

Lublin, dnia 8.09.2023

Prof. dr hab. Anna E. Kozioł

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Moniki SIUDY

pt.

BADANIA STRUKTURALNE ORAZ *IN SILICO* WIĄZANIA LIGANDÓW Z UGRUPOWANIEM ALIFATYCZNYM LUB AROMATYCZNYM DO β - LAKTOGLOBULINY POSIADAJĄCEJ MUTACJE W OKOLICY MIEJSCA WIĄŻĄCEGO

Ogólna charakterystyka. Rozprawa została wykonana przez Doktorantkę pod opieką naukową prof. dr. hab. Krzysztofa Lewińskiego oraz dr Joanny Loch. Badania były przeprowadzone w Zakładzie Krystalochemii i Krystalofizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego. Opublikowane dotychczas ważne prace o roli lipokalin i ich strukturze, jakie ukazywały się w czasopismach, pochodzą z lat 2000–2020. Jest to więc tematyka nowa i aktualna. Grupa badawcza prof. Krzysztofa Lewińskiego jest od 20 lat jedną z kilkunastu na świecie, która prowadzi prace nad tymi związkami, a rozprawa doktorska mgr Moniki Siudy poszerza ten dorobek.

Lipokaliny są białkami globularnymi o masie molowej do 20 kDa; cząsteczki lipokalin mają budowę pojedynczego łańcucha i 160–180 reszt aminokwasowych, są rozpuszczalne w osoczu. Lipokaliny odpowiedzialne są za fizjologiczne wiązanie kwasów tłuszczowych oraz innych cząsteczek hydrofobowych i amfifilowych związków biologicznie aktywnych (np. cholesterolu, retinolu, witaminy D, sperminy). Potencjalnie mogą być stosowane jako transportery leków i mogą służyć do detoksykacji płynów ustrojowych. Wprowadzenie odpowiednich mutacji do cząsteczek lipokalin może zwiększać powinowactwo i specyficzność wiązania wybranych grup bioaktywnych.

Formalna charakterystyka pracy. Rozprawa doktorska jest napisana w języku polskim w formie monografii zawierającej 160 stron. Praca ma klasyczny układ treści: *wstęp literaturowy – cel – badania własne – podsumowanie – spis odnośników – suplement*. Kolejne rozdziały to:

1. Wstęp – jest wprowadzeniem do charakterystyki związków z grupy lipokalin i ich modyfikacji, sposobu oddziaływania z wybranymi ligandami. **2.** Cel pracy, materiały i metody stosowane w namnażaniu i syntezie odmian różnych wariantów β -laktoglobuliny; krótki opis metodyki badań strukturalnych. **3.** Wyniki opisujące syntezę białek i jej efekty, sposób krystalizacji zmodyfikowanych białek i ich kompleksów. **4.** W kolejnym rozdziale analizowane są struktury trzeciorzędowe poszczególnych układów metodami rentgenografii strukturalnej oraz dokowanie molekularne, a później następuje porównanie wyników modelowania ze strukturami eksperymentalnymi. **5.** W dyskusji opisany został wpływ mutacji na ekspresję białek, na krystalizację i symetrię kryształów oraz na strukturalne modyfikacje kieszeni wiążącej spowodowane mutacją. **6, 7.** Wnioski i podsumowanie sposobu wiązań kwasów tłuszczowych, a także ocena wiarygodności procedury AlphaFold kończą część eksperymentalną pracy. **8, 9.** Ostatnie rozdziały to

bibliografia oraz 20. stronicowy suplement, gdzie zamieszczone są wybrane dane eksperymentalne z analityki biochemicznej i analizy strukturalnej.

Ocena merytoryczna pracy

Celem pracy było zaprojektowanie, produkcja i oczyszczenie nowych wariantów wołowej β -laktoglobuliny (BLG), a także wybór ligandów do tworzenia kompleksów z białkami. A następnie – badanie struktury drugo- i trzeciorzędowej białek; wstępnie, w roztworze metodą dichroizmu kołowego. Kolejnym zadaniem było opracowanie warunków krystalizacji i dyfrakcyjne badania strukturalne wariantów w formie apo (niezmienionej) oraz z ligandami. Badanie *in silico* potencjalnych kompleksów białko-ligand przy użyciu metod dokowania molekularnego. Ocena przydatności programu AlphaFold do projektowania struktur białek i projektowania mutacji zmieniających geometrię kieszeni wiążącej były celem finalnym.

Elementy strukturalne β -laktoglobuliny odpowiedzialne za oddziaływania z małymi ligandami organicznymi to osiem antyrównoległych nici beta (nazwanych od A do H), połączonych pętlami, a na końcach polimeru znajdują się trzy dodatkowe helisy: dwie alfa oraz jedna helisa 3_{10} . W projektowaniu wariantów β -laktoglobuliny Doktorantka uwzględniła budowę poznanych struktur lipokalin i porównała występujące w tych białkach aminokwasy w pozycjach: 19, 39, 61, 62 oraz 107, które mogą wywołać zmiany w geometrii okolicy kieszeni wiążącej ligandy i skutkować zmianą powinowactwa do ligandów.

Mgr Monika Siuda zaprojektowała osiem wariantów wołowej β -laktoglobuliny z jedną lub dwiema modyfikacjami jednostek AA; te warianty to L39K, L39Y, L39Y-M107L, W61Y, W61Y-W19F, W19F, E62K i E62R.

Z kolei wybrane ligandy były zaprojektowane w oparciu o wcześniejsze prace wykonywane w Zespole Biokrytalografii. Jako ligandy modelowe wiążące się do nowych wariantów BLG, wykorzystano najpierw kwasy laurynowy, mirystynowy i palmitynowy oraz dodecylosiarczan sodu (SDS); związki te posiadają łańcuchy alifatyczne o liczbie atomów węgla od 12 do 16. Docelowe badania wiązania ligandów przez pochodne BLG obejmowały związki bioaktywne, należące do grupy leków przeciwdepresyjnych, przeciwbólowych lub psychotropowe, stanowiące skład dopalaczy, czyli były to związki działające na układ nerwowy. Związki te należały do jednej z czterech klas pochodnych. Pierwsza grupa ligandów to hydrofobowe trójcykliczne cząsteczki z fragmentem alifatycznym lub cyklicznym; druga klasa to pochodne fenotiazynowe; trzecia klasa – cząsteczki zawierające fragmenty aromatyczne, alifatyczne i heteroatomy (m. in. grupy -OH, C=O, -NH-, SO₂; atomy F, Cl); a czwarta grupa to piperazyna oraz benzylopiperazyna – cząsteczki o najmniejszych wymiarach. Ligandy w liczbie jedenastu zaprezentowane są przez Autorkę na Rysunku 11.

W części eksperymentalnej mgr Monika Siuda opisuje szczegółowo metody biologii molekularnej zastosowane do namnażania, transformacji i ekspresji modyfikacji BLG oraz sposoby izolacji i oczyszczania tychże wariantów.

Dalej Doktorantka omawia zastosowaną metodykę modelowania molekularnego do przewidywania struktur wariantów rBLG oraz do dokowania ligandów. W tym celu wykorzystuje poznane już struktury 15 wariantów laktoglobulin, aby wykonać test wiarygodności programu. Przewidywanie struktur było wykonywane za pomocą programu AlphaFold; w tym programie wygenerowano po 5 wariantów struktur każdej rBLG. Tak wygenerowane struktury były nakładane w programie PyMol, po to, aby sprawdzić zgodność konformacji. Natomiast dokowania wybranych ligandów były wykonane w programie CCDC Gold z wykorzystaniem modeli 3D poznanych struktur

białkowych. Dla każdego liganda wykonywano około 20 cykli dokowania, umieszczając cząsteczki w najbardziej prawdopodobnych miejscach kieszeni baryłki wiążącej.

Doktorantka opisuje metodykę krystalizacji otrzymanych białek, dobór warunków krystalizacji czyli bufora, precypitanta, ich stężenia i objętości użytych roztworów substancji oraz stechiometrię składników. Te etapy badań są szczegółowo opisane i zilustrowane w Rozdziale 4.4. W pierwszym kroku wykonane zostały krystalizacje form apo ośmiu zsyntezowanych form rLGB, a w następnym kroku przeprowadzona została kokrystalizacja z ligandami alifatycznymi w takich samych warunkach. Natomiast do krystalizacji rBLG z jedenastoma bioaktywnymi ligandami wybrane zostały warianty, które utworzyły kryształy w jednej z dwóch poprzednich procedur krystalizacyjnych, czyli były to białka: L39K, L39Y-M107L, W61Y, E62R, E62K,

Przeprowadzona procedura krystalizacji dla tych białek i ich kompleksów, pozwoliła na uzyskanie kryształów, dla których mogły być wykonane pomiary dyfrakcyjne i pełna charakterystyka strukturalna.

Podsumowując, mgr Monika Siuda otrzymała 8 nowych wariantów rBLG (L39K, L39Y, L39Y-M107L, W61Y, W61Y-W19F, W19F, E62K i E62R; 18.4 kDa), a jako kryształy:

- w formie czystej (apo) wykrył 5 wariantów (L39K, L39Y, L39Y-M107L, W61Y, E62K),
- w formie kompleksu z co najmniej jednym z ligandów alifatycznych – 6 wariantów (L39K, L39Y, L39Y-M107L, W61Y, E62K, E62R).

Główną metodą analityczną zastosowaną przez Doktorantkę na tym etapie była rentgenowska analiza strukturalna monokryształów. Nie wszystkie kryształy dawały dobrą dyfrakcję; uzyskano kryształy odpowiednie do badań dla 25 z nich (w tym 5 apo). W 11 przypadkach badania strukturalne wykazały obecność cząsteczki ligandów w kieszeni wiążącej. Analiza wykazała, że – z wyjątkiem kryształów W61Y z SDS – ligand związany w tych kompleksach był kwasem tłuszczowym dodanym do kropli krystalizacyjnej albo endogeny kwas tłuszczowy pochodzący z bakterii. Nie otrzymano kryształów żadnego wariantu z przyłączonym ligandem aromatycznym lub piperazyną. Uzyskane kryształy badanych wariantów z włączonym ligandem alifatycznym krystalizowały w grupie przestrzennej trygonalnej ($P3_221$), natomiast pozostałe kryształy kompleksów tych samych wariantów miały inną grupę przestrzenną, co mogło być podstawą do wstępnej identyfikacji otrzymanych kompleksów.

Warianty zawierające mutacje w pozycji 19 charakteryzowały się niższą wydajnością syntez oraz prawdopodobnie nieprawidłowym fałdowaniem, co nie pozwalało na uzyskanie kryształów tych białek. Analiza struktur wykazała, że wprowadzone mutacje w elastycznej pętli białka (W61Y, E62K oraz E62R) nie wpływają bezpośrednio na kształt miejsca wiążącego. Natomiast mutacje w pętli AB, czyli L39K i L39Y, powodują niewielkie zwężenie wejścia do β -baryłki. Ponadto, wprowadzone mutacje nie miały bezpośredniego wpływu na położenie ligandów w kieszeni wiążącej, które wiązały się w podobnych pozycjach jak w naturalnym białku. Wśród przebadanych wariantów tylko w przypadku W61Y udało się otrzymać kryształy kompleksów białka ze wszystkimi ligandami alifatycznymi. Może to sugerować, że w geometrii miejsc wiążących dla pozostałych wariantów zachodzą niewielkie zmiany. Uzyskano oczekiwane obniżenie powinowactwa do ligandów alifatycznych dla pięciu nowych wariantów rBLG, co potencjalnie daje większą przydatność tych mutacji do dalszych analiz.

Doktorantka wykorzystwała też jeden z najnowszych algorytmów – AlphaFold – stosowany do generowania struktur przestrzennych białek i przewidywania struktur. Użycie tego programu do analizy struktur rBLG wykazało, że program niezbyt dobrze radzi sobie z przewidywaniem pozycji łańcuchów bocznych w mutacjach, które zostały wprowadzone

w elastycznej pętli CD. Może za to z dużą wiarygodnością przewidywać konformacje łańcuchów we fragmentach hydrofobowej kieszeni wiążącej a także dla elastycznej pętli AB.

Natomiast przeprowadzone dokowanie molekularne ligandów aromatycznych, piperazyny i benzylopiperazyny nie pozwala wiarygodnie przewidzieć, czy dana cząsteczka bioaktywna zwiąże się z nowym wariantem laktoglobuliny.

Charakterystyka redakcji tekstu. Istotnych błędów merytorycznych w tekście rozprawy doktorskiej nie znalazłam, jest napisana logicznie i poprawną polszczyzną. Zauważyłam kilka przypadków „literówek” i niedostatków interpunkcyjnych jakim jest brak przecinka w zdaniach złożonych zawierających imiesłowowy równoważnik zdania (np. „...oczyszczano w dwóch *etapach, wykorzystując chromatografię.*”, str. 43). Z kolei wykaz literatury dla odnośników w liczbie ponad 120, jest podany niezbyt standardowo; mianowicie w danych bibliograficznych charakteryzujących odnośniki brakuje numerów stron, ale są podane identyfikatory cyfrowe DOI.

Wnioski końcowe. W rozprawie doktorskiej zarówno prezentacja jak i dyskusja wyników są precyzyjne i logiczne. Dobór bardzo jednolitego materiału biochemicznego i chemicznego oraz odpowiednia metodyka badań umożliwiły spójną dyskusję wyników. Efektem pracy mgr Moniki Siudy jest otrzymanie ośmiu wariantów BLG, zbadanie dichroizmu kołowego dla pięciu wariantów, krystalizacja ośmiu wariantów apo, krystalizacja ośmiu wariantów rBLG z czterema związkami alifatycznymi, krystalizacja pięciu wariantów z dziesięcioma aromatycznymi związkami bioaktywnymi i piperazyną. Wykonała ona pomiary dyfrakcyjne dla 25 kryształów, rozwiązała i udokładniła 18 z nich. Wykonała dokowanie 11 cząsteczek bioaktywnych do 5 wariantów rBLG, wygenerowała również 15 struktur w programie AlphaFold i porównała 13 z nich ze strukturami określonymi eksperymentalnie. Powyższe wyniki badań stanowią bardzo istotny wkład w osiągnięcia nauki, a w szczególności biochemii lipokalin.

Ważnym osiągnięciem rozprawy doktorskiej mgr Moniki Siudy jest opracowanie warunków syntezy nowych mutacji rBLG oraz warunków krystalizacji form apo i kompleksów z ligandami alifatycznymi. Jest to istotny element nowości naukowej. Badania strukturalne tych faz krystalicznych i wynikające z nich wnioski mogą posłużyć do prac aplikacyjnych jak i dalszych projektów w zakresie celowych modyfikacji budowy laktoglobulin.

Posumowanie opinii

Należy podkreślić, że prezentowana dysertacja mgr Moniki Siudy ukazuje ją jako osobę naukowo twórczą i gwarantującą rzetelne badania na wysokim poziomie. Zrealizowała ona zaplanowane zadania swojego doktoratu przedstawionego w celu uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplina nauki chemiczne.

Jej rozprawa doktorska zatytułowana „Badania strukturalne oraz *in silico* wiązania ligandów z ugrupowaniem alifatycznym lub aromatycznym do β -laktoglobuliny posiadającej mutacje w okolicy miejsca wiążącego”, którą Rada Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego przedstawiła mi do oceny, spełnia wszelkie wymogi określone w *Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym* (art. 13 ust. 1) z dnia 14 marca 2003 r. (tekst jednolity: Dz.U. poz. 1789, z dnia 27 września 2017 r.) oraz

w ustawie Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 179; Dz.U. poz. 1669; z dnia 3 lipca 2018 r.).

Na tej podstawie wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Moniki Siudy do publicznej obrony.



/Anna E. Koziół/

