

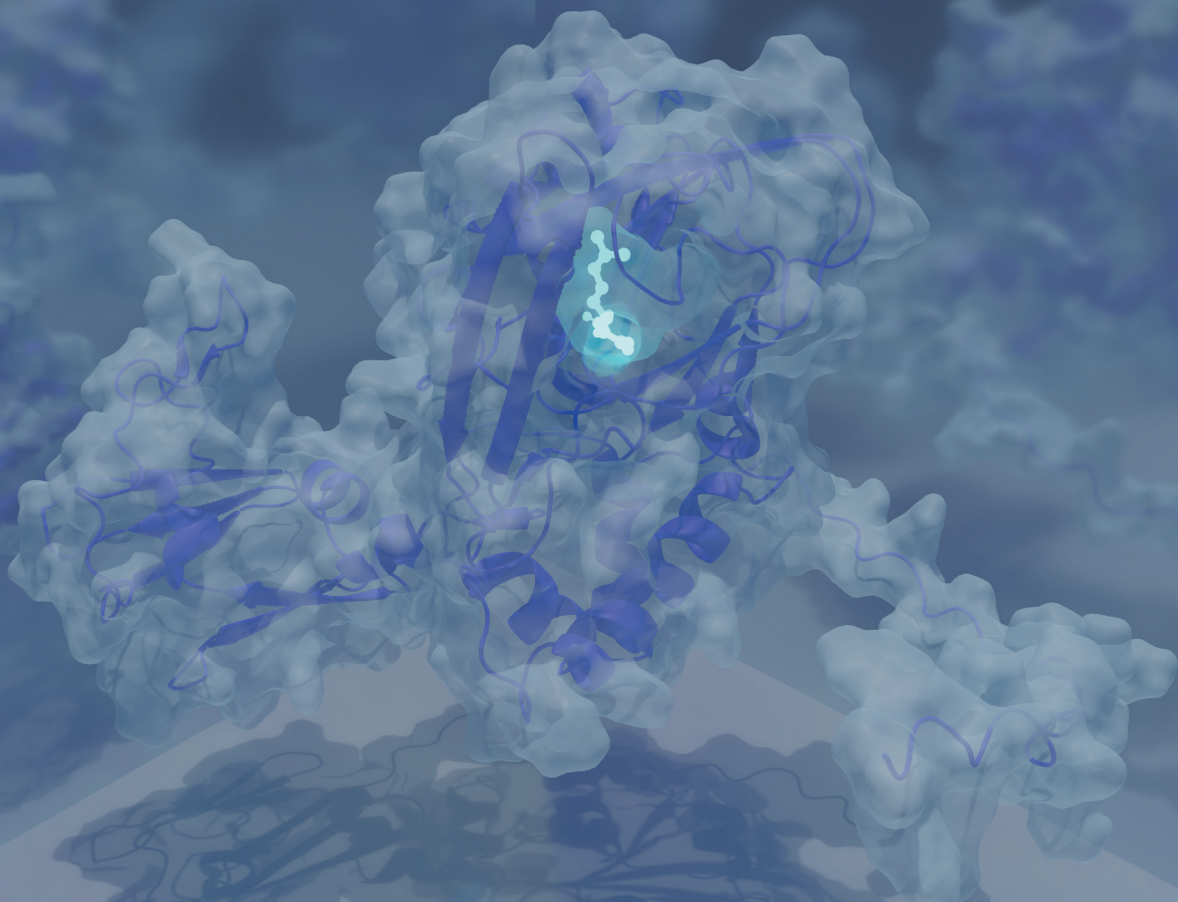


RĪGAS TEHNISKĀ
UNIVERSITĀTE

Diāna Zeļencova-Gopejenko

TAUKSKĀBJU METABOLISMA REGULĀCIJĀ IESAISTĪTO PROTEĪNU STRUKTURĀLIE UN FUNKCIONĀLIE PĒTĪJUMI

Promocijas darba kopsavilkums



RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte

Lietišķās ķīmijas institūts

Diāna Zeļencova-Gopejenko

Doktora studiju programmas “Ķīmija” doktorante

**TAUKSKĀBJU METABOLISMA REGULĀCIJĀ
IESAISTĪTO PROTEĪNU STRUKTURĀLIE UN
FUNKCIONĀLIE PĒTĪJUMI**

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskais vadītājs

Dr. chem. KRISTAPS JAUDZEMS

RTU Izdevniecība

Rīga 2023

Zeļencova-Gopejenko D. Taukskābju metabolisma
regulācijā iesaistīto proteīnu strukturālie un
funkcionālie pētījumi.
Promocijas darba kopsavilkums.
Rīga: RTU Izdevniecība, 2023. – 52 lpp.

Iespiests saskaņā ar promocijas padomes
“RTU P-01” 2023. gada 23. marta lēmumu,
protokols Nr. 04030-9.1/41.

Darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūta Fizikāli Organiskās ķīmijas
laboratorijā laikā no 2015. līdz 2023. gadam.

Pētījums saņēmis Latvijas Organiskās sintēzes institūta studentu grantu IG-2020-02,
IG-2021-02, IG-2022-04 un IG-2023-04 atbalstu.

Vāka attēla autore – Diāna Zeļencova-Gopejenko



<https://doi.org/10.7250/9789934229121>

ISBN 978-9934-22-912-1 (pdf)

PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2023. gada 21. jūnijā plkst. 14:00. Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un Lietišķās ķīmijas fakultātē, Rīgā, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Pētnieks *Ph. D.* Gints Kalniņš,
Latvijas Biomedicīnas studiju un pētījumu centrs, Latvija

Profesore *Dr. habil. biol.* Ruta Muceniece,
Latvijas Universitāte, Latvija

Vadošā pētniece *Dr. chem.* Dace Rasiņa
Latvijas Organiskās sintēzes institūts, Latvija

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Diāna Zeļencova-Gopejenko (paraksts)

Datums:

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā, tajā ir ievads, trīs nodaļas, secinājumi, literatūras saraksts, 142 attēli, 20 tabulas, 24 pielikumi, kopā 221 lappuse, ieskaitot pielikumus. Literatūras sarakstā ir 295 atsauces uz literatūras avotiem.

ANOTĀCIJA

Promocijas darbs veltīts taukskābju metabolismā iesaistīto γ -butirobetaīna dioksigenāzes (BBOX), ϵ -trimetil-*L*-lizīna dioksigenāzes (TMLD) un sirds taukskābes saistošā proteīna (FABP3) ligandu struktūras-aktivitātes likumsakarību izpētei. Proteīna-liganda saistības noteikšanai un raksturošanai izmantotas izotermālās titrēšanas kalorimetrijas (ITC), kodolu magnētiskās spektroskopijas (KMR) un molekulārās modelēšanas metodes. Izveidots protokols metālu saturošo proteīnu molekulārās dinamikas simulācijai, un tas veiksmīgi lietots BBOX un TMLD mimētiķiem. Noteikti BBOX un TMLD mimētiķu substrātu saistībai svarīgie strukturālie elementi, kas iesaistīti substrāta asociācijā/disociācijā. Izstrādātas divas jaunas ITC metodoloģijas, kas lietotas TMLD un FABP3 ligandu saistības termodinamikas raksturošanai. Pamatojoties uz eksperimentāliem datiem, izveidots TMLD potenciālo inhibitoru farmakoforais modelis. Atrasti jaunas savienojumu klases FABP3 substrāti ar atšķirīgu saistības mehānismu, salīdzinājumā ar taukskābēm.

Atslēgvārdi: BBOX, TMLD, FABP3, KMR, ITC, MOLEKULĀRAIS DOKINGS, MOLEKULĀRĀ DINAMIKA

SATURS

LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	7
PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS.....	9
Ievads.....	9
Promocijas darba mērķi.....	10
Darba mērķa īstenošanai noteiktie uzdevumi.....	10
Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti.....	10
Praktiskais lietojums.....	10
Darba struktūra un apjoms.....	11
Darba aprobācija, publikācijas un tēzes	11
1. LITERATŪRAS APSKATA KOPSAVILKUMS	13
1.1. BBOX un TMLD enzīmi.....	13
1.2. FABP3 transportproteīns	15
2. REZULTĀTU UN TO IZVĒRTĒŠANAS KOPSAVILKUMS.....	16
2.1. TMLD mimētiķu izveide uz BBOX bāzes	16
2.1.1. <i>In silico</i> BBOX mutantu un MD simulāciju protokola izstrāde.....	16
2.1.2. BBOX mutantu MD simulācijas	16
2.1.3. <i>In vitro</i> BBOX-4m un 2m mutantu izveide un iegūšana. Enzimātiskie testi	17
2.1.3.1. BBOX-4m iegūšana.....	17
2.1.3.2. BBOX-2m iegūšana.....	17
2.1.3.3. MBP-BBOX-4m un MBP-BBOX-2m enzimatiskie testi.....	17
2.2. TMLD modeļa izveide ar mākslīgo intelektu (<i>AlphaFold</i>).....	19
2.3. Aktīva MBP-TMLD iegūšanas optimizācija lielā apjomā	20
2.3.1. Ekspresijas un attīrīšanas apstākļu optimizācija	20
2.3.1.1. Ekspresijas barotnes testi	20
2.3.1.2. Stabilizējošo apstākļu meklējumi, izmantojot <i>TSA</i> metodi.....	21
2.3.1.3. Stabilizējošo piedevu testi šūnu sonifikācijas laikā.....	21
2.3.2. EDTA ietekme uz MBP-TMLD.....	23
2.4. <i>ITC</i> metodikas izstrāde MBP-TMLD enzīmam	23
2.5. TMLD struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte.....	24
2.5.1. TML analogu saistības likumsakarību izpēte.....	24
2.5.2. Farmakoforā modeļa izveide.....	29
2.5.3. TMLD enzimatiskās reakcijas izpēte	31
2.6. FABP3 lipoprotektīvās īpašības šūnu līmenī. Hipotēzes izveide	31
2.7. Apstākļu meklējumi FABP3 termodinamiskiem pētījumiem	32
2.7.1. TS šķīdības un šķīdumu stabilizējošo piedevu meklējumi.....	32
2.7.2. Piedevu efekts uz FABP3 struktūru	33
2.7.3. Stabilizējošo piedevu efekts uz termodinamiskajiem saistības parametriem.....	34
2.7.4. FABP3-laurināta saistības siltumkapacitātes noteikšana	35
2.8. FABP3 termodinamiskie pētījumi.....	35
2.8.1. FABP3-TS saistības termodinamika	35

2.8.2.	FABP3-acilkarnitīnu un palmitoil-CoA saistības termodinamika	37
2.8.3.	Piesātināto TS karnitīna esteru pētījumi.....	37
2.9.	Palmitoilkarnitīna efekts uz FABP3 pie zema pH.....	38
2.10.	FABP3 saistības validācija ar KMR	39
2.10.1.	Ķīmisko nobīžu perturbāciju analīzes pamatprincipi	39
2.10.2.	FABP3-ligandu kompleksu CSP analīze.....	39
2.10.3.	IFD aprēķini FABP3-acilkarnitīnu kompleksu izveidei.....	40
2.11.	Mononepiesātināto acilkarnitīnu saistības mehānisma izpēte	41
2.12.	FABP3 substrātu klāsta paplašināšana.....	45
	PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI.....	46
	SECINĀJUMI	47
	LITERATŪRAS SARAKSTS	48
	PATEICĪBAS.....	52

LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

1D	viendimensiju
2D	divdimensiju
3D	trīsdimensiju
α KG	α -ketoglutarāts
BBOX	γ -butirotbetaīna dioksigenāze
BSA	vērša seruma albumīns (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CMC	kritiskā micellu veidošanās koncentrācija
CoA	koenzīms A
CSP	ķīmisko nobīžu perturbācija (<i>Chemical Shift Perturbation</i>)
DLS	dinamiskā gaismas izkliede (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMPC	dimiristoilfosfatidilholīns
DSBH	dubultpavediena β -spirāles (<i>Double-Stranded β-Helix</i>) motīvs
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	etilēndiamintetraetiķskābe
FABP3	taukskābes saistošais proteīns 3 (<i>Fatty Acid Binding Protein 3</i>)
GBB	γ -butirotbetaīns
GroEL/ES	molekulārie šaperoni
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazīn-1-il]etāna sulfonskābe
HTML	β -hidroksi- ϵ -trimetil- <i>L</i> -lizīns
IC ₅₀	inhibējošā koncentrācija 50 (<i>half maximal inhibitory concentration</i>)
I/R	išēmijas/reperfūzijas
IFD	inducētās atbilstības dokings (<i>Induced Fit Docking</i>)
ITC	izotermālā titrēšanas kalorimetrija (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)
kDa	kilodaltoni
KMR	kodolu magnētiskā rezonanse
KPi	kālija fosfāta buferis
LC ₅₀	letālā koncentrācija 50 (<i>half maximal lethal concentration</i>)
MBP	maltozi saistošais proteīns (<i>Maltose Binding Protein</i>)
MD	molekulārā dinamika
mRNS	matrices ribonukleīnskābe
OGA	<i>N</i> -oksalilglicīns
PDB	proteīnu datubāze (<i>Protein Data Bank</i>)
PIPES	2,2'-(piperazīn-1,4-diil)di(etān-1-sulfonskābe)
RMSD	vidējā kvadrātiskā novirze (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
RMSF	vidējā kvadrātiskā fluktuācija (<i>Root Mean Square Fluctuation</i>)
S/H	sukcināta/hidroksilētā produkta attiecība
SASA	šķīdinātājam pieejamais virsmas laukums (<i>Solvent Accessible Surface Area</i>)
SDS-PAGE	nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gēla elektroforēze
SEC	izmēra izslēgšanas jeb gēlfiltrācijas hromatogrāfija (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)

TML	ϵ -trimetil- <i>L</i> -lizīns
TMLD	ϵ -trimetil- <i>L</i> -lizīna dioksigenāze
<i>TMLHE</i>	ϵ -trimetil- <i>L</i> -lizīna dioksigenāzi kodējošais gēns
TS	taukskābe
<i>TSA</i>	termiskās nobīdes analīze (<i>Thermal Shift Assay</i>)
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)-propān-1,3-diols

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Ievads

Sirds un asinsvadu slimības ir visizplatītākais nāves cēlonis visā pasaulē. Kopumā tās bija iemesls 31,4 % nāves gadījumu 2016. gadā, no kuriem 52,8 % gadījumu izraisīja išēmiskā sirds slimība [1]. Miokarda išēmijai raksturīga nepietiekama skābekļa piegāde sirds muskulim, ko vairumā gadījumu izraisa ateroskleroze. Išēmiskās sirds slimības īpatsvaru starp visiem nāves iemesliem paaugstina pasaules populācijas novecošanās. Rezultātā veidojas akūts pieprasījums pēc jauniem augsti efektīviem kardioprotektīviem medikamentiem, kas ievērojami palielinātu dzīves ilgumu un uzlabotu tās kvalitāti. Savukārt veiksmīgai zāļvielu izstrādei nepieciešama detalizēta sirds metabolisma ceļu izpēte.

Lai nodrošinātu kontrakcijas funkcijas un asins cirkulāciju, sirds metabolisms darbojas kā “visēdājs” un iegūst enerģiju (adenozīntrifosfāta veidā) no vairākiem enerģijas avotiem, galvenokārt izmantojot taukskābes (TS) un glikozi. Išēmijas/reperfūzijas (I/R) gadījumos, kad normāls sirds metabolisms ir traucēts, mainās pieejamo substrātu daudzumi un uzkrājas reaktīvas skābekļa formas (*Reactive Oxygen Species*), toksiskie lipīdu oksidēšanas starpprodukti, TS-koenzīma A (CoA) un karnitīna esteri [2]. Garķēžu acil-CoA ar augstu afinitāti spēj saistīt acil-CoA saistošais proteīns, un tā rezultātā šūnas tiek pasargātas no to augstās reaģētspējas un toksicitātes. Savukārt aizsargmehānismi pret garķēžu acilkarnitīnu nevēlamu darbību šūnās nav pētīti. Proponē, ka taukskābes saistošais proteīns 3 (FABP3), kas transportē TS no šūnas membrānas mitohondrijā, spēj saistīt ne tikai TS, bet arī to karnitīna esterus [3, 4].

Samazinot garķēžu TS un acilkarnitīnu koncentrāciju šūnā I/R gadījumā, var būtiski samazināt miokarda bojājumus. Šis ir jauns virziens kardioprotektīvo preparātu izstrādē, kas balstās uz acilkarnitīnu veidošanās kavēšanu mitohondrijos. Viens no efektīviem regulācijas veidiem būtu samazināt *L*-karnitīna pieejamību, ietekmējot tā biosintēzi un transportu. Šādi darbojas Latvijā izgudrotais meldonijs, kas ir γ -butirobetaīna dioksigenāzes (BBOX) inhibitors. Taču ārstniecības efekta sasniegšanai ir nepieciešamas augstas meldonija devas. Tāpēc definēts jauns terapeitiskais mērķis potenciālo kardioprotektīvo preparātu izstrādei – ϵ -trimetil-*L*-lizīna dioksigenāze (TMLD). TMLD ir pirmais enzīms *L*-karnitīna biosintēzē, kas, līdzīgi kā BBOX (ceturtais enzīms), katalizē stereospecifisko ϵ -trimetil-*L*-lizīna (TML) hidroksilēšanu par hidroksi-TML. Jaunākie pētījumi parādīja [5], ka “knock-out” pelēs ar izslēgtu *TMLHE* gēnu, novēroja garķēžu acilkarnitīnu satura samazināšanos un palēninātu TS oksidāciju. Rezultātā novēroja arī ievērojamu samazinājumu infarkta lielumā (skarto šūnu apjomā). Šie atklājumi izvirza TMLD kā jaunu terapeitisko mērķi kardioprotektīvo preparātu dizainam. Taču racionālo inhibitoru izstrādi apgrūtinātas, ka TMLD 3D struktūra nav eksperimentāli noteikta (līdz šim visi kristalizācijas mēģinājumi bijuši neveiksmīgi).

Promocijas darba mērķi

Promocijas darba mērķi ir:

1. atrast ligandu saistībai svarīgus farmakoforus un modelēt TMLD aktīvā centra struktūru ar nolūku attīstīt *de novo* inhibitoru dizainu;
2. izpētīt FABP3 spēju saistīt garķēžu acilkarnitīnus un noskaidrot saistības mehānismu, kas ir pamatā tā spējai pasargāt šūnas no acilkarnitīnu izraisītajiem bojājumiem.

Darba mērķa īstenošanai noteiktie uzdevumi

1. Izveidot TMLD mimētiķus uz BBOX bāzes un pārbaudīt dabiskā substrāta un tā analogu saistību *in silico* un *in vitro*.
2. Izpētīt dabiskā substrāta un tā analogu saistības termodinamiku un konversijas pakāpes enzimatiskajā reakcijā ar TMLD.
3. Noteikt dažāda garuma TS un to karnitīna esteru saistības ar FABP3 afinitāti un termodinamiku.
4. Noteikt FABP3 un acilkarnitīnu saistības mehānismu.

Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

Promocijas darba gaitā pētītas *L*-karnitīna biosintēzes un TS metabolisma regulācijas iespējas jaunu zāļvielu dizainam.

1. Izpētīti TMLD un potenciālo inhibitoru saistības termodinamiskie raksturlielumi un konversijas pakāpes enzimatiskajā reakcijā.
2. Noteikti ligandu saistībai svarīgie farmakofori un TMLD inhibīciju veicinošie struktūrelementi.
3. Pierādīta FABP3 lipoprotektīvā iedarbība un spēja pasargāt šūnas no acilkarnitīnu toksiskās iedarbības.
4. Izveidota jauna garķēžu TS mijiedarbības ar FABP3 testēšanas metode ūdens buferos ar izotermālo titrēšanas kalorimetriju (*ITC*).
5. Noteikts acilkarnitīnu un FABP3 saistības mehānisms.

Praktiskais lietojums

Daudzpusīgai un izsmeļošai proteīna-ligandu mijiedarbības izpētei un saistības mehānisma raksturošanai ir liela nozīme struktūras-aktivitātes likumsakarību noteikšanai, ko savukārt var izmantot *de novo* inhibitoru dizainam. Papildu zināšanās par proteīnu dinamiku var palīdzēt jauno zāļvielu līdersavienojumu (*hit-to-lead*) struktūras optimizācijā.

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs veltīts TS metabolisma regulācijā iesaistīto proteīnu, BBOX, TMLD un FABP3 strukturāliem un funkcionāliem pētījumiem. Darbs uzrakstīts latviešu valodā ar apjomu 221 lappuse, ieskaitot pielikumus.

Darba aprobācija, publikācijas un tēzes

Publikācijas par promocijas darba tēmu recenzējamos starptautiskajos izdevumos

1. **Zelencova-Gopejenko, D.**; Videja, M.; Grandane, A.; Pudnika-Okinčica, L.; Sipola, A.; Vilks, K.; Dambrova, M.; Jaudzems, K.; Liepinsh, E. Heart-Type Fatty Acid Binding Protein Binds Long-Chain Acylcarnitines and Protects Against Lipotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (6), 5528.
2. **Zelencova-Gopejenko, D.**; Grandane, A.; Loza, E.; Lola, D.; Sipola, A.; Liepinsh, E.; Arsenyan, P.; Jaudzems, K. Binding versus Enzymatic Processing of ϵ -Trimethyllysine Dioxygenase Substrate Analogues. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13* (11), 1723–1729.
3. Tars, K.; Leitans, J.; Kazaks, A.; **Zelencova, D.**; Liepinsh, E.; Kuka, J.; Makrecka, M.; Lola, D.; Andrianovs, V.; Gustina, D.; Grinberga, S.; Liepinsh, E.; Kalvinsh, I.; Dambrova, M.; Loza, E.; Pugovics, O. Targeting Carnitine Biosynthesis: Discovery of New Inhibitors against γ -Butyrobetaine Hydroxylase. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (6), 2213–2236.

Starptautiskās konferences, kurā ziņots par darba rezultātiem

1. **Zelencova-Gopejenko D.**; Jaudzems K. Binding Specificity and Thermodynamics of Fatty Acids and Acylcarnitines Affinity to Heart-Type Fatty Acid Binding Protein. *2nd Drug Discovery Conference*. September 22–24, **2022**, Riga, Latvia.
2. **Zelencova-Gopejenko D.**; Metlans R.; Jaudzems K. Insights into binding specificity of human heart-type fatty-acid binding protein. *7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*. November 1–30, **2021**, sciforum-053367.
3. **Zelencova D.**; Vilks K.; Makrecka-Kuka M.; Liepinsh E.; Jaudzems K. Investigation of protective effects of fatty acid binding protein 3 against long-chain fatty acid derivative-induced damage. *6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*. November 1–30, **2020**, sciforum-040478.
4. **Zelencova D.**; Liepinsh E. Mapping the Active Site of epsilon-Trimethyllysine Hydroxylase. *Biochem. Mol. Biol. J.*, **2018**, *04*, 47. *10th Edition of International Conference on Structural Biology*, Barcelona, Spain.
5. **Zelencova D.**; Liepiņš E. Mapping of the Active Site of ϵ -Trimethyllysine Hydroxylase. *Paul Walden 10th Symposium on Organic Chemistry*, Riga, Latvia. **2017**.
6. **Zelencova D.**; Liepinsh E. Inhibitor Studies of Epsilon-Trimethyllysine Hydroxylase by Means of NMR and Computer Modelling. *EUROMAR-2016*, Aarhus, Denmark, **2016**, 433.
7. **Zelencova, D.**; Liepinsh E. Structural Models and Binding Studies of Epsilon-Trimethyllysine Hydroxylase. *MSAC 2016*, 196–200.

8. **Zelencova D.**; Liepinsh E. ϵ -Trimethyllysine Hydroxylase. Search of Inhibitors. *Drug Discovery Conference*, Riga, Latvia, **2015**, 166.

Citas publikācijas

1. **Zelencova-Gopejenko, D.**; Andrianov, V.; Domracheva, I.; Kanepe-Lapsa, I.; Milczarek, M.; Stojak, M.; Przyborowski, K.; Fedak, FA.; Walczak, M.; Kramkowski, K.; Wietrzyk, J.; Chłopicki, S.; Kalvins, I. Aromatic Sulphonamides of Aziridine-2-Carboxylic Acid Derivatives as Novel PDIA1 and PDIA3 Inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2023**, 38 (1), 2158187.
2. Bobrovs, R.; Basens, E. E.; Drunka, L.; Kanepe, I.; Matisone, S.; Velins, K. K.; Andrianov, V.; Leitis, G.; **Zelencova-Gopejenko, D.**; Rasina, D.; Jirgensons, A.; Jaudzems, K. Exploring Aspartic Protease Inhibitor Binding to Design Selective Antimalarials. *J. Chem. Inf. Model.* **2022**, 62 (13), 3263–3273.
3. Leite, I.; Andrianov, V.; **Zelencova-Gopejenko, D.**; Loza, E.; Kazhoka-Lapsa, I.; Domracheva, I.; Stoyak, M.; Chłopicki, S.; Kalvins, I. Aziridine-2-Carboxylic Acid Derivatives and Its Open-Ring Isomers as a Novel PDIA1 Inhibitors. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2021**, 57 (11), 1086–1106.
4. Vitkovska, V.; Zogota, R.; Kalnins, T.; **Zelencova, D.**; Suna, E. Aliphatic Chain-Containing Macrocycles as Diazonamide A Analogs. *Chem. Heterocycl. Compd.*, **2020**, 56 (5), 586–602.
5. Brangulis, K.; Akopjana, I.; Petrovskis, I.; Kazaks, A.; **Zelencova, D.**; Jekabsons, A.; Jaudzems, K.; Tars, K. BBE31 from the Lyme Disease Agent *Borrelia burgdorferi*, Known to Play an Important Role in Successful Colonization of the Mammalian Host, Shows the Ability to Bind Glutathione. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **2020**, 1864 (3), 129499.
6. Czarna, A.; Wang, J.; **Zelencova, D.**; Kildalsen, H.; Seternes, O. M.; Gray, N.; Engh, R. A.; Rothweiler, U. Novel Scaffolds for DYRK1A inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2018**, 61 (17), 7560–7572.

Autores patenti

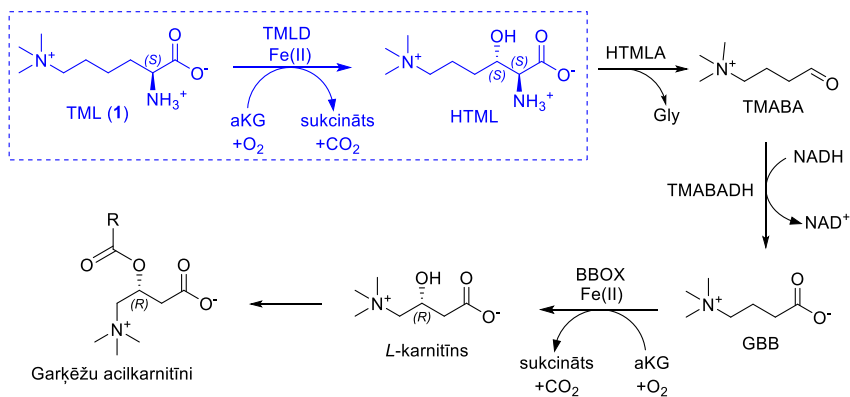
1. Kalvins, I.; Chłopicki, S.; Andrianov, V.; Stojak, M.; Domracheva, I.; Kanepe-Lapsa, I.; **Zelencova, D.**; Wietrzyk, J.; Turlej, E.; Stachowicz, M.; Jarosz, J.; Milczarek, M.; Kramkowski, K. Aromatic Sulphonamides Derivatives that Inhibits PDI A1, Their Synthesis and Use. WO2021141506A1, **2021**.
2. Chłopicki, S.; Kalvins, I.; Przyborowski, K.; Stojak, M.; Andrianov, V.; Domracheva, I.; Kanepe-Lapsa, I.; **Zelencova, D.**; Wietrzyk, J.; Turlej, E.; Stachowicz, M.; Jarosz, J.; Milczarek, M.; Kramkowski, K. Aromatic Sulphonamides Derivatives that Inhibits PDI A3, Their Synthesis and Use. WO2021141507A1, **2021**.
3. Kalvins, I.; Pyrc, K.; Chłopicki, S.; Andrianov, V.; Domracheva, I.; Kanepe-Lapsa, I.; **Zelencova, D.**; Milewska, A.; Botwina, P. Antiviral Aromatic Sulphonamides Derivatives, Their Method of Synthesis and Use. WO2021141508A1, **2021**.

1. LITERATŪRAS APSKATA KOPSAVILKUMS

Promocijas darba literatūras apskatā apkopota jaunākā literatūra par darbā pētāmiem enzīmiem, BBOX un TMLD, un TS transportproteīnu, FABP3. Dots ieskats darbā izmantotajās fizikāli ķīmiskajās metodēs kā dinamiskā gaismas izkliede (*DLS*), termiskās nobīdes analīze (*TSA*), *ITC*, proteīnu KMR un molekulāra dinamika (*MD*). Literatūras kopsavilkumā apkopota informācija par pētāmiem proteīniem, kas ir svarīga labākai rezultātu izpratnei.

1.1. BBOX un TMLD enzīmi

Acilkarnitīni organismā veidojas esterificēšanās reakcijā starp acil-CoA un *L*-karnitīnu ar karnitīna palmitoiltransferāzes 1 starpniecību. Tie ir TS transportforma un nodrošina TS transportu no citosola uz mitohondriju matricu, kurā tie pakļaujas β -oksidācijai [6–8]. Acilkarnitīnu sintēzi iespējams būtiski palēnināt, samazinot *L*-karnitīna biopieejamību. *L*-karnitīnu organisms spēj iegūt no uztura, kā arī biosintezēt endogēni četru secīgo enzīmātisko reakciju rezultātā (1.1. att.) [8, 9]. Divi svarīgi enzīmi šajā reakciju kaskadē ir TMLD (EC 1.14.11.8) un BBOX (EC 1.14.11.1). Tie attiecīgi katalizē pirmo un pēdējo reakciju, kurās notiek atbilstošā substrāta [TML vai γ -butirolbetaīna (GBB)] stereospecifiskā hidroksilēšana β -pozīcijā (1.1. att.). Turklāt abu reakcijas produktu [β -hidroksi- ϵ -trimetil-*L*-lizīna (HTML) un *L*-karnitīna] jaunā hirālā centra konfigurācija ir identiska attiecībā pret karboksil- un trimetilamonija grupu izvietojumu [10, 11]. Abi enzīmi pieder vienai no nehēma (*non-heme*) Fe(II) un no α -ketoglutarāta (α KG) atkarīgai oksigenāžu ģimenei [12–14]. Tiem novēro 23 % pirmējās struktūras identitāti, kas padara BBOX un TMLD par tuvākajiem homoloģiem.



1.1. att. *L*-Karnitīna biosintēze.

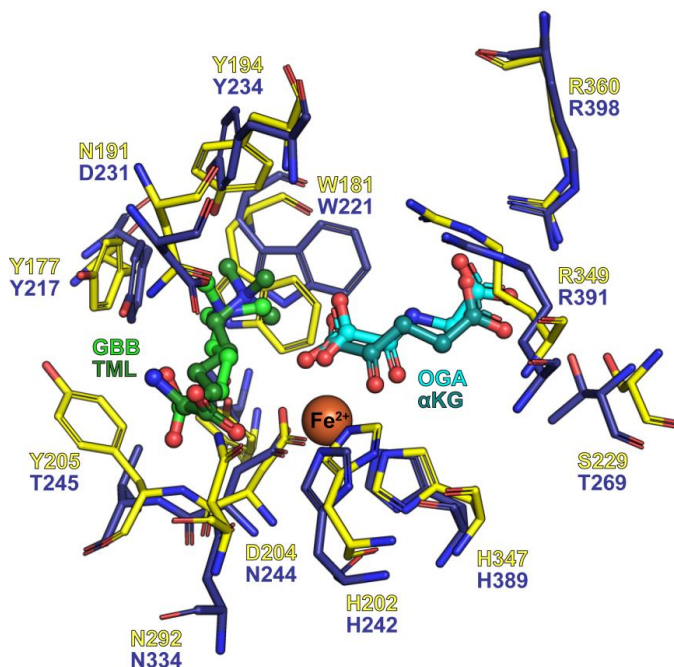
TML: ϵ -trimetil-*L*-lizīns, TMLD: TML dioksigenāze, HTML: β -hidroksi-TML, HTMLA: HTML aldolāze, TMABA: trimetilamīna butīraldehīds, TMABADH: TMABA dehidrogenāze, GBB: γ -butirolbetaīns, BBOX: GBB dioksigenāze.

Līdz šim ir iegūtas vairākas BBOX kristalogrāfiskās struktūras gan apo-formai [15], gan arī kompleksos ar dažādiem ligandiem (holo-forma) [16–18]. Savukārt visi mēģinājumi iegūt TMLD eksperimentālo telpisko struktūru ar kristalizācijas palīdzību bijuši neveiksmīgi, un TMLD izmērs ir par lielu 3D struktūras noteikšanai ar šķidrumu KMR. Rezultātā TMLD aktīvā centra izpētei lietota alternatīva metode – mutagēnēze.

Pateicoties 19 jaunizveidotiem cilvēku TMLD mutantiem [19], izdevās pierādīt sekojošo aminoskābju atlikumu svarīgumu kofaktoru vai substrāta saistībā:

- 1) Fe(II) helatējošās aminoskābes, katalītiskā triāde: H242, D244 un H389;
- 2) α KG saistošās aminoskābes: R391 un R398;
- 3) TML trimetilamonija grupas saistošās aminoskābes [t. s. “aromātiskais būris” (*aromatic cage*)]: Y217, W221 un Y234;
- 4) TML α -amino- un karboksilgrupu saistošās aminoskābes: D231, N334 un Y404.

Izmantojot iegūtos datus un homoloģisko modelēšanu, izveidots TMLD aktīvā centra modelis (1.2. att.), kas ļoti labi atspoguļo eksperimentālos datus [19].

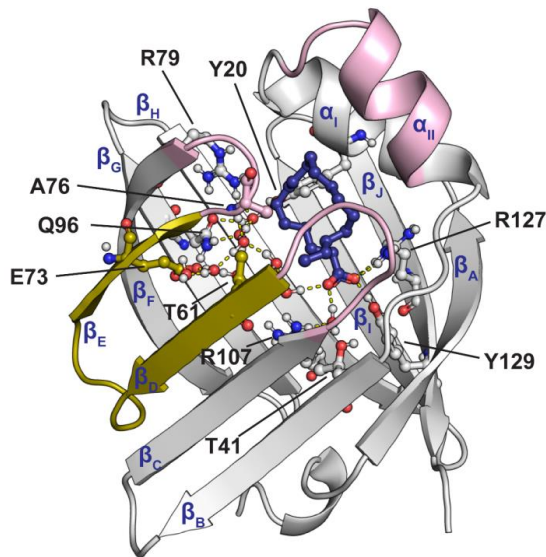


1.2. att. BBOX kristāla (PDB ID 4C5W) un TMLD homoloģiskā modeļa aktīvo centru superpozīcija [19].

BBOX (dzeltenā krāsā) un TMLD (tumši zilā krāsā) aminoskābju atlikumi atspoguļoti kā nūjiņas (*tubes*) ar atbilstošo nosaukumu. Fe(II) attēlots kā brūna sfēra, *N*-oksalilglicīns (OGA) un α KG – attēloti kā gaiši zilas un zilganzaļas lodītes un nūjiņas (*ball-and-stick*). TML atspoguļots kā tumši zaļas, GBB – kā gaiši zaļas lodītes un nūjiņas. Izveidots *PyMOL* programmā [20].

1.2. FABP3 transportproteīns

Sirds FABP jeb H-FABP vai FABP3 (*UniProt* ID P05413 [21]) ir viens no izplatītākajiem FABP pārstāvjiem, kas sastopams ne tikai sirds, bet arī nieru, skeleta muskuļu, aortas, virsnieru dziedzeru, placentas, smadzeņu, sēklinieku, olnīcu, plaušu, piena dziedzera un kuņģa audos [22]. Turklāt tas ir vienīgais FABP ģimenes pārstāvis, kas sastopams sirds un sarkanajos skeleta muskuļaudos [23]. FABP3 ir mazs (14,9 kDa) globulārs proteīns, kas pieder lipīdu saistošo proteīnu superģimenei. To galvenā funkcija ir augsti lipofilo TS transports citosolā, rezultātā regulējot tādas iekššūnu funkcijas kā membrānu fosfolipīdu sintēze, lipīdu metabolisms un mitohondriju β -oksidēšana [22, 24]. Proteīna struktūra sastāv no pieckēžu antiparalēlo β -lapu pāriem (*pair of five stranded antiparallel β -sheets*), kas veido mucu β_A – β_J , noslēgtu ar divām īsam α -spirālēm: α_I un α_{II} . Rezultātā veidojas liels iekšējais dobums, kas spēj saistīt vienu garķēžu TS (1.3. att.). Blakus esošās antiparalēlās β -virknes, β_D un β_E atrodas tālu viena no otras un nespēj veidot starpķēžu ūdeņraža saites, veidojot t. s. spraugu (*gap*, 1.3. att., tumši dzeltenšs reģions). Aktīvajā centrā garķēžu TS ieņem U veida konformāciju un ar karboksilgrupu saistās ar R127 un Y129. Savukārt TS alkilķēde saistās ar lipofiliem aminoskābes atlikumiem, kas veido aktīvā centra atveri (portālu) – α_{II} -spirāle un cilpas starp C–E un E–F β -virknēm (1.3. att., rozā reģions) – un aktīvā centra iedobi [25–27].



1.3. att. FABP3 proteīna struktūra kompleksā ar palmitātu (C16:0) un iekšējām ūdens molekulām (PDB ID 3WVM).

Proteīna struktūra lentes atspoguļojumā (pelēka krāsā) kopā ar saistīto ligandu (tumši zilas lodītes un nūjiņas) un ūdens molekulām (sarkanās sfēras). Liganda iecejas portāls aktīvajā centrā (rozā) un spraugas reģions starp β_D un β_E β -virknēm (*gap*, tumši dzeltenā krāsā). Ūdeņraža saites atspoguļotas kā dzeltenas pārtrauktas līnijas. Izveidots *PyMOL* programmā [20].

2. REZULTĀTU UN TO IZVĒRTĒŠANAS KOPSAVILKUMS

2.1. TMLD mimētiķu izveide uz BBOX bāzes

2.1.1. *In silico* BBOX mutantu un MD simulāciju protokola izstrāde

Analizējot BBOX aktīvo centru, noteiktas 18 aminoskābes, kas ir tiešā kontaktā ar BBOX substrātu, GBB un kofaktoriem, Fe(II)/ α KG, un nodrošina to atpazīšanu un saistību: Y177, W181, V183, N191, A193, Y194, L199, H202, D204, Y205, P206, N292, T295, H347, R349, R360, L362 un Y366. Reģions ap Fe(II)/ α KG saistīšanas vietu saglabājas par 89 %, savukārt substrātu saistīšanas vieta saglabājas tikai par 64 %. Visticamāk, novērojamās aminoskābju atlikumu atšķirības enzīma aktīvajā centrā, N191D, Y205T, P206T un T295D, nodrošina TML α -aminogrupas atpazīšanu.

Balstoties uz TMLD mutāģenēzes [19] un BBOX/TMLD sekvenču analīzi, izveidoti četri *in silico* BBOX mutanti:

- 1) BBOX-2m: N191D, T295D;
- 2) BBOX-4m: N191D, Y205T, P206T, T295D;
- 3) BBOX-5m: V183F, N191D, Y205T, P206T, T295D;
- 4) BBOX-7m: Q182Y, V183F, Q184T, N191D, Y205T, P206T, T295D.

Jaunizveidoto BBOX mutantu stabilitāti sākumā pārbaudīja *in silico*, izmantojot MD simulācijas. Šim nolūkam uz BBOX (PDB ID 3O2G) bāzes tika izstrādāts MD protokols. Gan BBOX, gan arī TMLD abi ir metālproteīni. Rezultātā Fe(II) tetragonālās bipiramīdas uzturēšanai simulācijā ieviesa papildu spēka lauka potenciālus (*restraint potential*), jo klasiskā molekulārā mehānika nespēj atveidot lādiņu sadalījumu šādās sistēmās. Vislabākie rezultāti sasniegti, iesaldējot visus 12 bipiramīdas divplakņu kakta leņķus. Enzīma-ligandu kontaktu tīkla (*network*) analīze parādīja, ka tetragonālās bipiramīdas iesaldēšana neietekmēja mijiedarbību veidošanos starp BBOX, α KG un GBB.

2.1.2. BBOX mutantu MD simulācijas

BBOX mutantu kompleksu ar GBB vai TML stabilitāte tika pārbaudīta 100 ns garās MD simulācijās, kā rezultatīvos rādītājus izmantojot vidējās kvadrātiskās novirzes (*Root Mean Square Deviation, RMSD*), vidējās kvadrātiskās fluktuācijas (*Root Mean Square Fluctuation, RMSF*) un šķīdinātājam pieejamā virsmas laukuma (*Solvent Accessible Surface Area, SASA*) analīzi. Dažās simulācijās novēroja substrāta (GBB vai TML) atsaistīšanos no enzīma aktīvā centra. Nestabilākiem kompleksiem (piemēram, BBOX-4m-GBB) šī atsaistīšanās notika jau pašā simulācijas sākumā (pēc ~10–20 ns). Rezultātā pierādīts, ka jaunizveidotie BBOX mutanti daudz labāk saistīja TML nekā GBB.

Balstoties uz četrām dažādu BBOX mutantu MD datu analīzi, secināts, ka visstabilākie ir TML kompleksi ar BBOX-2m un BBOX-4m. Rezultātā tieši šīs divas enzīma formas turpinājumā pārbaudītas eksperimentāli.

2.1.3. *In vitro* BBOX-4m un 2m mutantu izveide un iegūšana. Enzimātiskie testi

2.1.3.1. BBOX-4m iegūšana

Ieviešot četras mutācijas (N191D, Y205T, P206T un T295D) BBOX aktīvajā centrā, tas kļuva tikpat nestabils kā TMLD enzīms. Rezultātā aktīvo BBOX-4m enzīmu izdevās iegūt tikai himēriskā (*fusion*¹) proteīna veidā ar maltozi saistošo proteīnu (*Maltose Binding Protein*, MBP). Ekspresiju veica *E. Coli* BL21-AI šūnās molekulāru šaperonu GroEL/ES klātbūtnē, līdzīgi kā TMLD gadījumā [28]. Ekspresijas testi parādīja, ka šķīstoša MBP-BBOX-4m veidošanos varēja uzlabot, samazinot kultivēšanas temperatūru no 37 °C līdz 16 °C. Rezultātā iegūti šādi MBP-BBOX-4m beigu iznākumi:

- 1) 37 °C: ~ 0,3 mg/L *2xYT* barotnes;
- 2) 16 °C: ~ 1,9 mg/L *2xYT* barotnes.

2.1.3.2. BBOX-2m iegūšana

Savukārt BBOX-2m ar N191D un T295D mutācijām izradījās daudz stabilāks nekā BBOX-4m. Tomēr to arī izdevās iegūt tikai MBP-BBOX-2m himēriskā proteīna veidā ar šādiem beigu iznākumiem:

- 1) 37 °C: ~ 2,4 mg/L *2xYT* barotnes;
- 2) 16 °C: ~ 6,6 mg/L *2xYT* barotnes.

Kā redzams, ekspresējot 37 °C temperatūrā iegūts līdz pat astoņām reizēm vairāk, 16 °C temperatūrā – 3,5 reizes vairāk divkārtējā mutanta nekā četrkārtējā mutanta. Iegūtie eksperimentālie dati liecina, ka mutācijas Y205T un P206T stipri destabilizē BBOX struktūru, un tā rezultātā ievērojami samazinās enzīma iznākumi. Iespējams, šo mutāciju ieviešanai būtu jāveic papildu mutācijas otrā ligandu koordinācijas sfērā (> 4 Å attālumā), lai kompensētu palielināto kustīgumu aktīvajā centrā. Tomēr lielāks mutāciju skaits var stipri izmainīt BBOX struktūru, padarot izveidoto mimētiķi mazinformatīvu.

2.1.3.3. MBP-BBOX-4m un MBP-BBOX-2m enzimatiskie testi

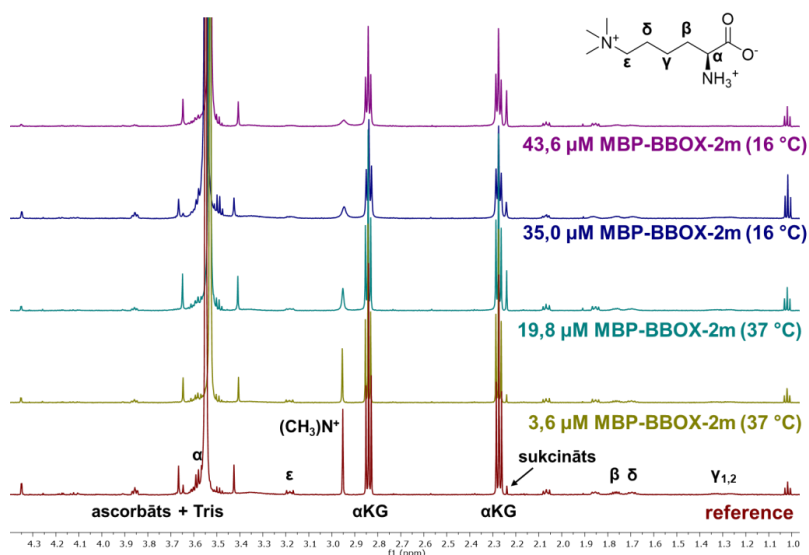
Iegūto BBOX mutantu aktivitāte pārbaudīta enzimatiskajās reakcijās, ko novēroja, izmantojot 1D ¹H KMR spektroskopiju. Kā substrātus izmantoja 200 μM TML, GBB vai δ-trimetil-L-orniīnu. Sākumā reakcijai izmantoja 3,0 μM enzīmu. Diemžēl nevienā no paraugiem ligandu ķīmisko nobīžu vai stipru signālu intensitāšu izmaiņas nenovēroja. Tas liecina, ka nevienā no reakcijas maisījumiem strauja substrāta vai αKG konversija nenotika.

Savukārt augstākās enzīma koncentrācijās novēroja sukcināta signāla intensitātes pieaugumu 4–6 reizes, salīdzinot ar references spektru. Turklāt, palielinot koncentrāciju līdz 19,8 μM, spektrā (2.1. att.), novēroja ievērojamu (CH₃)₃N⁺ signāla līniju paplašināšanos (*line*

¹ *fusion* (sapludinātais) jeb himēriskais proteīns – proteīns, kas sastāv no diviem vai vairākiem kovalenti saistītiem proteīniem/proteīnu domēniem, kas dabā nav sastopami.

broadening). Šis efekts kļūst arvien izteiktāks, palielinot enzīma koncentrāciju līdz 43,6 μM (enzīma-liganda attiecība 1 : 4,6). Signāla platumu vērtības atkarībā no enzīma koncentrācijas apkopotas 2.1. tabulā. Salīdzinot enzīmātiskās reakcijas spektrus visiem trim ligandiem un to signālu platumu datus, var secināt, ka MBP-BBOX-2m veidojas preference pret α-aminogrupu saturošiem substrātiem. Enzīma mutantu funkcionalitātes pārbaudei būtu jāņem vērā realizēt enzīmātisko reakciju ar α-amino-GBB, kas ir BBOX no *Pseudomonas sp.* substrāts [29].

Kopumā, neraugoties uz pārliecinošiem MD datiem, izskatās, ka substrāta selektivitātes maiņai BBOX aktīvajā centrā būtu jāveic vairāk mutāciju, lai “iemācītu” to pārstrādāt TML. Visticamāk, būtu jāpalielina βI/βII, βII/βIII un βIII/βIV cilpu garumi, kas dubultpavediena β-spirāles (*DSBH*) motīva struktūrā aptver aktīvo centru un piedalās substrāta saistībā.



2.1. att. 1D ¹H KMR spektri MBP-BBOX-2m enzīmātiskajai reakcijai ar TML.

Spektrs sarkanā krāsā – enzīmātiskā maisījuma references spektrs ar 200 μM TML, bez enzīma pievienošanas. Spektrs dzeltenā krāsā – 200 μM TML kopā ar 3,6 μM MBP-BBOX-2m (ekspressēts 37 °C) pēc 1 h inkubācijas 37 °C. Spektrs gaiši zilā krāsā – 200 μM TML kopā ar 19,8 μM MBP-BBOX-2m (ekspressēts 37 °C) pēc 1 h inkubācijas 37 °C. Spektrs tumši zilā krāsā – 200 μM TML kopā ar 35,0 μM MBP-BBOX-2m (ekspressēts 16 °C) pēc 1 h inkubācijas 37 °C. Spektrs violetā krāsā – 200 μM TML kopā ar 43,6 μM MBP-BBOX-2m (ekspressēts 37 °C) pēc 1 h inkubācijas 37 °C.

2.1. tabula

(CH₃)₃N⁺ grupas signāla platumu izmaiņas atkarībā no MBP-BBOX-2m koncentrācijas

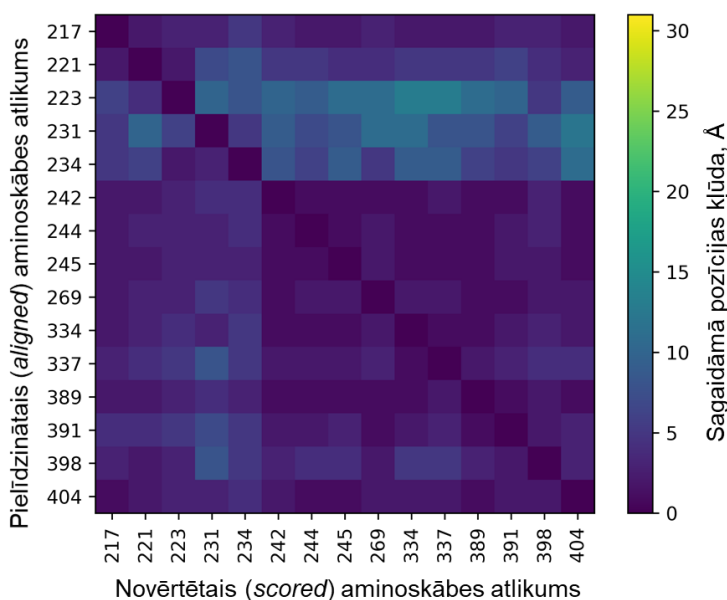
Enzīma konc., μM	TML, ppm	GBB, ppm	δ-trimetil-L-ornitīns, ppm
0	1,80	1,64	2,0
3,6	1,84	1,71	n/d
19,8	5,56	2,67	n/d
35,0	12,11	n/d	13,08
43,6	17,27	4,46	n/d

n/d – nav datu.

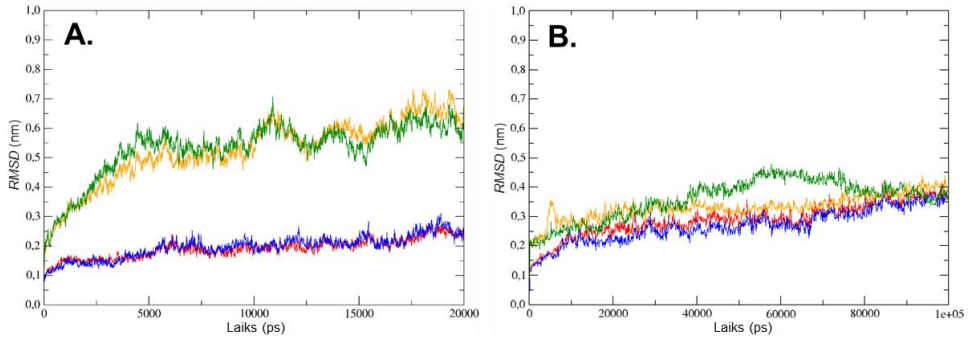
2.2. TMLD modeļa izveide ar mākslīgo intelektu (*AlphaFold*)

AlphaFold datubāzē [30, 31] pieejama cilvēku pilna garuma TMLD struktūra kopā ar modeļa ticamības rādītājiem, kas parāda strukturālā un katalītiskā domēna modeļa ļoti augstu ticamību. Izrēķinātās pozīciju kļūdas atspoguļo kā 2D grafiku, kur pozīciju kļūdas norāda ar krāsu gradientu, sākot no tumši zila līdz spilgti dzeltenam, kur tumšākie reģioni atbilst vismazākajai pozīcijas kļūdai. Analizējot sagaidāmās pozīciju kļūdas TMLD modeļa aktīvā centra 15 aminoskābju atlikumiem, ar darba autore uzrakstīta *Python v.3* skripta palīdzību izveidots jauns 2D grafiks (2.2. att.). Kā redzams, visticamākais reģions ir ap Fe(II)/ α KG saistīšanas vietu (attiecīgi H242, D244, H389 un R391, R398). TML saistīšanās vietā izveidojas divi reģioni, viens – ar augstāko (Y217, W221, T245, T269, N334, D337 un Y404), otrs – ar zemāko (F223, D231 un Y234) ticamību. Tomēr *AlphaFold* modelis MD simulācijas laikā bija daudz stabilāks nekā TMLD enzīma homoloģiskais modelis [32] (2.3. att.).

Kopumā TMLD modelis, kas iegūts ar mākslīgo neironu tīkla palīdzību, izskatās daudz stabilāks un ticamāks par iepriekš izveidotajiem homoloģiskajiem modeļiem un labi sakrīt ar eksperimentālajiem datiem no TMLD mutantiem [33]. Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, TMLD *AlphaFold* modeli turpmāk izmantoja enzīma-ligandu kompleksu modelēšanai ar nolūku racionalizēt iegūtos eksperimentālos datus un izveidot struktūras-aktivitātes likumsakarības.



2.2. att. Sagaidāmā pozīcijas kļūda TMLD modeļa aktīva centra aminoskābju atlikumam x , kas piedalās liganda saistīšanā, kad aprēķinātā un eksperimentālā struktūras pielīdzinātas (*aligned*) uz aminoskābes atlikuma y , aprēķināta ar *AlphaFold*. Tumši zilie reģioni – nav kļūdas, dzeltenie – reģioni ar lielu pozīcijas kļūdu.



2.3. att. RMSD izmaiņas BBOX (PDB ID 3O2G) un TMLD modeļu MD simulācijās.

A. 20 ns MD simulāciju RMSD salīdzinājums BBOX (PDB ID 3O2G) un TMLD homoloģiskajam modelim, kas sagatavots ar *Prime* [34] palīdzību [32]. **B.** 100 ns MD simulāciju RMSD salīdzinājums BBOX (PDB ID 3O2G) un TMLD modelim no *AlphaFold*. BBOX RMSD ķēdei A – sarkanā krāsā; BBOX RMSD ķēdei B – zilā krāsā; TMLD RMSD ķēdei A – dzeltenā krāsā; TMLD RMSD ķēdei B – zaļā krāsā.

2.3. Aktīva MBP-TMLD iegūšanas optimizācija lielā apjomā

2.3.1. Ekspresijas un attīršanas apstākļu optimizācija

2.3.1.1. Ekspresijas barotnes testi

MBP-TMLD galaiznākumu optimizācijai tika pārbaudīta četru *E. Coli* kultivēšanas barotņu ietekme uz MBP-TMLD iznākumu un agregātu veidošanos:

- 1) *LB* (*Lysogeny broth*) – standarta baktēriju ekspresijas barotne;
- 2) *2xYT* – bagātināta barotne, kurā, salīdzinot ar *LB*, divas reizes palielināts triptona un rauga daudzums;
- 3) *2xYT* barotne ar 100 μM Zn(II) piedevu, kas varētu uzlabot Zn(II) pirkstu motīva veidošanos *N*-termināla strukturālajā domēnā;
- 4) *TB* (*Terrific broth*) – augsti bagātināta barotne kopā ar pievienotiem mikroelementiem².

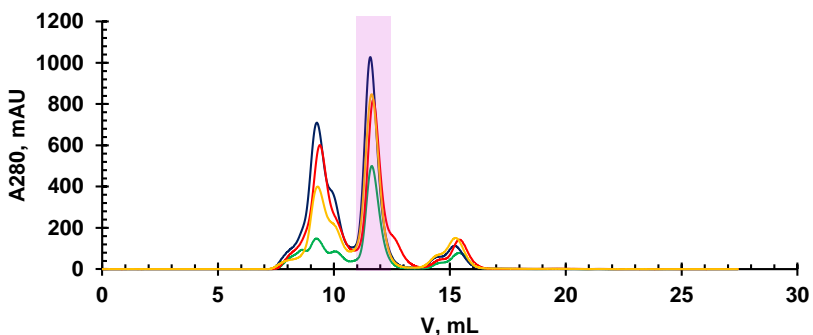
2.2. tabula

MBP-TMLD iznākumi *E. Coli* kultivēšanas barotnēs

	<i>LB</i>	<i>2xYT</i>	<i>2xYT</i> + Zn(II)	<i>TB</i>
Šūnu daudzums	4,1 g/L	6,0 g/L	6,2 g/L	5,5 g/L
Enzīma kopīgais daudzums pēc <i>MBPTrap</i> TM	9,7 mg/L	16,5 mg/L	15,6 mg/L	14,2 mg/L
	2,4 mg/g	2,8 mg/g	2,5 mg/g	2,6 mg/g
Dimēra daudzums pēc <i>SEC</i> ³	0,80 mg/g	1,16 mg/g	0,93 mg/g	0,57 mg/g

² Mikroelementu piedevas sastāvs: 50 μM FeCl₃, 20 μM CaCl₂, 10 μM MnCl₂ un ZnSO₄, 2 μM CoCl₂, CuCl₂, NiCl₂, Na₂SeO₃ un H₃BO₃.

³ *SEC* – izmēra izslēgšanas hromatogrāfija (*size exclusion chromatography*) jeb gēlfiltrācija.



2.4. att. MBP-TMLD enzīma SEC hromatogrammu no *Superdex™ 200 Increase 10/300 GL* kolonnas superpozīcija.

MBP-TMLD ekspresēts: *LB* barotnē – līkne zaļā krāsā; *2xYT* barotnē – līkne tumši zilā krāsā; *2xYT* barotnē ar Zn(II) piedevu – līkne sarkanā krāsā; *TB* barotnē – līkne dzeltenā krāsā. Rozā reģions parāda pīķi, kas atbilst enzīma dimēram (~ 174 kDa).

Iegūtie dati (2.2. tab. un 2.4. att.) liecina, ka bagātākā *TB* barotne veicina agregātu veidošanos, visticamāk, pārāk ātras šūnu augšanas dēļ, kas negatīvi ietekmēja MBP-TMLD salocīšanos. Rezultātā pasliktinājās enzīma šķīdība un pieauga agregātu daudzums. Zn(II) piedeva *2xYT* barotnē galaiznākumu neietekmēja. Tomēr SEC hromatogrāfijā MBP-TMLD dimēra pīķim novērojams papildu plecs (2.4. att., 12,5–13,5 mL), kas, iespējams, liecina par jaunas dimēra konformācijas veidošanos. Savukārt *LB* barotnē enzīma iznākumi bija daudz zemāki nekā *2xYT* un *TB* barotnēs. Rezultātā turpmāka enzīma producēšana veikta klasiskajā *2xYT* barotnē.

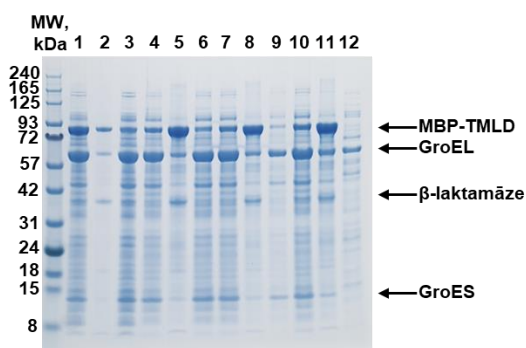
2.3.1.2. Stabilizējošo apstākļu meklējumi, izmantojot TSA metodi

Izmantojot TSA metodi, tika atrasti vairāki stabilizējošie apstākļi, kas palielināja MBP-TMLD kušanas (denaturācijas) temperatūru un stabilizēja enzīmu. Enzīms izrādījās maksimāli stabils pie pH 7,0 un pH 7,5, kas ir par vismaz vienu vienību augstāk nekā tā pI 6,08, un ir vismazāk stabils – pie pH 4,5 un pH 10,0, kas ir ļoti ekstrēmi apstākļi. Tris buferi pie pH 8,0 enzīms arī uzrādīja pietiekami augstu stabilitāti, salīdzinot ar MES pH 6,0. Palielinot NaCl daudzumu paraugā, lielas izmaiņas nenovēroja, tomēr enzīmu stabilizējošā sāls koncentrācija bija 200–500 mM robežās, un sāls pie 1000 mM koncentrācijas nedaudz destabilizēja enzīmu. No stabilizējošām piedevām vislabākos rezultātus uzrādīja 10 % glicerīns, cukuri (*D*-trehaloze, *D*-saharoze un *L*-arabinoze) un aminoskābju piedevas (*L*-Arg un *L*-Glu). Ņemot vērā iepriekš teikto, eksperimentos būtu jāizmanto PIPES, HEPES vai Tris buferi pH 7,0–8,0 kopā ar NaCl vai KCl < 1000 mM koncentrācijās.

2.3.1.3. Stabilizējošo piedevu testi šūnu sonifikācijas laikā

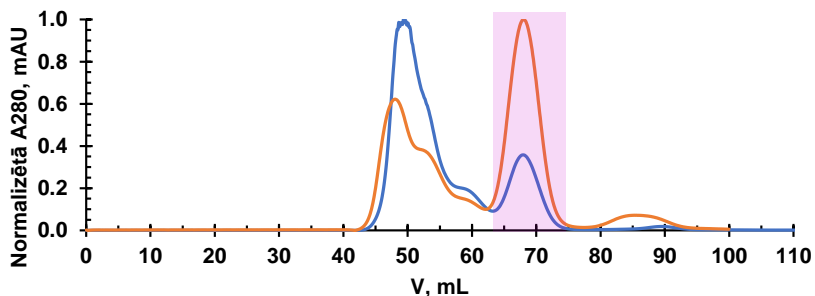
Līdzīgi kā BBOX mutantu gadījumā, ekspresijas temperatūras samazināšana no 37 °C uz 20 °C uzlaboja MBP-TMLD salocīšanos, un tā rezultātā aptuveni divreiz pieauga šķīstoša

proteīna īpatsvars (2.5. att., 1.–6. kontroles paraugs). Atbilstoši TSA analīzei pārbaudīts atlasīto stabilizējošo piedevu efekts sonifikācijas laikā uz enzīma aktivitāti un galaiznākumu. Kā redzams no SDS-PAGE gēla, 10 % (v/v) glicerīna piedeva (2.5. att., 7, 8) minimāli palielināja, savukārt 0,7 M *D*-trehalozes piedeva (2.5. att., 10, 11) ievērojami uzlaboja šķīstošā enzīma daudzumu. Maksimālais iznākums iegūts paraugam, kas ekspresēts 20 °C. Salīdzinot agregātu un MBP-TMLD dimēra daudzumu pēc attīrīšanas uz SEC kolonnas (2.6. att.), redzams, ka paraugā, kas ekspresēts 20 °C un sonificēts *D*-trehalozes klātbūtnē, šķīstošā enzīma daudzums ir par ~ 70 % lielāks nekā paraugā, kas sonificēts bez *D*-trehalozes piedevas. Turklāt paraugam, kas attīrīts *D*-trehalozes klātbūtnē, novēroja aktivitātes uzlabošanu no 40–50 % līdz 80–85 % (noteikts *ITC* eksperimentā pēc stehiometrijas vērtības). Iegūtie dati aprakstīti autores publikācijā [35].



2.5. att. MBP-TMLD ekspresijas un attīrīšanas apstākļu optimizācijas 20 °C un 37 °C SDS-PAGE analīze.

1.–3. un 4.–12. kontroles paraugs atbilst enzīma porcijām, kas ekspresētas attiecīgi 20 °C un 37 °C. 1.–6. kontroles paraugs – enzīma paraugs sonificēts lizēšanas buferī bez piedevām; 7.–9. – enzīma paraugs sonificēts lizēšanas buferī ar 10 % (v/v) glicerīnu; 10.–12. – enzīma porcija sonificēta lizēšanas buferī ar 0,7 M *D*-trehalozi. 1., 4., 7. un 10. kontroles paraugs – supernatants, kas satur šķīstošo enzīmu; 3., 5., 8. un 11. – šūnu nogulsnes, kas satur nešķīstošo enzīmu; 2., 6., 9. un 12. – caurplūde no *HisTrap*TM kolonnas mazgāšanas.

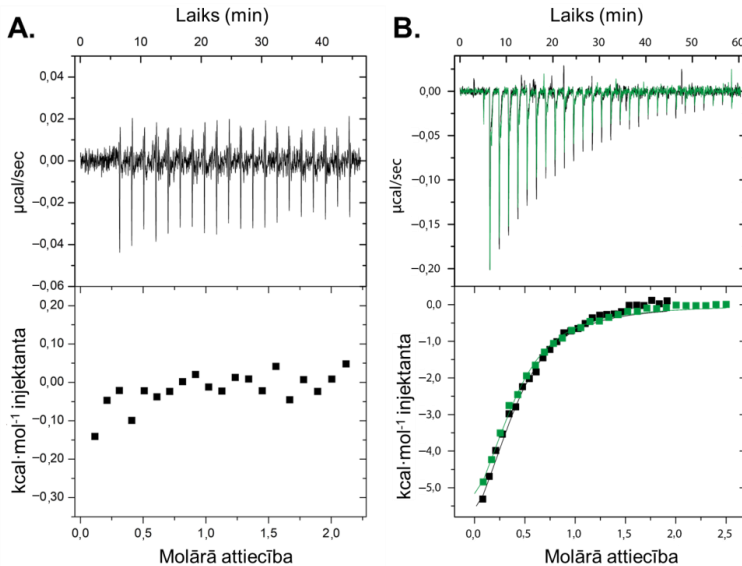


2.6. att. MBP-TMLD enzīma normalizēto SEC hromatogrammu no *HiLoad* 16/600 SuperdexTM 200pg kolonnas superpozīcija.

MBP-TMLD sonificēts bez (līkne zilā krāsā) un ar (līkne oranžā krāsā) 0,7 M *D*-trehalozes stabilizējošo piedevu. Rozā reģions parāda pīķi, kas atbilst enzīma dimēram (~ 174 kDa). Līknes normalizētas pēc absorbcijas pie 280 nm (A280).

2.3.2. EDTA ietekme uz MBP-TMLD

Etilēndiamīntetraetiķskābe (EDTA), kas ir spēcīgs helatējošais aģents metālu “izņemšanai” no proteīniem, tika izmantota, lai pārlicinātos, ka pēc attīrīšanas no *E. Coli* MBP-TMLD aktīvajā centrā nav palikuši kādi metāla joni, kas traucētu tā katalītiskai aktivitātei. Enzīma titrēšana ar EDTA neuzrādīja vērā ņemamu siltumefektu. Līdzīgu efektu novēroja arī *ITC* eksperimentā, kur MBP-TMLD bez kofaktoru pievienošanas vai kompleksā tikai ar *N*-oksalilglicīnu (OGA⁴) titrēja ar TML (2.7. att., A). Turklāt enzīma inkubācija ar EDTA pirms *SEC* hromatogrāfijas neietekmēja ne enzīma konformāciju, ne arī tā aktivitāti (noteikts *ITC* eksperimentā pēc stehiometrijas vērtības, 2.7. att., B). Kopumā tas liecina, ka MBP-TMLD aktīvais centrs nav nobloķēts ar citu metāla jonu un efektīva substrāta saistība notiek tikai abu kofaktoru Fe(II)/ α KG vai to izostēru klātbūtnē. Iegūtie dati aprakstīti darba autores publikācijā [35].



2.7. att. MBP-TMLD *ITC* titrēšanas dati uzņemti 25 °C temperatūrā.

A. MBP-TMLD kompleksa ar OGA (divkārtējā pārākumā) titrēšana ar TML. B. MBP-TMLD, kas attīrīts bez EDTA (melnā krāsā) un ar EDTA (zaļā krāsā), kompleksā ar Zn(II)/OGA (divkārtējā pārākumā) titrēšana ar TML.

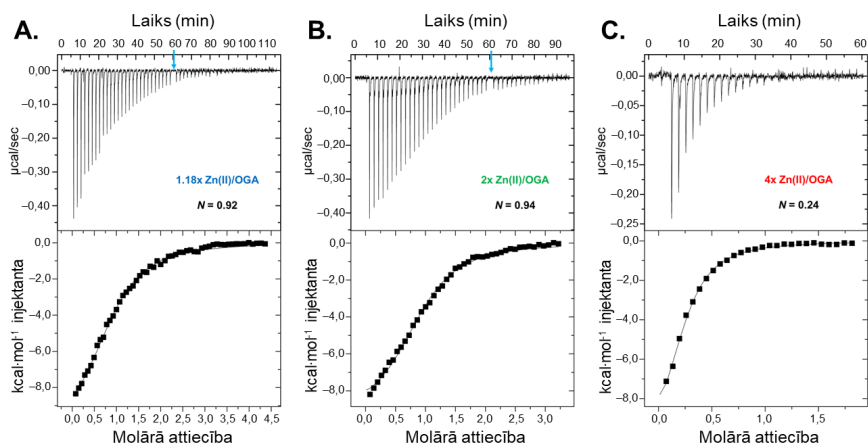
2.4. *ITC* metodikas izstrāde MBP-TMLD enzīmam

MBP-TMLD enzīmātiskai aktivitātei nepieciešami tādi kofaktori kā Fe(II) un α KG, kas savukārt nodrošina momentānu enzīmātisko reakciju. Rezultātā liganda saistības siltumefektu noteikšanai dabiskie kofaktori jāaizvieto ar izostēriem, kas pildītu līdzīgu strukturālo funkciju, bet bloķētu enzīmātisko reakciju. α KG izostērs, OGA, ir labi zināms, to plaši lietoja BBOX

⁴ OGA – α KG izostērs.

kristalizācijas un ITC pētījumos [16, 36]. Savukārt kā Fe(II) izostērs var kalpot vairāku metālu joni, kuru izmēri ir līdzīgi dzelzij un kas var veidot sešas koordinācijas saites. Darba gaitā pārbaudīti šādi deviņi joni: Ni(II), Zn(II), Mn(II), Fe(III), Cr(II), Co(II), Cu(II), Mg(II) un Ca(II). Interesanti, ka MBP-TMLD gadījumā ITC titrēšanas eksperimentā ar TML Ni(II)/OGA kombinācija, kas deva vislabākos rezultātus BBOX gadījumā [36], izrādījās neaktīva. Vienīgi metāli, kas kombinācijā ar OGA uzrādīja ievērojamu siltumefekta izmaiņu titrēšanas eksperimentā ar TML, bija Co(II) un Zn(II). Tomēr Zn(II) gadījumā izdalītais siltums bija vismaz četras reizes lielāks, tāpēc turpmākajos eksperimentos kā Fe(II) izostērs izmantots Zn(II).

Papildus pārbaudīts nepieciešamo kofaktoru daudzums, lai pilnībā piesātinātu MBP-TMLD aktīvo centru un nodrošinātu visaugstāko stehiometriju, N . Iegūtie dati redzami 2.8. attēlā. Jau ~ 20 % kofaktoru pārākums ļauj iegūt $N \sim 0,92$ (2.8. att., A). Savukārt divkārtējs pārākums dod tikai minimālu uzlabojumu, $N \sim 0,92$ (2.8. att., B), četrkārtējs pārākums negaidīti izraisīja stehiometrijas samazināšanos līdz $N \sim 0,24$ (2.8. att., C). Iespējams, šāds stehiometrijas samazinājums saistīts ar Zn(II) jonu paaugstinātu spēju veicināt proteīnu izgulsnēšanu. Tāpēc turpmākajos ITC eksperimentos ar MBP-TMLD enzīmu kā kofaktori izmantoti Zn(II)/OGA, kas divkārtējā pārākumā tika pielikti enzīmam tieši pirms eksperimenta.



2.8. att. ITC titrēšanas dati MBP-TMLD kompleksam ar Zn(II)/OGA, mainot kofaktoru koncentrācijas, mijiedarbībai ar TML, 25 °C.

MBP-TMLD kompleksā ar Zn(II)/OGA A. 1,18-kārtējā pārākumā; B. divkārtējā pārākumā; C. četrkārtējā pārākumā. Gaiši zilās bultiņas parāda ITC šļirces atkārtotu uzpildi.

2.5. TMLD struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte

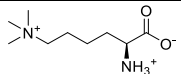
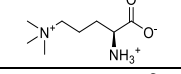
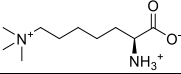
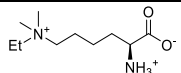
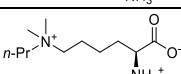
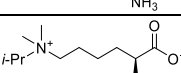
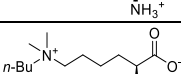
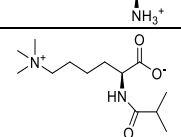
2.5.1. TML analoģu saistības likumsakarību izpēte

Izmantojot izstrādāto ITC metodiku, testēti TML un Latvijas Organiskās sintezēs institūtā (LOSI) sintezēti 11 TML analogi (2.3. tab.). Līgandiem variēja alifātiskās ķēdes garumu (savienojumi 2, 3), aizvietotājus pie ϵ -N (savienojumi 4–7) vai pie α -N slāpekļa atoma

(savienojums **8**). Daži *D*-izomēri (savienojumi **9–11**) un savienojums bez α -aminogrupas (**12**) bija sintezēti kā negatīvās kontroles (2.9. att.). Savienojumu sintēze aprakstīta darba autores publikācijā [35].

2.3. tabula

ITC termodinamiskie dati un KMR konversijas pakāpes MBP-TMLD mijiedarbībai/reakcijai ar TML un tā analogiem 25 °C temperatūrā

#	Savienojums ^a	K_D , μM	ΔG , $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	ΔH , $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$-T\Delta S$, $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	H ^b daudzums, %	S/H ^c attiecība
1		5,78 ± 0,06	-7,15 ± 0,01	-5,48 ± 0,08	-1,66 ± 0,08	97 ± 1	1,3 ± 0,3
2		7,6 ± 0,3	-6,9 ± 0,1	-4,5 ± 0,4	-2,5 ± 0,5	28 ± 5	3,1 ± 0,5
3		25 ± 1	-6,28 ± 0,03	-1,4 ± 0,2	-4,9 ± 0,2	30 ± 2	2,9 ± 0,2
4		6,0 ± 0,1	-7,12 ± 0,01	-6,37 ± 0,05	-0,75 ± 0,06	83 ± 2	2,1 ± 0,3
5		9,2 ± 1,6	-6,9 ± 0,1	-1,4 ± 0,2	-5,5 ± 0,3	25 ± 6	3,4 ± 0,4
6		11,3 ± 0,2	-6,75 ± 0,01	-5,6 ± 0,3	-1,2 ± 0,3	51 ± 3	2,4 ± 0,1
7		16,4 ± 0,2	-6,52 ± 0,03	-0,6 ± 0,1	-5,9 ± 0,1	39 ± 3	2,4 ± 0,1
8		–	–	–	–	12 ± 3	3,9 ± 0,8

^a Savienojumi **9–15** (2.9. att.) neuzrādīja saistību *ITC* un konversiju enzimatiskās reakcijas eksperimentos.

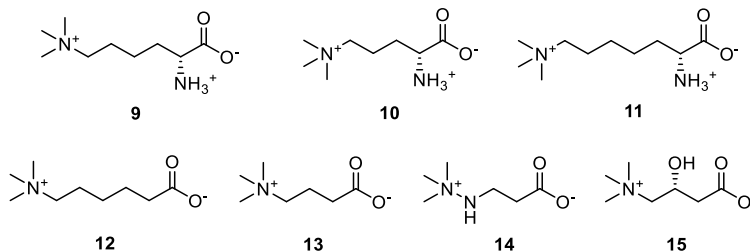
^b H – hidroksilēts substrāts.

^c S/H – sukcināta/hidroksilētā substrāta attiecība.

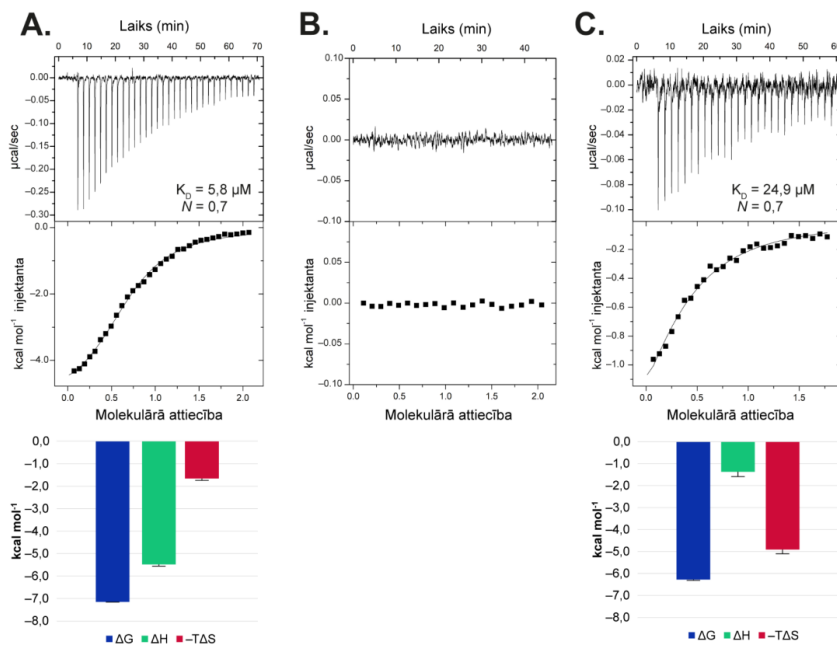
Visi *D*-izomēri neatkarīgi no ķēdes garuma [*D*-TML (**9**), δ -trimetil-*D*-ornitīns (**10**) un ζ -trimetil-*D*-homolizīns (**11**)], tāpat kā ϵ -trimetilaminoheksanoāts (**12**), nesaistījās pie MBP-TMLD. Līdzīgi *ITC* eksperimentā saistību neuzrādīja arī α -*N*-izobutiril- ϵ -trimetil-*L*-lizīns (**8**). Iegūtie dati liecina, ka veiksmīgai liganda saistībai enzīmam nepieciešama stēriski neapgrūtinātā (*unhindered*) primārā aminogrupa ar *L*-stereoķīmiju.

TML gadījumā noteiktā K_D vērtība ir 5,78 μM (2.3. tab.). Termodinamiskais saistības profils parāda saistībai labvēlīgas entalpijas, ΔH , un entropijas, $-T\Delta S$, komponentes (2.10. att., A). Turklāt absolūtās vērtībās ΔH ir 3,3 reizes lielāks nekā $-T\Delta S$, kas liecina par dominējošo entalpijas virzīto (*enthalpy-driven*) saistības mehānismu. Līdzīgi saistījās arī savienojumi **4** un **6**. Savukārt savienojumiem **3**, **5** un **7** novēroja pretējo saistības termodinamisko profilu

(2.10. att., C), kurā dominēja entropijas komponente, bet ΔH bija mazāks (absolūtos skaitļos). Visticamāk, tas atspoguļo kontaktu sabrukšanu vai vājināšanos (*weakening*) starp enzīmu un ligandu un lielas saistībai labvēlīgas konformacionālās izmaiņas aktīvajā centrā. Šāds saistības process ir entropijas virzīts (*entropy-driven*).



2.9. att. TML analogi (9–12) un BBOX substrāti (13–14) vai reakcijas produkts (15), kas nesaistās un nehidroksilējas ar TMLD.



2.10. att. MBP-TMLD ITC titrēšanas līknes (augšā) un termodinamisko saistības parametru grafiskais atspoguļojums (apakšā).

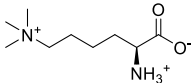
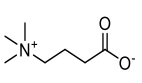
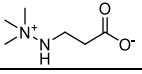
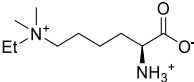
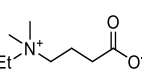
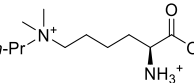
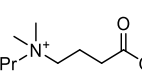
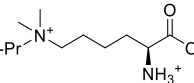
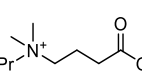
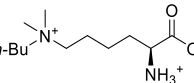
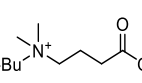
A MBP-TMLD piesātināts ar Zn(II)/OGA titrēts ar TML. B. MBP-TMLD piesātināts ar Zn(II)/OGA titrēts ar D-TML. C. MBP-TMLD piesātināts ar Zn(II)/OGA titrēts ar ζ-trimetil-L-homolizīnu. Visi titrēšanas eksperimenti veikti 25 °C temperatūrā.

Savienojumi ar aizvietotājiem pie ε-N-amonija grupas atkarībā no saistības afinitātes veido šādu rindu: Me ~ Et > n-Pr > i-Pr > n-Bu. Kā var redzēt, afinitāte pasliktinās, palielinoties aizvietotāja garumam. Interesanti, ka BBOX gadījumā γ-dimetiletilamonija butirāts (etil-GBB)

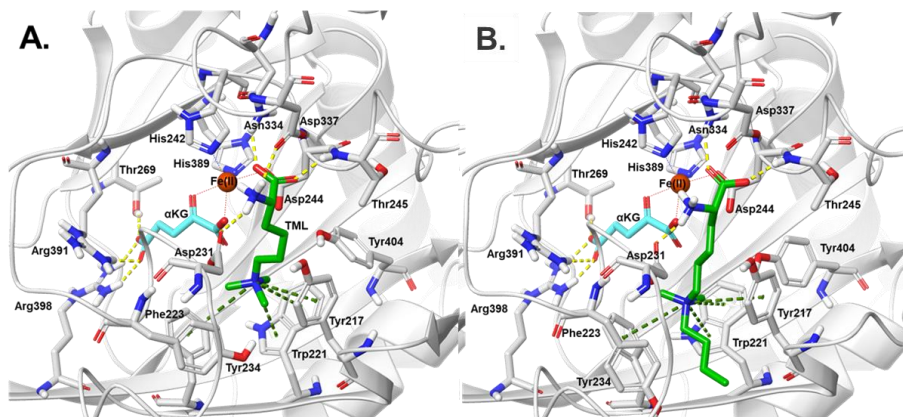
uzrādīja K_D , kas ir par kārtu sliktāks nekā dabiskais substrāts (2.4. tab.). Savukārt TMLD gadījumā etil-TML, ϵ -dimetiletil-*L*-lizīns (**4**) uzrādīja tikpat augstu afinitāti kā TML (2.3. tab.).

2.4. tabula

Jauno TMLD substrātu [35] un zināmo BBOX substrātu [36] salīdzinājums

#	TMLD	BBOX	BBOX PDB ID	BBOX IC ₅₀ , μ M	BBOX K_D , μ M
1			3O2G [16]	x	4,9 ± 0,2
	nav analogu		3MS5 [16]	34–62	24 ± 4
4			4C5W [36]	3,3 ± 1,8	46 ± 10
5			n/d	> 1000	n/d
6			n/d	5,7 ± 1,6	n/d
7			n/d	> 1000	n/d

n/d – eksperimentālie dati BBOX enzīmam nav pieejami.

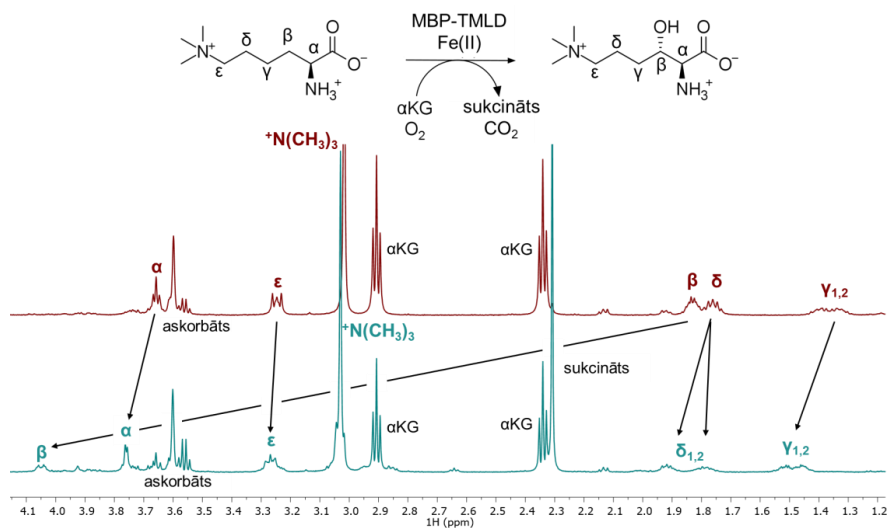


2.11. att. TMLD aktīvā centra modeļi, iegūti ar *IFD* ar dažādiem ligandiem, parādot apkārt esošos aminoskābju atlikumus un kofaktorus. **A.** TML (**1**) un **B.** ϵ -dimetilbutil-*L*-lizīns (**7**).

Aminoskābju atlikumi atspoguļoti kā pelēkas trubiņas. Kofaktori: Fe(II) atspoguļots kā brūna lode, α KG – kā gaiši zilas trubiņas. Ligands atspoguļots kā zaļas trubiņas. Udeņraža saites parādītas kā dzeltenas, katjonu- π mijiedarbības – kā zaļas pārtrauktas līnijas, nepolārie udeņraži netiek atspoguļoti.

Iegūto savienojumu modeļi parāda arī to, ka savienojumiem **1**, **4** un **6** ir ļoti līdzīgs novietojums aktīvajā centrā (piemēram, 2.11. att., A) un nav soda (*penalty*) par bioaktīvās konformācijas ieņemšanu. Savukārt savienojumi **5** un **7** uzrādīja ΔH tuvu nullei un entropijas virzītu (*entropy-driven*) saistības mehānismu, kas līdzīgs savienojumam **3**. Iegūtie dati parāda, ka garāka *n*-alkil aizvietotāja ieviešana ϵ -*N*-amonija grupā, tāpat kā alifātiskās ķēdes pagarināšana, izjauc substrātam līdzīgo saistības veidu MBP-TMLD aktīvajā centrā. Modelēšanas dati (piemēram, 2.11. att., B) parāda elektrostatisko kontaktu pavājināšanos un “aromātiskā būra” aminoskābju atlikumu reorganizāciju. Redzamās pārvērtības atspoguļojas kā afinitātes samazināšanās un hidrofobo mijiedarbību dominēšana. Šie novērojumi ļoti labi korelē ar IC_{50} vērtībām BBOX enzīmam (2.4. tab.), kur Et- un *i*-Pr- aizvietotāji deva ļoti līdzīgas un mazas IC_{50} vērtības (darbojas kā konkurējošie inhibitori), savukārt *n*-Pr- un *n*-Bu- – ļoti lielas (nav inhibitori, neietekmē hidroksilēšanās reakciju). TMLD gadījumā IC_{50} vērtības netiek publicētas, jo plānots šos datus iekļaut patenta pieteikumā.

Tālāk, lai pilnīgāk raksturotu pētāmos savienojumus, tika noteiktas substrātu **1–12** enzimatiskās konversijas pakāpes. Enzimātisko reakciju novēroja izmantojot 1D 1H KMR spektroskopiju pēc analogiskas metodes kā *Al Temimi et al.* [37]. 2.12. attēlā redzams piemērs pilnīgai izejvielas (TML) hidroksilēšanai līdz 2*S*,3*S*-HTML, par ko liecina signālu nobīde uz vājākiem laukiem. Substrāta izmaiņas enzimatiskās reakcijas rezultātā kvantificēja pēc $(CH_3)_{2-3}N^+$ grupas, kas spektrā parādās kā izolēts singlets pie 3,0–3,1 ppm. Papildus novērtēta attiecība starp hidroksilēta produkta un sukcināta veidošanos (S/H). Iegūtie dati apkopoti 2.3. tabulā.



2.12. att. 1D 1H KMR spektri MBP-TMLD enzimatiskajai reakcijai ar TML.

Spektri sarkanā un gaiši zilā krāsā atbilst enzimatiskās reakcijas maisījumiem bez un ar MBP-TMLD pēc 30 min inkubācijas 37 °C temperatūrā.

Savienojumi **9–12**, kas neuzrādīja saistības siltumefektus *ITC* eksperimentos, nedarbojās arī kā MBP-TMLD substrāti un nestājās enzimatiskajā reakcijā. Paaugstināto sukcināta

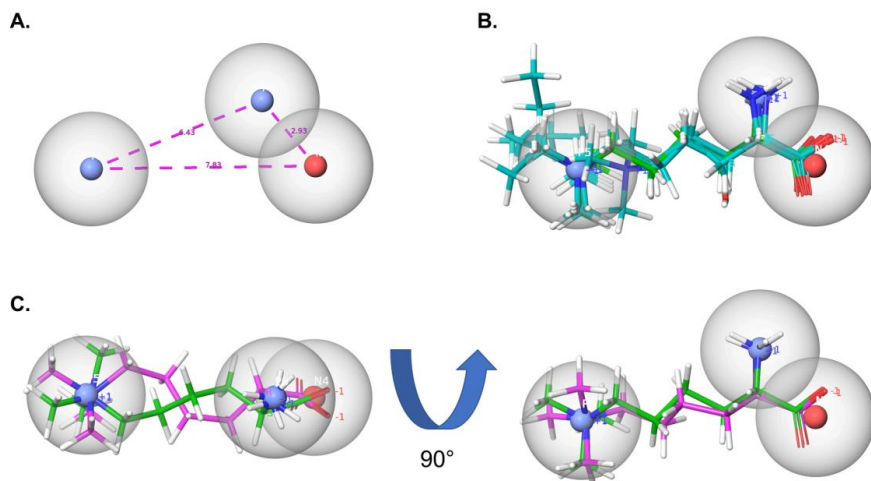
veidošanos šajos paraugos arī nenovēroja. Negaidīti enzīmātikajā reakcijā ar savienojumu **8** novēroja 12 % hidroksilētā produkta un četras reizes lielāku sukcināta veidošanos, kas liecina par atsaisti substrāta un α KG patēriņā (*turnover*). Balstoties uz šiem novērojumiem, var prognozēt, ka savienojums **8** spēj ieņemt MBP-TMLD aktīvo centru, savukārt enzīmātikajā reakcija ir ievērojami palēnināta α -amīdu grupas dēļ, kas aizvietojuši α -aminogrupu. Visos gadījumos, izņemot paša TML hidroksilēšanu, enzīmātikajā reakcijā ar endogēnā substrāta analogiem α KG patēriņš bija paaugstināts, un S/H attiecība ir 2,1–3,9 robežās. Tas var liecināt, ka savienojumi **2–7** aizņem aktīvo centru, bet retāk pieņem reaģētspējīgu konformāciju, kas izpaužas arī zemākos hidroksilēšanas reakcijas iznākumos.

Tāpat kā *ITC* eksperimentos, veidojas divas savienojumu grupas, pamatojoties uz hidroksilētā produkta daudzumu. Vienu grupu veido savienojumi **2, 3, 5** un **7**, kas hidroksilējas 25–39 % intervālā. Pie šīs grupas var pieskaitīt arī savienojumu **8** ar 12 % konversiju. Otrā grupā ietilpst TML un savienojumi **4, 6**, kas atbilstoši noreagēja par 97 %, 83 % un 51 %. Šie trīs savienojumi bija vienīgie, kam *ITC* eksperimentos noteica ievērojamu ΔH vērtību un kam ir līdzīgs entalpijas virzīts (*enthalpy-driven*) saistības mehānisms. Rezultātā var secināt, ka *ITC* saistības mehānisms atspoguļo potenciālo TMLD substrātu tieksmi hidroksilēties un to var izmantot konversijas paredzēšanai un *vice versa*. Turklāt α KG reakcijas atsaiste no hidroksilēšanās reakcijas norāda, ka šādi savienojumi ilgāk uzturas enzīma aktīvajā centrā, neveidojot reakcijas produktu. Šādi savienojumi potenciāli var tikt izmantoti *de novo* TMLD inhibitoru dizainā, pateicoties ilgākiem uzturēšanās laikiem (*residence times*). Iegūtie dati aprakstīti darba autores publikācijā [35]. Visi *ITC* un enzīmātikās reakcijas attēli pieejami promocijas darba pielikumā.

2.5.2. Farmakoforā modeļa izveide

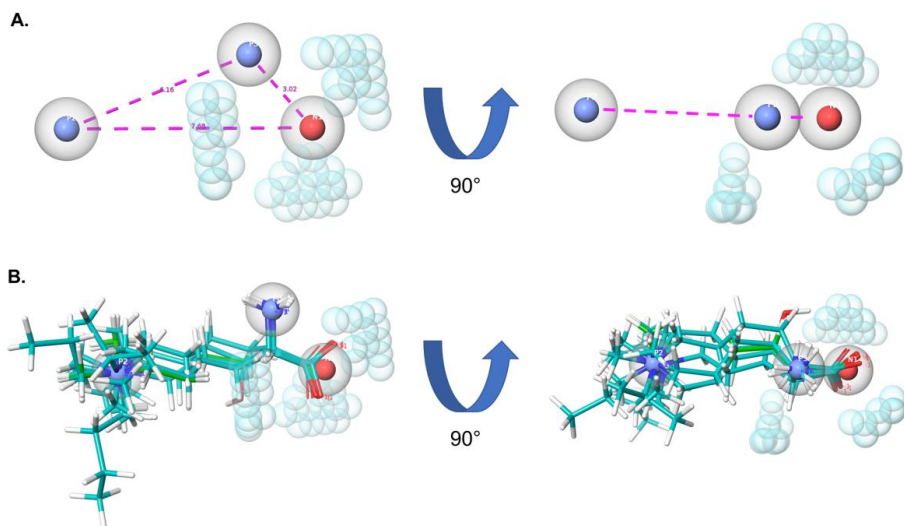
Farmakoforais modelis konstruēts, pamatojoties uz iegūtajiem *ITC* un KMR eksperimentālajiem datiem. Rezultātā izveidoti ģeometriski ierobežojumi, kas ietver trīs farmakoforus: divus pozitīvus un vienu negatīvu centru. Pirmajā modelī (2.13. att., A) neizmantoja papildu ģeometrijas ierobežojumus un pētāmie ligandi tika pielāgoti (*fitted*) modelim, ņemot vērā tikai attālumus starp lādētiem centriem (2.13. att., B).

Savukārt otrajā modelī (2.14. att., A) ieviesti papildu stēriskie traucējumi izslēgto tilpumu veidā. Tās ir aizliegtās zonas, kurās nevar atrasties ligands. Pirmais modelis nevarēja atlasīt *L*- un *D*-izomērus, pateicoties brīvai rotācijai alifātiskajā ķēdē (2.13. att., C, D). Tomēr, ņemot vērā *D*-izomēru β -CH₂ grupas novietojumu, šī nav reaģētspējīga konformācija. Izslēgtie tilpumi otrajā modelī veiksmīgi atveidoja enzīma aktīvā centra telpiskus ierobežojumus un veiksmīgi atlasīja visus *D*-izomērus. Aprēķināto *Phase Screen Score* un eksperimentālo ΔG vērtību salīdzinājums abiem modeļiem uzrādīja lineāru korelāciju ar $R^2 = 0,83$ un $0,92$ attiecīgi pirmajam un otrajam modelim. Otrais modelis (2.14. att.) deva labāku sakritību starp eksperimentālajiem un teorētiskajiem datiem, un tajā nenovēroja kļūdaini pozitīvu (*false positive*) *D*-izomēru atlasīšanu, kā tas ir pirmajā modelī. Tomēr abi modeļi trenēti konkrēti uz TML analogiem ar relatīvi augstu afinitāti. Lai uzlabotu farmakoforo modeli, būtu nepieciešams plašāks ligandu klāsts ar daudz atšķirīgākām struktūrām un aktivitātēm.



2.13. att. Pirmais farmakoforais modelis bez izslēgtiem tilpumiem, konstruēts uz TML un tā analogu bāzes, ņemot vērā *ITC* afinitātes datus.

A. Farmakoforais modelis ar norādītiem ģeometriskiem ierobežojumiem. **B.** Ligandu pārklājums (*alignment*) ar farmakoforo modeli. TML – zaļā krāsā un tā analogi (t. sk. HTML) – gaiši zilā krāsā. **C.** TML (zaļā krāsā) un *D*-TML (rozā krāsā) pārklājums ar farmakoforo modeli, parādīts no diviem skatpunktiem. Zilās sfēras – pozitīvi lādēti centri; sarkanā sfēra – negatīvi lādēts centrs. Pelēkās sfēras – tolerances rādiuss ap lādēto centru.



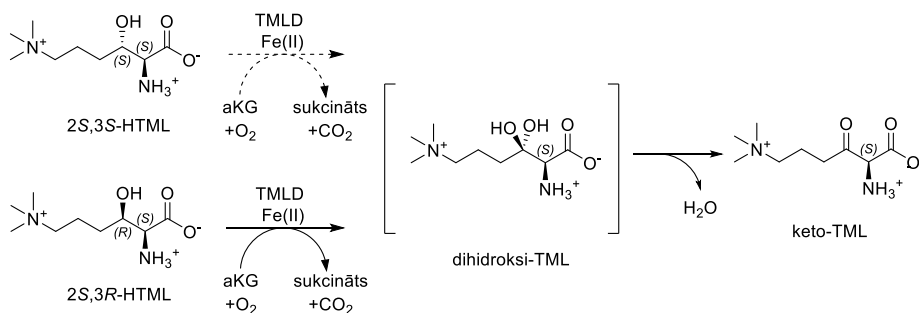
2.14. att. Otrais farmakoforais modelis ar izslēgtiem tilpumiem, konstruēts uz TML un tā analogu bāzes, ņemot vērā *ITC* afinitātes datus.

A. Farmakoforais modelis ar norādītiem ģeometriskiem ierobežojumiem no diviem skatpunktiem. **B.** Ligandu pārklājums (*alignment*) ar farmakoforo modeli. TML – zaļā krāsā un tā analogi (t. sk. HTML) – gaiši zilā krāsā, parādīts no diviem skatpunktiem. Zilās sfēras – pozitīvi lādēti centri; sarkanā sfēra – negatīvi lādēts centrs. Gaiši zilās sfēras – izslēgtais tilpums. Pelēkās sfēras – tolerances rādiuss ap lādēto centru.

2.5.3. TMLD enzimātiskās reakcijas izpēte

Līdzīgi kā BBOX hidroskilē *DL*-karnitīnu līdz 3-keto-GBB [29, 38], TMLD arī spēja hidroksilēt savu reakcijas produktu HTML. Iespējamā reakcija parādīta 2.15. attēlā. Enzimātiskajā reakcijā MBP-TMLD un Fe(II) pārākumā (attiecīgi ≥ 15 un $500 \mu\text{M}$) novēroja 2*S*,3*S*-HTML tālāko pārvēršanos. Spektrā jaunizveidota savienojuma signālu ķīmiskās nobīdes pie 2,02 (m, 2H), 2,66 (t, 2H), 3,05 (s, 9H), 3,24 (m, 2H) un 3,99 (s, 1H) ppm atbilst $(\text{CH}_3)_3\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X-CH}$ fragmentam, kas, visticamāk, atbilst TML keto-produktam.

Savukārt, veicot enzimātisko reakciju ar 2*S*,3*RS*-HTML diastereomēru maisījumu, novēroja, ka visstraujāk ar enzīmu reaģēja 2*S*,3*R*-HTML, kas ir dabiskajam pretējais diastereomērs (neveidojās no TML enzimātiskajā reakcijā). ITC eksperimentos arī izdevās noteikt HTML diastereomēru maisījuma saistīšanos pie enzīma ar afinitāti (K_D $12,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$), kas līdzīga ϵ -dimetilizopropil-*L*-lizīnam (6) un ϵ -dimetilbutil-*L*-lizīnam (7), bet pēc entropijas virzīta (*entropy-driven*) saistības mehānisma. Tas ir pretējs TML un līdzinās savienojumu 3, 5 un 7 saistības mehānismam.

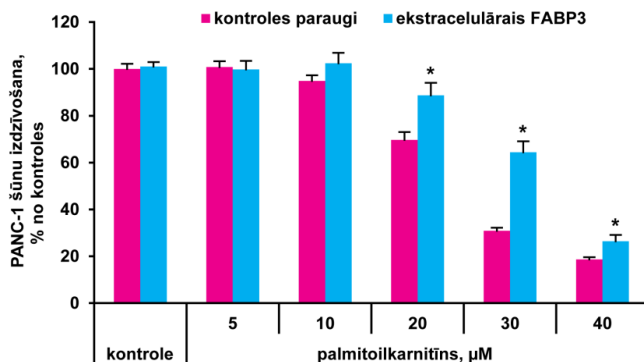


2.15. att. Atkārtota HTML konversija ar MBP-TMLD enzīmu.

2.6. FABP3 lipoprotektīvās īpašības šūnu līmenī. Hipotēzes izveide

FABP3 spēj efektīvi saistīt dažāda garuma TS un šādi pasargāt šūnas no to toksicitātes. FABP3 potenciāls aizsargāt šūnas no acilkarnitīniem pārbaudīts, tītrējot PANC-1⁵ šūnas ar palmitoilkarnitīnu. 2.16. attēlā redzams, ka palmitoilkarnitīns ir toksisks šūnām ar LC₅₀ $\sim 25 \mu\text{M}$. Savukārt FABP3 pievienošana palielināja šūnu dzīvotspēju vidēji par 20 %. Līdzīgi palmitoilkarnitīna citotoksiskā iedarbība tika efektīvi samazināta, iniciējot FABP3 pārekspresiju (*overexpression*) PANC-1 šūnās. Dati iegūti sadarbībā ar Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratoriju (LOSI) un aprakstīti darba autores publikācijā [39]. Rezultātā tika izvirzīta hipotēze, ka FABP3 spēj saistīt ne tikai TS, bet arī TS karnitīna esterus un šādi pasargāt šūnas no to augstās toksicitātes. Hipotēzes pārbaudei tika izstrādāta ITC metodika TS un to karnitīnu esteru testēšanai, kā arī veikti proteīnu KMR pētījumi saistības mehānisma raksturošanai.

⁵ PANC-1 (ATCC® CRL-1469™) aizkuņģa dziedzera epitēlija karcinomas šūnas.



2.16. att. Palmitoilkarnitīna (C16:0) toksicitāte PANC-1 šūnās pēc 4 h inkubācijas bez un ar 60 μM FABP3, ko noteica pēc MTT⁶ kolorimetriskās metodes⁷.

Rozā krāsā – references paraugi, kur proteīna vietā šūnām pielikts buferis. Gaiši zilā krāsā – paraugi, kuros pielikts rekombinantais FABP3. Pirmā aile – kontroles paraugi, kuriem nav pielikts klāt palmitoilkarnitīns.

* liecina par būtisku atšķirību, salīdzinot ar šūnām, kam nav pielikts klāt FABP3.

2.7. Apstākļu meklējumi FABP3 termodinamiskiem pētījumiem

2.7.1. TS šķīdības un šķīdumu stabilizējošo piedevu meklējumi

TS šķīdību ūdens buferos iespējams uzlabot, izmantojot DMPC⁸/TS liposomas [40], taču liposomu sagraušanas/reorganizācijas siltumefekti neļauj precīzi noteikt saistības termodinamiskus parametrus. Savukārt plaši pieejama alternatīva metode, kur TS šķīdību uzlabo, pieliekot klāt vērša seruma albumīnu (*Bovine Serum Albumin*, BSA) [41], šeit izmantot nevarēja, jo BSA afinitāte pret TS vai to esteriem ir ļoti augsta un tas traucē eksperimentu ar FABP3 realizāciju. Rezultātā izmēģināts uzlabot TS šķīdību ūdens buferos, pieliekot klāt dažādas piedevas, piemēram, glicerīnu, *Tween-20* vai *Triton X-100*. Katras piedevas efektivitāti novērtēja ar *DLS* izkliedes intensitātes rādītāju, kas deva iespēju spriest par daļiņas izmēru paraugā. Izanalizējot *DLS* datus, konstatēja, ka vislabāko stabilizējošo efektu izdevās panākt 0,1–0,5 % (v/v) *Triton X-100* piedevas gadījumā, kas varēja stabilizēt palmitātu (C16:0) līdz pat 500 μM koncentrācijai (izkliedes intensitāte ~ 4537 ± 149 *kcps*⁹). Acilkarnitīnu gadījumā *DLS* dati parādīja, ka *Triton X-100* koncentrācija izkliedes intensitāti neietekmēja, bet daļiņu izmēri bija relatīvi mazi visos gadījumos. 500 μM palmitoilkarnitīnam (C16:0-AC) izkliedes intensitāte sasniedza ~ 3812 ± 351 *kcps*, kas ir samērojama ar 20 mM kālija fosfāta un 50 mM KCl bufera pie pH 7,6 (KPi) ar 0,50 % (v/v) etanola piedevu izkliedes intensitāti 3935 ± 813 *kcps*.

⁶ MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds. Metodes pamatā ir MTT krāsvielas krāsas maiņa no dzeltenas uz violetu, notiekot tetrazola cikla reducēšanai, ko nodrošina dzīvās šūnas metabolisms.

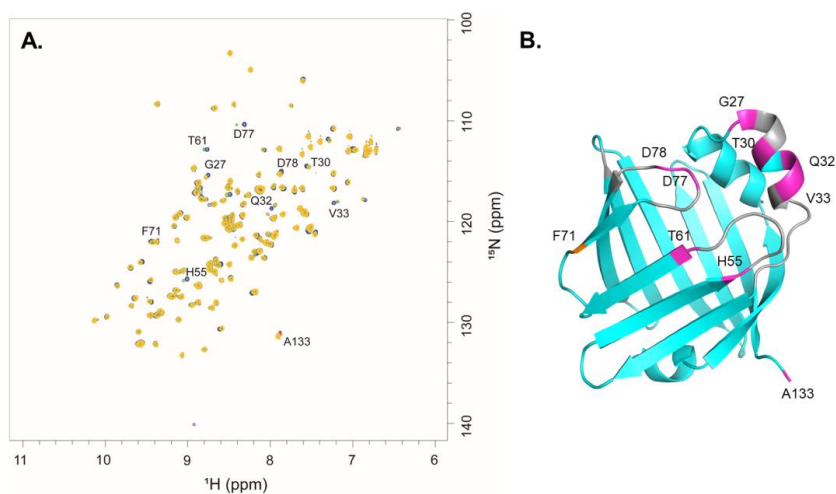
⁷ Dati iegūti sadarbībā ar Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratoriju (LOSI). Izpildītāji: Kārlis Vilks un Melita Vidēja.

⁸ DMPC – dimiristoilfosfatidilholīns.

⁹ *kcps* – fotonu skaits sekundē (*kilo counts per second*).

2.7.2. Piedevu efekts uz FABP3 struktūru

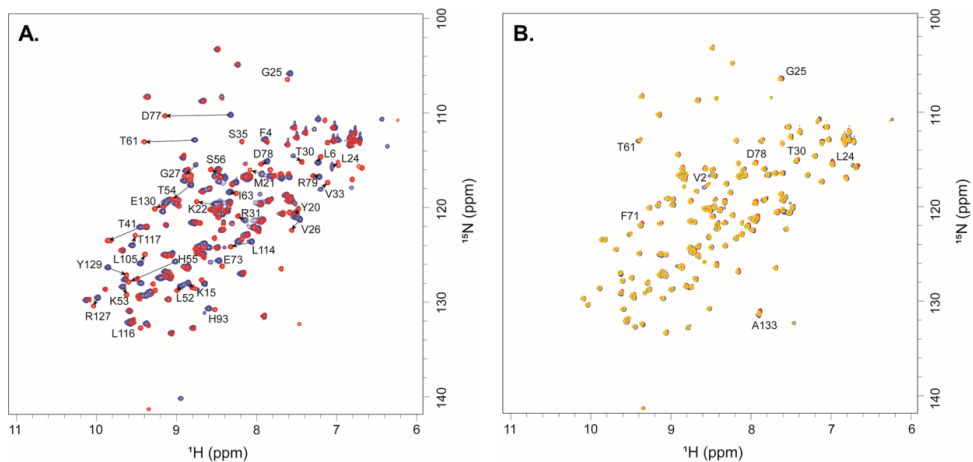
2D ^1H - ^{15}N HSQC KMR spektri uzņemti ^{15}N -iezīmētam FABP3, variējot buferu sastāvu nolūkā pārbaudīt piedevu efektu uz tā struktūru. Četri spektri reģistrēti apo-FABP3: (i) KPi buferī bez piedevām, (ii) KPi buferī ar 10 % (v/v) glicerīna, (iii) KPi buferī ar 0,10 % (v/v) *Triton X-100* un (iv) KPi buferī ar 0,25 % (v/v) *Triton X-100* piedevām. Iegūto spektru superpozīcija redzama 2.17. attēlā (A). Kā redzams, visi četri spektri ļoti labi savstarpēji sakrīt. Minimālās izmaiņas ir novērojamas 10 krospiķiem, no kuriem viens atbilst kustīgam C-terminālajam aminoskābju atlikumam, A133 (šeit un tālāk tekstā – FABP3 aminoskābju atlikumu numerācija pēc *UniProt* ID P05413 [21]). Pārējie astoņi aminoskābju atlikumi (2.17. att., B) pieder aminoskābju atlikumiem liganda ieejas portālā, savukārt viens, F71, – spraugas reģionam (1.3. att.), kas visi ir ļoti kustīgi FABP3 reģioni, it īpaši apo-formā.



2.17. att. 2D ^1H - ^{15}N HSQC apo-FABP3 spektru superpozīcija, variējot bufera piedevas, un novērojamo ķīmisko nobīžu izmaiņu atspoguļojums FABP3 struktūrā (PDB ID 4TKJ).

A. Spektrs KPi buferī bez piedevām – zilā krāsā; ar 10 % (v/v) glicerīna – sarkanā krāsā; ar 0,10 % (v/v) *Triton X-100* – zaļā krāsā; ar 0,25 % (v/v) *Triton X-100* – dzeltenā krāsā. B. Ķīmisko nobīžu izmaiņas atzīmētas proteīna struktūrā rozā un oranžā krāsā (attiecīgi liganda ieejas portāls un spraugas reģions); pelēkie reģioni – kustīgas cilpas, ko nevarēja attiecināt pie pH 7,6.

Tālāk salīdzināja piedevu efektu uz FABP3-palmitāta kompleksa struktūru. Sākumā salīdzināja apo-FABP3 spektru ar kompleksa spektru un attiecināja aminoskābju atlikumus ar vislielākajām izmaiņām krospiķu ķīmiskajās nobīdēs (2.18. att., A). Savstarpēji salīdzinot četrus FABP3-palmitāta spektrus, kas uzņemti variējot bufera piedevas, novēro ļoti augstu līdzību (2.18. att., B). Minimālās izmaiņas novēro astoņiem aminoskābju atlikumiem, no kuriem divi atrodas N-terminālā un C-terminālajā galā, attiecīgi V2 un A133. Pārējie seši aminoskābju atlikumi ir tie paši, kas identificēti eksperimentā ar apo-FABP3 (2.17. att., A). Iegūtie dati apstiprina, ka izmantotās piedevas neietekmē FABP3 struktūru, netraucē TS saistību un nemaina FABP3-TS kompleksa konformāciju. Iegūtie dati aprakstīti darba autorens publikācijā [39].



2.18. att. 2D ^1H - ^{15}N HSQC **A.** apo-FABP3 (zilā krāsā) un FABP3-palmitāta kompleksa (sarkanā krāsā) spektru superpozīcija. **B.** FABP3-palmitāta kompleksa spektru superpozīcija variējot bufera piedevas.

A. Spektru superpozīcija apo-FABP3 – zilā krāsā un FABP3-palmitāta (C16:0) kompleksam – sarkanā krāsā KPi buferī bez piedevām ar norādītiem aminoskābju atlikumiem, kam novēroja ķīmisko nobīžu izmaiņas. Melnās bultiņas norāda krospiķa nobīdes virzienu. **B.** Spektrs KPi buferī bez piedevām – zilā krāsā; ar 10 % (v/v) glicerīna – sarkanā krāsā; ar 0,10 % (v/v) *Triton X-100* – zaļā krāsā; ar 0,25 % (v/v) *Triton X-100* – dzeltenā krāsā.

2.7.3. Stabilizējošo piedevu efekts uz termodinamiskajiem saistības parametriem

Turpinājumā novērtēts iepriekš minēto stabilizējošo piedevu efekts uz FABP3-TS saistības termodinamiku un afinitāti. *ITC* eksperimenti veikti KPi buferī ar 10 % un 20 % (v/v) glicerīna, un 0,10 % un 0,25 % (v/v) *Triton X-100* piedevām, kā arī parastā KPi buferī bez piedevām. Kā testa savienojumi izmantoti laurīnāts (C12:0) un miristāts (C14:0), attiecīgi ar $\text{CMC} = 25,12$ un $6,92$ mM [42] un šķīdību – 55 un 20 mg/L H_2O 20 °C [43].

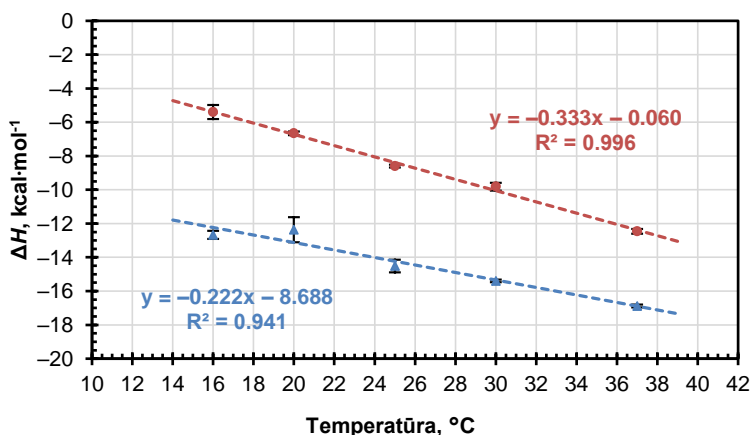
Neviena no piedevām saistības stehiometrijas $N \sim 1$ vērtību neietekmēja. Tomēr mainījās saistības stiprumi. Salīdzinot C12:0 K_D vērtības visiem pieciem titrēšanas eksperimentiem, redzams, ka KPi buferī un glicerīnā (neatkarīgi no koncentrācijas) iegūtās vērtības ļoti labi sakrīt (vidējā vērtība $0,18 \pm 0,03$ μM). Savukārt paraugos ar 0,10 % un 0,25 % (v/v) *Triton X-100* piedevu K_D pasliktinājās attiecīgi ~ 3 un $5,3$ reizes. Papildus novēro saistības termodinamiskā profila izmaiņu. KPi buferī gan entalpijas, gan entropijas komponentes ir negatīvas, proti, saistībai labvēlīgas. Tomēr $-T\Delta S$ komponentes vērtība tuva nullei un saistība ir entalpijas virzīta (*enthalpy-driven*). Pieliekot klāt glicerīnu, mainās vides viskozitāte. Rezultātā pieaug nekovalento mijiedarbību saistības stiprums (palielinās ΔH absolūtā vērtība), bet, pateicoties entalpijas-entropijas kompensācijas mehānismam [44, 45], $-T\Delta S$ kļūst pozitīva jeb saistībai nelabvēlīga. *Triton X-100* piedevas gadījumā novēro līdzīgas, bet daudz izteiktākas izmaiņas entalpijas un entropijas komponentēs, salīdzinot ar glicerīna pievienošanu.

Garāko TS gadījumā, C14:0, glicerīna piedeva izradījās neefektīva TS stabilizācijai, savukārt *Triton X-100* piedeva labi stabilizēja garķēžu TS gan 0,10 %, gan arī 0,25 % koncentrācijā. Tomēr abos gadījumos TS afinitāte pret FABP3 paraugā ar 0,10 % (v/v) *Triton*

X-100 bija divas reizes stiprāka nekā paraugā ar 0,25 % piedevu. Ņemot vērā iegūtos datus un ITC eksperimenta praktisko norisi, 0,10 % (v/v) Triton X-100 tika uzskatīta kā piedevas optimāla koncentrācija tālākām titrēšanām.

2.7.4. FABP3-laurināta saistības siltumkapacitātes noteikšana

ITC metodikas validācijai noteikta laurināta (C12:0) saistības pie FABP3 siltumkapacitātes izmaiņa, ΔC_p atkarībā no bufera sastāva: KPi buferī bez un ar 0,10 % (v/v) Triton X-100 piedevas. Titrēšanas eksperimenti veikti piecās dažādās temperatūrās: 16 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C un 37 °C. No iegūtajiem entalpijas datiem konstruēti divi lineāri grafiki un, izmantojot lineārās regresijas analīzi, iegūtas ΔC_p vērtības $-0,33 \pm 0,01$ un $-0,22 \pm 0,02$ kcal·K⁻¹·mol⁻¹ (2.19. att.). Iegūto vērtību atšķirība ir minimāla un labi saskan ar paša fosfāta bufera (pK_a 7,198) $\Delta C_p = -0,23$ kcal·K⁻¹·mol⁻¹ [46]. Kopumā termodinamisko parametru tendences abos buferos nemainījās, kas ļauj secināt, ka deterģenta piedeva netraucē FABP3-TS saistībai un neietekmē saistības mehānismu. Savukārt termodinamisko parametru variācijas saistītas ar solvatācijas apvalku reorganizāciju un nekovalento mijiedarbību enerģijas izmaiņām.



2.19. att. FABP3-laurināta (C12:0) saistības ΔH atkarība no temperatūras.

KPi buferī (bez piedevām) – sarkanā taisne; KPi buferī ar 0,10 % (v/v) Triton X-100 piedevu – zilā taisne. Punkti uz taisnēm – eksperimentālās ΔH vērtības, noteiktas piecās dažādās temperatūrās. Līknes slīpums nosaka siltumkapacitātes izmaiņu, ΔC_p .

2.8. FABP3 termodinamiskie pētījumi

2.8.1. FABP3-TS saistības termodinamika

Izmantojot iepriekš izstrādāto un validēto ITC protokolu, noteiktas afinitātes un termodinamiskie parametri FABP3 saistībai ar dažāda garuma un piesātinātības pakāpes TS (no C8 līdz C20). Gadījumos, kad TS šķīdība to pieļāva (C8–C12), ITC parametri tika noteikti arī buferī bez deterģenta. Iegūtie dati apkopoti 2.5. tabulā.

ITC termodinamiskie dati FABP3 mijiedarbībai ar TS un to esteriem KPi buferī, 25 °C

Savienojums	Saisinātā formula ¹⁰	0,10 % (v/v) Triton X-100	K_D , μM	ΔG , $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	ΔH , $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$-\Delta S$, $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	N ¹¹
kaprilāts	C8:0	–	1,86 ± 0,05	-7,82 ± 0,02	-8,01 ± 0,09	0,19 ± 0,07	~ 1,0
		+	1,109 ± 0,001	-8,13 ± 0,01	-12,6 ± 0,3	4,5 ± 0,3	~ 1,0
kaprināts	C10:0	–	0,252 ± 0,004	-9,01 ± 0,01	-11,09 ± 0,08	2,08 ± 0,08	~ 1,0
		+	0,56 ± 0,02	-8,535 ± 0,007	-13,2 ± 0,3	4,7 ± 0,3	~ 1,0
laurināts	C12:0	–	0,20 ± 0,02	-9,12 ± 0,06	-8,60 ± 0,08	-0,53 ± 0,02	~ 1,0
		+	0,57 ± 0,06	-8,54 ± 0,06	-14,5 ± 0,4	6,0 ± 0,3	~ 1,0
miristāts	C14:0	+	0,3 ± 0,1	-8,9 ± 0,2	-10,9 ± 0,4	1,9 ± 0,2	~ 1,0
palmitāts	C16:0	+	0,14 ± 0,02	-9,34 ± 0,07	-8,7 ± 0,9	-0,6 ± 0,8	~ 1,0
stearāts	C18:0	+	0,7 ± 0,1	-8,34 ± 0,04	-6,4 ± 0,4	-2,0 ± 0,4	~ 1,0
oleāts	C18:1 <i>cis</i> - Δ^9	+	0,29 ± 0,03	-8,93 ± 0,06	-10,0 ± 0,4	1,1 ± 0,5	~ 1,0
elaidāts	C18:1 <i>trans</i> - Δ^9	+	0,21 ± 0,02	-9,12 ± 0,06	-8,0 ± 0,9	-1,1 ± 0,9	~ 1,0
eikosapenāts (EPA)	20:5 <i>cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14,17}$	+	1,6 ± 0,2	-7,90 ± 0,07	-17,4 ± 0,7	9,5 ± 0,8	~ 1,0
palmitoil-CoA	C16:0-CoA	–	8,9 ± 1,2	-6,90 ± 0,08	-5,04 ± 0,09	-1,86 ± 0,01	~ 1,0
EPA-karnitīns	20:5 <i>cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -AC	–	14,83 ± 0,08	-6,61 ± 0,03	-2,43 ± 0,09	-4,19 ± 0,06	~ 1,0
miristoil-karnitīns	C14:0-AC	–	11,3	-6,7	-1,1	-5,7	~ 0,5
oleoil-karnitīns	C18:1 <i>cis</i> - Δ^9 -AC	–	2,21 ± 0,07	-7,72 ± 0,01	-4,6 ± 0,2	-3,1 ± 0,2	~ 0,5
elaidoil-karnitīns	C18:1 <i>trans</i> - Δ^9 -AC	–	2,19 ± 0,04	-7,72 ± 0,02	-4,29 ± 0,06	-3,43 ± 0,08	~ 0,5

Visvājāk ar FABP3 saistījās C8:0, visstiprāk – C16:0. C18:0 un C14:0 saistās vismaz divas reizes vājāk nekā C16:0. Visām izpētītajām TS saistības mehānisms bija entalpijas virzīts (*enthalpy-driven*) ar dominējošo ΔH komponenti. Dažām vidēja garuma un garķēžu TS (C8:0-C14:0) entropijas komponente bija saistībai nelabvēlīga, tuva nullei (C16:0) vai saistībai labvēlīga (C18:0). Abas mononepiesātinātās TS (C18:1) deva ļoti tuvas saistības afinitātes un termodinamiskos parametrus, kas norāda, ka *cis/trans* dubultsaites konfigurācija neietekmē TS saistību FABP3 aktīvajā centrā. Savukārt polinepiesātinātā TS, EPA uzrādīja samērā vāju saistību, kas bija līdzīga C8:0. Salīdzinot ar C8:0, EPA gadījumā novēroja ΔH uzlabojumu par ~ 9,4 kcal·mol⁻¹ un $-\Delta S$ pasliktināšanos par līdzīgu vērtību. Ņemot vērā to, ka EPA kustīgums ir ierobežots ar piecām *cis* dubultsaitēm, tā, visticamāk, ieņem FABP3 aktīvajā centrā saliektu konformāciju, papildus izraisot saistības centra reorganizāciju stērisko traucējumu dēļ, par ko

¹⁰ Oglekļu skaits: nepiesātināto saišu skaits un to pozīcijas.

¹¹ ITC eksperimentā stehiometrija N atspoguļo ne tikai proteīna-liganda attiecību, bet arī aktīvā proteīna daudzumu paraugā. Šeit N noteikts, pieņemot, ka proteīns ir 100 % aktīvs un pilnībā delipidēts.

liecina $-T\Delta S$ vērtības pieaugums. Savukārt ierobežotais kustīgums labvēlīgi ietekmēja proteīna-liganda nekovalentās mijiedarbības. Iegūtie dati aprakstīti darba autores publikācijā [39].

2.8.2. FABP3-acilkarnitīnu un palmitoil-CoA saistības termodinamika

Turpinot termodinamiskos pētījumus, izmēģināts noteikt saistības parametrus TS karnitīna un CoA esteriem. Interesanti, ka, salīdzinot ar TS, kur deterģenta piedeva netraucēja saistībai, šeit *Triton X-100* pat 0,10 % (v/v) koncentrācijā pilnībā bloķēja esteru saistību. Iegūtie rezultāti liecina, ka esteriem, visticamāk, ir cits atpazīšanas mehānisms nekā TS. Savukārt, realizējot reakciju KPi buferī bez piedevām, saistību uzrādīja tikai labi šķīstošās vielas – EPA-karnitīns, palmitoil-CoA un mononepiesātināti C18:1-*cis/trans*- Δ^9 -karnitīni (2.5. tab.). Salīdzinot ar attiecīgām TS, ΔH vērtība (absolūtos skaitļos) samazinājās divas reizes, kas liecina par nekovalento mijiedarbību pavājināšanos, ko mazā mērā kompensē saistībai labvēlīgā $-T\Delta S$, kas šeit ir trīs reizēs lielāka nekā atbilstošajām mononepiesātinātajām TS. Visi četri esteri saistījās pie FABP3 ar samērā līdzīgu termodinamisko profilu. Tomēr C18:1-*cis/trans*- Δ^9 -karnitīniem novēroja saistības stehiometrijas, N , samazinājumu no 1,0 līdz 0,5. Tas bija negaidīti, jo šāda stehiometrija paredz, ka viena liganda molekula vienlaikus saistās pie divām proteīna molekulām. Izmaiņas proteīna-liganda koncentrācijās un to attiecībās šo rezultātu neietekmēja. Šie dati liecina, ka tika novērots jauns mononepiesātināto acilkarnitīnu saistības mehānisms. Iegūtie dati aprakstīti darba autores publikācijā [39].

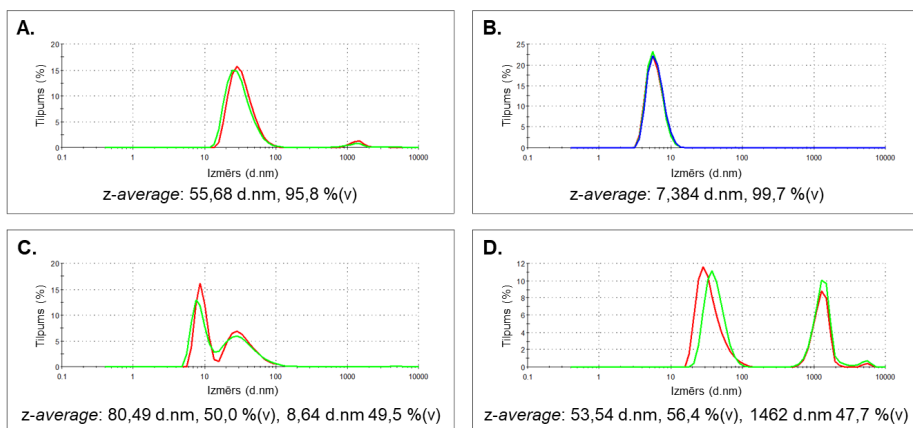
2.8.3. Piesātināto TS karnitīna esteru pētījumi

Ņemot vērā, ka mono- un polinepiesātināto TS karnitīna esteri veiksmīgi saistījās ar FABP3, sagaidāms, ka līdzīga garuma piesātināto TS karnitīna esteriem arī būtu jāsaistās pie FABP3, tomēr eksperimenti ar tiem nebija tik veiksmīgi. Neskatoties uz labāku šķīdību ūdens buferos (it īpaši zemā pH), salīdzinot ar TS, garāku acilkarnitīnu gadījumā novēro micellizēšanos [47, 48], kas traucē saistībai ar FABP3. Īpaši izteikts šis efekts ir palmitoilkarnitīnam, kam CMC ir tikai 15 μM [48]. Vienīgais piesātinātās TS karnitīna esters, kam izdevās noteikt saistību *ITC* eksperimentā KPi buferī (bez piedevām), bija C14:0-AC, kas saistījās tikpat vāji kā EPA-AC un ar līdzīgiem termodinamiskajiem parametriem, bet ar stehiometriju $\sim 0,5$ (2.5. tab.). Tas liecina, ka piesātināto un mononepiesātināto TS karnitīna esteriem būtu jāsaistās ar FABP3 pēc līdzīga mehānisma.

Palmitoilkarnitīna šķīdības uzlabošanai izmēģināts – pēc analogijas ar *Matsuoka S. et al.* metodi [40] – uztaisīt DMPC/acilkarnitīnu liposomas. Kontrolēi uztaisītas arī DMPC/laurināta un DMPC/miristāta liposomas. Diemžēl, lietojot šo metodi C12:0-AC, C14:0-AC un C16:0-AC esteru termodinamisko parametru noteikšanai, saistības siltumefektus *ITC* eksperimentā detektēt neizdevās. Savukārt KMR eksperimentā divi paraugi (C12:0-AC un C14:0-AC) spektrā uzrādīja minimālās izmaiņas, bet C16:0-AC spektrā ķīmisko nobīžu izmaiņas nenovēroja.

2.9. Palmitoilkarnitīna efekts uz FABP3 pie zema pH

Acilkarnitīni labi šķīst un neveido micellas pie zema pH. Rezultātā īstenots FABP3-palmitoilkarnitīna saistības pētījums pie nefizioloģiska pH: 5,4 un 3,6. Izmantojot 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrus, pierādīts, ka apo-FABP3 saglabā struktūru abu nefizioloģisko pH buferos. Tālāk pārbaudīta palmitāta (C16:0) un palmitoilkarnitīna (C16:0-AC) spēja saistīties pie FABP3 dažādu pH vidē. Palmitāta gadījumā proteīna-liganda saistību novēro pie pH 7,6 un pH 5,4. Turklāt spektrā redzamajām ķīmisko nobīžu izmaiņām ir līdzīgas tendences. Savukārt pie pH 3,6 palmitāta saistību ar FABP3 vairs nenovēro. Visticamāk, tas saistīts ar aminoskābju atlikumu protonēšanās stāvokļa maiņu liganda ieejas portāla apkārtnē un palmitāta karboksilgrupas protonēšanos (pK_a 4,75). Tas neļauj veidoties elektrostatiskām mijiedarbībām, kas virza ligandu aktīvajā centrā [27]. Palmitoilkarnitīna gadījumā izmaiņas spektrā pie pH 7,6 ir daudz izteiktākas nekā pie pH 5,4, tomēr tās joprojām ir ļoti mazas, lai varētu viennozīmīgi runāt par kompleksa veidošanos. Savukārt pie pH 3,6 spektrā novēroja proteīna signālu izzušanu, turklāt paraugā neveidojas nogulsnes. Visticamāk, paraugā veidojas lielmolekulārie kompleksi, kuru relaksācija ir pārāk ātra KMR laika skalā. Rezultātā novēro signālu pazušanu. Hipotēzes pārbaudei KMR paraugi acetāta buferī tika izpētīti ar *DLS*.



2.20. att. *DLS* mērījumi **A.** apo-FABP3, **B.** palmitoilkarnitīnam, **C.** FABP3-palmitoilkarnitīna kompleksam un **D.** FABP3-palmitāta kompleksam acetāta buferī pie pH 3,6.

DLS dati rāda, ka apo-FABP3 daļiņu izmērs (2.20. att., A) acetāta buferī pie pH 3,6 ir ~ 56 d. nm (95,8 %) un paraugs ir ļoti viendabīgs. Iegūtais izmērs sakrīt ar proteīna hidrodinamisko rādiusu. Palmitoilkarnitīna paraugs (2.20. att., B) pie zema pH arī izrādījās ļoti homogēns. Tajā visas daļiņas bija ar izmēru ~ 7,3 d. nm (99,7 %). Savukārt FABP3-palmitoilkarnitīna paraugā novēroja daļiņu izmēra sadalījumu (2.20. att., C) ~ 80,5 d. nm (50 %) un ~ 8,6 d. nm (50 %). Kopumā tas liecina, ka uz proteīna izveidojas palmitoilkarnitīna slānis. Proti, vienai FABP3 daļiņai piesaistījās divas C16:0-AC daļiņas ($56 + 8,6 + 8,6 = 73,2 \approx 80$ d. nm). Turklāt pēc šī sadalījuma var redzēt, ka tikai puse no pieliktā palmitoilkarnitīna saistījās pie proteīna. Paraugā ar FABP3-palmitātu (2.20. att., D) arī novēro divu izmēru daļiņas, ~ 54 d. nm (56 %) un 1462 d. nm (48 %). Tas arī pamato faktu, kāpēc C16:0 nesaistījās

ar FABP3, jo visas liganda molekulas izveidoja neregulārus lielmolekulārus agregātus. Savukārt proteīna daļiņas palika nemainīgas un sakrīt ar apo-FABP3 daļiņu izmēriem.

Ņemot vērā iegūtos datus, var secināt, ka pie ļoti zema pH, kad TS karboksilgrupa tiek protonēta, kompleksi ar FABP3 vairs neveidojas, jo šķīdumā nav brīvi pieejamu TS molekulu. Turklāt iespējams, ka FABP3 nespētu saistīt TS pat tad, ja tās neagregētos, jo aminoskābju atlikumiem daļēji mainās protonēšanās stāvokļi, kas nodrošina liganda atpazīšanu.

2.10. FABP3 saistības validācija ar KMR

2.10.1. Ķīmisko nobīžu perturbāciju analīzes pamatprincipi

Lai novērtētu un kvantificētu KMR spektros redzamās izmaiņas, veikta ķīmisko nobīžu perturbāciju (*Chemical Shift Perturbation, CSP*) analīze. Tās pamatā ir 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektra augsts jutīgums uz jebkurām izmaiņām paraugā. Izmantojot attiecinātus apo-FABP3 un FABP3-kompleksa spektrus un vienādojumu (1) ar mērogošanas koeficientu $\alpha = 0,10$ [49, 50], izrēķina spektrā redzamās krosipiķu nobīdes, ko pēc tam vizualizē kā stabiņu diagrammu vai arī grafiski, piešķirot *CSP* vērtībām krāsu kodu gradienta veidā, kas mainās no tumši zilās uz sarkanu. Šo krāsojumu lieto proteīna 3D struktūrai, kas dod iespēju detalizētāk izprast redzamo izmaiņu iemeslus un būtību, kā arī novērtēt proteīna un dažādu ligandu saistības atšķirības.

$$\Delta\delta = \sqrt{\frac{1}{2}[\delta_H^2 + (\alpha \cdot \delta_N)^2]}, \quad (1)$$

kur $\Delta\delta$ – CSP;

δ_H – protonu ķīmiskās nobīdes, ppm;

δ_N – slāpekļa ķīmiskās nobīdes, ppm;

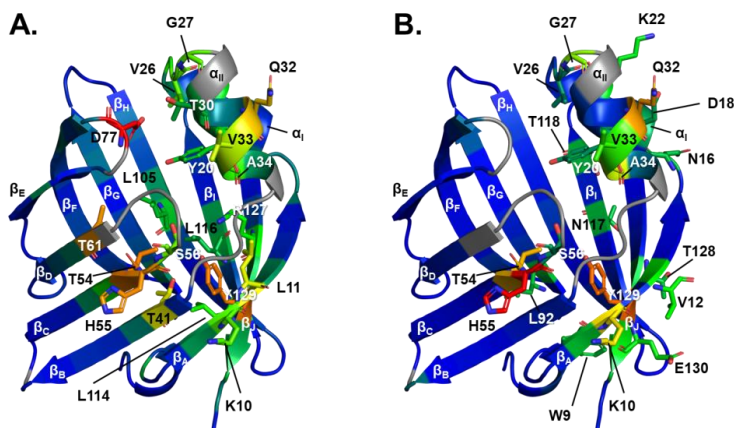
α – mērogošanas koeficients (0,10–0,45).

2.10.2. FABP3-ligandu kompleksu CSP analīze

Iepriekš aprakstītā *CSP* analīzes metode lietota visiem FABP3-ligandu kompleksiem, kas pētīti šajā darbā. Kopumā analizēti 17 savienojumi, no kuriem deviņi bija TS, astoņi – TS esteri. Kā liecina iegūtie dati, TS saistība (2.21. att., A) izraisa vairāk izmaiņu proteīna konformācijā nekā atbilstošo TS esteru saistība (2.21. att., B). Turklāt, palielinoties TS garumam, β -mucas β_A - β_B virknēs (1.3. att.) aktīvā centra dziļumā novērojamas lielākas perturbācijas. Kā arī visos gadījumos, izņemot C8:0-AC un C16:0-AC, novēro ievērojamas izmaiņas α_H spirāles daļā, kas tuvāka liganda ieejas portālam. Diemžēl pašas ieejas portālu veidojošās cilpas netika attiecinātas pie pH 7,6 (pelēkie reģioni), taču izmaiņas, ko izjūt tām blakus esošie aminoskābju atlikumi, potenciāli liecina par šī reģiona lielām konformacionālām izmaiņām.

Analizējot pozīcijas ar vislielākajām izmaiņām, ($CSP \geq 0,2$ ppm), identificēti šādi 20 aminoskābju atlikumi: K10, L11, Y20*, V26, G27, T30*, Q32, V33, A34*, T41, T54, H55, S56*, T61, D77, L105*, L114, L116*, R127 un Y129 (2.21. att., A). Aminoskābju atlikumus, atzīmētus ar *, novēro visām TS, izņemot visīsāko, C8:0. TS esteru gadījumos *CSP* uz β_A - β_B

lapas novēro mazāk vai vispār nenovēro. Turklāt, salīdzinot redzamās izmaiņas, novēro, ka C14:0-AC, C18:0-1-*cis/trans*- Δ^9 -AC un EPA-AC izraisa FABP3 struktūrā izmaiņas, kas visvairāk līdzinās C8:0 saistībai. Turklāt β_I - β_J virknēs novēro vairāk izmaiņu. Kopumā ievērojamu *CSP* efektu acilkarnitīniem uzrāda šādi aminoskābju atlikumi: W9, K10, V12, D18, Y20, K22, G27, Q32, V33, A34, T54, H55, L92, T117, T119, T128, Y129 un E130 (2.21. att., B).



2.21. att. *CSP* atspoguļojums uz FABP3 struktūras (PDB ID 3WVM) kompleksā ar **A.** elaidātu (C18:1-*trans*- Δ^9) un **B.** elaidoilkarnitīnu (C18:1-*trans*- Δ^9 -AC) ar norādītiem mijiedarbībā iesaistītiem aminoskābju atlikumiem. Izveidots *PyMOL* programmā [20].

Rezultātā var secināt, ka acilkarnitīni un palmitoil-CoA saistās pie FABP3 tikai vienā β -mucas pusē un, visticamāk, neveido U veida konformāciju. R127, kas parasti veido sāls tiltiņu ar negatīvi lādēto karboksilgrupu, neuzrāda *CSP* acilkarnitīniem. Visticamāk, ka ligands tagad ir estera formā un *L*-karnitīns nespēj iekļūt lipofilajā aktīvajā centrā un izveidot kontaktu ar savu karboksilgrupu. Iegūtie dati aprakstīti darba autores publikācijā [39].

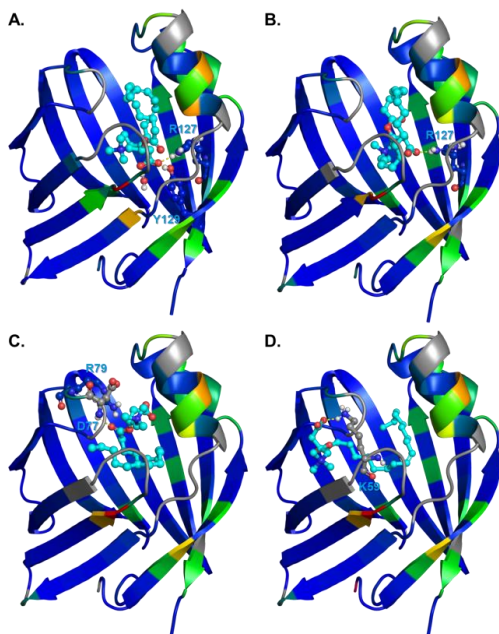
2.10.3. *IFD* aprēķini FABP3-acilkarnitīnu kompleksu izveidei

FABP3-acilkarnitīnu kompleksu modelēšanai izmantoja *IFD* metodi, ģenerējot 200 liganda konformācijas. Precīzā acilkarnitīnu saistības konformācija nav zināma, tāpēc nav iespējams pateikt, kāds ir ūdens molekulu skaits aktīvajā centrā. Šim nolūkam ar *in silico* metodēm tika izveidoti vairāki proteīna modeļi, kas savstarpēji atšķīrās tikai ar ūdens molekulu daudzumu. Pieci FABP3 kompleksi (PDB ID 4TKJ) ar 30, 24, 12, 2 un 0 ūdens molekulām tālāk tika izmantoti *IFD* SP molekulārajā dokingā [51, 52]. Labākos rezultātus izdevās sasniegt, izmantojot struktūras ar 0–12 ūdens molekulām, kas minimāli ierobežo aktīvā centra tilpumu un neizmaina tā hidrofilicitāti. Rezultātā novēro hidrofobo TS esteru saistību.

Lielākā daļā kompleksos *IFD* ievietoja acilkarnitīnus tādās konformācijās, kas atveido garķēžu TS U veida konformāciju (2.22. att., A, B) un novēro kontaktu veidošanās ar R127 un Y129. Otrā konformācijā *L*-karnitīna daļa novietojas tieši liganda ieejas portāla sākumā

(2.22. att., C) un veido ūdeņraža saiti ar D77, kā arī sāls tiltiņu ar R79. Savukārt lipofilās alkilķēdes gals novietojas tieši spraugā starp β_D un β_E virknēm. Trešā konformācija ir viena no visinteresantākajām. Šeit *L*-karnitīna daļa ir vērsta uz ārpusi caur spraugas reģionu (*gap*) starp β_D – β_E virknēm un izveido ūdeņraža saiti ar K59 (2.22. att., D). Savukārt visa liganda lipofilā daļa paliek iekšpusē β -mucā, pie kam tuvāk β_I – β_J virknēm, kā to arī paredz *CSP* eksperimentālie dati.

TS līdzīgas konformācijas izskatās mazticamas, jo eksperimentālie *CSP* dati neapstiprina kontaktu veidošanos ar R127 un Y129. No iegūto konformāciju īpatsvara analīzes redzams, ka *IFD* pārvērtē elektrostātisku kontaktu veidošanos, jo lielākajā daļā kompleksu *L*-karnitīna karboksilgrupa ir saistīta ar kādu no pozitīvi lādētiem aminoskābju atlikumiem FABP3 aktīvajā centrā, taču tas ir pretrunā ar KMR eksperimentiem. Savukārt mazā daļā kompleksu novēroja t. s. apgriezto un atvērto saistības konformāciju (2.22. att., C un D), kas ievērojami labāk saskan ar eksperimentālajiem datiem.



2.22. att. FABP3-acilkarnitīna kompleksi, iegūti ar *IFD*.

A. FABP3-oleoilkarnitīns (C18:1-*cis*- Δ^9 -AC) TS-līdzīgā konformācijā; **B.** FABP3-EPA-AC TS-līdzīgā konformācijā; **C.** FABP3-oleoilkarnitīns apgrieztā konformācijā; **D.** FABP3-oleoilkarnitīns atvērta konformācijā. Proteīns nokrāsots atbilstoši *CSP* un atspoguļots kā lentes. Ligands atspoguļots kā gaiši zilas lodītes un nūjiņas (*ball and stick*). Aminoskābju atlikumi, kas veido ūdeņraža saites ar ligandiem, atspoguļoti kā lodītes un nūjiņas (krāsojums pēc *CSP*). Ūdeņraža saites parādītas kā dzeltenas pārtrauktas līnijas.

Izveidots *PyMOL* programmā [20].

2.11. Mononepiesātināto acilkarnitīnu saistības mehānisma izpēte

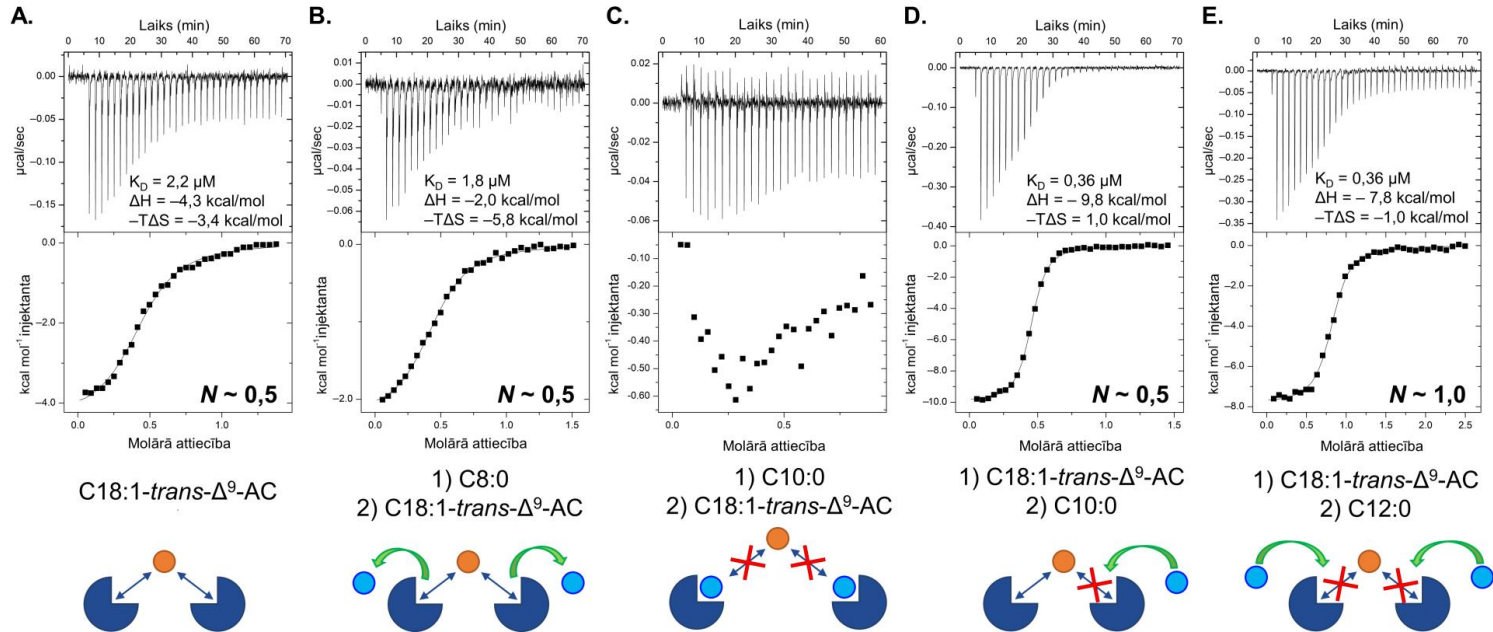
ITC eksperimentos novēroja, ka mononepiesātinātie acilkarnitīni saistās pie FABP3 pēc cita mehānisma, jo eksperimentos iegūtā stehiometrija, *N*, samazinājās līdz $\sim 0,5$ (2.23. att., A).

Viens no iespējamiem skaidrojumiem varētu būt tas, ka viena liganda molekula saista divas proteīna molekulas. Saistības mehānisma labākai raksturošanai veikti *ITC* un KMR izspiešanas jeb konkurences eksperimenti, kuros pārbaudīta mononepiesātināto acilkarnitīnu spēja konkurēt ar TS par saistību FABP3 aktīvajā centrā.

Vispirms veikti *ITC* eksperimenti. Izspiešanu mēģināja novērot starp trim dažāda garuma TS, kas šķīst ūdens buferos bez papildu piedevām. Iegūtie dati apkopoti 2.23. attēlā. Pirmajā eksperimentā FABP3 piesātināja ar C8:0 un pēc tam titrēja ar elaidoilkarnitīnu (C18:1-*trans*- Δ^9 -AC) [2.23. att., B]. Eksperimenta rezultātā C18:1-*trans*- Δ^9 -AC izkonkurēja C8:0 no FABP3 aktīvā centra, turklāt saglabājas saistības mehānisms ar $N \approx 0,5$. Nākamajā eksperimentā (2.23. att., C) FABP3 vispirms piesātināja ar C10:0, pēc tam atkārtoja titrēšanu ar elaidoilkarnitīnu. Šajā eksperimentā saistības siltumefektus nenovēroja.

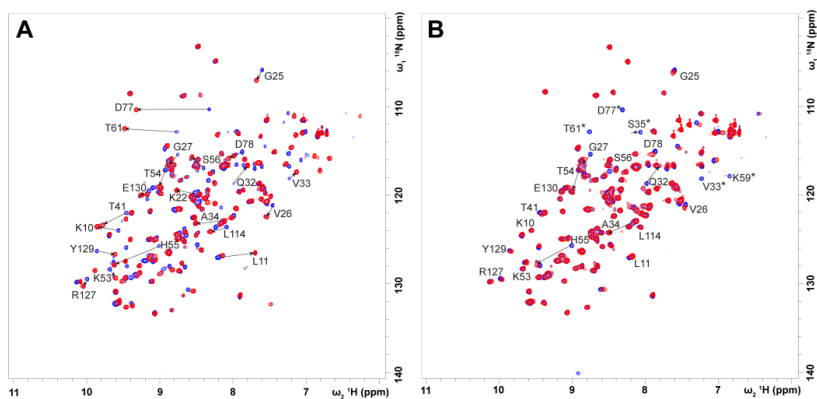
Apgrīztā eksperimentā proteīnu sākumā piesātināja ar C18:1-*trans*- Δ^9 -AC, pēc tam titrēja ar C10:0 (2.23. att., D). Šajā eksperimentā novēroja TS saistību pie proteīna, taču negaidīti tika iegūts $N \approx 0,5$. Šāds eksperiments ir iespējams, ja C10:0 izspiež elaidoilkarnitīnu tikai no vienas tā saistības vietas un nekonkurē ar otro. Šis novērojums ļauj proponēt, ka viena no mononepiesātināto acilkarnitīnu saistīšanās vietām ir FABP3 aktīvajā centrā un C10:0 nespēj to izkonkurēt vājās afinitātes dēļ. Savukārt otrā saistības vieta vai nu nav saistīta ar aktīvo centru, vai arī saistība notiek tajā ar citu konformāciju, kam ir vājāka afinitāte. Kā pēdējā titrēšana šajā eksperimentu sērijā veikta FABP3-C18:1-*trans*- Δ^9 -AC kompleksa titrēšana ar C12:0 (2.23. att., E). Šeit arī novēroja TS saistību pie FABP3 un elaidoil karnitīna izspiešanu, taču atšķirībā no C10:0 novēroja stehiometrijas atgriešanos uz $\sim 1,0$. Tas nozīmē, ka, salīdzinot ar C10:0, C12:0 spēj izkonkurēt mononepiesātinātos acilkarnitīnus no abām to saistīšanās vietām.

Lai pārlicinātos, kā mononepiesātinātie acilkarnitīni konkurē ar TS par FABP3 aktīvo centru, veikti daži proteīnu KMR eksperimenti pēc līdzīga principa kā *ITC* eksperimenti. Proteīnu sākumā piesātināja ar pirmo ligandu un reģistrēja 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektru. Pēc tam KMR stobriņā pievieno otro ligandu un atkārtoti uzņem spektru. 2.24. attēlā norādīti attiecinātie krosipiķi ar vislielākajām CSP, pēc kuriem būtu jāvadās, analizējot trīs komponentu maisījumu. Vislielākā starpība abos spektros saistīta ar dažu krosipiķu pazušānu no spektra (2.24. att., B, atzīmēti ar *). Protī, analizējot spektros C8:0 un elaidoilkarnitīnu konkurences eksperimentos (2.25. att., A), bija jāvadās pēc G27, R31, V33, S35, T61 un D77 krosipiķu pazušānas no spektra. Savukārt, kad elaidoilkarnitīns izspieja TS no FABP3 aktīvā centrā, novēro, ka daļa signālu atgriežas sākotnējās pozīcijās, bet daļa – pazūd. Spektri labi saskan savā starpā, kas apstiprina elaidoilkarnitīna saistību, izkonkurējot C8:0. Šis eksperiments ļoti labi sakrīt ar *ITC* izspiešanas eksperimentu datiem. Turpmāk realizēti divi pretēji eksperimenti starp FABP3-elaidoilkarnitīna kompleksu un C10:0 un C12:0 kā konkurējošiem ligandiem. Iegūtie rezultāti redzami 2.25. attēlā (attiecīgi B un C). Šeit analīze bija vienkāršāka, jo elaidoilkarnitīnam saistoties spektrā novēroja signālu pazušānu. Turpretī, kad spēcīgi saistošā TS izspiež acilkarnitīnu no FABP3 saistīšanās centra, novēro jaunu krosipiķu veidošanos. No šiem datiem redzams, ka abas TS, gan C10:0, gan arī C12:0, saistījās FABP3 aktīvajā centrā ar tādām pašām izmaiņām kā FABP3-TS kompleksos.



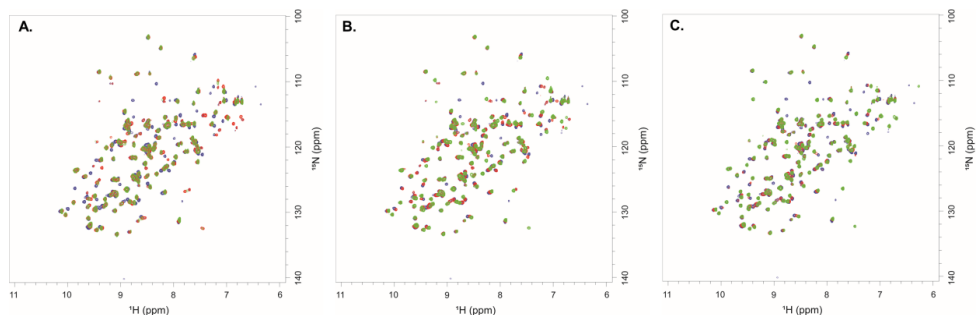
2.23. att. FBP3 ITC izpēšanas/konkurences eksperimenti starp elaidoilkarnītiņu (C18:1-*trans*- Δ^9 -AC) un trim dažāda garuma TS (C8:0 – C12:0) KP1 buferī, 25 °C (augšā) un shematisks atspoguļojums iespējamam saistības/konkurences procesam (apakšā).

A. Elaidoilkarnīta saistība pie apo-FBP3 (reference). Shēmā acilkarnītiņš parādīts kā oranžs aplītis, proteīns – kā tumši zils sektors. **B.** Elaidoilkarnīta saistība pie FBP3-C8:0 kompleksa. Shēmā TS parādīta kā gaiši zils aplītis. **C.** Elaidoilkarnīta saistība pie FBP3-C10:0 kompleksa. Izpēšanu/saistību nenovēro. **D.** C10:0 saistība pie FBP3-elaidoilkarnīta kompleksa. Shēmā parādīts, ka TS (gaiši zils aplītis) izspiež acilkarnītiņu (oranžais aplītis) tikai no vienas saistības vietas, bet ne no otras. **E.** C12:0 saistība pie FBP3-elaidoilkarnīta kompleksa. Shēmā parādīts, ka TS (gaiši zils aplītis) izspiež acilkarnītiņu (oranžais aplītis) no abām saistības vietām. Zaļās bultiņas norāda sekmīgu liganu konkurenci/izpēšanu.



2.24. att. 2D ^1H – ^{15}N HSQC spektru superpozīcijas ar attiecinātiem aminoskābju atlikumiem: **A.** FABP3-C8:0 un **B.** FABP3-C18:1-*trans*- Δ^9 -AC kompleksiem KPi buferī pH 7,6.

Spektru superpozīcija: apo-FABP3 – zilā krāsā un FABP3-C8:0 (A) vai FABP3-C18:1-*trans*- Δ^9 -AC komplekss (B) – sarkanā krāsā kopā ar norādītiem aminoskābju atlikumu numuriem, kam novēroja CSP. Melnās bultiņas norāda krospiķa nobīdes virzienu. Acilkarnīna kompleksa gadījumā aminoskābju atlikumi, kas pazuda no spektra, atzīmēti ar *.



2.25. att. 2D ^1H – ^{15}N HSQC spektru superpozīcijas FABP3 izspiešanas eksperimentiem kompleksiem KPi buferī pH 7,6.

A. FABP3 kompleksā ar C8:0, kam pielikts klāt laidoilkarnitīns (C18:1-*trans*- Δ^9 -AC). **B.** FABP3 kompleksā ar C18:1-*trans*- Δ^9 -AC, kam pielikts klāt C10:0. **C.** FABP3 kompleksā ar C18:1-*trans*- Δ^9 -AC, kam pielikts klāt C12:0. Apo-FABP3 – zilā krāsā; komplekss ar pirmo ligandu – sarkanā krāsā; komplekss ar otro ligandu – zaļā krāsā.

Rezultātā redzams, ka mononepiesātinātie acilkarnitīni saistās FABP3 aktīvajā centrā, taču savas uzbūves dēļ nespēj ieņemt tādu pašu konformāciju kā TS. Pašlaik līdz galam nav skaidrs, kā viena liganda molekula saista divas proteīna molekulas. Iespējams, ka saistība notiek caur karnīna molekulu, taču viens pats karnitīns nesaistās pie FABP3 (saistību nenovēroja ne *ITC*, ne KMR eksperimentos). Tomēr pastāv varbūtība, ka saistība iespējama tikai karnīna esteriem ar TS “astes” garumu ≥ 14 , kas darbojas kā “enkurs” un fiksē acilkarnitīnu FABP3 iekšpusē. Iegūtie dati aprakstīti darba autore publikācijā [39].

2.12. FABP3 substrātu klāsta paplašināšana

Apkopojot visus FABP3, TS un acilkarnitīnu saistības izpētes datus, redzams, ka FABP3 spēj saistīt ne tikai dažāda garuma TS, bet arī vidēja garuma un garķēžu acilkarnitīnus (2.6. tab.). Izmantotās fizikāli ķīmiskās metodes ar augstu ticamību ļāva noteikt, ka pie FABP3 saistās mono- un polinepiesātinātie acilkarnitīni, bet uzrādot par vienu kārtu zemāku afinitāti nekā garķēžu TS.

2.6. tabula

Apkopojums FABP3-ligandu saistības pētījumiem

Savienojums	Saišinātā formula	Saistība ITC	Saistība KMR	Jauns saistības mehānisms
kaprilāts	C8:0	+	+	nav
kaprināts	C10:0	+	+	nav
laurināts	C12:0	+	+	nav
miristāts	C14:0	+	+	nav
palmitāts	C16:0	+	+	nav
stearāts	C18:0	+	+	nav
oleāts	C18:1 <i>cis</i> - Δ^9	+	+	nav
elaidāts	C18:1 <i>trans</i> - Δ^9	+	+	nav
EPA	20:5 <i>cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14,17}$	+	+	nav
palmitoil-CoA	C16:0-CoA	+	+	nav
kaprioloilkarnitīns	C8:0-AC	nesaistās	nesaistās	nav
laurioilkarnitīns	C12:0-AC	nesaistās	+	nav
miristoilkarnitīns	C14:0-AC	+	+	+
palmitoilkarnitīns	C16:0-AC	nav nosakāma	tikai zemā pH	nav nosakāma
oleoilkarnitīns	C18:1 <i>cis</i> - Δ^9 -AC	+	+	+
elaidoilkarnitīns	C18:1 <i>trans</i> - Δ^9 -AC	+	+	+
EPA-karnitīns	20:5 <i>cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -AC	+	+	nav

Zaļā krāsā – pozitīvs, izteikts efekts, saistība viennozīmīgi novērota. Dzeltēnā krāsā – saistības rādītāji/efekti vāji izteikti. Baltā krāsā – saistību nenovēro vai arī neizdevās noteikt konkrētos eksperimentālos apstākļos.

PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

1. Ar divām vai četrām mutācijām BBOX aktīvajā centrā nepietiek, lai izveidotu efektīvu TMLD mimētiķi, kas spētu hidroksilēt TML vai tā analogus, taču ir iespējama BBOX mutantu un TML saistība, kas nenoved pie katalītiskās reakcijas.
2. TMLD modelis, kas ģenerēts ar mākslīgā intelekta palīdzību (*AlphaFold*), ir daudz stabilāks par modeļiem, kas ģenerēti ar proteīnu homoloģiskās modelēšanas programmām. Par to liecina MD simulācijas *RMSD*, *RMSF* un statistiskā analīze.
3. *AlphaFold* ar relatīvi augstu precizitāti atveido TMLD enzīma aktīvo centru, par ko liecina pLDDT un sagaidāmā pozīcijas kļūdas analīze, kā arī novērota laba sakritība ar eksperimentāliem datiem.
4. Rekombinanti iegūtā TMLD stabilitāti un aktivitāti iespējams paaugstināt, ekspresējot to zemās temperatūrās un attīrot, izmantojot cukuru piedevas augstās koncentrācijās.
5. TMLD enzīmā Fe(II) vietā kā izostēros katjonus var izmantot tikai Co(II) un Zn(II), bet ne Ni(II), kas savukārt deva vislabākos rezultātus BBOX saistības eksperimentos.
6. Izstrādāta metodika TMLD potenciālu inhibitoru raksturošanai ar *ITC*.
7. Atrasta korelācija starp TMLD substrāta konversiju, sukcināta/hidroksilētā produkta attiecību un saistības mehānismu.
8. Pamatojoties uz *ITC* datiem, izveidots uz TMLD substrāta analogiem balstīts farmakoforais modelis.
9. TMLD pēc analogijas ar BBOX ir spējīgs hidroksilēt 2*S*,3*S*-HTML un 2*S*,3*R*-HTML līdz keto-TML, tomēr dabiskā reakcijas produkta, 2*S*,3*S*-HTML, hidroksilēšana ir daudz lēnāka un neizdevīgākā, salīdzinot ar 2*S*,3*R*-HTML konversiju.
10. Izstrādāta un validēta dažāda garuma piesātināto un nepiesātināto TS *ITC* metodika šķīdību uzlabojošā deterģenta, *Triton X-100*, klātbūtnē, kas deva iespēju precīzi noteikt saistības termodinamiskos parametrus un novērtēt afinitāti.
11. Paplašināts FABP3 substrātu klāsts. Pierādīts, ka FABP3 spēj saistīt ne tikai TS, bet arī to karnitīna un CoA esterus. Mononepiesātināto acilkarnitīnu gadījumā novērots jauns saistības mehānisms.
12. Garķēžu acilkarnitīnu un CoA esteru afinitāte pret FABP3 ir vismaz par kārtu zemāka nekā atbilstošajām TS. *L*-Karnitīns un CoA traucē acilkarnitīniem ieiet dziļi FABP3 saistības kabatā, veidojot proteīna-liganda konformācijas ar neoptimāliem kontaktiem un saistībai nelabvēlīgu solvatāciju vai konformacionālām izmaiņām.
13. Attiecinātas apo-FABP3 un 14 FABP3-ligandu kompleksu pamatķēdes ķīmiskās nobīdes, kas izmantotas plašā *CSP* analīzē. Izmantojot *CSP* datus un *in silico* molekulāro dokingu, uzmodelētas iespējamās acilkarnitīnu saistības konformācijas.
14. Pierādīta konkurence starp acilkarnitīniem un TS par FABP3 saistības kabatu.

SECINĀJUMI

1. Izstrādātā *ITC* metodika ļauj veiksmīgi raksturot substrātam līdzīgo savienojumu saistību ar TMLD. Kombinācijā ar enzimatiskās reakcijas datiem tas dod iespēju noteikt gan termodinamiskus parametrus (saistības afinitāti, entalpiju un entropiju), gan arī ligandu potenciālu kalpot kā enzīma substrātiem.
2. Atklāti divi atšķirīgi substrātu saistības mehānismi: entalpijas un entropijas virzīti, kas atšķiras ar ligandu izraisītām izmaiņām TMLD aktīvajā centrā. Atrasta korelācija starp TMLD substrāta konversiju un saistības mehānismu. Substrāti, kas saistās pie TMLD pēc entropijas virzīta mehānisma, hidroksilējas mazākā mērā.
3. Atklāts, ka dažiem TML analogiem α KG reakcija ir atsaistīta no hidroksilēšanas reakcijas. Rezultātā šādi savienojumi ilgāk uzturas enzīma aktīvajā centrā, neveidojot reakcijas produktu, un var būt izmantoti *de novo* TMLD inhibitoru dizainā, pateicoties ilgākiem uzturēšanās laikiem.
4. Izveidotais farmakoforais modelis apstiprina trīs funkcionālo elementu nepieciešamību stiprai substrātu saistībai un var tikt izmantots, lai novērtētu jauno TML-analogo afinitāti pret TMLD.
5. Izmantojot fizikāli ķīmiskās metodes (*ITC* un KMR), pierādīts, ka FABP3 spēj saistīt ne tikai piesātinātas un nepiesātinātas garķēžu TS, bet arī atbilstošo garķēžu TS karnitīna vai CoA esterus. Polinepiesātinātie acilkarnitīni un CoA esteri saistās FABP3 aktīvajā centrā līdzīgi kā TS, savukārt mononepiesātinātie – pēc atšķirīga mehānisma, saistot divas proteīna molekulas ar vienu liganda molekulu.
6. Acilkarnitīni spēj izkonkurēt no FABP3 aktīvā centra īsas TS līdz kaprinātam (C10:0), kas savukārt spēj izkonkurēt acilkarnitīnus no otrās saistības vietas. Garķēžu TS, sākot ar laurinātu, pilnībā izspiež acilkarnitīnus no FABP3.
7. Iegūtie dati nosaka, ka FABP3 ir spējīgs saistīt acilkarnitīnus, pasargāt šūnas no acilkarnitīnu izraisītiem bojājumiem un potenciāli var darboties kā kardioprotektants. Viens no terapijas veidiem būtu iniciēt tā paaugstinātu ekspresiju mērķtiecīgi sirds muskulī, izmantojot mRNS vakcīnu pieeju.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- [1] World Health Organization. Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability. https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html.
- [2] Dambrova, M.; Zuurbier, C. J.; Borutaite, V.; Liepinsh, E.; Makrecka-Kuka, M. Energy Substrate Metabolism and Mitochondrial Oxidative Stress in Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *165*, 24–37.
- [3] Liepinsh, E.; Makrecka-Kuka, M.; Volska, K.; Kuka, J.; Makarova, E.; Antone, U.; Sevostjanovs, E.; Vilskersts, R.; Strods, A.; Tars, K.; Dambrova, M. Long-Chain Acylcarnitines Determine Ischaemia/Reperfusion-Induced Damage in Heart Mitochondria. *Biochem. J.* **2016**, *473* (9), 1191–1202.
- [4] Dambrova, M.; Makrecka-Kuka, M.; Kuka, J.; Vilskersts, R.; Nordberg, D.; Attwood, M. M.; Smesny, S.; Sen, Z. D.; Guo, A. C.; Oler, E.; Tian, S.; Zheng, J.; Wishart, D. S.; Liepinsh, E.; Schiöth, H. B. Acylcarnitines: Nomenclature, Biomarkers, Therapeutic Potential, Drug Targets, and Clinical Trials. *Pharmacol. Rev.* **2022**, *74* (3), 506–551.
- [5] Liepinsh, E.; Kuka, J.; Vilks, K.; Svalbe, B.; Stelfa, G.; Vilskersts, R.; Sevostjanovs, E.; Goldins, N. R.; Groma, V.; Grinberga, S.; Plaas, M.; Makrecka-Kuka, M.; Dambrova, M. Low Cardiac Content of Long-Chain Acylcarnitines in TMLHE Knockout Mice Prevents Ischaemia-Reperfusion-Induced Mitochondrial and Cardiac Damage. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *177*, 370–380.
- [6] Kerner, J.; Hoppel, C. Fatty Acid Import into Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2000**, *1486* (1), 1–17.
- [7] Ramsay, R. R.; Gandour, R. D.; Van Der Leij, F. R. Molecular Enzymology of Carnitine Transfer and Transport. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2001**, *1546*, 21–43.
- [8] Reuter, S. E.; Evans, A. M. Carnitine and Acylcarnitines: Pharmacokinetic, Pharmacological and Clinical Aspects. *Clin. Pharmacokinet.* **2012**, *51* (9), 553–572.
- [9] Rebouche, C. J. Carnitine Function and Requirements during the Life Cycle. *FASEB J.* **1992**, *6* (15), 3379–3386.
- [10] Leśniak, R. K.; Markolovic, S.; Tars, K.; Schofield, C. J. Human Carnitine Biosynthesis Proceeds via (2S,3S)-3-Hydroxy-N ϵ -Trimethyllysine. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (2), 440–442.
- [11] Reddy, Y. V.; Al Temimi, A. H. K.; White, P. B.; Mecinović, J. Evidence That Trimethyllysine Hydroxylase Catalyzes the Formation of (2S,3S)-3-Hydroxy-N ϵ -Trimethyllysine. *Org. Lett.* **2017**, *19* (2), 400–403.
- [12] Vaz, F. M.; van Vlies, N. Chapter 13. Dioxygenases of Carnitine Biosynthesis: 6- N -Trimethyllysine and γ -Butyrobetaine Hydroxylases. In *2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases*; **2015**; pp 324–337.
- [13] Herr, C. Q.; Hausinger, R. P. Amazing Diversity in Biochemical Roles of Fe(II)/2-Oxoglutarate Oxygenases. *Trends Biochem. Sci.* **2018**, *43* (7), 517–532.
- [14] Islam, M. S.; Leissing, T. M.; Chowdhury, R.; Hopkinson, R. J.; Schofield, C. J. 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases. *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87* (1), 585–620.
- [15] Tars, K.; Rumnieks, J.; Zeltins, A.; Kazaks, A.; Kotelovica, S.; Leonciks, A.; Sharipo, J.; Viksna, A.; Kuka, J.; Liepinsh, E.; Dambrova, M. Crystal Structure of Human Gamma-Butyrobetaine Hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *398* (4), 634–639.
- [16] Leung, I. K. H.; Krojer, T. J.; Kochan, G. T.; Henry, L.; von Delft, F.; Claridge, T. D. W.; Oppermann, U.; McDonough, M. a.; Schofield, C. J. Structural and Mechanistic Studies on γ -Butyrobetaine Hydroxylase. *Chem. Biol.* **2010**, *17* (12), 1316–1324.

- [17] Rydzik, A. M.; Leung, I. K. H.; Kochan, G. T.; McDonough, M. A.; Claridge, T. D. W.; Schofield, C. J. Oxygenase-Catalyzed Desymmetrization of N, N -Dialkyl-Piperidine-4-Carboxylic Acids. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53* (41), 10925–10927.
- [18] Rydzik, A. M.; Chowdhury, R.; Kochan, G. T.; Williams, S. T.; McDonough, M. A.; Kawamura, A.; Schofield, C. J. Modulating Carnitine Levels by Targeting Its Biosynthesis – Selective Inhibition of γ -Butyrobetaine Hydroxylase. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (5), 1765.
- [19] Wang, Y.; Reddy, Y. V.; Al Temimi, A. H. K.; Venselaar, H.; Nelissen, F. H. T.; Lenstra, D. C.; Mecinović, J. Investigating the Active Site of Human Trimethyllysine Hydroxylase. *Biochem. J.* **2019**, *476* (7), 1109–1119.
- [20] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.2, **2021**.
- [21] UniProt. P05413 . FABPH_HUMAN.
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P05413/entry#sequences>.
- [22] Zimmerman, A. W.; Veerkamp, J. H. New Insights into the Structure and Function of Fatty Acid-Binding Proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59* (7), 1096–1116.
- [23] Binás, B.; Danneberg, H.; Mcwhir, J.; Mullins, L.; Clark, A. J. Requirement for the Heart-type Fatty Acid Binding Protein in Cardiac Fatty Acid Utilization. *FASEB J.* **1999**, *13* (8), 805–812.
- [24] Storch, J.; Thumser, A. E. A. The Fatty Acid Transport Function of Fatty Acid-Binding Proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2000**, *1486* (1), 28–44.
- [25] Scapin, G.; Young, A. C. M.; Kromminga, A.; Veerkamp, J. H.; Gordon, J. I.; Sacchettini, J. C. High Resolution X-Ray Studies of Mammalian Intestinal and Muscle Fatty Acid-Binding Proteins Provide an Opportunity for Defining the Chemical Nature of Fatty Acid: Protein Interactions. *Mol. Cell. Biochem.* **1993**, *123* (1–2), 3–13.
- [26] Lassen, D.; Lucke, C.; Kveder, M.; Mesgarzadeh, A.; Schmidt, J. M.; Specht, B.; Lezius, A.; Spener, F.; Ruterjans, H. Three-Dimensional Structure of Bovine Heart Fatty-Acid-Binding Protein with Bound Palmitic Acid, Determined by Multidimensional NMR Spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230* (1), 266–280.
- [27] Matsuoka, D.; Sugiyama, S.; Murata, M.; Matsuoka, S. Molecular Dynamics Simulations of Heart-Type Fatty Acid Binding Protein in Apo and Holo Forms, and Hydration Structure Analyses in the Binding Cavity. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (1), 114–127.
- [28] Kazaks, A.; Makrečka-Kuka, M.; Kuka, J.; Voronkova, T.; Akopjana, I.; Grinberga, S.; Pugovics, O.; Tars, K. Expression and Purification of Active, Stabilized Trimethyllysine Hydroxylase. *Protein Expr. Purif.* **2014**, *104* (September), 1–6.
- [29] Rydzik, A. M.; Leung, I. K. H.; Kochan, G. T.; Loik, N. D.; Henry, L.; McDonough, M. A.; Claridge, T. D. W.; Schofield, C. J. Comparison of the Substrate Selectivity and Biochemical Properties of Human and Bacterial γ -Butyrobetaine Hydroxylase. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (33), 6354–6358.
- [30] Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; 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, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596* (7873), 583–589.
- [31] Varadi, M.; Anyango, S.; Deshpande, M.; Nair, S.; Natassia, C.; Yordanova, G.; Yuan, D.; Stroe, O.; Wood, G.; Laydon, A.; Židek, A.; Green, T.; Tunyasuvunakool, K.; Petersen, S.; Jumper, J.; Clancy, E.; Green, R.; Vora, A.; Lutfi, M.; Figurnov, M.; Cowie, A.; Hobbs, N.; Kohli, P.; Kleywegt, G.; Birney, E.; Hassabis, D.; Velankar, S. AlphaFold

- Protein Structure Database: Massively Expanding the Structural Coverage of Protein-Sequence Space with High-Accuracy Models. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50* (D1), D439–D444.
- [32] Zelencova, D. ϵ -Trimetillizīna Hidroksilāze. Inhibitoru Meklējumi, Rīgas Tehniskā universitāte, **2015**.
- [33] Fowler, D. M.; Stephany, J. J.; Fields, S. Measuring the Activity of Protein Variants on a Large Scale Using Deep Mutational Scanning. *Nat. Protoc.* **2014**, *9* (9), 2267–2284.
- [34] Prime, Version 4.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2015**.
- [35] Zelencova-Gopejenko, D.; Grandane, A.; Loza, E.; Lola, D.; Sipola, A.; Liepinsh, E.; Arsenyan, P.; Jaudzems, K. Binding versus Enzymatic Processing of ϵ -Trimethyllysine Dioxygenase Substrate Analogues. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13* (11), 1723–1729.
- [36] Tars, K.; Leitans, J.; Kazaks, A.; Zelencova, D.; Liepinsh, E.; Kuka, J.; Makrecka, M.; Lola, D.; Andrianovs, V.; Gustina, D.; Grinberga, S.; Liepinsh, E.; Kalvinsh, I.; Dambrova, M.; Loza, E.; Pugovics, O. Targeting Carnitine Biosynthesis: Discovery of New Inhibitors against γ -Butyrobetaine Hydroxylase. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (6), 2213–2236.
- [37] Al Temimi, A. H. K.; Pieters, B. J. G. E.; Reddy, Y. V.; White, P. B.; Mecinović, J. Substrate Scope for Trimethyllysine Hydroxylase Catalysis. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (87), 12849–12852.
- [38] Rydzik, A. M.; Leung, I. K. H.; Kochan, G. T.; Thalhammer, A.; Oppermann, U.; Claridge, T. D. W.; Schofield, C. J. Development and Application of a Fluoride-Detection-Based Fluorescence Assay for γ -Butyrobetaine Hydroxylase. *ChemBioChem* **2012**, *13* (11), 1559–1563.
- [39] Zelencova-Gopejenko, D.; Videja, M.; Grandane, A.; Pudnika-Okinčica, L.; Sipola, A.; Vilks, K.; Dambrova, M.; Jaudzems, K.; Liepinsh, E. Heart-Type Fatty Acid Binding Protein Binds Long-Chain Acylcarnitines and Protects Against Lipotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (6), 5528.
- [40] Matsuoka, S.; Sugiyama, S.; Matsuoka, D.; Hirose, M.; Lethu, S.; Ano, H.; Hara, T.; Ichihara, O.; Kimura, S. R.; Murakami, S.; Ishida, H.; Mizohata, E.; Inoue, T.; Murata, M. Water-Mediated Recognition of Simple Alkyl Chains by Heart-Type Fatty-Acid-Binding Protein. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54* (5), 1508–1511.
- [41] Spector, A. A.; John, K.; Fletcher, J. E. Binding of Long-Chain Fatty Acids to Bovine Serum Albumin. *J. Lipid Res.* **1969**, *10*, 56–67.
- [42] Malik, W. U.; Jain, A. K. Electrometric Determination of Critical Micelle Concentration of Soap Solutions. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1967**, *14* (1), 37–41.
- [43] Hoerr, C. W.; Pool, W. O.; Ralston, A. W. The Effect of Water on the Solidification Points of Fatty Acids. Solubility of Water in Fatty Acids. *Oil Soap* **1942**, *19* (7), 126–128.
- [44] Sharp, K. Entropy--Enthalpy Compensation: Fact or Artifact? *Protein Sci.* **2001**, *10* (3), 661–667.
- [45] Ford, D. M. Enthalpy-Entropy Compensation Is Not a General Feature of Weak Association. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 16167–16170.
- [46] Goldberg, R. N.; Kishore, N.; Lennen, R. M. Thermodynamic Quantities for the Ionization Reaction of Buffers. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2002**, *31* (2), 231–370.
- [47] Ho, J. K.; Duclos, R. I.; Hamilton, J. A. Interactions of Acyl Carnitines with Model Membranes. *J. Lipid Res.* **2002**, *43* (9), 1429–1439.
- [48] Yalkowsky, S. H.; Zografī, G. Some Micellar Properties of Long-Chain Acylcarnitines. *J. Colloid Interface Sci.* **1970**, *34* (4), 525–533.
- [49] Williamson, M. P. Using Chemical Shift Perturbation to Characterise Ligand Binding. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *73*, 1–16.

- [50] Hobbs, B.; Drant, J.; Williamson, M. P. The Measurement of Binding Affinities by NMR Chemical Shift Perturbation. *J. Biomol. NMR* **2022**, *76* (4), 153–163.
- [51] Schrödinger Release 2022-1: Induced Fit Docking Protocol; Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Prime, Schrödinger, **2021**.
- [52] Sherman, W.; Day, T.; Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Farid, R. Novel Procedure for Modeling Ligand/Receptor Induced Fit Effects. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (2), 534–553.



Diāna Zeļencova-Gopejenko dzimusi 1990. gadā Rīgā. Rīgas Tehniskajā universitātē ieguvusi inženierzinātņu bakalaura (2013) un maģistra (2015) grādu ķīmijas tehnoloģijā. Kopš 2011. gada strādā Latvijas Organiskās sintēzes institūtā. Patlaban ir zinātniskā asistente Struktūrbioloģijas un zāļvielu dizaina laboratorijā (iepriekš Fizikāli Organiskās ķīmijas laboratorijā) *Dr. chem.* Kristapa Jaudzema vadībā. Doktorantūras laikā studējusi aprēķinu ķīmiju Cīrihes Universitātē (*InnovaBalt* projektā) un struktūrbioloģiju Trumses Universitātē (*ERASMUS+*). Zinātniskās intereses saistītas ar proteīnu strukturāliem pētījumiem un jaunu zāļvielu dizainu, izmantojot kodolmagnētiskās rezonanses, kristalogrāfijas un aprēķinu metodes. Ir deviņu *Scopus* un *Web of Science* datubāzē indeksētu oriģinālpublikāciju līdzautore.