



AUTOREFERAT

BADANIA *IN SILICO* WYBRANYCH BIAŁEK BŁONOWYCH ORAZ ICH ODDZIAŁYWANIA Z BIOMOLEKUŁAMI TWORZĄCYMI Z NIMI KOMPLEKSY O POTENCJALE TERAPEUTYCZNYM

Dr Magdalena Justyna Ślusarz

1. IMIĘ I NAZWISKO

Magdalena Ślusarz

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE – Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- **Doktor nauk chemicznych**

Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański 2006; *Modelowanie molekularne białek GPCR i ich oddziaływań z bioligandami*, promotor: prof. dr hab. Jerzy Ciarkowski, recenzenci: prof. dr hab. Marta Pasenkiewicz-Gierula, prof. dr hab. Bernard Lammek

- **Magister**

Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański 2002; *Teoretyczne modelowanie kompleksów ludzkich receptorów hormonów neuroprzysadkowych z atosibanem*, promotor: dr Rajmund Kaźmierkiewicz

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- 17.03.2008 – obecnie: adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
- 17.03.2007 – 16.03.2008: asystent, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
- 07.11.2006 – 16.03.2007: specjalista, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (Dz. U. z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.)

LISTA PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

H1. Ślusarz MJ, Sikorska E, Ślusarz R, Ciarkowski J. Molecular docking-based study of vasopressin analogues modified at positions 2 and 3 with N-methylphenylalanine: influence on receptor-bound conformations and interactions with vasopressin and oxytocin receptors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49, 2463-2469. IF₂₀₀₆ = 5,115

H2. Ślusarz R, Sikorska E, Ślusarz MJ. Theoretical study on interactions of bicyclic vasopressin analogues with human neurohypophyseal hormone receptors, *QSAR & Combinatorial Science*, 2008, 27, 834-840. IF₂₀₀₈ = 2,594

- H3.** Ślusarz R, **Ślusarz MJ.** An influence of the aromatic side chains conformations in positions 2 and 3 of vasopressin analogs on interactions with vasopressin and oxytocin receptors, *QSAR & Combinatorial Science*, 2009, 28, 1166-1175. IF₂₀₀₉ = 3,027
- H4.** **Ślusarz MJ.** Molecular modeling study of the opioid receptor interactions with series of cyclic deltorphin analogues, *Journal of Peptide Science*, 2011, 17, 554-564. IF₂₀₁₁ = 1,799
- H5.** **Ślusarz MJ**, Sikorska E, Ślusarz R. Interactions of vasopressin and oxytocin receptors with vasopressin analogues substituted in position 2 with 3,3'-diphenylalanine - a molecular docking study, *Journal of Peptide Science*, 2013, 19, 118-126. IF₂₀₁₃ = 1,862
- H6.** Karska N, Graul M, Sikorska E, Zhukov I, **Ślusarz MJ**, Kasprzykowski F, Lipińska A, Rodziewicz-Motowidło S. Structure determination of UL49.5 transmembrane protein from bovine herpesvirus 1 by NMR spectroscopy and molecular dynamics, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2019, 1861, 926-938. IF₂₀₁₉ = 3,411
- H7.** **Ślusarz MJ.** Molecular insights into the mechanism of sugar-modified enkephalin binding to opioid receptors, *Computational Biology and Chemistry*, 2022, 101, 107783. IF₂₀₂₂ = 3,100
- H8.** **Ślusarz MJ.** How kelch domain-containing protein 3 distinguishes between the C-end degron of herpesviral protein UL49.5 and its mutants – insights from molecular dynamics, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2024, 109, 117795. IF₂₀₂₄ = 3,500
- H9.** **Ślusarz MJ**, Lipińska A. An intrinsic network of polar interactions is responsible for binding of UL49.5 C-degron by the CRL2^{KLHDC3} ubiquitin ligase, *Proteins – Structure, Function and Bioinformatics*, 2024, 92, 610-622. IF₂₀₂₄ = 2,900
- H10.** **Ślusarz MJ.** Structural basis for antagonist binding to vasopressin V1b receptor revealed by the molecular dynamics simulations, *Biopolymers*, 2025, 116, e23627. IF₂₀₂₄ = 3,200

Sumaryczny Impact Factor z roku opublikowania prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego wynosi **30,608**.

Oświadczenia opisujące wkład habilitantki w powstanie prac **H1-H10** oraz oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie prac **H1-H3**, **H5-H6** oraz **H9** znajdują się w Załączniku 5.

**BADANIA *IN SILICO* WYBRANYCH BIAŁEK BŁONOWYCH
ORAZ ICH ODDZIAŁYWANIA Z BIOMOLEKUŁAMI TWORZĄCYMI
Z NIMI KOMPLEKSY O POTENCJALE TERAPEUTYCZNYM**

WSTĘP

Integralne białka błonowe są kluczowym elementem procesu transdukcji sygnału do wnętrza komórki, pośredniczą także w przekazywaniu informacji pomiędzy komórkami. Białka te zdolne są do transportu jonów i metabolitów przez błonę, mogą też pełnić funkcje receptorów i enzymów. Szacuje się, że większość genomów organizmów eukariotycznych zawiera około 30% genów kodujących różne białka błonowe [1]. Białka błonowe kontrolują wiele procesów fizjologicznych, dlatego też zaburzenie ich prawidłowego działania prowadzi do nieprawidłowości w funkcjonowaniu komórek i licznych schorzeń będących tego wynikiem. Poznanie szczegółowego mechanizmu funkcjonowania białek błonowych na poziomie molekularnym oraz ich oddziaływania z innymi biomolekułami jest kluczowe dla projektowania leków, które mogą, w zależności od potrzeby, hamować lub wzmacniać działanie danego białka.

Badania składające się na osiągnięcie habilitacyjne obejmowały modelowanie struktury oraz oddziaływań białko-ligand lub białko-białko wybranych białek błonowych: sześciu receptorów sprzężonych z białkiem G, (**H1-H5**, **H7** i **H10**) oraz białka UL49.5 herpeswirusa i jego mutantów (**H6**, **H8** i **H9**). Wszystkie te białka pełnią istotne role fizjologiczne i stanowią bądź mogą stanowić, punkt docelowy działania leków. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie symulacji umożliwią racjonalne projektowanie nowych substancji leczniczych działających poprzez badane białka.

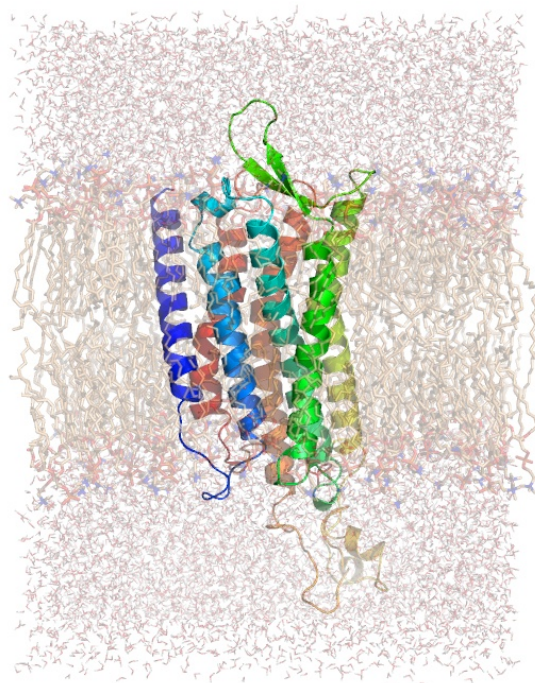
RECEPTORY SPRZĘŻONE Z BIAŁKIEM G

Receptory sprzężone z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptors*, GPCR) to integralne białka błonowe tworzące jedną z największych rodzin białkowych. W obrębie rodziny GPCR wyróżnia się sześć klas receptorów (A-F), z których najliczniejsza jest klasa A, zawierająca ponad 90% wszystkich znanych receptorów [2]. Należą do niej badane przeze mnie receptory wazopresyny i oksytocyny (prace **H1-H3**, **H5** i **H10**) oraz receptory opioidowe (prace **H4** i **H7**). Poprzez oddziaływanie z ligandami, GPCR biorą udział w procesie transdukcji sygnału do komórki. W przekazywaniu sygnału uczestniczą sprzężone

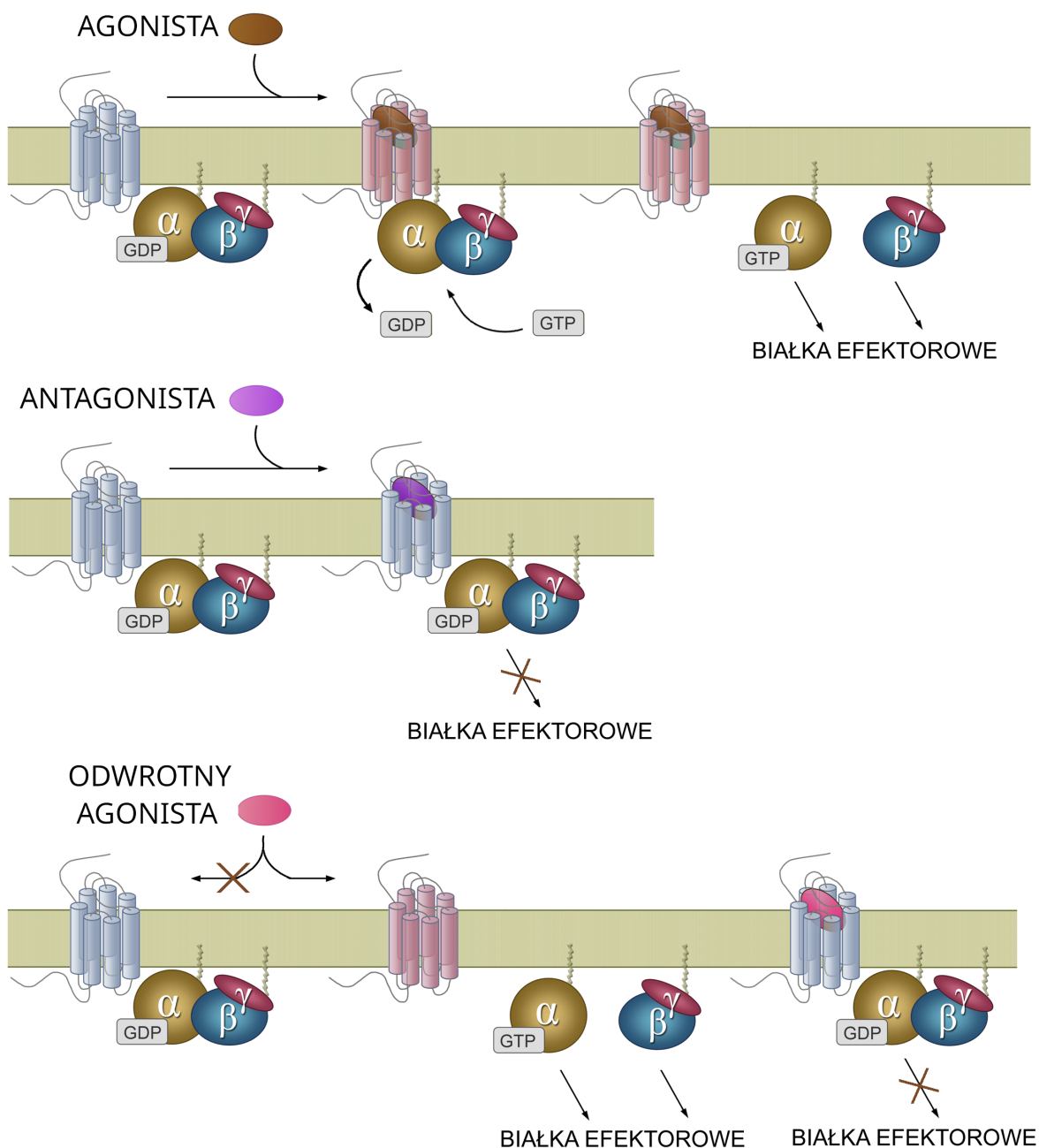
z nimi heterotrimeryczne białka G (ang. *GTP-binding protein, G-protein*), które przekazują sygnał od receptora na określony efektor, zwykle jest to kanał jonowy lub enzym.

Struktura trzeciorzędowa wszystkich GPCR jest podobna: łańcuch białkowy tworzy w błonie komórkowej domenę transmembranową (TM) złożoną z siedmiu odcinków α -helikalnych (TM1-TM7) połączonych pętlami (Rysunek 1). Miejsce wiązania liganda najczęściej znajduje się wewnątrz domeny transmembranowej, w pętlach zewnątrzkomórkowych (ECL) lub na pograniczu tych domen. Większość GPCR występuje w postaci dimerów lub oligomerów. Oligomeryzacja jest kluczowa dla ich syntezy, transportu z retikulum endoplazmatycznego do błony komórkowej, czy też prawidłowego sprzężenia z białkiem G [3].

Podobieństwo struktury wszystkich GPCR jest ściśle związane z podobieństwem mechanizmu ich działania. Proces transdukcji sygnału rozpoczyna się od oddziaływania receptora z agonistą, który indukuje zmiany konformacyjne białka receptorowego, prowadzące do przejścia receptora w formę aktywną [4]. Aktywowany receptor następnie oddziałuje z białkiem G, wywołując jego zmiany konformacyjne, wymianę GDP na GTP oraz dysocjację heterotrimeru na podjednostki, które mogą stymulować lub hamować określone białka efektorowe (Rysunek 2). W przypadku oddziaływania z antagonistą, receptor nie przechodzi zmian konformacyjnych prowadzących do jego aktywacji, zatem wiązanie antagonisty nie aktywuje ścieżki sygnałowej, a jedynie kompetycyjnie hamuje wiązanie innych ligandów do receptora (Rysunek 2).



Rysunek 1. Model GPCR w błonie komórkowej. Helisy pokolorowane są od niebieskiego (TM1) do czerwonego (TM7). Strona zewnątrzkomórkowa znajduje się u góry rysunku.



Rysunek 2. Schemat oddziaływania GPCR z agonistą, antagonistą oraz odwrotnym agonistą. Nieaktywny receptor zaznaczony jest kolorem szarym, aktywny - kolorem różowym.

Zgodnie z modelem dwóch stanów, każdy GPCR istnieje w równowadze pomiędzy stanem nieaktywnym i aktywnym, wykazując niewielką aktywność konstytutywną [5]. Związanie agonisty przesuwa stan równowagi w stronę receptora aktywnego, natomiast oddziaływanie z antagonistą nie ma wpływu na stan równowagi. Model dwóch stanów wyjaśnia również, dlaczego niektóre ligandy o działaniu antagonistycznym mogą przesuwać stan równowagi w stronę receptora nieaktywnego, zmniejszając aktywność konstytutywną

GPCR. Ligandy takie nazywane są odwrotnymi agonistami i posiadają zdolność odwracania procesu aktywacji receptora. Model wielu stanów jest rozwinięciem modelu dwóch stanów i zgodnie z tym modelem każdy GPCR może istnieć w jednym stanie podstawowym (nieaktywnym) oraz wielu różnych stanach aktywnych [6].

RECEPTORY WAZOPRESYNY I OKSYTOCYNY (H1-H3, H5, H10)

Receptory wazopresyny i oksytocyny są typowymi przedstawicielami receptorów sprzężonych z białkiem G. Znane są trzy podtypy receptorów wazopresyny: V1a, V1b i V2 (V1aR, V1bR, V2R) oraz jeden typ receptorów oksytocyny, OTR. Wszystkie te receptory wykazują wysokie podobieństwo sekwencyjne w obrębie domeny transmembranowej [7]. Endogennymi ligandami receptorów wazopresyny i oksytocyny są hormony neuroprzysadkowe: wazopresyna (CYFQNCPRG-NH₂, AVP) oraz oksytocyna (CYIQNCPLG-NH₂, OT). Oba hormony posiadają w swej strukturze mostek disulfidowy pomiędzy resztami cysteiny (Cys¹-Cys⁶).

Głównym miejscem ekspresji receptorów oksytocyny jest mięśniówka macicy oraz gruczoły mleczne. Aktywacja tych receptorów prowadzi do skurczu mięśni gładkich macicy (działanie uterotoniczne), umożliwiając poród oraz do skurczu komórek mioepitelialnych kanalików mlecznych (działanie galaktokinetyczne), co umożliwia wypływ pokarmu podczas laktacji. Receptory wazopresyny V1a zlokalizowane są głównie w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych, hepatocytach oraz trombocytach. Pobudzenie naczyniowych receptorów V1a wywołuje skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych i podniesienie ciśnienia krwi (działanie presyjne). Ponadto aktywacja V1aR stymuluje agregację płytek krwi oraz kontroluje procesy glikogenolizy i glukoneogenezy [8]. OTR oraz V1aR są również obecne w centralnym układzie nerwowym wielu naczelnych, w tym człowieka, gdzie kontrolują funkcje związane z zachowaniami społecznymi takimi jak przywiązanie i opieka nad potomstwem, obrona własnego terytorium czy zachowania agresywne [9, 10].

Receptory V1b podlegają ekspresji w przednim płacie przysadki mózgowej i pełnią istotną rolę w regulacji osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, *HPA axis*). Aktywacja V1bR indukuje wydzielanie hormonu adrenokortykotropowego (ACTH), który następnie stymuluje produkcję i wydzielanie kortyzolu przez korę nadnerczy. Receptory V1b w komórkach β wysepek Langerhansa trzustki kontrolują metabolizm glukozy poprzez regulację wydzielania insuliny [11].

Miejscem ekspresji receptorów V2 są przede wszystkim kanaliki nerkowe, a oddziaływanie V2R z agonistą indukuje wewnątrzkomórkową kaskadę reakcji prowadzącą

do wzrostu wchłaniania zwrotnego wody w nerkach, zmniejszenia ilości wydalanego moczu i w konsekwencji do zatrzymania wody w organizmie (działanie antydiuretyczne).

Nieprawidłowe funkcjonowanie receptorów oksytocyny i wazopresyny prowadzi do stanów patofizjologicznych, które mogą być leczone poprzez ligandy selektywnie działające na odpowiedni typ/podtyp receptora pobudzając go lub blokując [12]. Dobrze poznanym celem terapeutycznym są OTR i V2R. W przypadku przedwczesnej aktywacji receptorów macicznych przez oksytocynę (przed terminem porodu), korzystne jest ich zablokowanie poprzez podanie antagonisty i wygaszenie przedwczesnej czynności skurczowej (działanie tokolityczne). Atosiban, peptydowy analog oksytocyny, stosowany jest obecnie w Europie jako lek zapobiegający przedwczesnym porodom. Jest on jednak nieselektywny i oprócz receptorów oksytocyny blokuje także receptory wazopresyny V1a [13]. W zespole Schwartz-Barttera zbyt wysoki poziom wazopresyny we krwi powoduje zatrzymanie wody w organizmie, hiponatremię i hipoosmolalność płynów ustrojowych. Do leczenia tego schorzenia stosowane są niepeptydowe waptany będące antagonistami V2R, takie jak tolwaptan [14]. W przypadku niewystarczającej produkcji i wydzielania wazopresyny występuje moczówka prosta ośrodkowa, która charakteryzuje się upośledzeniem wchłaniania zwrotnego wody, wydalaniem dużych ilości rozwodnionego moczu i w konsekwencji doprowadza do odwodnienia organizmu. W tej sytuacji rozwiązaniem jest zastosowanie selektywnego agonisty receptorów V2. Desmopresyna będąca peptydowym analogiem wazopresyny jest stosowana jako lek na moczówkę prostą ośrodkową oraz moczenie nocne i wykazuje podwyższoną selektywność względem V2R [15]. Nie jest jednak lekiem wysoce selektywnym i jej oddziaływanie z V1aR może powodować efekt uboczny w postaci podniesienia ciśnienia krwi.

W ostatniej dekadzie, po odkryciu roli jaką pełnią receptory oksytocyny i wazopresyny V1a i V1b w centralnym układzie nerwowym, rozpoczęto próby kliniczne leczenia zaburzeń psychicznych takich jak autyzm, depresja, zespół chronicznego zmęczenia, zaburzenia lękowe czy zespół stresu pourazowego (PTSD) wykorzystując ligandy tych receptorów [16]. Niestety nadal nie dopuszczono do użycia w praktyce klinicznej żadnych leków silnie i selektywnie działających na V1aR i V1bR. Terlipresyna stosowana jako lek przeciwkrwotoczny, pierwotnie uważana za selektywnego agonistę V1aR, w nowszych badaniach okazała się, również agonistą V1bR oraz V2R [17]. Zatem, pomimo obecności na rynku leków takich jak terlipresyna, atosiban czy desmopresyna nadal istnieje potrzeba poszukiwania ligandów o silnym i selektywnym działaniu agonistycznym lub antagonistycznym względem określonego typu/podtypu receptora. W przypadku receptorów oksytocyny badania skupiają

się przede wszystkim na poszukiwaniu selektywnych antagonistów, potencjalnych tokolityków, natomiast w przypadku receptorów wazopresyny potrzebne jest racjonalne projektowanie zarówno agonistów, jak i antagonistów. Realizacji tak sformułowanego celu służyły badania opisane w publikacjach **H1-H3** oraz **H5**, które dotyczyły modelowania oddziaływań 21 peptydowych analogów wazopresyny z receptorami: OTR, V1aR oraz V2R (Tabela 1).

Tabela 1. Receptory wazopresyny i oksycytocyny oraz ich ligandy badane w pracach **H1-H3** i **H5**. Aic - kwas aminoindano-2-karboksylowy, Dab - kwas 2,4-diaminobutanowy, Dap - kwas 2,3-diaminopropanowy, Dpa - 3,3'-difenyloalanina, MePhe - N-metylofenyloalanina, Mpa - kwas 3-merkaptopropionowy, Orn - ornityna.

Receptory	Ligandy	Publ.
	[D-MePhe ^{2,3}]AVP [D-MePhe ² ,MePhe ³]AVP [MePhe ² ,D-MePhe ³]AVP [MePhe ^{2,3}]AVP	H1
	c-(4-9)-[Mpa ¹ ,Lys ⁴]AVP c-(4-9)-[Mpa ¹ ,Orn ⁴]AVP c-(4-9)-[Mpa ¹ ,Dab ⁴]AVP c-(4-9)-[Mpa ¹ ,Dap ⁴]AVP	H2
	[Aic ²]AVP [Mpa ¹ ,Aic ²]AVP [Aic ² ,D-Arg ⁸]VP [Mpa ¹ ,Aic ² ,D-Arg ⁸]VP [Aic ² ,Val ⁴]AVP [Mpa ¹ ,Aic ² ,Val ⁴ ,D-Arg ⁸]VP [Aic ³]AVP [Mpa ¹ ,Aic ³]AVP [Aic ³ ,D-Arg ⁸]VP	H3
	[Mpa ¹ ,Dpa ² ,Val ⁴ ,D-Arg ⁸]VP [Mpa ¹ ,D-Dpa ² ,Val ⁴ ,D-Arg ⁸]VP [D-Dpa ² ,D-Arg ⁸]VP [Mpa ¹ ,D-Dpa ² ,D-Arg ⁸]VP	H5

W pracy **H1** przedmiotem moich badań było oddziaływanie analogów wazopresyny podstawionych w pozycji 2 i 3 kombinacją enancjomerów N-metylofenyloalaniny (MePhe) z OTR, V1aR oraz V2R. W testach aktywności biologicznej dwa z badanych ligandów wykazywały aktywność antagonistyczną względem OTR i V1aR. Żaden z ligandów nie oddziaływał z V2R (Tabela 2) [18].

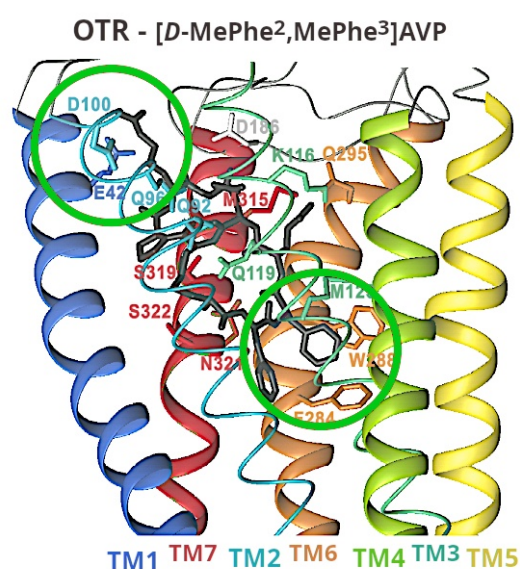
Tabela 2. Aktywność biologiczna analogów badanych w pracy **H1**.

Ligand	OTR [pA ₂]	V1aR [pA ₂]	V2R [pA ₂]
[D-MePhe ^{2,3}]AVP	6,4	0	0
[D-MePhe ² ,MePhe ³]AVP	6,6	5,8	0
[MePhe ² ,D-MePhe ³]AVP	0	0	0
[MePhe ^{2,3}]AVP	0	0	0

Modele nieaktywnych receptorów oksytocyny i wazopresyny zostały zbudowane metodami modelowania homologicznego w oparciu o strukturę krystaliczną rodopsyny bydlęcej, jedyną dostępną wówczas eksperymentalną strukturę GPCR, natomiast struktury ligandów oznaczone zostały z wykorzystaniem spektroskopii NMR i metod modelowania molekularnego [19]. Dokowanie wykonałam metodą dokowania semi-giętkiego - ligandy o pełnej swobodzie konformacyjnej dokowane były do "sztywnego" receptora i w kolejnym etapie symulacji optymalizacja geometrii umożliwiała dokładne dopasowanie oddziałujących ze sobą cząsteczek. Podczas dokowania badanych analogów do receptora V2, wszystkie ligandy często przyjmowały wewnątrz kieszeni wiążącej pozycję z C-końcem skierowanym do wnętrza receptora i uzyskiwały bardzo wysokie (niekorzystne) wartości energii swobodnej oddziaływania. Nieliczne dane eksperymentalne sugerowały, że cząsteczka wazopresyny układa się w receptorze w taki sposób, aby część cykliczna peptydu znajdowała się na dnie kieszeni wiążącej, natomiast polarny C-koniec, zawierający resztę Arg⁸, skierowany był w stronę pętli zewnątrzkomórkowych receptora [20]. Uznałam zatem, że badane analogi wazopresyny powinny być położone w kieszeni receptora podobnie, a odwrotne położenie nie jest prawidłowe. Dlatego też we wszystkich swoich symulacjach do oceny kompleksów receptor-ligand stosowałam zarówno kryterium energetyczne, jak i kryterium prawidłowego położenia. Opublikowana w roku 2021 struktura eksperymentalna kompleksu V2R-AVP potwierdziła słuszność takiego postępowania [21]. Po wykonaniu dokowania wszystkie wybrane kompleksy receptor-ligand poddałam optymalizacji geometrii poprzez wykonanie

minimalizacji energii oraz dodatkowo protokołu symulowanego wyżarzania z więzami (ang. *Constrained Simulated Annealing, CSA*).

Najważniejszym czynnikiem wpływającym na oddziaływanie receptor-ligand w pracy **H1** było położenie łańcuchów bocznych N-metylofenyloalaniny. Ligandy podstawione w pozycji drugiej resztą o konfiguracji L, [MePhe²,D-MePhe³]AVP oraz [MePhe^{2,3}]AVP, pozbawione aktywności biologicznej (Tabela 2), w czasie dokowania do receptorów nie były w stanie przyjąć konformacji, która pozwoliłaby na ich prawidłowe dopasowanie się do kieszeni wiążącej. Dwa pozostałe analogi, [D-MePhe^{2,3}]AVP oraz [D-MePhe²,MePhe³]AVP, tworzyły z receptorami kompleksy spełniające kryterium prawidłowej orientacji liganda, które uzyskiwały ujemne wartości energii swobodnej



Rysunek 3. Kompleks OTR - [D-MePhe², MePhe³]AVP [**H1**].

oddziaływania hydrofobowe i aromatyczne.

Zaproponowałam także wyjaśnienie, dlaczego badane ligandy są selektywne i nie wykazują aktywności względem V2R. W przypadku OTR i V1aR, w czasie dokowania liganda tworzył się mostek solny pomiędzy resztą Arg⁸ liganda i resztą kwasu asparaginowego D100(2.65)* z helisy TM2 (Rysunek 3). Jednocześnie cykliczny N-koniec peptydów lokował się w głębi kieszeni wiążącej i stabilizował pozycję liganda poprzez oddziaływania aromatyczne z helisą TM6. W receptorze V2, w tej samej pozycji aminokwasowej znajduje

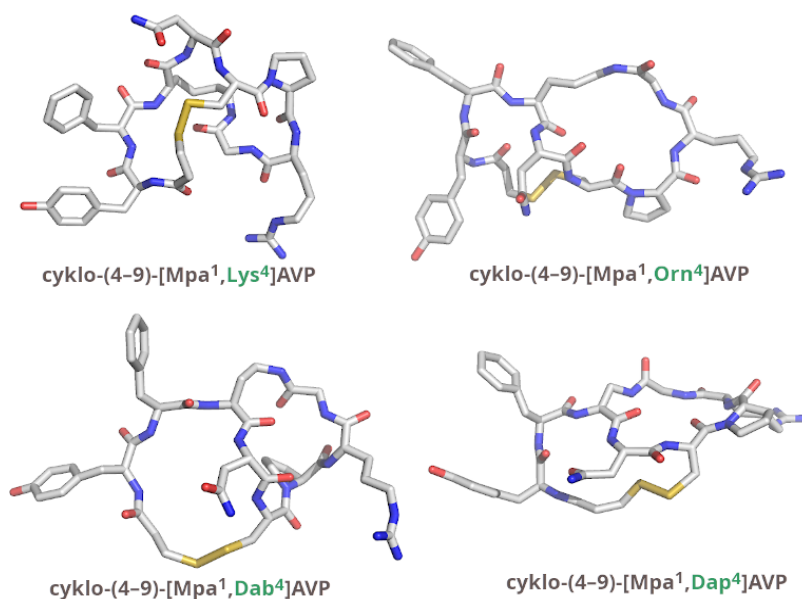
oddziaływania. Łańcuchy boczne reszt MePhe tych analogów zaangażowane były w oddziaływania typu π - π z resztami aromatycznymi helisy TM6 receptora (Rysunek 3), silnie stabilizując pozycję liganda w kieszeni wiążącej.

Szczegółowa analiza oddziaływań receptor-ligand pozwoliła mi zidentyfikować reszty aminokwasowe receptora zaangażowane w oddziaływanie z ligandami. Były to konserwatywne reszty glutaminy, które oddziaływały z ligandami poprzez wiązania wodorowe. W kompleksach występowały też

* Liczba w nawiasie po numerze bezwzględnym reszty aminokwasowej receptora jest numerem tej reszty zgodnym z systemem numeracji względnej, który ułatwia porównanie położenia reszt w różnych GPCR [Ballesteros and Weinstein, *Methods Neurosci*, 1995, 25, 366-428]. W przypadku reszt położonych w pętlach lub N-końcu receptora, w nawiasie znajduje się odpowiednie oznaczenie (np. ECL2 lub N). Numery reszt ligandów pisane są w indeksie górnym dla odróżnienia ich od reszt receptorów.

się dodatkowo naładowana reszta K100(2.65), która silnie odpycha resztę Arg⁸ liganda, najprawdopodobniej już na etapie rozpoznawania go przez receptor.

Wyniki uzyskane w pracy **H1**, a szczególnie ich zgodność z badaniami aktywności biologicznej zainspirowała mnie do zaprojektowania czterech nowych analogów wazopresyny opisanych w pracy **H2**, zawierających w cząsteczce oprócz mostka disulfidowego, drugi mostek łączący reszty aminokwasowe w pozycjach 4 i 9 (Rysunek 4). Obecność dodatkowego mostka powoduje znaczne zahamowanie swobody konformacyjnej peptydu.



Rysunek 4. Bicykliczne analogi AVP zaprojektowane w pracy **H2**.

Celem symulacji przeprowadzonych w **H2** była ocena siły i selektywności oddziaływania receptorów oksytocyny i wazopresyny z zaprojektowanymi *de novo* bicyklicznymi ligandami przed wykonaniem ich syntezy oraz badań biologicznych.

Zaprojektowane przeze mnie ligandy zadokowałam do modeli nieaktywnych receptorów oksytocyny i wazopresyny i zoptymalizowałam analogicznie jak w pracy **H1**. Podczas całego protokołu symulacyjnego, kompleksy receptor-ligand oceniałam w oparciu o kryterium prawidłowego położenia liganda oraz kryterium energetyczne. Analiza oddziaływań receptor-ligand wykazała, że dla wszystkich ligandów badanych w pracy **H2**, oddziaływanie z receptorami było słabsze niż w przypadku niemodyfikowanej wazopresyny [²²(**P9**[†])]. W kompleksach tego samego rodzaju (tworzonych przez ten sam receptor i ligand), występowały różne oddziaływania, co wskazuje na mało specyficzne i nietrwałe wiązanie badanych analogów. W kompleksach z V1aR występowały najmniej liczne i słabe oddziaływania. W receptorze V2 dla analogów c-(4-9)-[Mpa¹, Orn⁴]AVP oraz c-(4-9)-[Mpa¹,

† Litera **P** oznacza publikację znajdującą się w Wykazie osiągnięć naukowych (Załącznik 4a).

Dab⁴]AVP występowały bardziej istotne statystycznie oddziaływania z Q96(2.61), Q119(3.32) i S315(7.43). Z kolei w receptorze oksytocyny oddziaływania były liczniejsze, zwłaszcza dla analogu c-(4–9)-[Mpa¹,Dab⁴]AVP, ale mniej powtarzalne. Analog o najkrótszym mostku, c-(4–9)-[Mpa¹,Dap⁴]AVP, swobodnie mieścił się w kieszeni wiążącej receptorów, ale miał zbyt usztywnioną strukturę, która nie pozwalała na przyjęcie rozciągniętej konformacji umożliwiającej utworzenie silnego i trwałego kompleksu z receptorem. Podobnie było dla analogu c-(4–9)-[Mpa¹,Dab⁴]AVP. Z kolei dla analogu o najdłuższym mostku, c-(4–9)-[Mpa¹,Lys⁴]AVP, występowała największa liczba kompleksów o nieprawidłowym położeniu liganda, ponieważ analog ten nie był w stanie dopasować się do miejsca wiążącego ze względu na zawady steryczne. Dla analogu c-(4-9)-[Mpa¹,Orn⁴]AVP długość mostka okazała się optymalna i nie zaburzała prawidłowego dokowania liganda w receptorach. W rezultacie tworzył on z badanymi receptorami kompleksy, w których występują trwalsze oddziaływania. Do struktury tego analogu zamierzam wprowadzić modyfikacje w pozycjach 2 oraz 3 i ponownie zbadać jego oddziaływanie z receptorami, używając opublikowanych niedawno struktur eksperymentalnych OTR i V2R.

Celem pracy **H3** było poszerzenie wiedzy w zakresie wrażliwości receptorów wazopresyny i oksytocyny na podstawienie agonisty w pozycjach 2 i 3. Symulacje obejmowały dziewięć analogów wazopresyny podstawionych w pozycji 2 lub 3 kwasem 2-aminoindano-2-karboksylovym (Aic), co umożliwia usztywnienie pozycji aromatycznego łańcucha bocznego względem łańcucha głównego peptydu. Ligandy podstawione Aic w pozycji drugiej, w testach aktywności biologicznej wykazywały aktywność antagonistyczną względem OTR, agonistyczną względem V2R i mieszaną względem V1aR (Tabela 3) [23].

Jeden z ligandów, [Mpa¹,Aic²,Val⁴,D-Arg⁸]VP wykazywał bardzo silną aktywność agonistyczną względem V2R, silniejszą niż desmopresyna. Analogi podstawione Aic w pozycji 3 nie wykazywały żadnej aktywności względem badanych receptorów (Tabela 3).

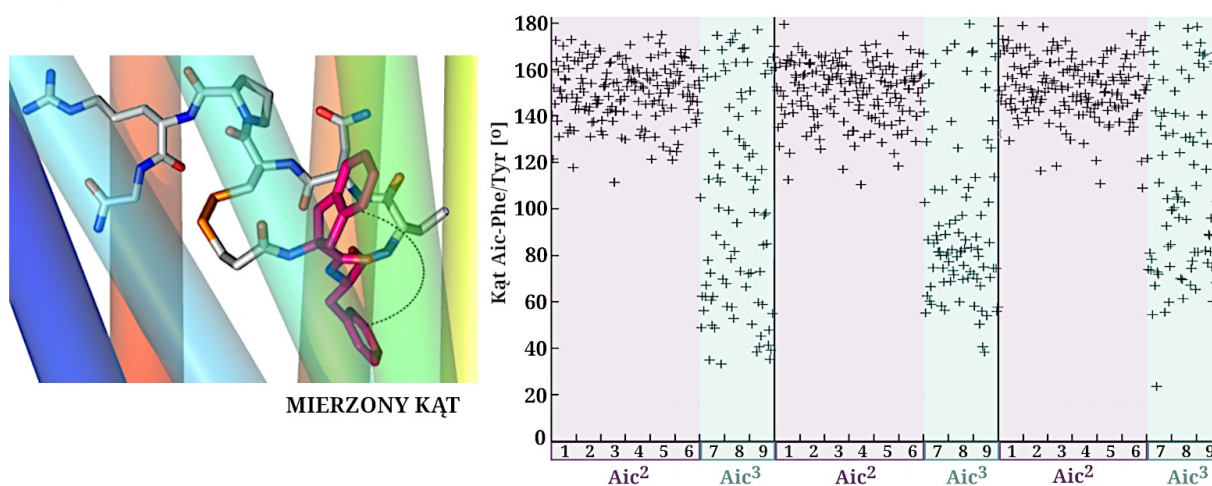
Tabela 3. Aktywność biologiczna analogów wazopresyny badanych w pracy **H3**.

Ligand	OTR [pA ₂]	V1aR [pA ₂ /IU]	V2R [IU]
[Aic ²]AVP	7,27	9,4 (IU)	~450
[Mpa ¹ ,Aic ²]AVP	7,50	5,3 (IU)	~450
[Aic ² ,D-Arg ⁸]VP	6,86	0	~45
[Mpa ¹ ,Aic ² ,D-Arg ⁸]VP	7,31	5,60 (pA ₂)	~450
[Aic ² ,Val ⁴]AVP	7,93	0	~450
[Mpa ¹ ,Aic ² ,Val ⁴ ,D-Arg ⁸]VP	8,06	6,25 (pA ₂)	~4500

Ligand	OTR [pA ₂]	V1aR [pA ₂ /IU]	V2R [IU]
[Aic ³]AVP	0	0	0
[Mpa ¹ ,Aic ³]AVP	0	0	0
[Aic ³ ,D-Arg ⁸]VP	0	0	0

Podstawowy protokół symulacyjny w pracy **H3** był analogiczny jak w przypadku prac **H1** i **H2** i obejmował dokowanie ligandów do modeli nieaktywnych receptorów, ocenę kompleksów receptor-ligand (w oparciu o kryterium położenia oraz wartość energii oddziaływania) oraz minimalizację energii i CSA wybranych kompleksów.

Pierwszym celem badań w pracy **H3** było wyjaśnienie, dlaczego analogi podstawione resztą Aic w pozycji 3 nie wykazują aktywności biologicznej. Założyłam, że czynnikiem wpływającym na oddziaływanie z receptorami może być położenie łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych w pozycjach 2 i 3, ponieważ podobną zależność zaobserwowałam wcześniej dla oddziaływania receptorów oksytocyny i wazopresyny z analogami wazopresyny podstawionymi resztą N-metylofenyloalaniny w pracy **H1**. W celu zweryfikowania tej hipotezy konieczne było przeprowadzenie analizy położenia łańcuchów bocznych Aic-Phe/Tyr względem siebie we wszystkich badanych kompleksach receptor-ligand. Okazało się, że w przypadku ligandów podstawionych Aic w pozycji 2, kąt pomiędzy płaszczyznami zawierającymi pierścienie aromatyczne wynosił powyżej 120 stopni, natomiast w analogach podstawionych w pozycji 3, wartość tego kąta najczęściej zawierała się w przedziale od 40 do 120 stopni (Rysunek 5).



Rysunek 5. Dystrybucja wartości kąta Aic-Phe/Tyr ligandów w kompleksach receptor-ligand [**H3**].

W przypadku mniejszego kąta, pierścienie łańcuchów bocznych leżą bliżej siebie i są przez to mniej dostępne dla oddziaływania z resztami receptorów, co skutkuje brakiem części oddziaływań z aromatycznymi resztami helisy TM6, kluczowych dla stabilizacji struktury

kompleksu receptor-ligand. Dodatkowe symulacje dynamiki molekularnej w wodzie dla dwóch monopodstawionych analogów: [Aic²]AVP oraz [Aic³]AVP potwierdziły, że różne wartości kąta Aic-Phe/Tyr występowały również w niezwiązanych z receptorem peptydach. Analogi te różniły się także konformacją C-końca (–PRG-NH₂). Tak znaczące różnice w strukturze peptydów tłumaczą, dlaczego analogi podstawione resztą Aic w pozycji 3 nie wykazują aktywności biologicznej, a te podstawione w pozycji 2 mogą być prawidłowo rozpoznawane przez receptory i tworzą z nimi stabilne kompleksy. Dla tych ostatnich szczegółowa analiza oddziaływań receptor-ligand wykazała różnice w oddziaływaniu z V1aR i ujawniła, że miejsca wiążące agonistów i antagonistów tylko częściowo się pokrywają. Najistotniejszą różnicą, którą zaobserwowałam była różnica w głębokości dokowania - ligandy o działaniu antagonistycznym zadokowane były głębiej. Bardzo głębokie położenie antagonistów występowało również w kompleksach z receptorem oksytocyny, ale nie w V2R, gdzie wszystkie ligandy podstawione w pozycji 2 resztą Aic wykazywały w testach biologicznych działanie agonistyczne. Podobne położenie antagonistów w kieszeni receptora oksytocyny zaobserwowałam wcześniej dla atosibanu i barusibanu [²⁴(P3),²⁵(P4)]. W 2020 roku opublikowana została struktura krystaliczna receptora oksytocyny w kompleksie z innym niepeptydowym antagonistą, retosibanem, podobnie głęboko położonym wewnątrz kieszeni wiążącej receptora [²⁶]. W pracy **H3**, podobnie jak w pracy **H1**, w przypadku ligandów o działaniu antagonistycznym zarówno w OTR, jak i V1aR obecne było oddziaływanie z położoną na dnie kieszeni wiążącej, silnie konserwatywną resztą kwasu asparaginowego D85/97(2.50) w OTR/V1aR.

Zaobserwowałam również różnice w liczbie oddziaływań receptor-ligand pomiędzy różnymi receptorami. W kompleksach receptor-agonista oddziaływania były liczniejsze. Było to szczególnie widoczne w receptorze V2, gdzie ligandy były dodatkowo wiązane przez reszty leżące w domenie zewnątrzkomórkowej. Występowały tam mostki solne lub wiązania wodorowe z udziałem R32(N) oraz D103(2.68). Kwas asparaginowy D103 jest resztą niekonserwatywną, może zatem odpowiadać za selektywność badanych ligandów względem receptora V2. W roku 2021, dla pierwszej opublikowanej struktury eksperymentalnej V2R z zadokowaną wazopresyną, zaobserwowano, że reszta D103(2.68) jest częścią kieszeni wiążącej wazopresyny i oddziałuje z C-końcem liganda podobnie jak w kompleksach badanych przeze mnie ligandów.

W pracy **H5** badałam oddziaływanie receptorów oksytocyny i wazopresyny z analogami wazopresyny podstawionymi w pozycji 2 resztą 3,3'-difenylalaniny (Dpa), lecz bez zmian w pozycji 3, ponieważ wyniki badań przeprowadzonych w pracach **H1-H3** wskazywały,

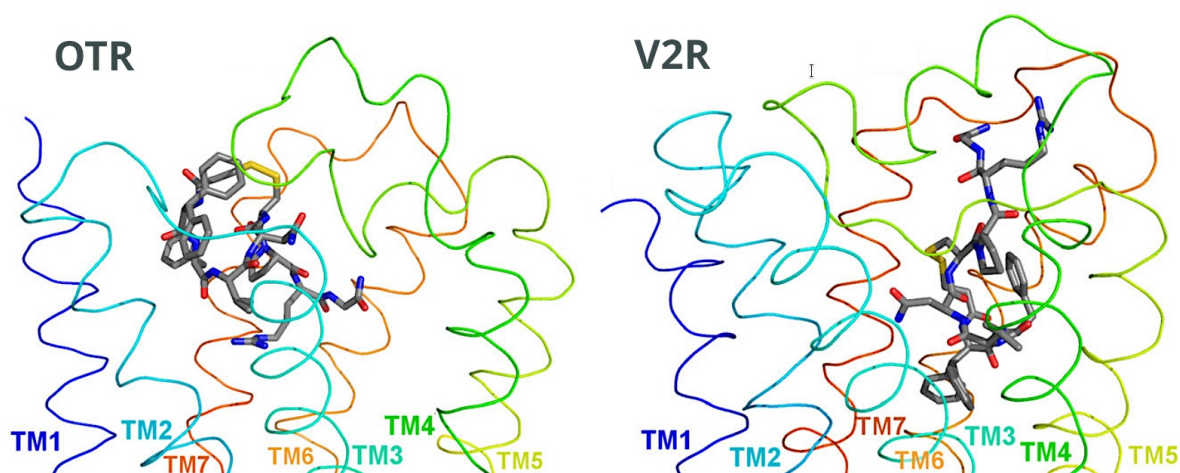
że podstawienie w pozycji 3 najczęściej skutkowało osłabieniem lub nawet zupełnym brakiem oddziaływania z receptorami. Wprowadzenie reszty Dpa do cząsteczki wazopresyny potencjalnie zwiększa szansę wystąpienia oddziaływań typu π - π z resztami aromatycznymi TM6 na dnie kieszeni wiążącej receptorów. Z drugiej strony, tak duża objętościowo reszta może silnie zaburzać prawidłowe dokowanie ligandów w kieszeni wiążącej receptorów. Badania aktywności biologicznej wykazały, że ligandy podstawione resztą Dpa w pozycji 2, podobnie jak analogi podstawione resztą Aic opisane w pracy **H3**, wykazywały działanie antagonistyczne w OTR i agonistyczne w V2R. Poza jednym ligandem, będącym słabym antagonistą, nie oddziaływały z V1aR (Tabela 4) [27].

Tabela 4. Aktywność biologiczna analogów wazopresyny badanych w pracy **H5**.

Ligand	OTR [pA ₂]	V1aR [pA ₂]	V2R [IU]
[Mpa ¹ ,Dpa ² ,Val ⁴ ,D-Arg ⁸]VP	0,24	0	100
[Mpa ¹ ,D-Dpa ² ,Val ⁴ ,D-Arg ⁸]VP	7,78	<5,8	9000
[D-Dpa ² ,D-Arg ⁸]VP	7,83	0	1000
[Mpa ¹ ,D-Dpa ²]AVP	7,80	0	4500

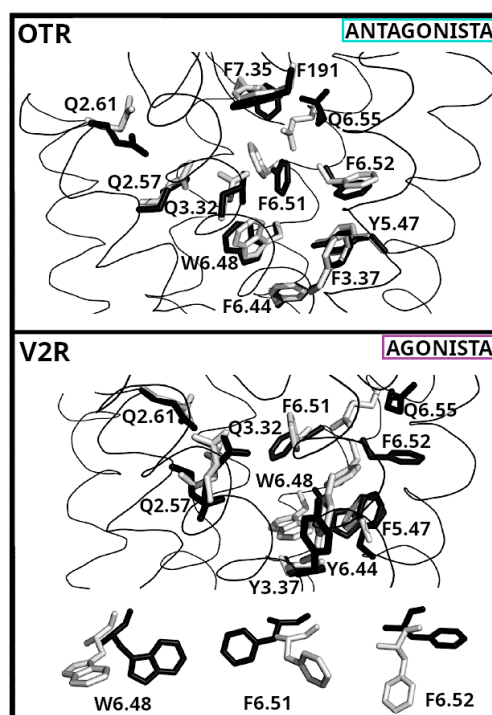
Modele receptorów oksytocyny i wazopresyny w pracy **H5** zbudowałam metodami modelowania homologicznego w oparciu o strukturę krystaliczną receptora β 2-adrenergicznego. Struktura ligandów oznaczona została z wykorzystaniem spektroskopii NMR i metod modelowania molekularnego [28(**P17**)]. Zasadniczy protokół obliczeniowy badania oddziaływań receptor-ligand był analogiczny jak w poprzednich pracach i obejmował dokowanie oraz optymalizację geometrii wybranych kompleksów. W pracy **H5** zastosowałam dokowanie giętkie - podczas dokowania ligandów, reszty aminokwasowe receptora obecne we wnętrzu kieszeni wiążącej mogły zmieniać swoją konformację, tak aby umożliwić jak najlepsze dopasowanie się do liganda.

Zadokowanie badanych ligandów do receptora V1a było wprawdzie możliwe, ale w uzyskanych kompleksach występowały bardzo nieliczne i słabe oddziaływania, a energie swobodne oddziaływań receptor-ligand były niekorzystnie wysokie. Analizując wyniki symulacji kompleksów z OTR i V2R, zauważyłam, że położenie ligandów w tych receptorach było różne. W receptorze V2 położenie ligandów było analogiczne jak ligandów badanych w pracy **H3**. N-koniec liganda zawierający reszty aromatyczne zanurzony był w głębi kieszeni wiążącej, natomiast polarna część C-końcowa z łańcuchem D-Arg/Arg⁸ skierowana była w stronę pętli zewnątrzkomórkowych (Rysunek 6).



Rysunek 6. Położenie liganda w kieszeni wiążącej OTR i V2R. Ligand: $[Mpa^1, D-Dpa^2, Val^4, D-Arg^3]VP$ [H5].

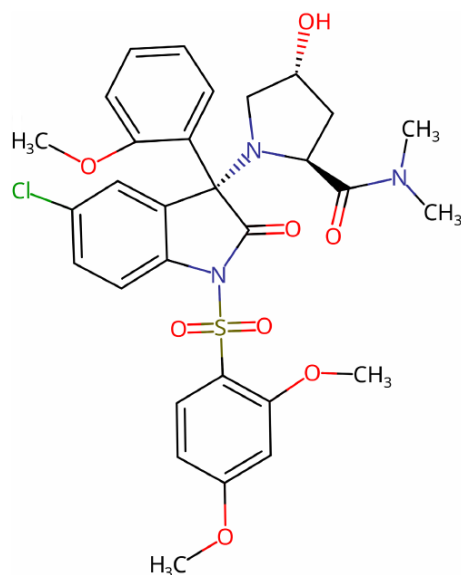
W przypadku receptora oksytocyny, cząsteczki ligandów przyjmowały zwiniętą konformację, były zadokowane płytko, a reszta D-Dpa²/Dpa² skierowana była w stronę domeny zewnątrzkomórkowej (Rysunek 6). Pomimo takiego położenia w kieszeni wiążącej, badane analogi tworzyły z receptorem oksytocyny stosunkowo silne oddziaływania, głównie poprzez wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe. Oddziaływania aromatyczne były słabe i nieliczne ze względu na nietypowe położenie reszt Dpa² i Phe³, i to właśnie brak kluczowych oddziaływań z resztami aromatycznymi helisy TM6 tłumaczy, dlaczego badane analogi nie wykazują w receptorze oksytocyny działania agonistycznego, lecz antagonistyczne. W przypadku receptora V2 obecne są wszystkie kluczowe punkty uchwytu receptor-ligand: wiązania wodorowe, oddziaływania polarne C-końca liganda z pętlami zewnątrzkomórkowymi oraz oddziaływania hydrofobowe i aromatyczne z resztami aromatycznymi helisy TM6. Podczas procesu dokowania, największe zmiany konformacyjne dotyczyły reszt aromatycznych helisy TM6: W284(6.48), F287(6.51) oraz F288(6.52) (Rysunek 7). Zmiany konformacyjne tych reszt są odpowiedzialne za inicjację procesu aktywacji receptora [29]. W przypadku receptora oksytocyny tak znaczące zmiany nie występowały,



Rysunek 7. Konformacja reszt receptora tworzących kieszeń wiążącą ligandów w OTR i V2R, przed (biały) i po (czarny) dokowaniu [H5].

gdyż aromatyczne reszty liganda nie lokowały się na dnie kieszeni wiążącej. Przeprowadzone symulacje pozwoliły mi zatem zaproponować wyjaśnienie, dlaczego badane ligandy wykazują inną aktywność względem V2R, niż OTR.

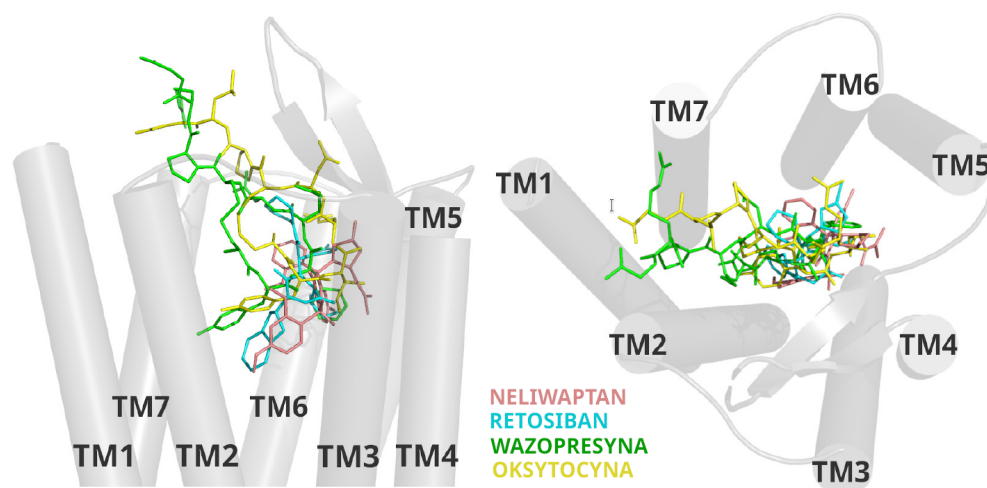
W pracy **H10** przedmiotem moich badań był receptor wazopresyny V1b, najslabiej dotąd opisany członek rodziny receptorów oksytocyny i wazopresyny, którego struktura eksperymentalna nie jest znana. V1bR pełni kluczową rolę w regulacji osi HPA. W ostatnich latach badania kliniczne pokazały, że nadmierne pobudzenie tej osi występuje u pacjentów z zaburzeniami psychicznymi, takimi jak depresja, zaburzenia lękowe, obsesyjno-kompulsyjne, czy też PTSD [30,31]. Normalizacja działania osi HPA poprzez zablokowanie receptora V1b może być metodą leczenia tych zaburzeń, a także uzależnienia od alkoholu [32,33]. W pracy **H10** moim celem było zbudowanie modelu V1bR oraz zaproponowanie mechanizmu jego oddziaływania z modelowym antagonistą. Do badań wybrałam neliwaptan (Rysunek 8), niepeptydowego antagonistę V1bR, który wykazuje również słaby antagonizm



Rysunek 8. Neliwaptan [H10].

względem OTR, ale nie oddziałuje z receptorami wazopresyny V1a i V2 [34]. Model receptora V1b zbudowałam metodami modelowania homologicznego w oparciu o strukturę krystaliczną receptora oksytocyny. Wcześniejszy model V1bR został opublikowany prawie 20 lat temu i był to model oparty na szablonie rodopsyny bydlęcej [35]. Zbudowany przeze mnie model V1bR poddałam długiej dynamice molekularnej w modelu błony lipidowej. Po zadokowaniu liganda do receptora przeprowadziłam sześć osobnych symulacji dynamiki molekularnej wybranych kompleksów receptor-ligand w modelu uwodnionej dwuwarstwy lipidowej. Całkowity czas symulacji wynosił 6 μ s. Wykonanie tak długich symulacji dla pełnoatomowych układów składających się z kilkudziesięciu tysięcy atomów stało się możliwe dzięki prowadzeniu obliczeń z użyciem jednostek GPU. Podczas analizy statystycznej oddziaływań receptor-ligand (analiza reszt oddziałujących, energii oddziaływania i wiązań wodorowych) połączone trajektorie były analizowane razem.

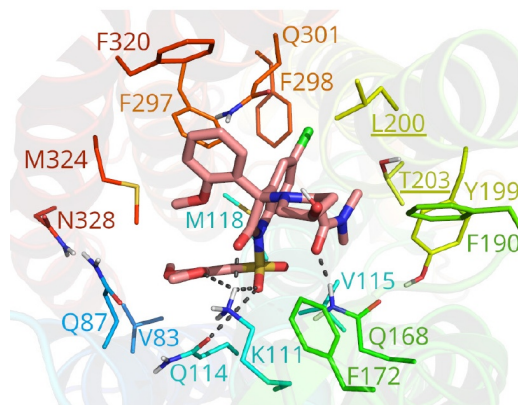
Analizując położenie neliwaptanu w kieszeni wiążącej zauważyłam, że jest ono bardzo podobne do położenia innych ligandów w strukturach eksperymentalnych OTR i V2R. Było to szczególnie widoczne w przypadku antagonistów: położenie retosibanu w strukturze krystalicznej OTR jest niemal identyczne jak położenie neliwaptanu w V1bR w kompleksie uzyskanym przeze mnie w pracy **H10** (Rysunek 9). Położenie neliwaptanu pokrywało się też częściowo z położeniem naturalnych agonistów, zajmujących niemal całą przestrzeń kieszeni wiążącej receptorów.



Rysunek 9. Porównanie położenia ligandów w kieszeni wiążącej receptorów [H10]. Kody kolorystyczne: neliwaptan: różowy, retosiban (6TPK): niebieski, wazopresyna (7BB6): zielony, oksytocyna (7RYC): żółty.

Szczegółowa analiza oddziaływań V1bR z neliwaptanem wskazała, że za oddziaływanie odpowiedzialne były głównie wiązania wodorowe z udziałem konserwatywnych reszt lizyny i glutaminy, takich jak K111(3.29), Q87(2.57), Q168(4.60), czy Q301(6.55). Wnosiły one największy wkład do energii oddziaływania receptor-ligand i stanowiły punkty kotwiczące ligand we wnętrzu receptora (Rysunek 10).

Dodatkowo do stabilizacji kompleksu przyczyniały się oddziaływania hydrofobowe i aromatyczne. Analizując oddziaływania V1bR z neliwaptanem, zwróciłam uwagę na niekonserwatywne reszty V1bR zaangażowane w wiązanie liganda. W oparciu o uzyskane wyniki oraz nieliczne dane eksperymentalne zaproponowałam, że reszty L200(5.39) oraz T203(5.42) mogą być odpowiedzialne za selektywne oddziaływanie neliwaptanu z V1bR.



Rysunek 10. Reszty V1bR tworzące kieszeń wiążącą neliwaptan [H10].

RECEPTORY OPIOIDOWE (H4, H7)

Oprócz receptorów oksytocyny i wazopresyny przedmiotem moich badań były receptory opioidowe (prace **H4** i **H7**). Receptory te również należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G i posiadają wszystkie ich charakterystyczne cechy strukturalne. Znane są trzy główne typy receptorów opioidowych: receptory δ , κ i μ . Blisko spokrewniony z nimi jest receptor nocycetyliny (NOP), który wykazuje wysokie podobieństwo sekwencyjne do receptorów opioidowych, ale inne właściwości farmakologiczne i obecnie nie jest uznawany przez IUPHAR za receptor opioidowy, a raczej "opioidopodobny" (ang. *opioid-related*) [36]. Receptory opioidowe podlegają ekspresji głównie w ośrodkowym układzie nerwowym: korze mózgowej, układzie limbicznym i pniu mózgu [37]. Występują także w licznych tkankach obwodowych, potwierdzono ich występowanie w skórze, przewodzie pokarmowym, sercu, czy nerkach. Większą gęstość receptorów opioidowych obserwuje się w tkankach zmienionych zapalnie [38].

Najważniejszą funkcją receptorów opioidowych jest działanie analgetyczne w wyniku pobudzenia przez agonistę. Endogennymi agonistami receptorów opioidowych są neuropeptydy: enkefaliny, endorfiny oraz dynorfiny pochodzące od białkowych prekursorów: proenkefaliny, proopiomelanokortyny lub prodynorfiny [39]. Ze względu na wysokie podobieństwo sekwencyjne receptorów opioidowych, endogenne ligandy opioidowe wprawdzie wiążą się chętniej z określonym typem receptora, jak na przykład enkefaliny z receptorem δ , czy dynorfiny z receptorem κ , lecz nie wykazują ścisłej selektywności [40]. Receptory opioidowe są również celem działania wielu leków przeciwbólowych, takich jak morfina, tramadol, oksykodon, fentanyl czy buprenorfina. Wskazaniem do ich stosowania są najczęściej bóle pourazowe, pooperacyjne i nowotworowe. Niektóre opioidy stosuje się także jako leki przeciwbiegunkowe (loperamid) i przeciwkaszlowe (kodeina). Ze względu na występowanie receptorów opioidowych w tkankach obwodowych, opioidy wykazują w mniejszym lub większym stopniu niepożądane efekty uboczne, takie jak nudności, zaparcia, świąd skóry, spadek ciśnienia tętniczego, czy depresja oddechowa [41]. Ponadto przy dłuższym ich stosowaniu rozwija się tolerancja oraz uzależnienie fizyczne i psychiczne. Uzależnienie od opioidów (ang. *Opioid Use Disorder, OUD*) wyraża się powstaniem przyzwyczajenia i nadużywaniem substancji uzależniającej, następnie rozwija się bardzo silne pragnienie jej zażywania i głód opioidowy, a w końcu następuje kompletne podporządkowanie życia zdobywaniu i zażywaniu opioidów. Efekty nadużywania opioidów możemy obecnie obserwować w Stanach Zjednoczonych, gdzie uzależnienie od opioidów osiągnęło taką skalę, że określa się je mianem epidemii

opiodowej, czy też kryzysem opiodowym. Istnieje zatem silna potrzeba poszukiwania substancji o silnym działaniu przeciwbólowym, ale o zredukowanych efektach ubocznych i przede wszystkim takiej, która nie wywołuje uzależnienia.

Jedną ze ścieżek projektowania nowych leków przeciwbólowych jest poszukiwanie substancji o wysokiej selektywności względem receptorów δ [42]. Pojawienie się uzależnienia oraz występowanie efektów ubocznych jest związane przede wszystkim z pobudzeniem receptorów μ i w mniejszym stopniu κ , podczas gdy selektywne pobudzenie receptorów δ wywołuje efekt analgetyczny bez uzależnienia [43,44]. Ponadto ich aktywacja jest związana z działaniem antydepresyjnym i przeciwłękowym, a przy tym nie zaburza funkcjonowania układu oddechowego [45]. Mają zatem korzystniejszy profil terapeutyczny. Receptory δ są również skuteczniejsze w uśmierzaniu bólu przewlekłego i zapalnego [45,46]. Jedynym poważnym efektem ubocznym pobudzenia receptorów δ jest możliwość występowania drgawek, którym można jednak skutecznie zapobiegać poprzez równoległe podawanie leków przeciwdrgawkowych [47]. W celu racjonalnego projektowania substancji o wysokiej selektywności względem receptorów δ , konieczne jest zrozumienie molekularnego mechanizmu wiązania ligandów przez te receptory. Taki cel postawiłam sobie w pracach **H4** i **H7**, w których zbadalam oddziaływanie 12 peptydów opiodowych z receptorami δ i μ (Tabela 5).

Tabela 5. Receptory opiodowe oraz ich ligandy badane w pracach **H4** i **H7**. Dab - kwas diaminobutanowy, Dap - kwas diaminopropanowy, Orn - ornityna, GlcA - kwas β -D-glukuronowy.

Receptory	Ligandy	Kody ligandów	Publ.
δ μ	c-(2-4)-Tyr-Lys-Phe-Dab-Val-Val-Gly-NH ₂	A	H4
	c-(2-4)-Tyr-Lys-Phe-Dap-Val-Val-Gly-NH ₂	B	
	c-(2-4)-Tyr-Orn-Phe-Dap-Val-Val-Gly-NH ₂	C	
	c-(2-4)-Tyr-Lys-Phe-Orn-Val-Val-Gly-NH ₂	D	
	c-(2-4)-Tyr-D-Orn-Phe-Orn-Val-Val-Gly-NH ₂	E	
	c-(2-4)-Tyr-Lys-Phe-Dab-NH ₂	a	
	c-(2-4)-Tyr-Lys-Phe-Dap-NH ₂	b	
	c-(2-4)-Tyr-Orn-Phe-Dap-NH ₂	c	
	c-(2-4)-Tyr-Lys-Phe-Orn-NH ₂	d	
	c-(2-4)-Tyr-D-Orn-Phe-Orn-NH ₂	e	
	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu		H7
	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-GlcA		

W pracy **H4** przedmiotem moich badań była analiza oddziaływań receptorów opioidowych δ i μ z dziesięcioma analogami deltorfin. Deltorfiny są klasą liniowych peptydów opioidowych wyizolowanych ze skóry żab należących do podrodziny *Phyllomedusinae*. Należą do niej m.in. deltorfina I (Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH₂) i deltorfina II (Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂). Peptydy te wykazują wysoką selektywność względem receptorów δ . Cechą charakterystyczną naturalnych deltorfin jest występowanie w pozycji drugiej aminokwasu o konfiguracji D. Badane ligandy to cykliczne deltorfiny zawierające w swej cząsteczce mostek utworzony przez ugrupowanie mocznikowe spinające łańcuchy boczne aminokwasów zasadowych podstawionych w pozycji 2 i 4 (oznaczone jako ligandy A-E w Tabeli 5) oraz ich tetrapeptydowe analogi (oznaczone jako ligandy a-e w Tabeli 5). Badane ligandy w testach GPI i MVD wykazywały zróżnicowaną aktywność biologiczną (Tabela 6) [48].

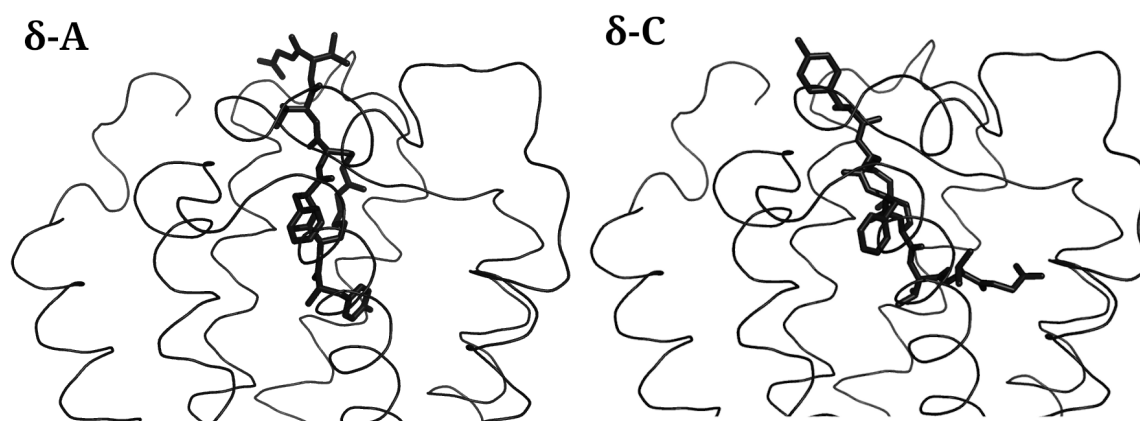
Tabela 6. Aktywność biologiczna badanych analogów deltorfin. Testy GPI (ang. Guinea pig ileum) - testy wykonywane na wycinkach jelita cienkiego kawii domowej (dla receptorów μ); testy MVD (ang. Mouse vas deferens) - testy wykonywane na izolowanych nasieniowodach myszy (dla receptorów δ) [H4].

Ligand	Kod	GPI IC ₅₀ (nM)	MVD IC ₅₀ (nM)	GPI/MVD
c-(2-4)-Tyr-Lys-Phe-Dab-Val-Val-Gly-NH ₂	A	65,4 ± 9,6	0,640 ± 0,043	102
c-(2-4)-Tyr-Lys-Phe-Dap-Val-Val-Gly-NH ₂	B	25,4 ± 2,0	0,483 ± 0,065	52,6
c-(2-4)-Tyr-Orn-Phe-Dap-Val-Val-Gly-NH ₂	C	> 10000	27,1 ± 3,1	> 369
c-(2-4)-Tyr-Lys-Phe-Orn-Val-Val-Gly-NH ₂	D	> 10000	67,0 ± 6,9	> 149
c-(2-4)-Tyr-D-Orn-Phe-Orn-Val-Val-Gly-NH ₂	E	159 ± 23	0,814 ± 0,054	88
c-(2-4)-Tyr-Lys-Phe-Dab-NH ₂	a	1,17 ± 0,25	5,02 ± 1,39	4,29
c-(2-4)-Tyr-Lys-Phe-Dap-NH ₂	b	4,15 ± 0,36	19,5 ± 2,3	4,70
c-(2-4)-Tyr-Orn-Phe-Dap-NH ₂	c	3,37 ± 0,09	7,76 ± 1,27	2,30
c-(2-4)-Tyr-Lys-Phe-Orn-NH ₂	d	15,6 ± 1,6	47,1 ± 3,5	3,01
c-(2-4)-Tyr-D-Orn-Phe-Orn-NH ₂	e	4,77 ± 0,71	11,4 ± 1,5	2,39

Modele receptorów opioidowych δ i μ zostały zbudowane metodami modelowania homologicznego w oparciu o strukturę krystaliczną receptora β 2-adrenergicznego, natomiast struktura ligandów oznaczona została z wykorzystaniem spektroskopii NMR i metod modelowania molekularnego [48]. Podobnie jak w pracach **H1-H3** i **H5**, w pracy **H4** protokół symulacyjny polegał na zadokowaniu ligandów do receptorów oraz optymalizacji geometrii wybranych kompleksów o najniższej energii swobodnej oddziaływania.

Analizując wyniki przeprowadzonych badań, zaobserwowałam, że w przypadku tetrapeptydowych ligandów, wartości energii swobodnej oddziaływania receptor-ligand były

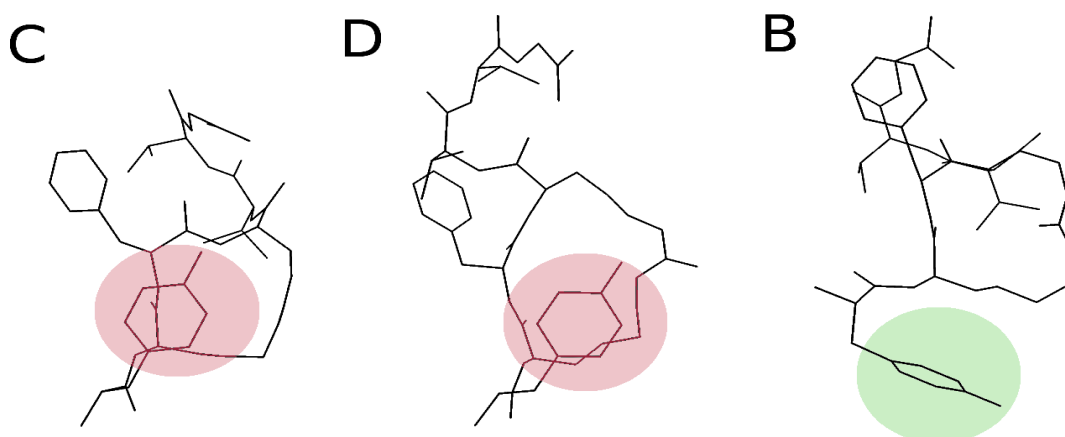
niskie i nie różniły się znacząco dla obu badanych receptorów, co zgadza się z wynikami badań aktywności biologicznej (Tabela 6). W przypadku kompleksów z heptapeptydowymi ligandami wartości energii swobodnej oddziaływania były wyższe i zróżnicowane. Najlepsza zgodność obliczonych wartości energii z testami MVD występowała dla kompleksów receptora δ z ligandami heptapeptydowymi A, B i E. Dla tych trzech kompleksów o najwyższej aktywności biologicznej wartości energii swobodnej oddziaływania były najniższe. Obok wartości energii, kolejnym analizowanym czynnikiem, który pozwolił mi ocenić stabilność kompleksów, było położenie (orientacja) liganda w kieszeni wiążącej, podobnie jak w przypadku receptorów wazopresyny i oksytocyny (**H1-H3**, **H5**). W receptorze δ , analogi o wyższej aktywności biologicznej były zadokowane w taki sposób, że N-terminalna grupa aminowa oraz pierścienie aromatyczne Tyr¹ i Phe³ były zanurzone w głębi kieszeni receptora. Analogi heptapeptydowe A, B i E o najwyższej aktywności biologicznej przyjmowały w receptorze δ rozciągniętą konformację, a ich C-koniec oddziaływał z pętlami zewnątrzkomórkowymi (Rysunek 11). Ligandy d, C i D o niższej



Rysunek 11. Położenie analogów deltorfiny w receptorze δ . Po lewej: położenie "aktywne" liganda; po prawej położenie "nieaktywne" [**H4**].

aktywności biologicznej były położone odwrotnie, co uniemożliwiało ich prawidłowe dopasowanie do kieszeni wiążącej receptora i utworzenie z nim stabilnych oddziaływań (Rysunek 11). W receptorze μ analog d o niższej aktywności biologicznej także ułożony był C-końcem w głębi kieszeni wiążącej, a położenie pozostałych tetrapeptydów o wyższej aktywności biologicznej było prawidłowe (N-końcówka zadokowana w głębi receptora). Analogi heptapeptydowe wykazujące niższą aktywność biologiczną w receptorze μ przyjmowały w tym receptorze zwiniętą konformację i wszystkie były w całości zanurzone w kieszeni wiążącej receptora. Zaobserwowałam, że położenie ligandów aktywnych biologicznie było zgodne z koncepcją "wiadomość-adres" (ang. *message-address*), według której N-końcówka

fragment liganda opioidowego - głównie grupa aminowa i łańcuch boczny Tyr¹ (tzw. tyramina) - odpowiadają za przekazywanie sygnału (wiadomości). Zatem prawidłowe położenie N-końca ligandów w kieszeni wiążącej jest kluczowe dla oddziaływania z receptorami opioidowymi i ich aktywacji [49]. Pozostała część cząsteczki liganda (adres) odpowiada za jego selektywne wiązanie do określonego typu receptora opioidowego [50]. Zgodnie z moimi obserwacjami koncepcja ta sprawdziła się również dla większości kompleksów receptor-ligand opisanych w pracy **H4**. Zaproponowałam również wyjaśnienie, dlaczego analogi C i D wykazują najniższą aktywność biologiczną. Przed dokowaniem, w strukturze tych dwóch ligandów, pierścień aromatyczny Tyr¹ był położony ponad płaszczyznę pierścienia makrocyklicznego liganda (Rysunek 12). Taka konformacja utrudniała poprawne zadokowanie ligandów C i D do receptorów w taki sposób, aby tyramina zanurzona w głębi miejsca wiążącego receptora mogła prawidłowo oddziaływać z receptorem, co warunkuje jego aktywację i przekazanie sygnału. W przypadku innych ligandów, wykazujących wyższą aktywność w testach GPI i MVD (jak ligand B), tyramina była wyeksponowana na zewnątrz cząsteczki (Rysunek 12).

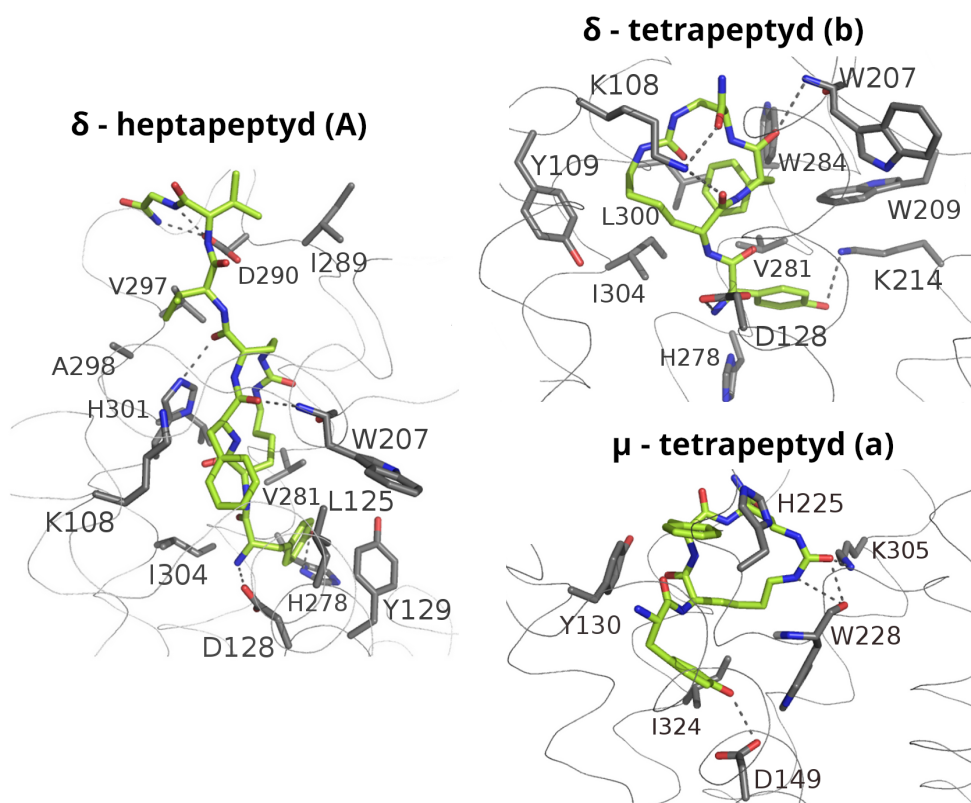


Rysunek 12. Konformacja ligandów C, D i B [H4].

Kolejnym wynikiem badań przeprowadzonych w pracy **H4** była identyfikacja reszt aminokwasowych receptora δ i μ zaangażowanych w wiązanie badanych ligandów. Zauważyłam, że kieszenie wiążące badane ligandy tylko częściowo się pokrywają. Biorąc pod uwagę liczbę i siłę oddziaływań receptor-ligand oraz dostępne dane eksperymentalne, zaproponowałam najbardziej prawdopodobny sposób wiązania tetrapeptydów w receptorze δ oraz μ , a także heptapeptydów w receptorze δ (Rysunek 13).

Najważniejszym oddziaływaniem zaobserwowanym przeze mnie w tych kompleksach był mostek solny pomiędzy grupą aminową Tyr¹ a kwasem asparaginowym z helisy TM3

D128/149(3.32) (Rysunek 13). To oddziaływanie warunkuje aktywność biologiczną badanych ligandów. Innymi ważnymi oddziaływaniami były wiązania wodorowe z resztami lizyny K108(2.63) i K214(5.39) w receptorze δ oraz z K305(6.58) w receptorze μ . W wiązaniu ligandów uczestniczyły także reszty histydyny oraz reszty aromatyczne i hydrofobowe (Rysunek 13).



Rysunek 13. Kompleksy receptor-ligand ilustrujące różne sposoby wiązania opioidów badanych w pracy **H4**.

Dla kompleksów heptapeptydów z receptorem μ nie zaobserwowałam żadnego preferowanego sposobu oddziaływania. Ze względu na zwiniętą konformację w receptorze μ , oddziaływania heptapeptydów w kompleksach z receptorem μ były słabsze niż w kompleksach z receptorem δ . Były też niespecyficzne ze względu na różną orientację heptapeptydów w kieszeni wiążącej receptora. W żadnym z kompleksów z receptorem μ nie występował mostek solny pomiędzy tyraminą a D149(3.32), co wyjaśnia, dlaczego aktywność biologiczna heptapeptydów w testach GPI była bardzo słaba. W receptorze δ to oddziaływanie zawsze występuje, ponadto rozciągnięta konformacja heptapeptydów wewnątrz kieszeni wiążącej (Rysunek 13) umożliwia oddziaływanie C-końca ligandów (części "adresowej") z pętlami zewnątrzkomórkowymi, warunkując selektywne wiązanie heptapeptydów w receptorze δ .

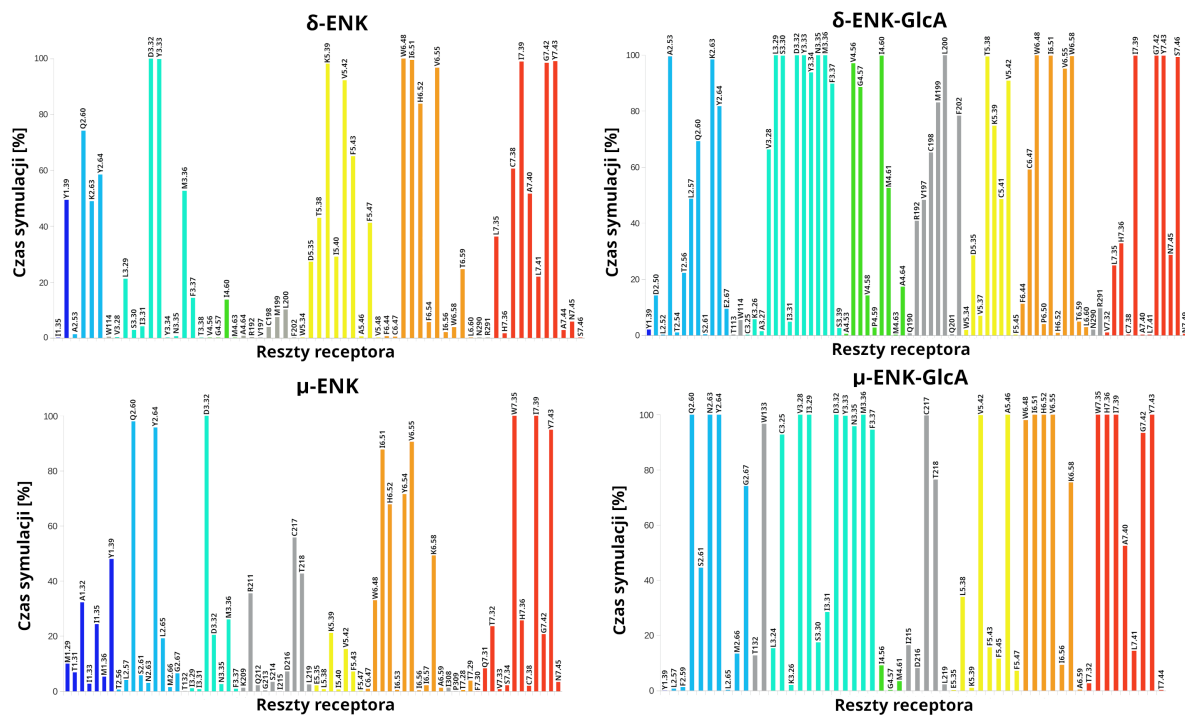
Praca **H7** była kontynuacją badań mechanizmu specyficzności wiązania ligandów przez receptory opioidowe δ . Przedmiotem badań były Leu⁵-enkefalina (Leu⁵-ENK), endogenne

ligand opioidowy selektywny względem receptora δ , oraz zmodyfikowana Leu⁵-enkefalina zawierająca w cząsteczce kwas β -D-glukuronowy (Leu⁵-ENK-GlcA) (Tabela 5). Dołączenie do cząsteczki Leu⁵-enkefaliny ugrupowania cukrowego powoduje wzrost aktywności peptydu w testach GPI i MVD, ale w sposób niesymetryczny, co powoduje, że Leu⁵-ENK-GlcA wykazuje jeszcze wyższą selektywność względem receptorów δ niż Leu⁵-ENK [51]. Obecność fragmentu cukrowego w cząsteczce peptydu zwiększa jego zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg [52], co może być przyczyną wyższej aktywności biologicznej Leu⁵-ENK-GlcA w obu testach, ale nie wyjaśnia, dlaczego efekt ten jest silniejszy w przypadku receptorów δ . Badania opisane w pracy **H7** miały na celu sprawdzenie jak modyfikacja cząsteczki Leu⁵-enkefaliny wpływa na oddziaływanie z receptorami i czy powoduje podwyższenie selektywności względem receptora δ .

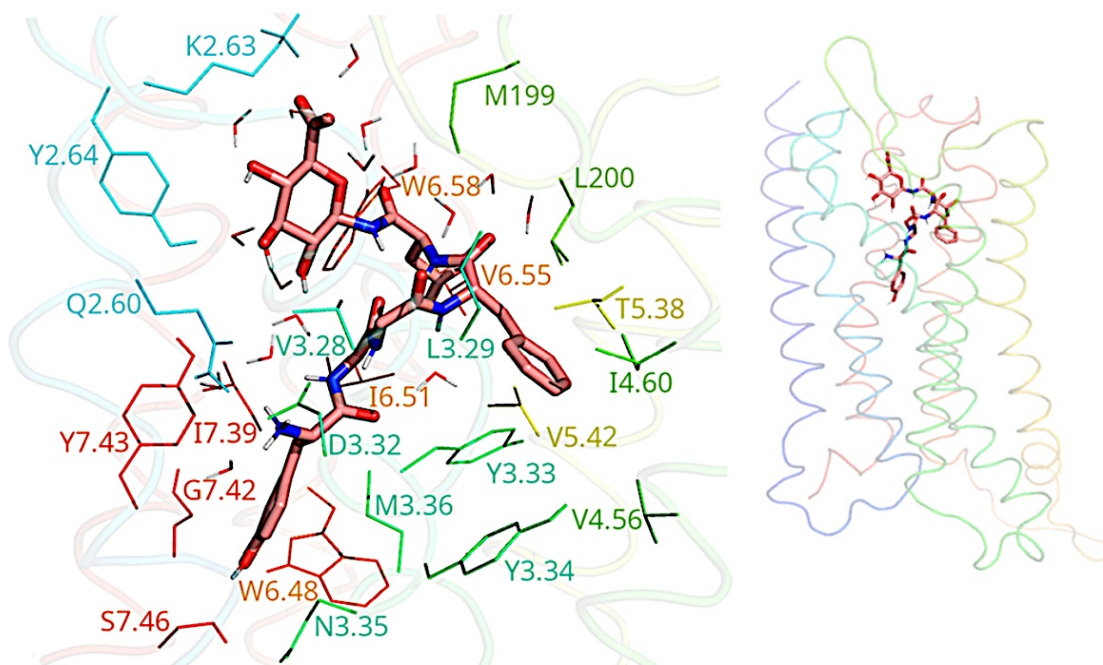
Do przeprowadzenia symulacji wykorzystałam struktury krystaliczne receptorów opioidowych, a struktury Leu⁵-ENK oraz Leu⁵-ENK-GlcA wymodelowałam *de novo*. Po wykonaniu minimalizacji energii oraz dynamiki molekularnej, do dokowania wybrałam struktury reprezentatywne z najliczniejszych klastrów. Po wykonaniu dokowania cztery wybrane kompleksy o najniższej energii swobodnej oddziaływania receptor-ligand zostały poddane dynamice molekularnej w modelu uwodnionej błony lipidowej.

Podczas symulacji, w każdym z czterech kompleksów badanych w pracy **H7**, ogólne położenie ligandów było zgodne z koncepcją *message-address*: N-koniec liganda był zadokowany w głębi kieszeni wiążącej, a C-koniec był skierowany w stronę domeny zewnątrzkomórkowej. Cząsteczka Leu⁵-ENK-GlcA była zadokowana nieco głębiej. Grupa aminowa Tyr¹ w każdym z kompleksów tworzyła mostek solny z kwasem asparaginowym D128/149(3.32). To oddziaływanie silnie kotwiczyło N-koniec ligandów wewnątrz kieszeni wiążącej receptora. W obu badanych receptorach widoczne było wyraźne zagęszczenie oddziaływań z Leu⁵-ENK-GlcA w porównaniu z Leu⁵-ENK, były też one trwalsze (Rysunek 14).

Efekt ten był najbardziej widoczny dla Leu⁵-ENK-GlcA w kompleksie z receptorem δ , gdzie obecnych było najwięcej silnych i trwałych oddziaływań. Ponadto reszty oddziałujące z ligandem były równomiernie rozmieszczone w całej kieszeni wiążącej receptora (Rysunek 15), co dodatkowo zwiększało stabilność kompleksu receptor-ligand, a położenie i konformacja liganda w czasie dynamiki molekularnej prawie się nie zmieniały. Wartość energii swobodnej oddziaływania receptor-ligand dla tego kompleksu była najniższa (najbardziej korzystna).



Rysunek 14. Reszty receptorów oddziałujące z Leu^5 -ENK i Leu^5 -ENK-GlcA podczas symulacji [H7].



Rysunek 15. Kompleks receptora δ z Leu^5 -ENK-GlcA [H7].

Mostek solny pomiędzy N-końcową grupą aminową a kwasem asparaginowym D128/149(3.32) wnosił największy wkład do energii swobodnej oddziaływania receptor-ligand we wszystkich badanych kompleksach. Kolejny mostek solny występował pomiędzy C-końcem liganda a resztami lizyny/argininy: K214(5.39), K108(2.63) i R192(ECL2) w receptorze δ oraz K305(6.58) i R211(ECL2) w receptorze μ . Sieć wiązań wodorowych była najgęstsza i najsilniejsza w kompleksie Leu⁵-ENK-GlcA z receptorem δ i tylko w tym kompleksie występowały wiązania wodorowe z W274(6.48), N131(3.35) i S311(7.46). Oddziaływania aromatyczne/hydrofobowe wносиły większy wkład do oddziaływania receptor-ligand w kompleksach obu receptorów z Leu⁵-ENK-GlcA niż z Leu⁵-ENK.

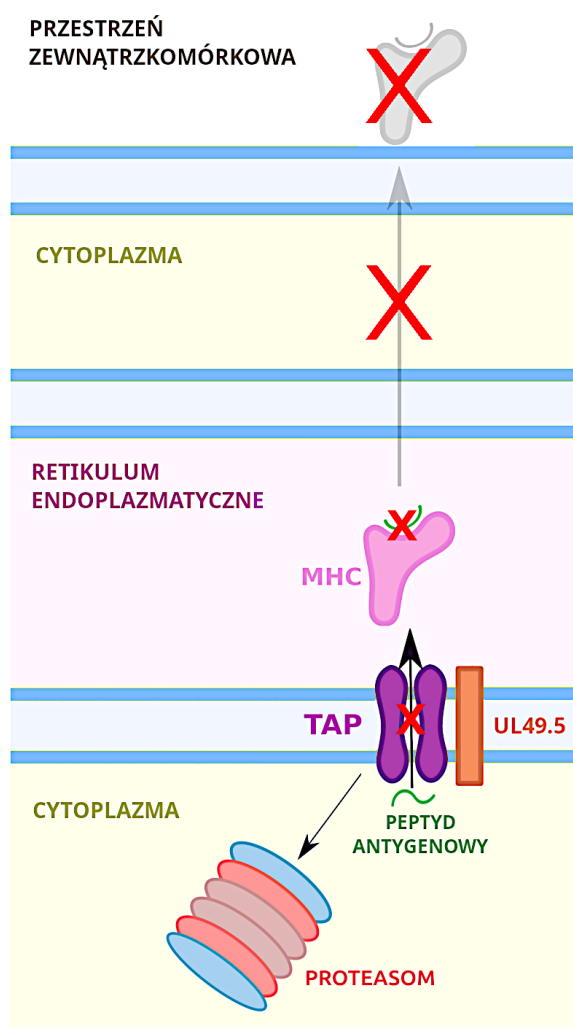
Na podstawie przeprowadzonych symulacji mogłam wykazać, że obecność ugrupowania cukrowego w cząsteczce enkefalin wzmacnia oddziaływanie z receptorami opioidowymi, a szczególnie z receptorem δ . Zaproponowałam także, że za selektywność wiązania Leu⁵-ENK-GlcA odpowiedzialne są niekonserwatywne reszty lizyny, K108(2.63) w receptorze δ i K305(6.58) w receptorze μ .

BIAŁKO WIRUSOWE UL49.5 (H6, H8-H9)

Białko UL49.5 bydłęcego herpeswirusa (BoHV-1) jest 96-aminokwasowym integralnym białkiem błonowym, składającym się z N-końcowej domeny luminalnej, domeny transmembranowej oraz C-końcowej domeny cytoplazmatycznej. Białko to nie ulega glikozylacji podczas modyfikacji potranslacyjnych w przeciwieństwie do homologicznych glikoprotein gN u innych przedstawicieli rodziny *Herpesviridae*. Białka UL49.5/gN mogą występować w postaci monomeru, homodimeru lub heterodimeru z wirusową glikoproteiną M (gM) [53].

Herpeswirusy są patogenami infekującymi wiele gatunków kręgowców, w tym człowieka. BoHV-1, należący do rodzaju *Varicellovirus* jest czynnikiem etiologicznym zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy u bydła (ang. *Infectious Bovine Rhinotracheitis, IBR*), może również wywoływać zapalenie spojówek, stany zapalne błony śluzowej narządów rozrodczych, poronienia oraz uogólnione zakażenia u cieląt [54, 55]. Do wirusów z rodziny *Herpesviridae* będących patogenami człowieka, należą między innymi wirusy: opryszczki (HSV-1 i HSV-2), ospy wietrznej (VZV), cytomegalii (CMV), czy wirus Epsteina-Barr (EBV) wywołujący mononukleozę [56].

Herpeswirusy potrafią unikać odpowiedzi immunologicznej ze strony układu odpornościowego gospodarza i mogą pozostawać w jego organizmie w stanie latencji [57]. Jedną ze strategii immunomodulacyjnych herpeswirusów jest zaburzenie procesu prezentacji antygenów na powierzchni komórki przez białka głównego układu zgodności tkankowej klasy I (MHC-I) [58]. Białko UL49.5 BoHV-1 jest elementem kluczowym tego procesu, ponieważ wykazuje zdolność do hamowania transportera związanego z prezentacją antygenów (ang. *Transporter associated with Antigen Processing*, TAP). TAP jest białkiem błonowym, heterodimerem złożonym z dwóch podjednostek, TAP1 i TAP2. UL49.5 oddziałuje z domeną transmembranową TAP i blokuje transport peptydów antygenowych wirusa z cytoplazmy do retikulum endoplazmatycznego (Rysunek 16). Kompleksy z białkami MHC-I nie powstają, a ponieważ nie występuje prezentacja antygenów na powierzchni komórki, nie może być ona rozpoznawana i niszczona przez limfocyty T cytotoksyczne. UL49.5 nie tylko hamuje transport peptydów antygenowych poprzez oddziaływanie z TAP,



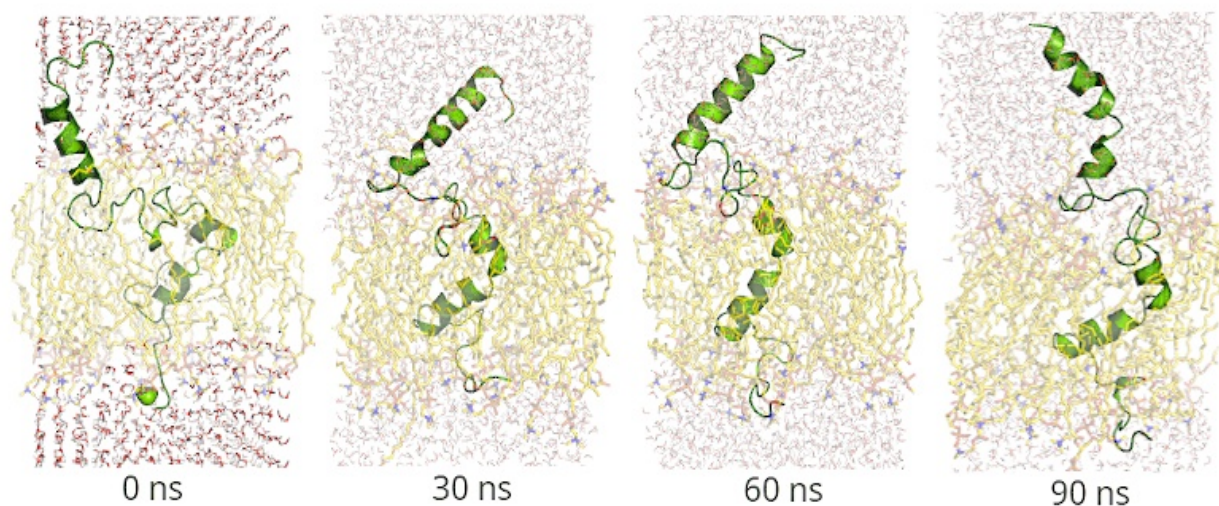
Rysunek 16. Schemat działania białek UL49.5 podczas infekcji wirusami z rodzaju *Varicellovirus*.

ale może też kierować TAP do degradacji proteasomalnej (Rysunek 16) [59]. Zdolność do inhibicji TAP posiadają również homologiczne białka UL49.5 innych wirusów z rodzaju *Varicellovirus* [60]. BoHV-1 jest blisko spokrewniony z ludzkimi wirusami HSV-1 i VZV należącymi do rodzaju *Varicellovirus*, dzięki czemu białko UL49.5 bydlęcego wirusa może być doskonałym modelem do badania mechanizmów modulacji odpowiedzi immunologicznej także ludzkich herpeswirusów. Badania UL49.5 opisane w pracach H6, H8 i H9 umożliwiają poznanie molekularnego mechanizmu działania UL49.5 i opracowanie nowych strategii leczenia i/lub zapobiegania zakażeniom herpeswirusowym, które są poważnym problemem zarówno dla człowieka, jak i zwierząt. Ponadto badania te mogą przyczynić się do rozwoju nowych

terapii przeciwnowotworowych, ponieważ BoHV-1 jest wirusem onkolitycznym, który potrafi selektywnie infekować ludzkie komórki nowotworowe.

Ponieważ struktura eksperymentalna UL49.5 nie była wcześniej znana, pierwszy etap badań, opisany w pracy **H6**, skupiał się na uzyskaniu struktury tego białka. Badania były wykonywane w dużym zespole i obejmowały badania eksperymentalne oraz modelowanie molekularne. Podczas badań eksperymentalnych wykonana została synteza dwóch fragmentów białka UL49.5: fragmentu luminalnego oraz transbłonowo-cytoplazmatycznego, a następnie badania strukturalne tych dwóch peptydów. Otrzymane z badań eksperymentalnych struktury obu peptydów połączyłam ze sobą, aby otrzymać ciągłą sekwencję białka. Wykorzystując dostępne dane literaturowe sugerujące prawdopodobne położenie UL49.5 w błonie lipidowej oraz dokładnie analizując sekwencję aminokwasową białka (charakter hydrofilowy/hydrofobowy), określiłam optymalne położenie białka w błonie. Tak przygotowaną strukturę białka w modelu uwodnionej błony POPC poddałam symulacji dynamiki molekularnej. W pierwszej części symulacji zastosowałam więzy harmoniczne nałożone na kąty ϕ i ψ helis, tak aby utrzymać wartości kątów oznaczonych w badaniach NMR. W pozostałej części symulację prowadziłam bez więzów.

Wynikiem badań przeprowadzonych w pracy **H6** było uzyskanie po raz pierwszy struktury białka UL49.5 BoHV-1. Dzięki zastosowaniu dynamiki molekularnej możliwe było zaobserwowanie zachowania białka i zmian jego struktury w czasie symulacji (Rysunek 17).

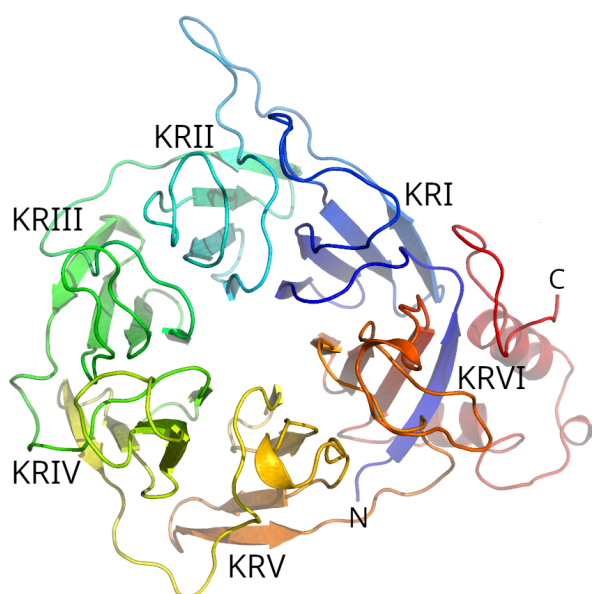


Rysunek 17. Struktura białka UL49.5 w czasie symulacji dynamiki molekularnej w modelu błony lipidowej [**H6**].

Struktura końcowa UL49.5 uzyskana w wyniku symulacji w modelu błony lipidowej składała się z trzech fragmentów helikalnych: N-końcowej helisy w domenie luminalnej oraz dwóch mniejszych fragmentów helikalnych w domenie transmembranowej połączonych

krótką pętlą zawierającą β -zgięcie. Na pograniczu domen luminalnej i transmembranowej, helisy połączone były 20-aminokwasowym fragmentem pętli zawierającym dwa β -zgięcia tworzone z udziałem reszt proliny. Pętla ta tworzy zawias (ang. *hinge*), umożliwiającą zmianę położenia fragmentów helikalnych (luminalnego i transbłonowego) względem siebie podczas symulacji. Analiza ruchliwości poszczególnych fragmentów białka (*Root Mean Square Fluctuations, RMSF*) wykazała, że znaczące zmiany położenia były widoczne dla zanurzonej w środowisku wodnym helisy luminalnej, natomiast region transmembranowy był bardziej stabilny. Obecność pętli i licznych zgięć w strukturze białka UL49.5 warunkuje jego fleksybilność, co jest kluczowe dla prawidłowego dopasowania się do białek błonowych, z którymi oddziałuje w komórce: TAP i gM. Dzięki uzyskaniu struktury UL49.5 w pracy **H6** zaproponowane zostały po raz pierwszy prawdopodobne struktury kompleksu UL49.5 z TAP.

Uzyskana struktura UL49.5 stała się punktem wyjściowym kolejnych badań opisanych w pracach **H8** i **H9**. Badania przeprowadzone we współpracy z Uniwersytetem Stanforda opisane w pracy **P39** wykazały, że białko UL49.5 poprzez oddziaływanie z TAP kieruje je

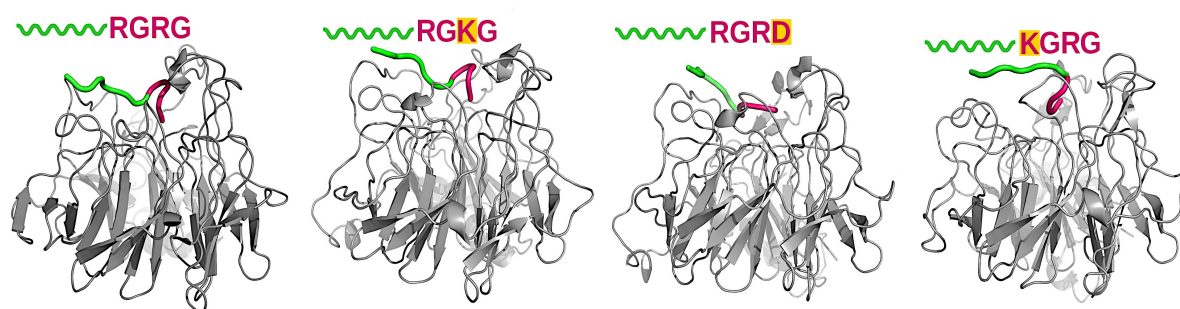


Rysunek 18. Struktura białka KLHDC3 [**H8**].

do degradacji proteasomalnej, wykorzystując ligazę ubikwityny E3 (ang. *Cullin2-RING E3 ubiquitin ligase*) [⁶¹]. Pierwszym, kluczowym etapem tego procesu jest rozpoznanie C-końcowego, cytozolowego fragmentu UL49.5 przez białko KLHDC3 (ang. *Kelch domain-containing protein 3*). Struktura KLHDC3 jest bardzo charakterystyczna, zawiera sześć domen typu kelch (KRI - KRVI) układających się w strukturę β -śmigła (Rysunek 18). Każda z łopatek śmigła złożona jest z czterech antyrównoległych nici β .

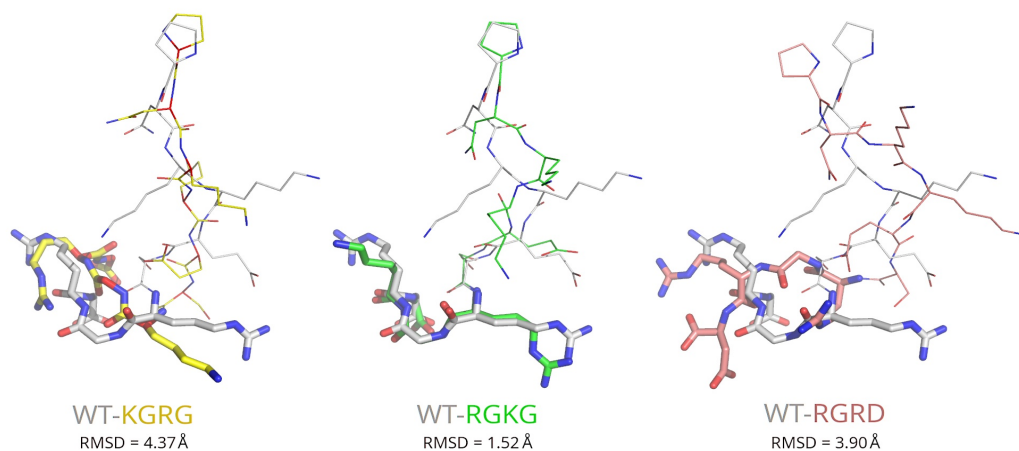
KLHDC3 rozpoznaje i wiąże substraty CRL2 poprzez oddziaływanie z krótkimi fragmentami C-terminalnymi białek, tak zwanymi degronami. Badania mutagenety ujawniły, że mutacje w C-końcowej sekwencji ⁹³RGRG⁹⁶ UL49.5 mają silny wpływ na wiązanie UL49.5 do KLHDC3 i degradację TAP. Mutacje G96D oraz R93K upośledzają oddziaływanie UL49.5 z KLHDC3 i w konsekwencji degradacja TAP nie następuje, natomiast mutacja R95K nie ma negatywnego wpływu na to oddziaływanie [⁶¹(**P39**)].

Aby wyjaśnić, dlaczego występują tak wyraźne różnice w oddziaływaniu, w pracy **H8** przeprowadziłam modelowanie molekularne kompleksów KLHDC3 z C-terminalnymi deka-peptydami białka UL49.5 typu dzikiego oraz jego mutantów: G96D, R93K oraz R95K. Ponieważ struktura eksperymentalna KLHDC3 nie jest znana, w badaniach użyłam modelu KLHDC3 pobranego z bazy AlphaFold [62]. Struktura ta była bardzo niestabilna i rozplatała się podczas próbnym symulacji dynamiki molekularnej. Konieczne było jej zoptymalizowanie, co uzyskałam poprzez wykonanie symulacji ze stopniowym rozluźnianiem więzów nałożonych na kąty ϕ i ψ , aż do swobodnej symulacji bez więzów. Strukturę deka-peptydu UL49.5 typu dzikiego utworzyłam poprzez wycięcie C-terminalnego fragmentu deka-peptydowego ze struktury UL49.5 uzyskanego podczas wcześniejszych badań, a struktury mutantów powstały poprzez wykonanie odpowiednich substytucji (G96D, R93K oraz R95K). Protokół symulacyjny w pracy **H8** obejmował dokowanie oraz dynamikę molekularną kompleksów KLHDC3-UL49.5. Do badań zastosowałam fragmenty deka-peptydowe UL49.5, ponieważ podczas próbnego dokowania samego degronu (tetrapeptydu) okazało się, że jest to zbyt krótki fragment, który dokuje się do KLHDC3 dość chaotycznie i w złej orientacji (część degronów układała się N-końcem do wnętrza białka), zatem nie był to wystarczająco dobry model UL49.5 aby móc wiarygodnie ocenić jego oddziaływanie z KLHDC3. W przypadku dokowania fragmentów deka-peptydowych ich długość była wystarczająca do zachowania stabilnej pozycji na powierzchni KLHDC3, a ich orientacja podczas dokowania była prawidłowa, z C-końcem skierowanym do wnętrza KLHDC3. Ponieważ żadna struktura kompleksu KLHDC3 z białkami nie jest znana, wiadomo tylko, że degrony wiązane są na górnej powierzchni białek KLHDC, miejsce potencjalnego dokowania obejmowało całą górną powierzchnię białka wraz z pętlami. Po przeprowadzeniu dokowania wszystkie cztery kompleksy zostały poddane dynamice molekularnej. W wyniku przeprowadzonych symulacji uzyskałam struktury czterech kompleksów KLHDC3 z UL49.5 typu dzikiego oraz trzema mutantami (Rysunek 19).



Rysunek 19 Położenie badanych decapeptydów na powierzchni białka KLHDC3. Kolorem żółtym zaznaczono zmutowane reszty aminokwasowe [H8].

Analiza wyników symulacji pozwoliła mi zaproponować wyjaśnienie różnic w aktywności UL49.5 i jego mutantów zaobserwowanych podczas badań eksperymentalnych [61]. Miejsce zadokowania wszystkich decapeptydów na powierzchni białka było podobne, natomiast konformacja degronów różniła się. Położenie i konformacja degronu UL49.5 typu dzikiego (RGRG) oraz mutantu R95K (RGKG) były niemal identyczne, z C-terminalną resztą G⁹⁶ zanurzoną głęboko w centralnej wnęce na powierzchni KLHDC3[‡]. Degrony pozostałych dwóch mutantów: G96D (RGRD) oraz R93K (KGRG) położone były nieco płycej, a reszta G⁹⁶ nie była skierowana do wnętrza białka KLHDC3 (Rysunek 19). Struktury RGRD oraz KGRG były też zdecydowanie mniej stabilne, policzone dla nich wartości RMSD podczas symulacji były wyższe niż dla degronu UL49.5 typu dzikiego oraz mutantu RGKG. Nałożenie struktur badanych decapeptydów po symulacji ujawniło, że mutant KGRG, który oddziałuje z KLHDC3, przyjmował konformację bardzo podobną do konformacji degronu UL49.5 typu dzikiego, natomiast struktury dwóch pozostałych mutantów znacząco się od niej różniły (Rysunek 20). Jest to najważniejsze odkrycie będące wynikiem badań opisanych w pracy H8,



Rysunek 20. Nałożenie struktur decapeptydów po symulacji [H8].

[‡] Numery reszt UL49.5 pisane są w indeksie górnym dla odróżnienia ich od reszt KLHDC3.

pokazujące, że zdolność UL49.5 do oddziaływania z KLHDC3 jest ściśle skorelowana z konformacją degronu, którą przyjmuje podczas oddziaływania z tym białkiem. Mutant R95K zachowuje konformację degronu UL49.5 typu dzikiego, zatem może przyjąć podobne jak on położenie w miejscu wiążącym KLHDC3 i podobnie z nim oddziaływać.

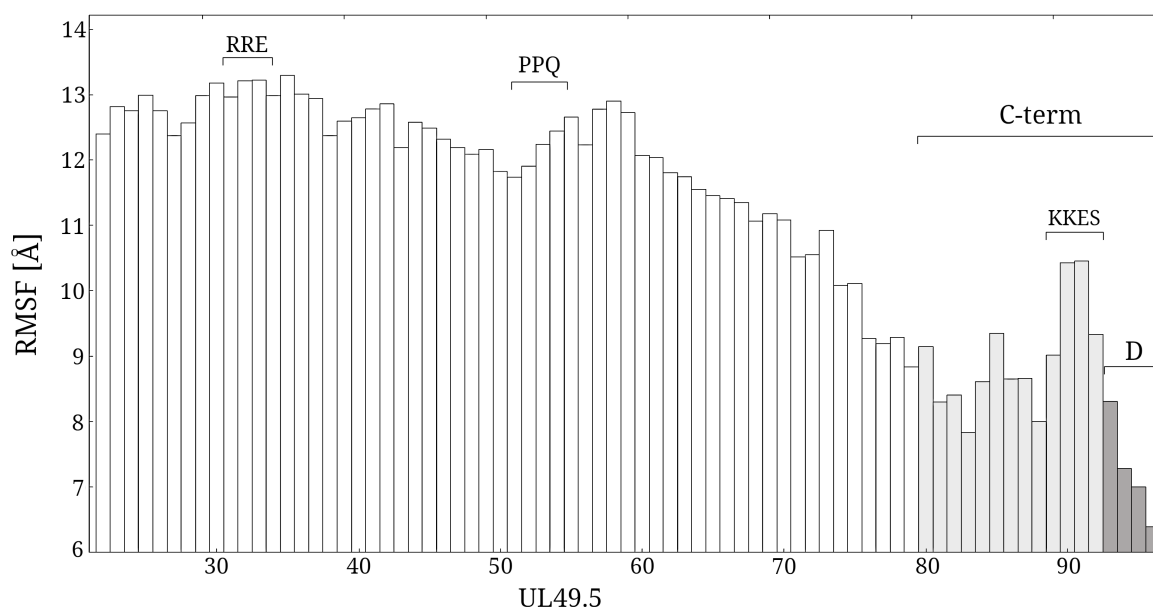
Mutacje G96D i R93K zmieniają konformację degronu, co skutkuje utratą kluczowych oddziaływań z udziałem C-terminalnej grupy karboksylowej, które determinują prawidłowe rozpoznawanie UL49.5 przez KLHDC3. W przypadku kompleksu dekapeptydu UL49.5 typu dzikiego, pomiędzy KLHDC3 i UL49.5 tworzyła się sieć silnych oddziaływań polarnych. C-terminalna grupa karboksylowa G⁹⁶ UL49.5 oddziaływała poprzez mostki solne z dwiema resztami argininy, R198 i R293, a także tworzyła wiązanie wodorowe z seryną S241. Znaczący wkład do energii swobodnej oddziaływania wnosili również oddziaływania dwóch reszt argininy degronu, które tworzyły mostki solne oraz wiązania wodorowe z KLHDC3. Mutacja R95K powodowała utratę większości oddziaływań w obrębie zmutowanej reszty, ale oddziaływania C-końca dekapeptydu były zachowane. W przypadku mutantów R96D i R93K ich konformacja i sposób ułożenia w miejscu wiążącym KLHDC3 powodowały brak kluczowego oddziaływania reszty C-terminalnej z S241 KLHDC3, a wkład wnoszony przez oddziaływania reszt D⁹⁶/G⁹⁶ do energii swobodnej oddziaływania był znacznie niższy niż dla UL49.5 typu dzikiego.

Praca **H9** była kontynuacją badań opisanych w pracy **H8**, a jej celem głównym było szczegółowe zbadanie oddziaływania KLHDC3 z UL49.5 podczas dłuższej symulacji kompleksu obu białek w środowisku błony lipidowej w otoczeniu cząsteczek wody (Rysunek 21). W pracy **H9** zastosowałam pełną strukturę dojrzałego białka UL49.5, pozbawioną jedynie N-terminalnej sekwencji sygnałowej (reszt 1-21), która nie bierze udziału w oddziaływaniu z KLHDC3 [63]. Dzięki temu możliwe było zaobserwowanie zmian struktury UL49.5 podczas symulacji. Dodatkowym celem badań w pracy **H9** była też próba znalezienia odpowiedzi na pytanie, dlaczego obecność w UL49.5 degronu rozpoznawanego przez KLHDC3 nie prowadzi do degradacji tego białka, a tylko do degradacji TAP.



Rysunek 21. Struktura startowa układu badanego w pracy **H9**.

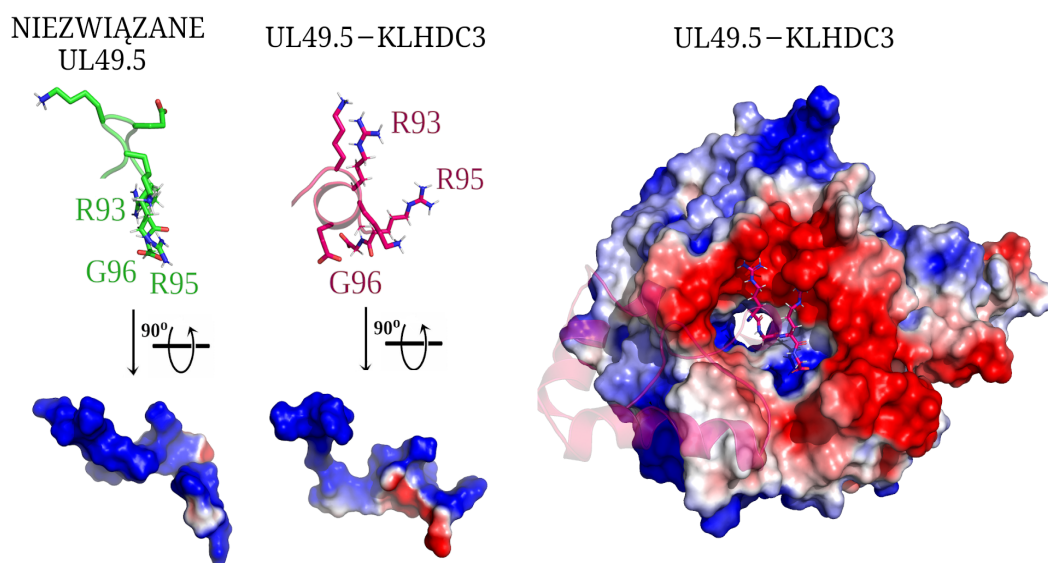
Startowy kompleks KLHDC3–UL49.5 został zbudowany w oparciu o strukturę kompleksu KLHDC3 z C-kończącym dekapeptydem UL49.5 otrzymaną w pracy **H8**. Po umieszczeniu kompleksu w modelu uwodnionej błony lipidowej wykonałam trzy niezależne symulacje dynamiki molekularnej, każda o długości 1,2 μ s. Analiza zmian RMSD podczas symulacji pokazała, że struktura KLHDC3 prawie się nie zmieniła, natomiast UL49.5 przechodziło znaczące zmiany konformacyjne. Zaobserwowałam, że oba białka podczas symulacji przemieszczały się, ale cały czas pozostawały silnie związane w stabilny kompleks. Potwierdzają to również ujemne wartości energii swobodnej oddziaływania podczas wszystkich trajektorii. Największy wkład do energii oddziaływania białko-białko wносиły oddziaływania reszt degronu, a zwłaszcza C-terminalnej reszty G⁹⁶. Wykonałam obliczenia RMSF, aby przeanalizować które fragmenty białka UL49.5 były najbardziej i najmniej ruchliwe podczas symulacji (Rysunek 22).



Rysunek 22. RMSF białka UL49.5 podczas symulacji dynamiki molekularnej [**H9**].

Okazało się, że najmniej ruchliwym fragmentem UL49.5 podczas symulacji był C-koniec białka. Zazwyczaj w przypadku białek błonowych największe zmiany konformacyjne zachodzą w pętlach oraz we fragmentach terminalnych białka. Było tak również podczas wcześniejszych symulacji białka UL49.5 i jego mutantów, w których C-koniec białka wykazywał największą ruchliwość, a najmniejszą domena transmembranowa [⁶⁴(P38)]. Podczas symulacji kompleksu KLHDC3-UL49.5 w pracy **H9**, wyższe wartości RMSF występowały dla części transmembranowej UL49.5, natomiast C-koniec silnie związany z KLHDC3 miał ograniczoną ruchliwość (Rysunek 22).

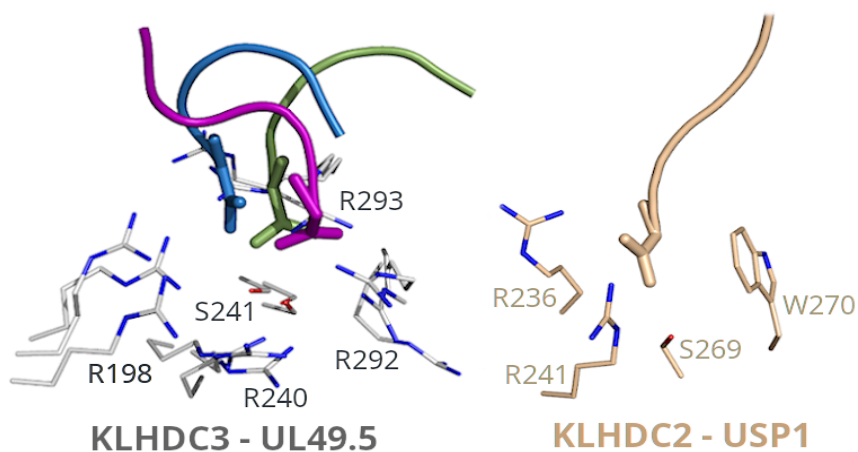
Analiza struktury drugorzędowej UL49.5 w czasie symulacji potwierdziła, że we wszystkich symulacjach ogólny schemat budowy UL49.5 nie zmienił się. Białko składało się z dwóch odcinków helikalnych połączonych długą pętlą, zawierającą motyw $^{52}\text{PPQ}^{54}$, który jest konieczny dla oddziaływania z TAP i kierowania go do degradacji [64]. Zauważyłam, że podczas prowadzonych przeze mnie symulacji, zgięcie w regionie $^{52}\text{PPQ}^{54}$ stanowiło zawias umożliwiający przemieszczanie się helisy pierwszej względem pozostałej części białka, co prawdopodobnie warunkuje prawidłowe dopasowanie się UL49.5 do TAP. Zmiany struktury UL49.5 widoczne były także w obrębie helisy pierwszej, gdzie w dwóch z trzech symulacji, złamanie helisy w regionie $^{30}\text{RRE}^{32}$ spowodowało ułożenie się jej krótszego N-terminalnego fragmentu na powierzchni błony. W regionie C-końca podczas symulacji utworzył się krótki fragment helikalny w regionie $^{89}\text{KKES}^{92}$ bezpośrednio poprzedzającym sekwencję degronu. Przeprowadzona analiza oddziaływań UL49.5 z KLHDC3 wykazała, że białka związane są ze sobą poprzez gęstą sieć oddziaływań polarnych (Rysunek 23). Najsilniejsze oddziaływania (najtrwalsze i wnoszące największy wkład do energii oddziaływania) tworzyły się z udziałem C-terminalnej reszty G^{96} . Było to wiązanie wodorowe $\text{G}^{96}\text{-S241}$ oraz dwa mostki solne: $\text{G}^{96}\text{-R198}$ i $\text{G}^{96}\text{-R293}$. Oddziaływania te występowały we wszystkich symulacjach. Reszty argininy degronu R^{93} i R^{95} przez większość czasu symulacji tworzyły mostki solne z D129, D181 i E320, ale nie tak stabilne, jak oddziaływania z udziałem G^{96} . Łańcuchy boczne tych dwóch reszt argininy podczas symulacji zmieniły swoje położenie, aby umożliwić idealne dopasowanie się degronu do bipolarnej powierzchni miejsca wiążącego KLHDC3 (Rysunek 23).



Rysunek 23. Panel lewy: konformacja degronu UL49.5: niezwiązanego (zielony) oraz w kompleksie z KLHDC3 (amarantowy). Panel prawy: kompleks UL49.5-KLHDC3 [H9].

Poza resztami degronu UL49.5, znaczący wkład do energii oddziaływania wnoszą także oddziaływania z udziałem reszt K⁸⁹, K⁹⁰, S⁹² i S⁸⁵. Reszty te mogą być potencjalnymi miejscami ubikwitynacji. Analiza trajektorii pokazała jednak, że podczas symulacji pozostawały one cały czas w bliskim kontakcie z resztami KLHDC3, przez co ich łańcuchy boczne prawdopodobnie nie są dostępne dla ubikwityny, co może wyjaśniać, dlaczego UL49.5 nie jest degradowane po związaniu z KLHDC3.

Porównałam strukturę otrzymanego w pracy **H9** kompleksu UL49.5-KLHDC3 ze strukturą krystaliczną białka KLHDC2 w kompleksie z degonem USP1 (ang. *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1*) [65]. Pomimo niezbyt wysokiego podobieństwa sekwencyjnego (~25%), oba białka, KLHDC2 i KLHDC3 wykazują wysokie podobieństwo strukturalne. Taka mimikra strukturalna może być niezwykle wydajnym mechanizmem, który umożliwia białkom KLHDC selektywne rozpoznawanie różnych degronów dzięki różnej sekwencji, ale stosując analogiczne mechanizmy wiązania dzięki podobnej strukturze trzeciorzędowej. Wniosek ten wyciągnęłam na podstawie porównania sieci oddziaływań polarnych wokół C-końca degronów w kompleksach z KLHDC2 i KLHDC3. Zauważyłam, że w obu przypadkach z C-terminalną grupą karboksylową degronu oddziałuje reszta seryny oraz dwie reszty arginy, które nazwałam "triadą RSR" (Rysunek 24).



Rysunek 24. Oddziaływanie C-terminalnych reszt degronów UL49.5 i USP1 z triadą RSR w białkach KLHDC2 i KLHDC3 [**H9**].

W oparciu o te obserwacje zaproponowałam prawdopodobny mechanizm wiązania degronów, który przebiega w dwóch etapach. W pierwszym etapie degron rozpoznawany jest przez niekonserwatywne reszty aminokwasowe znajdujące się w wyeksponowanych zwrotach pętli. W przypadku UL49.5 rozpoznawane są reszty arginy degronu, w kolejnym etapie triada RSR silnie przyciąga C-terminalną grupę karboksylową do wnętrza miejsca wiążącego

KLHDC3, a silne oddziaływania polarne stabilizują powstały kompleks. W przypadku degronu USP1 o sekwencji LLGG, najbardziej wyeksponowane są reszty leucyny i to one w pierwszym etapie wiązania mogą być rozpoznawane przez niekonserwatywne reszty KLHDC2 leżące w pętłach. Drugi etap wiązania z udziałem triady RSR może być analogiczny jak dla KLHDC3, a także dla innych białek KLHDC.

PODSUMOWANIE

Badania opisane w pracach **H1-H10** dotyczyły badania *in silico* struktury i molekularnego mechanizmu działania wybranych białek błonowych pełniących ważne funkcje fizjologiczne. Białka te są, lub mogą być, punktem docelowym działania leków. Zaprojektowanie skutecznego i selektywnego leku wymaga szczegółowej wiedzy o strukturze miejsca wiążącego białka oraz oddziaływaniach stabilizujących kompleks białko-lek. W tym celu przeanalizowałam osiemdziesiąt osiem kompleksów receptor-ligand oraz cztery kompleksy białko-białko. Podczas wszystkich przeprowadzanych badań zawsze porównywałam uzyskane wyniki z dostępnymi danymi eksperymentalnymi. Najczęściej były to badania aktywności biologicznej lub dane strukturalne dotyczące spokrewnionych białek pełniących podobne funkcje fizjologiczne.

Wyniki moich badań poszerzają wiedzę na temat struktury i molekularnych mechanizmów działania wybranych białek błonowych i mają na celu umożliwienie racjonalnego projektowania leków, których celem molekularnym są badane przeze mnie białka. Uzyskane wyniki mogą poprawić skuteczność stosowanych obecnie terapii poprzez celowaną modyfikację cząsteczki liganda, tak aby podwyższyć jego selektywność względem określonego typu receptora. Byłoby to cenne w przypadku stosowanych obecnie tokolityków (OTR), diuretyków (V2R), czy analgetyków (receptor δ) i umożliwiłoby otrzymanie leków o mniejszej liczbie skutków ubocznych. Jest to szczególnie ważne i pilne w przypadku leków działających przez receptory opioidowe, ponieważ szybkie rozwinięcie się uzależnienia jest ogromnym problemem podczas terapii bólu z zastosowaniem analgetyków opioidowych.

Dzięki wymodelowaniu struktury receptora wazopresyny V1b i opisaniu topologii jego miejsca wiążącego możliwe będzie racjonalne zaprojektowanie nowych substancji leczniczych działających selektywnie na receptory V1b. Leki te mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu zaburzeń psychicznych wynikających z nieprawidłowego działania osi HPA, a także w leczeniu alkoholizmu.

Dzięki badaniom opisanym w niniejszym autoreferacie możliwe będzie także rozwinięcie zupełnie nowych ścieżek terapeutycznych, takich jak leczenie infekcji

herpeswirusowych czy też niektórych typów nowotworów poprzez modulację wewnątrzkomórkowych mechanizmów degradacji białek. Zaproponowany przeze mnie mechanizm molekularnego rozpoznawania białka UL49.5 przez KLHDC3 umożliwi zaprojektowanie inhibitora, który w przypadku infekcji herpeswirusowej mógłby zablokować oddziaływanie UL49.5 z KLHDC3 i uniemożliwić skierowanie TAP do degradacji. Mechanizm ten można wykorzystać także w leczeniu nowotworów. Wiadomo, że KLHDC3 może rozpoznawać C-terminalny degron białka p14^{ARF} będącego supresorem nowotworu, co w rezultacie prowadzi do jego degradacji proteasomalnej, co zaobserwowano w przypadku raka jajnika i niedrobnokomórkowego raka płuca [66,67]. Zablokowanie oddziaływania KLHDC3 z p14^{ARF} mogłoby być nową metodą leczenia nowotworów, w których występuje nadekspresja KLHDC3.

Inne ważne osiągnięcia naukowe habilitantki, nieuwjęte w osiągnięciu habilitacyjnym, wskazane są w "Wykazie osiągnięć naukowych" (Załącznik 4a).

5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.

W czasie studiów doktoranckich głównym przedmiotem mojej pracy naukowej było modelowanie molekularne receptorów wazopresyny i oksytocyny oraz ich oddziaływania z ligandami, agonistami (oksytocyną, wazopresyną oraz desmopresyną) oraz antagonistami (atosibanem i barusibanem). Zajmowałam się również badaniem roli cząsteczek wody zidentyfikowanej wewnątrz kieszeni wiążących badanych receptorów. Badania oddziaływań receptor-antagonista wykonywałam w ramach zatrudnienia w projekcie badawczym **Ferring Research Lab (San Diego, USA)**, gdzie zaprojektowano i przeprowadzono badania kliniczne atosibanu i barusibanu. Wyniki badań wykonanych we współpracy z Ferring Research Lab opublikowane zostały w pracach:

- Ślusarz MJ, Ślusarz R, Kaźmierkiewicz R, Trojnar J, Wiśniewski K, Ciarkowski J. Molecular modeling of the neurohypophyseal receptor/atosiban complexes, *Protein Pept Lett*, 2003, 10, 295-302.
- Ślusarz MJ, Ślusarz R, Meadows R, Trojnar J, Ciarkowski J. Molecular dynamics of complexes of atosiban with neurohypophyseal receptors in the fully hydrated phospholipid bilayer, *QSAR Comb Sci*, 2004, 23, 536-545.
- Ślusarz MJ, Giełdoń A, Ślusarz R, Trojnar J, Meadows R, Ciarkowski J: Study of new oxytocin antagonist barusiban (Fe200 440) affinity toward human oxytocin receptor versus vasopressin V1a and V2 receptors - molecular dynamics simulation in POPC bilayer, *QSAR Comb Sci*, 2005, 24, 603-610.

Publikacje te, wraz z pracami **P6**, **P7** i **P9** weszły w skład mojej rozprawy doktorskiej (2006). Po uzyskaniu stopnia doktora, część prowadzonych przeze mnie badań była kontynuacją tematyki rozpoczętej w poprzednich latach i obejmowała modelowanie struktury oraz oddziaływań receptorów wazopresyny i oksytocyny z nowymi ligandami, potencjalnymi lekami. Do badanych przeze mnie receptorów OTR, V1aR i V2R, włączyłam też receptor wazopresyny V1b. Niektóre z tych badań stanowią część osiągnięcia habilitacyjnego [**H1-H3**, **H5**, **H10**]. W roku 2010 zostałam zaproszona do współpracy przez naukowców z **Centre Hospitalier de L'Universite de Montreal (Montreal, Kanada)**. W ramach tej współpracy wykonane zostały badania eksperymentalne oraz *in silico* nowego peptydu, OT-GRK, który stymuluje różnicowanie się komórek macierzystych serca w komórki mięśnia sercowego (kardiomiocyty). Wyniki przeprowadzonych badań opublikowane zostały w pracy:

- Danalache BA, Gutkowska J, Ślusarz MJ, Berezowska I, Jankowski M. Oxytocin-Gly-Lys-Arg: a novel cardiomyogenic peptide, *Plos One*, 2010, 5, e13643.

W kolejnych latach włączyłam do badań oprócz receptorów wazopresyny i oksytocyny, także receptory opioidowe. Opublikowane wyniki tych badań stanowią część osiągnięcia habilitacyjnego [**H4**, **H7**].

W roku 2013 zostałam zaproszona do współpracy z naukowcami z **Instituto Politécnico Nacional (Mexico City, Meksyk)**. Przedmiotem współpracy były badania oddziaływania receptorów wazopresyny z niepeptydowymi antagonistami receptorów wazopresyny (waptanami), mające na celu zaprojektowanie i zbadanie nowych substancji o działaniu akwaretycznym, które można byłoby stosować w leczeniu zaburzeń wodno-elektrolitowych różnego pochodzenia. Wyniki uzyskane we współpracy z meksykańskimi naukowcami opublikowane zostały w dwóch pracach:

- Contreras-Romo MC, Martínez-Archundia M, Deeb O, Ślusarz MJ, Ramírez-Salinas G, Garduño-Juárez R, Quintanar-Stephano A, Ramírez-Galicia G, Correa-Basurto J: Exploring the ligand recognition properties of the human vasopressin V1a receptor using QSAR and molecular modeling studies, *Chem Biol Drug Des*, 2014, 83, 207-223.
- Contreras-Romo MC, Correa-Basurto J, Padilla-Martínez I, Martínez-Archundia M, Martínez-Ramos F, Ślusarz MJ, López-Pérez G, Quintanar-Stephano A: Theoretical studies, synthesis, and biological activity of 1-[4-methylphenyl)sulfonyl]-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepine-4-carbonitrile (C9) as a non-peptide antagonist of the arginine vasopressin V1a and V2 receptors, *Med Chem Res*, 2014, 23, 1581-1590.

W roku 2014 zostałam zaproszona przez edytorów czasopisma "*Expert Opinion on Therapeutic Patents*" do napisania pracy przeglądowej przedstawiającej najważniejsze w mojej ocenie patenty dotyczące substancji działających na receptory wazopresyny V1a

i V1b, zarejestrowane w latach 2012-2014 oraz moją opinię na temat aktualnego statusu i przyszłych kierunków badań w tym obszarze. Praca została opublikowana w 2015 roku [P26].

Oprócz prowadzonych przeze mnie badań receptorów błonowych, równolegle zaangażowana byłam także w badania dotyczące przewidywania struktur białek w polu siłowym UNRES (ang. *UNited RESidue*) oraz parametryzację tego pola siłowego. Uczestniczyłam także kilkakrotnie w konkursach CASP (ang. *Critical Assessment of protein Structure Prediction*). Część prac wykonywana była we współpracy z **Korea Institute for Advanced Study (Seul, Korea Południowa)**:

- Karczyńska A, Mozolewska MA, Krupa P, Giełdoń A, Bojarski KK, Zaborowski B, Liwo A, Ślusarz R, Ślusarz M, Lee J, Joo K, Czaplewski C. Use of the UNRES force field in template-assisted prediction of protein structures and the refinement of server models: Test with CASP12 targets. *J Mol Graph Model*, 2018, 83, 92-99.

W ramach konkursów CASP byłam też członkiem dużej międzynarodowej grupy *WeFold*, składającej się z naukowców należących do grup badawczych całego świata, w tym dwóch laureatów nagrody Nobla:

- Keasar C, McGuffin LJ, Wallner B, Chopra G, Adhikari B, Bhattacharya D, Blake L, Bortot LO, Cao R, Dhanasekaran BK, Dimas I, Faccioli RA, Faraggi E, Ganzynkowicz R, Ghosh S, Ghosh S, Giełdoń A, Golon L, He Y, Heo L, Hou J, Khan M, Khatib F, Khoury GA, Kieslich C, Kim DE, Krupa P, Lee GR, Li H, Li J, Lipska A, Liwo A, Maghrabi AHA, Mirdita M, Mirzaei S, Mozolewska MA, Onel M, Ovchinnikov S, Shah A, Shah U, Sidi T, Sieradzan AK, Ślusarz M, Ślusarz R, Smadbeck J, Tamamis P, Trieber N, Wirecki T, Yin Y, Zhang Y, Bacardit J, Baranowski M, Chapman N, Cooper S, Defelicibus A, Flatten J, Koepnick B, Popović Z, Zaborowski B, Baker D, Cheng J, Czaplewski C, Delbem ACB, Floudas C, Kloczkowski A, Ołdziej S, Levitt M, Scheraga H, Seok C, Söding J, Vishveshwara S, Xu D; Foldit Players consortium; Crivelli SN. An analysis and evaluation of the WeFold collaborative for protein structure prediction and its pipelines in CASP11 and CASP12. *Sci Rep*, 2018, 8, 9939.

W ostatnich latach poszerzyłam swoje zainteresowania badawcze o kolejne białko błonowe: UL49.5 byłącego herpeswirusa. Praca opisująca badania strukturalne UL49.5 oraz dwie prace opisujące symulacje *in silico* oddziaływania UL49.5 z KLHDC3 zostały włączone do mojego osiągnięcia habilitacyjnego [H6, H8-H9]. W badaniach brali udział naukowcy z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed. Część badań wykonywana była również we współpracy z naukowcami z **Polskiej Akademii Nauk** oraz ze **Stanford University (USA)**:

- Wąchalaska M, Riepe C, Ślusarz MJ, Graul M, Borowski LS, Qiao W, Foltynska M, Carette JE, Bieńkowska-Szewczyk K, Szczesny RJ, Kopito RR, Lipińska AD. The herpesvirus UL49.5 protein hijacks a cellular C-degron pathway to drive TAP transporter degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2024, 121, e2309841121.

W 2023 roku odbyłam staż naukowy (IV-VI.2023) na **Wydziale Farmaceutycznym GUMed**. Staż obejmował projektowanie i syntezę lipopeptydów wykazujących aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz modelowanie ich struktury, agregacji i oddziaływań z dwuwarstwą lipidową. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiłam we wrześniu 2023 roku na konferencji międzynarodowej:

- Ślusarz MJ, Neubauer D, Wiśniewska K, Kamysz W. Structural characterization of the arginine-rich gemini lipopeptides containing p-xylene or biphenyl bridge, 2023, 8th Polish-Korean Conference on "Protein Folding: Theoretical and Experimental Approaches" 24-28.09.2023, Jastrzębia Góra, Poland.

6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ.

PROWADZONE ZAJĘCIA DYDAKTYCZNE

- Modelowanie struktury białek (Bioinformatyka, III r., I st.)
- Technologia informacyjna (Chemia, Ochrona środowiska, Biznes chemiczny, I r., I st.)
- Wstęp do modelowania białek (Chemia, III r., I st.)
- Modelowanie molekularne (Chemia, III r., I st.)
- Chemia organiczna i biochemia (Przyroda, I rok, I st.)
- Seminarium magisterskie (Chemia, II r., II st.)
- Seminarium dyplomowe (Bioinformatyka, III r., I st.)
- Pracownia dyplomowa KChT (Chemia, Bioinformatyka, III r., I st.)
- Graduate laboratory course (Digital Chemistry, I r., II st.)
- MSc laboratory course (Digital Chemistry, II r., II st.)
- ABC IT (Chemia, I r., I st.)
- Programy Użytkowe (Studia podyplomowe)
- Sieci, Internet, Multimedia (Studia podyplomowe)

OPIEKA NAD PRACAMI DYPLOMOWYMI, MAGISTERSKIMI I DOKTORSKIMI

- 15 prac dyplomowych (obecnie 4), na kierunkach Chemia i Bioinformatyka
- 6 prac magisterskich (obecnie 1), na kierunkach Chemia i Digital Chemistry; trzy osoby posiadają już stopień doktora, a kolejna osoba rozpoczęła właśnie studia doktoranckie
- 2 prace doktorskie (promotor pomocniczy):

- Magdalena Mozolewska: *Modelowanie teoretyczne białek i ich oddziaływań na różnych poziomach rozdzielczości na przykładzie przewidywania struktury białek oraz wybranych procesów biochemicznych*. 2015, promotor: prof. dr hab. Adam Liwo
- Karolina Zięba: *Badanie oddziaływań hydrofobowych i lokalnych w modelowych układach oraz białkach*. 2022, promotor: prof. dr hab. Cezary Czaplewski

POMOCE DYDAKTYCZNE

- Kursy przedmiotowe w Portalu Edukacyjnym UG: Wstęp do Modelowania Biocząstek, Technologia Informacyjna
- Materiały dydaktyczne dla studentów: ćwiczenia z modelowania molekularnego wykorzystywane podczas zajęć pracowni dyplomowej oraz specjalizacyjnej

CERTYFIKATY I SZKOLENIA DYDAKTYCZNE

- *Working with autism spectrum disorder (ASD) students on STEM faculties*. 18.11-04.12.2002, Uniwersytet Jagielloński, Platforma Edukacyjna Krakus
- *Viva dydaktyka*, 21.06.2023, Centrum Doskonalenia Dydaktycznego i Tutoringu UG
- *U.M.I.E.M. Neuronauka o uczeniu (się)*, 21.11.2022, Centrum Doskonalenia Dydaktycznego i Tutoringu UG
- *Empatia w komunikacji nauczyciela i studenta. Wprowadzenie do NVC (Non Violent Communication)*, 21.04.2022, Centrum Doskonalenia Dydaktycznego i Tutoringu UG
- *Wprowadzenie do pracy metodą problemową (PBL)*, 17.03.2022, Centrum Doskonalenia Dydaktycznego i Tutoringu UG

DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA

- Członek Wydziałowego Zespołu ds. Promocji Wydziału (2020 - obecnie)
- Członek Wydziałowej Komisji Wyborczej (2008 - 2016)
- Administrator strony internetowej Wydziału Chemii (2005 - 2009, 2022 - obecnie)
- Administrator strony internetowej Katedry Chemii Teoretycznej (2013 - obecnie)
- Członek Komitetu Organizacyjnego międzynarodowej konferencji *Polish-Korean Conference on Protein Folding: Theoretical and Experimental Approaches*, 2023

DZIAŁANIA POPULARYZUJĄCE NAUKĘ

- Organizacja i prowadzenie warsztatów w ramach Bałtyckiego Festiwalu Nauki, 2011 - 2017; warsztaty *Modeluj i eksperymentuj*
- Organizacja i prowadzenie warsztatów w czasie Dni Otwartych Wydziału Chemii, corocznie; warsztaty *Gry molekularne, Zbuduj swoją cząsteczkę*

- Zajęcia dla uczniów klas 7 i 8, 2020; w ramach projektu *Zdolni z Pomorza* (Regionalny Program Operacyjny Województwa Pomorskiego na lata 2014 - 2020); współautorstwo kursu e-learningowego *Molekuły portret własny*
- Rozmowa o receptorach - wywiad w Radiu Gdańsk, 23 XI 2005

7. INNE INFORMACJE, WAŻNE Z PUNKTU WIDZENIA WNIOSKODAWCY, DOTYCZĄCE JEGO KARIERY ZAWODOWEJ.

NAGRODY I STYPENDIA NAUKOWE:

- 2005** Stypendium **L'ORÉAL-UNESCO DLA KOBIET I NAUKI**
- 2005** Stypendium dla doktorantów **Europejskiego Funduszu Społecznego**, projekt nr ZPORR/2.22/II/2.6/ARP/U/2/05
- 2007** Nagroda oddziału gdańskiego **Polskiego Towarzystwa Chemicznego** za najlepszą pracę doktorską obronioną w 2006 roku
- 2007** Stypendium **Fundacji na rzecz Nauki Polskiej** (START, stypendium krajowe dla młodych uczonych)
- 2008** Stypendium **Fundacji na rzecz Nauki Polskiej** (START, stypendium krajowe dla młodych uczonych) - przedłużenie na kolejny rok
- 2007-2024** Nagrody naukowe **Rektora UG** za cykl publikacji (zespolowe), sześciokrotnie: 2007, 2013, 2016, 2020, 2022, 2024.

PLANY NAUKOWE

W najbliższych latach zamierzam kontynuować badania białek błonowych. Część badań dotyczyć będzie modelowania oddziaływań receptorów opioidowych z ligandami wykazującymi stronniczy agonizm (ang. *biased agonism*), który polega na selektywnej aktywacji szlaku sygnałowego z udziałem białka G, zamiast szlaku β -arestyny. Ligandy takie wykazują silne działanie przeciwbólne i nieliczne działania uboczne. Zamierzam także zbadać, w jaki sposób heterodimeryzacja receptorów opioidowych z innymi receptorami (oksytocyny, wazopresyny V1b i kannabinoidowym CB1) wpływa na ich oddziaływanie z ligandami opioidowymi i w jaki sposób przyłączony protomer moduluje działanie receptora opioidowego.

Kolejnym kierunkiem moich badań w najbliższych latach będzie modelowanie oddziaływań białka KLHDC3 z nowo zaprojektowanymi ligandami o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, blokującymi jego oddziaływanie z supresorem nowotworu, białkiem p14^{ARF}.

LITERATURA

- ¹ Wallin E, von Heijne G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci*, 1998, 7, 1029-1038.
- ² Zhang M, Chen T, Lu X, Lan X, Chen Z, Lu S. G protein-coupled receptors (GPCRs): advances in structures, mechanisms, and drug discovery. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9, 88.
- ³ Latorraca NR, Venkatakrishnan AJ, Dror RO. GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chem Rev*, 2017, 117, 139-155.
- ⁴ Hauser AS, Kooistra AJ, Munk C, Heydenreich FM, Veprintsev DB, Bouvier M, Babu MM, Gloriam DE. GPCR activation mechanisms across classes and macro/microscales. *Nat Struct Mol Biol*, 2021, 28, 879-888.
- ⁵ Rosenbaum D, Rasmussen S, Kobilka, B. The structure and function of G-protein-coupled receptors. 2009, *Nature*, 459, 356-363.
- ⁶ Perez DM, Karnik SS. Multiple Signaling States of G-Protein-Coupled Receptors. *Pharmacol Rev*, 2005, 57, 147-161.
- ⁷ Thibonnier M, Berti-Mattera LN, Dulin N, Conarty DM, Mattera R. Signal transduction pathways of the human V1-vascular, V2-renal, V3-pituitary vasopressin and oxytocin receptors. *Prog Brain Res*, 1998, 119, 147-161.
- ⁸ Barberis C, Mouillac B, Durroux T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol*, 1998, 156, 223-229.
- ⁹ Rogers Flattery CN, Coppeto DJ, Inoue K, Rilling JK, Preuss TM, Young LJ. Distribution of brain oxytocin and vasopressin V1a receptors in chimpanzees (*Pan troglodytes*): comparison with humans and other primate species. *Brain Struct Funct*, 2022, 227, 1907-1919.
- ¹⁰ Rigney N, de Vries GJ, Petrulis A, Young LJ. Oxytocin, Vasopressin, and Social Behavior: From Neural Circuits to Clinical Opportunities. *Endocrinology*, 2022, 163, bqac111.
- ¹¹ Oshikawa S, Tanoue A, Koshimizu TA, Kitagawa Y, Tsujimoto G. Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: a combined pharmacological/knockout approach. *Mol Pharmacol*, 2004, 65, 623-629.
- ¹² Perisic M, Woolcock K, Hering A, Mendel H, Muttenthaler M. Oxytocin and vasopressin signaling in health and disease. *Trends Biochem Sci*, 2024, 9, 361-377.
- ¹³ Wiśniewski K. Design of Oxytocin Analogs. *Methods Mol Biol*, 2019, 2001, 235-271.
- ¹⁴ Baska F, Bozó É, Patócs T. Vasopressin receptor antagonists: a patent summary (2018-2022). *Expert Opin Ther Pat*, 2023, 33, 385-395.
- ¹⁵ Garrahy A, Thompson CJ. Management of central diabetes insipidus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2020, 34, 101385.
- ¹⁶ Ryckmans T. Modulation of the vasopressin system for the treatment of CNS diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2010, 13, 538-547.
- ¹⁷ Colson PH, Virsolvy A, Gaudard P, Charrabi A, Corbani M, Manière MJ, Richard S, Guillon G. Terlipressin, a vasoactive prodrug recommended in hepatorenal syndrome, is an agonist of human V1, V2 and V1B receptors: Implications for its safety profile. *Pharmacol Res*, 2016, 113, 257-264.
- ¹⁸ Kowalczyk W, Derdowska I, Dawidowska O, Prah A, Hartrodt B, Neubert K, Slaninowa, I, Lammek B. Analogues of Arginine Vasopressin Modified in the N-Terminal Part of the Molecule with Enantiomers of N-Methylphenylalanine. *J Pept Res*, 2004, 63, 420-425.
- ¹⁹ Sikorska E, Slusarz MJ, Lammek B. Conformational studies of vasopressin analogues modified with N-methylphenylalanine enantiomers in dimethyl sulfoxide solution. *Biopolymers*, 2006, 82, 603-614.

- ²⁰ Mouillac B, Chini B, Balestre MN, Elands J, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Hibert M, Jard S, Barberis C. The binding site of neuropeptide vasopressin V1a receptor. Evidence for a major localization within transmembrane regions. *J Biol Chem*, 1995, 270, 25771-25777.
- ²¹ Wang L, Xu J, Cao S, Sun D, Liu H, Lu Q, Liu Z, Du Y, Zhang C. Cryo-EM structure of the AVP-vasopressin receptor 2-G_s signaling complex. *Cell Res*, 2021, 31, 932-934.
- ²² Ślusarz MJ, Giełdoń A, Ślusarz R, Ciarkowski J. Analysis of interactions responsible for vasopressin binding to human neurohypophyseal hormone receptors-molecular dynamics study of the activated receptor-vasopressin-G(alpha) systems. *J Pept Sci*. 2006, 12, 180-189.
- ²³ Kowalczyk W, Sobolewski D, Prahl A, Derdowska I, Borovicková L, Slaninová J, Lammek B. The effects of N-terminal part modification of arginine vasopressin analogues with 2-aminoindane-2-carboxylic acid: a highly potent V2 agonist. *J Med Chem*, 2007, 50, 2926-2929.
- ²⁴ Ślusarz MJ, Ślusarz R, Meadows R, Trojnar J, Ciarkowski J. Molecular dynamics of complexes of atosiban with neurohypophyseal receptors in the fully hydrated phospholipid bilayer. *QSAR Comb Sci*, 2004, 23, 536-545.
- ²⁵ Ślusarz MJ, Giełdoń A, Ślusarz R, Trojnar J, Meadows R, Ciarkowski J. Study of new oxytocin antagonist barusiban (Fe200 440) affinity toward human oxytocin receptor versus vasopressin V1a and V2 receptors - molecular dynamics simulation in POPC bilayer, *QSAR Comb Sci*, 2005, 24, 603-610.
- ²⁶ Waltenspühl Y, Schöppe J, Ehrenmann J, Kummer L, Plückthun A. Crystal structure of the human oxytocin receptor. *Sci Adv*, 2020, 6, eabb5419.
- ²⁷ Kwiatkowska A, Sobolewski D, Prahl A, Borovicková L, Slaninová J, Lammek B. Arginine vasopressin and its analogues - the influence of position 2 modification with 3,3-diphenylalanine enantiomers. Highly potent V2 agonists. *Eur J Med Chem*. 2009, 44, 2862-2867.
- ²⁸ Sikorska E, Kwiatkowska A, Sobolewski D, Ślusarz R, Ślusarz MJ. Influence of bulky 3,3'-diphenylalanine enantiomers replacing position 2 of AVP analogues on their conformations: NMR and molecular modeling studies. *Eur J Med Chem*. 2010, 45, 4065-4073.
- ²⁹ Zhou Q, Yang D, Wu M, Guo Y, Guo W, Zhong L, Cai X, Dai A, Jang W, Shakhnovich EI, Liu ZJ, Stevens RC, Lambert NA, Babu MM, Wang MW, Zhao S. Common activation mechanism of class A GPCRs. *eLife*, 2019, 8, e50279.
- ³⁰ Stetler C, Miller GE. Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. *Psychosom Med*, 2011, 73, 114-126.
- ³¹ Kanes SJ, Dennie L, Perera P. Targeting the Arginine Vasopressin V1b Receptor System and Stress Response in Depression and Other Neuropsychiatric Disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2023, 19, 811-828.
- ³² Griebel G, Stemmelin J, Gal CS, Soubrié P. Non-peptide vasopressin V1b receptor antagonists as potential drugs for the treatment of stress-related disorders. *Curr Pharm Des*, 2005, 11, 1549-1559.
- ³³ Edwards S, Guerrero M, Ghoneim OM, Roberts E, Koob GF. Evidence that vasopressin V1b receptors mediate the transition to excessive drinking in ethanol-dependent rats. *Addict Biol*. 2012, 17, 76-85.
- ³⁴ Griffante C, Green A, Curcuruto O, Haslam CP, Dickinson BA, Arban R. Selectivity of d[Cha⁴]AVP and SSR149415 at human vasopressin and oxytocin receptors: evidence that SSR149415 is a mixed vasopressin V1b/oxytocin receptor antagonist. *Br J Pharmacol*, 2005, 146, 744-751.
- ³⁵ Rodrigo J, Pena A, Murat B, Trueba M, Durroux T, Guillon G, Rognan D. Mapping the binding site of arginine vasopressin to V1a and V1b vasopressin receptors. *Mol Endocrinol*. 2007, 21, 512-523.
- ³⁶ Alexander SPH, Christopoulos A, Davenport AP, Kelly E, Mathie AA, Peters JA, Veale EL, Armstrong JF, Faccenda E, Harding SD, Davies JA, Amarosi L, Anderson CMH, Beart PM, Broer S, Dawson PA, Gyimesi G,

- Hagenbuch B, Hammond JR, Hancox JC, Hershinkel M, Inui KI, Kanai Y, Kemp S, Kunji ERS, Stewart G, Tavoulari S, Thwaites DT, Verri T. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2023/24: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol*, 180, S23-S144.
- ³⁷ Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL. Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev*, 2009, 89, 1379-1412.
- ³⁸ Kapitzke D, Vetter I, Cabot PJ. Endogenous opioid analgesia in peripheral tissues and the clinical implications for pain control. *Ther Clin Risk Manag*, 2005, 1, 279-297.
- ³⁹ Gupta A, Gullapalli S, Pan H, Ramos-Ortolaza DL, Hayward MD, Low MJ, Pintar JE, Devi LA, Gomes I. Regulation of Opioid Receptors by Their Endogenous Opioid Peptides. *Cell Mol Neurobiol*, 2021, 41, 1103-1118.
- ⁴⁰ Fricker LD, Margolis EB, Gomes I, Devi LA. Five Decades of Research on Opioid Peptides: Current Knowledge and Unanswered Questions. *Mol Pharmacol*. 2020, 98, 96-108.
- ⁴¹ Stein C, Opioid receptors. *Annu Rev Med*. 2016, 67, 433-451.
- ⁴² Claff T, Yu J, Blais V, Patel N, Martin C, Wu L, Han GW, Holleran BJ, Van der Poorten O, White KL, Hanson MA, Sarret P, Gendron L, Cherezov V, Katritch V, Ballet S, Liu ZJ, Müller CE, Stevens RC. Elucidating the active δ -opioid receptor crystal structure with peptide and small-molecule agonists. *Sci Adv*, 2019, 5, eaax9115.
- ⁴³ Brandt MR, Furness MS, Rice KC, Fischer BD, Negus SS. Studies of tolerance and dependence with the delta-opioid agonist SNC80 in rhesus monkeys responding under a schedule of food presentation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299, 629-637.
- ⁴⁴ Rapaka RS, Porreca F. Development of delta opioid peptides as nonaddicting analgesics. *Pharm Res*. 1991, 8, 1-8.
- ⁴⁵ Gendron L, Cahill CM, von Zastrow M, Schiller PW, Pineyro G. Molecular Pharmacology of δ -Opioid Receptors. *Pharmacol Rev*. 2016, 68, 631-700.
- ⁴⁶ Nadal X, Baños JE, Kieffer BL, Maldonado R. Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci*, 2006, 23, 830-834.
- ⁴⁷ Jutkiewicz EM, Baladi MG, Folk JE, Rice KC, Woods JH. The convulsive and electroencephalographic changes produced by nonpeptidic delta-opioid agonists in rats: comparison with pentylentetrazol. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006, 317, 1337-1348.
- ⁴⁸ Zieleniak A, Rodziewicz-Motowidło S, Rusak Ł, Chung NN, Czaplewski C, Witkowska E, Schiller PW, Ciarkowski J, Izdebski J. Deltorphin analogs restricted via a urea bridge: structure and opioid activity. *J Pept Sci*, 2008, 14, 830-837.
- ⁴⁹ Portoghese PS, Sultana M, Nagase H, Takemori AE. Application of the message-address concept in the design of highly potent and selective non-peptide delta opioid receptor antagonists. *J Med Chem*, 1988, 31, 281-282.
- ⁵⁰ Shen Q, Qian Y, Huang X, Xu X, Li W, Liu J, Fu W. Discovery of Potent and Selective Agonists of δ Opioid Receptor by Revisiting the "Message-Address" Concept. *ACS Med Chem Lett*, 2016, 7, 391-396.
- ⁵¹ Kellam B, Drouillat B, Dekany G, Starr MS, Toth I, Synthesis and in vitro evaluation of lipoamino acid and carbohydrate-modified enkephalins as potential antinociceptive agents. *Int J Pharm*, 1998, 161, 55-64.
- ⁵² Polt, R., Dhanasekaran, M., Keyari, C.M., Glycosylated neuropeptides: a new vista for neuropsychopharmacology. *Med. Res. Rev*. 2005, 25, 557-585.
- ⁵³ Wu SX, Zhu XP, Letchworth GJ. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein. *J Virol*, 1998, 72, 3029-3036.

- ⁵⁴ Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS. Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Health Res Rev*, 2009, 10, 85-98.
- ⁵⁵ Jones C, Chowdhury S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Anim Health Res Rev*, 2007, 8, 187-205.
- ⁵⁶ Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
- ⁵⁷ Griffin BD, Verweij MC, Wiertz EJ. Herpesviruses and immunity: the art of evasion. *Vet Microbiol*. 2010, 143, 89-100.
- ⁵⁸ Rensing ME, Luteijn RD, Horst D, Wiertz EJ. Viral interference with antigen presentation: trapping TAP. *Mol Immunol*. 2013, 55, 139-142.
- ⁵⁹ Verweij MC, Lipińska AD, Koppers-Lalic D, Quinten E, Funke J, van Leeuwen HC, Bieńkowska-Szewczyk K, Koch J, Rensing ME, Wiertz EJ. Structural and functional analysis of the TAP-inhibiting UL49.5 proteins of varicelloviruses. *Mol Immunol*. 2011, 48, 2038-2051.
- ⁶⁰ Verweij MC, Lipińska AD, Koppers-Lalic D, van Leeuwen WF, Cohen JI, Kinchington PR, Messaoudi I, Bieńkowska-Szewczyk K, Rensing ME, Rijsewijk FA, Wiertz EJ. The capacity of UL49.5 proteins to inhibit TAP is widely distributed among members of the genus Varicellovirus. *J Virol*, 2011, 85, 2351-2363.
- ⁶¹ Wąchalska M, Riepe C, Ślusarz MJ, Graul M, Borowski LS, Qiao W, Foltyńska M, Carette JE, Bieńkowska-Szewczyk K, Szczesny RJ, Kopito RR, Lipińska AD. The herpesvirus UL49.5 protein hijacks a cellular C-degron pathway to drive TAP transporter degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121, e2309841121.
- ⁶² Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021, 596, 583-589.
- ⁶³ Loch S, Klauschies F, Schölz C, Verweij MC, Wiertz EJ, Koch J, Tampé R. Signaling of a varicelloviral factor across the endoplasmic reticulum membrane induces destruction of the peptide-loading complex and immune evasion. *J Biol Chem*, 2008, 283, 13428-13436.
- ⁶⁴ Graul M, Karska N, Wąchalska M, Krupa P, Ślusarz MJ, Lubocki M, Bieńkowska-Szewczyk K, Rodziejcz-Motowidło S, Sieradzan AK, Lipińska AD. The N-terminal Proline Hinge Motif Controls the Structure of Bovine Herpesvirus 1-encoded Inhibitor of the Transporter Associated with Antigen Processing Required for its Immunomodulatory Function. *J Mol Biol*. 2023, 435, 167964.
- ⁶⁵ Rusnac DV, Lin HC, Canzani D, Tien KX, Hinds TR, Tsue AF, Bush MF, Yen HS, Zheng N. Recognition of the Diglycine C-End Degron by CRL2K^{LHDC2} Ubiquitin Ligase. *Mol Cell*, 2018, 72, 813-822.
- ⁶⁶ Zhang P, Gao K, Zhang L, Sun H, Zhao X, Liu Y, Lv Z, Shi Q, Chen Y, Jiao D, Li Y, Gu W, Wang C. CRL2-K^{LHDC3} E3 ubiquitin ligase complex suppresses ferroptosis through promoting p14^{ARF} degradation. *Cell Death Differ*, 2022, 29, 758-771.
- ⁶⁷ Liu Y, Luo Y, Yan S, Lian YF, Wu S, Xu M, Feng L, Zhang X, Li R, Zhang X, Feng QS, Zeng YX, Zhang H. CRL2^{K^{LHDC3}} mediates p14^{ARF} N-terminal ubiquitylation degradation to promote non-small cell lung carcinoma progression. *Oncogene*. 2022, 41, 3104-3117.