

Streszczenie pracy doktorskiej mgr inż. Pawła Strzelczyka

Praca doktorska wykonana pod opieką prof. dr hab. inż. Grzegorza Bujacza

### **Badania strukturalne kompleksów awidyny z ligandami**

Awidyna to glikoproteina znajdująca się w jajach płazów, gadów i ptaków, która charakteryzuje się wysokim powinowactwem do biotyny. Utworzony kompleks awidyna-biotyna uznawany jest za jedno z najsilniejszych, niekowalencyjnych oddziaływań występujących w przyrodzie i dlatego znajduje szerokie zastosowanie między innymi w technikach laboratoryjnych. Obecnie poszukiwane są pochodne biotyny o potencjalnie słabszym powinowactwie, które mogłyby być wykorzystywane w formie kompleksów z awidyną w technikach analitycznych oraz jako nośniki leków.

W ramach rozprawy doktorskiej metodą rentgenografii strukturalnej określono struktury przestrzenne kompleksów awidyny wyizolowanej z białka jaja kurzego z ligandami. Za cel przyjęto zbadanie oddziaływań występujących w kompleksach awidyny z fluorescencyjnymi ligandami oraz metalocenowymi pochodnymi biotyny o znaczeniu medycznym. Większość ligandów została zsyntezowana przez dr hab. Damiana Plażuka, prof. nadzw. UŁ z Katedry Chemii Organicznej Wydziału Chemii UŁ. Poszczególne etapy prowadzące do poznania struktur krystalicznych obejmowały: oczyszczenie białka, utworzenie kompleksów białko-ligand, krystalizację, pomiar dyfrakcyjny wyhodowanych kryształów, obrabianie zarejestrowanych danych dyfrakcyjnych, a w końcu rozwiązanie struktury, udokładnianie modelu i jego walidację. Analiza otrzymanych struktur krystalicznych kompleksów awidyny z ligandami przyczyniła się do rozszerzenia wiedzy dotyczącej oddziaływań awidyny z koniugatami biotyny.

Badanie właściwości wiążących awidyny rozpoczęto od wyznaczenia struktury kompleksu z rutenocenową pochodną biotyny (RuBiot). Związek ten posiada ugrupowanie rutenocenowe, dołączone przez grupę karboksylową kwasu walerianowego biotyny. Bezpośrednio przy rutenocenie znajduje się grupa karbonylowa, która odgrywa znaczącą rolę w oddziaływaniu liganda z białkiem. Rozwiązana struktura kompleksu awidyna-RuBiot jest jedną z pierwszych struktur zdeponowanych w PDB, pokazujących możliwy sposób oddziaływania ugrupowania rutenocenowego z białkiem. Uczestniczą w nim dwie reszty aminokwasowe awidyny: (i) Ser73 będąca donorem protonu dla  $\pi$ -elektronowego systemu pierścienia cyklopentadienylu RuBiot, pełniącego rolę akceptora protonu oraz (ii) Arg114, która oddziałuje na zasadzie kontaktu  $\pi$ - $\pi$ . W celu zbadania, jak zmiana atomu w metalocenie (Ru $\rightarrow$ Fe) wpłynie na sposób wiązania się liganda z białkiem, rozwiązano strukturę kompleksu awidyna-FcBiotOH. FcBiotOH w swojej strukturze posiada ugrupowanie ferrocenowe dołączone przez grupę karboksylową kwasu walerianowego biotyny i przy ferrocenie posiada grupę hydroksylową. Analiza strukturalna wykazała, że ugrupowanie ferrocenowe stabilizowane jest tylko przez oddziaływanie  $\pi$ -elektronowe z Ser101, natomiast obecność grupy hydroksylowej umożliwiła utworzenie wiązań wodorowych z aminokwasami Ser73 i Ser75. Pomimo, że w najgłębszej części kieszeni wiążącej zestaw wiązań wodorowych stabilizujących dwupierścieniowe ugrupowanie tetrahydrotiofenowo-

imidazolidynowe obu ligandów jest zachowany, to reszta wiązań różni się zarówno między sobą, jak i w porównaniu do tych występujących w kompleksie awidyna-biotyna. W kolejnym etapie zbadano charakter oddziaływania awidyny z ferrocenowymi pochodnymi biotyny, które w swojej cząsteczce zawierają dodatkową grupę metylenową (FcHomoBiot-en) lub alifatyczny łącznik (FcHexHexBiot). Obydwa ligandy są zakotwiczone w kieszeni wiążącej awidyny przez wiązania wodorowe, a ugrupowanie ferrocenowe nie oddziałuje bezpośrednio z białkiem, ale stabilizowane jest przez aminokwasy z pętli otaczających miejsce wiązania.

Porównanie uzyskanych struktur kompleksów ze strukturą formy awidyny niezwiązanej z ligandem wykazało, że główne różnice występują w rejonach pętli CD, DE i FG. Szczególnie interesujące było zachowanie pętli CD, która może regulować dostęp do kieszeni wiążącej. Nałożenie atomów C<sub>α</sub> uzyskanych struktur wykazało, że pozycja pętli CD w analizowanych kompleksach jest skorelowana z obecnością liganda w kieszeni wiążącej. Otrzymane struktury krystaliczne kompleksów awidyny z metalocenowymi pochodnymi biotyny pozwoliły na ustalenie wpływu poszczególnych grup funkcyjnych na pozycję i stabilizację liganda związanego z białkiem.

W ramach pracy doktorskiej określone również zostały struktury krystaliczne kompleksów awidyny z pirenowymi pochodnymi biotyny (PirBiot) i destiobiotyny (PirDestioBiot). Wyznaczone struktury pozwoliły na scharakteryzowanie oddziaływań białka z badanymi ligandami, a także na określenie, jaki wpływ ma proces wiązania fluorescencyjnych pochodnych na konformację pętli otaczających miejsce wiązania. W toku prowadzonych badań wyznaczono także strukturę krystaliczną kompleksu awidyna-HABA.

Badania strukturalne prowadzone w czasie realizacji rozprawy doktorskiej potwierdziły, że mimo hydrofobowego charakteru kieszeni wiążącej awidyny, wiązania wodorowe odgrywają znaczącą rolę w stabilizowaniu ligandów we wnętrzu β-baryłki. Obserwowana w strukturach krystalicznych stechiometria wiązania białko-ligand wynosi 1:1. Uzyskane struktury po raz pierwszy pokazały możliwy sposób oddziaływania ugrupowania metalocenowego oraz pirenowego z białkiem. Wykazały również, że stosunkowo wąska kieszeń wiążąca białka może pomieścić duże ugrupowania aromatyczne.

Upowszechnienie struktur krystalicznych kompleksów awidyny (z *Gallus gallus*) z metalocenowymi pochodnymi biotyny o znaczeniu medycznym (kody PDB: 4I60, 4JHQ, 5HLM, 5MYQ) oraz pirenowymi pochodnymi (kody PDB: 5IRU, 5IRW) poprzez zdeponowanie ich w ogólnodostępnej bazie PDB, może stanowić podstawę do wykorzystania tych układów w badaniach spektroskopowych lub jako nośników leków.