

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie

Doktorský studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce



**Strukturní charakterizace biotechnologicky a
medicinálně významných proteinů**

Structural characterization of biotechnologically and
medicinally important proteins

Mgr. František Filandr

Školitel: RNDr. Petr Man, Ph.D.

Praha 2020

Abstrakt (In Czech)

Velké množství biologických procesů je závislé na strukturní dynamice proteinů a specifických protein-proteinových, nebo protein-ligandových interakcích závislých na specifických podmínkách uvnitř, či vně buněk. Analýza struktury proteinů klasickými metodami jako je rentgenová krystalografie, NMR, nebo nově kryo-EM poskytuje důležité struktury s atomárním rozlišením, avšak většinou ukazuje pouze statický obrázek bez detailů o dynamice, nebo transientních interakcích, a navíc často v nenativních podmínkách.

Tyto detaily může doplnit strukturní hmotnostní spektrometrie, která umí poskytnout informace o proteinové dynamice, interakcích proteinů s jinými molekulami a také o specifických meziatomových vzdálenostech v samotných proteinech, nebo mez interakčními partnery, to vše při relativně nativních podmínkách.

V této práci byla použita vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS), klasická proteomická analýza a turbidimetrie ke studiu biotechnologicky užitečných proteinů houbového celulolytického systému lytické polysacharidové monooxygenasy (LPMO) a celobiosadehydrogenasy (CDH) a rovněž fotosensitivní domény LOV2 pocházející z rostlinného fototropinu využitelné při fotodynamické terapii.

Pomocí těchto metod byla sledována celulolytická reakce katalyzovaná redukovaným enzymem LPMO v heterogenním roztoku mikrokrytalické celulosy a byly získány poznatky o změnách a dynamice struktury LPMO během reakce. Podstata destabilizace enzymu byla určena jako oxidativní degradace způsobená vedlejší reakcí hydroxidových radikálů generovaných aktivním centrem enzymu a byla rovněž strukturně popsána a vysvětlena stabilizace enzymu polysacharidovým substrátem. Byla rovněž potvrzena spekulovaná role H_2O_2 jako pravého kosubstrátu LPMO.

Analýza LOV2 pomohla vysvětlit dříve publikované zvýšení produkce singletového kyslíku (1O_2) při dlouhodobém ozáření, které je způsobené uvolněním FMN kofaktoru s vysokou efektivitou produkce 1O_2 do roztoku po oxidativní modifikaci cysteinu v blízkosti kofaktoru v molekule proteinu.

Klíčová slova: strukturní hmotnostní spektrometrie, vodík deuteriová výměna, lytická polysacharidová monooxygenasa (LPMO), celobiosadehydrogenasa (CDH), oxidativní modifikace, rozklad celulosy, turbidimetrie, fotosenzitivní protein, “light oxygen and voltage sensing domain” (LOV)

Abstract (in English)

A large number of biological processes depends on dynamics of protein structure and specific protein-protein and protein-ligand interactions occurring under specific native conditions in or outside of cells. Standard methods for protein structure analysis like x-ray crystallography, nuclear magnetic resonance or cryo-EM are able to obtain important atomic or near- atomic resolution protein structures, however these are usually a static snapshot of protein locked in a specific conformation and mostly in non-native conditions.

Structural mass spectrometry on the other hand, allows to describe protein structure dynamics, protein-protein and protein-ligand interactions and obtain inter- and intraprotein distance constraints between amino acid residues, all while working with proteins in their native conditions and needing only a fraction of sample.

In this work, hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) and classical proteomic approaches were used together with other methods to analyse biotechnologically important proteins of fungal cellulolytic system Lytic Polysaccharide Monooxygenase (LPMO) and Cellobiose Dehydrogenase (CDH) as well as plant-derived photosensitizer protein LOV2 with potential use in biologically targeted photodynamic therapy.

These methods allowed us to follow cellulolytic reaction of reduced LPMO even in heterogeneous solution of crystalline cellulose, obtaining insights into structural changes accompanying LPMO catalysis, mainly its notorious instability which we determined to be caused by oxidative modification of the protein, as well as verifying and structurally describing previously reported stabilisation of LPMO by suitable substrate. The recently speculated role of hydrogen peroxide as true LPMO cosubstrate was also confirmed.

Analysis of LOV2 protein then explained previously reported gradually increasing production of singlet oxygen upon protein irradiation as caused by a release of flavin cofactor into the solution, with interesting implications for biologically targeted photosensitizers.

Keywords: Structural mass spectrometry, hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS), lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO), cellobiose dehydrogenase (CDH), oxidative modification, cellulose degradation, turbidimetry, photosensitizer, light oxygen and voltage sensing domain (LOV)

1. Úvod

1.1. Struktura proteinů

Funkce proteinů úzce souvisí s jejich strukturou a často také s její dynamikou. Proteiny mohou reagovat lokální změnou struktury na podněty jako je například vazba substrátu nebo interakce s jiným proteinem. V některých případech dokonce dochází k výrazným strukturním změnám v rámci celého proteinu¹ nebo ke změnám vzájemné orientace jednotlivých domén vůči sobě². Během posledních čtyřiceti let umožnil rozvoj a neustálé vylepšování technik jako je rentgenová krystalografie, NMR nebo kryoelektronová mikroskopie vyřešení struktury tisíců rozličných proteinů s vysokým (atomárním nebo téměř atomárním) rozlišením. Přestože znalost struktury proteinu je nutný předpoklad pro pochopení jeho funkce, a právě na základě struktur získaných pomocí výše zmíněných technik bývají tvořeny hypotézy o funkci proteinů, jsou tyto struktury více nebo méně pouze statickým obrazem situace, jelikož je obtížné pomocí těchto metod zachytit dynamiku nebo slabší interakce proteinů s ligandy nebo dalšími proteiny. Metody řešení struktury proteinů s vysokým rozlišením navíc většinou vyžadují, aby byl protein ve vzorku přítomen ve vysoké koncentraci a často také v roztoku, jehož iontová síla a složení neodpovídají podmínkám nativního prostředí, což může vést k nepřesnostem při určování vztahu mezi strukturou proteinu a jeho funkcí.

K doplnění informací o strukturní dynamice proteinu v podmínkách, které se co nejvíce blíží těm nativním, jsou používány metody s nižším rozlišením založené na využití hmotnostní spektrometrie, které tak hrají důležitou roli na poli integrativní strukturní biologie. Tyto metody umožňují rychle analyzovat i velmi malá množství vzorku v různých typech heterogenních roztoků za podmínek blízkých nativním a mohou poskytnout informace o přístupnosti jednotlivých částí proteinu rozpouštědlu nebo o jejich účasti na tvorbě vodíkových můstků. Pomocí těchto metod lze také získat limity pro maximální vzdálenost jednotlivých částí proteinu nebo případně i různých proteinů od sebe, které se dále využívají ke zpřesňování strukturních modelů nebo k lokalizaci protein-proteinových interakcí³.

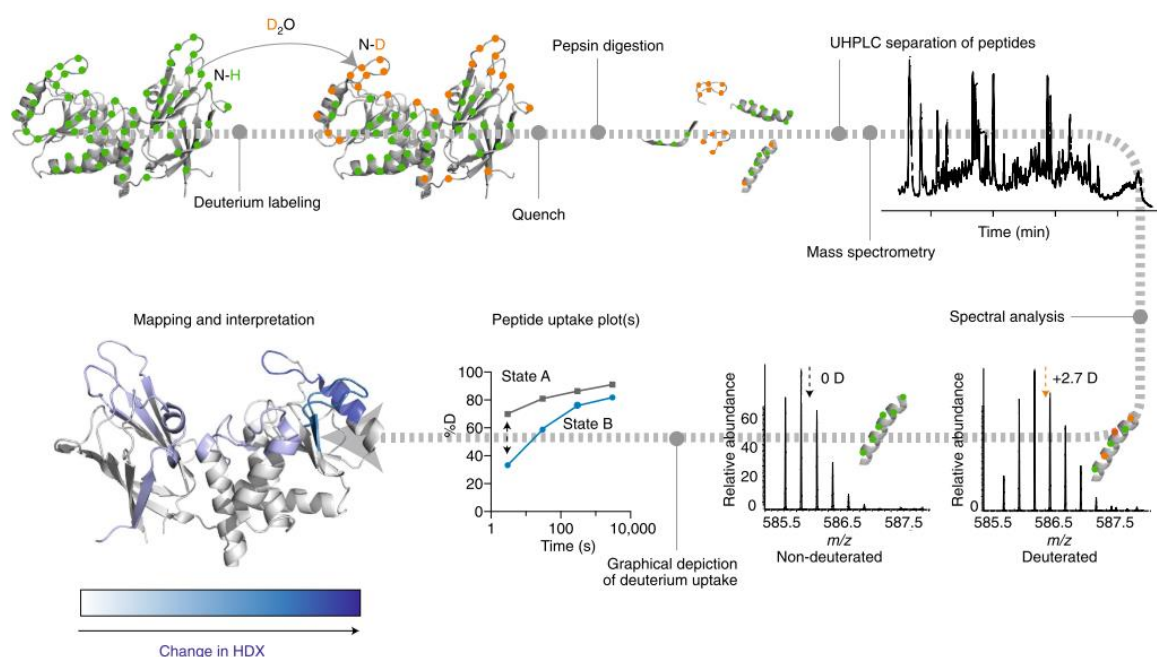
1.2. Strukturní hmotnostní spektrometrie

Strukturní hmotnostní spektrometrie umožňuje změřit přesnou hmotu ionizovaného analytu ve formě poměru hmoty k náboji (m/z). Metody strukturní hmotnostní spektrometrie pak dále využívají různé techniky kovalentního nebo nekovalentního značení k indukování lokalizované změny hmoty, která je analyzovatelná po rozštěpení proteinu ať už pomocí proteas (“bottom-up” přístup) nebo fragmentací v hmotnostním spektrometru (“top-down” přístup). Z polohy takto vytvořených značek na analyzovaném proteinu jsou poté vyvozovány informace o jeho struktuře. Techniky využívající měření hmoty proteinu jako celku zase umožňují získat informace o podjednotkovém složení proteinu, nebo mohou určit jeho kolizní průřez. V této práci byla využívána hlavně vodík/deuteriová výměna ve spojení s hmotnostní spektrometrií, a proto bude v tomto autoreferátu popsána detailněji.

Vodík/deuteriová výměna ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS) využívá nekovalentního značení, které se zakládá na výměně vodíků v proteinu za deuteria po přemístění analyzovaného proteinu do roztoku D_2O . Při následné hmotnostně spektrometrické analýze je detekováno a počítáno specifické zvýšení hmoty vzniklé v důsledku vodík/deuteriové výměny. Rychlost této výměny je ovlivněna přístupností vyměnitelných vodíků rozpouštědлу, jejich účastí ve vodíkových můstcích a lokální konformací a její dynamikou⁴. Z těchto důvodů se může ve složených proteinech rychlost výměny velmi lišit a to na škále od minut až po měsíce⁵. Z rychlosti výměny v jednotlivých částech proteinu lze potom vyvodit širokou škálu informací od struktury proteinu a její dynamiky⁶, přes protein-proteinové interakce^{7,8}, až po interakce proteinů s jejich ligandy⁹. Analyzovaný vzorek může v principu být značen v jakémkoliv rozpouštědle kompatibilním s ESI ionizací a dokonce i v heterogenních roztocích¹⁰, což dává HDX-MS výhodu oproti metodám s vysokým rozlišením, jako je rentgenová krystalografie nebo NMR, v možnosti analyzovat protein za podmínek bližších nativním.

Většina HDX-MS experimentů se provádí způsobem *kontinuálního značení* (**Obr. 1, strana 5**)¹¹, kdy je protein po různě dlouhé časové intervaly inkubován v 80-90% D_2O . Výsledkem je postupný nárůst deuterace a sledovány jsou změny v tomto nárůstu za různých podmínek, například za přítomnosti nebo nepřítomnosti ligandu. Po uplynutí daného času inkubace je výměnná reakce ukončena snížením pH na hodnotu 2,5 při kterém probíhá vodík/deuteriová výměna jen minimálně a většinou také rychlým zmražením v tekutém dusíku. Cílem těchto kroků je zabránit zpětné výměně deuterií za vodíky během následné

analýzy¹¹. Při analýze deuterovaných vzorků se většinou používá tzv. „bottom-up“ přístup, pro který je charakteristické využití proteas pro rozštěpení analyzovaného vzorku na peptidy a jejich následná analýza pomocí HPLC-ESI-MS. Míra deuterace je posléze určena po každém jednotlivém peptidu a prostorové rozlišení proto velmi závisí na kvalitě proteolýzy. Jelikož štěpení musí probíhat za nízkého pH, bývá k němu typicky využíván pepsin, jehož výhodou je také nízká specifita, která umožňuje vznik překrývajících se peptidů sloužících k výpočtu míry deuterace v překrývajících se oblastech, což vede ke zvýšení rozlišení¹². Kromě pepsinu byla k využití pro štěpení za HDX podmínek vyvinuta i řada dalších proteas^{13,14}.

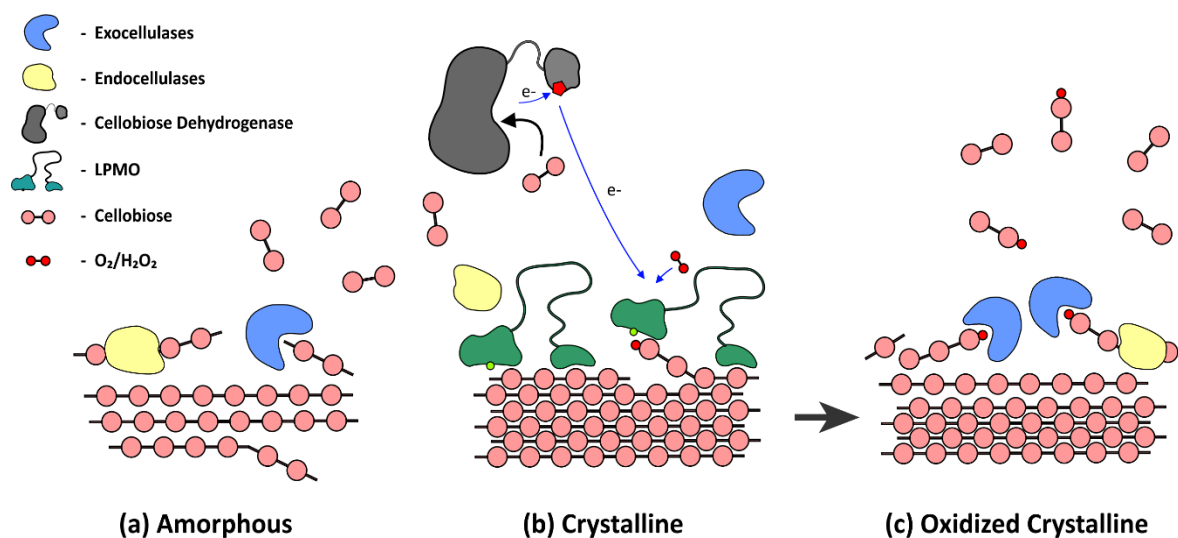


Obrázek 1: Schéma typického “bottom-up” HDX experimentu. Vzorek je inkubován v D₂O a jsou odebírány alikvoty vždy po uplynutí dané doby inkubace. Deuterace je zastavena snížením pH a teploty. Následuje proteolytické štěpení, které často probíhá „online“ na koloně zapojené do LC systému, a LC-MS analýza. Míra deuterace je pro každý peptid vypočtena z průměrné změny jeho hmoty.

1.3. Celulolytický systém hub – LPMO a CDH

Celulolytický systém hub je příkladem komplexního enzymového systému, kde dynamika proteinů hraje zásadní roli. Mezi enzymy tohoto systému patří lytická polysacharidová monooxygenasa (LPMO) a celobiosadehydrogenasa (CDH) (**Obr. 2**).

LPMO je celulolytický enzym patřící mezi oxidoreduktasy obsahující měď v aktivním místě. Je produkován hlavně u bakterií¹⁵ a hub¹⁶, ale lze ho nalézt i u několika dalších



Obrázek 2: Schématické zobrazení celulolytického systému hub se zaměřením na CDH a LPMO. Amorfni celuloza (a) je snadno přístupná pro endo- a exocelulasy a proto je jimi rychle štěpena na mono a disacharidy. Krystalická celuloza (b) je stericky velmi špatně přístupná a aby mohla být štěpena, potřebuje LPMO enzymy s plochými katalytickými místy, které dokáží tato místa oxidativním štěpením zpřístupnit (c).

organismů^{17,18}. Aktivní místo tohoto enzymu se nachází na ploché části jeho povrchu a ve chvíli, kdy je měď přítomná v tomto místě redukována, ať už redoxním partnerem CDH, nebo některým z nízkomolekulárních reduktantů, z Cu⁺² na Cu⁺¹, je LPMO schopno vazby na svůj polysacharidový substrát^{19,20}. Redukovaný iont mědi pak dále váže buď kyslík^{21,22} a nebo peroxid voíku^{23,24} za tvorby reaktivních forem kyslíku. Vzniklé radikály následně oxidativně štěpí β -(1→4) glykosidickou vazbu a to v závislosti na typu LPMO buďto v C1 nebo C4 místě^{25,26}. Přestože LPMO enzymy již v biotechnologickém průmyslu využívány jsou, je jejich nejvýraznějším omezením jejich nízká stabilita v průběhu katalýzy a bývá tedy poněkud obtížné reakci optimalizovat. Příčiny této nízké stability byly zatím zkoumány pouze okrajově v několika studiích zabývajících se teplotní stabilitou a strukturálními změnami v průběhu katalýzy^{20,27}, nicméně předpokládá se, že by mohla být způsobena oxidativním poškozením vzniklým v důsledku boční reakce²³. Předmětem diskuse je také druh kosubstrátu, jelikož byla v poslední době publikována řada studií s tvrzením, že pravým kosubstrátem LPMO je H₂O₂ a O₂ je ve skutečnosti jen meziproduct, což by z LPMO dělalo peroxigenasu místo monooxygenasy^{19,23,24,28,29}. Tato tvrzení jsou ovšem v rozporu s tím, co se dříve tvrdilo, tedy že O₂ je přímo využíván LPMO enzymy jako kosubstrát k oxidaci polysacharidového substrátu^{2,22,30}. Z těchto důvodů je studium strukturální dynamiky LPMO během katalýzy i zjištění druhu kosubstrátu důležité pro objasnění funkce tohoto enzymu.

CDH (EC 1.1.99.18) je do této chvíle jediný známý extracelulární flavocytochrom³¹. Skládá se ze dvou funkčních domén spojených flexibilní oblastí, a to z N-koncové cytochromové domény (CYT) obsahující hem *b* a z C-koncové dehydrogenasové domény (DH), která obsahuje kofaktor flavinadenindinukleotid (FAD)^{2,32}. Oxidace celobiosy nebo jiných malých sacharidů jako je laktosa nebo glukosa³³ probíhá na DH doméně za současné redukce FAD kofaktoru na FADH₂. Z FADH₂ jsou pak elektrony přenášeny na CYT doménu, a to ve dvou krocích po jednom elektronu přímým mezidoménovým elektronovým přenosem (IDET). Z CYT domény jsou elektrony nakonec přeneseny na jejich finální akceptor, kterým je většinou iont mědi v aktivním místě LPMO, jehož redukce spustí oxidativní depolymeraci celulosy katalyzovanou LPMO². IDET je nejdůležitějším krokem pro funkci CDH a zároveň je také krokem, který určuje rychlost předávání elektronů z CDH na jiné molekuly³⁴. Bylo zjištěno, že v průběhu tohoto přenosu dochází ke změnám konformace CDH a to tak, že vzájemná pozice domén se střídá mezi „zavřenou“ a „otevřenou“ s tím, že flexibilní oblast slouží jako oddělovač³². Existuje hypotéza, že rozsah vzájemné interakce domén je do velké míry řízen rozložením elektrostatických nábojů na interakčním rozhraní, které při dosažení daného pH optima sníží elektrostatický odpor mezi doménami^{35–37}. Velmi důležitou vlastností CDH je také to, že elektrony mohou kromě LPMO být přeneseny i na jiné molekuly s vhodným redoxním potenciálem nebo dokonce na povrch elektrody³³, čehož se využívá při výrobě biosenzorů založených na pokrytí povrchu elektrody imobilizovaným CDH. Porozumění strukturním změnám probíhajícím na CDH při IDET a znalost parametrů, které mohou ovlivnit přenos elektronů je proto podstatná pro možnost dalších úprav CDH enzymů k jejich využití v biotechnologickém průmyslu.

1.4. Fotosenzitivní protein LOV2

V další části této práce byla studována fotosenzitivní doména LOV2 fototropinu pocházejícího z ovsa setého (*Avena sativa*). Fotosenzitivní látky jsou sloučeniny, které po absorpci světla určité vlnové délky jsou schopné z kyslíku tvořit jeho specifické reaktivní formy (ROS). Využívají se pro antimikrobiální fotodynamickou inaktivaci (aPDI)³⁸, fotodynamickou terapii (PDT)³⁹, léčbu rakoviny nebo při studiu buněčné signalizace zprostředkované ROS⁴⁰. Exogenní fotosenzitivní barviva nejsou při využití v PDT příliš efektivní kvůli jejich toxicitě, neschopnosti zacílit je na konkrétní typ buněk a omezené farmakokinetice. Z toho důvodu byly vyvinuty fotosenzitivní látky vložené do genetického

kódu s tím, že z těch, které se v současnosti využívají, většinu tvoří flavoproteinu obsahující FMN nebo FAD odvozené od “light, oxygen and voltage sensing” (LOV) fotosenzitivní domény rostlinného a mikrobiálního fototropinu⁴¹. Fotoreceptory LOV se objevují u archeí, bakterií, hub a rostlin a jsou zodpovědné za fyziologické reakce odpovídající na přítomnost světla nebo ROS jako je fototropismus, pohyb chloroplastů, cirkadiánní rytmy nebo všeobecná reakce na stres⁴². V reakci na ozáření světlem produkuje LOV2 vysoce reaktivní singletový kyslík $^1\text{O}_2$, který pak oxidativně modifikuje dostupné makromolekuly, což ve větším množství může vézt až ke smrti buňky⁴³. V průběhu fotocyklu je signál přenášen díky strukturální reorganizaci LOV domény, která následuje po vzniku kovalentní vazby mezi cysteinem v aktivním místě proteinu a C4 atomem isoalloxasinového kruhu flavinu (patřícímu FAD nebo FMN) jenž je katalyzován ozáření modrým světlem. Nicméně byly také objeveny LOV varianty postrádající cystein schopné tvorby většího množství radikálů po ozáření. Pro zvýšení výtěžku ROS jsou vytvářeny proteiny jako je miniSOG (z anglického mini Singlet Oxygen Generator) pro jejichž návržení je důležité znát přesnou strukturu proteinu včetně detailní znalosti způsobu vzniku ROS u v přírodě se vyskytujících fotosenzitivních proteinů⁴⁴. Tato práce je příspěvkem ke studii, v níž byla zkoumána struktura a funkce jedné takové fotosenzitivní domény pocházející z rostliny *Avena sativa* - *AsLOV2*⁴⁵ za účelem vysvětlení postupně se zvyšující tvorby singletového kyslíku po ozáření, která u ní byla pozorována.

2. Cíle disertační práce

Cílem této práce bylo popsat strukturní aspekty aktivity enzymů celulolytického systému hub CDH a LPMO a fotosenzitivního proteinu LOV2 za využití metod strukturní hmotnostní spektrometrie.

Konkrétní cíle byly:

- Charakterizovat interakci celobiosadehydrogenasy s lytickou polysacharidovou monooxygenasou
- Charakterizovat strukturní stabilitu LPMO a strukturní změny doprovázející inaktivaci LPMO v průběhu katalýzy
- Objasnit skutečný kosubstrát LPMO
- Popsat strukturní změny proteinu AsLOV2 objevující se při ozáření světlem a tvorbě reaktivních forem kyslíku

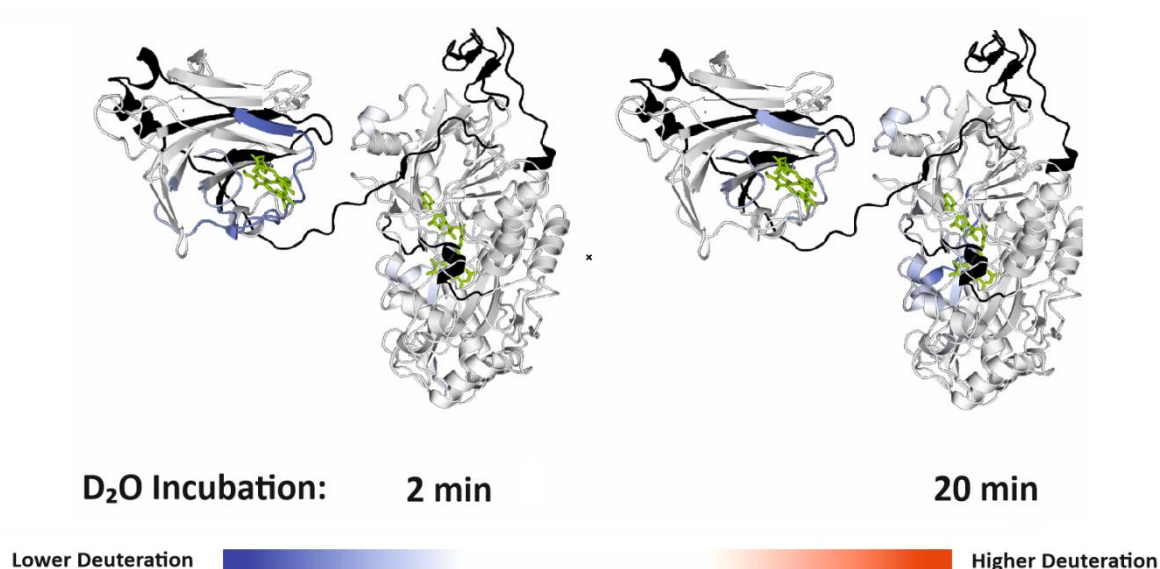
3. Výsledky a diskuse

3.1. Výzkum enzymů celulólytického enzymového systému hub

Houbové celulólytické enzymy LPMO a CDH jsou v současné době předmětem výzkumu hlavně kvůli možnosti jejich využití k sacharifikaci biomasy obsahující lignocelulosu (LPMO) a k výrobě biosenzorů (CDH). Aktivita těchto enzymů nicméně stále ještě není úplně prozkoumána, a to zejména kvůli složitosti celého systému obsahujícímu ROS a nerozpustné substráty. Příkladem dvou faktorů, které stále nejsou dokonale vysvětleny, jsou způsob interakce CDH s LPMO a notorická nestabilita LPMO během katalýzy^{20,23,27}.

HDX-MS a další metody byly využity k rozšíření současných poznatků o interakci CDH s LPMO, k popsání strukturních změn obou těchto proteinů objevujících se během katalýzy na nativním substrátu, k vysvětlení nízké stability LPMO a v neposlední řadě k potvrzení druhu jeho kosubstrátu.

Po počáteční optimalizaci pufru využívaného k zastavení deuterací reakce a proteolytického štěpení k získání co nejlepšího sekvenčního pokrytí byla provedena série HDX-MS experimentů s cílem najít interakční rozhraní proteinů *Neurospora crassa* CDH (*NcCDH-IIA*) a *Neurospora crassa* LPMO9C (*NcLPMO9C*) během přenosu elektronů z CDH na LPMO. Bylo pozorováno několik různých efektů, ale žádný z nich neukazoval na přítomnost přesně definovaného interakčního rozhraní. Nicméně slabé známky interakce byly nalezeny v podobě rozvolnění struktury v okolí aktivního místa LPMO v případě, že CDH a LPMO byly spolu smíchány bez přítomnosti substrátu nebo redukčních činidel. Bohužel ani po zopakování experimentů s přidaným substrátem nebyl nalezen žádný jasný důkaz přítomnosti interakčního rozhraní ani na jednom z testovaných proteinů. Přestože žádná protein-proteinová interakce detekována nebyla, byl pozorován vliv redukce celobiosou na strukturu samotného CDH jakožto snížení míry deuterace na předpokládaném interakčním rozhraní obou jeho domén a v okolí FAD kofaktoru. To poukazuje na fakt, že přenos elektronů probíhal a redukce FAD ovlivňovala strukturu v jeho okolí (**Obr. 3**). Část z těchto výsledků byla využita ve studii zabývající se přenosem elektronů v CDH, která je diskutována níže, a dále už byly oba enzymy zkoumány odděleně. Interakce CDH-LPMO byla dále zkoumána našimi spolupracovníky za využití výpočetních technik v kombinaci s mutačními a enzymovými metodami a jejich výsledky byly nedávno publikovány v časopise *ACS Catalysis*⁴⁶.



Obrázek 3: Vliv celobiosy na redukci CDH zkoumaný pomocí HDX-MS. Protekci proti deuteraci lze pozorovat na interakčním rozhraní cytochromové i dehydrogenasové domény. Černě jsou vyznačeny nepokryté oblasti proteinu.

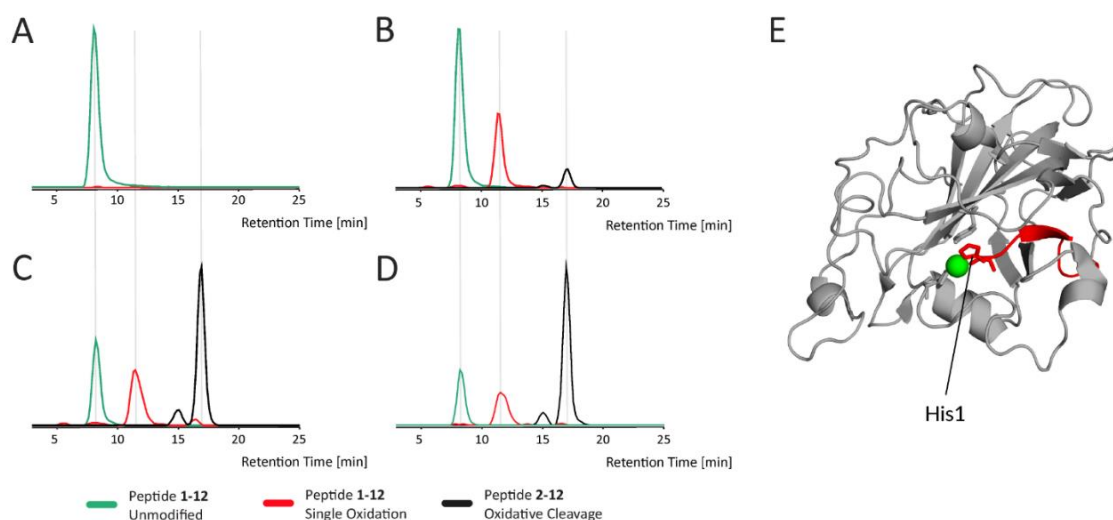
Byla také rozšířena studie publikovaná Kádkem et al.³⁷ provedením podrobné HDX-MS analýzy glykosylované a neglykosylované formy wild-type a mutované varianty CDH z houby *Crassiacarpon hotsonii*. Získané výsledky potvrdily hypotézu, že inhibice mezidoménového elektronového přenosu ve vyšším pH je způsobena elektrostatickým odpuzováním domén od sebe, což potvrzuje, že existuje možnost vytvořit CDH proteiny s cíleně posunutým pH optimem. Tato data jsou momentálně zpracovávána a výsledky analýzy funkční enzymové kinetiky a budou tvořit základ pro další publikaci.

3.1.1. Výzkum strukturní dynamiky LPMO v průběhu katalýzy (Publikace I)

Přestože studie zabývající se interakcí CDH-LPMO za redukujících podmínek nepoukázala na žádný výrazný efekt způsobený protein-proteinovou interakcí, byl pozorován rozsáhlý nárůst deuterace na proteinu LPMO. Tento efekt mohl být způsoben dříve navrženou možností degradace LPMO vlivem reaktivních forem kyslíku⁴⁷, což bylo předmětem našeho dalšího výzkumu.

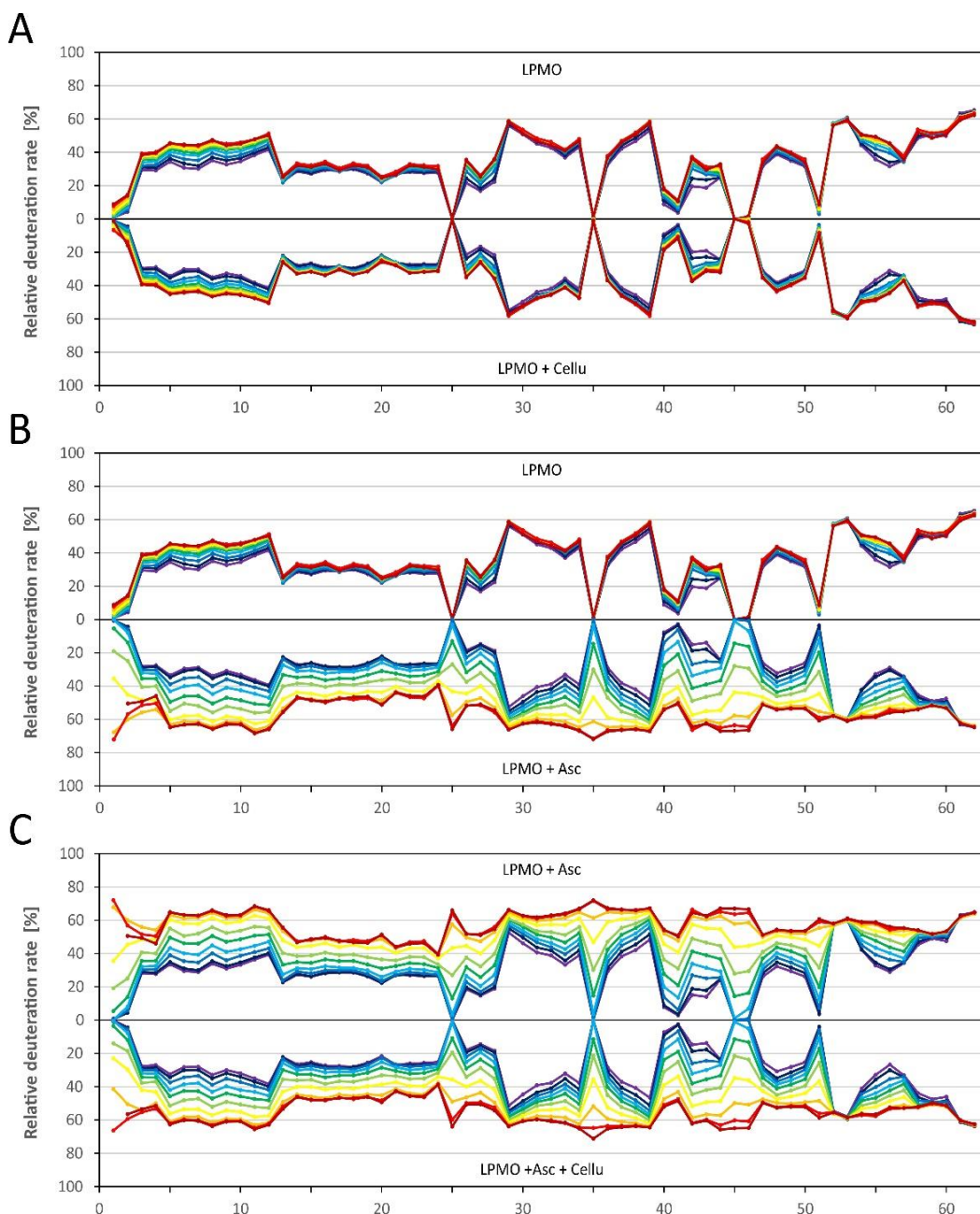
HDX-MS analýza redukovaného LPMO odhalila dva různé efekty. První z nich se projevil jako pokles deuterace peptidů pocházejících z okolí iontu mědi v aktivním místě

v krátkých časech deuterace a byl pravděpodobně způsoben již dříve pozorovanými strukturálními změnami způsobenými redukcí iontu mědi²⁰. Druhým pozorovaným efektem pak byl velmi výrazný nárůst deuterace objevující se nejprve v okolí aktivního místa a postupně se rozšiřující do celého proteinu s delšími časy inkubace. Současně s tím se snižovala intenzita signálu postižených peptidů. Tento efekt je pravděpodobně následkem rozvolňování struktury a degradace způsobené oxidativním poškozením vlivem ROS vznikajících v aktivním místě, což bylo následně potvrzeno nalezením řady oxidativních modifikací včetně produktů oxidativního štěpení na peptidech z okolí aktivního místa pomocí LC-MS/MS analýzy (**Obr. 4**).



Obrázek 4. Monitorování průběhu oxidativních modifikací na LPMO hmotnostní spektrometrií. Extrahované iontové chromatogramy N-terminálního peptidu LPMO (1-12) obsahujícího koncový His 1, který se účastní vazby mědi v aktivním centru. LPMO bylo inkubováno (A) samostatně po dobu 30 minut, nebo s 5mM kyselinou askorbovou po dobu (B) 10 minut, (C) 20 minut, nebo (D) 30 minut. Protein byl následně štěpen proteázou Asp-N a analyzován pomocí LC-MS/MS. Chromatogramy ukazují signály nemodifikované (zelený), oxidované (+O; červený) a oxidativně štěpené (-His, +C, +O, černý) formy peptidu. Umístění peptidu a koncového Histidinu je zvýrazněno na modelové struktuře (E). Zeleně je zvýrazněn iont mědi.

Nedávno bylo popsáno, že polysacharidový substrát zvyšuje stabilitu LPMO²⁰. Aby byl tento jev ověřen, byla provedena sada dalších HDX-MS experimentů s mikrokrytalickou celulosou (**Obr.5, strana 13**). Aby bylo možné do reakční směsi nerozpustnou celulosu přidat, bylo nutné mezi mražení a zastavení reakce přidat rychlou centrifugační filtraci na její odstranění před LC-MS analýzou při zachování co možná nejnižší míry zpětné výměny vodíků. To vyžadovalo opatrnou selekci a testování různých centrifugačních filtrů, neboť se například ukázalo, že filtry založené na nylonu kontaminují vzorky za podmínek zastavené



Obrázek 5: HDX-MS experiment s LPMO v přítomnosti kyseliny askorbové a krystalické celulosy. Časové body jsou 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 a 45 minut a odpovídají barvám od fialové po červenou seřazeným podle pořadí ve viditelném spektru. Osa X značí všechny analyzované peptidy v jejich sekvenčním pořadí. Osa Y znázorňuje míru deuterační daného peptidu.

reakce a způsobují výrazné problémy při hmotnostně spektrometrické analýze⁴⁸.

Výsledky tohoto HDX-MS experimentu ukázaly, že zvýšení deuterační na LPMO při jeho redukcí v přítomnosti celulosy se projevuje na stejných peptidech jako bez celulosy, avšak přítomnost substrátu zpomalila nástup zvýšení deuterační globálně o několik časových bodů.

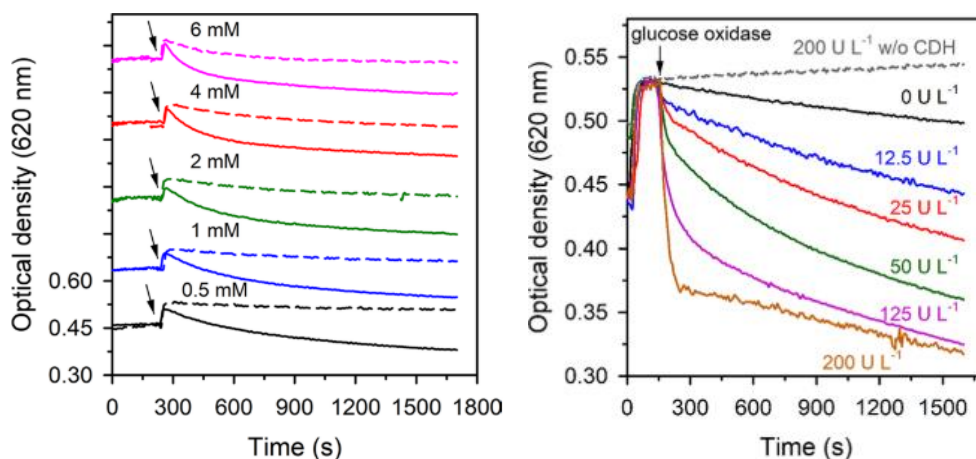
Zdá se tedy, že přítomnost vhodného množství celulosy chrání protein před oxidativním poškozením, nejspíš absorbováním určitého množství kyslíkových radikálů vznikajících v aktivním centru LPMO. Podobné výsledky byly publikovány jinou skupinou v průběhu psaní našeho manuskriptu¹⁹.

Pro ověření toho, jak se na deuteraci proteinu projeví odstranění mědi za aktivního centra enzymu, byla analyzována apoforma LPMO, kdy byl iont mědi odstraněn chemicky. Bylo zjištěno, že odstranění mědi způsobují charakteristické změny na struktuře aktivního centra a snižuje celkovou tepelnou stabilitu proteinu. Nedávná publikace však ukázala, že iont mědi zůstává na LPMO navázán desítky minut i za zvýšené teploty²⁰, což znamená, že námi popsaná destabilizace LPMO soustředěná do aktivního místa enzymu nebude primárně způsobena uvolněním mědi, přestože měď je pro konformaci aktivního místa důležitá.

3.1.2. Sledování H₂O₂-dependentní celulolytické aktivity LPMO (Publikace II)

Další experimenty byly zaměřeny na potvrzení, či vyvrácení teorie, že H₂O₂ je ve skutečnosti pravý kosubstrát LPMO^{23,28}. Pro tuto práci byl pro kontinuální měření modifikován již dříve použitý turbidimetrický protokol, umožňující sledovat celulolytickou aktivitu LPMO jako změnu optické density roztoku po určité době inkubace⁴⁹.

Vzhledem k tomu, že kyselina askorbová, široce používaná jako reduktant LPMO, je schopná v roztoku produkovat H₂O₂, byl proveden turbidimetrický experiment s různým množstvím kyseliny askorbové, přičemž i nejmenší koncentrace byla již saturující pro redukci LPMO. Rovněž byly provedeny experimenty s glukosaoxidasou (GOX) pro sledování aktivity LPMO při průběžné cílené produkci H₂O₂. Byla pozorována zvyšující se aktivita, úměrná množství kyseliny askorbové nebo glukosaoxidasy. Především bylo také zjištěno, že tato celulolytická aktivita je inhibovaná katalasou, jak při přítomnosti kyseliny askorbové, tak glukosaoxidasy (**Obr. 6, strana 15**) a dokonce je katalasou inhibována i reakce, kdy je k redukci LPMO použit její přirozený redoxní partner CDH v přítomnosti celobiosy a není jinak cíleně produkován žádný H₂O₂. To může sloužit jako důkaz toho, že H₂O₂ v tomto ději skutečně i hraje roli, a to i při nativních podmínkách. Zvýšená produkce oxidovaných oligosacharidů při dodání H₂O₂ do reakce byla rovněž ověřena pomocí MALDI-MS a byla elektrochemicky potvrzena spotřeba H₂O₂ během reakce.



Obrázek 6: Turbidimetrické měření celulytické aktivity LPMO s různými koncentracemi kyseliny askorbové a GOX. A) V přítomnosti kyseliny askorbové. Čas přidavku kyseliny askorbové je indikován černou šipkou. Prvotní nárůst absorbance je dán vazbou LPMO na substrát. Postupné snížení absorbance od bodu přidavku kyseliny askorbové ukazuje celulytickou aktivitu (snížení turbidity roztoku). Přerušované čáry značí identické reakce s přidavkem 2000U/ml katalasy. B) V přítomnosti GOX. Čas přidavku GOX je indikován černou šipkou. Redukce byla v tomto případě zajištěna přítomností malého množství CDH doplněného celobiosou.

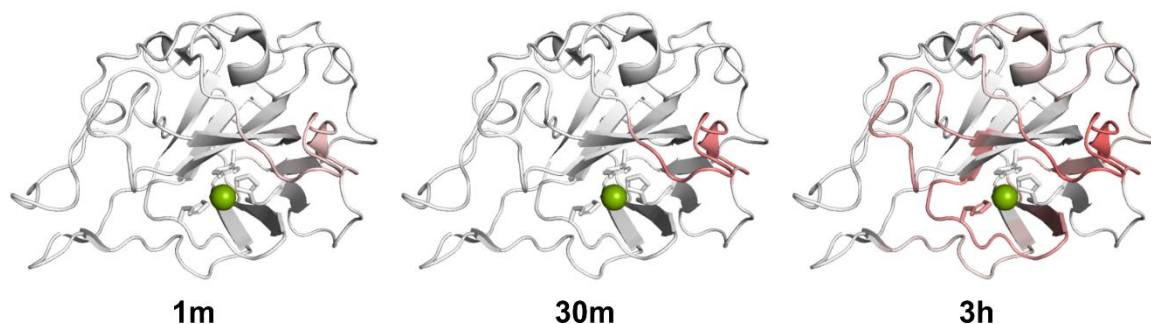
3.1.3. Studie elektronových přenosů v CDH (Publikace III)

Tato studie, aktuálně v recenzním řízení v časopise *ASC Catalysis*, je zaměřená na studium elektronových přenosů v CDH pocházejícím z houby *Neurospora crassa* a to jak mezidoménového přenosu (IDET), mezi CYT a DH doménou v rámci CDH, tak meziproteinového přenosu elektronů (IPET) z CYT domény CDH na finální akceptor. Během této práce byly připraveny chimérické proteiny složené z kombinací CYT a DH domén a flexibilních částí, pocházejících z dvou typů CDH, *NcCDHIIA* a *NcCDHIIIB*. Jejich vlastnosti byly poté analyzovány elektrochemicky a pomocí molekulárního dokování.

Kinetická měření ukázala, že různé proteiny vykazují rozdíly v rychlosti redukce FAD kofaktoru celobiosou v závislosti na identitě DH domény, různé CYT domény však neměly na tuto redukci vliv. Chimérické proteiny vykazovaly posunuté pH optimum a sníženou rychlost IDET. Modelování domén ukázalo, že klíčovým faktorem pro efektivní IDET je relativní vzdálenost domén a nízká kompatibilita interakčních rozhraní a delší flexibilní část mezi doménami způsobuje preferenci proteinu k otevřené konformaci, ve které jsou domény dále od sebe.

Data z předchozích HDX-MS experimentů sledující interakci nechimerického

NcCDHIIA s *NcLPMO9C* byla využita v této studii (**Obr.7**). Z dat vyplývá, že interakce CDH a LPMO ovlivňuje pouze peptidy aktivního centra LPMO. Nebyla tedy potvrzena předchozí hypotéza o interakce na opačné straně LPMO a tunelování elektronů skrz strukturu⁵⁰.



Obrázek 7: Sledování interakce *NcCDHIIA* a *NcLPMO9C* pomocí HDX-MS. Interakce byla sledována v oxidovaném stavu, kvůli rapidní degradaci LPMO po redukcí. Vliv na strukturu byl pozorován na LPMO v blízkosti aktivního centra s iontem mědi, což poukazuje na přímý kontakt domén CDH a LPMO. Žádný jiný efekt nebyl na proteinu pozorován.

Bylo také provedeno měření IPET mezi wild-type nebo chimérickými CDH a *NcLPMO9C*, které ukázalo, že chimérické proteiny preferující otevřenou konformaci a mající tak nižší IDET, mají ale naopak vyšší IPET.

3.1.4. Shrnutí studie LPMO a CDH

Po shrnutí všech výsledků získaných **Publikacích I, II a III** můžeme konstatovat, že H₂O₂ je skutečně kosubstrát LPMO, který je potřebný pro celulolytickou aktivitu tohoto enzymu a O₂, který byl dříve považován za kosubstrát LPMO, se stále více ukazuje jen jako intermediát. Pravděpodobný mechanismus LPMO zahrnující H₂O₂, poprvé navržený na konci roku 2018 a podrobněji pak popsán až na počátku tohoto roku^{19,29,51}, odpovídá naměřeným datům v **Publikaci II** a zároveň predikuje degradaci enzymu tak jak byla pozorována v **Publikaci I**. Spolu s pozorovanou stabilizací proteinu polysacharidovým substrátem můžeme konstatovat, že pro efektivní využití LPMO při průmyslové sacharifikaci celulosy je klíčové udržet enzym satureovaný substrátem pro eliminaci nežádoucí boční reakce způsobující degradaci proteinu, a doplňovat reakci vhodným množstvím H₂O₂ pro její urychlení.

Výsledky **Publikace III** poté ukazují, že hlavní faktor ovlivňující jak IDET, tak IPET v CDH je relativní vzdálenost domén, jejich flexibilita a komplementarita interakčních rozhraní. Poslední zatím nevydané výsledky ze studie mutovaného CDH poté ukazují možnost jak cíleně upravit CDH pro zachování schopnosti přenášet elektrony i za fyziologického pH a taktéž ukazují, že hyperglykosylace způsobená neideálním produkčním organismem *Pichia pastoris*, může přenos elektronů mezi doménami ovlivňovat. Tyto výsledky jsou důležité pro vývoj modifikovaných variant CDH s požadovanými vlastnostmi pro produkci biosensorů, či pro průmyslovou sacharifikaci celulósy.

3.2. Výzkum oxidativních procesů v *AsLOV2*

LOV2 doména z phototropin 1 rostliny *Avena sativa* (*AsLOV2*) je fotosenzitivní protein obsahující FMN a produkující reaktivní singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) po ozáření viditelným světlem. Pro sekvenčně podobný fotosenzitivní protein miniSOG (80% sekvenční identita) bylo zjištěno postupně se zvyšující kvantový výtěžek produkce $^1\text{O}_2$ během ozařování a kumulující se oxidativní modifikace v okolí FMN. Zvyšující se kvantový výtěžek nebyl zatím nijak vysvětlen a byl předmětem tohoto výzkumu, který byl proveden ve spolupráci s docentem Erikem Sedlákem z Centra Interdisciplinárních Biologických Věd v Košicích.

3.2.1. Studie nárůstu kvantového výtěžku *AsLOV2* (Publikace IV)

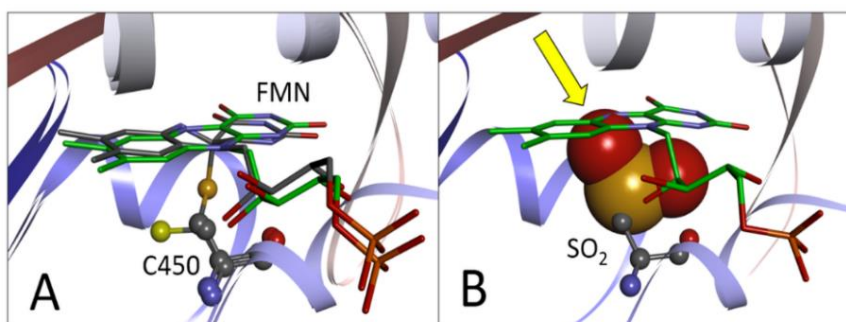
Pro analýzu produkce singletového kyslíku $^1\text{O}_2$ proteinem *AsLOV2* byl použit wild-type a mutovaný *AsLOV2* s cysteinem C450 zodpovědným za signalizační funkci proteinu nahrazeným za alanin, což by mělo mít za následek vyšší produkci kyslíkových radikálů.

Měření fosforescence $^1\text{O}_2$ ukázalo postupně se zvyšující výtěžek produkce $^1\text{O}_2$ po ozáření jak u wild-type *AsLOV2*, tak u *AsLOV2* C450A. Komplementární měření fluorescence FMN poté odhalilo, že uvolnění FMN do roztoku, výraznější u wild-type proteinu, je zodpovědné za zvýšenou produkci $^1\text{O}_2$, vzhledem k vyššímu kvantovému výtěžku volného FMN.

Pro pochopení uvolnění FMN z proteinu a objasnění změn na proteinu doprovázejících tento jev, byla využita „bottom-up“ a „top-down“ hmotnostní spektrometrie. Na obou formách *AsLOV2* byla odhalena široká škála oxidativních modifikací s tím, že výraznější míra modifikace, soustředěná do okolí FMN, byla detekována pro C450A variantu proteinu. To je zdánlivě v rozporu s nalezenou vyšší mírou produkce $^1\text{O}_2$ u wild-type formy, nicméně za vyšší produkci je zodpovědný FMN výrazněji uvolňovaný do roztoku u wild-type formy,

zatímco FMN ve větší míře navázané na C450A variantu produkuje $^1\text{O}_2$ lokálně a větší míra lokální oxidativní modifikace je tak pochopitelná.

Důležité bylo zjištění, že Cystein 450 ve wild-type *AsLOV2* je výrazně oxidativně modifikovaný. Simulace modifikace tohoto cysteinu z formy -SH na formu $-\text{SO}_2^-$ poukázala na vznikající sterickou kolizi (**Obr.8**), který je nejspíš zodpovědná za vypuzení FMN z proteinu, což vysvětluje vyšší míru uvolnění FMN do roztoku právě u wild-type proteinu.



Obrázek 8: **A)** Překryv modelů PDB ID: 2w0u (FMN se zeleně znázorněnými uhlíky) a PDB ID: 2v0w (FMN navázané na Cys450 s šedě znázorněnými uhlíky). **B)** substituce -SH za $-\text{SO}_2^-$ na C450 s označenou atomovou kolizí ve vygenerované struktuře.

Získané detaily produkce $^1\text{O}_2$ proteinem *AsLOV2* a uvolňování FMN do roztoku mohou být použity při přípravě efektivnějších geneticky kódovaných fotosenzitivních proteinů pro fotodynamickou terapii založených na LOV2 doméně, které by mohly mít díky své proteinové části schopnost biologicky cílit požadované tkáně a v daném místě uvolnit po ozáření FMN pro vytvoření vysoké lokální produkce kyslíkových radikálů.

4. Shrnutí

Cílem této disertační práce bylo přispět k rozšíření současného poznání o medicínálně a biotechnologicky významných enzymech s využitím metod strukturní hmotnostní spektrometrie. Níže uvedené výsledky, které byly získány při studiu houbových celulólytických enzymů lytické polysacharidové monooxygenasy a celobiosadehydrogenasy a fotosenzitivního proteinu *AsLOV2*, jsou součástí celkem tří publikací a dvou manuskriptů:

- Na proteinu *NcLPMO9C* byly pomocí HDX-MS pozorovány strukturní změny v průběhu katalýzy, a to konkrétně redukce iontu mědi v aktivním místě a následná degradace proteinu.
- Pomocí klasické proteomiky a pozorování intenzity signálů jednotlivých peptidů v HDX-MS byla nalezena primární příčina ztráty aktivity a degradace *NcLPMO9C* v průběhu katalýzy, a to oxidativní modifikace včetně štěpení peptidových vazeb
- Byl pozorován ochranný vliv substrátu na *NcLPMO9C* pomocí HDX-MS v heterogenní směsi *NcLPMO9C* s krystalickou celulosou.
- Pomocí turbidimetrické a chronoamperometrické analýzy roztoků obsahujících *NcLPMO9C*, celulosu upravenou kyselinou fosforečnou a různé generátory peroxidu vodíku, byl peroxid vodíku identifikován jako kosubstrát *NcLPMO9C*, jelikož všechny reakce byly inhibovány katalasou a aktivita enzymu byla úměrná množství přidaného peroxidu.
- Bylo zjištěno, že rychlost IDET a IPET u CDH silně závisí na vzájemném pohybu CYT a DH domén a jejich strukturní komplementaritě. Chimérické CDH proteiny s méně kompatibilními doménami a delší flexibilní oblastí preferují otevřenou konformaci a vykazují rychlejší IPET a pomalejší IDET.
- Oxidativní modifikace C450 na proteinu *AsLOV2* byla identifikována jako příčina uvolnění FMN do roztoku při delším ozařování proteinu, což pak dále způsobuje zvýšení produkce singletového kyslíku.

Použitá literatura

1. Pelech, S. Dimerization in protein kinase signaling. *J. Biol.* **5**, 1–7 (2006).
2. Tan, T.-C., Kracher, D., Gandini, R., Sygmund, C., Kittl, R., Haltrich, D., Hällberg, B. M., Ludwig, R. & Divne, C. Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation. *Nat. Commun.* **6**, 7542 (2015).
3. Allison, T. M. & Bechara, C. Structural mass spectrometry comes of age: new insight into protein structure, function and interactions. *Biochem. Soc. Trans.* **47**, 317–327 (2019).
4. Marcsisin, S. R. & Engen, J. R. Hydrogen exchange mass spectrometry: what is it and what can it tell us? *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 967–972 (2010).
5. Englander, S. W. & Kallenbach, N. R. Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids. *Q. Rev. Biophys.* **16**, 521–655 (1983).
6. Möller, I. R., Slivacka, M., Nielsen, A. K., Rasmussen, S. G. F., Gether, U., Loland, C. J. & Rand, K. D. Conformational dynamics of the human serotonin transporter during substrate and drug binding. *Nat. Commun.* **10**, 1687 (2019).
7. Trcka, F., Durech, M., Vankova, P., Chmelik, J., Martinkova, V., Hausner, J., Kadek, A., Marcoux, J., Klumpler, T., Vojtesek, B., Muller, P. & Man, P. Human Stress-inducible Hsp70 Has a High Propensity to Form ATP-dependent Antiparallel Dimers That Are Differentially Regulated by Cochaperone Binding. *Mol. Cell. Proteomics* **18**, 320–337 (2019).
8. Harrison, R. A. & Engen, J. R. Conformational insight into multi-protein signaling assemblies by hydrogen–deuterium exchange mass spectrometry. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **41**, 187–193 (2016).
9. Vankova, Salido, Timson, Man & Pey. A Dynamic Core in Human NQO1 Controls the Functional and Stability Effects of Ligand Binding and Their Communication across the Enzyme Dimer. *Biomolecules* **9**, 728 (2019).
10. Filandr, F., Kavan, D., Kracher, D., Laurent, C. V. F. P., Ludwig, R., Man, P. & Halada, P. Structural Dynamics of Lytic Polysaccharide Monooxygenase during Catalysis. *Biomolecules* **10**, 242 (2020).
11. Masson, G. R., Burke, J. E., Ahn, N. G., Anand, G. S., Borchers, C., Brier, S., Bou-assaf, G. M., Engen, J. R., Englander, S. W., Faber, J., Garlish, R., Griffin, P. R., Gross, M. L., Guttman, M., Hamuro, Y., Klinman, J. P., Konermann, L., Man, P., Mayne, L., Pascal, B. D., Reichmann, D., Skehel, M., Snijder, J., Strutzenberg, T. S., Underbakke, E. S., Wintrode, P. L., Zhang, Z., Zheng, J., Schriemer, D. C. & Rand, K. D. Recommendations for performing, interpreting and reporting hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) experiments. *Nat. Methods* **16**, (2019).
12. Gessner, C., Steinchen, W., Bédard, S., J. Skinner, J., Woods, V. L., Walsh, T. J., Bange, G. & Pantazatos, Di. P. Computational method allowing Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry at single amide Resolution. *Sci. Rep.* **7**, 3789 (2017).
13. Yang, M., Hoepfner, M., Rey, M., Kadek, A., Man, P. & Schriemer, D. C. Recombinant Nepenthesin II for Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **87**, 6681–6687 (2015).
14. Kadek, A., Mrazek, H., Halada, P., Rey, M., Schriemer, D. C. & Man, P. Aspartic Protease Nepenthesin-1 as a Tool for Digestion in Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **86**, 4287–4294 (2014).
15. Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørlic, M. & Eijsink, V. G. H. An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science (80-)*. **330**, 219–222 (2010).
16. Quinlan, R. J., Sweeney, M. D., Lo Leggio, L., Otten, H., Poulsen, J.-C. N. J.-C. N. J.-C. N., Johansen, K. S., Krogh, K. B. R. M., Jørgensen, C. I., Tovborg, M., Anthonsen, A., Tryfona, T., Walter, C. P., Dupree, P., Xu, F.,

- Davies, G. J., Walton, P. H., Jorgensen, C. I., Tovborg, M., Anthonsen, A., Tryfona, T., Walter, C. P., Dupree, P., Xu, F., Davies, G. J. & Walton, P. H. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 15079–15084 (2011).
17. Chiu, E., Hijnen, M., Bunker, R. D., Boudes, M., Rajendran, C., Aizel, K., Oliéric, V., Schulze-Briese, C., Mitsuhashi, W., Young, V., Ward, V. K., Bergoin, M., Metcalf, P. & Coulibaly, F. Structural basis for the enhancement of virulence by viral spindles and their in vivo crystallization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 3973–3978 (2015).
 18. Sabbadin, F., Hemsworth, G. R., Ciano, L., Henrissat, B., Dupree, P., Tryfona, T., Marques, R. D. S., Sweeney, S. T., Besser, K., Elias, L., Pesante, G., Li, Y., Dowle, A. A., Bates, R., Gomez, L. D., Simister, R., Davies, G. J., Walton, P. H., Bruce, N. C. & McQueen-Mason, S. J. An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion. *Nat. Commun.* **9**, 1–12 (2018).
 19. Loose, J. S. M., Arntzen, M. Ø., Bissaro, B., Ludwig, R., Eijsink, V. G. H. & Vaaje-Kolstad, G. Multipoint Precision Binding of Substrate Protects Lytic Polysaccharide Monooxygenases from Self-Destructive Off-Pathway Processes. *Biochemistry* **57**, 4114–4124 (2018).
 20. Kracher, D., Andlar, M., Furtmüller, P. G. & Ludwig, R. Active-site copper reduction promotes substrate binding of fungal lytic polysaccharide monooxygenase and reduces stability. *J. Biol. Chem.* **293**, 1676–1687 (2018).
 21. Frandsen, K. E. H., Simmons, T. J., Dupree, P., Poulsen, J.-C. N., Hemsworth, G. R., Ciano, L., Johnston, E. M., Tovborg, M., Johansen, K. S., von Freiesleben, P., Marmuse, L., Fort, S., Cottaz, S., Driguez, H., Henrissat, B., Lenfant, N., Tuna, F., Baldansuren, A., Davies, G. J., Lo Leggio, L. & Walton, P. H. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 298–303 (2016).
 22. Kjaergaard, C. H., Qayyum, M. F., Wong, S. D., Xu, F., Hemsworth, G. R., Walton, D. J., Young, N. A., Davies, G. J., Walton, P. H., Johansen, K. S., Hodgson, K. O., Hedman, B. & Solomon, E. I. Spectroscopic and computational insight into the activation of O₂ by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 8797–8802 (2014).
 23. Bissaro, B., Röhr, Å. K., Müller, G., Chylenski, P., Skaugen, M., Forsberg, Z., Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. H. Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 1123–1128 (2017).
 24. Kuusk, S., Bissaro, B., Kuusk, P., Forsberg, Z., Eijsink, V. G. H. H., Sørli, M. & Väljamäe, P. Kinetics of H₂O₂-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **293**, 523–531 (2018).
 25. Beeson, W. T., Phillips, C. M., Cate, J. H. D. & Marletta, M. A. Oxidative Cleavage of Cellulose by Fungal Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 890–892 (2012).
 26. Bennati-Granier, C., Garajova, S., Champion, C., Grisel, S., Haon, M., Zhou, S., Fanuel, M., Ropartz, D., Rogniaux, H., Gimbert, I., Record, E. & Berrin, J.-G. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*. *Biotechnol. Biofuels* **8**, 90 (2015).
 27. Singh, R. K., Blossom, B. M., Russo, D. A., van Oort, B., Croce, R., Jensen, P. E., Felby, C. & Bjerrum, M. J. Thermal unfolding and refolding of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Thermoascus aurantiacus*. *RSC Adv.* **9**, 29734–29742 (2019).
 28. Müller, G., Chylenski, P., Bissaro, B., Eijsink, V. G. H. & Horn, S. J. The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail. *Biotechnol. Biofuels* **11**, 209 (2018).
 29. Jones, S. M., Transue, W. J., Meier, K. K., Kelemen, B. & Solomon, E. I. Kinetic analysis of amino acid radicals

- formed in H₂O₂-driven Cu I LPMO reoxidation implicates dominant homolytic reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 11916–11922 (2020).
30. Kim, S., Stahlberg, J., Sandgren, M., Paton, R. S. & Beckham, G. T. Quantum mechanical calculations suggest that lytic polysaccharide monooxygenases use a copper-oxyl, oxygen-rebound mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 149–154 (2014).
 31. Zamocky, M., Ludwig, R., Peterbauer, C., Hallberg, B., Divne, C., Nicholls, P. & Haltrich, D. Cellobiose Dehydrogenase – A Flavocytochrome from Wood-Degrading, Phytopathogenic and Saprotrophic Fungi. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**, 255–280 (2006).
 32. Harada, H., Onoda, A., Uchihashi, T., Watanabe, H., Sunagawa, N., Samejima, M., Igarashi, K. & Hayashi, T. Interdomain flip-flop motion visualized in flavocytochrome cellobiose dehydrogenase using high-speed atomic force microscopy during catalysis. *Chem. Sci.* **8**, 6561–6565 (2017).
 33. Ludwig, R., Ortiz, R., Schulz, C., Harreither, W., Sygmund, C. & Gorton, L. Cellobiose dehydrogenase modified electrodes: advances by materials science and biochemical engineering. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 3637–3658 (2013).
 34. IGARASHI, K., MOMOHARA, I., NISHINO, T. & SAMEJIMA, M. Kinetics of inter-domain electron transfer in flavocytochrome cellobiose dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. J.* **365**, 521–526 (2002).
 35. Kracher, D., Zahma, K., Schulz, C., Sygmund, C., Gorton, L. & Ludwig, R. Inter-domain electron transfer in cellobiose dehydrogenase: modulation by pH and divalent cations. *FEBS J.* **282**, 3136–3148 (2015).
 36. Kadek, A., Kavan, D., Felice, A. K. G., Ludwig, R., Halada, P. & Man, P. Structural insight into the calcium ion modulated interdomain electron transfer in cellobiose dehydrogenase. *FEBS Lett.* **589**, 1194–1199 (2015).
 37. Kadek, A., Kavan, D., Marcoux, J., Stojko, J., Felice, A. K. G., Cianférani, S., Ludwig, R., Halada, P. & Man, P. Interdomain electron transfer in cellobiose dehydrogenase is governed by surface electrostatics. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1861**, 157–167 (2017).
 38. Endres, S., Wingen, M., Torra, J., Ruiz-González, R., Polen, T., Bosio, G., Bitzenhofer, N. L., Hilgers, F., Gensch, T., Nonell, S., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. An optogenetic toolbox of LOV-based photosensitizers for light-driven killing of bacteria. *Sci. Rep.* **8**, 15021 (2018).
 39. Serebrovskaya, E. O., Edelweiss, E. F., Stremovskiy, O. A., Lukyanov, K. A., Chudakov, D. M. & Deyev, S. M. Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 9221–9225 (2009).
 40. Westberg, M., Bregnhøj, M., Etzerodt, M. & Ogilby, P. R. Temperature Sensitive Singlet Oxygen Photosensitization by LOV-Derived Fluorescent Flavoproteins. *J. Phys. Chem. B* **121**, 2561–2574 (2017).
 41. Salomon, M., Christie, J. M., Knieb, E., Lempert, U. & Briggs, W. R. Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**, 9401–9410 (2000).
 42. Zoltowski, B. D. & Gardner, K. H. Tripping the Light Fantastic: Blue-Light Photoreceptors as Examples of Environmentally Modulated Protein–Protein Interactions. *Biochemistry* **50**, 4–16 (2011).
 43. Robertson, C. A., Evans, D. H. & Abrahamse, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **96**, 1–8 (2009).
 44. Torra, J., Lafaye, C., Signor, L., Aumonier, S., Flors, C., Shu, X., Nonell, S., Gotthard, G. & Royant, A. Tailing miniSOG: structural bases of the complex photophysics of a flavin-binding singlet oxygen photosensitizing protein. *Sci. Rep.* **9**, 2428 (2019).
 45. Petrenčáková, M., Filandr, F., Hovan, A., Yassaghi, G., Man, P., Kožár, T., Schwer, M.-S., Jancura, D., Plückerthun, A., Novák, P., Miškovský, P., Bánó, G. & Sedlák, E. Photoinduced damage of AsLOV2 domain is

- accompanied by increased singlet oxygen production due to flavin dissociation. *Sci. Rep.* **10**, 4119 (2020).
46. Breslmayr, E., Laurent, C. V. F. P., Scheiblbrandner, S., Jerkovic, A., Heyes, D. J., Oostenbrink, C., Ludwig, R., Hedison, T. M., Scrutton, N. S. & Kracher, D. Protein Conformational Change Is Essential for Reductive Activation of Lytic Polysaccharide Monooxygenase by Cellobiose Dehydrogenase. *ACS Catal.* **10**, 4842–4853 (2020).
47. Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Felice, A. K. G., Breslmayr, E., Preims, M., Ludwicka, K., Haltrich, D., Eijssink, V. G. H. & Ludwig, R. Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science (80-.)*. **352**, 1098–1101 (2016).
48. Tran, J. C. & Doucette, A. A. Cyclic polyamide oligomers extracted from nylon 66 membrane filter disks as a source of contamination in liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 652–656 (2006).
49. Hansson, H., Karkehabadi, S., Mikkelsen, N., Douglas, N. R., Kim, S., Lam, A., Kaper, T., Kelemen, B., Meier, K. K., Jones, S. M., Solomon, E. I. & Sandgren, M. High-resolution structure of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Hypocrea jecorina* reveals a predicted linker as an integral part of the catalytic domain. *J. Biol. Chem.* jbc.M117.799767 (2017). doi:10.1074/jbc.M117.799767
50. Li, X., Beeson, W. T., Phillips, C. M., Marletta, M. A. & Cate, J. H. D. Structural Basis for Substrate Targeting and Catalysis by Fungal Polysaccharide Monooxygenases. *Structure* **20**, 1051–1061 (2012).
51. Bissaro, B., Streit, B., Isaksen, I., Eijssink, V. G. H., Beckham, G. T., DuBois, J. L. & Røhr, Å. K. Molecular mechanism of the chitinolytic peroxygenase reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201904889 (2020). doi:10.1073/pnas.1904889117

Seznam publikací

Publikace přímo se vztahující k této disertační práci:

1. **Filandr, F.**, Kavan, D., Kracher, D., Laurent, C. V. F. P., Ludwig, R., Man, P. & Halada, P. Structural Dynamics of Lytic Polysaccharide Monooxygenase during Catalysis. *Biomolecules* 10, 242 (2020). Doi:10.3390/biom10020242
2. **Filandr, F.**, Man, P., Halada, P., Chang, H., Ludwig, R. & Kracher, D. The H₂O₂-dependent activity of a fungal lytic polysaccharide monooxygenase investigated with a turbidimetric assay. *Biotechnol. Biofuels* 13, 1–13 (2020). doi:10.1186/s13068-020-01673-4
3. Petrenčáková, M., **Filandr, F.**, Hovan, A., Yassaghi, G., Man, P., Kožár, T., Schwer, M. S., Jancura, D., Plückthun, A., Novák, P., Miškovský, P., Bánó, G. & Sedlák, E. Photoinduced damage of AsLOV2 domain is accompanied by increased singlet oxygen production due to flavin dissociation. *Sci. Rep.* 10, 1–15 (2020). doi: 10.1038/s41598-020-60861-2
4. Felice A.K.G., Schuster C., Kadek, A., **Filandr F.**, Laurent, C.V.F.P., Scheiblbrandner, S., Schwaiger, L., Schachinger, F., Kracher, D., Sygmund, C., Man, P., Halada, P., Oostenbrink, C. & Ludwig, R. Chimeric cellobiose dehydrogenases reveal the function of cytochrome domain mobility for the electron transfer to lytic polysaccharide monooxygenase. *ACS Catal.*, under review.

Ostatní publikace autora:

5. Kalabova, D., **Filandr, F.**, Alblova, M., Petrvalska, O., Horvath, M., Man, P., Obsil, T. & Obsilova, V. 14-3-3 protein binding blocks the dimerization interface of caspase-2. *FEBS J.* febs.15215 (2020). doi:10.1111/febs.15215



FRANTIŠEK FILANDR

PhD Student

PERSONAL

Birthday : 26th August 1991
Nationality : Czech
Languages : Czech - native speaker
English - fluent (C2)
Relationship : Married
Hobbies : Photography, Cycling,
Gaming, Snowboarding

SKILLS AND EXPERIENCE

Mass Spectrometry:

ESI/MALDI-FT-ICR, MALDI-TOF
LC-MS, LC-MS/MS (HPLC, UPLC)
Hydrogen/Deuterium Exchange
Chemical Crosslinking
FPOP

Other scientific techniques:

PCR, Q-PCR, Western Blotting,
Stopped-Flow, UV/VIS Spectrometry

Software and other skills:

Bruker DataAnalysis, ProteinScape
PEAKS Studio
PyMOL
CorelDRAW
MS Office
Python programming (basic)

CONTACT

☎ +420 605 236 717
✉ frantisek.filandr@biomed.cas.cz
✉ filandr.frantisek@gmail.com
📍 Theinova 6, 196 00 Prague, Czechia

PROFILE

I am currently a PhD student in Prague working in mass spectrometry focused laboratory of Petr Novák (Laboratory of Structural Biology and Cell Signalling - <http://peterslab.org/>). I have been studying biotechnologically useful cellulose degrading enzymes Lytic Polysaccharide Monooxygenase (LPMO) and its redox partner Cellobiose Dehydrogenase (CDH) by determining their structural changes during catalysis. I was mainly using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and standard proteomic approaches for PTM analysis, but I also worked on several projects where I performed Q-PCR, Western Blotting, FPOP-MS and stopped-flow spectrometry. I enjoy learning new technologies and solving interesting problems and I want to continue my career in science, be it in academia or company R&D.

EDUCATION

2003 - 2011: High School

Gymnázium T.G.Masaryka, Litvínov, Czechia

2011-2014: Bachelor's Degree in Biochemistry

Faculty of Science, Charles University, Prague, Czechia

2014-2016: Masters's Degree in Biochemistry

Faculty of Science, Charles University, Prague, Czechia

2016-2020: PhD in Biochemistry

Faculty of Science, Charles University, Prague, Czechia

NON-SCIENTIFIC WORK EXPERIENCE AND CERTIFICATES

2011 - obtained Cambridge English FCE, **Grade A** (CEFR Level C1)

2011 - 2020 - **Private Tutor** of english, chemistry and mathematics

2014 - 2016 - **Teacher** of weekly english courses in language school „Point 007”

ACADEMIC ACHIEVEMENTS AND EXPERIENCE

Publications: 4 published, 1 submitted, 1 other being finalized

Internships: a total of one month in Vienna in laboratory of Ludwig Roland during two internships where I worked with Daniel Kracher. Data obtained resulted in a joint publication.

Conference talks: 2

Conference poster presentations: 8 including 2 short poster talks

Teaching: three semesters of practical course in biochemistry

REFERENCE

Petr Novák

Head of Laboratory

pnovak@biomed.cas.cz

Petr Man

Doctoral Advisor

pman@biomed.cas.cz