



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie
Wydział Chemii

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Badania strukturalne oraz *in silico* wiązania ligandów
z ugrupowaniem alifatycznym lub aromatycznym do
 β -laktoglobuliny posiadającej mutacje w okolicy miejsca
wiążącego

Praca wykonana w Zakładzie Krystalochemii i Krystalofizyki
w Zespole Biokrystalografii
na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego
pod kierunkiem

prof. dr hab. Krzysztofa Lewińskiego

oraz

dr Joanny Loch

Kraków 2023

Lipokaliny są szeroko rozpowszechnionymi białkami występującymi u ludzi, zwierząt, roślin a także w bakteriach. Są one niewielkimi białkami globularnymi o masie molowej zwykle nieprzekraczającej 20 kDa. Głównym elementem strukturalnym lipokalin jest β -baryłka utworzona z ośmiu antyrównoległych nici β . Korzystając z nowoczesnych metod kombinatorycznego projektowania białek, lipokaliny zostały wykorzystane jako rusztowania do budowy sztucznych białek, o nowatorskiej specyficzności wiązania ligandów, tak zwanych Antykalin, otwierając tym samym perspektywę nowej klasy biofarmaceutyków w terapii medycznej. Należąca do rodziny lipokalin β -laktoglobulina posiada zdolność wiązania różnorodnych cząsteczek, szczególnie o charakterze hydrofobowym. Dzięki temu może zostać potencjalnie wykorzystana w celowanym dostarczaniu leków oraz w detoksykacji płynów ustrojowych. Wprowadzenie do β -laktoglobuliny odpowiednio zaprojektowanych mutacji może zwiększać powinowactwo i specyficzność wiązania wybranych grup bioaktywnych cząsteczek. W oparciu o analizę oddziaływań β -laktoglobuliny z alifatycznymi ligandami oraz podobieństwo struktur przestrzennych homologicznych białek z rodziny lipokalin zaprojektowano i otrzymano osiem wariantów (L39K, L39Y, L39Y-M107L, W61Y, W61Y-W19F, W19F, E62K oraz E62R) posiadających modyfikacje w okolicy kieszeni wiążącej. Produkcję białek prowadzono w bakteryjnym systemie ekspresji, białka oczyszczano wykorzystując metody chromatograficzne.

Główną metodą badawczą wykorzystywaną w pracy doktorskiej była krystalografia rentgenowska. Dla wszystkich otrzymanych wariantów przeprowadzono krystalizację bez dodatku liganda uzyskując kryształy dla pięciu wariantów: L39K, L39Y-M107L, W61Y, E62K, L39Y i zbadano ich strukturę krystaliczną. Przeprowadzono krystalizację wszystkich otrzymanych wariantów w obecności wybranych cząsteczek bioaktywnych należących do związków z ugrupowaniem alifatycznym (kwas laurynowy, kwas mirystynowy, kwas palmitynowy oraz dodecylosiarczan sodu), dziewięciu związków z ugrupowaniem aromatycznym (amitryptylina, dezypramina, ketotifen, flufenazyna, chloropromazyna, haloperidol, tolbutamid, kapsaicyna, tetrakaina) oraz z benzylopierazyną i piperazyną. Kryształy odpowiednie do badań dyfraktometrycznych uzyskano dla dwudziestu pięciu układów, w jedenastu przypadkach badania strukturalne ujawniły obecność cząsteczki liganda w kieszeni wiążącej. Analiza map Fouriera wykazała, że oprócz kryształów W61Y z przyłączonym SDS, związanym ligandem każdorazowo był kwas tłuszczowy dodany do kropli krystalizacyjnej lub endogenny kwas tłuszczowy pochodzący z bakterii. Nie udało się uzyskać kryształów żadnego wariantu z przyłączonym ligandem aromatycznym lub piperazyną.

Zauważono, że uzyskane kryształy badanych wariantów (L39K, L39Y, L39Y-M107L, W61Y, E62K) z przyłączonym ligandem alifatycznym zawsze krystalizowały z symetrią grupy przestrzennej $P3_221$, podczas gdy kryształy form apo tych samych wariantów zawsze posiadały symetrię innej grupy przestrzennej. Dzięki tym różnicom, z dużą wiarygodnością można stwierdzić związanie liganda na podstawie pokroju kryształów bez konieczności wykonywania pomiarów dyfrakcyjnych.

Warianty zawierające mutację w pozycji 19 (W19F i W19F-W61Y) charakteryzowały się istotnie niższą wydajnością produkcji oraz przypuszczalnie nieprawidłowym fałdowaniem, co uniemożliwiło uzyskanie kryształów tych białek. Warianty te zostały wyłączone z dalszych badań.

Analiza struktur krystalicznych wykazała, że wprowadzone mutacje W61Y, E62K oraz E62R na elastycznej pętli CD nie wpływają bezpośrednio na kształt miejsca wiążącego, natomiast mutacje wprowadzone na pętli AB (L39K, L39Y) powodują niewielkie zwężenie wejścia do β -baryłki. Uzyskane struktury przestrzenne z ligandami alifatycznymi wykazały, że wprowadzone mutacje nie miały bezpośredniego wpływu na pozycję ligandów w kieszeni wiążącej, które związały się w podobnych pozycjach jak w naturalnym białku. Spośród przebadanych wariantów tylko w przypadku W61Y udało się otrzymać kryształy kompleksów białka z wszystkimi ligandami alifatycznymi. Może to wskazywać, że pomimo niewielkich zmian w geometrii okolicy kieszeni wiążącej, dla pozostałych wariantów uzyskano oczekiwane obniżenie powinowactwa do ligandów alifatycznych.

Dla pięciu nowych wariantów β -laktoglobuliny o potencjalnie największej przydatności do dalszych badań przeprowadzono dokowanie molekularne ligandów aromatycznych oraz piperazyny i benzylopiperazyny. W celu oceny wiarygodności wyników dokowania przeprowadzono dodatkowo dokowanie wariantów I56F-L39A-M107W i I56F-L39A-M107F z dezypraminą oraz I56F-L39A i F105L-L39A z chloropromazyną, dla których tworzenie kompleksów było potwierdzone w niezależnych badaniach strukturalnych. Otrzymane dla tych kompleksów wartości funkcji oceny nie odbiegały istotnie od wyników uzyskanych dla ligandów nietworzących kompleksów z β -laktoglobuliną. Oznacza to, że na podstawie uzyskanych wyników dokowania molekularnego nie można wiarygodnie przewidzieć czy dana cząsteczka bioaktywna zwiąże się do nowych wariantów β -laktoglobuliny.

Rok 2021 przyniósł swego rodzaju przełom w technikach komputerowych, które umożliwiają przewidywanie trójwymiarowej struktury białek. Oparty na metodach sztucznej inteligencji (AI) algorytm AlphaFold, opracowany przez DeepMind umożliwił wygenerowanie struktur przestrzennych białek całego ludzkiego proteomu. AlphaFold jest pierwszą metodą obliczeniową, która umożliwia przewidywanie struktury przestrzennej białek na podstawie wprowadzonej sekwencji z dokładnością zbliżoną do metod eksperymentalnych.

Przewidywanie struktur z użyciem AlphaFold stało się dostępne w końcowym okresie realizacji niniejszej pracy doktorskiej. Wprawdzie twórcy metody zastrzegają się, że nie jest ona zweryfikowana pod kątem przewidywania wpływu mutacji na strukturę i stabilność białka, jednak ze względu na znaczenie tej metody podjęto decyzję o jej użyciu, w celu weryfikacji przydatności do przewidywania wywołanych mutacją zmian struktury w kieszeni wiążącej β -laktoglobuliny. Badania przeprowadzono dla czterech wariantów β -laktoglobuliny, których struktury nie zostały wcześniej zdeponowane w Bazie PDB: W61Y, E62K, E62R, L39Y-M107L. Dodatkowo, przeprowadzono porównania dla dziewięciu pojedynczych i potrójnych mutantów β -laktoglobulin, dla których struktury formy apo były dostępne w PDB.

Na podstawie przeprowadzonego porównania struktur eksperymentalnych oraz przewidywanych można stwierdzić, że AlphaFold niezbyt dobrze radzi sobie z przewidywaniem pozycji łańcuchów bocznych w mutacjach wprowadzonych na elastycznej pętli CD. Natomiast z dużą wiarygodnością jest w stanie przewidzieć konformację łańcuchów bocznych w resztach znajdujących się w hydrofobowej kieszeni wiążącej a także na elastycznej pętli AB, czyli w regionach β -laktoglobuliny, które najczęściej podlegały modyfikacjom. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że AlphaFold może być wykorzystywany do projektowania nowych wariantów β -laktoglobuliny posiadających modyfikacje w hydrofobowej kieszeni wiążącej.

Przebadane mutacje obniżyły powinowactwo do ligandów alifatycznych jednak nie wpłynęły istotnie na zdolność wiązania przez β -laktoglobulinę ligandów z ugrupowaniem aromatycznym. W celu zwiększenia powinowactwa do związków tej grupy konieczne jest wprowadzenie kilku mutacji równocześnie. W oparciu o zmiany geometrii obszaru kieszeni wiążącej jako najbardziej obiecujące pozycje do dalszych modyfikacji uznano znajdującą się na pętli AB leucynę 39 oraz metioninę 107 zlokalizowaną w górnej części kieszeni wiążącej.