

Toruń, 18.11.2023

Prof. dr hab. Andrzej Wojtczak

Wydział Chemii UMK

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Moniki Siudy

**‘Badania strukturalne oraz *in silico* wiązania ligandów z ugrupowaniem alifatycznym lub aromatycznym do β -laktoglobuliny posiadającej mutacje w okolicy miejsca wiążącego’
przedłożonej Radzie Dyscypliny Nauki Chemiczne**

Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Przesłana mi do oceny rozprawa magister Moniki Siudy została wykonana pod kierunkiem prof. dra hab. Krzysztofa Lewińskiego w Zakładzie Krystalochemii i Krystalofizyki Wydziału Chemii UJ. Promotorem pomocniczym jest dr Joanna Loch z tego Zakładu.

Jednym z perspektywicznych obszarów badań białek jest możliwość ich wykorzystania jako biofarmaceutyków w nowatorskich procedurach medycznych, np. jako nośników leków lub do wiązania toksyn występujących w płynach ustrojowych. Jako temat rozprawy wybrano jedną z lipokalin, β -laktoglobulinę. To niewielkie białko wykazuje zdolność wiązania małowcząsteczkowych związków hydrofobowych. Punktowe mutacje w sekwencji β -laktoglobuliny mogą wpływać na powinowactwo do ligandów i zmienić specyficzność centrum wiązania, ale jednocześnie mogą destabilizować cząsteczkę białka. Dlatego wybór tematu uważam za interesujący i ważny poznawczo. Jednocześnie stworzenie szerokiej bazy wiedzy o oddziaływaniach wariantów białek ze związkami aktywnymi stwarza perspektywę ich przydatności w praktyce terapeutycznej. Należy zauważyć, że badania prezentowane w rozprawie były częścią projektu realizowanego przez zespół profesora Krzysztofa Lewińskiego.

Aspekty formalne. Przedłożona rozprawa została przygotowana w formie tzw. książeczki. Struktura i układ rozprawy można określić jako klasyczny. Wyniki i ich dyskusja obejmują prawie

50%, a suplement zawierający chromatogramy i schematy oddziaływania wołowej β -laktoglobuliny z badanymi ligandami to ponad 10% objętości rozprawy. Interesujący wstęp daje dobre wprowadzenie do tematyki rozprawy. Bibliografia obejmuje ponad 120 dobrze dobranych pozycji.

Najważniejsze wyniki i osiągnięcia. Cel badań sformułowany przez Doktorantkę to określenie wpływu wybranych pojedynczych i podwójnych mutacji punktowych w pobliżu miejsca wiązania ligandów (pozycje 19, 39, 61, 62 i 107 sekwencji aminokwasowej) na strukturę wołowej β -laktoglobuliny i jej zdolności do wiązania wybranych ligandów. Wybrane modyfikacje miały na celu zmianę powinowactwa β -laktoglobuliny do endogennych ligandów - kwasów tłuszczowych. Dobór miejsc mutacji w pętlach przy wejściu do kieszeni wiążącej i w środkowej części kieszeni pozwalał na racjonalną modyfikację powinowactwa BLG do ligandów. Doktorantka wybrała ligandy z kilku grup związków wykazujących aktywność biologiczną: alifatycznych kwasów (laurynowy, mirystynowy, palmitynowy) SDS jako związki modelowe, trójpierścieniowych leków psychoaktywnych, fenotiazyn, związków zawierających fragmenty aromatyczne i alifatyczne, oraz piperazyny i benzylopiperazyny. Postawione cele zostały zrealizowane i omówione w rozprawie.

Znaczną część rozdziału '**Materiały i metody**' Doktorantka poświęciła na opisanie zastosowanych procedur z zakresu biologii molekularnej. Poszczególne etapy obejmowały otrzymanie genów nowych wariantów BLG, kspresję wariantów BLG w komórkach bakteryjnych, izolację i oczyszczanie wariantów β -laktoglobuliny. W kolejnym podrozdziale Doktorantka opisała zastosowanie metody dichroizmu kołowego do oceny poprawności fałdowania białka, zastosowanie programu CCDC GOLD do dokowania wybranych ligandów w wariantach BLG, oraz przewidywanie struktury przestrzennej wariantów programem AlphaFold. Końcowy fragment rozdziału poświęcony jest metodom krystalografii – krystalizacji wariantów BLG z ligandami oraz określaniu i walidacji struktury. W mojej opinii rozdział ten jest wystarczająco szczegółowy dla oceny zastosowanych metod, dowodząc ich właściwego doboru do realizacji celu badań.

Wyniki i Dyskusja. Moje uznanie budzi metodyczne prowadzenie współkrystalizacji wariantów β -laktoglobuliny z ligandami i ogrom włożonej pracy. Wstępne badania wydajności produkcji białka wykluczyły badania nad wariantami W19F oraz W19F-W61Y, wskazując na nieprawidłowe fałdowanie białka. Badania metodą dichroizmu kołowego wykazały poprawne fałdowanie pozostałych wariantów β -laktoglobuliny, wybranych do dalszych badań. Dla pięciu

wariantów BLG Doktorantka określiła strukturę apo BLG. Krystalizacja 8 wariantów z alifatycznymi ligandami doprowadziła do otrzymania kryształów 10 kompleksów. Współkrystalizacja 5 wariantów rBLG z ligandami trójpierścieniowymi, fenotiazynami, ligandami zawierającymi grupy aromatyczne i alifatyczne, oraz piperazynami dały kryształy w 14 układach. Dla otrzymanych kryształów Doktorantka wykonała pomiary dyfrakcyjne i określiła 19 struktur krystalicznych. W 6 przypadkach dla wariantu W61Y struktury nie wykazały obecności ligandów. Podsumowanie tego fragmentu badań wykazuje, że mgr Siuda otrzymała 5 kompleksów zawierających kwas mirystynowy, 2 kompleksy z kwasem laurynowym, po jednym kompleksie z kwasem palmitynowym i SDS. Dodatkowo w 5 kompleksach mapy gęstości elektronowej wykazały obecność endogennego liganda o budowie C10. Niestety, większość ligandów z grupy związków zawierających układy pierścieniowe nie była obserwowana w kieszeni wiążącej rBLG. Jedynym wyjątkiem jest kapsaicyna w kompleksie W61Y. Należy zauważyć, że w kilku przypadkach, w szczególności dla wariantów W61Y, L39K i L39Y-M107L Doktorantka nie wykryła ani ligandów pierścieniowych, ani endogennych. To wskazuje, że wybrane punktowe mutacje rzeczywiście zmniejszyły powinowactwo wariantów BLG do alifatycznych ligandów. Jednocześnie, wiązanie ligandów pierścieniowych w warunkach inkubacji i krystalizacji nie zaszło z odpowiednią wydajnością.

Analiza danych dotyczących eksperymentów dyfrakcyjnych i udokładniania struktur w Tabelach 16a-g wykazuje, że struktury zostały określone z porównywalną, dobrą jakością. Brak mi w tych tabelach określenia liczby cząsteczek białka w komórkach elementarnych, choć da się to oszacować po liczbie atomów białka. Brak informacji o liczbie cząsteczek rozpuszczalnika, co może być użyteczne przy interpretacji gęstości na Rys. 28 i Rys na stronie 94 (Rys. 34?).

Dla ligandów, które nie wykazały wiązania do wariantów BLG, Doktorantka przeprowadziła dokowanie *in silico* w 5 wybranych wariantach, stosując algorytm programu GOLD z pakietu CCDC z funkcją ChemPLP. Sposób prezentacji uzyskanych wyników nie jest najszcześniejszy. Świetna idea nałożenia struktury badanych 5 wariantów ujawnia różnice i podobieństwa wiązania tych ligandów w zależności od wprowadzonych mutacji. Jednak małe rozmiary odpowiednich rysunków od 37 do 49 nie pozwoliły mi na analizę różnic. Muszę przyznać, że szczegóły oddziaływań zawarte są w suplemencie, jednak dwuwymiarowe projekcje LigPlot nie są tak informatywne. Analiza uzyskanych wyników wykazuje, że dezypramina, chloropromazyna i benzylopiperazyna wiążą się w podobnej pozycji niezależnie od mutacji w badanych wariantach. W pozostałych przypadkach podstawienia wpływają na różnice oddziaływań wiążących ligand-białko. Większość

ligandów pierścieniowych była dokowana przy wejściu do β -baryłki. W przypadku kapsaicyny łańcuch alifatyczny był pozycjonowany we wnętrzu baryłki, a fragment benzyłowy tolbutamidu był dokowany w górnej części baryłki. Benzylopiperazyna także była dokowana w hydrofobowej części baryłki BLG. Doktorantka omawia jakościową korelację pomiędzy punktacją ChemPLP i eksperymentalnie stwierdzonym wiązaniem lub jego brakiem, konkludując, że nie jest to narzędzie zapewniające otrzymanie kompleksów. Mi nasuwa się pytanie, czy Autorka porównała położenie ligandów wynikające z dokowania i w rzeczywistych strukturach odpowiednich kompleksów choćby z wtBLG, czy kapsaicyny w W61Y. Można by zrobić modelowanie referencyjne dowolnego kompleksu z którymś z kwasów tłuszczowych w tym układzie białkowym.

Kolejnym aspektem badań było przewidywanie struktury wariantów BLG programem AlphaFold. Dla każdego badanego wariantu BLG Doktorantka otrzymała 5 najlepszych modeli białka. Wskaźniki oceny w Tabeli 17 wskazują na dobrą jakość modeli. Wartości RMSD liczone dla modeli i struktury krystalicznej dla wybranych reszt aminokwasów tworzących zrab β -baryłki wskazują na dobre przewidywanie struktury tej względnie sztywnej struktury. Doktorantka komentuje, że przewidywanie daje gorsze wyniki dla łańcuchów bocznych w elastycznych pętlach białka. Ten wniosek uważam za cenny w kontekście badania białek nieznanymi.

Niewątpliwymi elementami nowości naukowej są: zaprojektowanie, otrzymanie i badania strukturalne nowych wariantów wołowej β -laktoglobuliny i ich kompleksów z małowcząsteczkowymi ligandami.

Do najważniejszych rezultatów badań zaliczam:

1. Zaprojektowanie i otrzymanie wariantów BLG o zmniejszonym powinowactwie do alifatycznych kwasów.
2. Eksperymentalne potwierdzenie, że mutacje W61 i E62 pętli CD nie mają bezpośredniego wpływu na geometrię miejsca wiązania, mutacje L39 powodują zwężenie miejsca wiązania i mogą wpływać na wiązanie ligandów. Mutacja W19 zachowanego w rodzinie lipokalin destabilizuje strukturę białka.
3. Badane mutacje nie wpływają na wiązanie alifatycznych cząsteczek w baryłce BLG
4. Stwierdzenie, że punktacja dokowania programem GOLD z funkcją ChemPLP nie wskazuje jednoznacznie na zdolność wiązania ligandów.
5. Wniosek metodyczny, że przewidywanie struktury programem AlphaFold działa skutecznie dla sztywnych obszarów białek

Uważna lektura rozprawy skłania mnie do zadania kilku dodatkowych pytań.

1. Wyniki CD wskazują, że dla większości wariantów procentowy udział α -helis to 10-12%, a w przypadku L39K tylko 3%. To sugeruje istotne zmiany architektury cząsteczki. Jednak w Tabeli 16a wykazane są badania strukturalne tego wariantu i jego kompleksu. Czy struktura drugorzędowa istotnie różni się od struktury innych wariantów lub wtBLG?
2. Czy mapy gęstości dla kompleksu W61Y z kwasem palmitynowym (Rys. 28) oraz kapsaicyną (Rys na str. 94) można interpretować inaczej?

WNIOSEK KOŃCOWY.

Rozprawa magister Moniki Siudy jest rezultatem badań biochemicznych, analizy strukturalnej i badań *in silico*. Doktorantka z sukcesem zaprojektowała i otrzymała warianty wołowej β -laktoglobuliny o mniejszym powinowactwie do kwasów tłuszczowych. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę o sposobie oddziaływań między BLG i ligandami, zarówno endogennymi jak i lekami, co może stanowić podstawę zastosowania tego białka do wiązania toksycznych związków z płynów ustrojowych. Postawienie ciekawego problemu, sprawne zastosowanie wybranych narzędzi i umiejętność podsumowania wyników są w mojej opinii dużym pozytywnym ocenianej rozprawy. Na pozytywną ocenę rozprawy nie wpływają pytania, które zawarłem w recenzji, są one odbiciem mojego zainteresowania tematyką badań.

Stwierdzam, że rozprawa magister Moniki Siudy spełnia wymogi określone w ustawie „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 20 lipca 2018 (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej do dalszych etapów postępowania.

