

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI
POLITECHNIKA ŁÓDZKA**



Dr inż. ANNA DANUTA BUJACZ

Załącznik 3

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

(w języku polskim)

**STRUKTURY KRYSTALICZNE WYBRANYCH BIAŁEK O ZNACZENIU
MEDYCZNYM I BIOTECHNOLOGICZNYM**

ŁÓDŹ, 2015

1. Imię i Nazwisko

Anna Danuta Bujacz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Magister inżynier chemik, specjalność chemia i technologia organiczna; Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka – 1984 rok. Temat pracy magisterskiej “Synteza barwników kwasowych, pochodnych izomerycznych nitrodifenyloamin”- promotor dr Kazimierz Blus.

Doktor nauk technicznych, specjalność technologia chemiczna, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka – 2004 rok. Temat pracy doktorskiej „Projektowanie, synteza i modyfikacja inhibitorów proteazy HIV-1 pochodnych izosteru hydroksyetylenowego” – promotor dr hab. Józef Kula, profesor PŁ.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu.

1986 - 1994 Nauczyciel fizyki i chemii w SP 148, SP 109 i XXXV LO w Łodzi;

1994 - 1997 Pracownik naukowy w Programie Biochemii Strukturalnej w Narodowym Instytucie Zdrowia (NIH), SAIC, NCI, Frederick, USA;

1997 - 1999 Kierownik (koordynator) Programu Nauczania na Odległość w Polsko-Amerykańskim Centrum Zarządzania, Uniwersytet Łódzki;

2000 - 2004 Studia Doktoranckie na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej;

2001 (VI-X) Pracownik naukowy w Laboratorium Racjonalnego Projektowania Leków, NCI, Frederick, USA;

2004 - 2007 Pracownik naukowo-badawczy, Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Biochemii Technicznej;

2008 - Adiunkt, Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Biochemii Technicznej.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego,

Struktury krystaliczne wybranych białek o znaczeniu medycznym i biotechnologicznym

b) Lista publikacji naukowych, stanowiących podstawę do wniosku. (Autor/autorzy, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

H-1 Moiani D., Salvalaglio M., Cavallotti C., **Bujacz A.**, Redzynia I., Bujacz G., Dinon F., Pengo P., Fassina G. „Structural characterization of a Protein A mimetic peptide dendrimer bound to human IgG” **2009**, *J Phys Chem B*. 113(50):16268–16275.

MNiSW - 30, IF₂₀₀₉ = 3.471, (5 letni IF = 3.7) Cit – 19

H-2 Świderek K., Panczakiewicz A., **Bujacz A.**, Bujacz G., Paneth P.* „ Modeling of isotope effects on binding oxamate to lactic dehydrogenase” **2009**, *J Phys Chem B*. 113(38):12782-12789.

MNiSW - 30, IF₂₀₀₉ = 3.471, (5 letni IF = 3.7) Cit – 14

H-3 **Bujacz, A.***, Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Bielecki, S., Redzynia I., Bujacz, G. „Crystal structures of the apo form of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose” **2011**, *FEBS J*. 278(10):1728-1744.

MNiSW - 30, IF₂₀₁₁ = 3.790, (5 letni IF = 3.8) Cit – 17

H-4 **Bujacz A.*** „Structures of bovine, equine and leporine serum albumin” **2012**, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 68(Pt10):1278-1289.

MNiSW - 45, IF₂₀₁₂ = 14.103 (5 letni IF=12.6) Cit – 86

H-5 Strzelczyk P., **Bujacz A.***, Plazuk D, Zakrzewski J, Bujacz G. “Structural investigation of the interactions of biotinylruthenocene with avidin” **2013**, *Chem Biol Interact*. 204(1):6-12.

MNiSW - 30, IF₂₀₁₃ = 2.967 (5 letni IF=2.9) Cit – 2

H-6 Bartasun P., Cieśliński H.* , **Bujacz A.**, Wierzbička-Wos A., Kur J. “A study on the interaction of rhodamine B with methylthioadenosine phosphorylase protein sourced

from an Antarctic soil metagenomic library" **2013**, *PLoS One*. 8(1): e55697.

MNiSW - 40, IF₂₀₁₃= 3.730 (5 letni IF=4.1) Cit – 1

- H-7** Sekuła B., Zieliński K., **Bujacz A.*** „Crystallographic studies of the complexes of bovine and equine serum albumin with 3,5-diiodosalicylic acid" **2013**, *Int J Biol Macromol*. 60:316– 324.

MNiSW - 25, IF₂₀₁₃= 2.596 (5 letni IF=2.5) Cit - 12

- H-8** **Bujacz A.***, Zieliński K., Sekuła B. „Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen" **2014**, *Proteins*. 82(9):2199-208.

MNiSW - 25 , IF₂₀₁₄= 2.921 (5 letni IF=3.4) Cit - 4

- H-9** **Bujacz A.***, Rutkiewicz-Krotewicz M., Nowakowska-Sapota K., Turkiewicz M. „Crystal structure and enzymatic properties of broad substrate specificity psychrophilic aminotransferase from Antarctic soil bacterium, *Psychrobacter* sp. B6". **2015**, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 71(Pt3): 632-645.

MNiSW - 45, IF₂₀₁₄= 2.674, IF₂₀₁₅= 7.619 (5 letni IF=12.6) Cit – 0

- H-10** Pietrzyk A.J., **Bujacz A.***, Mak P., Potempa B., Niedziela T. "Structural studies of *Helix aspersa* agglutinin complexed with GalNAc: a lectin that serves as a diagnostic tool" **2015**, *Int J Biol Macromol*. 81:1059-1068.

MNiSW - 25, IF₂₀₁₄= 3.096, IF₂₀₁₅= 2.619 (5 letni IF=2.5) Cit - 0

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Podstawą wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego jest cykl 10 artykułów naukowych powiązanych tematycznie opublikowanych w latach 2009 – 2015, w czasopiśmie z *Thomson Reuters Master Journal List* (tzw. listy filadelfijskiej) ujętych w zbiorach *Journal Citation Report* (JCR). Publikacje łączy ta sama metodyka, czyli określanie struktur metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich na monokryształach białkowych. Obiektem badań są makrocząsteczki wykorzystywane w procesach biotechnologicznych lub w testach medycznych. Informacje, jakie niosą ze sobą określone struktury przestrzenne białek, przedstawione jako moje osiągnięcie naukowe, przysłużą się do usprawnienia bądź powstania nowych testów medycznych i udoskonalenia procesów biotechnologicznych.

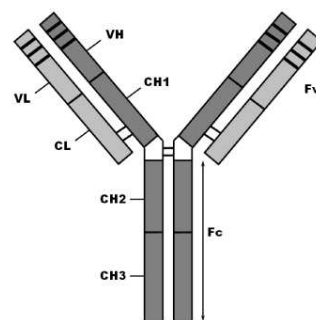
Do niedawna krystalografia była dziedziną dostarczającą podstawowej wiedzy przede wszystkim o budowie makrocząsteczek, natomiast ostatnimi laty stała się bardzo użyteczna do rozwiązywania konkretnych problemów medycznych i biotechnologicznych. Świat pod koniec XX wieku został zaatakowany chorobą AIDS (Zespół nabytego niedoboru odporności, ang. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), którą można było zatrzymać projektując leki hamujące rozwój wirusa HIV (Ludzki wirus niedoboru odporności, ang. *human immunodeficiency virus*). Aby to osiągnąć należało najpierw poznać budowę przestrzenną jego trzech podstawowych enzymów: proteazy aspartylowej, odwrotnej transkryptazy i integrazy, i następnie w oparciu o tę wiedzę zaprojektować związki chemiczne - potencjalne leki, blokujące ich działanie. W tym czasie miałam szczęście pracować jako chemik organik w laboratorium projektującym i syntezującym inhibitory proteazy wirusa HIV-1 (*Science Applications International Corporation (SAIC), National Institutes of Health (NIH), Frederick, USA*), które później były tematem mojej pracy doktorskiej. Ten etap pracy naukowej zapoczątkował moje zainteresowanie badaniami struktur przestrzennych enzymów wirusa HIV pod kątem projektowania ich inhibitorów. Zainteresowania te bardzo szybko rozciągnęły się na inne białka, a określanie ich struktury krystalicznej stało się głównym celem mojej pracy naukowej. Poznanie struktury przestrzennej makrocząsteczek pozwala określić mechanizmy reakcji enzymatycznych, scharakteryzować topologię centrów aktywnych białek i w konsekwencji lepiej zrozumieć procesy fizjologiczne wpływające na funkcjonowanie i rozwój organizmów żywych. Bardzo szybko mogłam się o tym przekonać pracując w europejskim projekcie *Advance Interactive Materials by design (AIMs)*.

- **Określenie struktury przestrzennej fragmentu Fc przeciwciała monoklonalnego IgG1 oraz jego kompleksu z peptydomimicznym ligandem XG [H-1]**

Celem tego zadania było określenie struktury przestrzennej fragmentu Fc przeciwciała monoklonalnego IgG1 (ang. *Immunoglobuline G type 1*) oraz otrzymanie kompleksów tego białka z różnymi ligandami. Ligandy były analizowane pod kątem ich wykorzystania w charakterze aktywnych komponentów wypełnień kolumn chromatograficznych, mających służyć do oczyszczania przeciwciał. Ligand posiadający najbardziej pożądane właściwości miał zastąpić dotychczas stosowane w złożu chromatograficznym białko A ze *Staphylococcus aureus* (gronkowca złocistego), którego użycie do oczyszczania przeciwciał wpływało na wysoką cenę leków przeciwrakowych, otrzymywanych dla potrzeb tzw. celowanej terapii antynowotworowej. Wypełnienia chromatograficzne oparte na białku A są drogie i niezbyt praktyczne w wielkoskalowych procesach przemysłowych [1-3]. Ponadto śladowe ilości białka A

wymywanego z kolumny w procesie oczyszczania mogą wywołać odpowiedź immunologiczną, gdy oczyszczane przeciwciało używane jest później jako lek [4-6].

Wprowadzając obce białko do organizmów żywych można uzyskać przeciwciała specyficznie wiążące się do tego białka. Izolując przeciwciało o najwyższym powinowactwie do danego białka i powielając je w hodowli komórkowej otrzymujemy przeciwciała monoklonalne. Jest to najłatwiejsza metoda produkcji bardzo czułych i specyficznych testów diagnostycznych. Przeciwciała specyficznie wiążące się do białek na powierzchni komórek nowotworowych mogą być użyte w celowanej terapii onkologicznej [7]. Metodami inżynierii genetycznej konstruować można przeciwciała hybrydowe, w których cały szkielet białka ma sekwencję i strukturę ludzkiego IgG1 (Rys.1), a epitopy wiążące mają sekwencję przeciwciała np. mysiego o powinowactwie specyficznym do danego antygeny. Z dwóch przeciwciał monoklonalnych IgG1, pochodzących z leków przeciwrakowych, Herceptyny i Rituxanu, po proteolitycznej hydrolizie otrzymaliśmy fragment Fc [8]. Na podstawie danych literaturowych opracowałam protokół odcięcia dwóch fragmentów Fab od fragmentu Fc i odseparowałam go na kolumnie chromatograficznej [9]. Do przeprowadzenia proteolizy IgG1 i oczyszczenia Fc udostępniono nam laboratorium firmy DSM Biologics Company w Groningen, Holandia – jednego z partnerów projektu AIMs.



Rysunek 1. Przeciwciało monoklonalne IgG1 z podziałem na łańcuchy stałe C i zmienne V oraz na lekkie z indeksem L i ciężkie z indeksem H

Prace krystalograficzne w ramach projektu realizowaliśmy w trzyosobowym zespole razem z prof. G. Bujaczem i doktorantką I. Redznią (obecnie dr inż. I. Szymczak). Był to dla mnie wspaniały czas poznawania tajników krystalografii białek i małych cząsteczek, a także ogromne doświadczenie współpracy w dużym międzynarodowym projekcie. Prowadziliśmy krystalizację fragmentu Fc w kompleksach z ligandami, które syntezowały dla nas dwie firmy: Prometic (Anglia) i Xeptagen (Włochy) (Rys.2). Najlepsze właściwości wiążące wynikające z testów i obliczeń teoretycznych prowadzonych przez prof. C. Cavallotti z Politechniki w Mediolanie wykazał peptydomimiczny ligand XG zsyntezowany przez dr G. Fassina z firmy Xeptagen (Wenecja, Włochy). Otrzymałam kryształ kompleksu Fc/XG w wyniku krystalizacji metodą dyfuzji par w wiszącej kropli, przeprowadziłam jego pomiar dyfrakcyjny na synchrotronie w Hamburgu z użyciem 20% (R,R)-2,3-butanodiolu jako krioprotektanta, rozwiązałam strukturę krystaliczną do rozdzielczości 2.3 Å w grupie przestrzennej P2₁2₁2₁ z dimerem w części niezależnej komórki i udokładniłam strukturę uzyskując dobre wskaźniki

rozbieżności $R/R_{\text{free}}=18/25$. W publikacji [H-1] przedstawiona jest tylko jedna struktura fragmentu Fc w kompleksie z ligandem XG, jednakże to osiągnięcie było wynikiem przeprowadzonych wcześniej setek krystalizacji i rozwiązania dziesiątek struktur kompleksów z różnymi ligandami – potencjalnymi komponentami czynnymi nośników kolumn chromatograficznych. Struktury te nie mogły być publikowane, gdyż dostarczane nam ligandy posiadały zbyt małe powinowactwo do fragmentu Fc i w związku z tym ich lokalizacja na mapach gęstości elektronowej nie była całkowicie jednoznaczna. Pozwoliła ona jednak na przybliżone ustalenie reszt aminokwasowych oddziałujących z ligandem i zasugerowanie kierunku modyfikacji syntezowanych ligandów. Wprowadzone modyfikacje zwiększały selektywność oddziaływania ligandów z fragmentem Fc, który jest jednakowy dla wszystkich Ig, co zwiększało uniwersalność wypełnień kolumn chromatograficznych uzyskanych w projekcie AIMS.

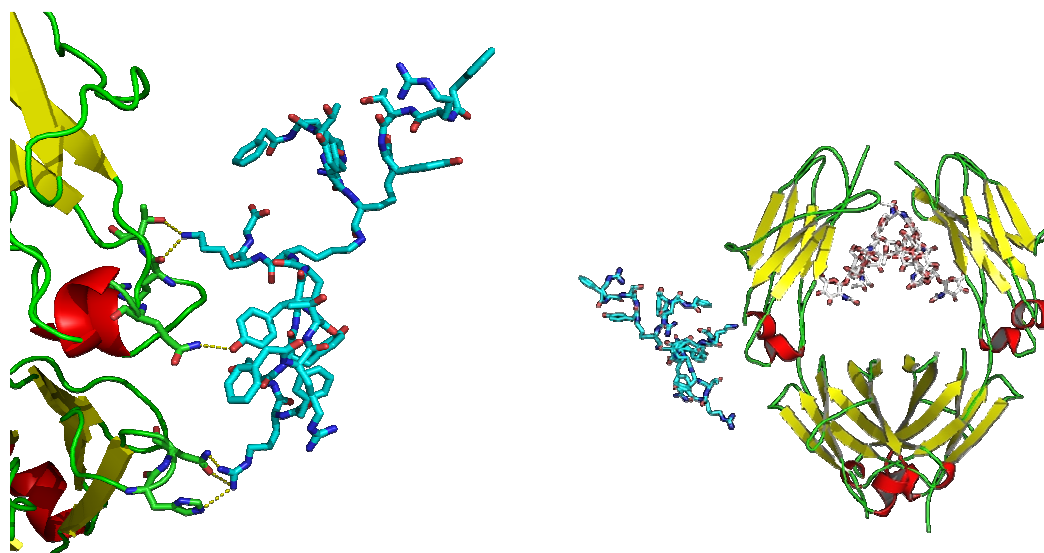


Rysunek 2. Kryształy fragmentu Fc w kompleksach z ligandami firmy Xepitagen.

Po analizie oddziaływań białko-ligand w każdym z otrzymanych kompleksów sugerowaliśmy zmiany do następnych syntezowanych ligandów i na podstawie naszych analiz projektowane były kolejne ligandy. Większość ligandów nie wykazywała jednak zbyt dużego powinowactwa do Fc, bądź nie było ono dostatecznie selektywne. Ostatecznie najlepiej oddziałującym z fragmentem Fc przeciwciała IgG1 okazał się związek XG o „kalafiorowatym kształcie”, którego kontakty najbardziej przypominały oddziaływania domeny B białka A z fragmentem Fc, co sugerowało możliwość wykorzystania go w wypełnieniu kolumn chromatograficznych, na których oczyszcza się przeciwciała monoklonalne.

Ligand XG, który ostatecznie został uznany za najlepszy, nie miał dobrych map gęstości elektronowej i został udokładniony z obsadzeniem zaledwie 1/3. Rozedrganie tego dendrymerycznego ligandu, który potrafił oddziaływać z symetrycznie równoważnymi cząsteczkami białka, spowodowane było labilnością jego „ramion”, a brak w jego miejscu negatywnych map gęstości elektronowej oraz dobre wskaźniki rozbieżności struktury utwierdzały o jego właściwym miejscu i najbardziej prawdopodobnej konformacji. Oddziaływania ligandu XG z białkiem mają charakter wiązań wodorowych (Rys. 3) i są utworzone pomiędzy polarnymi grupami ligandu a 255Arg, 256Thr, 311Gln, 433His i 434Asn z domeny C_{H2} fragmentu Fc przeciwciała monoklonalnego IgG1 [H-1].

Oprócz opisanego ligandu firmy Xeptagen obiecującym okazał się również jeden ze związków otrzymany w firmie Prometic tuż przed końcem projektu, nad którym pracuje firma już we własnym zakresie. Ligandy tej firmy były małymi związkami, pochodnymi triazyny z dwoma podstawnikami hydrofobowymi. Nasze badania pozwoliły ustalić długość łącznika i sposób przyłączenia ligandu do złoża chromatograficznego.



Rysunek 3. Struktura kompleksu fragmentu Fc z ligandem XG (PDB: 3D6G) (prawy). Ligand XG oddziałuje z aminokwasami subdomeny C_{H2} w rejonie zawiasowym przy subdomenie C_{H3} (lewy).

W otrzymanych przez nas strukturach krystalicznych kompleksów Fc z kilkoma ligandami tego typu zaobserwowaliśmy, że oddziałują one z aminokwasami w kluczowej bruzdzie fragmentu Fc pomiędzy domenami C_{H2} i C_{H3} . Te obserwacje pozwoliły na zaprojektowanie ligandu gdzie jeden podstawnik hydrofobowy został zastąpiony układem polarnym, a drugi został odsunięty o jedną grupę metylenową od głównego pierścienia triazynowego. Ligand ten po połączeniu ze złożem chromatograficznym wiązał przeciwciała monoklonalne.

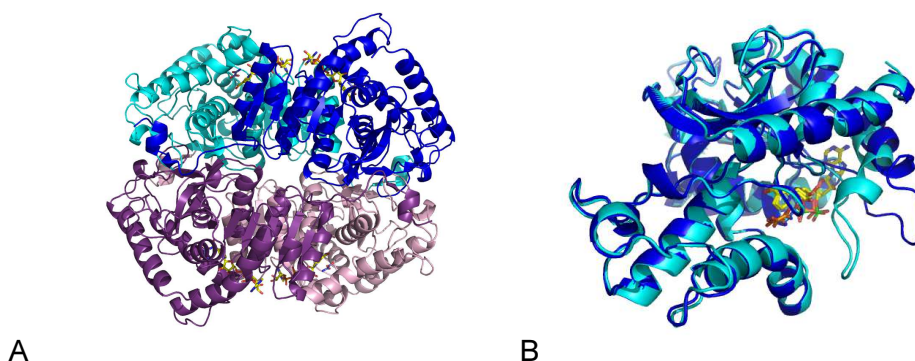
- **Określenie struktury krystalicznej i mechanizmu działania dehydrogenazy mleczanowej [H-2]**

Prof. Piotr Paneth z Instytutu Chemii Radiacyjnej Wydziału Chemicznego PŁ nawiązał z nami współpracę mającą na celu badania strukturalne dehydrogenazy mleczanowej (LDH – ang. *lactic dehydrogenase*). Badał on na poziomie kwantowym mechanizm reakcji katalizowanej przez ten enzym, pochodzący z mięśni królika. Do modelowania wykorzystywał z uwagi na duże podobieństwo sekwencyjne (93.66%) dostępną w PDB

dehydrogenazę ludzką. Zaproponowałam, by kierunkiem naszych badań było określenie struktury króliczej LDH w kompleksach z substratem i inhibitorem, a nie tylko enzymu w formie *apo*.

Dehydrogenaza mleczanowa jest enzymem końcowego etapu beztlenowej glikolizy zachodzącej w cytoplazmie wszystkich tkanek eukariotycznych. Katalizuje ona odwracalną reakcję redukcji pirogronianu do L-mleczanu, której towarzyszy utlenianie NADH (Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) do NAD⁺. Aktywność LDH jest obserwowana w mózgu, nerkach, wątrobie, płucach, węzłach limfatycznych, mięśniu sercowym, mięśniach szkieletowych, śledzionie, erytrocytach, leukocytach oraz w płytkach krwi, lecz jej poziom jest różny w poszczególnych tkankach. Tkanki wykazują różny skład izoenzymów LDH i analiza całkowitej aktywności LDH oraz jej izoform jest pomocna w diagnostyce wielu schorzeń, między innymi zawału mięśnia sercowego [10-12].

Krystalizację LDH prowadziłam razem z ówczesną doktorantką prof. P. Panetha, panią Katarzyną Świderek, bardzo zainteresowaną poznaniem metod krystalizacji białek. Otrzymałyśmy dwie formy krystaliczne badanej dehydrogenazy - w kompleksie z NADH i oksaminianem. Kryształy białkowe są bardzo delikatne z racji zawartości w swojej objętości około 50% wody, a co więcej, wstępne kryształy LDH charakteryzowały się niesprzyjającą żelową konsystencją. Po wielu optymalizacjach udało mi się znaleźć warunki, w których wyrosły monokryształy nadające się do eksperymentu dyfrakcyjnego. Dane dyfrakcyjne były rejestrowane na synchrotronie w Hamburgu, na linii X-11 do rozdzielczości 2.4 Å. Udokładnianie struktury LDH okazało się bardzo czasochłonne, ponieważ w części niezależnej komórki dla obu form znajdowały się dwa tetramery, czyli osiem monomerów, z których każdy składa się z 331 aminokwasów (Rys. 4). Dodatkowo należało dobrze zinterpretować różnicowe mapy gęstości elektronowej, aby we właściwej konformacji wbudować NADH. Struktura LDH została zdeponowana w PDB pod kodem dostępu 3H3F.



Rysunek 4. A) Tetramer będący 1/2 części asymetrycznej komórki LDH w kompleksie z NADH i oksaminianem (PDB: 3H3F); B) Nałożenie dwóch monomerów pokazujące ruch pętli w pobliżu centrum aktywnego enzymu.

Udało mi się również uzyskać dobrze rozpraszające kryształy drugiego kompleksu LDH z pirogronianem i przeprowadzić pomiar dyfrakcyjny na synchrotronie w Berlinie, do praktycznie atomowej rozdzielczości 1.4 Å. Struktura ta jeszcze nie została opublikowana, ale pozwoliła mi na porównanie oddziaływań w kieszeni aktywnej tego enzymu zarówno z substratem (pirogronianem), jak i kompetycyjnym inhibitorem (oksaminianem).

LDH jest białkiem tetramerycznym, występującym w postaci pięciu izoenzymów, tworzonych przez dwa rodzaje podjednostek - typu mięśniowego (M) w mięśniach szkieletowych i sercowego (H) w mięśniu sercowym. Poszczególne izoenzymy są połączeniem obu typów podjednostek i mimo, że katalizują tę samą reakcję, różnią się strukturą i specyficznością tkankową. Różnice te dotyczą przede wszystkim powinowactwa do substratu, wrażliwości na inhibitory, termostabilności oraz ruchliwości elektroforetycznej. Specyficzność izoenzymów LDH czyni ten enzym niezwykle przydatnym markerem zarówno w diagnostyce klinicznej, jak i w monitorowaniu przebiegu wielu schorzeń [13, 14].

Moim osiągnięciem oprócz określenia struktury przestrzennej LDH, było pokazanie na poziomie molekularnym centrum aktywnego enzymu wraz z ulokowanym NADH w kieszeni aktywnej oraz zaobserwowanie zmian konformacji pętli w pobliżu centrum aktywnego w momencie wiązania substratu (pirogronianu) lub inhibitora (oksaminianu) [15]. Analiza oddziaływań centrum katalitycznego obu kompleksów pomogła w wyjaśnieniu mechanizmu reakcji katalizowanej przez LDH. W obu strukturach w tetramerze występują zarówno monomery o zamkniętej, jak i otwartej konformacji pętli w pobliżu centrum aktywnego, co może wskazywać na to, że mimo, iż każdy monomer ma niezależne centrum aktywne, to działają one kooperatywnie podczas katalizowania reakcji (Rys. 4).

- **Określenie struktury krystalicznej β -fruktofuranozydazy (BFF) z *Bifidobacterium longum* w formie natywnej i kompleksu z fruktozą [H-3]**

Poznanie struktur enzymów użytecznych w procesach biotechnologicznych oraz mechanizmów ich działania ma ogromne znaczenie dla możliwości kontroli katalizowanej przez enzym reakcji na poziomie molekularnym, odpowiedniego doboru niestandardowych substratów, a także kształtowania centrum aktywnego na drodze ukierunkowanej mutagenезy w obszarze rozpoznawania substratów [16]. Inżynieria enzymu pozwala również zmodyfikować jego właściwości w celu optymalizacji warunków reakcji, np.: przesunięcia optymalnej temperatury reakcji czy podwyższenia odporności enzymu na specyficzne warunki [17].

Na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności trwają zaawansowane badania nad pre- i probiotykami. Między innymi w Instytucie Biochemii Technicznej realizowane są prace nad enzymatycznym przetwarzaniem sacharozy do prebiotycznych fruktooligosacharydów

[18,19]. Cukry te, w przeciwieństwie do sacharozy, nie są metabolizowane przez drobnoustroje jamy ustnej (tym samym nie sprzyjają rozwojowi chorób przyzębia), nie są również hydrolizowane przez enzymy trawienne przewodu pokarmowego, a wykorzystywane są dopiero w jego dolnej części przez bytujące w jelitach bakterie prebiotyczne, głównie z rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*.

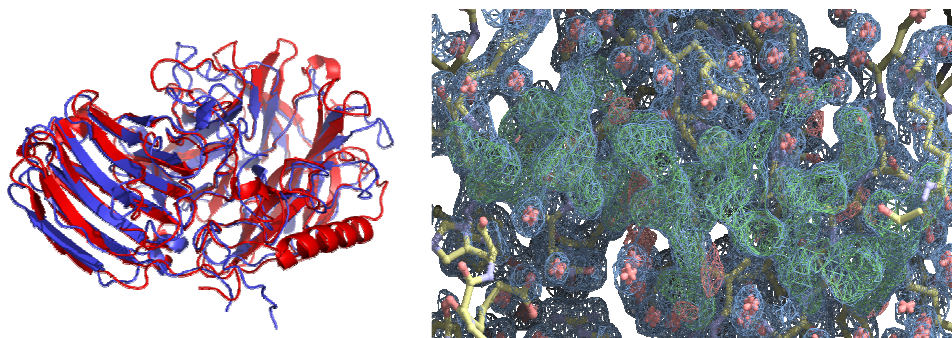
W naszym Instytucie opracowano metodę otrzymywania β -fruktofuranozydazy (BFF) z *Bifidobacterium longum* oraz metodę oczyszczania tego enzymu. *B. longum* są jednymi z pierwszych bakterii, które zasiedlają przewód pokarmowy noworodka, karmionego mlekiem matki. Ułatwiają one trawienie, hamują wzrost szkodliwych bakterii i usprawniają system obronny organizmu [20].

Włączając się w te badania prowadzone w naszym Instytucie wykrywałam i rozwiązałam strukturę krystaliczną natywnej formy β -fruktofuranozydazy a także uzyskałam strukturę jej kompleksu z jednym z produktów powstałych po katalizowanej przez ten enzym reakcji hydrolizy. Poznanie struktury inwertazy z prokariotycznego organizmu uznaję za bardzo duże swoje osiągnięcie, nie tylko z uwagi na znaczenie naukowe informacji, jakie niesie ze sobą jej struktura, ale również ze względu na wykorzystanie skomplikowanej metodyki koniecznej do jej rozwiązania.

Doktorantka prof. S. Bieleckiego, pani M. Jędrzejczak-Krzepkowska (obecnie dr inż.) dostarczyła mi enzym do badań strukturalnych. Pierwsze próby krystalizacyjne zapowiadały szybkie otrzymanie jego struktury, jednakże okazało się inaczej. Mimo, że kryształy pojawiły się dość szybko i miały obiecującą morfologię graniastosłupów lub heksagonalnych płytek, to albo słabo rozpraszały promienie X, albo były zbliżniaczone i nie można było przeindeksować danych dyfrakcyjnych. W związku z tym należało usprawnić proces oczyszczania białka tak, by wydajność końcowego, czystego produktu do badań strukturalnych była większa. Wspólnie dopracowaliśmy ten etap by uzyskać jak największą ilość białka do kolejnych prób krystalizacyjnych. Zasugerowałam użycie innego plazmidu, pozwalającego na umieszczenie metki histydynowej na C-końcu nadprodukowanego białka, co zapobiegało tworzeniu się ciałek inkluzyjnych, a później ułatwiało oczyszczanie chromatograficzne na złożu niklowym.

Po kolejnych optymalizacjach krystalizacji udało mi się otrzymać inną formę krystaliczną białka, dobrze rozpraszającą promieniowanie rentgenowskie. Dane dyfrakcyjne (1.7 Å) uzyskane na synchrotronie w Berlinie przeindeksowałam i skalowałam za pomocą programu HKL2000. Wybór grupy przestrzennej nie był prosty, ale jeszcze trudniejsze okazało się rozwiązanie struktury tego enzymu, gdyż białko wykorzystane jako model o największym podobieństwie sekwencyjnym (26%) nie pozwoliło na uzyskanie rozwiązania. Dopiero zbudowanie sztucznej hybrydy, uzyskanej przez połączenie dwóch najbardziej podobnych fragmentów z różnych białek w jeden model: inwertazy z *Thermotoga maritima* (PDB ID:

1W2T) i egzoinulinazy z *Aspergillus awamori* (PDB ID: 1Y4W), umożliwiło rozwiązanie struktury przez podstawienie cząsteczkowe w grupie przestrzennej P3₁21. Wykorzystałam w tym celu program *Phaser*, przeprowadzając obliczenia w wielu krokach przy zmieniającym się r.m.s.d. pomiędzy podstawianym modelem a rozwiązywaną strukturą. Jednakże po rozwiązaniu otrzymane mapy gęstości elektronowej były wypełnione tylko szczątkowymi fragmentami aminokwasów. Dzięki programowi *ARP/wARP* z pakietu *CCP4* i powolnemu wstawianiu kolejnych aminokwasów udało mi się zbudować model białka.



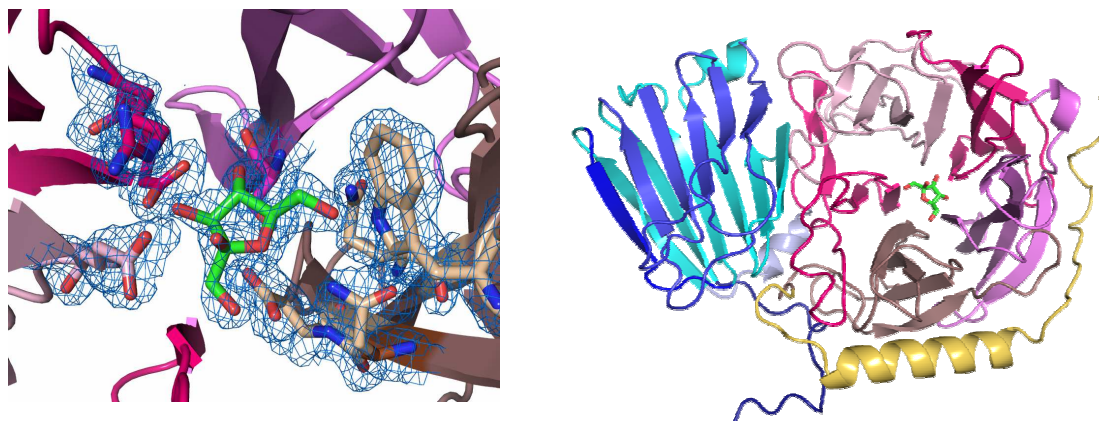
Rysunek.5 Nałożenie modelu teoretycznego (niebieski) i krystalograficznego (czerwony) β -fruktofuranozydazy oraz mapy gęstości elektronowej Fo-Fc (zielone) na brakującą w modelu teoretycznym N-terminalną helisę (czerwony kolor w lewym panelu).

Po kilku cyklach udokładniania programem *Refmac5* pojawiły się mapy przedstawiające dodatnią gęstość elektronową (Fo-Fc) na N-terminalną helisę (Rys. 5). Zarówno N-terminalnej helisy, jak i położenia bądź konformacji kilku pętli nie przewidziano w teoretycznym modelu (Rys.5), który był wykonany dla potrzeb biochemicznej analizy białka w zespole prof. J. Bujnickiego. Jest to zresztą dość częsty przypadek, że model teoretyczny nieco odbiega od rzeczywistego, dlatego też określanie struktur przestrzennych za pomocą analizy rentgenograficznej jest niezbędne do przedstawienia wiarygodnego modelu zarówno makromolekuł, jak i małych cząsteczek.

Dzięki bardzo dobrej rozdzielczości danych dyfrakcyjnych (1.7 Å) mapy gęstości elektronowej 2Fo-Fc pozwoliły na jednoznaczną interpretację wielu szczegółów strukturalnych. Po uzyskaniu kompletnego modelu wskaźniki rozbieżności struktury poprawiły się znacząco, co ostatecznie potwierdziło poprawność otrzymanego rozwiązania. Określiłam strukturę zarówno natywnej formy tego enzymu, jak i jego kompleksu z fruktozą, który uzyskałam przez nasączenie natywnych kryształów w roztworze rafinozy.

β -fruktofuranozydaza hydrolizuje wiązania glikozydowe β -2-1 w sacharydach i wykazuje dużą reaktywność względem m.in. nystozy, kestozy i sacharozy, natomiast do rafinozy ma znacznie mniejsze powinowactwo. Aktywność enzymu względem rafinozy jako substratu wyniosła zaledwie 6.7% w porównaniu z referencyjną sacharozą dla której przyjęto 100%. Biorąc pod uwagę niską aktywność enzymu względem rafinozy miałam nadzieję, że po

krótkim czasie namaczania kryształu natywnego enzymu w roztworze rafinozy enzym nie zdąży przeprowadzić jej hydrolizy i otrzymam strukturę kompleksu enzymu z rafinozą.



Rysunek 6. Kompleks BFF z fruktofuranozą w centrum katalitycznym powstałą w wyniku hydrolizy rafinozy katalizowanej przez β -fructofuranozydazę

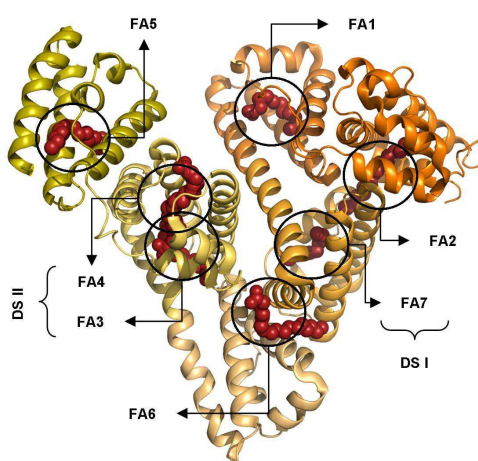
Okazało się, że enzym w kryształach przeprowadził reakcję hydrolizy **[H-3]** i w otrzymanej strukturze krystalicznej w centrum aktywnym widoczna była fruktofuranaza jako jeden z produktów hydrolizy rafinozy (Rys. 6). Udowodniłam tym samym, że enzym ten hydrolizuje wiązanie β -2-1 w rafinozie, zgodnie z mechanizmem podwójnego podstawienia nukleofilowego, które prowadzi do retencji konfiguracji na anomerycznym atomie węgla i pozostawia w centrum katalitycznym β -(2,1)-D-fruktofuranozę **[H-3]**. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań strukturalnych pozwoliły na pełniejsze scharakteryzowanie tego enzymu, który wykorzystywany jest przy produkcji preparatów prebiotycznych [21]. Badany przeze mnie enzym może być również dodawany bezpośrednio do różnych produktów w celach profilaktycznych lub może być składnikiem leków wspomagających trawienie.

- **Określenie struktur przestrzennych surowiczych albumin ssaczych oraz analiza ich oddziaływań w kompleksach z ligandami [H-4, H-7, H-8 i H-11]**

Próbując znaleźć rozwiązanie problemu z krystalizacją lipazy otrzymanej w naszym Instytucie analizowałam homogenność próbki na linii SAXS (*small angle X-ray scattering*), na synchrotronie w Hamburgu. Metoda ta wykorzystuje niskokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego na roztworach białek, w której referencyjnym białkiem jest wołowa surowicza albumina (BSA od ang. *bovine serum albumin*). Na moje pytanie, dlaczego akurat to białko jest używane w tym celu – otrzymałam odpowiedź, że jest to białko łatwo dostępne, stabilne, o specyficznym kształcie, a dodatkowo uznane za niekrystalizowalne. Bardzo zdziwił mnie fakt, że białko tak szeroko wykorzystywane w eksperymentach fizykochemicznych i testach laboratoryjnych [22-25] nie posiada

określonej do tej pory struktury krystalicznej. Krystalizacja makromolekuł jest trudnym i nieprzewidywalnym procesem, jednak jestem przekonana, że nie można o jakimkolwiek białku powiedzieć, że nigdy nie wykryje. Po sprawdzeniu struktur w Protein Data Bank (PDB) przekonałam się, że jedyną badaną strukturą surowiczej albuminy jest albumina ludzka - HSA (ang. *human serum albumin*) [26,27]. Tak właśnie zrodził się pomysł na projekt „albuminowy”, który rozpoczął się od dużego wyzwania, czyli wykrycia BSA, uznanej powszechnie za niekrystalizowalne białko i określenia jej struktury przestrzennej.

Surowicza albumina jest głównym białkiem transportującym liczne substancje w płynach ustrojowych kręgowców. Ligandy przyłączone do albuminy mogą być przenoszone w układzie krwionośnym z miejsca sekrecji lub aplikacji do miejsca ich działania. Częsteczką albuminy surowiczej posiada wiele miejsc wiążących (Rys. 7), które są odpowiedzialne za interakcje nie tylko z ligandami naturalnie występującymi w organizmie (m.in. kwasami tłuszczowymi, hormonami), ale także z syntetycznymi związkami, takimi jak leki przeciwbólowe czy antybiotyki.



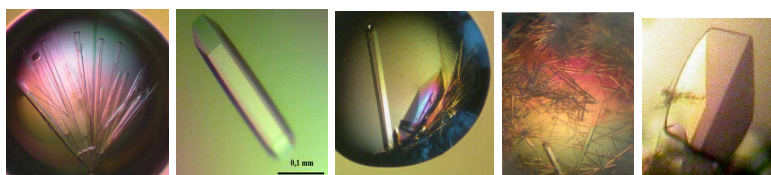
Rysunek 7. Rozkład głównych kieszeni wiążących FA w albuminie surowiczej.

Krystalizacja surowiczych albumin wymagała diametralnie innego podejścia niż jest to stosowane w przypadku większości białek. Zazwyczaj białka krystalizują ze stężeń 5 - 16mg/ml, natomiast surowicze albuminy ze stężeń kilkanaście razy wyższych (40 - 130mg/ml). Opracowałam również metodykę oczyszczania komercyjnych preparatów albumin w celu otrzymania białka dającego monokryształy nadające się do eksperymentu dyfrakcyjnego. Procedura ta składa się z etapu odtłuszczania albumin na węglu aktywnym, a następnie oczyszczania chromatograficznego na złożu Superdex 200 w celu oddzielenia kowalencyjnego dimeru, który obecny jest w handlowych albuminach nawet o czystości 99% lub większej. Podczas izolowania albumin z krwi pojawia się spontanicznie dimer w wyniku tworzenia się mostka disiarczkowego pomiędzy jedyną wolną 34Cys. W różnych albuminach jest inny jego procentowy udział w stosunku do frakcji zawierającej monomer. Kolejnym

wyzwaniem, po znalezieniu warunków krystalizacyjnych dających monokryształy, było opracowanie sposobu na wydobycie ich z kropli krystalizacyjnej, ponieważ duże stężenie białka powodowało tworzenie się na jej powierzchni „kożucha”, który uszkadzał kryształy białka przy wyjmowaniu go z kropli. Morfologia kryształów BSA nie była dobra; białko krystalizowało w postaci długiego prostopadłościanu z rynienką wzdłuż jego najdłuższego boku. Pierwsze pomiary synchrotronowe kryształów BSA, zgodnie z sugestią bardziej doświadczonych krystalografów, wykonywałam w pokojowej temperaturze. Jednak była to strata czasu gdyż otrzymywane dane dyfrakcyjne o rozdzielczości powyżej 3.5 Å nie nadawały się do rozwiązania nowej struktury. Po znalezieniu właściwego krioprotektanta udało mi się otrzymać znacznie lepsze dane dyfrakcyjne, które rejestrowałam w temperaturze 100K. Strukturę krystaliczną albuminy surowicy wołowej BSA rozwiązałam podstawieniem cząsteczkowym za pomocą programu *Phaser*, w którym wykorzystałam monomer HSA (PDB: 1AO6) jako model. Podobieństwo sekwencyjne pomiędzy HSA i BSA wynosi 76%, ale pomimo tak dużego podobieństwa rozwiązanie nie było łatwe. Również udokładnianie struktury wiązało się z wykorzystywaniem wielu opcji programów krystalograficznych; najlepsze dał program *Phenix* z modyfikowanymi przeze mnie parametrami wejściowymi. Publikacja, w której opisuję rozwiązanie trzech natywnych surowiczych albumin: wołowej, końskiej i króliczej [H-4] po trzech latach od jej ukazania ma już ponad 80 cytowań.

BSA jest używana w testach *western blot* oraz w badaniach spektrofotometrycznych jako wzorzec, np. we wspomnianej powyżej metodzie niskokątowego rozpraszania promieni Roentgena na roztworach białek - SAXS. Jest również zamiennie stosowana z HSA jako wzorzec w wielu testach określających powinowactwo i kinetykę wiązania leków, [28] jest wzorcem masy w elektroforezie SDS_PAGE oraz w chromatografii żelowej (GPC). Z tego względu poznanie struktury przestrzennej tego białka ma duże znaczenie. Natomiast określenie struktury końskiej surowiczej albuminy (ESA – *equine serum albumin*) pozwoliło zrozumieć, dlaczego ludzie mogą być uczuleni na końską surowicę, która w czasie wojny używana była do transfuzji krwi, a jeszcze do niedawna - w zastrzykach przeciwciałowych. ESA była dość prosta do wykrystalizowania, natomiast otrzymanie kryształów kolejnych surowiczych albumin, podobnie jak wołowej, było naprawdę dużym wyzwaniem. Optymalizację warunków krystalizacyjnych dla króliczej surowiczej albuminy (LSA – *Leporine serum albumin*), jak również dla owczej (OSA – *Ovine serum albumin*) i koziej (CSA – *Caprine serum albumin*) rozpoczynałam od bardzo cienkich, długich kryształków w kształcie igieł. Dopracowanie warunków krystalizacyjnych wiązało się ze sprawdzaniem rodzaju buforów i ich pH, doboru czynników strącających, a także stężenia białka. Dodatkowo, oprócz już znalezionych we wstępnych warunkach głównych czynników powodujących nukleację, potrzebne było przetestowanie bardzo dużej liczby tzw. dodatków

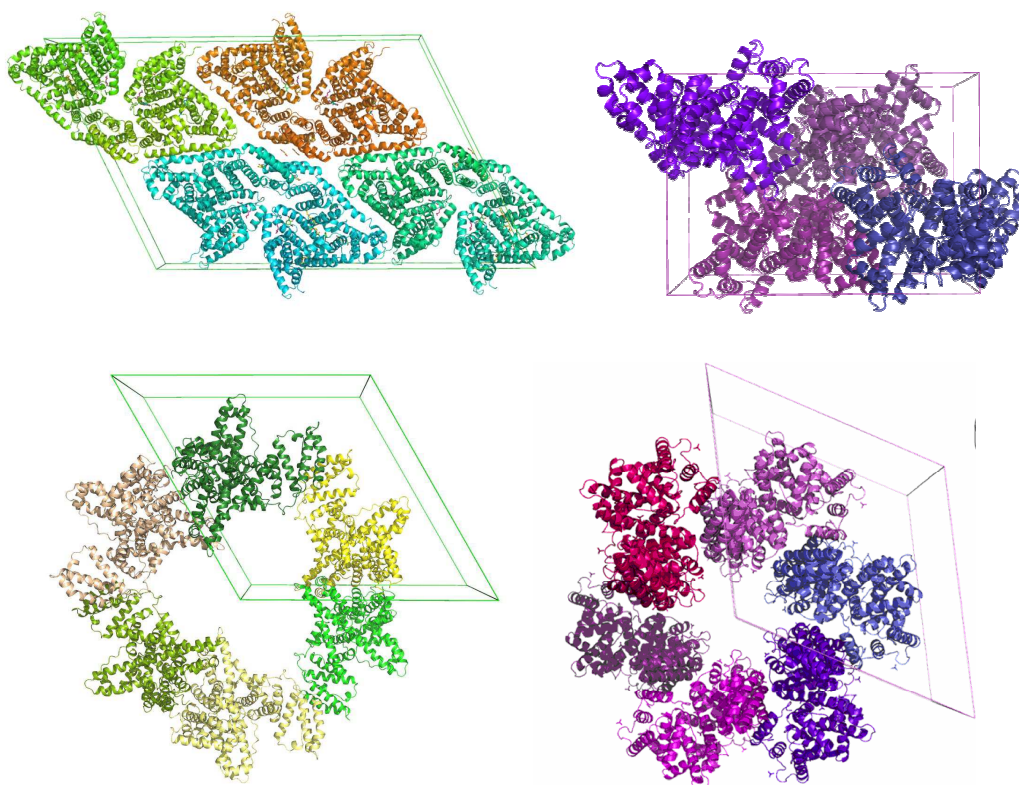
krystalizacyjnych, których użycie doprowadziłoby do formowania się kryształów o lepszej morfologii, a więc o pożądanych kształtach brył geometrycznych (Rys. 8).



Rysunek 8. Kryształy w kolejności: BSA, ESA, LSA, OSA i CSA.

Każda, z określonych przeze mnie struktur ssaczych albumin, krystalizuje w innych warunkach, jak również w innej grupie przestrzennej: BSA w C2, ESA w P6₁, LSA w P2₁2₁2₁ [H-4], OSA w P3₂21, CSA w P2₁2₁2₁ i dodatkowo zarówno OSA, jak i CSA w układzie trójskośnym P1. Upakowanie cząsteczek w komórkach elementarnych kilku rozwiązanych albumin pokazane jest na Rys. 9.

Po określeniu struktur przestrzennych surowiczych albumin: wołowej (BSA), końskiej (ESA) i króliczej (LSA) w formie natywnej kontynuowałam krystalizacje kompleksów tychże albumin z różnymi ligandami, a także prowadziłam badania strukturalne innych surowiczych albumin. Z uwagi na to, że kompleksy ESA otrzymywane były w podobnych warunkach przez kokrystalizację, a ich kryształy rosły w ciągu 2-3 dni, to najszybciej mogłam uzyskać kryształy kompleksów tego białka z ligandami i przeprowadzić ich pomiar dyfrakcyjny w celu określenia struktury i analizy oddziaływań białko - ligand.



Rysunek 9. Upakowanie albumin w kryształach: BSA, LSA (górny panel), OSA i ESA (dolny panel)

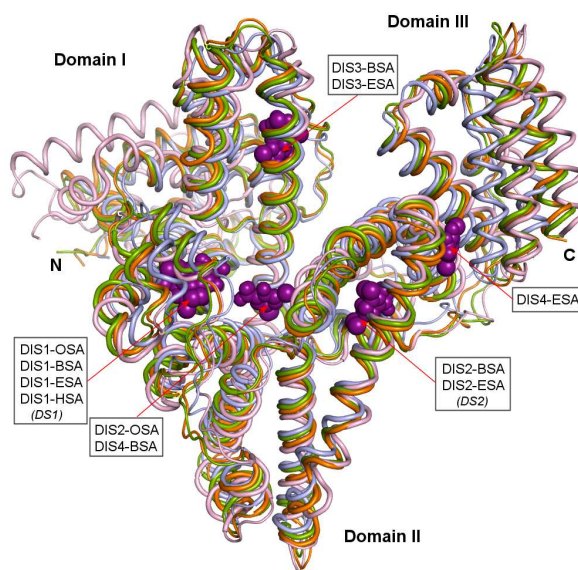
W tym czasie zaczęłam opiekę nad trójką doktorantów, których wprowadziłam w projekt „albuminowy” ucząc ich tajników krystalizacji, pomiaru dyfrakcyjnego, indeksowania i skalowania danych dyfrakcyjnych różnymi programami oraz rozwiązywania i udokładniania struktur krystalicznych. Ich prace doktorskie będą dotyczyły struktur krystalicznych kompleksów surowiczych albumin z ligandami, w celu określania miejsc wiążących te same ligandy, a także analizy sposobu wiązania tych samych ligandów w cząsteczkach różnych albumin: BSA, ESA, LSA, OSA i CSA i HSA.

Do krystalizacji kompleksów SA z ligandami wyselekcjonowałam kilka grup związków należących do: leków przeciwzapalnych, antybiotyków, witamin oraz hormonów i metabolitów. Badania strukturalne tych blisko spokrewnionych białek pokazują jak zmiany w sekwencji aminokwasowej wpływają na ich właściwości wiążące [29]. Praca z tymi białkami jest bardzo fascynująca, szczególnie z uwagi na to, że badając jednocześnie albuminy z różnych organizmów otrzymuję bardzo dużo ciekawych i zaskakujących często wyników w tym samym czasie. Wyniki badań strukturalnych pokazują, jak różnice sekwencyjne albumin wpływają na ich inne powinowactwo do ligandów. Dzięki określonym strukturom 3D i graficznym programom krystalograficznym możliwa jest wizualizacja miejsc wiążących ligandy i obrazowe wytłumaczenie innego sposobu ich wiązania. Przeprowadzone przeze mnie badania krystalograficzne surowiczych albumin wskazują na, nie tylko odmienne miejsca wiązania niektórych ligandów, ale również na inną liczbę związanych cząsteczek tego samego ligandu. Czasami są to te same miejsca, ale związane ligandy mają inną konformację, na którą to wpływają zarówno różnice sekwencyjne w kieszeniach wiążących albumin z różnych organizmów, a niekiedy zmiana objętości kieszeni bądź wejścia do niej, będąca efektem nawet minimalnego ruchu którejś z domen, czy subdomen.

Moje publikacje, w których porównuję właściwości wiążące albumin surowiczych różnych gatunków [**H-4**, **H-7** i **H-8**] są pierwszymi w świecie pracami o surowiczych albuminach opartymi o ich struktury przestrzenne. Opracowałam metodykę otrzymywania kompleksów surowiczych albumin z różnymi ligandami. W zależności od warunków krystalizacyjnych bądź rozpuszczalności jedne tworzyły kompleksy przez namaczanie kryształów natywnych w roztworach ligandów inne natomiast jedynie poprzez kokrystalizację. Już przy odtłuszczaniu albumin na węglu aktywnym zauważyłam, że białka te są stabilne nawet w bardzo wysokiej temperaturze. Dlatego też kompleksy tworzyłam poprzez całodobową, a nieraz kilkudniową inkubację białka w temperaturze 30-55°C z 10 molowym nadmiarem ligandu, wcześniej przygotowanego w odpowiednim rozpuszczalniku. Jeśli musiał być to rozpuszczalnik organiczny np. etanol, dbałam o to by ostateczna jego zawartość w roztworze białka nie przekroczyła 10%, choć albuminy nie ulegają denaturacji nawet przy 40% zawartości alkoholu. Po przeprowadzonych eksperymentach dyfrakcyjnych i rozwiązaniu struktur, w przypadku niezaobserwowania ligandu w mapach gęstości

elektronowej, w kolejnej próbie kompleks tworzony był poprzez nasączenie kryształu natywnego w roztworze ligandu w optymalizowanych warunkach. Zaobserwowałam pewną prawidłowość, że albuminy krystalizujące w obecności soli łatwiej tworzyły kompleksy z ligandami poprzez kokrystalizację, po wcześniejszej inkubacji w podwyższonej temperaturze, a te, które dawały monokryształy w obecności polietylenoglikoli (PEG-ów) - najczęściej tworzyły kompleksy po krótkim czasie namaczania kryształów natywnych w roztworze z ligandem. Czas kontaktu białka z ligandem należało kontrolować, gdyż w obecności jednych ligandów kryształ mógł być namaczany nawet kilkanaście godzin, a w innych przypadkach już po 2 godzinach namaczania ulegał zniszczeniu. Przy współudziale współpracujących ze mną doktorantów udało się wykrystalizować po kilkanaście kompleksów badanych albumin z lekami przeciwzapalnymi i antybiotykami. Do tej pory zdeponowaliśmy w Protein Data Bank (PDB) ponad 20 struktur ssaczych albumin w kompleksach z różnymi ligandami, mimo że rozwiązaliśmy ich dużo więcej. Wyznaję jednak zasadę, że zdeponowana struktura w PDB powinna mieć towarzyszącą jej publikację, w której można znaleźć pełny opis struktury z zaakcentowanymi ważnymi szczegółami strukturalnymi oraz informacje na temat korelacji pomiędzy budową a funkcją deponowanej makromolekuły. Białka te mają dwa główne miejsca wiązania leków, jednakże każda albumina ma inne wartości stałej wiązania dla tych samych ligandów, które nie mają zawsze tej samej lokalizacji, a także różnią się liczbą miejsc wiążących ten sam ligand. Z tego względu badania strukturalne albumin dodatkowo starałam się poszerzać o metody fizykochemiczne, takie jak: termoforezę w małej skali (MST – ang. *Microscale thermophoresis*) czy miareczkowanie kalorymetryczne (ITC – ang. *Isotermic titration calorimetry*).

Pierwszym ligandem, którego użyłam do tworzenia kompleksów z albuminami był kwas diiodosalicylowy (DIS). Był to wybór metodyczny, gdyż związek ten oprócz medycznego zastosowania w kontrastach i leczeniu przeciw pasożytniczym zwierząt posiada 4 atomy jodu, i w przypadku niepowodzenia w podstawieniu cząsteczkowym (MR – ang. *molecular replacement*) z zastosowaniem ludzkiej albuminy (HSA) dawał możliwość anomalnego rozpraszania i rozwiązania struktury metodą SAD. Okazało się, że badane przeze mnie albuminy można rozwiązać metodą MR (jedne bez problemu, inne wymagają więcej podejść), a cząsteczka ligandu DIS dała możliwość zaobserwowania innych właściwości wiążących dla różnych albumin. Ligand ten ma zarówno takie same miejsca wiązania w porównywanych albuminach HSA, BSA i ESA [H-7], jak również każda z surowiczych albumin ma typowe tylko dla siebie dodatkowe miejsca wiążące cząsteczki DIS (Rys. 10).



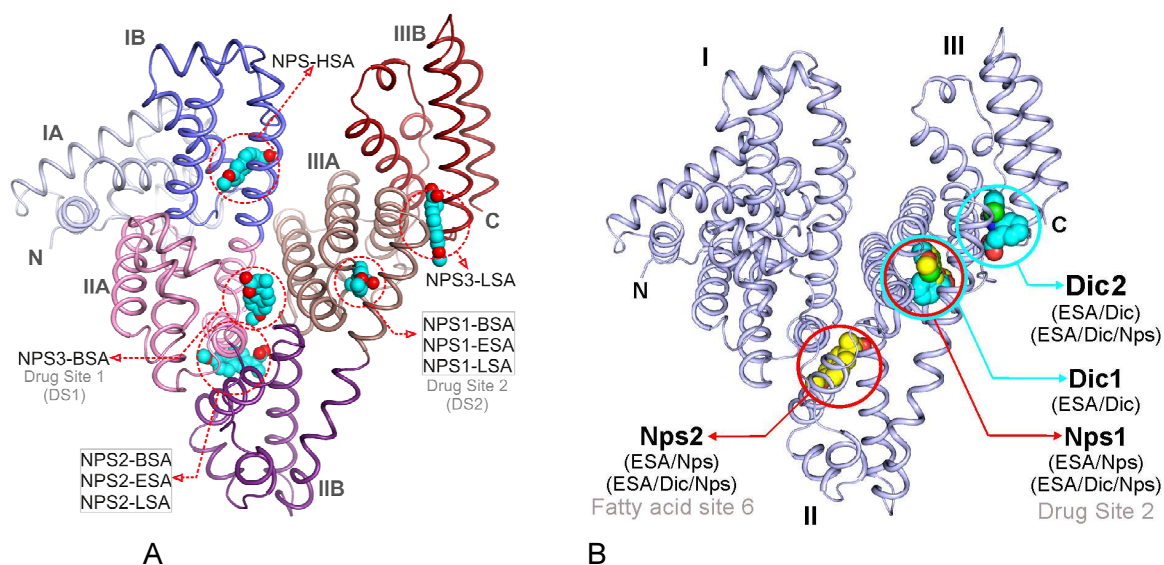
Rysunek 10. Wiązanie DIS przez albuminy: BSA (zielony), ESA (pomarańczowy), OSA (niebieski) i porównanie z HSA (różowy)

Według literatury HSA ma powinowactwo do jednej cząsteczki DIS, która po związaniu posiada wysokie czynniki drgań termicznych, natomiast BSA i ESA wiążą po 4 cząsteczki tego ligandu, a OSA mające 98% podobieństwa do BSA wiąże tylko dwie molekuly DIS.

Absolutnym zaskoczeniem był przypadek koziej albuminy (CSA), która związała aż 7 cząsteczek DIS (publikacja jest w ostatnim etapie edycyjnym).

Zaobserwowałam również różnice w sposobie wiązania się leku przeciwzapalnego – naproksenu, do albuminy wołowej i końskiej [H-9], który jest podobny w dwóch miejscach, w obu albuminach, ale żadne z czterech w BSA i trzech w ESA nie jest analogicznym miejscem wiązania go w HSA (Rys. 11A). Informacja ta jest tym bardziej zaskakująca, że nie jest to typowe miejsce wiązania leków DS1 (*drug site 1*) ani DS2 (*drug site 2*). Podobnie przedstawia się porównanie wiązania diklofenaku, ibuprofenu i suprofenu przez albuminy różnych gatunków, których badania strukturalne będę publikować w najbliższym czasie.

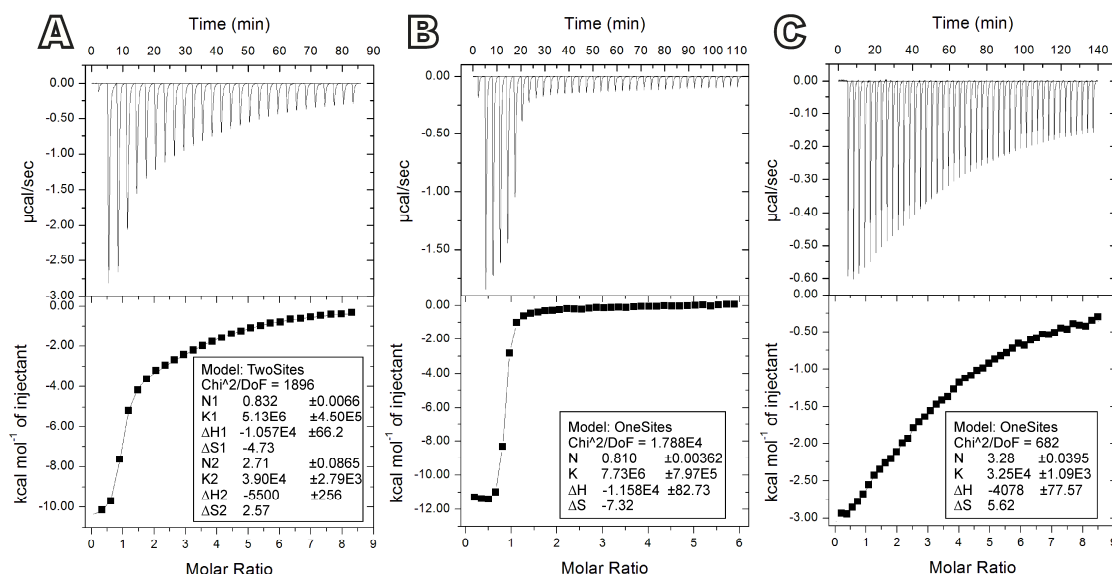
Określone przeze mnie struktury ssaczych surowiczych albumin i prowadzone badania krystalograficzne ich kompleksów z ligandami pozwoliły na szersze poznanie tego ważnego białka transportującego oraz wykazały inne właściwości wiążące dla albumin z różnych organizmów. Na ich podstawie możemy wskazać, które właściwości mogą być przenoszone na "model ludzki", a które nie. Moim osiągnięciem w tym zakresie, oprócz określenia struktur krystalicznych kilku surowiczych albumin, było przede wszystkim potwierdzenie zmienności ewolucyjnej tego białka, która ujawnia się nie tylko w różnej sekwencji aminokwasowej, ale również w odmiennym wiązaniu tych samych ligandów przez albuminy różnych gatunków. Dzięki programom graficznym możliwa jest wizualizacja struktur przestrzennych z dokładnie widocznymi kieszeniami wiążącymi i oddziałującymi w nich ligandami.



Rys 11. Wiązanie naproksenu (Nps) w BSA, LSA i ESA (A) oraz miejsca wiązania Nps i diklofenaku (Dic) w podwójnym kompleksie ESA/Dic/Nps oraz Dic w kompleksie ESA/Dic (B).

W ostatnim czasie prowadzone przeze mnie badania strukturalne albumin dotyczą eksperymentów konkurencyjności wiązania leków. Publikacja dotycząca badania konkurencyjności naproksenu (Nps) i diklofenaku (Dic) w wiązaniu się do końskiej albuminy (Rys. 11B), od lipca tego roku jest w toku edycyjnym w *Journal of Medicinal Chemistry* i najprawdopodobniej ukaże się już po złożeniu wniosku habilitacyjnego [P-26]. Opisuję w niej kompetycję wiązania diklofenaku i naproksenu przy użyciu metod krystalograficznych i eksperymentów ITC. Dzięki przeprowadzonemu poszerzonemu eksperymentowi krystalizacyjnemu i jednoczesnym badaniom kalorymetrycznym możliwa była jednoznaczna interpretacja wyników ITC.

Kompleksy ESA z Nps i Dic uzyskane metodą kokryształizacji wskazywały na obecność dwóch miejsc wiążących dla każdego z nich, a kieszeń DS2 była miejscem wspólnym dla obydwu tych leków przeciwzapalnych. W przypadku, gdy kryształ kompleksu uzyskiwany był przez kokryształizację z równomolowymi ilościami Nps i Dic, w kieszeni DS2 wiązał się Nps, a drugie unikalne miejsca wiązania dla tych leków obsadzone były tak, jak w pojedynczych kompleksach. Miareczkowanie kalorymetryczne pozwoliło wyznaczyć dwie stałe wiązania dla diklofenaku, ale tylko pojedynczą stałą wiązania dla naproksenu (Rys. 12). W kolejnym eksperymencie krystalizacyjnym otrzymaliśmy kryształ podwójnego kompleksu metodą dwukrotnego namaczania w ligandach, najpierw kryształ natywny ESA był namaczany w roztworze diklofenaku, a później po utworzeniu kompleksu ESA/Dic w roztworze naproksenu tworząc podwójny kompleks ESA/Dic/Nps. W tym kompleksie drugie miejsce wiązania diklofenaku zostało utrzymane natomiast naproksen wyparł diklofenak z jego głównego miejsca wiązania i nie związał się w swoim pobocznym miejscu. Pozwoliło to na zaplanowanie i prawidłową interpretację eksperymentów ITC.



Rysunek 12. ITC eksperyment dla stałej wiązania ESA do naproksenu i diklofenaku.

Stałe wiązania Dic odpowiadają kolejno głównemu i pobocznemu miejscu wiązania (A), stała wiązania dla Nps odpowiada jedynie wiązaniu go w głównej kieszeni DS2 (B). Wiązanie do miejsca drugiego zachodzi z dużo mniejszym powinowactwem, a wyższa wartość tej stałej dla Nps świadczy o tym, że ma on większe powinowactwo do kieszeni DS2 niż Dic i wypiera go z niej zarówno przy konkurencyjnym wiązaniu, jak i z już utworzonego kompleksu ESA/Dic. Miareczkowanie poprzednio utworzonego kompleksu ESA/Nps nadmiarem diklofenaku pozwoliło na ustalenie, że niższa stała wiązania odpowiada pobocznemu miejscu wiązania Dic.

W przyszłości łatwiejsza będzie interpretacja wyników podobnych doświadczeń w przypadku innych albumin. Równoległe prowadzenie eksperymentów tworzenia pojedynczych kompleksów a następnie wypierania jednych ligandów drugimi i otrzymywania podwójnych, czy potrójnych kompleksów przy użyciu różnych metod np. krystalograficznej, ITC lub MST pomoże w bardziej precyzyjnej interpretacji wyników z tych eksperymentów. Dzięki tym doświadczeniom będzie można łatwiej skorelować sposób wiązania ligandu ze stałą powinowactwa. W trakcie realizacji projektu albuminowego miałam okazję pracować z innym białkiem - awidyną, niesklasyfikowanym jako transportujące, jednakże ewolucyjnie dostosowane do wiązania jednego typu ligandu - biotyny oraz całego szeregu różnych jej pochodnych.

- **Badania strukturalne awidyny z koniugatami biotyny [H-5]**

Awidyna jest dobrze rozpuszczalną makromolekułą występującą w białku jaja kurzego. Jest obiektem wielu badań biochemicznych z uwagi na swoją unikatową właściwość wiązania biotyny, które to oddziaływanie jest jednym z najsilniejszych występujących w

przyrodzie [30]. Tetramer awidyny wiąże cztery cząsteczki witaminy H, tworząc niekowalencyjne wiązanie o wysokim powinowactwie ($K_d \approx 10^{-13} - 12^{-15}$ M). Oddziaływanie to jest kilka razy silniejsze od typowego, występującego w kompleksie antygen – przeciwciało i dlatego taki kompleks jest podstawą technologii znakowania (LAB - Labeled Avidin - Biotin) i "mostkowania" (BRAB - Bridged Avidin - Biotin) [31,32], które są wykorzystywane w badaniach immunologicznych, a także metodach laboratoryjnych do wykrywania sond biotynylowanych [33-35]. Opracowaliśmy warunki krystalizacji awidyny z dwiema pochodnymi biotyny (rutenową **[H-5]** i ferrocenową [P-23]), zsyntezowanymi w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Łódzkiego (dr. D. Płażuk i prof. J. Zakrzewski). Do wniosku habilitacyjnego włączyłam tylko pierwszą z tych publikacji **[H-5]**, gdyż druga jest bardziej nakierowana na projektowanie i syntezę koniugatów biotyny i była koordynowana przez dr D. Płażuka z UŁ.

Krysztaly obu kompleksów były otrzymane przez kokrystalizację metodą dyfuzji par w wiszącej kropli, a pomiar dyfrakcyjny kryształów przeprowadziłam na synchrotronie w Berlinie (BL.14.2 BESSY). Rozwiązałam strukturę krystaliczną kompleksu awidyny z rutenocenową pochodną biotyny w grupie przestrzennej $P4_22_12$ ($2,5\text{\AA}$). Struktura tego kompleksu ujawnia reszty aminokwasowe łańcucha polipeptydowego stabilizujące tetramer oraz wpływające na silne wiązanie pochodnej biotyny (Rys. 13). Miejsce wiążące ligand znajduje się w centralnej części β -beczki, a dwie reszty aminokwasowe Ser73 i Arg114 ściśle oddziałują z dwupierścieniowym ugrupowaniem rutenocenowym. Z uwagi na to, że użyta do badań awidyna była z naturalnego źródła (nierekombinowana) to w mapach gęstości elektronowej dobrze widoczny był łańcuch oligosacharydu dołączony do białka w wyniku glikozylacji. Dane dyfrakcyjne drugiego kompleksu zindeksowałam i przeskalowałam do $2.0\text{\AA}$, a strukturę rozwiązałam w układzie rombowym, w grupie $P2_12_12$ z dwoma monomerami w części asymetrycznej.



Rysunek 13. Kompleks awidyny z pochodną rutenocenową biotyny (pomarańczowy) **[H-5]** oraz dwa monomery o różnej konformacji pętli L3-4 kompleksu awidyny z ferrocenową pochodną biotyny (fioletowy) [P-23].

Moim osiągnięciem w tej drugiej strukturze było zauważenie, że pochodna ferrocenowa związana jest inaczej w obu monomerach i, że to ona wpłynęła na ruch pętli L3-4 (Rys. 13). Te oddziaływania - inne w obu monomerach - spowodowane są elastycznym łańcuchem łączącym ugrupowania cykliczne na obu jego końcach. I właśnie różnica w konformacji pętli L3-4 na czubku dwóch monomerów jest wynikiem innego oddziaływania z ligandem. Te specyficzne strukturalne właściwości tego ligandu umożliwią jego wykorzystanie w wielu biochemicznych aplikacjach [P-23].

Awidyna jest małym białkiem (11kDa) o bardzo ciekawej strukturze ośmio-łańcuchowej antyrównoległej prawoskrętnej β -beczki, której wewnątrz jest przystosowane do wiązania nawet mocno rozbudowanych pochodnych biotyny. Metalocenowe pochodne biotyny mają silne właściwości cytotoksyczne, a nadprodukcja receptorów o dużym powinowactwie do witaminy H powoduje, że mogą być użyte jako potencjalne leki przeciwnowotworowe [P-23]. Problemem jest jednak duża ich toksyczność i znalezienie sposobu selektywnego dostarczenia ich do komórek nowotworowych. Tworzenie koniugatów z biotyną stwarza właśnie taką możliwość [36].

W niektórych zastosowaniach biochemicznych wysokie powinowactwo awidyny do biotyny stwarza szereg trudności, gdy zależy nam na odwracalności procesu. Mamy nadzieję, że badane pochodne biotyny dzięki temu, że wykazują mniejsze powinowactwo do awidyny niż biotyna, umożliwią potencjalne wykorzystanie takich kompleksów do wykrywania białek, kwasów nukleinowych oraz do izolacji białek.

- ***Badania strukturalne enzymów psychrofilnych [H-6] i [H-9]***

Analiza miejsc wiążących w strukturach krystalicznych, pozwala poznać mechanizm działania wielu enzymów, w wyniku czego możliwe jest kontrolowanie katalizowanych przez nie reakcji na poziomie molekularnym. Struktury przestrzenne enzymów wskazują aminokwasy, które po zmodyfikowaniu mogą polepszyć efektywność działania enzymu lub dostosować go do odpowiednich warunków procesu biotechnologicznego.

Rozwój przemysłu jest uzależniony od wprowadzania nowych technologii, w których rolę katalizatorów reakcji chemicznych pełnią enzymy. Posiadając jak najwięcej informacji dotyczących ich aktywności katalitycznej i specyficzności działania można zaprojektować reakcje katalizowane enzymatycznie z odpowiednią szybkością, w zaplanowanych warunkach uzyskując pożądany produkt z dużą wydajnością. Aktywność katalityczna enzymów jest już od lat wykorzystywana przez człowieka, jednakże dopiero rozwój nowoczesnej biotechnologii pozwolił na szerokie zastosowanie biokatalizatorów w procesach przemysłowych.

- **Określenie struktury krystalicznej S-metylo-5'-tioadenozyno-fosforylasy (MTAP) z metagenomowej biblioteki z ziemi Antarktycznej [H-6]**

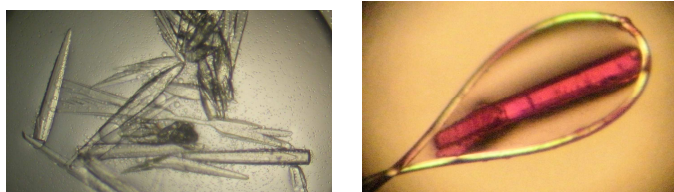
MTA-fosforylasy (MTAP) są obiektem zainteresowań naukowców zajmujących się badaniem nowotworów u ludzi, ze względu na ich supresorowe właściwości [37]. Enzym ten jest zaangażowany w dwa główne szlaki metaboliczne; syntezę poliamin i syntezę metioniny [38, 39]. Dzięki zaobserwowanemu fenomenowi fluorescencji rodaminę B w komórkach *E. coli*, eksprymujących gen kodujący MTA-fosforylase, pochodzący ze skonstruowanej przez zespół prof. Kura z Politechniki Gdańskiej biblioteki metagenomowej, rozważa się możliwość wykorzystania tego białka do promocji transkrypcji i oznaczania kolonii bakterii do których udało się wprowadzić wektor z genem fosforylasy. Zespół prof. Kura jest w posiadaniu patentu na badanie produktów zawierających rodaminę B, która jako substancja toksyczna nie może być wykorzystywana w produktach żywnościowych [40]. MTAP ma duże zastosowanie medyczne np. w zapobieganiu i leczeniu chorób autoimmunologicznych, a także przy odrzucaniu przeszczepu [41].

Kiedy dr H. Cieśliński zaprosił mnie do współpracy nie była jeszcze znana funkcja tego białka, któremu początkowo nadano skrót RSFP (*rodamine specific fluorescent protein*). Omawiane białko znaleziono podczas specyficznego „skriningu” biblioteki metagenomowej, skonstruowanej w ramach projektu „W poszukiwaniu nowych enzymów lipolitycznych o dużym potencjale biotechnologicznym”, kierowanego przez prof. Mariannę Turkiewicz z mojego Instytutu i wykonywanego we współpracy z zespołem prof. Józefa Kura, odpowiedzialnego za genetyczną część badań.

W testach lipolitycznych rodamina B (RB) zmienia barwę z czerwonej na najpierw pomarańczową, a w końcu na żółtą zależnie od stężenia wolnych kwasów tłuszczowych, uwalnianych z substratu tłuszczowego w trakcie lipolizy. W jednej z próbek zaobserwowano zmianę barwy kolonii rosnącej na podłożu z substratem tłuszczowym na różową i dodatkowe pojawienie się fluorescencji. Ekspresja genu kodującego to białko wykluczyła w testach biochemicznych jego aktywność lipolityczną. Różowa fluorescencja zachodziła zarówno w oczyszczonym białku, jak i w surowym lizacie bakterii z wklonowanym wektorem kodującym *rsfp*. Moim zadaniem było ustalenie struktury białka natywnego i jego kompleksu z RB, co miało pomóc w wyjaśnieniu zjawiska fluorescencji. Na wstępnym etapie projektu niewiele było wiadomo o fizjologicznej funkcji tego białka, znana była jednak jego sekwencja ustalona na drodze translacji *in silico*, co umożliwiło poszukiwania najbardziej podobnych białek programem BLAST. Analizy te wskazały między innymi na fosforylasy. W celu znalezienia białka o jak największej identyczności, które mogłabym wykorzystać do rozwiązania struktury RSFP metodą podstawienia cząsteczkowego zawęziłam dalsze poszukiwania do białek mających około 40% identyczności z RSFP. Tymi białkami były MTA

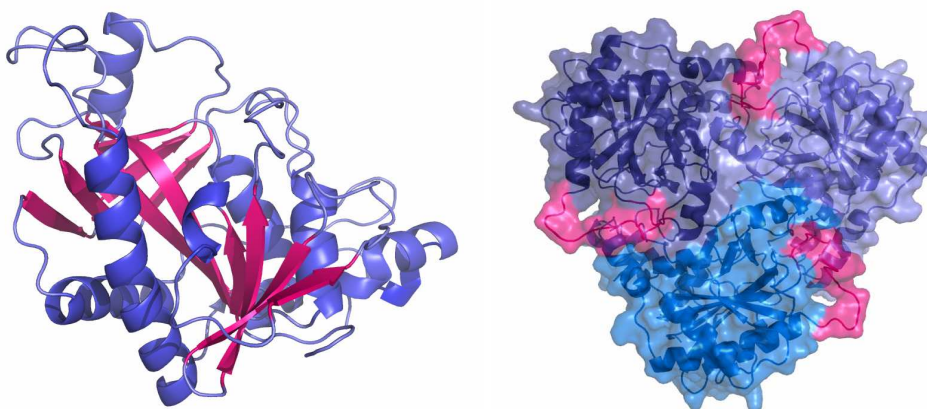
fosforylasy z bakterii, aktywne jako trimery lub heksamery. Największe podobieństwo sekwencyjne (44%) białko RSFP wykazywało do fosforylasy z *Sulfolobus tokodaii* i niewiele mniejsze do ludzkiej MTA fosforylasy - 36%.

Wyhodowałam kryształy białka RSFP formy apo oraz w kompleksie z rodaminą B (Rys. 14). Na podstawie danych dyfrakcyjnych zebranych na synchrotronie w Berlinie określiłam strukturę natywną tego białka oraz strukturę kompleksu z rodaminą B - obie w grupie przestrzennej P6₃.



Rysunek 14. Kryształy natywnej MTAP i kompleksu MTAP z rodaminą B (czerwony).

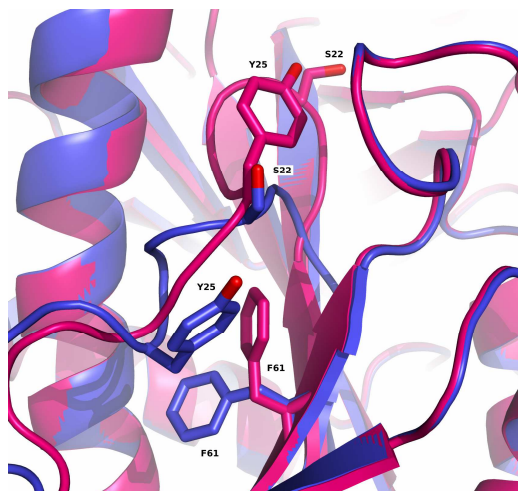
Po udokładnieniu struktury krystalicznej okazało się, że dwie cząsteczki RB (o połówkowym obsadzeniu) wiązały się w bruzdach pomiędzy monomerami (Rys. 15) [H-6].



Rysunek 15. Monomer i trimer RSFP (MTAP) z pokazanymi miejscami wiązania RB.

Porównanie struktur natywnej RSFP i kompleksu z RB pokazało, że szkielet strukturalny białka jest niemal identyczny natomiast dwa elementy: pętla D222-D236 (pętla L-A) i pętla I19-L30 (L-P) mają całkowicie inną konformację. Labilność łańcucha dłuższej pętli wydaje się naturalna i można ją uznać za przystosowanie enzymu do działania w niskiej temperaturze, natomiast zmiana konformacji tej drugiej pętli, jak się później okazało, była skutkiem obecności lub braku jonu fosforanowego. Pętla ta jest na tyle ruchoma, że modyfikuje dostęp do wnęki, w której wiąże się RB. Wiązaniu jonu fosforanowego towarzyszy zmiana konformacji pętli L-P na dnie kieszeni wiążącej z Ser22 na jej czubku. W formie natywnej pętla ta jest cofnięta i Tyr25 oddziałuje z Phe61. Przy związaniu jonu PO_4^{3-} Ser22 wysuwa się w kierunku powierzchni białka o ponad 8 Å (Rys. 16). Jednocześnie w tym

samym kierunku podąża Tyr25 (o około 11 Å) wywołując po drodze zmianę konformacji Phe61 i później z uwagi na zwiększenie odległości nie obserwuje się między nimi jakiegokolwiek oddziaływania.



Rysunek 16. Monomer RSFP (MTAP) z widocznym ruchem pętli L-P; czerwony kolor pętli w obecności jonu PO_4^{3-} w kompleksie z RB, niebieski - w natywnej strukturze enzymu.

Na tym etapie projektu byłam już pewna, że badanym enzymem jest MTA fosforylaza, mimo, że w zespole prof. Kura nadal nie została potwierdzona kinetyka reakcji, ponieważ zarówno substrat (metylotioadenozyna), jak i jeden z produktów reakcji (adenina) wykazywały maksimum absorpcji przy tej samej długości fali 261nm. Zaproponowałam dr H. Cieślińskiemu wprowadzenie do analityki fosforylazy kolejnego etapu reakcji wskaźnikowej, w której powstałby następny produkt wykazujący maksimum absorpcji przy innej długości fali, oczywiście przy założeniu, że wyjściowy substrat (metylotioadenozyna) nie będzie w stanie przereagować do kolejnego produktu. W oparciu o te sugestie dr H. Cieśliński opracował spektrofotometryczną metodykę oznaczania aktywności badanej fosforylazy, sprzęgając reakcję katalizowaną przez ten enzym z reakcją wskaźnikową katalizowaną przez dodawany do mieszaniny reakcyjnej komercyjny preparat oksydazy ksantynowej, która, powstającą w pierwszej reakcji adeninę, utleniała do 2,8-dihydroksyadeniny mającej maksimum absorpcji przy 305 nm. Analizy kinetyki reakcji z wykorzystaniem tej metody oraz w oparciu o rozwiązana strukturę krystaliczną jednoznacznie potwierdziły funkcję MTA fosforylazy. Obie struktury zdeponowałam w PDB pod numerami dostępu: 4GLF i 4GLJ.

Dzięki potwierdzeniu aktywności fosforylazy możliwe było zaplanowanie kolejnych eksperymentów krystalograficznych i biochemicznych. Przede wszystkim zaplanowałam wykrystalizować i określić struktury przestrzenne RSFP w kompleksach z metylo-tioadenozyną (MTA) w obecności jonów PO_4^{3-} i SO_4^{2-} oraz tylko z jonem PO_4^{3-} . Analiza tych struktur powinna dostarczyć informacji o budowie centrum aktywnego tego białka, o

mechanizmie reakcji oraz wyjaśnić rolę poszczególnych reszt aminokwasowych w katalizie.

Podsumowując przeprowadzone dotychczas badania strukturalne RSFP mogę stwierdzić, że jest to nie tylko białko specyficznie wiążące rodaminę B, ale również, że jest to fosforylaza metyloioadenozyny przeprowadzająca reakcję fosforolizy z udziałem dwóch substratów MTA i PO_4^{3-} . Enzym ten ma charakter psychrofilny, co wykazały badania biochemiczne przeprowadzone przez dr hab. H. Cieślinskiego (obecnie dr. hab), a bardzo ruchliwe pętle w pobliżu centrum aktywnego, ukazane w rozwiązanej przeze mnie strukturze krystalicznej, potwierdzają cechę strukturalną typową dla enzymów zdolnych do katalizowania reakcji w niskiej temperaturze.

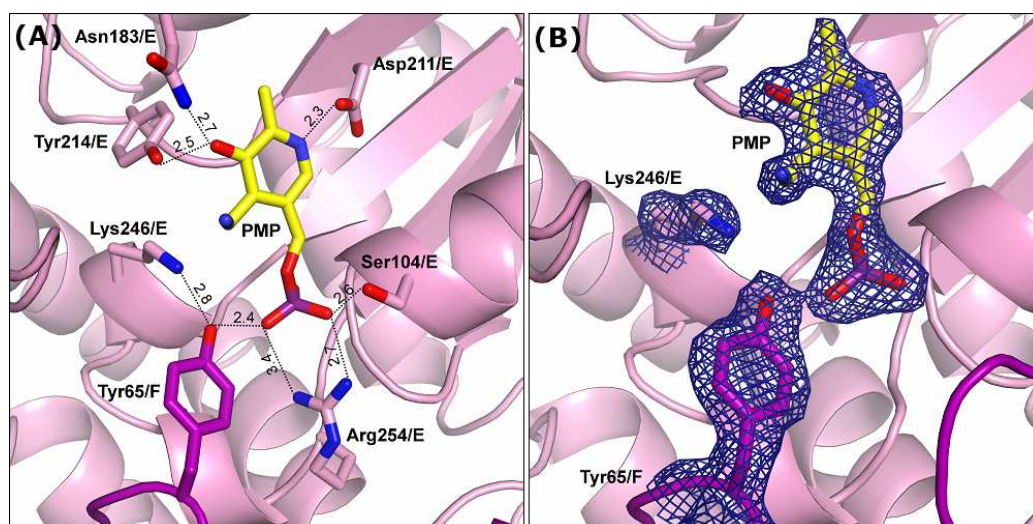
- **Określenie struktury krystalicznej aminotransferazy z *Psychrobacter Sp.B6* [H-9]**

W instytucie Biochemii Technicznej PŁ od wielu lat trwały prace nad aminotransferazą z *Psychrobacter sp.B6*. Enzym ten został wybrany do badań w oparciu o analizę bioinformatyczną genomów *Psychrobacter arcticus* i *P. cryohalolentis*, z którymi to gatunkami *Psychrobacter sp. B6* jest blisko spokrewniony. Gen kodujący aminotransferazę w genomach wspomnianych gatunków został najpierw anotowany jako gen aminotransferazy asparaginianowej, nieco później zmieniono anotację na gen kodujący aminotransferazę aminokwasów aromatycznych. W kolejnych pracach prowadzonych przez mgr Karolinę Nowakowską-Sapota, doktorantkę pani prof. M.Turkiewicz, wyizolowano gen domniemanej aminotransferazy, uzyskano z dobrą wydajnością jego ekspresję w *E. coli*, oczyszczono enzym do homogenności i stwierdzono, że jest to rzeczywiście aminotransferaza o podwójnej specyficzności, z przewagą aktywności względem aminokwasów aromatycznych. Wykazano także, że to białko przejawia adaptację do działania w niskich temperaturach. Zaproponowałam badania strukturalne tego enzymu w kontekście wspomnianych właściwości.

Przeglądając literaturę doszłam do wniosku, że wiele aminotransferaz aromatycznych wykazuje pewną aktywność względem kwasu asparaginowego, natomiast asparaginianowe aminotransferazy nie wykazują aktywności względem aromatycznych aminokwasów [42]. W tej sytuacji chciałam nie tylko określić strukturę natywnego enzymu, ale również strukturę jego kompleksów z substratami, które pozwoliłyby na określenie mechanizmu reakcji i identyfikację reszt katalitycznie ważnych dla działania tego ekstremofilnego enzymu w skrajnych, bądź nietypowych temperaturach. Udało mi się otrzymać kompleks z kwasem asparaginowym, względem którego aktywność ArAT_{PsyB6} była trzykrotnie niższa niż względem aminokwasów aromatycznych.

Aminotransferazy mają zastosowanie w biotechnologii do otrzymywania aminokwasów i ketokwasów [43-49], a wykorzystanie psychrofilnych enzymów może obniżyć

koszty tych procesów. Kryształy ArATPsyB6 otrzymałam z różnych warunków krystalizacyjnych, zarówno w formie apo, jak i w kompleksach z kwasem asparaginowym (substratem) [H-9] i kwasem jabłkowym (strukturalnym analogiem substratu - publikacja w przygotowaniu). Dane dyfrakcyjne zarejestrowałam na synchrotronach w Berlinie i w Hamburgu. Okazało się, że enzym bez ligandu oraz w kompleksie z kwasem asparaginowym wykrył się w tej samej grupie przestrzennej - P2₁, ale z komórką o innych wymiarach i również z inną liczbą monomerów w części niezależnej. ArATPsyB6 kokryształowana w obecności kwasu asparaginowego posiada 4 dimery w części niezależnej, które reprezentują różne etapy reakcji transaminacji, natomiast ta bez ligandu posiada dimer w części asymetrycznej. Różne ukształtowanie centrum aktywnego enzymu, szczególnie w obrębie kofaktora (Rys. 17), uchwycone w rozwiązanych strukturach, pozwoliło na strukturalne scharakteryzowanie reakcji transaminacji katalizowanej przez badaną psychrofilną aminotransferazę.

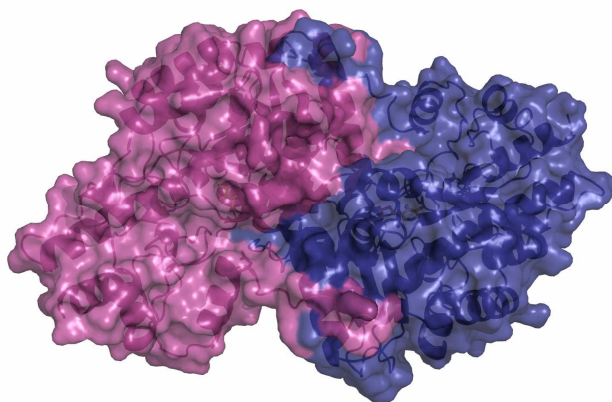


Rysunek 17. PMP w centrum aktywnym ArATPsyB6 z widocznymi mapami gęstości elektronowej 2Fo-Fc skonturowanymi na poziomie 1 σ .

Aminotransferazy (AT) są grupą enzymów istotnych pod względem aplikacyjnym. Są one powszechnie używane w przemyśle chemicznym i farmaceutycznym do syntezy naturalnych i nienaturalnych aminokwasów. Dobrze scharakteryzowane i łatwo dostępne enzymy mezofilne mają szerokie zastosowanie. W ostatnich latach widoczna staje się tendencja poszukiwania ich psychrofilnych homologów. Jest to związane z ekonomicznymi i ekologicznymi zaletami stosowania enzymów, pozwalającymi na obniżenie temperatury procesu produkcyjnego. Enzymy psychrofilne wykazują zdolność katalizowania reakcji na podobnym poziomie do enzymów mezofilnych, jednak w znacznie niższej temperaturze, co zawdzięczają swojemu przystosowaniu środowiskowemu. Zdolność enzymu do przezwyciężenia bariery energetycznej, która wzrasta wraz z obniżeniem temperatury, jest

łączona ze zmianami w jego drugo- i trzeciorzędowej strukturze. W związku z powyższym, badania krystalograficzne wydają się być naturalnym wyborem metody pozwalającej na wyjaśnienie unikatowych właściwości psychrofilnego enzymu. Jest to po raz pierwszy opublikowana struktura przestrzenna psychrofilnej, bakteryjnej aminotransferazy aminokwasów aromatycznych. Interpretacja otrzymanych trójwymiarowych struktur ArATP_{syB6} oraz ich porównanie z szeregiem mezofilnych i termofilnych aminotransferaz aminokwasów aromatycznych pozwoliło na dokładne strukturalne scharakteryzowanie badanego enzymu.

Struktura aktywnej formy enzymu (z koenzymem) została rozwiązana z rozdzielczością 2.19 Å natomiast dwie struktury kompleksów, z kwasem asparaginowym (ArATP_{syB6/D}) oraz kwasem jabłkowym (ArATP_{syB6/Ma}) zostały rozwiązane odpowiednio do rozdzielczości 2.76 Å oraz 1.62 Å. Kryształy struktury natywnej oraz kompleksu z kwasem asparaginowym wyrosły w jednoskośnym układzie krystalograficznym w grupie przestrzennej P2₁, podczas gdy kryształy kompleksu z kwasem jabłkowym rosły w układzie heksagonalnym w grupie przestrzennej P6₅22. Głównym czynnikiem strącającym dla ArATP_{syB6} i ArATP_{syB6/D} był PEG3350 Da z dodatkową obecnością różnych soli; kryształy ArATP_{syB6} powstały przy obecności azotanu magnezu, a ArATP_{syB6/D} w obecności octanu magnezu. Natomiast kryształy kompleksu ArATP_{syB6/Ma} zostały otrzymane z warunków krystalizacyjnych zawierających duże stężenie kwasu jabłkowego, będącego jednocześnie strukturalnym analogiem substratu. Struktury krystaliczne ArATP_{syB6} i ArATP_{syB6/D} mimo, że zostały określone w tej samej grupie przestrzennej, to różniły się pod względem rozmiaru komórki elementarnej oraz upakowania w sieci krystalicznej. Struktura ArATP_{syB6} zawiera w jednostce asymetrycznej funkcjonalny dimer (Rys. 18), natomiast kompleks ArATP_{syB6/D} posiada cztery dimery. Kompleks ArATP_{syB6/Ma}, określony w grupie heksagonalnej, posiada jedynie monomer w części niezależnej, natomiast funkcjonalny dimer jest ulokowany na krystalograficznej osi dwukrotnej.



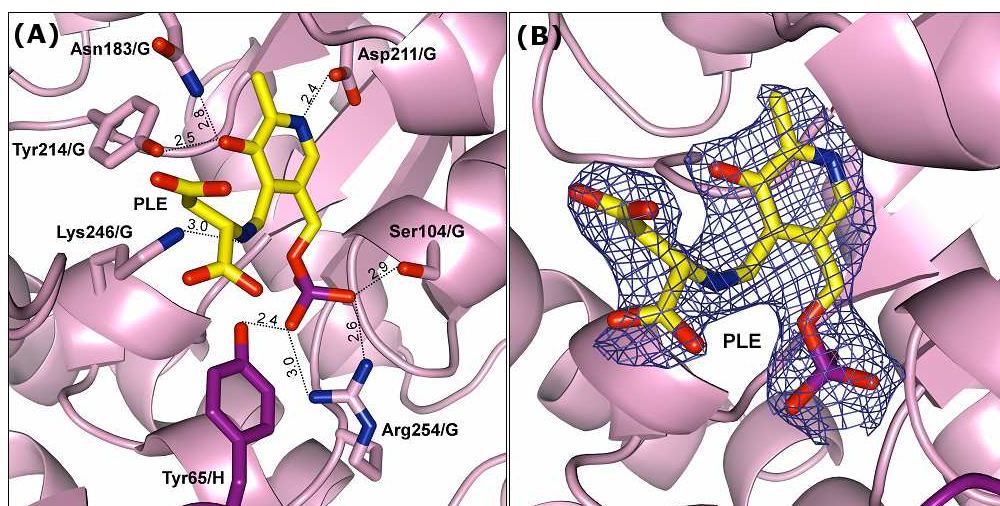
Rysunek 18. Dimer funkcyjny ArATP_{syB6}

Aktywną formą enzymu ArATPsyB6 z *Psychrobacter* sp. B6 jest dimer o masie molekularnej 90 kDa, posiadający dwa centra aktywne znajdujące się blisko powierzchni kontaktu pomiędzy poszczególnymi monomerami. Początkowe analizy sekwencji aminokwasów ujawniły wysokie prawdopodobieństwo posiadania przez enzym podwójnej aktywności: aminotransferazy aminokwasów aromatycznych oraz aminotransferazy asparaginowej. Teza ta została poparta wykonanymi próbami enzymatycznymi, udowadniając przynależność badanego enzymu do EC 2.6.1.57.

Nałożenie struktur badanej aminotransferazy ze strukturami aminotransferaz należących do podgrup Ia i Ib wykazało bardzo dużą konserwatywność architektury centrum katalitycznego pomiędzy aminotransferazami aromatycznymi i asparaginowymi. Na bazie porównania sekwencyjnego zakwalifikowaliśmy ArATPsyB6 do podgrupy Ia.

Architektura struktury ArATPsyB6 wykazuje duże podobieństwo do innych struktur aromatycznych aminotransferaz. Pod względem funkcyjnym struktura została podzielona na wielką i małą domenę, z wydzielonym N-terminalnym ramieniem. Poszczególne monomery wszystkich struktur można traktować jako formy otwarte lub zamknięte. Otwartą formę posiadają monomery struktury natywnej ArATPsyB6, w strukturze kompleksu ArATPsyB6/D można znaleźć obydwie formy, natomiast monomer kompleksu ArATPsyB6/Ma został otrzymany w formie zamkniętej (publikacja w przygotowaniu).

Centra aktywne ośmiu monomerów, będących w części niezależnej komórki elementarnej kompleksu ArATPsyB6/D, przedstawiają enzym w trzech etapach reakcji transaminacji **[H-9]**: wewnętrznej aldiminy (PLI), zewnętrznej aldiminy (PLE) (Rys. 19) oraz niezwiązanego fosforanu pirydoksaminy (PMP) (Rys. 17).



Rysunek 19. Jeden ze stanów przejściowych reakcji katalizowanej przez ArATPsyB6 w kompleksie z kwasem asparaginowym w chwili powstania zewnętrznej aldiminy (PLE) - mapa gęstości elektronowej 2Fo-Fc skonturowana jest na poziomie 1σ.

Uzyskanie wszystkich etapów reakcji w jednej strukturze krystalicznej daje nadzwyczajną możliwość prześledzenia strukturalnego mechanizmu reakcji katalizowanej przez ten enzym. Na podstawie analizy obu struktur, mogłam stwierdzić, że przystosowanie badanej aminotransferazy do aktywności w niższej temperaturze nie jest związane z wydłużeniem pętli, jak to zazwyczaj bywa u zimnolubnych białek, tylko ze zwiększoną elastycznością głównego łańcucha peptydowego poprzez obecność reszt glicynowych ulokowanych w „zawiasowych” rejonach cząsteczki.

- **Badania strukturalne lektyny ze ślimaka ogrodowego *Helix aspersa*. [H-10]**

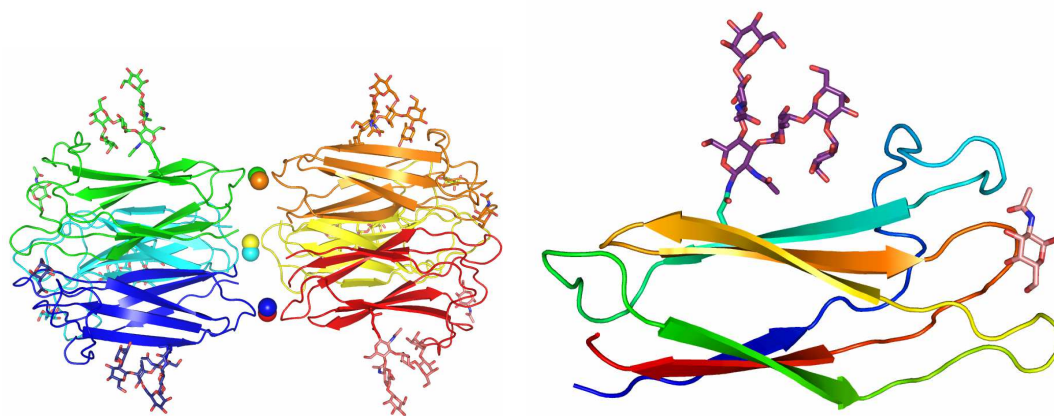
Białkiem o znaczeniu medycznym, które opisuję w ostatniej publikacji włączonej do osiągnięcia naukowego, jest lektyna izolowana ze śluzu ślimaka ogrodowego *Helix aspersa* (Rys. 20), zwanego również ślimakiem afrykańskim (*Helix aspersa agglutinin* (HAA)). Lektyna ta zainteresowała mnie z uwagi na możliwości jej wykorzystania medycznego [50-52] i kosmetycznego [53]. Białko to posiada zdolność aglutynacji komórek o specyficznej glikozylacji, w której łańcuch polisacharydowy zakończony jest N-acetylo-galaktozaminą (GalNAc), stąd inna jego nazwa - aglutynina [54, 55]. Na początkowym etapie badań krystalograficznych nie była znana sekwencja tego białka. Przypuszczałam nawet, że firma (Sigma) sprzedającą tę lektynę z jakiegoś powodu objęła tajemnicą jej sekwencję. Okazało się jednak, że sekwencja tego białka nie była do tej pory poznana.



Rysunek 20. *Helix aspersa* – ślimak ogrodowy i kryształy lektyny formy glikozylowanej.

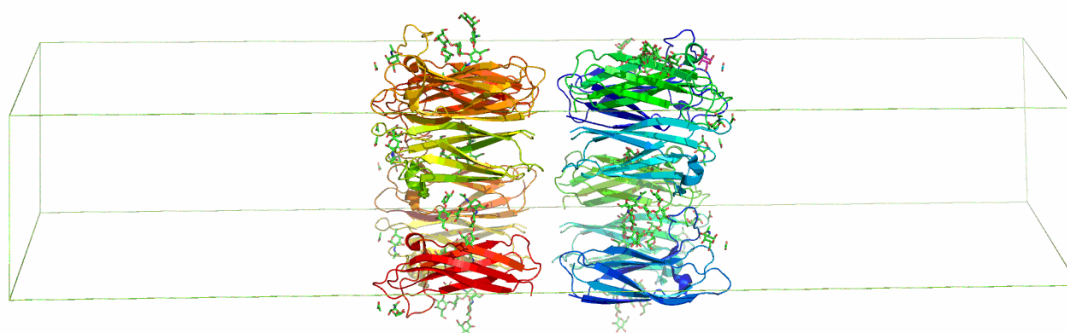
Na szczęście otrzymany kryształ badanej lektyny (Rys. 20) miał bardzo dobre właściwości dyfrakcyjne i zarejestrowanie kilku zbiorów danych dyfrakcyjnych, w tym HAA oraz jego kompleksu z GalNAc, do rozdzielczości 1.3 Å na synchrotronie w Hamburgu i w Berlinie, pozwoliło na ustalenie wstępnej sekwencji białka na podstawie kształtu map gęstości elektronowej. Do rozwiązania struktury HAA, jako modelu w podstawieniu cząsteczkowym użyłam homologicznej lektyny z winniczka *Helix pomatia* (HPA).

Struktura krystaliczna HAA, podobnie jak HPA, została rozwiązana w grupie przestrzennej H32 z jednym monomerem w części asymetrycznej. Aktywną formą białka jest heksamer, który jest trimerym połączonych mostkiem disiarczkowym dimerów (Rys. 21).



Rysunek 21. Heksameryczna struktura HAA z widocznymi mostkami disiarczkowymi przedstawionymi jako kulki, a na prawym panelu przedstawiony jest monomer z łańcuchem glikozydowym oraz oddziałującą na powierzchni cząsteczką GalNAc.

W sieci krystalicznej heksamer leży na przecięciu krystalograficznych elementów symetrii: osi trójkrotnej i prostopadłych do niej osi dwukrotnych. W komórce elementarnej znajduje się 18 monomerów upakowanych w ciekawy sposób, gdzie warstwy monomerów połączone są naprzemian mostkami disiarczkowymi i atomami cynku (Rys. 22).



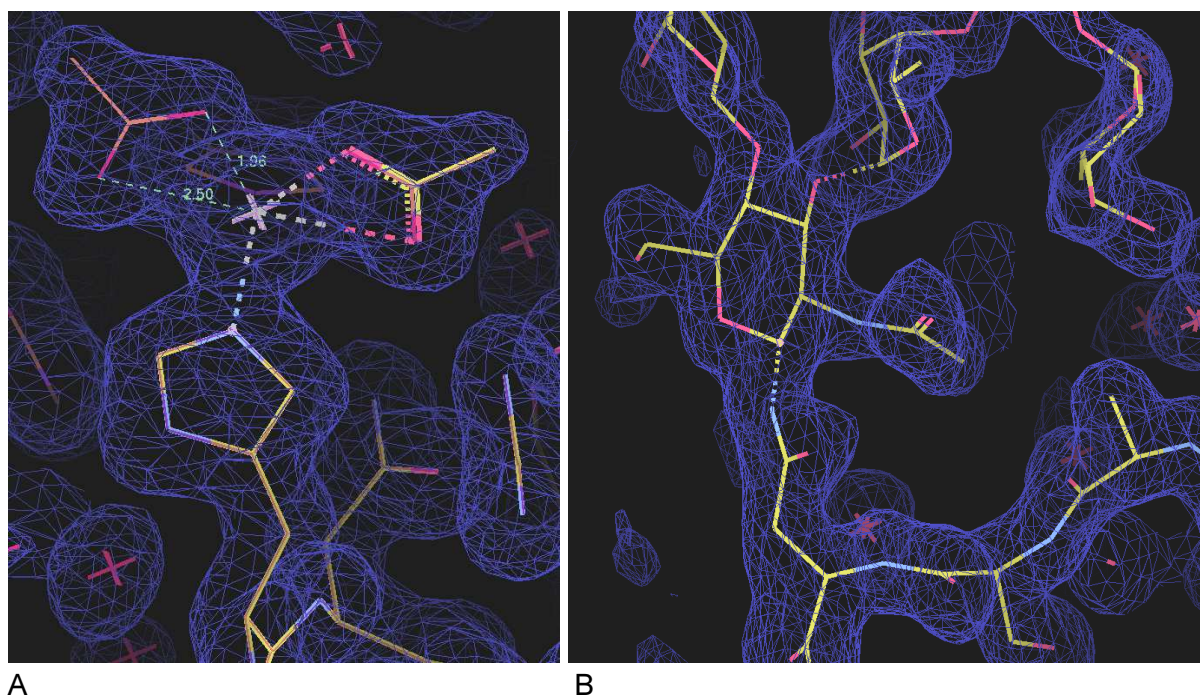
Rysunek 22. Sposób upakowania heksameru HAA w komórce.

Okazało się, że zarówno struktura „natywna”, jak i kompleksu otrzymanego w obecności N-acetylo-galaktozoaminy posiadają związaną w tym samym miejscu cząsteczkę GalNAc. Cukier ten trudno jest usunąć zarówno podczas izolacji tego białka, jak i podczas oczyszczania prowadzonego na kolumnie powinowactwa z kowalencyjnie związaną pochodną GalNAc.

Mapy gęstości elektronowej były w większości tak dobre, że wskazywały jednoznacznie na łańcuch boczny konkretnego aminokwasu. Podobnie, dodatnia gęstość elektronowa dokładnie pokazywała łańcuch sacharydowy połączony z 34 asparaginą (Rys. 23). W strukturze zidentyfikowałam również cząsteczkę GalNAc oddziałującą na powierzchni

białka oraz jony cynku, sodu i octanowe pochodzące z roztworu krystalizacyjnego. Jon cynku jest odpowiedzialny za kontakty międzycząsteczkowe i prawdopodobnie promował takie, a nie inne upakowanie cząsteczek w sieci krystalicznej (Rys. 23).

Wprost paradoksalne wydaje się, że pomimo braku takich podstawowych informacji, jak sekwencja aminokwasowa czy glikozydowa, białko to ma tak szerokie zastosowania w diagnostyce różnych chorób. Wspólnie z mgr Agnieszką Pietrzyk, z którą współpracowałam w tym projekcie, miałyśmy rozwiązana i udokładnioną strukturę białka, i czekałyśmy z depozycją na potwierdzenie jego sekwencji aminokwasowej oraz identyfikację cukrów w łańcuchu glikozydowym. Okazało się, że zderzyliśmy się z bardzo dużym problemem, który pomógł nam rozwiązać dr hab. P. Mak z Zakładu Biochemii Analitycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Otóż komercyjna próbka białka, okazała się być mieszaniną przynajmniej dwóch izoform lektyny. Pierwsza izoforma posiadała sekwencję absolutnie niezgadzącą się z „odczytaną” przez nas z map gęstości elektronowej otrzymanej struktury krystalicznej HAA. Szczególnie reszta asparaginy z przyłączonym kowalencyjnie łańcuchem cukrowym, według tej sekwencji powinna być histydyną. W związku z dużą rozbieżnością określonej sekwencji w stosunku do odczytanej przez nas z kształtu map gęstości elektronowej 2Fo-Fc zdecydowałam się na wysłanie wyhodowanych kryształów lektyny do pana dr hab. P. Maka w celu weryfikacji sekwencji wykryzowanego białka.



Rysunek 23. Mapy gęstości elektronowej 2Fo-Fc na poziomie 1σ A) dla jonu cynkowego oddziaływującego z His74 oraz z dwoma jonami octanowymi (jeden z symetrycznie równoważnego monomeru); B) dla Asn34 i kowalencyjnie przyłączonego łańcucha sacharydowego.

Poznanie sekwencji wykryształizowanej izoformy lektyny okazało się prawdziwym wyzwaniem. Obie izoformy silnie wiązały się do złoża chromatograficznego, a szczególnie ta glikozylowana, przez co ich rozdział był utrudniony. Dodatkowo forma glikozylowana posiada scyklizowany pierwszy aminokwas (kwas glutaminowy), który należało usunąć aby rozpocząć sekwencjonowanie metodą degradacji Edmana. Po około pół roku prowadzonych eksperymentów otrzymałam od pana dr hab. P. Maka sekwencję II izoformy, dzięki czemu mogłam zdeponować białko w PDB i opublikować prowadzone badania [H-10]. Okazało się, że sekwencja badanej lektyny HAA różniła się zaledwie kilkoma aminokwasami od lektyny z winniczka HPA, a zidentyfikowana przez nas z map gęstości elektronowej sekwencja wymagała korekty tylko czterech reszt aminokwasowych.

W celu poznania sekwencji łańcucha sacharydowego nawiązałam współpracę z panem dr hab. T. Niedzielą z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Pomimo użycia wielu metod eksperymentalnych (MALDI-TOF MS, NMR: COSY, TOCSY, HSQC-DEPT i STD HSQC) i ograniczonej ilości próbki z białkiem nie był w stanie jednoznacznie podać całkowitej sekwencji łańcucha glikozydowego badanej lektyny. Potwierdził określone przez nas cukry, jednakże z masy cząsteczkowej wynikało, że brakuje jeszcze jednej bądź dwóch reszt cukrowych, które najprawdopodobniej są labilne konformacyjnie. Po zdeponowaniu w PDB (ID: 4Q56) i opublikowaniu glikozylowanej izoformy lektyny ze ślimaka HAA, kontynuuję badania nad kompleksami tego białka z ligandami oraz nad drugą jego izoformą, której sekwencję aminokwasową już znamy i wiemy, że jest to forma nieglikozylowana.

Określenie struktury przestrzennej lektyny z HAA dostarczyło cennych informacji dla środowiska medycznego zajmującego się diagnostyką, gdyż białko to rozpoznaje zmiany w glikozylacji przeciwciał IgA i IgD obecnych w komórkach krwi grupy A, jak również w komórkach niektórych typów białaczki charakteryzującej się glikozylacją z terminalnymi resztami GalNAc [56, 57]. Poza tym możliwości wykorzystania lektyn są już przedmiotem wielu zgłoszeń patentowych, a doniesienia o ich zastosowaniu w kosmetyce mogą jeszcze bardziej poszerzyć ich dotychczasowe wykorzystanie. Określona struktura HAA jest dopiero drugą na świecie strukturą krystaliczną lektyny ze śluzu ślimaka zdeponowaną w PDB.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Droga do określenia struktury krystalicznej makrocząsteczek jest bardzo czasochłonna i na niektórych etapach badań bywa bardzo nieprzewidywalna. W związku z tym powszechną praktyką w dobrych laboratoriach krystalograficznych jest praca nad kilkoma projektami równolegle, aby w którymś z nich uzyskać efekty. Sukces w jednym projekcie zawsze motywuje do dalszej pracy - szczególnie w projektach o dużym potencjale

naukowym. Rozpoczynając badania nad nowym białkiem nigdy nie wiemy, jak szybko uda nam się osiągnąć sukces, ale zdarza się, że w każdym rozpoczętym projekcie mamy efekty i ciągle przybywa nowych. Tak też było w moim przypadku, mimo, że pracą naukową zajęłam się w nieco późniejszym wieku. Czas bezpośrednio po studiach magisterskich poświęciłam rodzinie, czego absolutnie nie żałuję gdyż jest ona moją chlubą. Następnie po ośmioletniej pracy, jako nauczyciel fizyki i chemii w szkole podstawowej i średniej (1986-94), wyjechałam do USA z mężem, w związku z jego stażem podoktorskim, wraz z już nastoletnimi dziećmi. Po kilku miesiącach pobytu w Stanach Zjednoczonych znalazłam laboratorium syntezy organicznej, w którym realizowany był bardzo interesujący Biochemiczny Program Strukturalny (NIH, SAIC, Frederick, USA). W laboratorium tym pracowałam na stanowisku *Visiting Scientist* przez trzy lata (1994-97), projektując i syntezując inhibitory proteazy HIV-1. Część zsyntezowanych przeze mnie związków (około 100), hamujących replikację wirusa HIV-1 była podstawą mojego doktoratu, a badania nad nimi zostały opisane w trzech publikacjach, ale tylko w dwóch widnieję jako współautor **[P-1, P-16]**. Po powrocie do kraju i ukończeniu studiów doktoranckich (1999-2004) obroniłam doktorat w 2004 roku (z wyróżnieniem) i rozpoczęłam pracę na Politechnice Łódzkiej, najpierw jako pracownik naukowo-badawczy w projekcie europejskim AIMS (2004-2008), a od 2008 do chwili obecnej jestem zatrudniona na stanowisku adiunkta w Instytucie Biochemii Technicznej, na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności PŁ. W związku z tym, że moja kariera naukowa rozpoczęła się później o kilkanaście lat w stosunku do rówieśników, którzy rozpoczęli badania naukowe bezpośrednio po studiach magisterskich, angażowałam się równolegle w wiele projektów, a każdą chwilę poświęcałam na zdobywanie wiedzy krystalograficznej. Mając wspaniałych ekspertów z krystalografii blisko siebie, prof. M. Jaskólskiego i prof. G. Bujacza, nie narzekałam ani na brak projektów, ani na „źródła” wiedzy, które miałam na wyciągnięcie ręki. Bardzo dużo zawdzięczam również takim sławom krystalograficznym, jak: Alexander Wlodawer, Zbigniew Dauter i Wladek Minor, którzy uchylali rąbek tajemnic indeksowania i skalowania danych dyfrakcyjnych oraz rozwiązywania najbardziej skomplikowanych problemów krystalograficznych w trakcie różnych spotkań naukowych.

Należę do grupy naukowców, którzy najlepiej przyswajają wiedzę w praktyce, dlatego też wiele pierwszych prac wykonywałam w projektach prowadzonych przez prof. M. Jaskólskiego w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu – jedynym wówczas w Polsce ośrodku zajmującym się krystalografią białek. W projektach „poznańskich” moja praca najczęściej polegała na synchrotronowym pomiarze dyfrakcyjnym kryształów białkowych, indeksowaniu i redukcji danych dyfrakcyjnych, czasami rozwiązaniu i udziale w udokładnianiu struktur białkowych lub wykonaniu biblioteki ligandów. Jednocześnie organizowaliśmy Pracownię Krystalografii Białek w Instytucie Biochemii

Technicznej na Politechnice Łódzkiej i realizowaliśmy prace krystalizacyjne z projektów wywodzących się z IChB PAN, Poznań. Publikacje z tego okresu dotyczyły w większości wiązania naturalnych i syntetycznych cytokinin do białek klasy PR10 z łubinu żółtego związanych z patogenezą roślin. Okazało się, że dla jednego z białek tej klasy, PR10.2b, udało nam się uzyskać kryształy kompleksów z szeregiem ligandów: zeatyną, N-fenyl-N'-(2-chloro-4-pirydylo)mocznikiem (CPPU), difenylomocznikiem (DPU), kinetyną oraz brazynolidem. Fakt, że dysponowaliśmy kompleksami tego samego białka z różnymi ligandami pozwoliło na wyjaśnienie, jakie czynniki strukturalne są odpowiedzialne za wiązanie ligandu i specyfikę oddziaływania białko – ligand w klasie roślinnych białek PR10. W trakcie pracy nad tymi strukturami **[P-5, P-8]** obok kilku następnych, którymi były struktury fragmentu Fc przeciwciała monoklonalnego IgG1 **[H-1]** oraz kompleksów chagasyny **[7]** zdobyłam bardzo dobry warsztat krystalograficzny. Zaczęto postrzegać mnie jako dobrego krystalografa, któremu można powierzyć trudny projekt mając pewność otrzymania struktury krystalicznej. I tak rozpoczął się napływ białek nie tylko z macierzystego Instytutu, ale również z innych uczelni, i trudno było wybrać te, które mogłabym włączyć w osiągnięcie habilitacyjne. Z uwagi na specyfikę badań naukowych prowadzonych w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej zdecydowałam się na publikacje powiązane tematycznie i obejmujące białka o potencjale aplikacyjnym w biotechnologii i medycynie. Określanie struktur przestrzennych nowych białek metodami dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na kryształach białkowych w celu badania oddziaływań białko-ligand na potrzeby procesów biotechnologicznych oraz testów medycznych jest moim osiągnięciem naukowym.

Mimo ogromnego postępu w technikach obliczeniowych i pomiarowych w krystalografii białek, zdarzają się problemy z rozwiązaniem struktury nowego białka. W naszym przypadku takim białkiem było CSBP (*Cytokinin-Specific Binding Protein*) z *Vigna radiata*, którego kryształ poddaliśmy dyfrakcji promieniami Roentgena i mimo dużego podobieństwa do dwóch struktur w PDB nie byliśmy w stanie określić jego struktury metodą podstawienia cząsteczkowego (MR – ang. *molecular replacement*). Rozwiązanie struktury polega na rozwiązaniu tzw. problemu fazowego. Droga do określenia struktury nowych białek, niemających podobnych, które można by było wykorzystać w MR prowadzi często poprzez pochodne metali ciężkich lub pierwiastków wykazujących właściwości rozpraszania anomalnego, jak selen czy brom. Selen wprowadzany jest najczęściej do cząsteczki białka na etapie ekspresji w postaci selenometioniny. Na podstawie anomalnego rozpraszania pochodzącego od tych atomów stosując metody dyfrakcji anomalnej przy pojedynczej (SAD – ang. *single-wavelength anomalous diffraction*) i modulowanej długości fali (MAD – ang. *multi-wavelength anomalous diffraction*) w wielu przypadkach udaje się rozwiązać problem fazowy. Nie każde białko zawiera metioninę, którą można byłoby podstawić selenometioniną, a inne metody wprowadzenia atomu ciężkiego zawodzą z uwagi na właściwości kryształów

danego białka. Taki niestandardowy przypadek skłania do poszukiwania nowych metod wprowadzenia atomu ciężkiego do białka, w celu przeprowadzenia pomiaru dyfrakcji anomalnej. Po raz pierwszy, dla stosunkowo niewielkiego białka, zastosowaliśmy kompleks bromo-tantalowy $\{[\text{Ta}_6\text{Br}_{12}(\text{H}_2\text{O})_6]\}^{2+}\text{Br}^-\text{OH}^-\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, stosowany wcześniej do fazowania dużych kompleksów np. rybosomu, w celu sprawdzenia jego zdolności do rozpraszania anomalnego i tym samym przydatności do określenia struktury białka CSBP. Strukturę tego białka rozwiązaliśmy przy wykorzystaniu anomalnego rozpraszania, przy 3 długościach fali, wykorzystując kation $(\text{Ta}_6\text{Br}_{12})^{2+}$, który daje bardzo silny sygnał anomalny pochodzący od atomów tantalu i dodatkowo od atomów bromu. Badania dotyczące podejścia eksperymentalnego do rozwiązania problemu fazowego zostały opisane w publikacji **[P-4]**. Zastosowana przez nas nowatorska metodyka badawcza spotkała się z dużym uznaniem wśród naukowców.

Inną publikacją związaną z metodyką krystalograficzną była praca opisująca krioprotekcyjne właściwości soli kwasów karboksylowych. W artykule tym określiliśmy minimalne stężenia soli niezbędne do osiągnięcia witrifikacji kropli z kryształem dla kilku soli powszechnie używanych do krystalizacji. Dodatkowym badanym parametrem było pH roztworu, dzięki któremu możliwe było ustalenie, że minimalne stężenie soli niezbędne do osiągnięcia krioprotekcji występuje przy pH obojętnym. Badania te pozwoliły na rozszerzenie wachlarza krioprotektantów przydatnych szczególnie do pomiarów kryształów wyhodowanych z wysokich stężeń soli **[P-12]**.

Kolejnym projektem, o którym chciałabym wspomnieć, były badania krystalograficzne kompleksów chagasyny z proteinazami cysteinowymi, które to kompleksy były tematem pracy doktorskiej pani Izabeli Redziny. Mimo, że jestem współautorem tylko jednej publikacji dotyczącej tych badań **[P-7]**, to praktycznie od początku do końca udzielałam się aktywnie w projekcie szczególnie przy pomiarach synchrotronowych, redukcji danych dyfrakcyjnych i w końcu pomyśle otrzymania kompleksu chagasyny z papainą (kanoniczną proteazą cysteinową), enzymem będącym homologiem kruzypainy, z której otrzymaniem nasi współpracownicy mieli problem. Celem projektu było określenie struktury przestrzennej chagasyny oraz jej kompleksów z proteinazami cysteinowymi, szczególnie katepsynami, które są blokowane w organizmie ludzkim podczas infekcji pasożytem wywołującym drugą po malarii pod względem śmiertelności chorobę tropikalną na świecie - chorobę Chagasa. Poznanie sposobu inhibicji proteinaz cysteinowych przez chagasynę i porównanie go z działaniem innych białkowych inhibitorów tych enzymów powinno umożliwić projektowanie leków przeciwko tej chorobie.

Ostatnim białkowym projektem, w którym uczestniczę od kilku lat, jest badanie białek z limfy larw jedwabnika morwowego *Bombyx mori*. Określenie struktury kilku białek wyizolowanych z limfy larwy tego udomowionego owada było tematem pracy doktorskiej pani

Agnieszki Pietrzyk. Owady odgrywają olbrzymią, choć często niedostrzegalną rolę w życiu ludzi i funkcjonowaniu ekosystemu, mogą produkować znane na całym świecie artykuły takie jak miód czy jedwab, a w wielu krajach azjatyckich i afrykańskich same stanowią produkt spożywczy. Początkowym celem tego projektu było określenie struktury przestrzennej białka wiążącego hormon juwenilny, którego poznanie struktury mogłoby pozwolić na opracowanie nowych insektycydów, eliminujących tylko wybrane szkodniki. Nie udało się wyizolować tego białka w ilości wystarczającej do przeprowadzenia krystalizacji, natomiast w naszej pracowni określiliśmy struktury kilku innych białek. Badania rozpoczęliśmy od zebrania hemolimfy z larw jedwabnika morwowego, które dostajemy z Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu. Następnie używając technik chromatograficznych takich, jak: sączenie molekularne i chromatografia jonowymienna izolowaliśmy białka o różnej masie molekularnej. Po zatężeniu ustawialiśmy krystalizację. Największą grupę stanowiły białka o masie 30kDa. Dla 4 z nich określiliśmy struktury krystaliczne i w oparciu o struktury przestrzenne zaproponowaliśmy potencjalne funkcje; wiążące lipidy i sacharydy **[P-13, P-18, P-20 i P-24]**. Drugą grupą były białka spichlerzowe (SP- *storage protein*) o masie 60kDa, będące ewolucyjnymi pochodnymi hemocyjanin. Dla tych białek określiliśmy strukturę heteroheksamery SP2-SP3 **[P-19]**.

Oprócz badań krystalograficznych makromolekuł zajmuję się również określaniem struktur krystalicznych małych cząsteczek metodami rentgenograficznymi. Od chwili powstania Pracowni Badań Strukturalnych IBT głównymi obszarami zainteresowań były właśnie związki małocząsteczkowe. Ja włączyłam się w nurt tych badań począwszy od projektów dotyczących komplementarnego wykorzystania dwóch technik badawczych: rentgenografii strukturalnej i NMR w ciele stałym, które prowadzone były we współpracy z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi, z grupą prof. M. Potrzebowskiego. Dla modelowego fosfonianu, zawierającego ugrupowanie P-S-P, ustaliliśmy mechanizm przejścia fazowego **[P-2]**, a drugą badaną grupą związków były peptydy sygnałowe dermorfiny - optoidowego peptydu ze śluzu żaby z dorzecza Amazonki **[P-9, P-15]**. Kolejny projekt dotyczył badań strukturalnych selenometioniny, aminokwasu używanego powszechnie w krystalografii do uzyskiwania pochodnych selenometioninowych białek, które są następnie wykorzystywane do rozwiązywania problemu fazowego metodami opartymi o dyfrakcję anomalną przy pojedynczej (SAD – ang. *single-wavelength anomalous diffraction*) i modulowanej długości fali (MAD – ang. *multi-wavelength anomalous diffraction*) **[P-3, P-6]**. Uczestniczyłam również w badaniach strukturalnych eterów koronowych, gdzie do środka pierścienia makrocyclicznego wprowadzana była mała cząsteczka, w celu prześledzenia oddziaływań gość-gospodarz **[P-14]**.

Z racji tego, że na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności PŁ istnieją pracownie syntezujące związki organiczne dla różnych celów, to jako jedyna pracownia

krystalograficzna na Wydziale prowadzimy ich krystalizację, pomiar dyfrakcyjny oraz rozwiązujemy struktury krystaliczne, które następnie deponujemy w Krystalograficznej Bazie Danych (CCDC - ang. *Cambridge Crystallographic Data Centre*). Są wśród nich związki zapachowe otrzymywane przez dr inż. R. Bonikowskiego, którego interesują zagadnienia względnej chiralności [P-10, P-17] oraz metalo-kompleksy otrzymywane przez panią profesor E. Łodygę-Chruścińską [P-11, P-25]. Ostatnio badam także porfiryny, nie pochodzące z naszego Wydziału, w ramach projektu we współpracy z prof. H. Nasirem z Tunezji, który wykorzystuje układ porfirynewy dla otrzymywania kryształów supramolekularnych [P-22].



Pozostałe publikacje niewchodzące w skład przewodu habilitacyjnego:

- [P-1] Randad R.S., Lubkowska L., **Bujacz A.**, Naik R.H., Gulnik S.V., Yu B., Silva A., Munshi S., Lynch T.M., Clanton D.J., Bhat T.N., Erickson J.W. „Structure-Based Design of Achiral Anthranilamides as P2P2' Surrogates for Symmetry-Based HIV Protease Inhibitors: Design, Synthesis, X-ray Structure, Enzyme Inhibition and Antiviral Activity”. **1995** *Bioorg Med Chem Lett.* 5: 2557-2562.
MNiSW - 30, IF₁₉₉₅ = 1.632, Cit - 5
- [P-2] Potrzebowski M.J., Bujacz G.D., **Bujacz A.**, Olejniczak S., Nopora P., Helinski J., Ciesielski W., Gajda J. „Study of molecular dynamics and the solid state phase transition mechanism for unsymmetrical thiopyrophosphate using X-ray diffraction, DFT calculations and NMR spectroscopy ”. **2006**, *J Phys Chem B.* 110 (2): 761-71.
MNiSW - 30, IF₂₀₀₆ = 4.115, Cit - 4
- [P-3] Gajda J., Pacholczyk J., **Bujacz A.**, Bartoszak-Adamska E., Bujacz G., Ciesielski W., Potrzebowski M.J. „Structure and dynamics of L-selenomethionine in the solid state” **2006**, *J Phys Chem B.* 110: 2345-55.
MNiSW - 30, IF₂₀₀₆ = 4.115, Cit - 8
- [P-4] Pasternak O., **Bujacz A.**, Biesiadka J., Bujacz G., Sikorski M., Jaskolski M. „MAD phasing using the (Ta₆Br₁₂)²⁺ cluster: a retrospective study” **2008**, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 64: 595-606.
MNiSW - 45, IF₂₀₀₈ = 2.943, Cit - 7
- [P-5] Fernandes H., Pasternak O., Bujacz G., **Bujacz A.**, Sikorski M.M., Jaskolski M. „Lupinus luteus pathogenesis-related protein as a reservoir for cytokinin.” **2008**, *J Mol Biol.* 378(5): 1040-51.
MNiSW - 30, IF₂₀₀₈ = 4.146, Cit - 41

- [P-6] Gajda J., Potrzebowski M.J., **Bujacz A.**, Bujacz G. „Application of the ^{77}Se Solid State NMR for Investigation of Bioorganic Compounds – the Case of Selenomethionine". **2008**, *Phosphorus Sulfur*. 183(4): 1061-1066.
MNiSW - 15, IF₂₀₀₈ = 0.692, Cit - 6
- [P-7] Redzynia I., Ljunggren A., **Bujacz A.**, Abrahamson M., Jaskolski M., Bujacz G.; „Crystal structure of the parasite inhibitor chagasin in complex with papain allows identification of structural requirements for broad reactivity and specificity determinants for target proteases". **2009**, *FEBS J*. 276(3): 793-806.
MNiSW - 30, IF₂₀₀₉ = 3.042 Cit – 19
- [P-8] Fernandes H., **Bujacz A.**, Bujacz G., Jelen F., Jasinski M., Kachlicki P., Otlewski J., Sikorski M.M., Jaskolski M. „Cytokinin-induced structural adaptability of a *Lupinus luteus* PR-10 protein". **2009**, *FEBS J*. 276(6): 1596-609.
MNiSW - 30, IF₂₀₀₉ = 3.042 Cit – 25
- [P-9] Trzeciak-Karlikowska K., **Bujacz A.**, Jeziorna A., Ciesielski W., Bujacz G., Gajda J., Pentak D., Potrzebowski M. „Solid State NMR and X-Ray Diffraction Study of Structure and Dynamics of Dihydrate and Anhydrous Form of Tyr-Ala-Phe." **2009**, *Cryst Growth Des*. 9 (9): 4051–4059.
MNiSW - 40, IF₂₀₀₉ = 4.162, Cit - 9
- [P-10] Bonikowski, R., Kula, J., **Bujacz, A.**, Wajs-Bonikowska, A., Majzner, W. „Natural (+)-carotol as a donor of chirality in the synthesis of enantiomerically pure hydroindene building blocks" **2009**, *Tetrahedron Asym.* 20: 2583-2588.
MNiSW - 30, IF₂₀₀₉ = 2.625, Cit – 6
- [P-11] **Bujacz A.**, Turek M., Majzner W., Lodyga-Chruscinska E. „X-ray structure of a novel histidine-copper(II) complex" **2010**, *Rus J of Coordinat Chem*. 36: 430-435.
MNiSW - 15, IF = 0.564 Cit - 2
- [P-12] Bujacz, G., Wrzesniewska, B., **Bujacz, A.** „Cryoprotection properties of salts of organic acids: a case study for a tetragonal crystal of HEW lysozyme" **2010**, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 66: 789-796.
MNiSW - 45, IF₂₀₁₀ = 6.326, Cit - 15
- [P-13] Pietrzyk, A.J., **Bujacz, A.**, Lochynska, M., Jaskolski, M., Bujacz, G.* „Isolation, purification, crystallization and preliminary X-ray studies of two 30 kDa proteins from silkworm haemolymph" **2011**, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 67: 372-376.
MNiSW - 15, IF₂₀₁₁ = 0.506, Cit - 8
- [P-14] Nowicka, K., **Bujacz, A.**, Paluch, P., Sobczuk, A., Jeziorna, A., Ciesielski, W., Bujacz, G., Jurczak, J., Potrzebowski, MJ „Study of host-guest interactions in benzodiazacoronands by means of solid state NMR spectroscopy, X-ray diffraction and quantum

mechanical computations" **2011**, *Phys Chem Chem Phys*. 13: 6423-6433.

MNiSW - 35, IF₂₀₁₁ = 3.573 Cit - 9

- [P-15] Trzeciak-Karlikowska, K., **Bujacz, A.**, Ciesielski, W., Bujacz, G., Potrzebowski, M.J.* „The Influence of the Stereochemistry of Alanine Residue on the Solid State Conformation and Crystal Packing of Opioid Peptides Containing D-Ala or L-Ala in Message Domain - XRD and NMR Study" **2011**, *J Phys Chem B*. 115: 9910-9919.

MNiSW - 30, IF₂₀₁₁ = 3.696, Cit - 10

- [P-16] Ziolkowska N.E., **Bujacz, A.**, Randad R.S., Erikson J., Skalova T., Hasek J., Bujacz G.* „New Active HIV-1 Protease Inhibitors Derived from 3-Hexanol: Conformation Study of the Free Inhibitors in Crystalline State and in Complex with the Enzyme" **2012**, *Chem Biol Drug Des*. 79: 798-809.

MNiSW - 25, IF₂₀₁₂ = 2.282, Cit - 1

- [P-17] Bonikowski R., Kula J., **Bujacz A.**, Wajs-Bonikowska A., Zaklos-Szyda M., Wysocki S., „Hydroindene-derived chiral synthons from carotol and their cytotoxicity" **2012**, *Tetrahedron Asym*. 23: 1038-1045.

MNiSW - 30, IF₂₀₁₂ = 2.652 Cit - 1

- [P-18] Pietrzyk A.J., Panjikar S., **Bujacz A.**, Lochynska M., Jaskolski M., Bujacz G.*, „High-resolution structure of Bombyx mori lipoprotein 7: crystallographic determination of the identity of the protein and its potential role in detoxification" **2012**, *Acta Cryst. D Biol Cryst*. 68: 1140-1151.

MNiSW - 45, IF₂₀₁₂ = 14.103, Cit – 9

- [P-19] Pietrzyk A.J., **Bujacz A.**, Mueller-Dieckmann J., Łochynska M., Jaskolski M., Bujacz G. "Crystallographic identification of an unexpected protein complex in silkworm haemolymph." **2013**, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 69: 2353-64.

MNiSW - 45, IF₂₀₁₃ = 7.232, Cit - 2

- [P-20] Pietrzyk A.J., **Bujacz A.**, Mueller-Dieckmann J., Łochynska M., Jaskolski M., Bujacz G. „Two Crystal Structures of Bombyx mori Lipoprotein 3-Structural Characterization of a New 30-kDa Lipoprotein Family Member" **2013**, *PLoS ONE*. 8(4): e61303

MNiSW - 40, IF₂₀₁₃ = 3.730 Cit - 3

- [P-21] Pietrzyk A.J., **Bujacz A.**, Jaskolski M., Bujacz G. „Identification of amino acid sequences via X-ray crystallography: a mini review of case studies" **2013**, *Biotechnologia*. 94: 9-14.

MNiSW - 10, IF₂₀₁₃ = n.a. Cit – 2

- [P-22] Mansour A., Belghith Y., Belkhiria M.S., **Bujacz A.**, Vincent Guérineau V., Nasri H.* "Synthesis, crystal structures and spectroscopic characterization of Co(II) bis(4,4'-bipyridine) with mesoporphyrins a,b,a,b-tetrakis(o-pivalamidophenyl) porphyrin (a,b,a,b-TpivPP) and tetraphenylporphyrin (TPP)" **2013**, *J Porphyrins*

Phthalocyanines. 17: 1–10.

MNiSW - 25, IF₂₀₁₃ = 1.433 Cit – 0

- [P-23] Plażuk D., Zakrzewski J*, Salmain M., Błaż A., Rychlik B. Strzelczyk P., **Bujacz A.**, Bujacz G. "Ferrocene-biotin conjugates targeting cancer cells: Synthesis, interaction with avidin, cytotoxic properties and the crystal structure of the complex of avidin with a biotin-linker-ferrocene conjugate" **2013**, *Organometallics*. 32(20): 5774-5783

MNiSW - 35, IF₂₀₁₃ = 4.145 Cit – 12

- [P-24] Pietrzyk A.J., **Bujacz A.**, Łochyńska M., Jaskolski M., Bujacz G.* „Crystal Structure of Bombyx mori Lipoprotein 6: Comparative Structural Analysis of the 30-kDa Lipoprotein Family" **2014**, *PLoS One*. 9(11): e108761.

MNiSW - 40, IF₂₀₁₄ = 3.534 Cit - 0

- [P-25] Lodyga-Chruscinska E., Symonowicz M., Sykula A., **Bujacz A.**, Garribba E., Rowinska-Zyrek M., Oldziej S., Klewicka E., Janicka M., Krolewska K., Cieslak M., Brodowska K., Chruscinski L. „Chelating ability and biological activity of hesperetin Schiff base". **2014**, *J Inorg Biochem*. 143C: 34-47.

MNiSW - 35, IF₂₀₁₄ = 3.274 Cit – 3

- [P-26] Bartosz Sekuła and **Anna Bujacz*** „Structural insights into the competitive binding of diclofenac and naproxen by equine serum albumin" **2015**, *J Med Chem*. (submitted in July 2015)

MNiSW - 45, IF₂₀₁₄ = 5.614 (5 letni IF=5.32) Cit – 0

Literatura cytowana w autoreferacie potwierdzająca aplikacyjne (biotechnologiczne i medyczne) znaczenie opisywanych białek.

1. Rathore A.S., Godavarti R., Kumar V., Tugcu N. Evolution of the Monoclonal Antibody Purification Platform. **2013** *BioPharm International*. (26): 11.
2. Gronemeyer P., Ditz R. and Strube J. **2014** Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering* (1): 188-212.
3. Cramer S.M. and Holstein M.A. Downstream bioprocessing: recent advances and future promise. **2011** *Curr Opin Chem Eng*. (1): 27–37.
4. Ravetch J. V., Bolland S. IgG Fc receptors **2001** *Annu Rev Immunol*. (19): 275. JP909405B.
5. Grodzki A.C. and Berenstein E. Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. In: C. Oliver and M.C. Jamur (eds.) Humana Press. **2010** *Immunocytochemical Methods and Protocols, Meth in Mol Biol*. (588): 15-26.

6. Wang J.M., Ferreira G., Arunakumari A. Advances in Non-Protein A Purification Processes for Human Monoclonal Antibodies. **2009** *BioPharm.com*.
7. Vogel C.L., Nabholz J.-M. Monotherapy of Metastatic Breast Cancer: A Review of Newer Agents, **1999** *The Oncologist* (4):17-33.
8. Raju T.S., Scallon B.J. Glycosylation in the Fc domain of IgG increases resistance to proteolytic cleavage by papain. **2006** *Biochem Biophys Res Commun.* 17; 341(3):797-803.
9. Seldon T.A., Hughes K.E., Munster D.J., Chin D.Y., Jones M.L. Improved Protein-A separation of V(H)3 Fab from Fc after papain digestion of antibodies. **2011** *J Biomol Tech.* 22(2):50-2.
10. Drent M., Cobben N. A., Henderson R. F., Wouters E. F., Dieijen-Visser M., Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. **1996** *M. Eur. Respir. J.* (9): 1736–1742.
11. Langvad E. Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in the tumour-bearing colon. **1968** *Int J Cancer.* 3(1):17–29.
12. Lossos I.S., Breuer R., Intrator O. and Sonenblick M. Differential diagnosis of pleural effusion by lactate dehydrogenase isoenzyme analysis. **1997** *Chest.* 111(3):648-651.
13. Garay S.M., Greene J. Prognostic indicators in the initial presentation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **1989** *Chest*, (95): 769–772.
14. Kumar S.A. and Chen S-M. Electroanalysis of NADH using conducting and redox active polymer/carbon nanotubes modified electrodes - a review. **2008**, *Sensors*, (8): 739-766.
15. Gawlita E., Paneth P., Anderson V.E. Equilibrium isotope effect on ternary complex formation of [1-¹⁸O]oxamate with NADH and lactate dehydrogenase. **1995** *Biochemistry*, (34): 6050–6058.
16. Alvaro-Benito M., de Abreu M., Portillo F., Sanz-Aparicio J., Fernández-Lobato M. New insights into the fructosyltransferase activity of *Schwanniomyces occidentalis* β -fructofuranosidase, emerging from nonconventional codon usage and directed mutation. **2010** *Appl Environ Microbiol.* 76 (22):7491-9.
17. Li C. Effects of chemical modification by chitooligosaccharide on enzyme activity and stability of yeast β -D-fructofuranosidase. **2014** *Enz Microb Technol.* (64-65):24-32.
18. Mouelhi R., Abidi F., Marzouki M.N. An improved method for the production of fructooligosaccharides by immobilized β -fructofuranosidase from *Sclerotinia sclerotiorum*. **2015** *Biotechnol Appl Biochem.* 1360. doi: 10.1002/bab.1360.
19. Gimeno-Pérez M., Linde D., Fernández-Arrojo L., Plou F.J., Fernández-Lobato M. Heterologous overproduction of β -fructofuranosidase from yeast *Xanthophyllomyces*

- dendrorhous*, an enzyme producing prebiotic sugars. **2015** *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(8):3459-67.
20. Kwon S.K., Kwak M.J., Seo J.G., Chung M.J., Kim J.F. Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* KCTC 12200BP, a probiotic strain promoting the intestinal health. **2015** *J Biotechnol.* (214):169-70.
 21. Guyonnet D., Chassany O., Ucrotte P., Picard C., Mouret M. §, Mercier C.-H. And Matuchansky C. Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. **2007** *Danone Research, Aliment Pharmacol Ther.* (26): 475–486.
 22. Loughney J.W., Lancaster C., Ha S., Rustandi R.R. Residual bovine serum albumin (BSA) quantitation in vaccines using automated Capillary Western technology. **2014** *Anal Biochem.* (461):49-56.
 23. Lu J., Ye F., Zhang A., Wei Z., Peng Y., Zhao S.. Preparation and characterization of silica monolith modified with bovine serum albumin-gold nanoparticles conjugates and its use as chiral stationary phases for capillary electrochromatography. **2011** *J Sep Sci.* 34(16-17): 2329-36.
 24. Shahabadi N., Nemat L. Multispectroscopic studies on the interaction of a platinum(II) complex containing L-histidine and 1,10-phenanthroline ligands with bovine serum albumin. **2014** *Appl Biochem Biotechnol.* 172(6): 2800-14.
 25. Barbosa L.R., Ortore M.G., Spinozzi F., Mariani P., Bernstorff S., Itri R. The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: a small-angle X-ray scattering study. **2010** *Biophys J.* 98(1):147-57.
 26. Petitpas I., Grüne T., Bhattacharya A.A., Curry S. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. **2001** *J Mol Biol.* 314(5): 955-60.
 27. Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **1999** *Protein Eng.* 12(6):439-46.
 28. Lovich M.A., Creel C., Hong K., Hwang C.W., Edelman E.R. Carrier proteins determine local pharmacokinetics and arterial distribution of paclitaxel. **2001** *J Pharm Sci.* 90(9):1324-35.
 29. Kosa T., Maruyama T., Otagiri M. Species differences of serum albumins: Drug binding sites. **1997** *Pharm Res.* 14(11):1607-12.
 30. Garlick R.K., Giese R.W. Avidin binding of radiolabeled biotin derivatives. **1988** *J Biol Chem.* 263(1):210-5.

31. Wilchek M., Bayer E.A. The avidin-biotin complex in immunology. **1984** *Immunol Today*. 5(2):39-43.
32. Haugland R.P., You W.W. Coupling of antibodies with biotin. **2008** *Methods Mol Biol.* (418):13-24.
33. Bayer E.A., Wilchek M. The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. **1980** *Methods Biochem Anal.* (26):1-45.
34. Kay B.K., Thai S., Volgina V.V. High-throughput biotinylation of proteins. **2009** *Methods Mol Biol.* (498):185-96.
35. Meier K.E., Ruoho A.E. An avidin-biotinyl-propranolol complex for beta-adrenergic receptor characterization. **1978** *J Supramol Struct.* (2):243-52.
36. Babak M.V., Plažuk D., Meier S.M., Arabshahi H.J., Reynisson J., Rychlik B., Błaż A., Szulc K., Hanif M., Strobl S., Roller A., Keppler B.K., Hartinger C.G. Half-sandwich ruthenium(II) biotin conjugates as biological vectors to cancer cells. **2015** *Chemistry*. 21(13):5110-7.
37. Hustinx S.R., Hruban R.H., Leoni L.M., Iacobuzio-Donahue C., Cameron J.L., Yeo C.J., Brown P.N., Argani P., Ashfaq R., Fukushima N., Goggins M., Kern S.E., Maitra A. Homozygous deletion of the MTAP gene in invasive adenocarcinoma of the pancreas and in periampullary cancer: a potential new target for therapy. **2005** *Cancer Biol Ther.* 4(1):83-6.
38. Sekowska A., Dénervaud V., Ashida H., Michoud K., Haas D., Yokota A., Danchin A. Bacterial variations on the methionine salvage pathway. 2004 *BMC Microbiol.* (4):9.
39. Smolenski R.T., Fabianowska-Majewska K., Montero C., Duley J.A., Fairbanks L.D., Marlewski M., Simmonds H.A. A novel route of ATP synthesis. **1992** *Biochem Pharmacol.* 43(10):2053-7.
40. Cieśliński H., Długołęcka A., Kur J., Turkiewicz M. Politechnika Gdańska. Rekord 091362. Gen mod-rsfp, jego sekwencja, jej otrzymywanie i jego zastosowanie, jako gen markerowy. Patent PL 211236, 04.11.**2011**.
41. Villoslada Diaz P., Avila Zaragoza M., Moreno Bruna B., Corrales Izquierdo F., Berasain Lasarte C., Ruiz Garcia-Trevijano E.. Proyecto De Biomedicina Cima, S.L., Cizur Mayor, ES zastosowanie 5'-metylotioadenozyny (mta) w zapobieganiu i/lub leczeniu chorób autoimmunologicznych i/lub odrzucania przeszczepu. 26.02.**2010**. EP 1891961 B1.
42. Shaffer W.A., Luong T.N., Rothman S.C., Kirsch J.F. Quantitative chimeric analysis of six specificity determinants that differentiate Escherichia coli aspartate from tyrosine aminotransferase. **2002** *Protein Sci.* 11(12):2848-59.

43. Koszelewski D., Lavandera I., Clay D., Rozzell D., Kroutil W., Asymmetric Synthesis of Optically Pure Pharmacologically Relevant Amines Employing ω -Transaminases. **2008** *Adv Synth Catal.* (350): 2761 – 2766.
44. Hçhne M., Bornscheue U.T. Biocatalytic Routes to Optically Active Amines. **2009** *Chem Cat Chem.* (1),42–51.
45. Taylor P.P., Pantaleone D.P., Senkpeil R.F. and Fotheringha I.G. Novel biosynthetic approaches to the production of unnatural amino acids using transaminases. **1998** *Trends in Biotechn.* (16): 412–418.
46. Rudat J., Brucher B.R., Syldak C. Transaminases for the synthesis of enantiopure beta-amino acids. 2012 *AMBExpress.* (2): 11.
47. Savile C.K., Janey J.M., Mundorff E.C., Moore J.C., Tam S., Jarvis W.R., Colbeck J.C., Krebber A., Fleitz F.J., Brands J., Devine P.N., Huisman G.W., Hughes G.J. Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. 2010 *Science.* (329): 305-309
48. Ward J., Wohlgemuth R. High-yield biocatalytic amination reactions in organic synthesis. 2010 *Curr Org Chem.* (14): 1914-1927.
49. Hwang B.Y., Cho B.K., Yun H., Koteswar K., Kim B.G. Revisit of aminotransferase in the genomic era and its application to biocatalysis. 2005 *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* (37): 47–55.
50. Rabinovich G.A. Galectins: An evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. 1999 *Cell Death Differ.* (6): 711–721.
51. Sharon N., Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. 2004 *Glycobiology.* (14): 53R–62R.
52. Ghazarian H., Idoni B., Oppenheimer S.B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins, and implications in cancer therapeutics. 2011 *Acta Histochem.* (113): 236–247.
53. El Mubarak M.A., Lamari F.N., Kontoyannis C. Simultaneous determination of allantoin and glycolic acid in snail mucus and cosmetic creams with high performance liquid chromatography and ultraviolet detection. 2013 *J Chromatogr A.* (1322): 49-53.
54. Lis H., Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. 1998 *Chem Rev.* (98): 637.
55. Gomes M.M., Suzuki H., Brooks M.T., Tomana M., Moldoveanu Z., Mestecky J., Julian B.A., Novak J., Herr A.B. Recognition of galactose-deficient O-glycans in the hinge region of IgA1 by N-acetylgalactosamine-specific snail lectins: a comparative binding study. 2010 *Biochemistry.* (49): 5671-5682.

56. Choi E., Loo D., Dennis J.W., O'Leary C.A., Hill M.M. High-throughput lectin magnetic bead array-coupled tandem mass spectrometry for glycoprotein biomarker discovery. 2011 *Electrophoresis*. (32): 3564-3575.
57. Drake P.M., Cho W., Li B., Prakobphol A., Johansen E., Anderson N.L, Regnier F.E., Gibson B.W., Fisher S.J. Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation. 2010 *Clin Chem*. (56): 223–236.

Anne Bujas