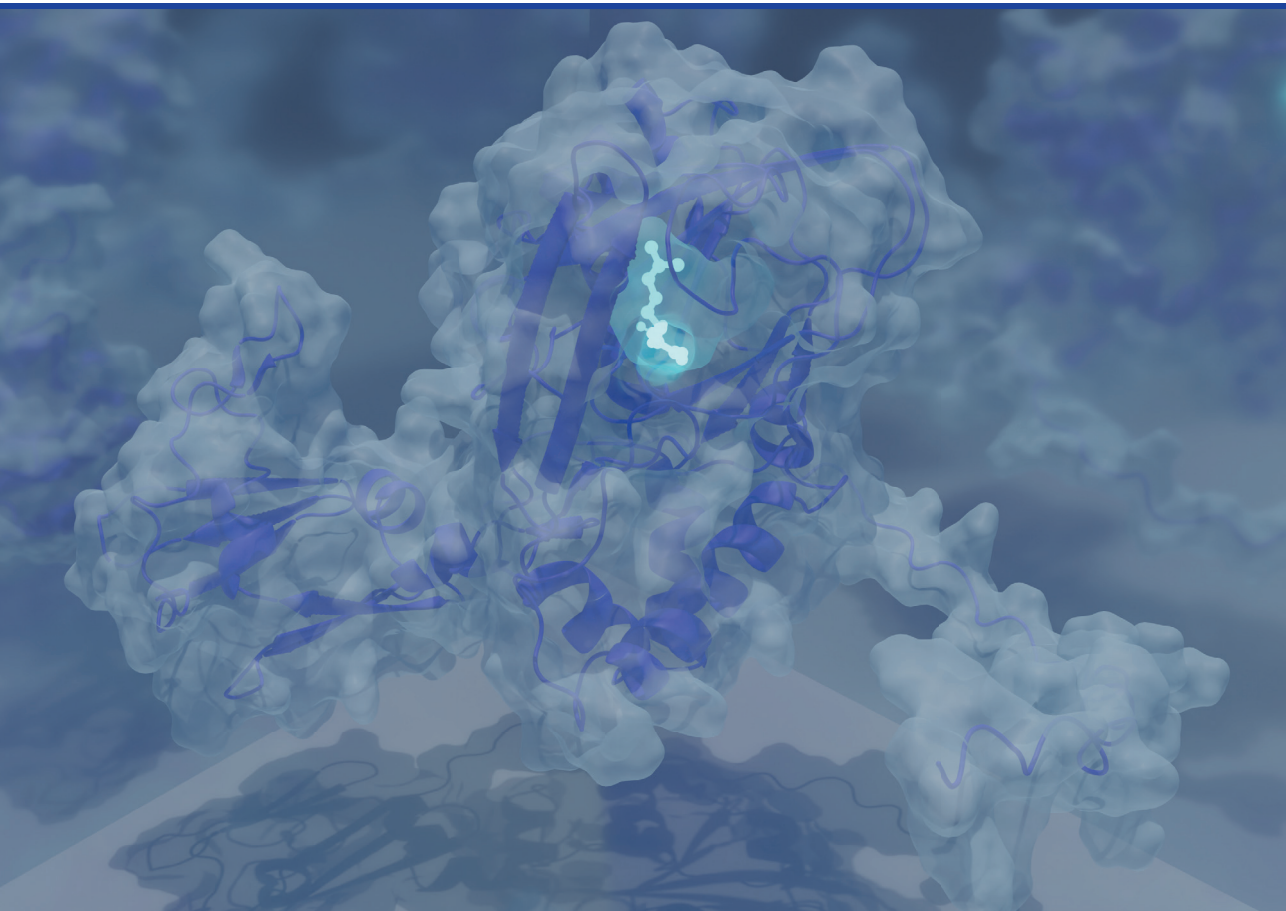


**Diāna Zeļencova-Gopejenko**

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

Promocijas darbs



**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 darbs**

Zinātniskais vadītājs:

*Dr. chem.* KRISTAPS JAUDZEMS

RTU Izdevniecība

Rīga 2023



Zeļencova-Gopejenko D. Taukskājbu metabolisma regulācijā iesaistīto proteīnu  
strukturālie un funkcionālie pētījumi.  
Promocijas darbs.  
Rīga: RTU Izdevniecība, 2023. – 221. 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.



# 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  $\gamma$ -butirobetaīna dioksigenāzes (BBOX),  $\epsilon$ -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

## ANNOTATION

The Doctoral Thesis is devoted to structure-activity relationship studies of  $\gamma$ -butyrobetaine dioxygenase (BBOX),  $\epsilon$ -trimethyl-*L*-lysine dioxygenase (TMLD), and heart-type fatty acid binding protein (FABP3) ligands. Protein-ligand binding was determined and characterized by means of isothermal titration calorimetry (ITC), nuclear magnetic resonance (NMR), and molecular modelling. A protocol for molecular dynamics of metalloproteins was developed and successfully applied for simulations of BBOX and TMLD mimetics. Key structural elements for substrate binding to BBOX and TMLD mimetics were determined in combination with substrate association/dissociation studies. Two new ITC approaches were established and implemented for the determination of ligand binding thermodynamics to TMLD and FABP3. The pharmacophore model for potential TMLD inhibitors was designed based on the experimental data. A new class of FABP3 substrates with a different binding mechanism in comparison to fatty acids was found.

**Keywords:** BBOX, TMLD, FABP3, NMR, ITC, MOLECULAR DOCKING, MOLECULAR DYNAMICS

# SATURS

LIETOTIE SAĪSINĀJUMI .....	9
IEVADS .....	11
DARBA MĒRĶI .....	12
DARBA UZDEVUMI.....	12
DARBA ZINĀTNISKĀ NOVITĀTE .....	12
PRAKTISKAIS LIETOJUMS .....	12
DARBA APROBĀCIJA, PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES .....	13
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	16
1.1. Acilkarnitīni.....	16
1.2. <i>L</i> -Karnitīna regulācija .....	17
1.2.1. BBOX strukturālie un inhibitoru pētījumi .....	19
1.2.1.1. BBOX strukturālā daudzveidība .....	19
1.2.1.2. GBB-analogu konversija.....	21
1.2.2. TMLD funkcionālie un strukturālie pētījumi .....	22
1.2.2.1. TMLD substrātu klāsta paplašināšana .....	22
1.2.2.2. TMLD katalītiskās reakcijas izpēte .....	24
1.2.2.3. TMLD mutaģenēze .....	24
1.3. Taukskābes saistošie proteīni (FABP).....	28
1.3.1. FABP funkcijas un daudzveidība.....	28
1.3.2. Sirds FABP struktūra, īpašības un ligandu afinitāte .....	30
1.4. Dinamiskā gaismas izkliede .....	35
1.5. Proteīna-liganda mijiedarbības izpēte .....	36
1.5.1. Termiskās nobīdes analīzes ( <i>TSA</i> ) metode.....	36
1.5.2. Saistības termodinamikas parametru noteikšana ar <i>ITC</i> .....	38
1.5.2.1. <i>ITC</i> metode.....	38
1.5.2.2. Saistības termodinamika .....	40
1.5.2.2.1. Entalpijas komponente.....	40
1.5.2.2.2. Entropijas komponente .....	42
1.5.2.3. Siltumkapacitāte.....	42
1.5.3. Proteīnu KMR .....	45
1.5.3.1. 2D <sup>1</sup> H– <sup>15</sup> N HSQC kā proteīna “pirkstu nospieduma” spektrs .....	47
1.5.3.2. Ķīmisko nobīžu perturbācija liganda saistības raksturošanai .....	49
1.5.3.3. 3D spektri proteīnu ķīmisko nobīžu attiecināšanai.....	51
1.6. Proteīnu 3D struktūras paredzēšana, izmantojot mākslīgo intelektu.....	55
1.7. Proteīnu dinamika.....	57
2. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒŠANA .....	60
2.1. TMLD mimētiķu izveide uz BBOX bāzes .....	60
2.1.1. <i>In silico</i> BBOX mutantu un MD simulāciju protokola izstrāde.....	60
2.1.2. BBOX mutantu MD simulācijas .....	74
2.1.3. <i>In vitro</i> BBOX-4m un 2m mutantu izveide un iegūšana. Enzimātiskie testi .....	77

2.1.3.1.	BBOX-4m iegūšana .....	77
2.1.3.2.	BBOX-2m iegūšana .....	80
2.1.3.3.	MBP-BBOX-4m un MBP-BBOX-2m enzimatiskie testi .....	83
2.2.	TMLD modeļa izveide ar mākslīgo intelektu ( <i>AlphaFold</i> ) .....	87
2.3.	Aktīva MBP-TMLD iegūšanas optimizācija lielā apjomā .....	91
2.3.1.	Ekspresijas un attīrīšanas apstākļu optimizācija .....	91
2.3.1.1.	Ekspresijas barotnes testi .....	91
2.3.1.2.	Stabilizējošo apstākļu meklējumi, izmantojot <i>TSA</i> metodi .....	92
2.3.1.3.	Stabilizējošo piedevu testi šūnu sonifikācijas laikā .....	94
2.3.2.	EDTA ietekme uz MBP-TMLD .....	96
2.4.	<i>ITC</i> metodikas izstrāde MBP-TMLD enzīmam .....	99
2.5.	TMLD struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte .....	103
2.5.1.	TML analoģu saistības likumsakarību izpēte .....	103
2.5.2.	Farmakoforā modeļa izveide .....	111
2.5.3.	TMLD enzimatiskās reakcijas izpēte .....	114
2.6.	FABP3 lipoprotektīvās īpašības šūnu līmenī. Hipotēzes izveide .....	118
2.7.	Apstākļu meklējumi FABP3 termodinamiskiem pētījumiem .....	120
2.7.1.	TS šķīdības un šķīdumu stabilizējošo piedevu meklējumi .....	120
2.7.2.	Piedevu efekts uz FABP3 struktūru .....	121
2.7.3.	Stabilizējošo piedevu efekts uz termodinamiskajiem saistības parametriem ...	123
2.7.4.	FABP3-laurināta saistības siltumkapacitātes noteikšana .....	126
2.8.	FABP3 termodinamiskie pētījumi .....	129
2.8.1.	FABP3-TS saistības termodinamika .....	129
2.8.2.	FABP3-acilkarnitīnu un palmitoil-CoA saistības termodinamika .....	132
2.8.3.	Piesātināto TS karnitīna esteru pētījumi .....	133
2.9.	Palmitoilkarnitīna efekts uz FABP3 pie zema pH .....	135
2.10.	FABP3 saistības validācija ar KMR .....	139
2.10.1.	Ķīmisko nobīžu perturbāciju analīzes pamatprincipi .....	139
2.10.2.	FABP3-ligandu kompleksu <i>CSP</i> analīze .....	140
2.10.3.	<i>IFD</i> aprēķini FABP3-acilkarnitīnu kompleksu izveidei .....	142
2.11.	Mononepiesātināto acilkarnitīnu saistības mehānisma izpēte .....	145
2.12.	FABP3 substrātu klāsta paplašināšana .....	149
3.	EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA .....	150
3.1.	Aparatūra .....	150
3.1.1.	Iekārtas proteīnu-ligandu mijiedarbības izpētei .....	150
3.1.2.	Iekārtas, izmantotas proteīnu ražošanā, attīrīšanā un detektēšanā .....	150
3.2.	Reaģenti un protokoli .....	150
3.2.1.	Izmantotie reaģenti .....	150
3.2.2.	Buferi un barotnes .....	151
3.2.2.1.	Barotnes .....	151
3.2.2.2.	Buferi darbam ar BBOX mutantiem un MBP-TMLD .....	151
3.2.2.3.	Buferi darbam ar FABP3 .....	151

3.3.	Proteīnu iegūšana.....	152
3.3.1.	MBP-TMLD iegūšana.....	153
3.3.2.	BBOX mutantu iegūšana.....	154
3.3.2.1.	BBOX mutantu ekspresijas vektoru izveide.....	154
3.3.2.2.	MBP-BBOX-4m un MBP-BBOX-2m iegūšana.....	156
3.3.3.	FABP3 iegūšana.....	157
3.3.3.1.	Neiezīmētā FABP3 iegūšana.....	157
3.3.3.2.	<sup>15</sup> N-iezīmētā vai <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C-dubultiezīmētā FABP3 iegūšana.....	157
3.3.3.3.	FABP3 attīrīšana.....	157
3.4.	TSA protokols.....	159
3.5.	ITC protokoli.....	161
3.5.1.	ITC protokoli MBP-TMLD enzīmam.....	161
3.5.2.	ITC protokoli FABP3 proteīnam.....	161
3.6.	Enzimātiskās reakcijas protokols.....	162
3.7.	TML analoģu KMR spektru interpretācija.....	163
3.8.	Proteīnu KMR.....	164
3.9.	Datormodelēšana.....	165
3.9.1.	Molekulārais dokings.....	165
3.9.1.1.	TMLD molekulārais dokings.....	165
3.9.1.2.	FABP3 molekulārais dokings.....	165
3.9.2.	<i>Ab initio</i> aprēķini un farmakoforu modeļu izveide.....	166
3.9.3.	BBOX mutantu izveide un sagatavošana molekulārajai dinamikai.....	166
3.9.4.	Molekulārā dinamika.....	167
	GALVENIE REZULTĀTI.....	169
	SECINĀJUMI.....	170
	CONCLUSIONS.....	171
	LITERATŪRAS SARAKSTS.....	172
	PATEICĪBAS.....	190
	PIELIKUMI.....	191



## LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

1D	viendimensiju
2D	divdimensiju
3D	trīsdimensiju
$\alpha$ KG	$\alpha$ -ketoglutarāts
ATF	adenozīntrifosfāts
BBOX	$\gamma$ -butirotbetaīna dioksigenāze
BSA	vērša seruma albumīns ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CHARMM	<i>Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics</i>
CMC	kritiskā micellu veidošanās koncentrācija
CoA	koenzīms A ( <i>Coenzyme A</i> )
CSP	ķīmisko nobīžu perturbācija ( <i>Chemical Shift Perturbation</i> )
DFT	blīvuma funkcionālā teorija ( <i>Density Functional Theory</i> )
DLS	dinamiskā gaismas izkliede ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DMPC	dimiristoilfosfatidilholīns
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
DSBH	dubultpavediena $\beta$ -spirāles ( <i>Double-Stranded <math>\beta</math>-Helix</i> ) motīvs
DSF	diferenciālā skenējošā fluorimetrija
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	etilēndiamīntetraetiķskābe
FABP3	tauskābes saistošais proteīns 3 ( <i>Fatty Acid Binding Protein 3</i> )
<i>fc</i>	spēka konstante ( <i>force constant</i> )
GBB	$\gamma$ -butirotbetaīns
GroEL/ES	molekulārie šaperoni
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazīn-1-il]etāna sulfonskābe
HTML	$\beta$ -hidroksi- $\epsilon$ -trimetil- <i>L</i> -lizīns
IC <sub>50</sub>	inhibējošā koncentrācija 50 ( <i>half maximal inhibitory concentration</i> )
I/R	išēmijas/reperfūzijas
IFD	inducētās atbilstības dokings ( <i>Induced Fit Docking</i> )
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozīds
ITC	izotermālā titrēšanas kalorimetrija ( <i>Isothermal Titration Calorimetry</i> )
kDa	kilodaltoni
KMR	kodolu magnētiskā rezonanse
KO	izslēgts ( <i>Knock-Out</i> )
KPi	kālija fosfāta buferis
LC <sub>50</sub>	letālā koncentrācija 50 ( <i>half maximal lethal concentration</i> )
MBP	maltozi saistošais proteīns ( <i>Maltose Binding Protein</i> )
MD	molekulārā dinamika
mRNS	matricas ribonukleīnskābe
MST	mitohondriālā mērķsekvenca ( <i>Mitochondrial Targeting Sequence</i> )
MW	molmasa ( <i>Molecular Weight</i> )

MWCO	molmasas robežvērtība ( <i>Molecular Weight Cutoff</i> )
NTA	nitrilotrietiķskābe
OD	optiskais blīvums ( <i>Optical Density</i> )
OGA	N-oksaliļglicīns
PCR	polimērazes ķēdes reakcija ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDB	proteīnu datubāze ( <i>Protein Data Bank</i> )
PIPES	2,2'-(piperazīn-1,4-diil)di(etān-1-sulfonskābe)
PPW	proteīna sagatavošanas apakšprogramma ( <i>Protein Preparation Wizard</i> )
RNS	ribonukleīnskābe
RMSD	vidējā kvadrātiskā novirze ( <i>Root Mean Square Deviation</i> )
RMSF	vidējā kvadrātiskā fluktuācija ( <i>Root Mean Square Fluctuation</i> )
ROS	reaktīvās skābekļa formas ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
rpm	apgriezieni minūtē ( <i>revolutions per minute</i> )
S/H	sukcināta/hidroksilētā produkta attiecība
S/N	signāla-trokšņa attiecība ( <i>signal-to-noise ratio</i> )
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-L-lizīns
TMLD	ε-trimetil-L-lizīna dioksigenāze
TMLHE	ε-trimetil-L-lizīna dioksigenāzi kodējošais gēns
TS	tauskābe
TSA	termiskās nobīdes analīze ( <i>Thermal Shift Assay</i> )
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)-propān-1,3-diols
UV-VIS	ultravioletais-redzamās gaismas starojums
VdW	Van-der-Vālsa
WT	savvaļas izcelsmes, dabisks ( <i>Wild-Type</i> )

## 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, ROS*), 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 acilkarnitīnu veidošanās kavēšanā mitohondrijos. Viens no efektīviem regulācijas veidiem būtu samazināt *L*-karnitīna pieejamību, ietekmējot tā biosintēzi un transportu. Šādi darbojas Latvijā izgudrotais meldonijs, kas ir  $\gamma$ -butirotbetaīna dioksigenāzes (BBOX) inhibitors. Taču ārstniecības efekta sasniegšanai ir nepieciešamas augstas meldonija devas. Tāpēc definēts jauns terapeitiskais mērķis potenciālo kardioprotektīvo preparātu izstrādei –  $\epsilon$ -trimetil-*L*-lizīna dioksigenāze (TMLD). TMLD ir pirmais enzīms *L*-karnitīna biosintēzē, kas, līdzīgi kā BBOX (ceturtais enzīms), katalizē stereospecifisko  $\epsilon$ -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 apgrūtina tas, ka TMLD 3D struktūra nav eksperimentāli noteikta (līdz šim visi kristalizācijas mēģinājumi bijuši neveiksmīgi).

## 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 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 enzimātiskajā 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.

## DARBA ZINĀTNISKĀ NOVITĀTE

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

1. Izpētīti TMLD un potenciālo inhibitoru saistības termodinamiskie raksturlielumi un konversijas pakāpes enzimātiskajā 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 zālvielu līdersavienojumu (*hit-to-lead*) struktūras optimizācijā.

## DARBA APROBĀCIJA, PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

Publikācijas par promocijas darba tēmu recenzējamās 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  $\epsilon$ -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  $\gamma$ -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. *2<sup>nd</sup> 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. *7<sup>th</sup> International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*. November 1-30, **2021**, sciforum-053367 (<https://sciforum.net/event/ECMC2021>).
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. *6<sup>th</sup> International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*. November 1-30, **2020**, sciforum-040478 (<https://ecmc2020.sciforum.net>).
4. **Zelencova D.**; Liepinsh E. Mapping the Active Site of epsilon-Trimethyllysine Hydroxylase. *Biochem. Mol. Biol. J.*, **2018**, *04*, 47. *10<sup>th</sup> Edition of International Conference on Structural Biology*, Barcelona, Spain.
5. **Zelencova D.**; Liepinš E. Mapping of the Active Site of  $\epsilon$ -Trimethyllysine Hydroxylase. *Paul Walden 10<sup>th</sup> 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.  $\epsilon$ -Trimethyllysine Hydroxylase. Search of Inhibitors. *Drug Discovery Conference*, Riga, Latvia, **2015**, 166.

Par darba rezultātiem ziņots sekojošās Latvijā rīkotajās konferencēs/atklātos semināros

1. **Zelencova D.**; Liepiņš E. *L*-Karnitīna biosintēzē iesaistīto oksigenāžu *in vitro* un *in silico* izpēte. INSTRUCT-ERIC: strukturālās bioloģijas konsorcijs informatīvais seminārs, Rīga, Latvija, **2019**.
2. **Zelencova D.**; Liepiņš E. The investigation of  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase Inhibitors by Means of NMR, ITC and Computer Modelling. Riga Technical University 55<sup>th</sup> *International Scientific Conference, Section Material Science and Applied Chemistry*, Riga, Latvia, **2014**, 110.

Darba izstrādes laikā par saistīto tēmu vadīts bakalaura darbs:

1. Romane, K. Protein-ligand binding studies of  $\epsilon$ -trimethyllysine hydroxylase by means of NMR, Universitat Politecnica De Valencia, **2018**.

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.; Chlopicki, 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.; Chlopicki, 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.; Domraceva, 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.; Domraceva, 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.; Domraceva, I.; Kanepe-Lapsa, I.; **Zelencova, D.**; Milewska, A.; Botwina, P. Antiviral Aromatic Sulphonamides Derivatives, Their Method of Synthesis and Use. WO2021141508A1, **2021**.

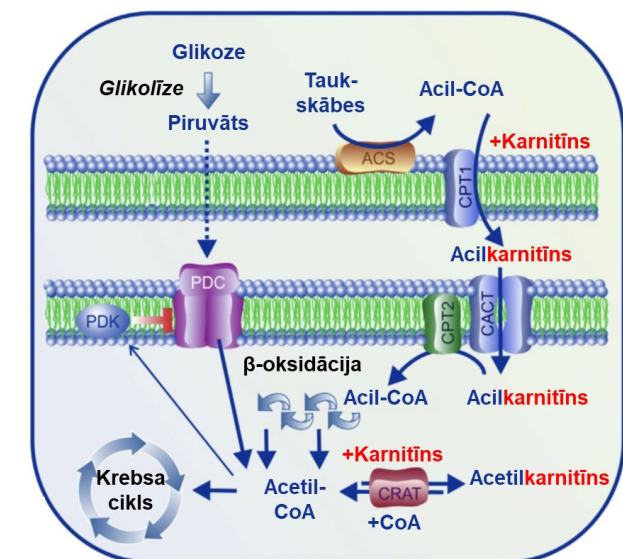


# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Acilkarnitīni

Acilkarnitīni ir svarīgi vielmaiņas starpprodukti šūnu enerģijas metabolisma regulācijā [2, 5, 6]. Tie ir esterificēta TS forma, kas nodrošina TS transportu no citosola uz mitochondriju matricu, kurā tie pakļaujas  $\beta$ -oksidācijai. Rezultātā izveidojušies acetil-CoA iesaistās trikarbonskābju (Krebsa) ciklā ATF iegūšanai, kas ir šūnu enerģijas pamatavots [7–9].

Atkarībā no TS garuma, acilkarnitīnus var iedalīt trīs grupās: (i) īsķēžu: C2–C4, (ii) vidējgaro ķēžu: C6–C12, un (iii) garķēžu: C14+, acilkarnitīni [9]. Acilkarnitīni organismā veidojas no acil-CoA un brīva *L*-karnitīna. Sākumā citosola TS tiek aktivētas ar acil-CoA sintāzi (ACS, EC 6.2.1.3) veidojot acil-CoA, kas tālāk transesterificējas ar karnitīna aciltransferāzes (CPT1, EC 2.3.1.21) palīdzību (1.1. att.) [9–11].



1.1. att. *L*-Karnitīna loma TS transportā un mitochondriju enerģijas metabolismā [10].  
Copyright © 2016 Elsevier Ltd.

TS aktivētas ar garķēžu acil-CoA sintēzē (*acyl-coenzyme A synthetase*, ACS) palīdzību veidojot atbilstošus acil-CoA. Secīgi *L*-karnitīns nodrošina acil-CoA transportu mitochondrijā pārvēršot to par acilkarnitīnu ar karnitīna palmitoiltransferāzi 1 (*carnitine palmitoyltransferase 1*, CPT1). Jaunizveidotais acilkarnitīns tiek transportēts mitochondrijā, izmantojot karnitīna/acilkarnitīna translokāzi (*carnitine/acylcarnitine translocase*, CACT). Mitochondrija matricā acilkarnitīni atkal pāresterificējas par acil-CoA ar karnitīna palmitoiltransferāzi 2 (*carnitine palmitoyltransferase 2*, CPT2). Turpmāk acil-CoA  $\beta$ -oksidācijas rezultātā veidojas acetil-CoA. Glikolīzes gadījumā, glikozi metabolizē par piruvātu, kas ar piruvāta dehidrogenāzes kompleksu (*pyruvate dehydrogenase complex*, PDC) dekarboksilējas līdz acetil-CoA. Acetil-CoA, kas veidojas TS un glikozes metabolisma rezultātā, turpmāk Krebsa ciklā var tikt pārstrādāts par ATF vai arī ar karnitīna acetiltransferāzi 2 (*carnitine acetyltransferase*, CrAT) pārvērsts par acetilkarnitīnu. CrAT katalizē acetilkarnitīnu veidošanos no acetil-CoA un *L*-karnitīna šādi regulējot acetil-CoA/CoA attiecību. Izmaiņas kurā ietekmē piruvāta dehidrogenāzes kināzi (*pyruvate dehydrogenase kinase*, PDK), kas savukārt inhibē PDC aktivitāti.

Vidēja garuma un garķēžu acilkarnitīnu līmeņi pieaug, kad TS pieejamība pārsniedz Krebsa cikla pieprasījumu vai kapacitāti [12]. Uzkrājoties, garķēžu acilkarnitīni var ietekmēt mitohondrija oksidatīvo fosforilāciju, insulīna signālceļu un jonu kanālus, kā rezultātā ietekmē šūnu metabolismu un funkcionalitāti [2, 5, 6, 13].

Acilkarnitīnu sintēze būtiski palēninās, samazinot *L*-karnitīna biopieejamību, šādi ietekmējot enerģijas metabolismu. Tas kļūst īpaši svarīgi išēmijas apstākļos, kad sirds metabolisms skābekļa piegādes samazināšanās rezultātā pārslēdzas no oksidatīvās fosforilācijas uz anaerobo glikolīzi [13, 14]. Apstājoties sirds darbībai, notiek mitohondriālā disfunkcija un mainās iekššūnu signālceļi, kas noved pie TS metabolisma ātruma samazināšanās un garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās [15]. Būtiska  $\beta$ -oksidācijas procesu palēnināšana izraisa toksisko starpproduktu uzkrāšanos, tādu kā garķēžu TS, acilkarnitīni, acil-CoA un sukcināts, kas stimulē reaktīvo skābekļa formu (*ROS*) producēšanu [2, 3, 6, 16].

Skābekļa un šūnas elpošanas ceļu substrātu trūkums inhibē piruvāta un TS  $\beta$ -oksidāciju un vēl arī oksidatīvo fosforilāciju. Savukārt, kad skābekļa piegāde strauji atjaunojas (notiekot reperfūzijai), izmaiņas mitohondrija metabolismā noved pie šūnu nekrozes [17]. Vairākās kardioprotektīvās stratēģijās izceļ mitohondrija funkcionalitātes aizsardzību [18], miokarda kondicionēšanu un enerģijas metabolisma regulāciju kā galvenās pieejas mitohondrija funkcionalitātes saglabāšanai un I/R radīto bojājumu smaguma samazināšanai [19, 20]. Rezultātā, viena no ārstnieciskām pieejām būtu medikamentoza acilkarnitīnu līmeņa samazināšana, ar nolūku novērst mitohondrija bojājumus un kardiometaboliskās slimības attīstību [5, 13].

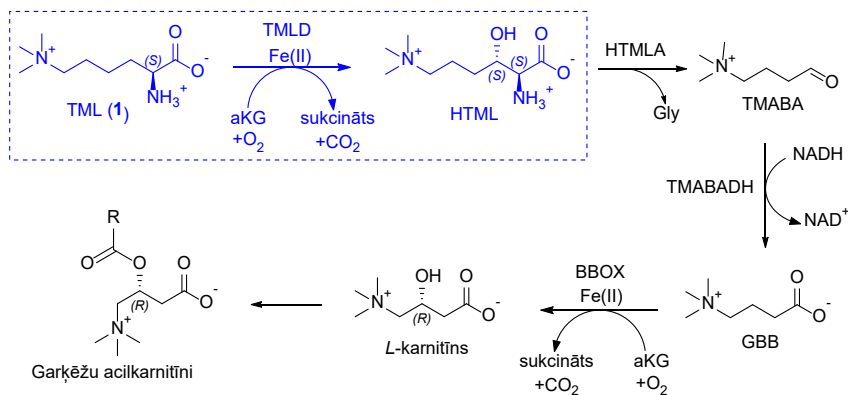
## 1.2. *L*-Karnitīna regulācija

*L*-Karnitīnu organisms iegūst no uztura (pārsvarā no gaļas, zivju un piena produktiem), kā arī biosintezē endogēni četru secīgo enzīmātisko reakciju rezultātā (1.2. att.). Biosintezētā *L*-karnitīna daudzums ir tieši atkarīgs no diētas, piemēram, visēdājam tas var sasniegt ~ 25 %, bet stingram veģetārietim – līdz pat 90 % [9, 21].

Pirmo un pēdējo soli *L*-karnitīna biosintezē katalizē divi radniecīgi enzīmi:  $\epsilon$ -trimetil-*L*-lizīna dioksigenāze (TMLD, EC 1.14.11.8) un  $\gamma$ -butirot-betaīna dioksigenāze (BBOX, EC 1.14.11.1). Abi enzīmi pieder vienai, no nehēma (*non-heme*) Fe(II) un no  $\alpha$ -ketoglutarāta ( $\alpha$ KG) atkarīgai, oksigenāžu ģimenei [22–24]. Centrālos soļus nodrošina  $\beta$ -hidroksi- $\epsilon$ -trimetil-*L*-lizīna aldolāze (EC 4.1.2.–) un trimetilaminobutiraldehīda dehidrogenāze (EC 1.2.1.47) [25].

*L*-Karnitīna regulācija inhibē jeb BBOX enzīmu apskatīta vairākos literatūras avotos [26–28]. Turklāt, BBOX ir zināms arī kā klīniskā izmantojamā kardioprotektīvā preparāta meldonija [3-(2,2,2-trimetilhidrazinija) proponāta] terapeitiskais mērķa enzīms [10, 29–31]. Te meldonijs darbojas kā konkurējošais inhibitors un substrāts [32, 33], stājoties enzīmātiskajā reakcijā, kas izraisa tā fragmentāciju un Stīvensa tipa pārgrupēšanos, rezultātā veidojoties vairākiem reakcijas produktiem [33]. Meldonija kardioprotektīvās īpašības apskatītas vairākās publikācijās [30, 31, 34–36]. Eksperimentāli pierādīta infarkta lieluma [30, 31, 37] un *L*-karnitīna daudzuma samazinājums asinsvadu audos, kā arī aterosklerozes attīstības palēninājums [35]. Dažos pētījumos meldonijs novērsis garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanos pēc

išēmijas izolētos sirds modeļos [38] un samazinājis to līmeni plazmā vai sirds audos [29, 39]. Turklāt ilgtermiņa meldonija lietošana peļu sirdīs stimulē glikozes uzņemšanu un glikozes metabolismā iesaistīto gēnu ekspresiju, paralēli samazinot glikozes līmeni asinīs [40, 41].



1.2. att. *L*-Karnitīna biosintēze.

TML:  $\epsilon$ -trimetil-*L*-lizīns, TMLD: TML dioksigenāze, HTML:  $\beta$ -hidroksi-TML, HTMLA: HTML aldolāze, TMABA: trimetilamīna butiraldehīds, TMABADH: TMABA dehidrogenāze, GBB:  $\gamma$ -butirobetaīns, BBOX: GBB dioksigenāze.

Meldonijs ir samērā vājš BBOX ( $IC_{50}$  34–62  $\mu$ M [10, 42, 43]) inhibitors un var darboties arī neselektīvi [44, 45], ietekmējot  $\gamma$ -butirobetaīna (GBB)/*L*-karnitīna saistošus proteīnus un importēšanas kanālus [46], piemēram, organisko katjonu transportieri 2 (OCTN2,  $IC_{50}$  62  $\mu$ M [26, 47]). Līdzīgi darbojas jaunatklātais metil-GBB [4-(dimetiletilamonija) butanoāts] [48], kas ir daudz spēcīgāks inhibitors nekā meldonijs gan BBOX ( $IC_{50}$  3,3  $\mu$ M), gan arī OCTN2 ( $IC_{50}$  3,0  $\mu$ M) gadījumā [26, 47]. Metil-GBB izraisa *L*-karnitīna un acilkarnitīnu līmeņu samazinājumu sirds audos, rezultātā samazinot mitohondriālā un peroksisomālā palmitāta oksidāciju attiecīgi par 44 un 53 %, kā arī divreiz palielina glikozes oksidēšanu. Žurku premedikācija ar metil-GBB *in vivo* samazināja infarkta lielumu par 45 % un uzlaboja 24 h izdzīvotību par 20–30 % [26]. Publicētie dati demonstrē, ka garķēžu acilkarnitīni ir galvenie TS starpprodukti, kas sekmē sirds muskuļa bojājumus I/R gadījumā.

2022. gadā parādījās jauns pētījums [5], kurā labvēlīgo pazeminātā acilkarnitīnu līmeņa ietekmi novēroja ģenētiski modificētās pelēs, kurās *TMLHE* gēns bija pilnībā inaktivēts (*TMLHE* KO peles) un kas zaudēja spēju producēt TMLD enzīmu un biosintezēt *L*-karnitīnu. Rezultātā, *TMLHE* KO pelēs novēroja būtisku garķēžu acilkarnitīnu daudzuma samazinājumu plazmā un sirdī, kas noveda pie TS oksidācijas palēnināšanās. Turklāt, novēroja polinepiesātināto TS koncentrācijas pieaugumu plazmā. Salīdzinot savvaļas (*wild-type*, WT) un *TMLHE* KO peles, novēroja, ka *TMLHE* KO pelēm sirds mitohondrijiem labāk saglabājas funkcionalitāte un veidojās mazās *ROS* I/R gadījumā, kas par 39 % samazina infarkta lielumu. Metabolītu analīze izceļ tieši vairākkārtīgo acilkarnitīnu līmeņa samazinājumu kā galveno kardioprotektīvo mehānismu *TMLHE* KO pelēs [5].

Iepriekšējos pētījumos medikamentozo acilkarnitīnu līmeņa samazināšanos panāca izmantojot zālvielas ar komplekso iedarbību [26, 49], kas inhibē ne tikai *L*-karnitīna biosintēzi.

Rezultātā, veidojas pieprasījums pret selektīviem un šūnā aktīviem *L*-karnitīna biosintēzes inhibitoriem, kas ļautu sasniegt kardioprotektīvās īpašības tādas kā *TMLHE* KO pelēs.

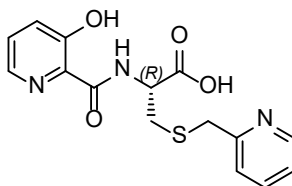
### 1.2.1. BBOX strukturālie un inhibitoru pētījumi

#### 1.2.1.1. BBOX strukturālā daudzveidība

Pirmās BBOX kristālogrāfiskās struktūras publicētas 2010. gadā (PDB ID 3O2G, 3MS5 un 3N6W) [42, 50]. Detalizēti BBOX pamatstruktūra aprakstīta autores bakalaura darbā [51]. Pēdējā desmitgadē publicēta virkne jaunu BBOX inhibitoru [28, 52, 53] un izpētīts atpazīšanas mehānisms [54–57].

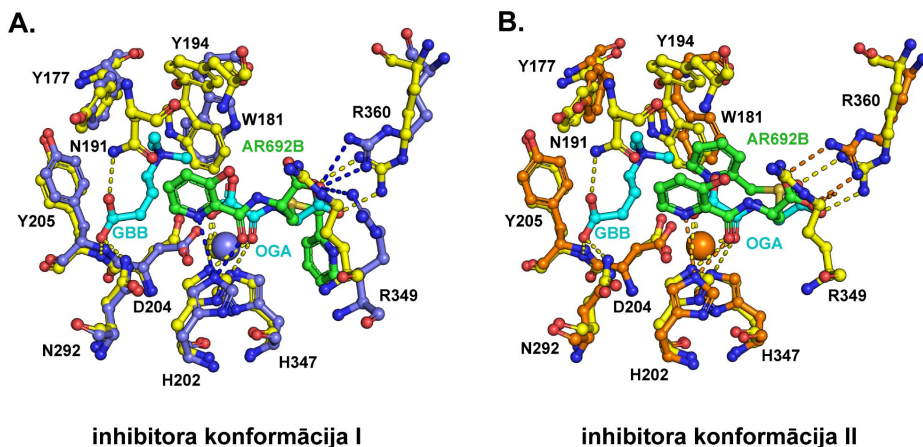
Rydzik *et al.* [53] atklāja jaunus selektīvus BBOX inhibitorus, kas nav GBB analogi un kas saistās  $\alpha$ KG vietā. Visaktīvākais savienojums, AR692B (1.3. att.) ar IC<sub>50</sub> 153 nM, kas darbojas kā Fe(II) helatējošais aģents, uzrādīja jaunu saistības veidu ar BBOX un būtiski izmainīja enzīma aktīvā centra konformāciju (PDB ID 4C8R, 1.4. att.). Rezultātā, novēro jauna inhibitora saistības vietas pārklāšanos gan ar GBB, gan arī ar  $\alpha$ KG izostēru, *N*-oksalilglicīnu (OGA) (1.4. att., A un B), kā arī enzīma cilpas (aminoskābju atlikumi 183–199, 1.5. att.) atvēršanos. Sākotnējā apo-BBOX struktūrā (PDB ID 3N6W [42]) reģions starp 183. un 199. aminoskābes atlikumiem (cilpa  $\beta$ I/ $\beta$ II) vispār nebija atrisināts no elektronu blīvuma, kas liecina par minētas cilpas augsto kustīgumu (nestrukturēts reģions) un labi korelē ar jaunatklāto enzīma konformāciju. Tyr194<sup>1</sup>, kas piedalās “aromātiskā būra” (*aromaic cage*) veidošanā un saista GBB trimetilamonija grupu [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>] pateicoties katjona- $\pi$  mijiedarbībai (1.4. att.), darbojas kā “vāks”, kas aizver aktīvo centru pēc substrāta piesaistīšanās. Savukārt stēriskie traucējumi starp AR692B un  $\beta$ I/ $\beta$ II cilpu, izraisa enzīma reģiona atvēršanos un  $\beta$ -lokšņu  $\beta$ I un  $\beta$ II pagarināšanos. Iegūtie dati šo konformacionālo elastību atklāj kā BBOX katalīzei raksturīgu pazīmi.

Novērojamās izmaiņas BBOX konformācijā atkarībā no liganda saistības parādītas 1.5. attēlā. Kā var redzēt, AR692B “atver” BBOX aktīvo centru, padarot enzīmu neaktīvu. Turklāt, ja  $\beta$ I/ $\beta$ II cilpa aizveras pirms GBB un  $\alpha$ KG saistības, enzīms zaudē aktivitāti nepieejamā aktīvā centra dēļ. Līdzīgi, ja GBB saistīsies aktīvajā centrā pirms  $\alpha$ KG un izraisīs cilpas aizvēršanu,  $\alpha$ KG vairs nespēs iekļūs tajā. Iespējams, šādi darbojas BBOX pašinhibīcija augstas GBB koncentrācijas apstākļos [50, 53].



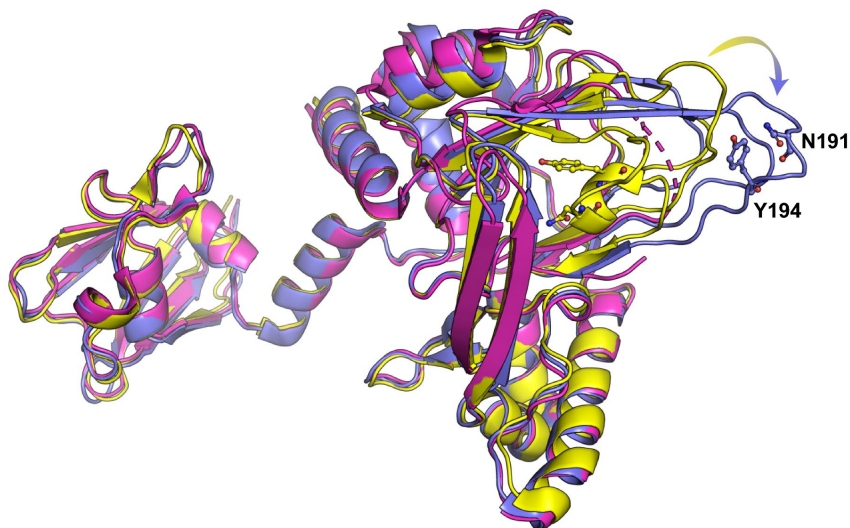
1.3. att. Selektīva BBOX inhibitora AR692B struktūra [53].

<sup>1</sup> Pieņemtie saīsinātie aminoskābju atlikumu nosaukumi apkopoti 1. pielikumā.



1.4. att. BBOX inhibīcija ar AR692B realizējot strukturāli nestandarta mehānismu.

Jaunais inhibitors kompleksā ar BBOX ir spējīgs ieņemt divas konformācijas (**A** un **B**). **A.** gadījumā veidojas sendviča tipa struktūra, kas stabilizēta ar inter- un intra- molekulārām  $\pi$ - $\pi$ -mijiedarbībām starp piridīna cikliem un W181, Y177 aminoskābes atlikumiem. **B.** gadījumā AR692B tioētera grupa aizņem hidrofobo kabatu blakus OGA saistīšanās vietai. GBB un OGA astpoguļoti kā gaiši zilas, bet AR692B – kā gaiši zaļas lodītes un nūjiņas (*ball-and-stick*); aminoskābju atlikumi atspoguļoti kā lodītes un nūjiņas un nokrāsoti atbilstoši PDB struktūrai: 3O2G – dzeltenā, 4C8R, ķēde A – violetā, bet 4C8R ķēde C – oranžā krāsā. Ūdeņraža saites atspoguļotas kā attiecīgās krāsas pārtrauktas (*dashed*) līnijas. Izveidots *PyMOL* programmā [58].



1.5. att. BBOX monomēru superpozīcija.

apo-BBOX (rozā), BBOX-GBB komplekss (dzeltenā) un BBOX-AR692B komplekss (violetā krāsā). Divi saistībai svarīgi aminoskābju atlikumi atspoguļoti kā atbilstošās krāsas lodītes un nūjiņas (*ball-and-stick*). Bultiņa parāda cilpas  $\beta$ I/ $\beta$ II atvēršanas virzienu. Pārtraukta līnija apo-BBOX struktūrā norāda nenoteikto (*undefined*) cilpu reģionu. Izveidots *PyMOL* programmā [58].

### 1.2.1.2. GBB-analogo konversija

BBOX spēj hidroksilēt ne tikai to endogēno substrātu, GBB, bet arī virkni tuvu strukturālo analoģu [28, 51, 54, 56]. BBOX spēj konvertēt arī garākus un īsākus GBB analogus, taču ar daudz mazāku ātrumu (attiecīgi 8,1 un 1,7 reizes lēnāk, 1.1. tab.). Interesanti, ka reakcijā ar *L*- un *D*-karnitīniem detektēja 3-okso-4-(trimetilamonija)butanoātu (3-keto-GBB). Iegūtie dati liecina, ka iespējama otrā hidroksilēšanās reakcija, kuras rezultātā veidojas 3-keto-GBB, kas pēc tam sabrūk līdz *N*-trimetilamonija acetnam (1.6. att.). Taču dabiskā *L*-karnitīna hidroksilēšanās ātrums bija 11,5 reizes lēnāks nekā *D*-karnitīna gadījumā, norādot ka *L*-karnitīns nespēj efektīvi ieņemt bioaktīvo konformāciju [43, 56].

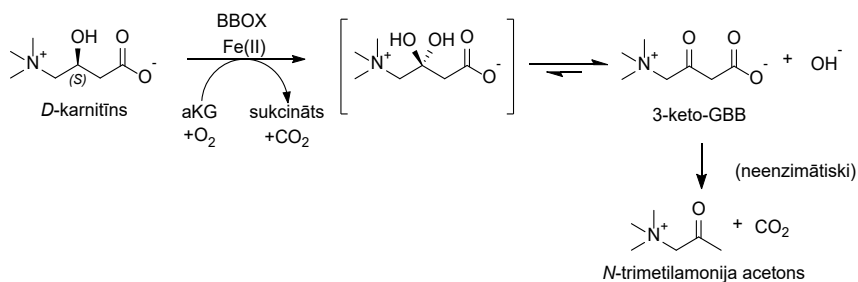
1.1. tabula

GBB analoģu ar BBOX katalizētu hidroksilēšanas ātrumi [56]

Substrāts	Produkts	Hidroksilēšanas ātrums, $\mu\text{M s}^{-1}$	S/P*	Reakcijas produkta daudzums
		0,13	1,2	> 90 %
		0,016	1,8	12 %
		0,075	1,2	58 %
		0,0048	15,8	~ 20 %**
		0,055	2,3	< 5 %**

\* sukcināta un reakcijas produkta veidošanās attiecība.

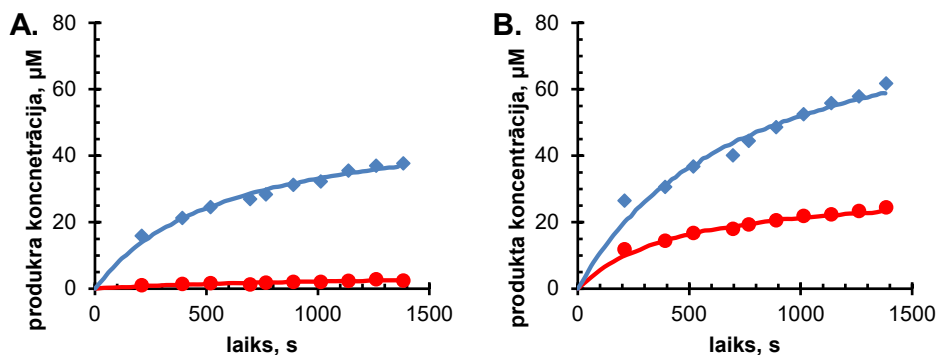
\*\* dati noteikti no substrātu/kofaktora konversijas līknēm (1.7. att.).



1.6. att. BBOX katalizē *D*-karnitīna hidroksilēšanu, kuras rezultātā veidojas 3-okso-4-(trimetilamonija)butanoāts (3-keto-GBB) un ūdens, kas tālāk sabrūk par  $\text{CO}_2$  un *N*-trimetilamonija acetonu [43, 56].

Enzimātiskās reakcijas mehānisms paredz, ka notiekot konversijai, uz vienu substrāta molekulu būtu jāpatērē viena sukcināta molekula, jo abas reakcijas ir cieši saistītas. Šī likumsakarība labi izpildās dabiskā substrāta, GBB, un ātri konvertējamo GBB-analoģu gadījumos. Savukārt, savienojumiem, kam hidroksilēšanas ātrums ir stipri palēnināts, novēro atsaisti starp sukcināta un hidroksilētā produkta veidošanos. Tas liecina, ka daži GBB-analoģi

BBOX aktīvajā centrā saistās neproduktīvi, ko atspoguļo arī reakcijas produkta daudzuma samazināšanās (1.1. tab., 1.7. att.) [56].



1.7. att. BBOX katalizētā **A.** *L*- un **B.** *D*-karnitīna un kofaktora,  $\alpha$ KG, koncentrāciju maiņa laikā [56].

*L*- un *D*-karnitīnu konversija, ko novēro kā 3-keto-GBB veidošanos (sarkana līkne) un  $\alpha$ KG konversija, ko novēro kā sukcināta veidošanos (zila līkne).

## 1.2.2. TMLD funkcionālie un strukturālie pētījumi

### 1.2.2.1. TMLD substrātu klāsta paplašināšana

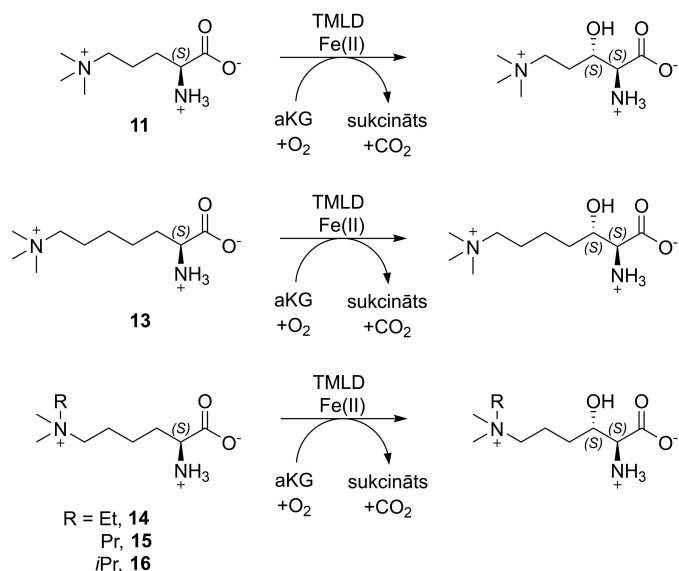
Pirmie pētījumi ar šūnu TMLD parādīja, ka enzīms endogēno TML hidroksilēšanu katalizē precīzi  $\beta$ -pozīcijā [59–61]. Taču ilgu laiku TML bija vienīgais zināmais TMLD substrāts. 2016. gadā Temimi *et al.* [62] virkniei TML-analogu pārbaudīja spēju pakļauties enzimatiskai hidroksilēšanai (1.8. un 1.9. att.). Šī sistemātiskā pieeja pierādīja, ka enzīma-substrāta atpazīšanai nepieciešami trīs farmakofori: di- vai trimetilamonija grupa  $[(\text{CH}_3)_2\text{-}_3\text{N}^+]$ , pozitīvi lādēta  $\alpha$ -*L*-amino ( $\alpha\text{-CH}_3\text{N}^+$ ) un negatīvi lādēta karboksil ( $\text{COO}^-$ ) grupa. Turklāt, enzīms spēja konvertēt substrātus ar dažādu metilēngrupu ķēdes garumu  $(\text{-CH}_2\text{-})_{3-5}$  [1.8. att., **11**, **13**]. Īsākie analogi (1.9. att., **12**), tāpat kā savienojumi, kam trūkst vismaz viens no farmakoforiem (1.9. att., **3–4**, **6–8**) vai ir apgriezta  $\alpha$ -aminogrupas stereokīmija [1.9. att., *D*-TML (**5**)], neveidoja hidroksilēto reakcijas produktu. Līdzīgu efektu novēroja, bloķējot  $\alpha$ -aminogrupas spēju veidot ūdeņraža saiti ar proteīnu (1.9. att., **9**, **10**), vai arī trimetilamonija grupas vietā ieviešot telpiski lielu (1.9. att., **17**) vai planāru (1.9. att., **18**, **19**) aizvietotāju. Tai pat laikā enzīms bija spējīgs hidroksilēt savienojumus ar etil-, propil- un izopropil- aizvietotājiem  $\epsilon\text{-N}^+$  pozīcijā (1.8. att., **14–16**).

Autori norāda zemāk minētās substrātu konversijas pakāpes [62]:

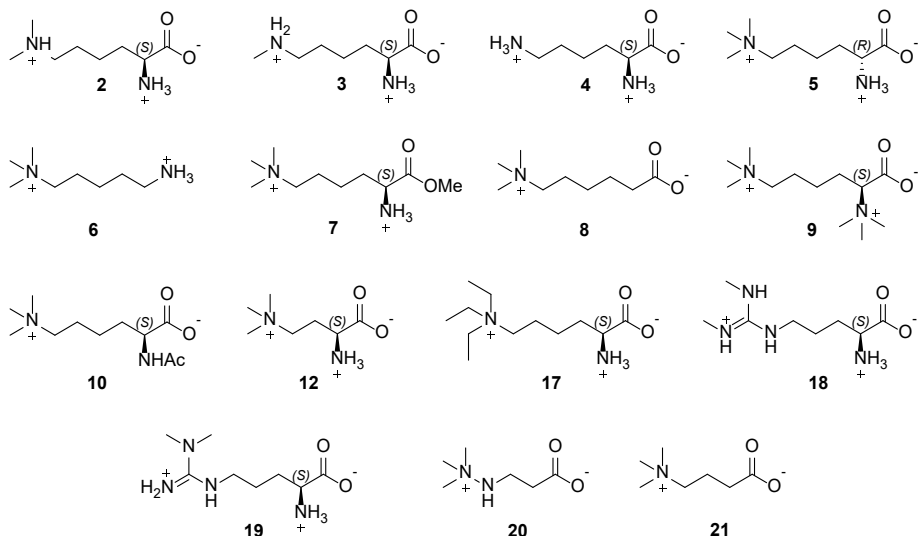
- TML: 90 % (MS) vai 81 % (KMR);
- $\epsilon$ -dimetil-*L*-lizīns (1.8. att., **2**) 25 % (MS) vai pēdas (*traces*) (KMR);
- $\delta$ -trimetil-*L*-ornitīns (1.8. att., **11**) 75 % (MS);
- $\zeta$ -trimetil-*L*-homolizīns (1.8. att., **13**) 70 % (MS);
- savienojumi **14–16** (1.8. att.) efektīvi hidroksilējas (% nav norādīti).



Līdzīgs pētījums, analizējot strukturāli daudzveidīgu TML analoģu (*DL*-racemātu veidā) spēju saistīties ar TMLD, bija aprakstīts autores maģistra darbā (aizstāvēts 2015. gadā) [63]. Maģistra darbā izpētīto savienojumu struktūrformulas netiek rādītas komercnoslēpuma dēļ (LOSI izstrādāto savienojumu klāsts nepārklājas ar Temimi *et al.* [62] pētītajiem savienojumiem). Kopumā, TMLD spējīgs hidroksilēt savienojumus gan ar aizvietotajiem  $\epsilon$ -C pozīcijā, gan ar nelielām modifikācijām alifātiskajā ķēdē.



1.8. att. TML analogi, kas stājās TMLD-katalizētā enzimatiskajā reakcijā (**11, 13–16**) [62].

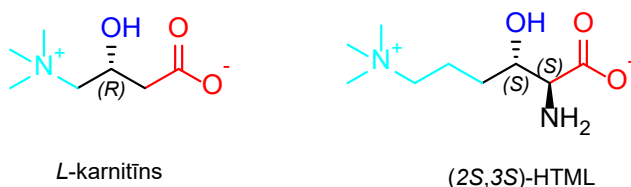


1.9. att. TML analogi, kas nav TMLD substrāti (**2–10, 12, 17–21**) [62].

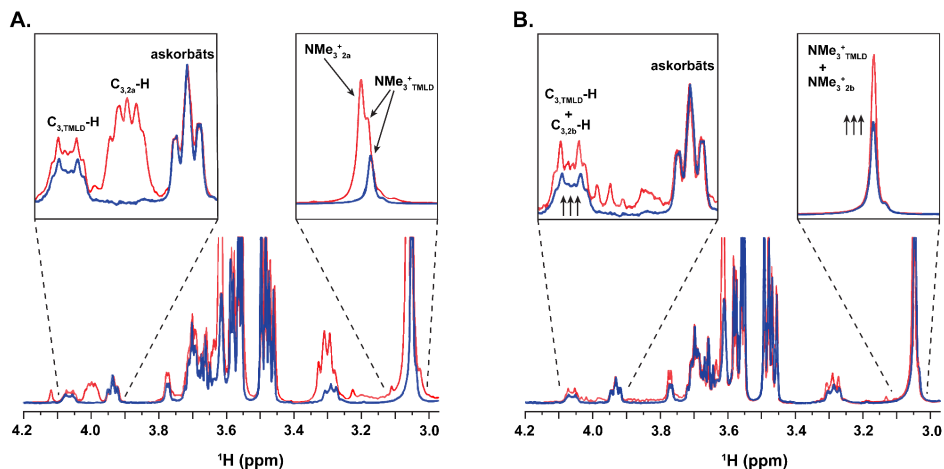
### 1.2.2.2. TMLD katalītiskās reakcijas izpēte

TMLD loma *L*-karnitīna biosintēzē atklāta jau sen [59, 64], taču līdz pat 2017. gadam nebija skaidra reakcijas produkta stereoķīmija. Brīvā rotācija ap  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$  saiti neļauj noteikt  $\beta$ -hidroksi- $\epsilon$ -trimetil-*L*-lizīna (HTML) diastereomēra konfigurāciju ar KMR. Tomēr uzskata, ka veidojas *eritro* produkts, proti (2*S*,3*S*)-HTML [65], kas sakrīt ar *L*-karnitīna konfigurāciju attiecībā pret karboksil un trimetilamonija grupu izvietojumu (1.10. att.) [66].

Divi sintēzes mehānismi [66, 67] enantiotīru (2*S*,3*S*)- un (2*S*,3*R*)-HTML iegūšanai publicēti viens pēc otra, divu mēnešu laikā. KMR dati parāda, ka enzimatiskās reakcijas produkts atbilst sintētiski iegūtam (2*S*,3*S*)-HTML (1.11. att., **2b**), jo pievienojot šo vielu enzimatiskās reakcijas maisījumam, spektrā novēro signālu intensitātes pieaugumu, kamēr (2*S*,3*R*)-HTML (1.11. att., **2a**), gadījumā spektrā parādās jauni otra diastereomera signāli.



1.10. att. *L*-karnitīna un (2*S*,3*S*)-HTML stereoķīmijas salīdzinājums [66].



1.11. att. TMLD-katalizētas TML hidrolīzes KMR analīze [67].

- A.** Sintētiskā, enantiotīra (2*S*,3*R*)-HTML (**2a**) izomēra pievienošana enzimatiskās reakcijas maisījumam.  
**B.** Sintētiskā, enantiotīra (2*S*,3*S*)-HTML (**2b**) izomēra pievienošana enzimatiskās reakcijas maisījumam.  
1D  $^1\text{H}$  KMR spektrs melnā krāsā, treknrakstā – enzimatiskās reakcijas maisījuma spektrs. 1D  $^1\text{H}$  KMR spektrs sarkanā krāsā – spektrs pēc **2a/2b** izomēra pievienošanas.

### 1.2.2.3. TMLD mutaģenēze

Līdz šim literatūrā nav aprakstīta TMLD eksperimentālā struktūra, kas liecina par neveiksmīgiem kristalizācijas mēģinājumiem. Savukārt TMLD izmērs ir par lielu 3D struktūras

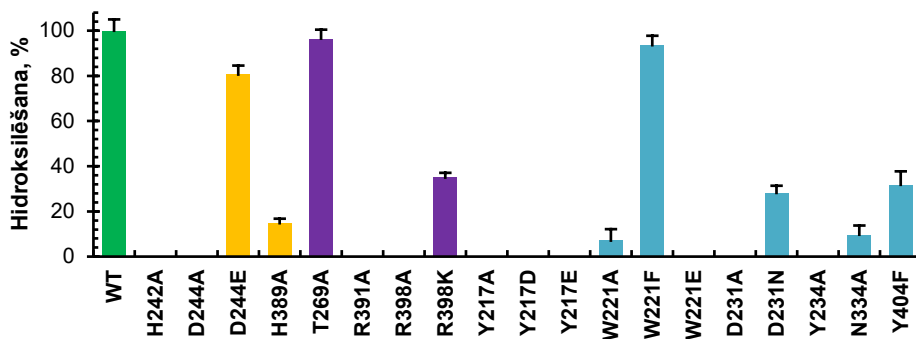
noteikšanai ar šķidrums KMR. Rezultātā TMLD aktīvā centra izpētei lietota alternatīva metode – mutāģenēze.

Mutāģenēzes paradigma iekļauj sevī mērķa, sistemātisku un nejaušu mutāciju ieviešanu proteīnā. Mērķa mutāciju ieviešanai ir jāzina precīzas pozīcijas proteīnā, kas kalpos kā informācijas avots. Šīs metodes galvenā priekšrocība ir neliels nepieciešamo mutantu skaits. Savukārt, ja nekas nav zināms par proteīnu, tad priekšroka dodama sistemātisku mutāciju ieviešanai. Viens no pirmajiem sistemātiskās mutāģenēzes piemēriem ir skenēšana ar alanīnu (*alanine scouting*), kurā katrs aminoskābes atlikums proteīnā tiek secīgi mutēts uz alanīnu [68]. Analizējot katras punktveida mutācijas ietekmi uz funkcionalitāti, iespējams noteikt svarīgus aminoskābes atlikumus, kas, piemēram, nosaka proteīna-proteīna mijiedarbību vai nodrošina ligandu saistību [69].

Jaunākie strukturālie pētījumi [70] apraksta 19 cilvēku TMLD mutantu izveidi, izmantojot gan mutācijas uz alanīnu, gan arī mutācijas uz radnieciskām aminoskābēm ar nolūku noskaidrot to, kādi aminoskābju atlikumi piedalās Fe(II),  $\alpha$ KG un TML saistībā. Rezultātā pēc paredzamās iesaistes substrāta un kofaktoru saistībā visas ieviestās mutācijas var iedalīt četrās grupās:

- 1) Fe(II) helatējošās aminoskābes, katalītiskā triāde: H242, D244 un H389;
- 2)  $\alpha$ KG saistošās aminoskābes: R391, R398 un T269;
- 3) TML trimetilamonija grupas saistošās aminoskābes [t.s. “aromātiskais būris” (aromatic cage)]: Y217, W221 un Y234;
- 4) TML  $\alpha$ -amino- un karboksilgrupu saistošās aminoskābes: D231, N334 un Y404.

Katras mutācijas ietekme uz enzīma aktivitāti tika novērtēta ar enzīmātisko reakciju (1.12. att.) un kinētiskas mērījumiem (1.13. att. un 1.2. tab.).



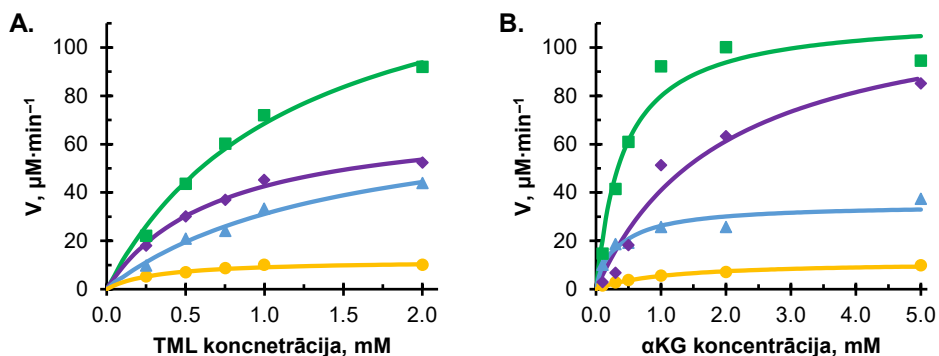
1.12. att. Enzīmātiskā aktivitāte dabiskam (WT) TMLD un 19 TMLD mutantiem [70].

Izreaģējušā TML daudzums, %, noteikts KMR spektroskopiski. Mutācijas veids norādīts kā X#Y, kur X – sākotnējā aminoskābe, Y – aminoskābe pēc mutācijas, # – aminoskābes kārtas numurs pilna garuma cilvēka TMLD (izoforma a) sekvencē. Stabiņi diagrammā iekrāsoti atbilstoši aminoskābes dalībai substrāta vai kofaktoru saistībā: Fe(II) – dzelteni;  $\alpha$ KG – violeti; TML – zili. WT (reference) – zaļa krāsā.

Katalītiskā triāde H-D/E-H konservatīvi saglabājas (*highly conserved*) starp visiem Fe(II)/ $\alpha$ KG-dioksigenāžu klases pārstāvjiem neatkarīgi no sugām un katalītiskajām funkcijām [23, 24]. Savukārt mutācijas šajos aminoskābju atlikumos noved pie pilnībā

neaktīviem enzīmiem, jo tie zaudē spēju saistīt Fe(II) un tā rezultātā nespēj aktivēt molekulāro skābekli [71]. Publicētie dati [70] pierādīja, ka katra no trim mutācijām, H242A, D244A vai H389A, noved pie neaktīva TMLD, kas nespēj enzīmātiski procesēt TML un  $\alpha$ KG. Līdzīgu efektu novēro, ieviešot H389L mutāciju, un arī dabā sastopamām īsākām TMLD b, c, d un e isoformām, kas veidojas alternatīvā splaisinga (*splicing*) rezultātā [71, 72]. Savukārt, D244E mutācija, nomainot D ar garāko E, par ~ 20 % samazināja substrāta konversiju, un pasliktināja reakcijas kinētiku (1.2. tab.).

Pēc mutāciju ieviešanas R391A un R398A pozīcijās, novēroja pilnu enzīma inaktivāciju, kas pierāda pozitīvā lādiņa nepieciešamību  $\alpha$ KG saistībai. Savukārt R398K mutācija būtiski pasliktināja enzīma substrāta konversiju (35 %), norādot, ka efektīvai  $\alpha$ KG saistībai ir svarīga mijiedarbība tieši ar Arg guanidīnija katjonu, kas bidentāta veidā saistās pie karboksilgrupas. Balstoties uz analogiju ar BBOX, tika pārbaudīta arī T269 iesaiste  $\alpha$ KG atpazīšanā. Šeit T269A mutācija minimāli ietekmēja enzīma aktivitāti, norādot uz to, ka šim aminoskābes atlikumam ir mazsvarīga loma  $\alpha$ KG saistībai.



1.13. att. Kinētiskas analīze dabiskām (WT) TMLD (zaļās līknes) un trīs TMLD mutantiem W221F (violetas), T269A (gaiši zilas) un D244E (dzeltenas līknes) [70].

Kinētiskas līknes variējot **A.** dabiskā substrāta, TML, un **B.** endogēnā kofaktora,  $\alpha$ KG, koncentrāciju.

1.2. tabula

Kinētiskie parametri TML un  $\alpha$ KG konversijai ar dažādiem TMLD enzīma variantiem [70]

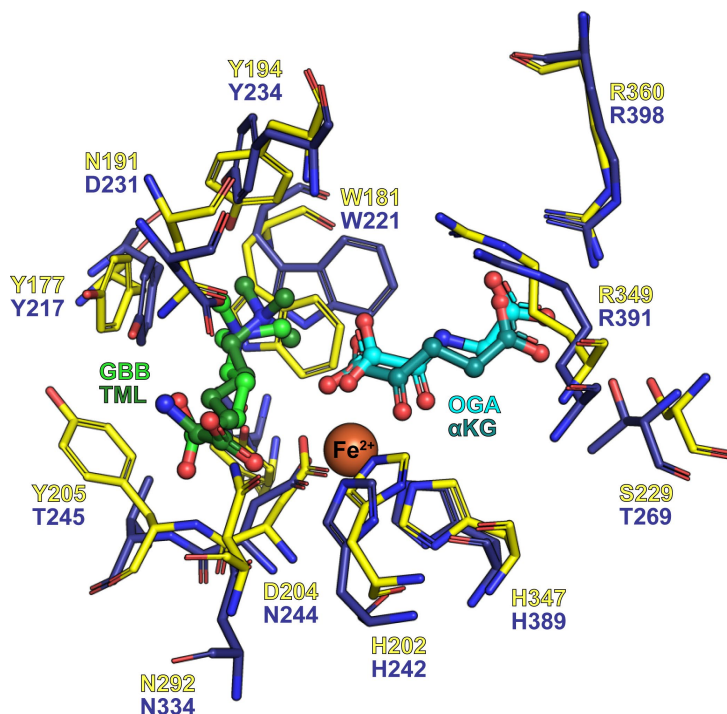
Enzīma variants	Substrāts	$V_{\max}$ , $\mu\text{M min}^{-1}$	$K_m$ , mM
WT	TML	$147 \pm 13$	$1,18 \pm 0,13$
W221F	TML	$77 \pm 9$	$1,47 \pm 0,31$
T269A	TML	$72 \pm 4$	$0,70 \pm 0,09$
D244E	TML	$12 \pm 1$	$0,32 \pm 0,07$
WT	$\alpha$ KG	$114 \pm 9$	$0,42 \pm 0,12$
W221F	$\alpha$ KG	$35 \pm 3$	$0,35 \pm 0,11$
T269A	$\alpha$ KG	$122 \pm 20$	$1,97 \pm 0,70$
D244E	$\alpha$ KG	$11 \pm 1$	$1,12 \pm 0,16$

Turpinājumā pārbaudītas aminoskābes, kas nepieciešamas TML substrāta atpazīšanai. Mutāciju ieviešana t.s. “aromātiskā būra” aminoskābju atlikumos – W221A, Y217A un Y234A – izraisīja enzīma pilnīgu inaktivāciju, kas liecina par visu trīs aromātisko aminoskābju

nepieciešamību katjona- $\pi$  mijiedarbības nodrošināšanai. Savukārt W221F mutācija, ko novēroja BBOX *Pseudomonas sp.* organismā, arī TMLD gadījumā radīja enzīmu ar augstu aktivitāti (1.12. un 1.13. att., 1.2. tab.). Y404F mutācija parādīja, ka saistībai svarīga ir arī Y404 OH grupa, visticamāk saistībai labvēlīgas elektrostatiskās mijiedarbības dēļ. Ja aktīvajā centrā aromātisko atlikumu iekļaušanas vietā ievieša negatīvi lādētus atlikumus (Y217D, Y217E un W221E), tad tas radīja neaktīvu enzīmu (1.12. att.). Tas papildus apstiprināja “aromātiskā būra” nepieciešamību.

BBOX un TMLD sekvenču salīdzinājums norāda, ka D231 var būt svarīga aminoskābe TML  $\alpha$ -aminogrupas atpazīšanā, veidojot sāls tiltiņu. Savukārt N334 uzskata par TML karboksilgrupas mijiedarbības partneri. Rezultātā, D231A mutācija radīja pilnībā neaktīvu, bet D231N mutācija – mazaktīvu enzīmu. Līdzīgi uzvedās arī TMLD ar N334A mutāciju (1.12. att.).

Apkopojot iegūtos datus, tika izveidots TMLD aktīvā centra modelis (1.14. att.), kas ļoti labi sakrīt ar eksperimentālajiem datiem [70].



1.14. att. BBOX kristāla (PDB ID 4C5W) un TMLD homoloģiskā modeļa aktīvo centru superpozīcija [70].

BBOX (dzeltenā krāsā) un TMLD (tumši zilā krāsā) aminoskābju atlikumi atspoguļoti kā nūjiņas (*tubes*) ar atbilstošu nosaukumu. Fe(II) attēlots kā brūna sfēra, *N*-oksalilglicīns (OGA) un  $\alpha$ 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 [58].

### 1.3. Taukskābes saistošie proteīni (FABP)

#### 1.3.1. FABP funkcijas un daudzveidība

Lipīdiem piemīt plašas un vispusīgas īpašības vairākos bioloģijas aspektos. Tie darbojas kā strukturāli būvbloki vai enerģijas avoti, kalpo arī kā iekššūnu un starpšūnu signālmolekulas. Lipīdi var modificēt proteīnu darbību un atrašanās vietu tādiem proteīniem kā kināzes vai jonu kanāli, modificēt signālu caur šūnu virsmu ar G-proteīnu saistītiem receptoriem, un var kalpot kā transkripcijas faktoru ligandi. Brīvas TS var regulēt hormonu darbību un aktivēt iekaisuma molekulas, vai arī, iesaistīt struktūru atpazīšanas receptorus (*pattern recognition receptor*) metabolisma regulācijai un slimību veicināšanā [73–76]. Relatīvi vāja TS šķīdība un brīvo formu toksicitāte [77] tiek novērsta pateicoties buferējošiem objektiem – nekatalītiski lipīdu saistošiem proteīniem, t. sk. arī taukskābes saistošiem proteīniem (*fatty acid binding proteins*, FABP) [76, 78].

FABP ir 14–15 kDa globulārie proteīni, 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 [79, 80].

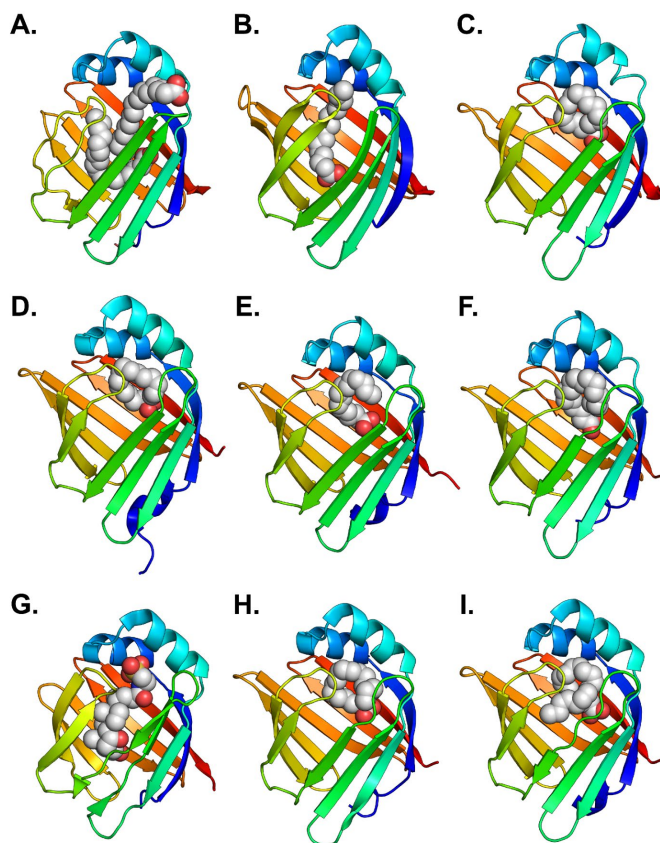
H-FABP	MVDA-- <b>FLGT</b>	<b>WKLVD</b> <b>SKNFD</b>	<b>DYMK</b> <b>SLGVGF</b>	<b>ATRQ</b> <b>VASMTK</b>	<b>FTTII</b> <b>EKNGD</b>	<b>ILTLK</b> <b>TH-ST</b>	57
A-FABP	MCD A-- <b>FVGT</b>	<b>WKLVS</b> <b>ENFDF</b>	<b>DYMK</b> <b>EVGVGF</b>	<b>ATRK</b> <b>VAGMAK</b>	<b>FNMI</b> <b>ISVNGD</b>	<b>VITIK</b> <b>SE-ST</b>	57
E-FABP	MATVQQL <b>EGR</b>	<b>WRLVD</b> <b>SKGFD</b>	<b>EYMK</b> <b>ELGVGI</b>	<b>ALRK</b> <b>MGAMAK</b>	<b>PDCI</b> <b>IITCDGK</b>	<b>NLITK</b> <b>TE-ST</b>	59
B-FABP	MVEA-- <b>FCAT</b>	<b>WKLIN</b> <b>SNFDF</b>	<b>EYMK</b> <b>ALGVGF</b>	<b>ATRQ</b> <b>VGNVTK</b>	<b>FTVI</b> <b>ISQEGD</b>	<b>KVVIR</b> <b>TL-ST</b>	57
M-FABP	MSNK-- <b>FLGT</b>	<b>WKLVS</b> <b>ENFDF</b>	<b>DYMK</b> <b>ALGVGL</b>	<b>ATRK</b> <b>LGNLAK</b>	<b>FTVI</b> <b>ISKKGD</b>	<b>IITIR</b> <b>TE-ST</b>	57
L-FABP	MS--- <b>FSGK</b>	<b>YQLQ</b> <b>SQENFE</b>	<b>AFMK</b> <b>AIGLPE</b>	<b>ELIQ</b> <b>KGKDIK</b>	<b>GVSE</b> <b>IVQNGK</b>	<b>HFKFT</b> <b>IT-AG</b>	55
I-FABP	MA--- <b>FDSI</b>	<b>WKVD</b> <b>RSENYD</b>	<b>KFME</b> <b>KMGVNI</b>	<b>VK</b> <b>KLAADHN</b>	<b>LKLT</b> <b>IITQEGN</b>	<b>KFTV</b> <b>KES-SA</b>	55
I-LBP	MA--- <b>FTGK</b>	<b>FEM</b> <b>ESEKNYD</b>	<b>EFMK</b> <b>LLGISS</b>	<b>DVIE</b> <b>KARNFK</b>	<b>IVTE</b> <b>VQDDGQ</b>	<b>DFTW</b> <b>SQHYSG</b>	56
T-FABP	MVEP-- <b>FLGT</b>	<b>WKLVS</b> <b>ENFDF</b>	<b>DYMK</b> <b>ELGVNF</b>	<b>AARN</b> <b>MAGLVK</b>	<b>FTVI</b> <b>ISVDGK</b>	<b>MMTIR</b> <b>TE-SS</b>	57
H-FABP	<b>FKNTE</b> <b>ISFKL</b>	<b>GVEF</b> <b>DETTAD</b>	<b>DRK</b> <b>VKSIIVTL</b>	<b>DGG</b> <b>-KLVHLQ</b>	<b>K--</b> <b>WDGQETT</b>	<b>LVRE</b> <b>LIDGKL</b>	114
A-FABP	<b>FKNTE</b> <b>ISFIL</b>	<b>GQEF</b> <b>DEVTAD</b>	<b>DRK</b> <b>VKSTITL</b>	<b>DGG</b> <b>-VLVHVQ</b>	<b>K--</b> <b>WDGRSTT</b>	<b>IKRK</b> <b>REDDKL</b>	114
E-FABP	<b>LKIT</b> <b>QFSCTL</b>	<b>GEKF</b> <b>FEETAD</b>	<b>GRKT</b> <b>QTVCNF</b>	<b>TDG</b> <b>-ALVQHQ</b>	<b>E--</b> <b>WDGKEST</b>	<b>ITRK</b> <b>LKDGKL</b>	116
B-FABP	<b>FKNTE</b> <b>ISFOL</b>	<b>GQEF</b> <b>DETTAD</b>	<b>DRN</b> <b>CKSVVSL</b>	<b>DGD</b> <b>-KLVHIQ</b>	<b>K--</b> <b>WDGKETN</b>	<b>FVRE</b> <b>IKDGKM</b>	114
M-FABP	<b>FKNTE</b> <b>ISFKL</b>	<b>GQEF</b> <b>FEETAD</b>	<b>NRK</b> <b>TKSIIVTL</b>	<b>QRG</b> <b>-SLNQVQ</b>	<b>R--</b> <b>WDGKETT</b>	<b>IKRK</b> <b>LVNGKM</b>	114
L-FABP	<b>SKVI</b> <b>QNEFTV</b>	<b>GEE</b> <b>CELEMT</b>	<b>GEKV</b> <b>KTIVQL</b>	<b>EGDN</b> <b>KLVITTF</b>	<b>K-----</b> <b>NIK</b>	<b>SVTE</b> <b>LENGDII</b>	109
I-FABP	<b>FRNI</b> <b>EVVPEL</b>	<b>GVT</b> <b>FNYNLAD</b>	<b>GTEL</b> <b>RGTWSL</b>	<b>EGN</b> <b>-KLIGKF</b>	<b>KRTD</b> <b>NGNELN</b>	<b>TVRE</b> <b>IIGDEL</b>	114
I-LBP	<b>GHTM</b> <b>TNKFTV</b>	<b>GKES</b> <b>NIQTMG</b>	<b>GKTF</b> <b>KATVOM</b>	<b>EGG</b> <b>-KLVVNF</b>	<b>P-----</b> <b>NYH</b>	<b>QTSE</b> <b>IVGDKL</b>	109
T-FABP	<b>FQDT</b> <b>KISFKL</b>	<b>GQEF</b> <b>DETTAD</b>	<b>NRK</b> <b>VKSTITL</b>	<b>ENG</b> <b>-SMIHVQ</b>	<b>K--</b> <b>WLGKETT</b>	<b>IKRK</b> <b>IVDEKM</b>	114
H-FABP	<b>ILTL</b> <b>THGTAV</b>	<b>CTRI</b> <b>EYKEA</b>	133				
A-FABP	<b>VVEC</b> <b>VMKGV</b>	<b>STR</b> <b>VYERA-</b>	132				
E-FABP	<b>VVEC</b> <b>VMNNV</b>	<b>CTRI</b> <b>EYKEV</b>	135				
B-FABP	<b>VMTL</b> <b>TFGDVV</b>	<b>AVR</b> <b>HYERA-</b>	132				
M-FABP	<b>VAEC</b> <b>KMKGV</b>	<b>CTRI</b> <b>EYKV-</b>	132				
L-FABP	<b>TNMT</b> <b>LTLDIV</b>	<b>FKR</b> <b>ISKRI-</b>	127				
I-FABP	<b>VQTY</b> <b>VYEGVE</b>	<b>AKR</b> <b>IFKRD-</b>	132				
I-LBP	<b>VEV</b> <b>STIGGV</b>	<b>YER</b> <b>VSKRLA</b>	128				
T-FABP	<b>VVEC</b> <b>KMNNIV</b>	<b>STR</b> <b>IYKV-</b>	132				

#### 1.15. att. Aminoskābju sekvenču salīdzinājums FABP ģimenes pārstāvjiem [80, 81].

Visas FABP sekvences pieder cilvēku proteīniem un iegūtas no *UniProt* datubāzes [82]. Sekvenču salīdzinājums veikts izmantojot *ClustalW* [83, 84]. Aminoskābju atlikumu pozīcijas ar identiskām aminoskābēm vismaz piecās proteīnu sekvencēs (*well-conserved*) atzīmētas treknrakstā un iekrāsotas gaiši zilā krāsā.

Pateiz ir zināmi deviņi audu-specifiski FABP: aknu (L-), zarnu (I-), sirds (H-), adipocītu (A-), epidermas (E-), ileāla (I-LBP), smadzeņu (B-), mielīnu (M-) un sēkliniņu (T-) [80, 81].

Daži no tiem (L- un H-) sastopami vairākos audos, kamēr pārējie – tikai vienā audu tipā [85]. FABP pārstāvju aminoskābju sekvenču sakritība svārstās robežās no 22 līdz 73 % (1.15. att.), taču visu proteīnu 3D struktūras saglabā augstu līdzību, nedaudz mainoties garķēžu TS saistības veidam no izstieptā līdz U veida (1.16. att.). Visiem proteīniem, izņemot I-LBP, ir augsta afinitāte pret TS. Savukārt, L-FABP un I-LBP ir daudz lielāks aktīvais centrs un tie spēj saistīt apjomīgākus hidrofobos ligandus, tādus kā lizofosfolipīdi (*lysophospholipids*), žultsskābes, eikozanoīdi un dažas zāļvielas [86–88]. L-FABP ir vislielākais aktīvais centrs, kurā vienlaikus var saistīties divas TS molekulas (1.16. att., A), savukārt pārējie FABP spēj saistīt tikai vienu liganda molekulu. I-FABP un I-LBP saista ligandus nedaudz saliektā stāvoklī (1.16. att., B, G), bet citi FABP saloka garķēžu TS U veidā (1.16. att., C-F, H), vai arī garas polinepiesātinātas TS (*polyunsaturated fatty acids*) saloka spirāles veidā (1.16. att., I) [89].



1.16. att. FABP kristalogrāfisko struktūru piemēri [89].

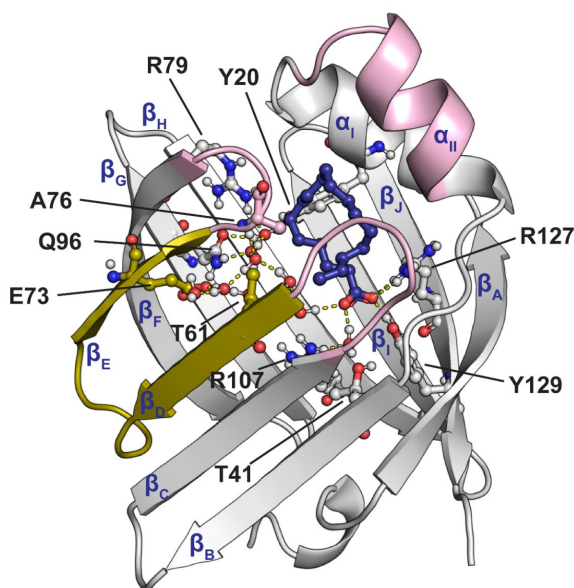
A. Žurku L-FABP (FABP1, PDB ID 1LFO) aktīvajā centrā spēj saistīt divas oleāta molekulas. B. Žurku I-FABP (FABP2, PDB ID 2IFB) saista palmitātu nedaudz saliektā stāvoklī. C. Cilvēku H-FABP (FABP3, PDB ID 2HMB), D. cilvēku A-FABP (FABP4, PDB ID 2HNX), E. cilvēku E-FABP (FABP5, PDB ID 1B56) saista palmitātu, bet F. vēršu M-FABP (FABP8, PDB ID 1PMP) – oleātu, saliektā U formā. G. Cilvēku I-LBP (FABP6, PDB ID 1O1V) selektīvi saista žultsskābes, bet nesaista TS. H. Cilvēku B-FABP (FABP7, PDB ID 1FE3) tā pat kā C-F gadījumos, saista oleātu U formā, kā arī spēj pielāgot aktīvo centru ļoti garo TS (piemēram, cervonskābes) saistībai spirāles veidā [I. PDB ID 1FDQ]. Izveidots *PyMOL* programmā [58].



FABP proteīnu ekspresija noteiktās šūnās atspoguļo to spēju metabolizēt lipīdus [89]. Savukārt paaugstinātā TS iedarbība lielākajā daļā šūnu izraisa ievērojami paaugstinātu FABP ekspresiju [90]. Izturības treniņi vai patoloģiskās izmaiņas barības vielās, piemēram, tādās kā diabēta gadījumā, arī var ietekmēt FABP līmeņa paaugstināšanos. Iegūtie dati liecina, ka eksistē adaptīva sensorsitēma, kas reaģē uz lipīdu daudzumu mērķa šūnās un ar FABP palīdzību regulē to stehiometriju *in vivo* [80].

### 1.3.2. Sirds FABP struktūra, īpašības un ligandu afinitāte

Sirds FABP jeb H-FABP vai FABP3 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 [80].



1.17. 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 lodītes). Liganda ieejas portāls aktīvajā centrā (rozā) un spraugas reģions starp  $\beta_0$  un  $\beta_E$   $\beta$ -virknēm (*gap*, tumši dzeltenā krāsā). Ūdenraža saites atspoguļotas kā dzeltenas pārtrauktas līnijas. Izveidots *PyMOL* programmā [58].

Eksperimenti ar FABP3 KO pelēm parādīja, ka izslēdzot FABP3 gēnu pelēs novēro par 45–65 % mazāku palmitāta uzņemšanu un oksidēšanu, 80 % lielāku glikozes oksidēšanu, kā arī lokalizētu sirds hipertrofiju. Turklāt plazmā novēroja brīvo TS koncentrācijas palielināšanos. FABP3 KO peles ātri nogura pēc fiziskas slodzes, norādot uz spēku izsīkumu un samazinātu toleranci pret fiziskām aktivitātēm [91, 92].

FABP3 eksperimentālās 3D struktūras kompleksā ar dažāda garuma TS aprakstītas vairākās publikācijās [93–99]. Proteīna struktūra sastāv no pieckēžu antiparalēlo  $\beta$ -lapu pāriem (*pair of five stranded antiparallel  $\beta$ -sheets*), kas veido mucu  $\beta_A$ – $\beta_J$ , noslēgtu ar divām īsam  $\alpha$ -spirālēm:  $\alpha_I$  un  $\alpha_{II}$ . Rezultātā veidojas liels iekšējais dobums, kas spēj saistīt vienu garķēžu TS (1.17. att.). Blakus esošās antiparalēlās  $\beta$ -virknes,  $\beta_D$  un  $\beta_E$  atrodas tālu viena no otras un nespēj veidot starpkēžu ūdeņraža saites, veidojot t.s. spraugu (*gap*, 1.17. att., tumši dzeltens 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) –  $\alpha_{II}$ -spirāle un cilpas starp C–D un E–F  $\beta$ -virknēm (1.17. att., rozā reģions) – un aktīvā centra iedobi [95, 96, 100].

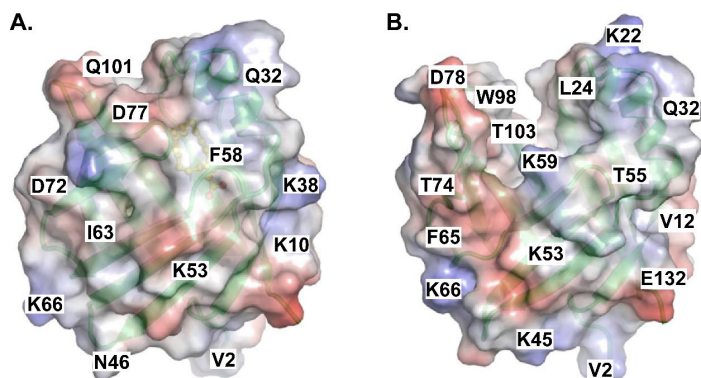
Ņemot vērā, ka galvenā FABP funkcija ir saistīt TS, nav brīnums, ka aktīvo centru veido 59 % hidrofobo, 15 % polāro un tikai 21 % lādēto aminoskābju atlikumu sānu ķēdes. Stearāta, oleāta un elaidāta gadījumā (attiecīgi PDB ID 1HMT, 1HMS un 1HMR [94]), TS aizņem 23 % no iedobes (250–253 Å<sup>3</sup> TS tilpums pret 1086–1103 Å<sup>3</sup> aktīvā centra tilpuma), veidojot ūdeņraža saites ar R127, Y129 un divām strukturētām ūdens molekulām, kas tālāk veido ūdeņraža saites ar T41, R107 un T54. Turklāt, aktīvajā centrā detektē 13 ūdens molekulas, kas veido 18 ūdeņraža saites gan savstarpējas, gan arī ar polārajiem aminoskābju atlikumiem iedobē. Tabulā 1.3. norādīti kontakti starp stearātu, FABP3 un ūdens molekulām, ko definē kā Van der Vālsa (VdW) mijiedarbību [93, 94].

1.3. tabula

VdW kontakti (4,5 Å attālumā) starp stearātu (C18:0), oleātu (C18:0 *cis*- $\Delta^9$ ), elaidātu (C18:0 *trans*- $\Delta^9$ ) un FABP3 (PDB ID 1HMT) [94]

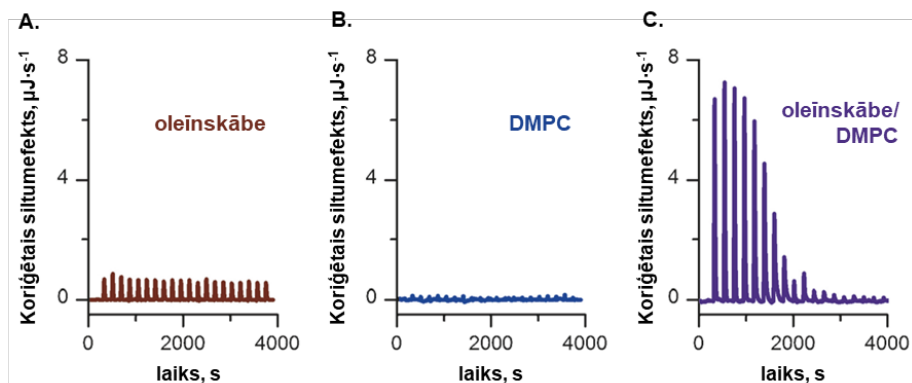
Oglekļa atoms	Kontakti ar aminoskābēm un ūdens molekulām FABP3 aktīvajā centrā ( <i>UniProt</i> ID P05413)		
	Stearāts (C18:0)	Oleāts (C18:0 <i>cis</i> - $\Delta^9$ )	Elaidāts (C18:0 <i>trans</i> - $\Delta^9$ )
C1	L116, R127, Y129, HOH1, HOH2	L116, R127, Y129, HOH1, HOH2	L116, R127, Y129, HOH1, HOH2
C2	F17, L116, L118, R127, HOH1	F17, L116, HOH1	F17, L116, R127, HOH1
C3	HOH1, HOH3	HOH1, HOH3	HOH1, HOH3
C4	F17	F17	F17, L118
C5	HOH3, HOH4, HOH5, HOH6	HOH3, HOH4, HOH5, HOH6	HOH4, HOH5, HOH6
C6	D77, R79, HOH4, HOH5, HOH6	D77, R79, HOH4, HOH5, HOH6	D77, R79, HOH4, HOH5, HOH6
C7	Y20, L24, D77, R79	Y20, L24, D77, R79, HOH5	Y20, L24, D77, R79, HOH5
C8	A76, D77	A76, D77	L24, V26, D77
C9	M21, V26, D77	F17, M21, V26, D77	F17, M21
C10	M21, V26, T30, D77	M21, V26, D77	M21, V26, D77
C11	T30, A76	T30, A76, D77	M21, T30, A34
C12	F17, A34	T30, A34, F58, A76	A76
C13	A34, F58	A34, A76	A34, F58
C14	T37, F58	A34, F58	
C15	T37, P39, HOH7		K59
C16	P39, T54, HOH3	A76	P39, T54, S56, K59
C17	T54, S56, K59	T54, S56, K59	T54, S56, K59, HOH3
C18	T54, K59, N60, T61, A76, HOH3	T54, K59, N60, T61, A76, HOH3	T54, K59, N60, T61, A76, HOH3

Pieejamās kristalogrāfiskās struktūrās [101–103] apo- un holo-FABP proteīnam atspoguļo aizvērtu konformāciju (1.18. att., A). Izmantojot tā statistas struktūras, ir grūti paredzēt, kādā veidā ligands nonāk un iziet no FABP iedobes. Molekulārās dinamikas (MD) simulācijas paredz, ka iespējama FABP3 ieejas portāla atvēršanās (1.18. att., B), veidojot kanālu ar diametru  $\sim 11\text{--}14$  Å. Iespējams, ka šo atvērtu konformāciju nevar noteikt eksperimentāli kristālu  $P2_12_12_1$  simetrijas dēļ, kuros novēro ciešus kontaktus starp vienas molekulas  $\alpha_{II}$  spirāli un otras molekulas  $\beta_D$ -virkni [100].



1.18. att. Virsmas atspoguļojums FABP3 struktūrai MD simulācijā (PDB ID 4WBK) [100].  
Copyright © 2015 American Chemical Society.

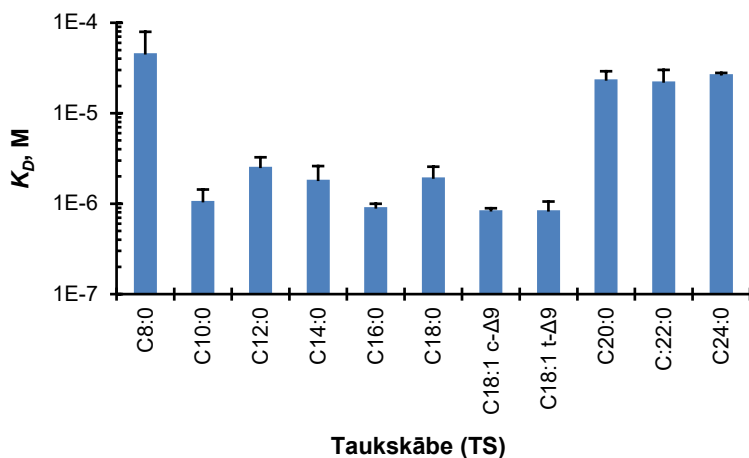
A. Aizvērtā proteīna struktūra kompleksā ar stearātu, kadrs no 116 ns MD simulācijas. B. Atvērtā apo-proteīna struktūra, kadrs no 194 ns MD simulācijas. Aminoskābju atlikumu numerācija pēc UniProt ID P05413.



1.19. att. Izotermālās titrēšanas kalorimetrijas līknes: **A.** oleīnskābei, **B.** DMPC un **C.** oleīnskābes/DMPC liposomām (1/11 mols/mols). Saistības siltumefekts detektēts tikai oleāta/DMPC liposomu titrēšanas gadījumā [99].

Zināms, ka FABP proteīniem ir atšķirīga afinitāte pret dažāda garuma TS. Taču precīzu šīs afinitātes raksturošanu apgrūtina vājā TS šķīdība ūdens buferos. Matsuoka S. *et al.* [99] piedāvāja vienu no veidiem, kā palielināt TS šķīdību un, papildus, imitēt citoplazmas vidi, proti izveidot heterogēnās liposomas, izmantojot dimiristoilfosfatidilholīna (DMPC) un TS

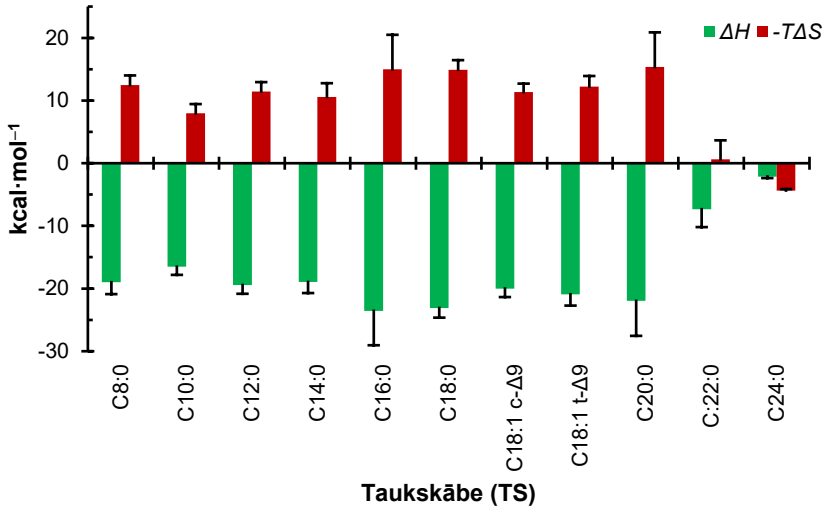
kombināciju molārās attiecībās 1:1. Iegūtajām DMPC/TS liposomām ar izotermālās titrēšanas kalorimetriju (*ITC*) noteica saistības afinitāti un termodinamiku. Liposomas tikai un vienīgi no DMPC saistību ar FABP3 neuzrādīja (1.19. att.). Kopumā,  $K_D$  dažāda garuma TS svārstījās 1–50  $\mu\text{M}$  robežās. Kā redzams 1.20. attēlā, visspēcīgāk ar FABP3 saistījās palmitāts<sup>2</sup> (C16:0), bet visvājāk – kaprilāts (C8:0). Kaproātam (C6:0) saistību ar FABP3 detektēt neizdevās. Savienojumiem ar C8–C20 novēroja saistībai labvēlīgu entalpiju,  $\Delta H$ , un saistībai nelabvēlīgu entropiju,  $-T\Delta S$  (1.21. att.). Savukārt, TS ar C22 un C24 novēroja termodināmisko parametru maiņu.  $\Delta H$  un  $-T\Delta S$  vērtības kļuva mazākas (absolūtos skaitļos), bet C24 gadījumā  $-T\Delta S$  mainīja zīmi un kļuva saistībai labvēlīga (1.21. att.). Proteīns uzrādīja vislabāko afinitāti piesātinātajām TS ar garumu no 10 līdz 18 oglekļiem, ieskaitot, kas arī kokristalizēti ar FABP3 (PDB ID 4TKJ, 4TKB, 4TKH, 4TKJ un 3WVM). Iegūtās struktūras ir ar augstāko izšķiršanas spēju (0,87–0,93 Å) un deva iespēju precīzāk definēt dažāda garuma TS saistības konformāciju (1.22. att.). Kā redzams, pirmie 10 oglekļa atomi visu piecu TS gadījumā ieņem ļoti līdzīgu konformāciju ar vidējo kvadrātisko novirzi (*Root Mean Square Deviation, RMSD*) < 0,13 Å. Savukārt 13 ūdens molekulas aktīvā centra iedobē nodrošina to, ka TS ieņem konkrēti U veida konformāciju. Ļoti garo TS gadījumā, šie ūdens molekulu klasteri tiek izjaukti, kas rezultējas zemākās afinitātēs. Hidrofobie aminoskābju atlikumi F17 un A77, stipri mijiedarbojoties ar vidēji garām un garķēžu TS ( $C > 8$ ), nodrošina šo TS augstu afinitāti. Īsākās TS tiek izkonkurētas, jo to C3–C6 atomi mijiedarbojas tikai ar ūdens molekulām, kas noved pie entropijas un saistības stipruma samazinājuma [99]. Līdzīgi tiek izkonkurētas arī hidrofobās molekulas ar stīvu, nelokāmu struktūru (piemēram, retinoīnskābes/fitānskābes un oksilipīni) [104].



1.20. att. FABP3 TS saistības afinitātes noteiktas ar liposomu starpniecību (*liposome-mediated*) izmantojot *ITC*, dati uzņemti 37 °C temperatūrā [99].

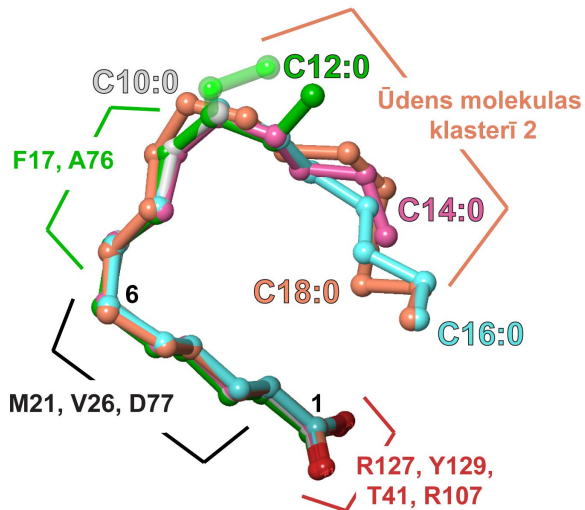
$K_D$  vērtības dažāda garuma TS un FABP3 kompleksiem. Visi eksperimenti uzņemti TS/DMPC liposomu maisījumiem ar molāro attiecību 1:11. Kļūdu vērtības ir standartkļūdas ( $n = 3$ ).

<sup>2</sup> Pieņemtie TS nosaukumi apkopoti 2. pielikumā.



1.21. att. FABP3 TS termodinamiskie parametri, noteikti ar liposomu starpniecību (*liposome-mediated*) izmantojot ITC, dati uzņemti 37 °C temperatūrā [99].

Termodinamiskie saistības parametri,  $\Delta H$  (zaļā krāsā) un  $-T\Delta S$  (sarkanā krāsā). Visi eksperimenti uzņemti TS/DMPC liposomu maisījumiem ar molāro attiecību 1:11. Kļūdu vērtības ir standartkļūdas ( $n = 3$ ).



1.22. att. Dažāda garuma TS konformāciju superpozīcija.

Dažāda garuma eksperimentāli noteikto TS konformāciju superpozīcija, kopā ar norādītajiem saistības partneriem (aminoskābju atlikumiem). Kaprināts (C10:0) – gaiši pelēkā, laurināts (C12:0) – zaļā, miristāts – rozā, palmitāts (C16:0) – gaiši zilā un stearāts (C18:0) – oranžā krāsā. Laurināta (C12:0) gadījumā novēro divas iespējamās konformācijas. Aminoskābju atlikumu numerācija pēc *UniProt* ID P05413 [105].

## 1.4. Dinamiskā gaismas izkliede

Dinamiskās gaismas izkliedi (*Dynamic Light Scattering, DLS*, jeb fotonu korelācijas spektroskopiju) plaši pielieto daļiņu izmēra un to sadalījuma profila noteikšanai šķīdumos. Turklāt, to iespējams pielietot proteīnu agregācijas, proteīna-proteīna, proteīna-RNS vai DNS mijiedarbības pētīšanai, kā arī paraugu homogenitātes noteikšanai [106, 107].

Metodes pamatā ir gaismas izkļedes parādība (1.23. att.). Monohromatiskā gaisma nokļūstot šķīdumā, kas satur jebkādas daļiņas (parasti  $< 1 \mu\text{m}$ ), haotiski izkļiedējas visos virzienos atkarībā no daļiņu izmēra un formas. Izkļiedētā gaisma no katras daļiņas pēc tam mijiedarbojas viena ar otru. Novēro interferenci. Ņemot vērā to, ka daļiņas nepārtraukti maina savu novietojumu Brauna siltumkustības dēļ, izkļedes centri mainās. Tas savukārt ietekmē interferenci un rada izkļedes intensitātes fluktuācijas. Izkļiedēto gaismas intensitāti noteiktā fiksētā leņķī pret sākotnējo staru (parasti  $- 90^\circ$ ) mēra laikā. Mērījumi sniedz informāciju par daļiņu ātrumu šķīdumā. Difūzijas koeficientu aprēķina pēc datu autokorelācijas funkcijas, bet daļiņu izmēru (hidrodinamisko diametru) nosaka pēc Stoksa-Einšteina vienādojuma (1.1.) [106, 108, 109].

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (1.1.)$$

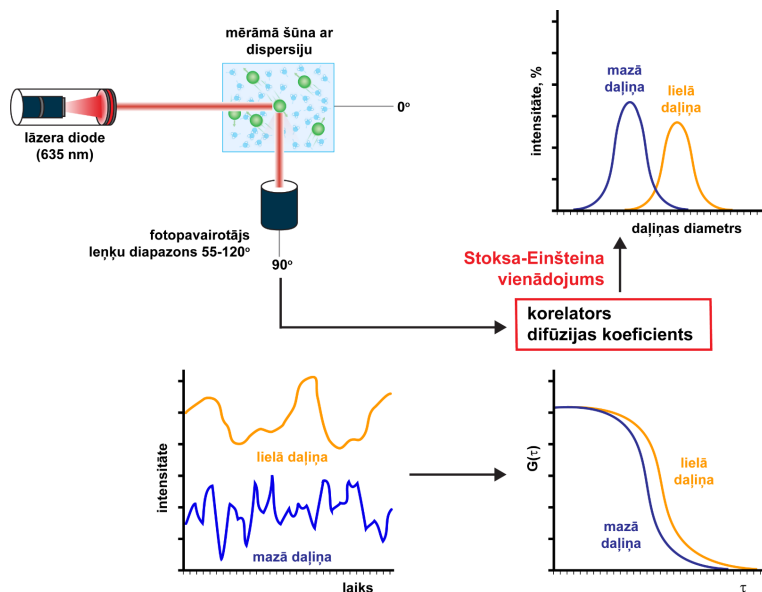
kur  $D$  – difūzijas koeficients,  $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ;

$k_B$  – Bolcmaņa konstante,  $\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ ;

$T$  – absolūtā temperatūra, K;

$\eta$  – dinamiskā viskozitāte, Pa·s;

$R_h$  – sfēriskās daļiņas hidrodinamiskais rādiuss, m.



1.23. att. Daļiņu izmēra noteikšana ar *DLS*.

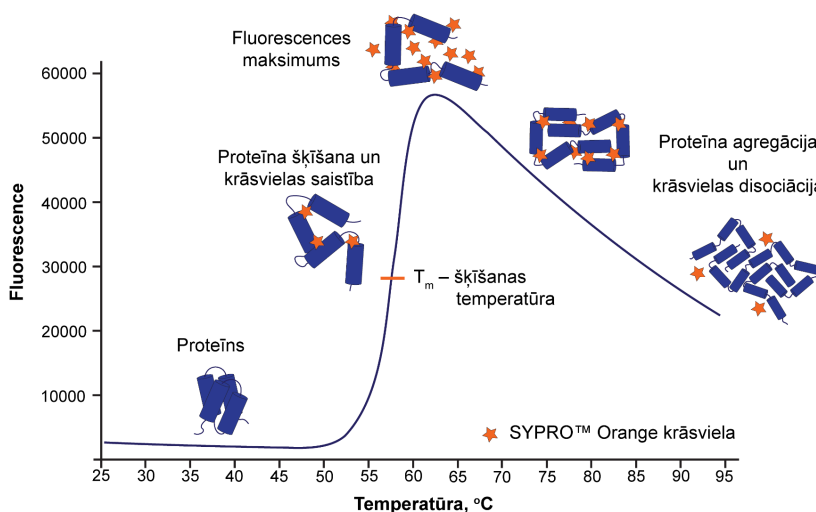
## 1.5. Proteīna-liganda mijiedarbības izpēte

Lielākā daļa bioloģisko procesu notiek pateicoties proteīna-proteīna, proteīna-DNS vai proteīna-liganda mijiedarbībai. Tām ir svarīga loma šūnu dzīvības cikla un gēnu ekspresijas un replikācijas regulācijā, kā arī DNS labošanā, RNS transportēšanā un translācijā. Savukārt, proteīna-liganda mijiedarbība ir katra bioloģiskā procesa neatņemama sastāvdaļa. Tāpēc ir svarīgi saprast proteīnu un ligandu mijiedarbības lomu un to struktūras-aktivitātes likumsakarības ar nolūku izstrādāt efektīvu dažādu bioloģisko procesu medikamentozo regulācijas stratēģiju. Šajā apakšnodaļā apskatītas trīs metodes, kas dod plašāko informāciju par proteīna-liganda saistības mehānismu, termodinamiku un kompleksa stabilitāti.

### 1.5.1. Termiskās nobīdes analīzes (TSA) metode

Proteīnu termiskās nobīdes analīzes metode (*Thermal Shift Assay, TSA*) novērtē izmaiņas termiskās denaturācijas temperatūrā un šādi nosaka proteīna stabilitāti dažādos apstākļos, piemēram, mainoties vides pH, buferkomponentei, sāls daudzumam, vai arī citām piedevām. Turklāt, šādi iespējams efektīvi skrīnēt zāļvielu kandidātus, vai zāļvielu fragmentu bibliotēkas, jo notiekot specifiskai proteīna-liganda saistībai, proteīna struktūra tiek stabilizēta, kas rezultējās proteīna denaturācijas jeb kušanas temperatūras paaugstināšanā.

Visizplatītākā termiskās nobīdes mērīšanas metode ir diferenciālā skenējošā fluorimetrija (DSF) vai termofluors, kurā izmanto specializētas fluorogēnas krāsvielas [110]. Jaunākie dati rāda, ka *TSA* metodi iespējams izmantot arī zāļvielu skrīningam veselās šūnās [111].

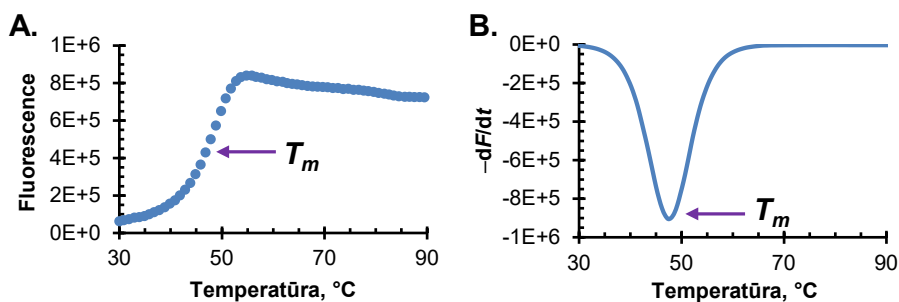


1.24. att. *TSA* metodes princips.

Proteīna salocīšanas/denaturācijas detektēšanai izmanto vides jutīgas krāsvielas, tādas kā 1-anilīnonaftalīn-8-sulfonāts (1,8-ANS), naftalīn-6-sulfonāts (2,6-TNS) vai arī SYPRO™ Orange. Galvenais trūkums 1,8-ANS, 2,6-TNS un tām radnieciskām krāsvielām ir

ierosināšanas un emisijas viļņu gaumi,  $\lambda$ , kas ir ārpus plaši pielietojamo reāllaika polimerāzes ķēdes reakcijas (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) instrumentu [ar fluorescences noteikšanas iespēju un Peltjē-balstītu (termoelektrisko) temperatūras kontroli] diapazona. Savukārt SYPRO™ Orange krāsvielai  $\lambda_{\text{ieros.}}$  300 nm un  $\lambda_{\text{emis.}}$  470/570 nm ļoti labi sader ar reāllaika *PCR* instrumentu filtru komplektu. Turklāt, tai saistoties pie proteīna hidrofobiem reģioniem, novēro ievērojami lielāku kvantu iznākumu nekā 1,8-ANS vai 2,6-TNS. Kopumā tas padara SYPRO™ Orange par vienu no labākajām proteīna iezīmēšanas krāsvielām salocīšanas/denaturācijas pētījumos [112–114].

*TSA* eksperimenta tipiskākās līknes piemērs ir parādīts 1.24. attēlā. Sākumā dabiski salocīto proteīnu inkubē kopā ar SYPRO™ Orange. Eksperimenta laikā pakāpeniski palielina parauga temperatūru un mēra fluorescenci (emisiju). Atkarībā no *PCR* aparāta dizaina, mērījumus iespējams veikt vairākiem paraugiem vienlaicīgi, piemēram, 96- vai 384- bedrīšu platēs, u.c. Sasniedzot noteiktu temperatūru, proteīns sāk zaudēt savu dabisko struktūru. Notiek proteīna denaturācija jeb kušana. Šī procesa rezultātā proteīna hidrofobie reģioni kļūst pieejami SYPRO™ Orange krāsvielai. Notiekot proteīna un krāsvielas saistībai, detektē fluorescences signāla strauju pieaugumu. Turpinot parauga sildīšanu, tiek sasniegta temperatūra, kurā sāk veidoties proteīnu agregāti. Šajā temperatūrā brīvi pieejamo hidrofobo reģionu daudzums samazinās un novēro krāsvielas disociāciju no proteīna. Rezultātā fluorescences signāls samazinās. Proteīna kušanas temperatūru,  $T_m$ , nosaka no iegūtas līknes. Tā ir temperatūra, kurā 50 % no proteīna ir denaturēti (1.25. att., A). Maksimāli ērti  $T_m$  nosakāma pēc fluorescences emisijas pirmā atvasinājuma kā funkcijas no temperatūras,  $(-\frac{dF}{dt})$ , (1.25. att., B) [112, 114].



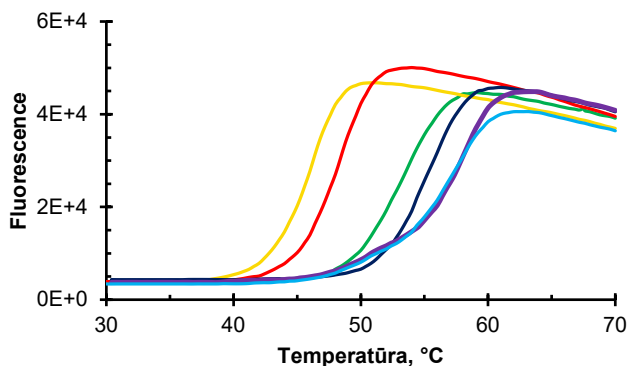
1.25. att. Tipiska *TSA* datu analīze.

- A. Tipiska proteīna denaturācijas līkne.  $T_m$  nosaka proteīna denaturācijas līknes lineārās daļas viduspunktā.  
 B. *TSA* līknes atspoguļojums kā fluorescences emisijas pirmā atvasinājuma funkcija no temperatūras.  $T_m$  uzrāda proteīna denaturācijas līknes minimums.

Variējot analizējamā parauga sastāvu, piemēram, pievienojot klāt ligandu vai nomainot bufera pH, novēro *TSA* līkņu nobīdi (1.26. att.). Ja līkne nobīdās pa kreisi,  $T_m$  samazinās, tad notiek proteīna destabilizācija. Savukārt, ja līkne nobīdās pa labi,  $T_m$  palielinās, tad novēro proteīna stabilizāciju. Datu analīzi veic salīdzinot savā starpā  $T_m$  vērtības, kas iegūtas vai nu atšķirīgos apstākļos, vai arī vienā buferī variējot ligandu. Vislielāko afinitāti parasti uzrāda tas ligands, kura kompleksam ar proteīnu novēroja visaugstāko  $T_m$ . Metodes galvenā priekšrocība ir ļoti mazs proteīna patēriņš (pateicoties augsti jutīgām fluorescentām krāsvielām) un liela



caurlaidība. Tomēr metode nepasaka, vai pētāmais ligands saistās proteīna aktīvajā centrā, alostēriski vai arī nespecifiski. Turklāt, metode nav piemērota ļoti hidrofobo sistēmu vai proteīna-proteīna mijiedarbības pētījumiem, krāsvielas nespecifiskās saistības dēļ [113, 115].



1.26. att. Kušanas līkņu salīdzinājums cūkas citrāta sintetāzei [(EC 2.3.3.1), 1  $\mu\text{M}$ ] kompleksos ar diviem ligandiem trīs dažādas bufersistēmās [113].

B04 (tumši zila līkne): Z00001, Na acetāts pH 5,0; B08 (zaļa līkne): Z00001, HEPES pH 7,5; B12 (dzeltena līkne): Z00001, BORAX pH 9,0; H03 (violeto līkne): 100  $\mu\text{M}$  oksaloacetāts, Na acetāts pH 5,0; H07 (gaiši zila līkne): 100  $\mu\text{M}$  oksaloacetāts, HEPES pH 7,5; H11 (sarkana līkne): 100  $\mu\text{M}$  oksaloacetāts, BORAX pH 9,0.

## 1.5.2. Saistības termodinamikas parametru noteikšana ar *ITC*

### 1.5.2.1. *ITC* metode

Proteīnu mijiedarbība ar mazām molekulām (ligandiem) ir ļoti specifiska. Papildus strukturālai informācijai ir svarīgi izprast novērojamās saistības termodinamiku, lai raksturotu specifiskumu un selektivitāti [116, 117].

*ITC* ir “zelta-standarts” starpmolekulāro mijiedarbību pētīšanai [118–121]. Tā ir vienīgā metode, kas dod iespēju viena eksperimenta laikā raksturot saistības stiprumu [nosakot asociācijas konstantes,  $K_A$ , vai disociācijas konstantes,  $K_D$ , vienādojums (1.2.)], saistības entalpiju ( $\Delta H$ ) un reakcijas stehiometriju,  $N$ . Saistības entropiju,  $-T\Delta S$ , aprēķina atbilstoši vienādojumam (1.3.). *ITC* spēj noteikt saistības stiprumu savienojumiem ar  $K_D$  robežās no mM līdz nM. Savukārt savienojumi ar  $K_D$  robežās pM–fM raksturojami konkurences jeb izspiešanas saistības eksperimentos [122, 123]. Turklāt, jaunākās konstrukcijas aparāti spēj detektēt ļoti vājus siltumefektus,  $< 0,4 \mu\text{J}$ , tāpēc tie vislabāk der nekovalento mijiedarbību raksturošanai biomolekulās [118].

$$K_D = \frac{1}{K_A}, \quad (1.2.)$$

kur  $K_D$  – disociācijas konstante, M;

$K_A$  – asociācijas konstante,  $\text{M}^{-1}$ .

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_A, \quad (1.3.)$$

kur  $\Delta G$  – Gibbsa brīva enerģija, kcal·mol<sup>-1</sup>;

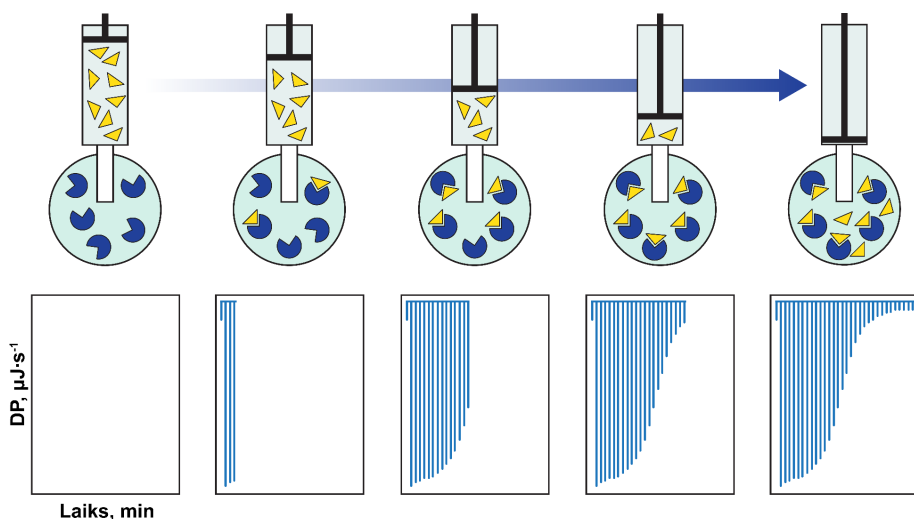
$\Delta H$  – entalpija, kcal·mol<sup>-1</sup>;

$-T\Delta S$  – entropija, kcal·mol<sup>-1</sup>;

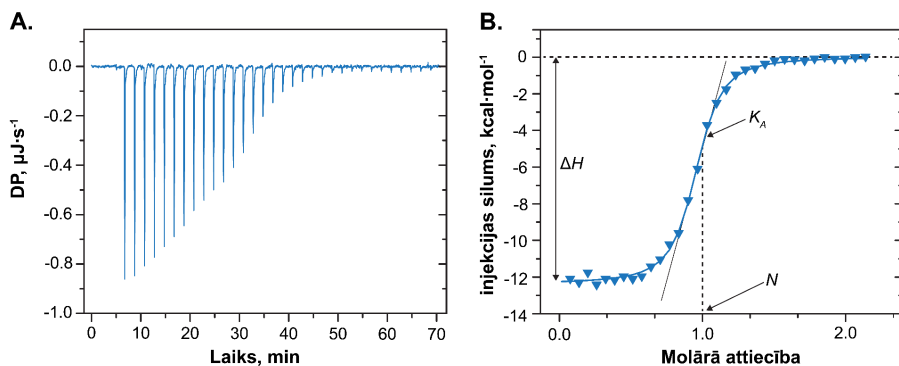
$R$  – universālā gāzes konstante, kcal·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>;

$T$  – temperatūra, K;

$K_A$  – asociācijas konstante, M<sup>-1</sup>.



1.27. att. ITC eksperimentu norises atspoguļojums.



1.28. att. **A.** Neapstrādāta ITC termogramma, kas rāda jaudas starpību (DP) starp referenes un parauga šūnu. **B.** Integrētie termogrammas dati (aplīši) un izoterma (nepārtraukta S-tipa līkne).

Molārās entalpijas izmaiņas, ko novēro katrai injekcijai, attēlo attiecībā pret abu reaģējošo vielu (piemēram, proteīna-liganda) molārām attiecībām. Dati tiek analizēti ar 1-1 saistības modeli, kurā nolasa asociācijas konstanti,  $K_A$ , entalpiju,  $\Delta H$ , un stehiometriju,  $N$ . Pārtrauktās līnijas parāda parametru noteikšanas vietas.

*ITC* aparātam ir trīs nedalāmas sastāvdaļas: i) references jeb atskaites šūna, ii) parauga šūna un automātiskā injekciju šļirce. References šūnu, kas uzpildīta ar ūdeni vai eksperimenta buferi, izmanto, lai titrēšanas laikā parauga šūnā normalizētu  $\Delta H$  izmaiņas. To nodrošina ar atgriezeniskās saites jaudas palīdzību. Tipiskā *ITC* eksperimentā parauga šūnā liganda šķīdumu ievada mazu alikvotu veidā. Eksperimenta sākumā visas ievadītās liganda molekulas saistās ar proteīnu un uzrāda vislielāko siltumefektu. Savukārt, sasniedzot proteīna piesātinājumu, siltumefektu vairs nenovēro, jo saistība nenotiek (1.27. att.) [124, 125]. *ITC* aparāts maina jaudu (*dynamic power*, DP), lai kompensētu temperatūras izmaiņas. Šīs jaudas izmaiņas ir detektējams instrumenta signāls. Atkarībā no saistības veida detektē eksotermiskus (ar siltuma izdalīšanu) vai endotermiskus (ar siltuma uzņemšanu) siltumefektus. Rezultātā iegūst S-tipa līkni, kas kalpo termodinamisko parametru noteikšanai (1.28. att.) [126–128].

### 1.5.2.2. Saistības termodinamika

Saistība starp diviem mijiedarbības partneriem vienmēr ietver sevī entalpijas,  $\Delta H$ , un entropijas,  $-T\Delta S$ , komponentes, kas norāda, ka atpazīšanas procesā, notiek gan struktūras, gan dinamikas izmaiņas. Jebkuram spontānam procesam saistība notiek tikai tad, kad Gibbsa brīvā enerģija,  $\Delta G$ , ir negatīva. Taču negatīva  $\Delta G$  var veidoties no dažādiem termodinamiskiem profiliem, kas variējas no entalpijas- līdz entropijas- balstītiem [vienādojums (1.3.)]. Rezultātā, atpazīšanas un mijiedarbības virzītājspēku izprašana prasa detalizētu saistības termodinamikas aprakstu, kā arī korelācijas izveidi starp iegūtiem termodinamiskiem parametriem un mijiedarbības partneru struktūrām. Atpazīšanas fenomena izprašanai ir svarīga loma medicīnas ķīmijā un materiālu izpētē, jo tas ļauj veikt patiesi racionālu uz struktūru balstītu molekulāro dizainu.

Termodinamiskie parametri sniedz milzīgu informācijas daudzumu, taču sadalīt tos atsevišķos ieguldījumos struktūras-aktivitātes likumsakarību izveidei nav tik vienkārši. Stiprākās un mērķtiecīgākās (*more directed*) mijiedarbības ir mazāk entropijas-izdevīgas, jo stipra saistība ierobežo molekulu kustīgumu. Šo paradigmu sauc par entalpijas-entropijas kompensācijas fenomenu. Fenomens stipri atkarīgs no pētāmas sistēmas un nav obligāta termodinamiskā prasība [129, 130]. Tomēr to bieži novēro proteīna-liganda mijiedarbībā [131].

#### 1.5.2.2.1. Entalpijas komponente

Entalpijas komponentes atspoguļo specifiskumu un saistības stiprumu nekovalentām mijiedarbībām. Tās ietver jonu, halogēnu un ūdeņraža saišu veidošanos, elektrostatiskās (Kulona) un VdW mijiedarbības, kā arī kontaktā esošo grupu polarizāciju. Turklāt, entalpijas izmaiņas iekļauj sevī liganda-šķīdinātāja un proteīna-šķīdinātāja kontaktu sabrukšanu, starpmolekulāro ūdeņraža saišu tīkla reorganizāciju, šķīdinātāja reorganizāciju uz proteīna virsmas, aktīvā centra konformācijas izmaiņas u.c. Tā visa rezultātā izmērīto entalpijas izmaiņu sadalīt atsevišķās komponentēs ir visai sarežģīti [132].

Elektrostatiskās mijiedarbības sadalāmas trīs grupās: lādiņa-lādiņa, lādiņa-dipola un dipola-dipola mijiedarbība. Parasti tās novēro starp pretēji lādētiem atomiem, ligandu funkcionālām

grupām vai proteīnu sānu ķēdēm. Svarīgu ieguldījumu entalpijas komponentē nodrošina lādiņa-dipola mijiedarbības.

VdW mijiedarbības sevišķi svarīgas bioloģiskām molekulām. Eksistē divi VdW mijiedarbību veidi: pievilšanās un atgrūšanās, un tie abi piedalās saistības procesā. VdW mijiedarbības ir ļoti vājas ( $0,5-1,0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) salīdzinājumā ar kovalentām vai elektrostatiskām mijiedarbībām. Taču tas tiek kompensēts ar lielo VdW kontaktu skaitu, kas padara VdW mijiedarbību īpatsvaru entalpijas komponentē nozīmīgu [133].

Ūdeņraža saite ir nekovalenta, pievilšanās mijiedarbība starp ūdeņradi, kas kovalenti saistīts ar kādu elektronegatīvu grupu (donoru) un citu elektronegatīvu atomu, tādu kā skābeklis vai slāpeklis (akceptoru). Ūdeņraža saiti var definēt kā dipola-dipola elektrostatisko mijiedarbību, taču tai piemīt dažas kovalentās saites īpašības: tās ir specifiskas un orientētas (pakļaujas stingrām ģeometriskām prasībām), tajās starpatomu attālumi ir mazāki par VdW rādiusu summu, kā arī ir limitēts iespējamo kontaktu un mijiedarbības partneru skaits, ko var interpretēt kā valenci. Bioloģiskajos apstākļos ūdeņraža saites ir salīdzinoši vājas:  $1,2-7,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  [134]. Tās ir vājākas nekā jonu vai kovalentās saites. Ņemot vērā šādu ūdeņraža saišu stiprumu, tās var viegli un ātri veidoties, bet var arī sabrukt notiekot saistībai, konformācijas maiņai vai proteīna salocīšanai, patērējot enerģiju, kas samērojama ar termālām fluktuācijām. Ūdeņraža saites ir daļēji atbildīgas par otrējo, trešējo un ceturto proteīnu struktūru, kā arī DNS un sintētisko polimēru struktūrām. Rezultātā, tām ir galvenā loma molekulārās atpazīšanās procesā. Ūdeņraža saišu ģeometriskie ierobežojumi bija vieni no pirmajiem, kurus konstatēja struktūru kristalogrāfiskos pētījumos, taču to ieguldījums saistības brīvajā enerģijā ir specifisks katrai atsevišķai sistēmai [135, 136]. Nav šaubu, ka ūdeņraža saites vienmēr nodrošina saistības vai atpazīšanas procesa specifiskumu, bet ne vienmēr ievērojami uzlabo saistības brīvo enerģiju. Ļoti bieži, pastāvot stiprām ūdeņraža saitēm, ir jāpatērē vairāk enerģijas desolvatācijai, kā rezultātā brīvās enerģijas ieguvums var būt pavisam niecīgs [137]. Tas ne vienmēr ir spēkā un var mainīties atšķirīgās proteīna-liganda sistēmās [138].

Halogēnu saites līdzīgas ūdeņraža saitēm, jo tās arī ietver elektronu donora, halogēna atoma, un elektronu akceptora mijiedarbības. Halogēnu saites ir salīdzinoši vājas, taču atsevišķos gadījumos tās var konkurēt ar ūdeņraža saitēm [139, 140]. Zāļvielās biežāk izmantotie halogēni ir hlors, broms, jods un fluors (retāk), no kuriem jods veido visspēcīgākās halogēnu saites, bet fluors – visvājākās. Saites stiprums pieaug līdz ar atoma izmēru ( $F < Cl < Br < I$ ). Pieejamie eksperimentālie dati rāda, ka halogēnu saites stipri ietekmē saistības afinitāti. Ūdeņraža nomaiņa ar halogēnu var uzlabot afinitāti līdz par 200–300 reizēm [141, 142].

Hidrofobās mijiedarbības parasti novēro starp ligandu un proteīna hidrofobām sānu ķēdēm. Tām ir liela ietekme uz saistības brīvo enerģiju. Hidrofobie aminoskābju atlikumi atgrūž ūdens molekulas un citas polārās grupas, bet pievelk liganda nopolārās grupas. Papildus Tyr, Phe un Trp apolārie un aromātiskie cikli piedalās  $\pi$ - $\pi$  mijiedarbībā ar liganda aromātiskām daļām [139, 143]. Tomēr, lielākā daļa afinitātes uzlabojuma veidojas no hidrofobām mijiedarbībām hidrofobā aktīvajā centrā no sub-optimālās aktīvā centra solvatācijas apo-stāvoklī [132].

Mijiedarbības ar proteīnu aromātiskiem cikliem bieži sastop proteīnu-ligandu kompleksos. Tyr, Trp un Phe sānu ķēžu unikālās stēriskās un elektroniskās īpašības, kas uzrāda lielāku polarizējamību un lielākus kvadrupola momentus, nodrošina vēlamu ģeometriju mijiedarbības

procesā [139]. Divām aromātiskām sistēmām dominējošas ir divas ģeometrijas: paralēlā un perpendikulārā [144–146]. Elektronakceptorās grupas ieviešana *orto*- vai *para*- stāvoklī vienā no aromātiskiem gredzeniem, nodrošina konkrēti perpendikulāro novietojumu [147]. Alifātiskās-aromātiskās mijiedarbības gadījumā novēro saistībai izdevīgāko perpendikulāro novietojumu ar enerģijas ieguvumu līdzīgu perpendikulārai aromātiskai-aromātiskai mijiedarbībai [148]. Turklāt, alifātisko-aromātisko mijiedarbību gadījumā, mijiedarbības kļūst enerģētiski visizdevīgākās, kad alifātiskās grupas skābums pieaug. Proti, etāns (sp<sup>3</sup> hibridizācija, mazāk skābs) mijiedarbosies ar aromātisko ciklu sliktāk nekā acetilēns (sp hibridizācija, skābāks) [149].

#### 1.5.2.2.2. Entropijas komponente

Entropijas komponente parāda visas sistēmas dinamiku un pielāgojamību [150, 151]. Izmaiņas entropijā atspoguļo kustīguma samazināšanos translācijas un rotācijas brīvības pakāpju izmaiņu dēļ. Parasti, šādas izmaiņas nelabvēlīgi ietekmē mijiedarbības entropiju. Tomēr konformāciju izmaiņas var būt arī entropijas-izdevīgas un uzlabot saistības afinitāti [152, 153]. Solvatācijas efekti, tādi kā šķīdinātāja reorganizācija vai cieši piesaistīto ūdens molekulu atbrīvošana arī stipri ietekme entropijas izmaiņas [154]. Tomēr, ūdens molekulas, kas piedalās proteīna-liganda kontaktvirsmas veidošanā, var pozitīvi ietekmēt kopējo saistības entropiju [155]. Kā redzams, entalpijas un entropijas ieguldījums saistības brīvajā enerģijā ir atkarīgs no vairākām sistēmas-specifiskām īpašībām [132].

Jebkuras saistības rezultātā ūdens tiek izspiests no mijiedarbības virsmas vai no aktīvā centra, paralēli notiekot liganda desolvatācijai. Neskatoties uz to, ka šis ūdens molekulas parasti ir nesakārtotas un vāji saistītas ar proteīna struktūru, šāda izspiešana ietekmē visu proteīna-liganda kompleksa solvatācijas apvalku [156]. Savukārt, cieši saistītās ūdens molekulas, kas saglabājas vairākās kristalogrāfiskās struktūrās, tiek uzskatītas par proteīna struktūras neatņemamu daļu un var piedalīties proteīna bioloģiskās aktivitātes regulēšanā [157–159]. Gadījumos, kad šādas ūdens molekulas tiek izspiestas no aktīvā centra, novēro stipras izmaiņas termodinamiskā saistības profilā. Uzskata, ka ūdens molekulas atbrīvošanai no stingrās vides (*rigid environment*) vajadzētu būt entropijas-izdevīgai. Taču šo ieguvumu bieži kompensē zudumi entalpijas komponentē [132].

Tradicionāls uzskats par entropijas virzīto proteīna-liganda asociāciju lielākoties neņem vērā solvatācijas efektus, lai gan solvatācija stipri ietekmē termodinamisko saistības profilu. Pēdējie pētījumi rāda, ka apo-proteīna aktīvā centra hidratācijas stāvokļa izpēte racionālā zālvielu dizainā ir ārkārtīgi svarīga [132]. Dažos gadījumos liganda desolvatācija arī var ietekmēt saistības brīvo enerģiju. Ļoti stipriem hidrofilēm ligandiem desolvatācija var patērēt pārāk daudz enerģijas, kas padara to neizdevīgu saistībai [152, 160].

#### 1.5.2.3. Siltumkapacitāte

Termodinamikā Gibbsa brīvā enerģija, entalpija un entropija ir stāvokļa funkcijas, kas atkarīgas no temperatūras. Rezultātā, vienas sistēmas termodinamiskie parametri, kas noteikti pie vienas temperatūras atšķiras no parametriem, kas noteikti citā temperatūrā.

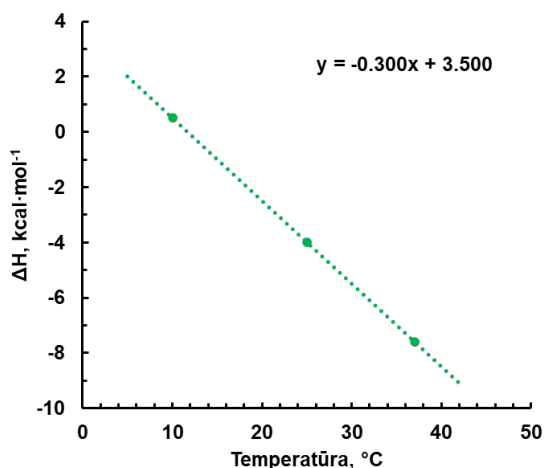
$$\Delta C_p = \left( \frac{\partial \Delta H}{\partial \Delta T} \right)_p, \quad (1.4.)$$

kur  $\Delta C_p$  – siltumkapacitātes izmaiņa pie nemainīga spiediena,  $p$ , kcal·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>;

$\partial \Delta H$  – saistības entalpijas izmaiņa dažādās temperatūrās, kcal·mol<sup>-1</sup>;

$\partial \Delta T$  – temperatūras izmaiņa, K.

Proteīna siltumkapacitāte,  $C_p$ , parāda cik daudz enerģijas nepieciešams, lai palielinātu tā temperatūru par vienu grādu. Savukārt, procesa siltumkapacitātes izmaiņa,  $\Delta C_p$ , definē šim procesam entalpijas izmaiņas atkarību no temperatūras [vienādojums (1.4.)]. Ja liganda saistīšanās pie proteīna notiek ar negatīvu siltumkapacitātes izmaiņu, tad entalpijas un entropijas izmaiņas šim procesam stipri atkarīgas no temperatūras [161]. Parasti, novēro  $\Delta C_p$  negativitātes pieaugumu palielinoties liganda hidrofobicitātei. Tas raksturīgi klasiskām hidrofobām nepolāro grupu mijiedarbībām ūdens sistēmās un eksponētās (*exposed*) virsmas laukuma izmaiņām [162, 163].



1.29. att.  $\Delta H$  atkarība no temperatūras.

Zaļie aplīši – eksperimentālās  $\Delta H$  vērtības, noteiktas trīs dažādās temperatūrās.

Zaļā punktveida līnija – lineārā regresija. Līnijas slīpums atbilst siltumkapacitātes izmaiņai.

Siltumkapacitātes izmaiņu  $\Delta C_p$  var viegli noteikt veicot *ITC* eksperimentus vienam un tam pašam proteīna-liganda kompleksam dažādās temperatūrās un atspoguļojot noteiktās saistības entalpijas izmaiņas kā funkciju no temperatūras. Nelielā temperatūru diapazonā (piemēram, 0 – 50 °C)  $\Delta H$  atkarībā no temperatūras ir lineāra. Rezultātā  $\Delta C_p$  raksturojams ar lineārās regresijas slīpumu (1.29. att.). Izmantojot iegūtās siltumkapacitātes izmaiņas vērtību un vienādojumus (1.5.) – (1.8.) [161, 164–166], var aprēķināt kā mainīšies saistības termodinamiskie parametri ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $-T\Delta S$  un  $K_A$ ) plašākā temperatūru diapazonā (1.30. att.). Kā jau iepriekš minēts,  $\Delta H$  un temperatūras atkarības slīpums raksturo  $\Delta C_p$ . Savukārt  $-T\Delta S$  un temperatūras atkarības slīpums vienāds ar  $-(\Delta C_p + \Delta S)$ . Parasti, samērā mazos temperatūru intervālos  $\Delta C_p$  ir daudz lielāks par  $\Delta S$  un entalpijas un entropijas temperatūras atkarību slīpumi

ir ļoti līdzīgi. Rezultātā Gībsa brīvās enerģijas izmaiņas ir mazjūtīgas pret temperatūras izmaiņām. Līdzīgi uzvedas arī ar  $\Delta G$  saistītā asociācijas konstante [vienādojums (1.3.)]. Izmantojot iegūtās temperatūras-termodinamisko parametru likumsakarības (1.30. att.), iespējams noteikt temperatūru  $T_H$ , kurā  $\Delta H = 0$  (piemēram,  $\sim 12$  °C, 1.30. att.), bet  $K_A$  vērtība – maksimālā (pēc Van't Hofa attiecības). Savukārt,  $T_S$  temperatūrā, kad  $-\Delta S = 0$  (piemēram,  $\sim 39$  °C, 1.30. att.), maksimāla ir saistības Gībsa enerģija.

$$\Delta H_T = \Delta H_{T_0} + \Delta C_p(T - T_0), \quad (1.5.)$$

kur  $\Delta H_T$  – saistības entalpijas izmaiņa temperatūrā  $T$ , kcal·mol<sup>-1</sup>;

$\Delta H_{T_0}$  – saistības entalpijas izmaiņa atskaites temperatūrā  $T_0$ , kcal·mol<sup>-1</sup>;

$\Delta C_p$  – siltumkapacitātes izmaiņa, kcal·K<sup>-1</sup>;

$T$  – temperatūra, K;

$T_0$  – atskaites temperatūra, K.

$$\Delta S_T = \Delta S_{T_0} + \Delta C_p \left( \ln \frac{T}{T_0} \right), \quad (1.6.)$$

kur  $\Delta S_T$  – saistības entalpijas izmaiņa temperatūrā  $T$ , kcal·mol<sup>-1</sup>;

$\Delta S_{T_0}$  – saistības entalpijas izmaiņa atskaites temperatūrā  $T_0$ , kcal·mol<sup>-1</sup>;

$\Delta C_p$  – siltumkapacitātes izmaiņa, kcal·K<sup>-1</sup>;

$T$  – temperatūra, K;

$T_0$  – atskaites temperatūra, K.

$$\Delta G_T = \Delta G_{T_0} + \Delta C_p \left( T - T_0 - T \ln \frac{T}{T_0} \right), \quad (1.7.)$$

kur  $\Delta G_T$  – Gībsa brīvās enerģijas izmaiņa temperatūrā  $T$ , kcal·mol<sup>-1</sup>;

$\Delta G_{T_0}$  – Gībsa brīvās enerģijas izmaiņa atskaites temperatūrā  $T_0$ , kcal·mol<sup>-1</sup>;

$\Delta C_p$  – siltumkapacitātes izmaiņa, kcal·K<sup>-1</sup>;

$T$  – temperatūra, K;

$T_0$  – atskaites temperatūra, K.

$$K_{AT} = K_{AT_0} \exp \left[ -\frac{\Delta H_{T_0}}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \left( \ln \frac{T}{T_0} + \frac{T_0}{T} - 1 \right) \right], \quad (1.8.)$$

kur  $K_{AT}$  – asociācijas konstante temperatūrā  $T$ , M<sup>-1</sup>;

$K_{AT_0}$  – asociācijas konstante atskaites temperatūrā  $T_0$ , M<sup>-1</sup>;

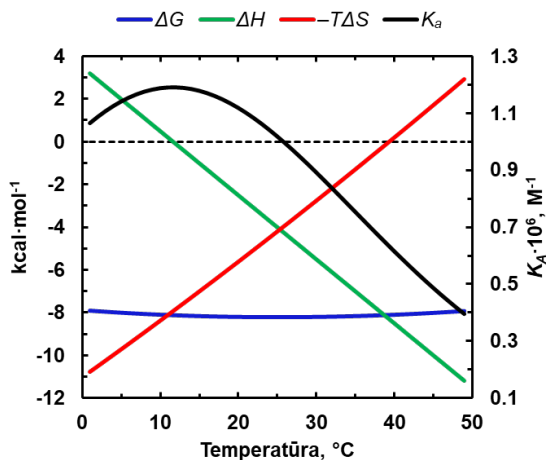
$\Delta H_{T_0}$  – saistības entalpijas izmaiņa atskaites temperatūrā  $T_0$ , kcal·mol<sup>-1</sup>;

$\Delta C_p$  – siltumkapacitātes izmaiņa, kcal·K<sup>-1</sup>;

$R$  – universālā gāzes konstante, kcal·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>;

$T$  – temperatūra, K;

$T_0$  – atskaites temperatūra, K.



1.30. att. Termodinamiskā saistības profila atkarība no temperatūras makromolekulas–liganda mijiedarbībai.

Izmantotie saistības termodinamiskie parametri, noteikti pie  $t = 25$  °C:  $K_A = 1,02 \cdot 10^6 M^{-1}$ ,  $\Delta G = -8,2$  kcal·mol<sup>-1</sup>,  $\Delta H = -4,0$  kcal·mol<sup>-1</sup>,  $-T\Delta S = -4,2$  kcal·mol<sup>-1</sup> un  $\Delta C_p = -0,3$  kcal·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>.

### 1.5.3. Proteīnu KMR

KMR spektroskopija jau sen kļuvusi par rūpīnas analīzes metodi makromolekulu telpiskās atomārās struktūras noteikšanai. Proteīnu KMR kļuva iespējama pateicoties 1970-80. gados izstrādātajai komplicētu impulsu sekvenču tehnikai un multidimensionālajai spektroskopijai [167–170]. Pieaugot KMR spektrometru magnētu radīto lauku intensitātei (no 2,35 līdz 28,19 T), homogenitātei un stabilitātei, būtiski uzlabojās iegūstamo komplicēto biomolekulu spektru izšķiršana un jutība (signāla un trokšņa attiecība, S/N) [171].

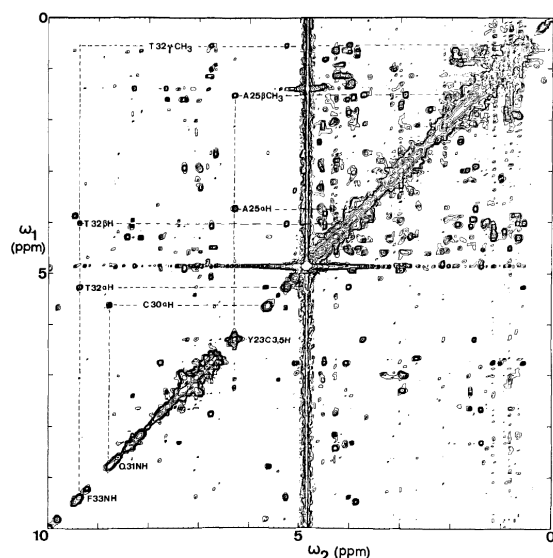
Pretstatā kristalogrāfijai, KMR dod iespēju atrast struktūras šķīdumā, variējot temperatūru, pH un sāls koncentrāciju, fizioloģisko apstākļu atveidošanai, vai arī pretēji – pakļautu pētāmo molekulu ekstremāliem nefizioloģiskiem apstākļiem, piemēram, lai pētītu proteīna denaturāciju. Turklāt, KMR metode ļauj pētīt molekulāro sistēmu dinamiku [172] un divu vai vairāku molekulu (proteīns-ligands, proteīns-proteīns, proteīns-RNS vai DNS, u.c.) mijiedarbību strukturālos, termodinamiskos un kinētiskos aspektus [173]. Izmantojot KMR iespējams pētīt proteīnus arī ierosinātā stāvoklī [174], daļēji salocītus vai proteīnus, kas neveido stabili trešējo struktūru (*Intrinsically Disordered Proteins*, IDP), membrānproteīnus [175] un dzīvās šūnas [176], kas nav izdarāms ar proteīnu kristalogrāfiju.

KMR pastāv pētāmo molekulu izmēra limits. Lielām molekulām ir lēns kustīgums<sup>3</sup> (*tumbling*) un ātra relaksācija, kā rezultātā pazeminās jutība (impulsu sekvenču bieži jāizmanto gari aiztures laiki) un palielinās līniju pusplatumi, kas ievērojami pasliktina izšķirtspēju un apgrūtinā signālu attiecināšanu.

<sup>3</sup> Molekulas kustīgums (*tumbling*) ietver sevī rotācijas, vibrācijas un translācijas kustības.



Pašos pirmsākumos [177], ar proteīnu KMR varēja pētīt tikai samēra mazas biomolekulas,  $MW \leq 10$  kDa, jo tika izmantoti paraugi ar dabisko izotopu saturu. Tas ļāva detektēt tikai protonus,  $^1H$ , bet ne  $^{13}C$  un  $^{15}N$  (dabiskais saturs attiecīgi 1,108 % un 0,365 %) kodolus. Rezultātā visu izmantojamo spektru klāsts aprobežojās ar 2D  $^1H$ - $^1H$  homonukleāriem spektriem: COSY, TOCSY, NOESY un ROESY<sup>4</sup>. Pat ļoti maziem proteīniem, piemēram, liellopu aizkuņģa dziedzerā tripsīna inhibitoram (*Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*, BPTI), kas sastāv tikai no 58 aminoskābju atlikumiem ( $MW = 6,5$  kDa), 2D NOESY spektrā (1.31. att.) novēro signālu pārklāšanos, kas pasliktina izšķirtspēju un ievērojami apgrūtinā uz sekvenču balsfīto attiecināšanu. Savukārt, palielinoties proteīna  $MW$  līdz 30–35 kDa signālu pārklāšanās kļūst tik ievērojama, ka ķīmisko nobīžu attiecināšana tikai un vienīgi no homonukleāriem spektriem nav veicama.



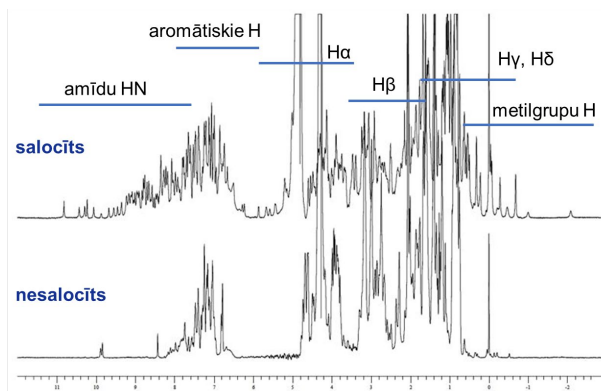
1.31. att. 2D NOESY spektrs liellopu aizkuņģa dziedzerā tripsīna inhibitoram (*bovine pancreatic trypsin inhibitor*, BPTI) [178]. Copyright © 1980 Published by Elsevier Inc.

Mūsdienās, pateicoties proteīnu iezīmēšanas metožu attīstībai, izmanto  $^{15}N$  un  $^{13}C$  bagātinātus paraugus. Tādējādi, izmantojot sarežģītākas impulsu secību programmas, iespējams pētīt līdz pat  $\sim 35$  kDa lielus proteīnus [179]. Lielākām biomolekulām paātrinās relaksācija, kas palielina līniju pusplatumus un neļauj detektēt proteīna signālus. Relaksāciju iespējams palēnināt iezīmējot paraugu ar deitēriju [180]. Izmantojot jaunākās izotopu iezīmes shēmas (piemēram, selektīvo metilgrupu iezīmēšanu [181, 182]) iespējams pētīt arī lielākas sistēmas [183]. Rezultātā, kombinējot selektīvas proteīna iezīmēšanas shēmas un avancētākas impulsu sekvenču, tādas kā TROSY (*transverse relaxation optimized spectroscopy*) iespējams pacelt izmēru limitu līdz pat 100 kDa strukturālās informācijas iegūšanai un virs 500 kDa mijiedarbības, dinamikas un kompleksu veidošanās pētījumiem [184]. Turklāt mūsdienās

<sup>4</sup> Pieņemtie 2D KMR spektru saīsinājumi un to atšifrējumi apkopoti 3. pielikumā.

strauji attīstās cietvielu proteīnu KMR, kas ļauj detektēt veselas vīrusa kapsīdas [185] un amiloīdu fibrillas [186].

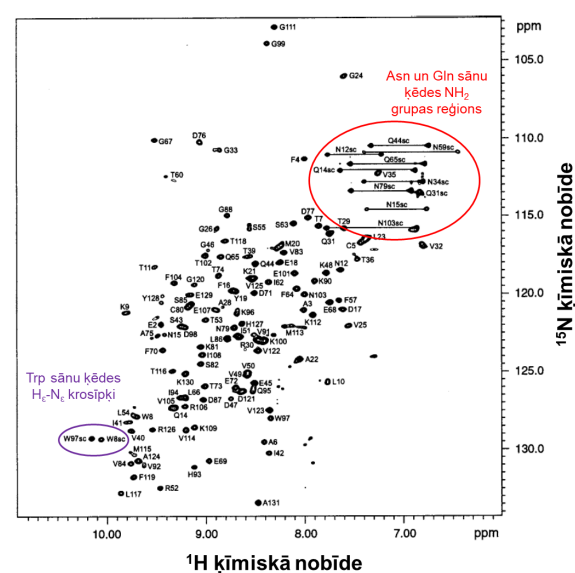
Neraugoties uz ievērojamu signālu pārklāšanos un relaksācijas problēmām, proteīnu 1D  $^1\text{H}$  spektri joprojām dod ievērojami daudz informācijas. Viens no efektīvākajiem veidiem 1D  $^1\text{H}$  proteīnu spektru izmantošanai ir proteīna salocīšanas (*folding*) pārbaude. Kā redzams 1.32. attēlā, proteīnam zaudējot trešējo struktūru (*unfolding*), spektrā novēro atsevišķu signālu pazušānu ķīmisko nobīžu reģionos:  $-2 - 0$ ,  $5 - 6$  un  $9 - 11$  ppm.



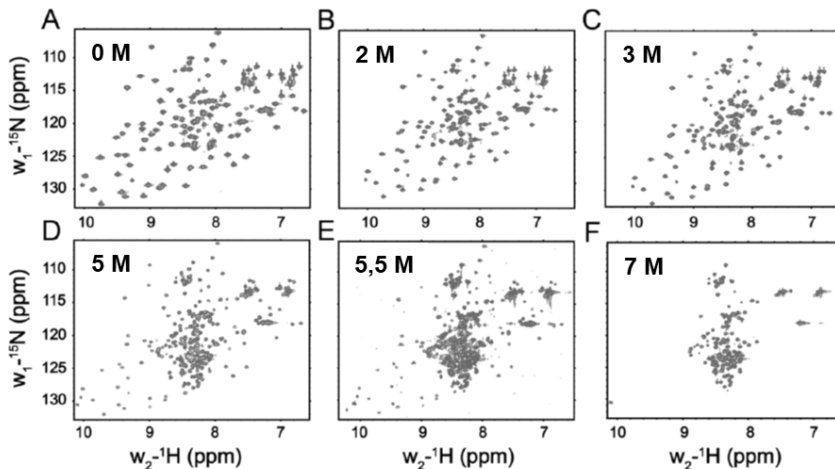
1.32. att. 1D  $^1\text{H}$  spektri salocītam un nesalocītam proteīnam (vistas olbaltuma lizocīms) ar norādītiem dažāda tipa aminoskābju atlikumu protonu signālu reģioniem proteīnā.

#### 1.5.3.1. 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC kā proteīna “pirkstu nospieduma” spektrs

Parasti, jebkura proteīna analīzi, kas vismaz  $^{15}\text{N}$ -iezīmēts, sāk ar 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra uzņemšanu. Šis spektrs ir unikāls katram proteīnam [to bieži uzskata par proteīna “pirkstu nospiedumu” (“*fingerprint*”)], un ļoti jutīgs pret jebkurām izmaiņām paraugā, piemēram, pH vai temperatūras izmaiņas, proteīna-liganda kompleksu veidošanos, u.c.. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (1.33. att. [187]) spektrā katram aminoskābes atlikumam, izņemot Asn, Gln, Trp un Arg, novēro tikai vienu amīda grupas protona krosipīķi ar atbilstošu amīda grupas slāpekli. Savukārt Asn, Gln, Trp un Arg spektrā novēro papildus krosipīķus  $\text{NH}_2$  grupai (Asn un Gln) un  $\text{H}_\epsilon$ - $\text{N}_\epsilon$  grupai (Trp un Arg). Prolīna gadījumā krosipīķus spektrā nenovēro, jo tām nav  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  pāra. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC eksperimentu var izmantot parauga bufera kompozīcijas optimizācijai pirms ilgstošo 3D spektru uzņemšanas. Šis spektrs sniedz informāciju par proteīna parauga kvalitāti, proti, par tā tīrību, par to, vai proteīns ir salocījies (*folded*) vai nesalocījies (*unfolded*), kā arī parauga oligomerizācijas pakāpi (monomērs, dimērs, utt.). Nesalocītam (*unfolded*) proteīnam 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrā krosipīķu izkliedi nenovēro un visi signāli ir sagrupēti nelielā reģionā  $8,0 - 8,5$  ppm robežās. 1.34. attēlā parādīts pakāpenisks proteīna denaturācijas process, ko izraisa urīnvielas pievienošana [188]. Veidojoties proteīna multimēram, spektrā parādās jauni krosipīķi no kontaktvirsmas. Tomēr, pieaugot kompleksa  $\text{MW} > 30-35$  kDa, proteīna relaksācija paātrinās, un tas ievērojami samazina izšķiršanu un apgrūtina signālu detektēšanu.



1.33. att. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrs cilvēku B-FABP pie pH 7,0 un  $T = 298$  K (uzņemts uz spektrometra ar  $^1\text{H}$  detektēšanas frekvenci 600,13 MHz) ar norādītu uz sekvences balstīto pamat- (*backbone*) un sānu ķēdes (*side chain, sc*) amīda grupu attiecinājumu [187].  
Copyright © 2002, Kluwer Academic Publishers.



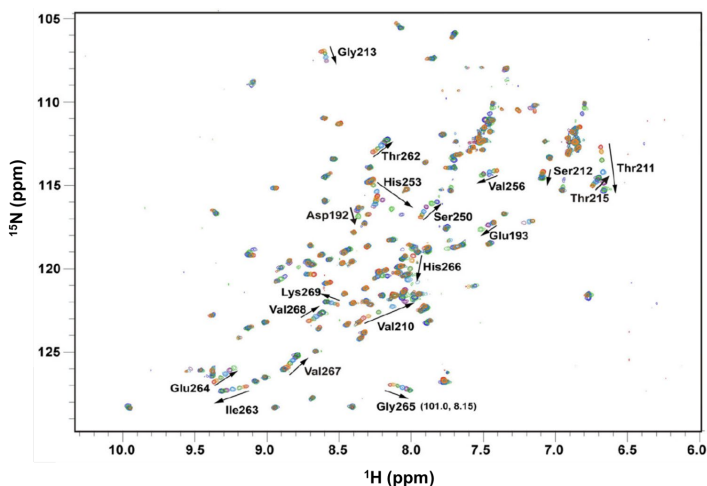
1.34. att. Dok1 proteīna (*UniProt* ID Q99704) fosfotirozīna saistības domēna 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektri, mainoties urīnvielas koncentrācijai [188].

A. salocītā (*folded*) proteīna spektrs pirms urīnvielas pievienošanas (0 M); B. proteīna spektrs 2 M urīnvielā, novēro minimālas strukturālās izmaiņas; C. proteīna spektrs 3 M urīnvielā, spektrā parādās jaunie krosipiķi, kas norāda uz denaturācijas procesa sākumu; D. proteīna spektrs 5 M urīnvielā un E. proteīna spektrs 5,5 M urīnvielā redzams ievērojams salocītā (*folded*) proteīna signālu intensitāšu kritums; tai pat laikā parādās nesalocītā proteīna signāli. F. pilnībā denaturētā proteīna spektrs 7 M urīnvielā.

Proteīni ir dinamiski veidojumi, kas mijiedarbojas ar apkārtējo vidi, šķīdinātāju (ūdens molekulām). Proteīnu amīdu protonu apmaiņas ātrumi ar apkārtējo ūdeni sniedz informāciju par ūdeņraža saišu stabilitāti, pamatķēdes dinamiku, kustīgiem reģioniem, konformacionālām izmaiņām, šķīdinātājam pieejamo virsmas laukumu (*Solvent Accessible Surface Area, SASA*), utt. [189–191].

Amīdu protonu apmaiņa ar šķīdinātāja protoniem ir skābes- vai bāzes katalizēta ar apmaiņas ātrumu sekunžu-minūšu laika skalā. Variējot parauga pH, spektrā novēro dažu  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  amīda grupu ķīmisko nobīžu izmaiņas, bet daļa krospiķu paliek inerta pret pH izmaiņām, norādot uz cieši saistītiem vai no šķīdinātāja paslēptiem protoniem (1.35. att.) [192]. Proteīnos, amīdu protonu apmaiņa ir vislētākā skābā vidē (modeļsavienojumos: ja pH 3, apmaiņa > 1 h), un tā paātrinās pieaugot pH (ja pH 10, apmaiņa < 1 ms) [192–194].

Šķīdinot proteīnu  $\text{D}_2\text{O}$ , amīdu protonu signāli pazūd ( $\text{H}/\text{D}$  izotopu apmaiņas konstante,  $k_{ex}$ ,  $\sim 10^{-7} - 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  [191]). Savukārt, ja amīdu protoni piedalās ūdeņraža saišu veidošanā salocītā (*folded*) proteīnā, tie ir pasargāti no apmaiņas ar šķīdinātāju vai deitēriju tāpēc apmainās daudz lētāk. Tomēr ne visi protoni ir vienādi pasargāti no šādas apmaiņas. Terminālās grupās, aminoskābju atlikumos no *SASA* vai arī no kustīgiem cilpu reģioniem amīdu protoni apmainās ātrāk nekā amīdu protoni no ciešiem otrējās struktūras elementiem proteīna kodolā [195].



1.35. att. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru superpozīcija T-šūnu iekššūnu antigēna-1 RNS atpazīšanas motīvam 3 pH robežās 5 – 8 [192].

Spektrā atsevišķi norādītas aminoskābes, kuru krospiķi pH ietekmē mainās visvairāk. pH 5,0 – sarkanā; pH 5,5 – oranžā; pH 6,0 – tumši zaļā; pH 6,5 – gaiši zilā; pH 7,0 – violetā; pH 7,5 – gaiši zaļā; pH 8,0 – tumši zilā krāsā.

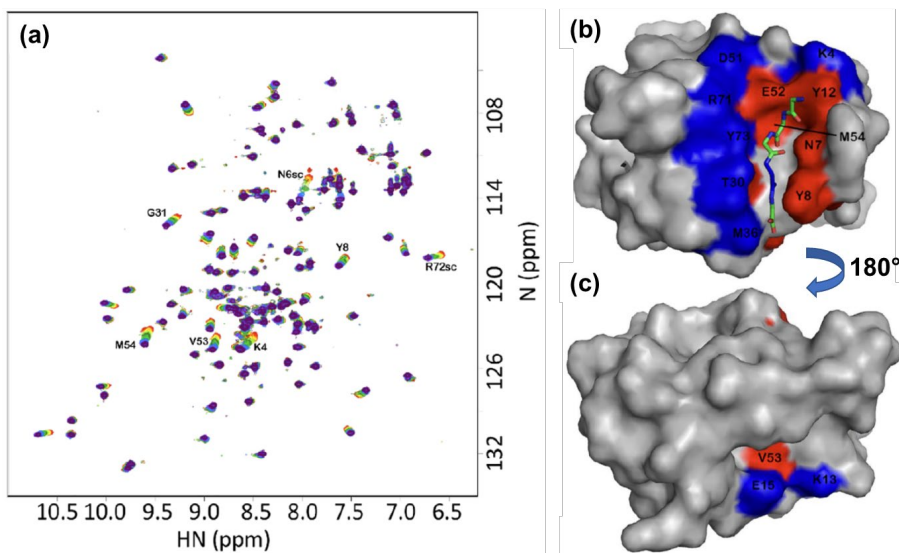
#### 1.5.3.2. Ķīmisko nobīžu perturbācija liganda saistības raksturošana

Ķīmisko nobīžu perturbācija (*Chemical Shift Perturbation, CSP*) ir ļoti vienkārša eksperimentālā metode saistības pie proteīna pētīšanai. Standarta eksperimentam nepieciešams vienīgi  $^{15}\text{N}$  iezīmēts proteīna paraugs un neiezīmēts ligands (maza molekula vai arī cita makromolekula: peptīds, DNS, RNS u.c.). Proteīnu titrē ar ligandu un uzņem 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC

spektru pēc katras liganda porcijas pievienošanas. Modernā spektrometrā tas aizņems 15–30 min (atkarībā no proteīna koncentrācijas) [196]. Ķīmiskās nobīdes izmaiņas ir ļoti jutīgas uz strukturālām izmaiņām proteīnā un izmērāmas ar augstu precizitāti. Rezultātā, jebkura īsta saistība izraisīs *CSP*. Datu analīze arī ir relatīvi vienkārša un ietver sevī ķīmiskās nobīdes noteikšanu katram aminoskābes atlikumam katrā titrēšanas stadijā. Krospiķi, kas nobīdījušies visvairāk, parasti norāda uz liganda saistīšanas vietu, proti, proteīna aktīvo centru (1.36. att.). Metode lietojama bez proteīna ķīmisko nobīžu attiecināšanas, piemēram, ligandu skrīningam, tomēr proteīniem ar attiecinātajām ķīmiskām nobīdēm šī metode ir daudz informatīvākā un veido pamatu struktūras-aktivitātes likumsakarību izveidei [197].

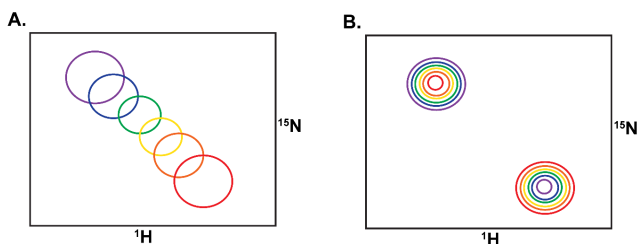
Ligandam *L* saistoties pie proteīna *P* atgriezeniski vienā saistības vietā,  $P + L \leftrightarrow PL$ , saistības process var norisināties ātru vai lēnu apmaiņas ātrumu (*exchange rate*) attiecībā pret KMR laika skalu. Pirmajā gadījumā, veicot titrēšanu, spektrā novēro vienmērīgu plūstošo signāla migrāciju no vienas pozīcijas uz otru (1.37. att., A). Toties, otrā gadījumā, proteīna signāls pakāpeniski pazūd vienā vietā un parādās otrā (1.37. att., B) [198].

Novērojamās ķīmisko nobīžu izmaiņas aprēķina izmantojot vienādojumu (1.9). Ņemot vērā to, ka protonu un slāpekļa ķīmisko nobīžu skalas nav samērojamas, formulā ievieš t.s. mērogošanas koeficientu,  $\alpha$ , kura vērtība var būt robežās no 0,10 līdz 0,45, un kas atkarīgs no sistēmas konformacionālo izmaiņu lieluma [198, 199].



1.36. att. *CSP* titrējot lizostafīna SH3b domēnu (93 aminoskābju atlikumi) ar YG<sub>5</sub> (heksapeptīds) ligandu [199].

A. 2D <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC spektru superpozīcija SH3b proteīnam pievienojot YG<sub>5</sub> ligandu secīgas titrēšanas 13 soļos. Krospiķu krāsa mainīta no sarkanās uz violetu un tā reprezentē ligandu pievienošanu. Spektrā apzīmēti aminoskābju atlikumi ar vislielākām *CSP* izmaiņām. B. un C. SH3b proteīna 3D struktūras virsma kompleksā ar YG<sub>5</sub>, nokrāsota atbilstoši ķīmiskās nobīdes izmaiņām: negatīvās izmaiņas (*upfield*) – zilā krāsā; pozitīvās izmaiņas (*downfield*) – sarkanā krāsā.



1.37. att. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  krospeķa formas atkarība no apmaiņas ātruma.

**A.** Ātra apmaiņa: krospeķis pārvietojas plūstoši no brīvās (apo-proteīns, violetā krāsā) uz saistīto (sarkanā krāsā) formu. **B.** Lēna apmaiņa: brīvās (apo) formas krospeķa (violetā krāsā) intensitāte pakāpeniski samazinās, bet saistītās formas (sarkanā krāsā) intensitāte – pieaug.

$$\Delta\delta = \sqrt{\frac{1}{2}[\delta_H^2 + (\alpha \cdot \delta_N)^2]}, \quad (1.9)$$

kur  $\Delta\delta$  – CSP;

$\delta_H$  – protonu ķīmiskās nobīdes, ppm;

$\delta_N$  – slāpekļa ķīmiskās nobīdes, ppm;

$\alpha$  – mērogošanas koeficients (0,10–0,45).

### 1.5.3.3. 3D spektri proteīnu ķīmisko nobīžu attiecināšanai

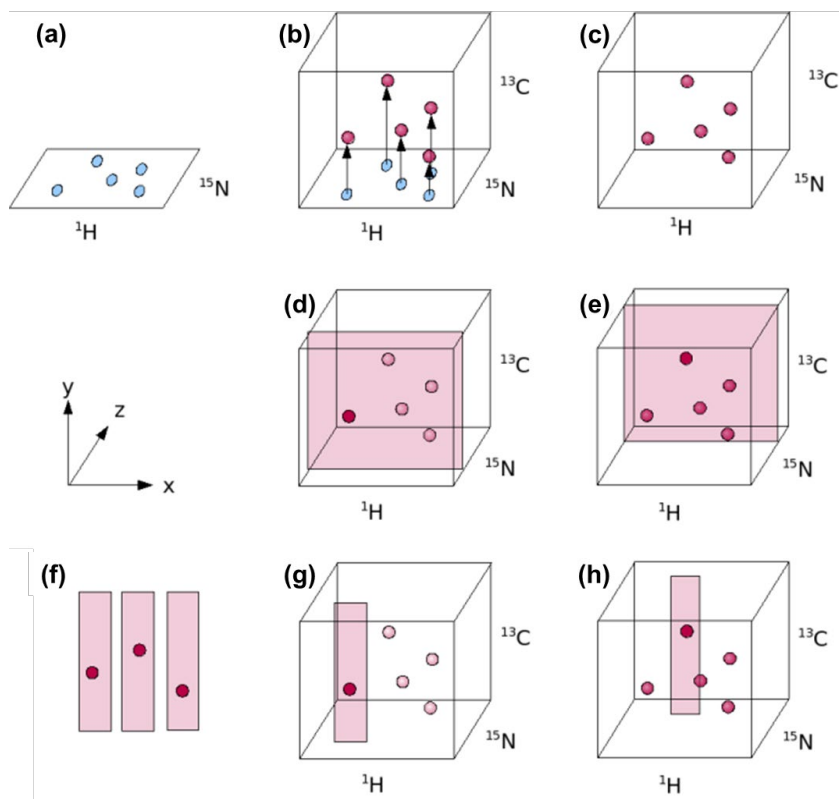
3D spektri parasti tiek dizainēti uz 2D spektru bāzes. Līdz ar to 3D spektru viegli iedomāties kā parastu 2D spektru, kas attīstās trešajā dimensijā. Proteīnu KMR visbiežāk izmanto  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  un  $^{13}\text{C}$  signālu ķīmisko nobīžu dimensijas. Piemēram, 3D HNCQ spektra pamatā ir 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrs, kas tālāk attīstās trešajā dimensijā, tas ir  $^{13}\text{C}$  nobīžu dimensija. Rezultātā  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  krospeķi vairs neatrodas vienā plaknē, bet sadalās atsevišķās plaknēs trešajā dimensijā, kas atbilst  $^{13}\text{C}$  karbonilgrupas nobīdei no iepriekšējā (*i*-1) aminoskābes atlikuma (1.38. att., A–E). Šāda pieeja ļauj samazināt signālu pārklāšanos un attiecināt atsevišķus krospeķus. Atsevišķi apskatot katru  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  plakni, visticamāk katrā *z*-plaknē ( $^{15}\text{N}$  rezonanses signāli) būs tikai viens signāls (1.38. att., G–H). Rezultātā nav vērts atspoguļot visu *xy*-plakni, bet gan atveidot to kā strīpu (*stride*) apkārt redzamajam  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  krospeķim un salīdzināšanai salikt vairākas strīpas vienu blakus otrai (1.38. att., F).

Liela proteīna struktūras noteikšana sākas ar pamatķēdes attiecināšanu. Pieņemot, ka proteīna paraugs ir  $^{15}\text{N}$  un  $^{13}\text{C}$  dubultiezmēts, tiek uzņemts spektru komplekts, kas nepieciešams aminoskābju atlikumu ķēdes atpazīšanai: 3D HNCQ, 3D HNCA un 3D HN(CO)CA. Papildus var uzņemt arī 3D CBCA(CO)NH un 3D  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC (1.4. tab.). Visos minētos spektros sākumā ierosina vienu kodolu ( $^1\text{H}_\text{N}$ ), pēc tam pārnes magnetizāciju atbilstoši izvēlētai impulsu secībai, ļauj tai attīstīties cita kodola dimensijā, un pēc tam pārnes to atpakaļ uz pirmo kodolu detektēšanai.

3D HNCA spektrā katrā strīpā novēro divus krospeķus,  $C\alpha_i^5$  un  $C\alpha_{i-1}$ , kur pirmais atbilst esošās aminoskābes atlikumam, bet otrais – iepriekšējam. Parasti,  $C\alpha_{i-1}$  ir mazāk intensīvs nekā

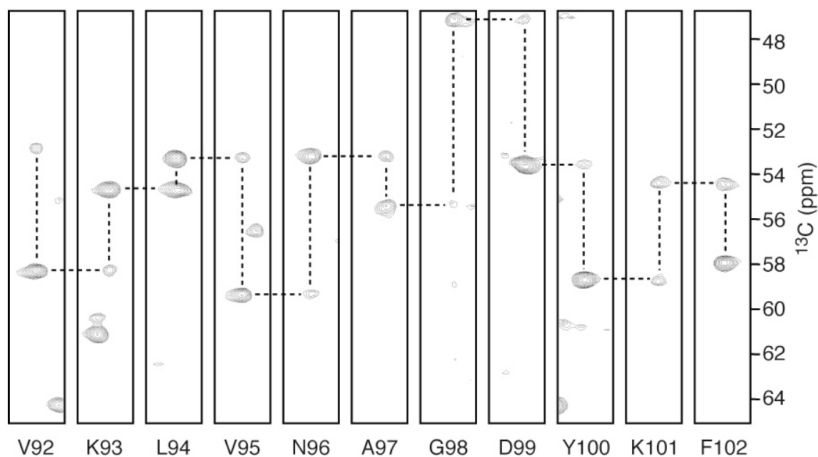
<sup>5</sup> Rekomendējamie aminoskābju atlikumu atomu nosaukumi ir apkopoti 4. pielikumā [290].

$Ca_i$ . Sarežģītākos gadījumos 3D CBCA(CO)NH spektrs var palīdzēt atšķirt  $Ca_{i-1}$  ķīmiskās nobīdes. Izveidotās strīpas saliek vienu blakus otrai un atrod korelācijas starp iepriekšējo un nākamo aminoskābju atlikumiem (1.39. att.). Līdzīgi izmanto 3D HNCO un 3D HN(CO)CA spektru kombināciju. Šeit pirmā spektrā redz tikai krosipīkus no  $C'_{i-1}$ , bet otrā – gan no  $C'_i$ , gan no  $C'_{i-1}$ . Teoretiski, strīpu izveidei varētu izmantot tikai 3D HN(CO)CA, taču parasti tas ir mazāk intensīvs un  $C'_{i-1}$  rezonanses tajā nedetektē. Toties 3D HNCO spektrs dod visintensīvākos krosipīkus, ko izmanto arī  $C'_{i-1}$  noteikšanai. Izmantojot šīs divas savā starpā nesaistītās strīpu virknes var viennozīmīgi attiecināt proteīna pamatķēdi, jo reti kad signālu pārklāšanās vai krosipīku pazušana notiek vienlaicīgi gan  $Ca_i/Ca_{i-1}$ , gan  $C'_i/C'_{i-1}$  pāros. Papildus, 3D CBCA(CO)NH spektrs sniedz informāciju par  $C\beta_{i-1}$  ķīmiskajām nobīdēm. Salīdzinot iegūtās ķīmiskās nobīdes ar datu bāzē [200, 201] esošajām, iespējams aminoskābes atlikumu identificēt. Attiecinot pēc kārtas 3–5 aminoskābes atlikumus, tos visticamāk varēs savietot ar proteīna aminoskābju sekvenci (primāro struktūru) un noteikt aminoskābju atlikuma secīgo numuru  $i$ .



1.38. att. 3D spektra atspoguļošanas veidi [202].

**A.** 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrs; **B.** 2D HSQC spektra attīstīšanās trešajā dimensijā, kur katram  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  krosipīkam (gaiši zilā krāsā) atbilst jauns krosipīks ar  $^{13}\text{C}$  (rozā krāsā); **C.** 3D spektra izveide ar šķautnēm  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  un  $^{13}\text{C}$ ; **D. – E.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  plaknes (gaiši rozā krāsā) pie noteiktās  $^{15}\text{N}$  rezonanses ar plaknei piederošiem krosipīkiem (tumši rozā krāsā); **F.** 3D spektrs atspoguļots kā strīpas (*strides*); **G. – H.** Strīpu atveidojums 3D spektrā.



1.39. att. 3D HNCA strīpas  $\{^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}\}$ -dubultiezīmētam sulfītu reductāzes flavodoksīnam līdzīga domēna (SiR-FP18) proteīnam 92–102 aminokābju atlikumu reģionā [203].

$\text{C}\alpha_i$  parādās kā intensīvi, bet  $\text{C}\alpha_{i-1}$  kā mazāk intensīvi krospīki. Pārtrauktā līnija savieno atbilstošo esošo aminokābju atlikumu  $\text{C}\alpha_i$  ar iepriekšējo aminokābju atlikumu  $\text{C}\alpha_{i-1}$  veidojot VKLVNAGDYKF fragmentu.

1.4. tabula

Proteīnu struktūras attiecināšanai izmantojamie 2D un 3D KMR spektri [202]

Dimensijas	Saīsinājums	Magnetizācijas pārnese mehānisms	Magnetizācijas pārnese shēma <sup>a</sup>	Spektrā detektējamie signāli
2D	$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC	no ūdeņraža atoma, kas saistīts ar $^{15}\text{N}$ kodolu caur saistības konstanti; pēc ķīmiskās nobīdes evolūcijas uz slāpekļa, magnetizācija pārnesta atpakaļ uz protonu, $^1\text{H}_\text{N}$		$^1\text{H}_\text{N}-^{15}\text{N}$ krospīki
3D	HNCO	no amīdgrupas protona uz amīdgrupas slāpekli un tālāk selektīvi uz iepriekšējā (i-1) aminokābes atlikuma karbonilgrupas $^{13}\text{C}$ ; pēc tam magnetizācija pārnesta atpakaļ uz protonu, $^1\text{H}_\text{N}$		$\text{C}'_{i-1}$
3D	HNCA	no amīdgrupas protona uz amīdgrupas slāpekli un tālāk uz $\text{C}\alpha$ atomiem esošā (i) un iepriekšējā (i-1) aminokābes atlikumā; pēc tam magnetizācija pārnesta atpakaļ uz protonu, $^1\text{H}_\text{N}$		$\text{C}\alpha_i$ un $\text{C}\alpha_{i-1}$



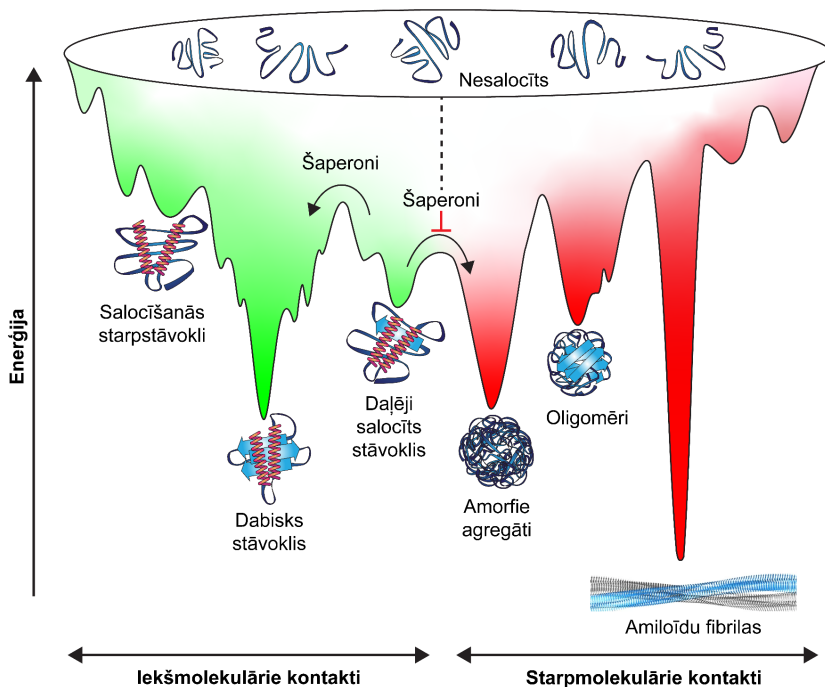
## Proteīnu struktūras attiecināšanai izmantojamie 2D un 3D KMR spektri [202]

Dimensijas	Saīsinājums	Magnetizācijas pārnese mehānisms	Magnetizācijas pārnese shēma <sup>a</sup>	Spektrā detektējamie signāli
3D	HN(CA)CO	no amīdgrupas protona uz amīdgrupas slāpekli un selektīvi uz $^{13}\text{C}_\alpha$ ; tālāk magnetizācija pārnesta no $^{13}\text{C}_\alpha$ un $^{13}\text{C}'$ esošajā (i) un iepriekšējā (i-1) aminoskābes atlikumā; pēc tam magnetizācija pārnesta atpakaļ uz protonu, $^1\text{H}_\text{N}$		$\text{C}'_i$ un $\text{C}'_{i-1}$
3D	HN(CO)CA	no amīdgrupas protona uz amīdgrupas slāpekli un selektīvi uz iepriekšējā (i-1) aminoskābes atlikuma $^{13}\text{C}'$ ; pēc tam magnetizācija pārnesta atpakaļ uz protonu, $^1\text{H}_\text{N}$		$\text{C}_\alpha_{i-1}$
3D	CBCA(CO)NH vai HN(CO)CACB	no $^1\text{H}_\alpha$ un $^1\text{H}_\beta$ uz $^{13}\text{C}_\alpha$ un $^{13}\text{C}_\beta$ , pēc tam no $^{13}\text{C}_\beta$ uz iepriekšējā (i-1) aminoskābes atlikuma $^{13}\text{C}_\alpha$ ; nobeigumā magnetizācija pārnesta atpakaļ uz protonu, $^1\text{H}_\text{N}$		$\text{C}_\alpha_{i-1}$ un $\text{C}_\beta_{i-1}$
3D	$^{15}\text{N}$ -TOCSY- HSQC	līdzīgi kā klasiskajā TOCSY spektrā esošajam (i) un iepriekšējam (i-1) aminoskābes atlikumam; pēc tam magnetizācija pārnesta atpakaļ uz protonu, $^1\text{H}_\text{N}$		$^1\text{H}_\text{N}$ , $^1\text{H}_{\alpha_3}$ , $^1\text{H}_\beta$ , $^1\text{H}_\gamma$ , $^1\text{H}_\delta$ , $^1\text{H}_\epsilon$
3D	$^{15}\text{N}$ -NOESY- HSQC	līdzīgi kā klasiskajā NOESY spektrā esošajam (i) un iepriekšējam (i-1) aminoskābes atlikumam; pēc tam magnetizācija pārnesta atpakaļ uz protonu, $^1\text{H}_\text{N}$		$^1\text{H}_\text{N}$ , $^1\text{H}_{\alpha_3}$ , $^1\text{H}_\beta$ , $^1\text{H}_\gamma$ , $^1\text{H}_\delta$ , $^1\text{H}_\epsilon$
3D	$^{13}\text{C}$ -NOESY- HSQC	līdzīgi kā klasiskajā NOESY spektrā esošajam (i) un iepriekšējam (i-1) aminoskābes atlikumam; pēc tam magnetizācija pārnesta atpakaļ uz protonu, $^1\text{H}$		$^1\text{H}_\text{N}$ , $^1\text{H}_{\alpha_3}$ , $^1\text{H}_\beta$ , $^1\text{H}_\gamma$ , $^1\text{H}_\delta$ , $^1\text{H}_\epsilon$

<sup>a</sup>Rozā iekrāsoti eksperimentā detektējamie atomi; gaiši zili attēloti atomi, caur kuriem tiek pārnesta magnetizācija (eksperimentā tos nedetektē); melnās bultīņas rāda magnetizācijas plūsmu.

## 1.6. Proteīnu 3D struktūras paredzēšana, izmantojot mākslīgo intelektu

Proteīnu 3D struktūras noteikšana ir viens no fundamentāliem izaicinājumiem strukturālajā bioloģijā. Katrs proteīns pēc translācijas no mRNS eksistē kā nesalocīta (*unfolded*) polipeptīdu, kas ieņem nejaušu konformāciju (*random coil*). Šajā posmā proteīnam nav stabilas 3D struktūras. Turpinoties polipeptīdu virknes sintēzei ribosomā, proteīna lineārā aminoskābju atlikumu ķēde ātri un reproducējamā procesā salokās dabiskā 3D struktūrā. Ņemot vērā ļoti lielo iespējamo konformāciju skaitu, ko var ieņemt polipeptīda virkne, salocīšanās/savērpšanās procesi ir ļoti sarežģīti un heterogēni, kā arī balstās uz vairākām vājām nekovalentām mijiedarbībām. Turklāt, polipeptīdu ķēdes salocīšanās un nepolāro aminoskābju atlikumu virkņu iekļaušanā proteīna iekšpusē izšķirošu lomu spēlē hidrofobie spēki. Uzskata, ka polipeptīdu ķēdes it kā “pārvietojas” pa potenciālās enerģijas virsmu piltuves formā, virzoties lejup uz dabiskas struktūras stāvokli (1.40. att.). Šis process norisinās nevis pa vienu konkrētu ceļu, bet pa vairākiem nesaistītiem ceļiem [204–206].

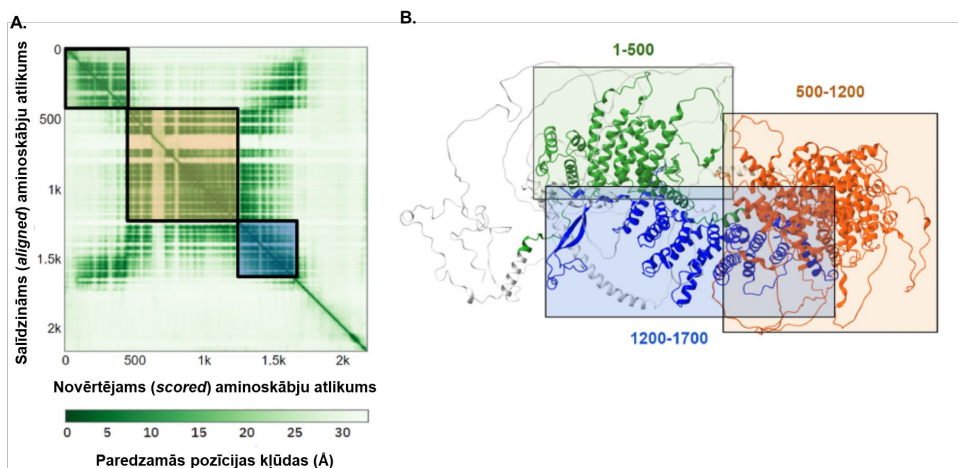


1.40. att. Proteīnu savērpšanās/salocīšanās un agregācijas konkurējošie procesi [204, 206].

Proteīni savērpjas secīgi mainot vairākas enerģētiski atšķirīgas konformācijas, kas veido savērpšanās enerģijas virsmu. Enerģētiski izdevīgas iekšmolekulārās mijiedarbības stabilizētas (zaļais reģions) proteīnam “virzoties” lejup dabiskā stāvokļa virzienā. Enerģētiski izdevīgas, bet nedabiskas konformācijas izraisa kinētiski iesprostotus stāvokļus, kas aizņem zemās enerģijas ielejas (daļēji vai nepareizi salocīti stāvokļi). Šaperoni palīdz šādām molekulām pārvarēt enerģētiskās barjeras un novērš starpmolekulārās mijiedarbības (sarkanais reģions). Tas novērš proteīnu agregāciju (amorfie agregāti,  $\beta$ -lapu oligomēri, amiloīdu fibrilas, u.c.), šādi veicinot proteīna salocīšanos dabiskā formā.

Nenoliedzami, proteīniem ir svarīga loma vairumā bioloģisko procesu, tādu kā katalīze, citu molekulu transports, mehāniskās funkcijas, imūnās reakcijas, nervu impulsu pārvešana, u.c. Proteīnu struktūras nosaka to spēju mijiedarboties ar citām molekulām, kā rezultātā nosakot to funkcijas un darbības mehānismu. Neskatoties uz milzīgo eksperimentālo darbu [207–210], struktūra noteikta tikai aptuveni 100 000 unikālo proteīnu [210], kas sastāda nelielu daļu no miljarda zināmo proteīnu sekvenču [211, 212]. Rezultātā veidojas pieprasījums pēc precīzām aprēķinu metodēm, kas varētu paredzēt proteīnu 3D struktūru zinot tikai aminoskābju sekvenču [213, 214]. Neskatoties uz jaunākajiem sasniegumiem [215–219], esošās metodes nespēj paredzēt precīzu atomāro struktūru, it īpaši gadījumos, kad nav zināmas proteīna homologa struktūra.

Viena no jaunākajām metodēm proteīnu atomārās struktūras paredzēšanā, *AlphaFold*, balstīta uz mākslīgā intelekta (*artificial intelligence*, AI) izmantošanu. Pateicoties jaunai sarežģītai mašīnmācīšanās (*machine learning*) pieejai, kas ietver fizikālās un bioloģiskās zināšanas par proteīnu struktūru kombinācijā ar vairāku sekvenču salīdzinājumu uz neironu tīklu arhitektūras bāzes tiek izstrādāts dziļās mācīšanās (*deep learning*) algoritms, kas ar augstu precizitāti spēj paredzēt proteīnu 3D struktūras [220, 221]. Uz šodien *AlphaFold* datu bāzē apkopots ap 200 miljonu aprēķināto proteīnu struktūru. Katrai aprēķinātai struktūrai pieejamas koordinātes un katra aminoskābju atlikuma novietojuma struktūrā ticamība novērtēta skalā no 0 līdz 100, kur 100 atbilst visticamākajam novietojumam (*predicted per-residue score*, pLDDT) [222]. Novērtējumu vizualizē grafiski (1.41. att., A), kur tumši zaļie reģioni atbilst visticamākajiem reģioniem, bet baltie – vismazāk ticamajiem, kļūdainiem, reģioniem. Aplūkotojā piemērā, 243 kDa lielam proteīnam (2177 aminoskābju atlikumi), ar augstu precizitāti izdevās modelēt divus no trim domēniem (1.41. att., B).

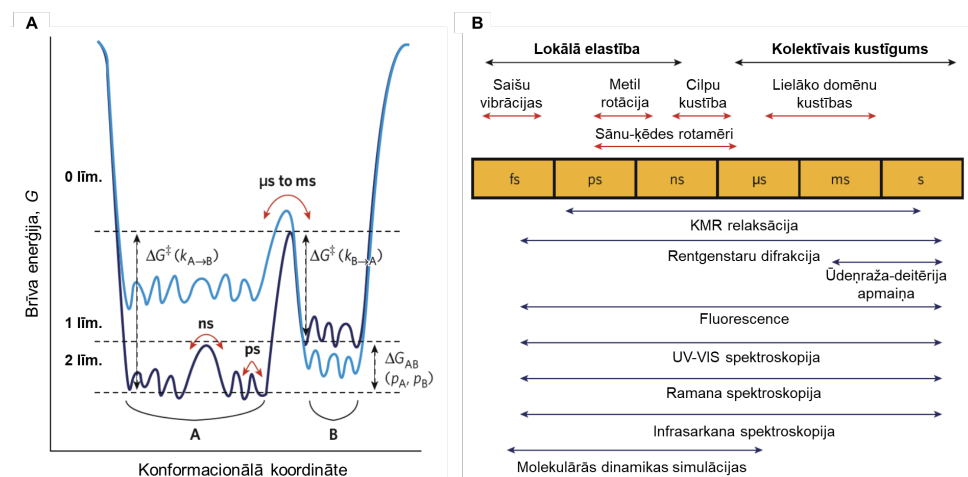


1.41. att. Aprēķinātās proteīna struktūras paredzamo pozīciju kļūdu vizualizācija [221].

A. *AlphaFold* datu bāzē katram proteīna modelim izveidota interaktīvā 2D karte, kas parāda atsevišķu fragmentu (aminoskābju atlikumu pāris, domēnu pāris, u.c.) novietojuma ticamību. B. Piemērā (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q93074>) *AlphaFold* sniedz ticamu novietojumu aminoskābju atlikumiem 1–500 (zaļš taisnstūris) un 1200–1700 (zils taisnstūris), un mazticamu novietojumu 500–1200 reģionam (oranžais taisnstūris), kā arī C-termināliem aminoskābju atlikumiem.

## 1.7. Proteīnu dinamika

Mūsdienās proteīnus vairs neuztver kā atsevišķas stingras un statiskas vienības, bet uzsver, ka tās ir dinamiskas molekulas ar iekšējo kustību (*internal motions*) un konformāciju ansambļiem. Šādas kustības un konformacionālā dinamika būtiski ietekmē proteīnu funkcijas. Rezultātā pilnīgākai proteīna struktūras-aktivitātes likumsakarību izpētei nepieciešamas papildus zināšanas par proteīnu dinamiku un to saistību ar bioloģiskām sistēmām. Proteīni parasti nedarbojas atsevišķi, bet gan fizikālā vai funkcionālā sadarbībā ar citiem proteīniem, arī veidojot makromolekulārus kompleksus. Proteīnu dinamiku nosaka ne tikai fluktuāciju laika skala (kinētiskā komponente), bet arī fluktuāciju amplitūda un virziens (strukturālā komponente). Rezultātā, proteīna kustības enerģijas virsma kļūst sarežģīta un daudzdimensionāla (1.42. att.). Lēna dinamika (0. līmenis) apraksta fluktuācijas starp kinētiski atšķirīgiem stāvokļiem, kurus atdala enerģijas barjera ( $\Delta G^\ddagger$ ) un kas atbilst  $\mu\text{s}$  laika skalai. Šeit pāreja starp stāvokļiem ir reta, pateicoties zelai iespējamībai ieņemt atbilstošo pārejas konformāciju. Līdz ar to eksperimentāli (KMR, kristalogrāfijas, krio-elektronu mikroskopijas, mazā leņķa rentgenstaru difrakcijas metodes) iespējams “noķert” atsevišķus stāvokļus. Tieši šajā laika skalā notiek daudzi bioloģiskie procesi (t. sk. enzīmu katalīze, signālu pārnese, proteīnu-proteīnu mijiedarbības) [223–225].



1.42. att. Brīvās enerģijas virsma, kas parāda proteīna kustības amplitūdu un laika skalu [225].

Copyright © 2016, American Chemical Society.

**A.** 1D šķērsgriezums daudzdimensionālai enerģijas virsmai, kas atspoguļo proteīna dinamikas hierarhiju un enerģijas barjeras. Katrs līmenis klasificēts pēc Ansati *et al.* [226]. Stāvokļi definē kā enerģijas minimumu virsmā, bet pārejas stāvokļi – kā maksimumu starp ielejām. Populācijas 0. līmenī stāvokļiem A un B ( $p_A$  un  $p_B$ ) nosaka pēc Bolcmaņa sadalījuma pamatojoties uz to enerģijas starpību ( $\Delta G_{AB}$ ). Barjera ( $\Delta G^\ddagger$ ) starp diviem stāvokļiem nosaka savstarpējās konversijas ātrumu ( $k$ ). Līmeņi 1 un 2 attēlo ātrākas fluktuācijas starp vairākām cieši saistītām konformācijām katram atsevišķam stāvoklim 0. līmeņa ietvaros. Izmaiņa sistēmā (piemēram, liganda saistība, proteīna mutācija, ārējo apstākļu izmaiņas, u.c.) izraisa izmaiņu enerģijas virsmā (no tumši zilās uz gaiši zilu vai otrādi). **B.** Proteīnu kustību dinamikas laika skala kopā ar eksperimentālām metodēm, kas spēj noteikt fluktuācijas katrā no šīm laika skalām.

Atsevišķā 0. līmeņa stāvokļa ietvaros, proteīns nav statisks, bet fluktuē ap vidējo struktūru ātrākā laikā skalā, veidojot strukturāli līdzīgu konformāciju ansambli (1.42. att., A, līmeņi 1–2). Šeit fluktuācijas ir lokalizētas, ar mazu amplitūdu, un notiek ps – ns laika skalā. 1. līmenī notiek mazo atomu grupu kolektīvās fluktuācijas ns laika skalā (piemēram, cilpu kustība). Savukārt, 2. līmenī novēro lokālās atomu fluktuācijas ps laika skalā (piemēram, sānu-ķēdes rotācija). Aptuvenu informāciju 1.–2. līmeņu stāvokļiem iespējams noteikt no rentgenstaru difrakcijas datiem, B faktoriem (temperatūras faktoriem jeb *Debye-Waller* faktoriem), kas raksturo atomu kustīgumu kristālā. Diemžēl, B faktoros ietekmē gan statistiskie, gan dinamiskie traucējumi, kā arī kristālkontakti, kas neļauj viennozīmīgi interpretēt tos kā atomu fluktuācijas amplitūdu [223, 224].

MD simulācijas papildina eksperimentālos datus, modelējot konformacionālās pārejas atomārā līmenī ns–μs laika skalā [227, 228]. Izmantojot MD, iespējams novērot visu atomu novietojumu ar fs telpisko izšķiršanu biomolekulāriem procesiem tādiem kā, piemēram, konformacionālās izmaiņas, proteīna-liganda un proteīna-proteīna/peptīda mijiedarbības [229, 230]. MD simulācijas mehānisms darbojas kā “skaitļošanas mikroskops” un spēj identificēt mijiedarbības atomārā līmenī starp visām sistēmas sastāvdaļām [231, 232]. MD pēta makromolekulas koordinātu un sistēmas stāvokļa evolūciju laika gaitā [233–236]. Šo evolūciju sauc par trajektoriju un tā iegūstama atrisinot Ņūtona kustības vienādojumu (1.10.) (1.10.) [237].

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = -\nabla_i U \quad (1.10.)$$

kur  $\vec{F}_i$  – spēks, kas darbojas uz *i*-to daļiņu;

$m_i$  – *i*-tās daļiņas masa;

$\vec{a}_i$  – *i*-tās daļiņas paātrinājums;

$\nabla_i U$  – *i*-tās daļiņas potenciālās enerģijas gradients [237].

MD ietvaros spēka lauks (*force field*) ir matemātisko formulu un asociēto parametru kombinācija, ko izmanto, lai makromolekulas enerģiju aprakstītu kā tās atomu koordinātu funkciju. Visos populārākajos spēku laukos (piemēram, CHARMM<sup>6</sup>, Amber, GROMOS, OPLS-AA) esošās mijiedarbības sadala divās grupās: kovalentās (*bonded*) un nekovalentās (*non-bonded*), kuru potenciālās enerģijas aprēķina pēc vienādojumiem (1.11.) un (1.12.). Vienādojums (1.12.) apvieno Lennarda-Džonsa 6-12 potenciālu (VdW mijiedarbības enerģijas) ar Kulona potenciālu (elektrostatiskās mijiedarbības enerģijas). Rezultātā iegūst spēku vektoru, kas iedarbojas uz katru atomu [238].

MD simulācijas algoritms ir sekojošs:

1) Sākotnējās struktūras sagatavošana:

- a. eksperimentālās struktūras nepilnību labošana (ūdeņraža atomu pievienošana; trūkstošo/nedetektēto cilpu, aminoskābju atlikumu modelēšana, u.c.);
- b. proteīna vai proteīna-liganda parametrizācija izvēlētā spēku laukā;

<sup>6</sup> CHARMM – Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics

- c. solvatācijas kuba izveide;
  - d. sistēmas lādiņu līdzsvarošana.
- 2) Struktūras minimizācija;
  - 3) Sākotnējo ātrumu (*initial velocities*) piešķiršana;
  - 4) Sistēmas temperatūras līdzsvarošana (*NVT*<sup>7</sup> ansamblis);
  - 5) Sistēmas spiediena līdzsvarošana (*NPT*<sup>8</sup> ansamblis);
  - 6) MD simulācija [237, 239].

$$E_{bonded} = \sum_s k_s (b - b_0)^2 + \sum_l k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dih} k_\chi [1 + \cos(n\chi - \sigma)] \quad (1.11.)$$

kur  $E_{bonded}$  – iekšmolekulāro, kovalento enerģiju summa;

$\sum_s, \sum_l, \sum_{dih}$  – atbilstoši saišu, leņķu un divplakņu kakta leņķu enerģiju summas, kas ir vai nu harmoniskais potenciāls, vai arī vienkārša trigonometriskā funkcija;

$k_s, k_\theta, k_\chi$  – atbilstošās saišu, leņķu un divplakņu kakta leņķu spēka konstantes (stīvums);

$b$  – attālums starp atomiem (saites garums);

$b_0$  – saites līdzsvara garums;

$\theta$  – leņķis starp trim kovalenti saistītiem atomiem;

$\theta_0$  – leņķis līdzsvara ģeometrijā;

$\chi$  – dihedrālais leņķis starp četriem kovalenti saistītiem atomiem;

$n$  – simetrijas konstante;

$\sigma$  – fāze [238].

$$E_{non-bonded} = \sum_{nb \text{ pāris } ij} \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \cdot \left( \frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (1.12.)$$

kur  $E_{non-bonded}$  – nekovalento (*non-bonded*) enerģiju summa;

$\sum_{nb}$  – nekovalento (*non-bonded*) enerģiju summa;

$i, j$  – divi blakusesošie nesaistītie atomi;

$q_i q_j$  – nesaistīto atomu lādiņi;

$\epsilon_{ij}$  – prefaktors, kas atkarīgs no  $i, j$  atomu tipa;

$r_{ij}$  – starpatpomu attālums;

$R_{min,ij}$  – attālums starp  $i, j$  ar minimālo enerģiju (arī atkarīgs no  $i, j$  atomu tipa) [238].

<sup>7</sup> *NVT* – kanoniskais ansamblis, kurā atomu skaits,  $N$ , tilpums,  $V$ , un temperatūra,  $T$ , ir konstanti.

<sup>8</sup> *NPT* – izobāri-izotermiskais ansamblis, kurā atomu skaits,  $N$ , spiediens,  $P$ , un temperatūra,  $T$ , ir konstanti.

## 2. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒŠANA

### 2.1. TMLD mimētiķu izveide uz BBOX bāzes

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

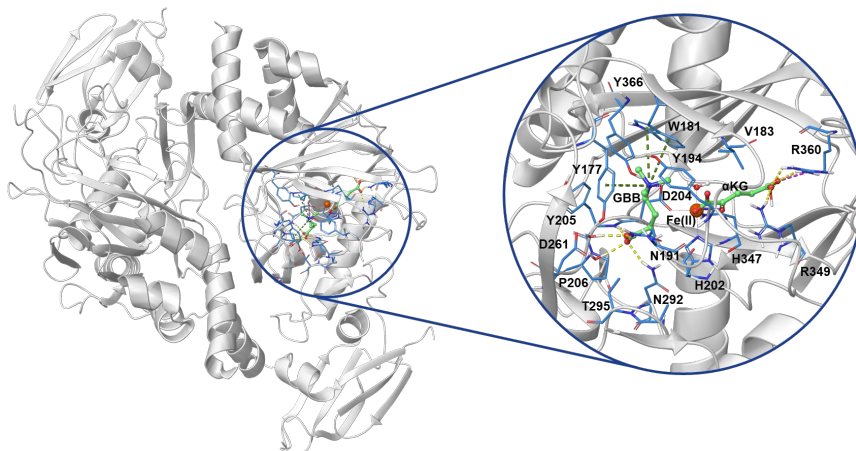
Līdz šim visi mēģinājumi iegūt TMLD eksperimentālo telpisko struktūru ar kristalizācijas palīdzību bijuši neveiksmīgi. Pēdējie strukturālie pētījumi ar 19 TMLD mutantiem [70] pierādīja augstu katalītisko domēnu līdzību ar BBOX, ko atspoguļo arī proteīnu primāro sekvenču salīdzinājums (2.1. att.). Taču iegūtie dati nespēj pilnībā raksturot enzīma aktīvo centru un definēt ģeometriskos ierobežojumus, kas būtiski ietekmē struktūras-aktivitātes likumsakarību un jaunu inhibitoru dizainu izveidi. Savukārt, homologisko modeļu izmantošana ir ierobežota dēļ zemās BBOX/TMLD sekvenču identitātes – 26 % un arī katalītisko domēnu (dubultpavediena  $\beta$ -spirāles motīvs, *DSBH*) identitātes – 56 %. Analizējot BBOX aktīvo centru (2.2. att.), tika noteiktas 18 aminoskābes, kas ir tiešā kontaktā ar GBB/ $\alpha$ KG un nodrošina kofaktoru un substrāta atpazīšanu un saistību. Tabulās 2.1. un 2.2. tās sagrupētas pēc attāluma no substrāta (GBB) vai kofaktora ( $\alpha$ KG) un salīdzinātas ar tām atbilstošām TMLD aminoskābēm, kam būtu jāpilda līdzīgas funkcijas. Kā redzams, reģions ap Fe(II)/ $\alpha$ KG saistīšanas vietu saglabājas par 89 %, kamēr substrātu saistīšanas vieta saglabājas tikai par 64 %. Šie dati liecina, ka novērojamās aminoskābju atšķirības enzīma aktīvajā centrā nodrošina TML  $\alpha$ -aminogrupas atpazīšanu.

Literatūrā [42, 50] aprakstīts, ka BBOX ir divi metālcetri: Fe(II) un Zn(II), no kuriem pirmais ir katalītisks un nodrošina substrāta konversiju, bet otrs – strukturāls un nodrošina BBOX dimēra veidošanos. Fe(II) iesaistīts tetragonālā bipiramīdā ar H202, D204, H347,  $\alpha$ KG un vienu ūdens molekulu (2.3. att.), veidojot sešas koordinācijas saites. Reakcijas mehānisms paredz, ka tuvojoties substrātam, ūdens molekula atsaistās un tās vietā pie Fe(II) piesaistās molekulārais skābeklis [24, 240, 241]. Savukārt, Zn(II) iesaistīts t.s. “cinka pirksta” (*zinc finger*) motīvā (2.4. att.) un veido četras koordinācijas saites ar C38, C40, C43 un H82 – ZnCCCH motīvs.

TMLD gadījumā viennozīmīgi var konstatēt Fe(II) centra eksistenci, kur tas veido tetragonālo bipiramīdu ar H242, D244, H389,  $\alpha$ KG un vienu ūdens molekulu [59, 70–72]. Savukārt, Zn(II) saturošā domēna klātesamība nav pierādīta. Tomēr, ņemot vērā ievērojamo TMLD un BBOX līdzību, var paredzēt, ka ZnCCCH motīvs tiek saglabāts. Pašreizējos homologiskos modeļos, kas apskatīti autores maģistra darbā [63], var atrast tikai trīs kandidātus: C80, C85 un H124, bet ceturta aminoskābe, kas varētu būt gan cisteīns, gan histidīns, nav zināma. Visos modeļos tās vietā ielikts atrodas S83, kas nespēj koordinēties ar Zn(II). Šādi modelēšanas dati ir sagaidāmi, jo pie minētās BBOX/TMLD sekvenču līdzības ar homologisko modelēšanu ticami var ģenerēt tikai katalītisko *DSBH* domēnu, bet ne pilna garuma TMLD struktūru. Rezultātā, tika meklētas citas iespējas kā ticamāk atveidot TMLD aktīvo centru un racionalizēt enzīma-ligandu afinitātes.







2.2. att. BBOX dimēra (PDB ID 3O2G) aktīvais centrs.

Enzīms atspoguļots kā gaiši pelēkās lentes (*ribbons*). Aktīvā centra aminoskābes atspoguļotas kā gaiši zilas caurulītes (*small tubes*). GBB un  $\alpha$ KG atspoguļotas kā gaiši zaļas lodītes un nūjiņas (*ball and stick*). Fe(II) atspoguļots kā oranža lode. Ūdeņraža saites, katjona- $\pi$  saites un jonu tiltiņi atspoguļoti attiecīgi kā dzeltenas, zaļas un rozā pārtrauktas līnijas.

2.1. tabula

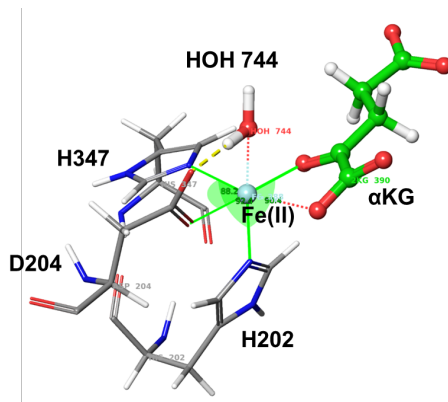
Fe(II)/ $\alpha$ KG kofaktoru pirmās koordinācijas sfēras aminoskābju salīdzinājums starp BBOX un TMLD

BBOX	TMLD	Sakritība
V183	F223	–
A193	A233	+
L199	L239	+
H202	H242	+
D204	D244	+
H347	H389	+
R349	R391	+
R360	R398	+
L362	L400	+
<b>Identitāte:</b>		<b>8/9 (89 %)</b>

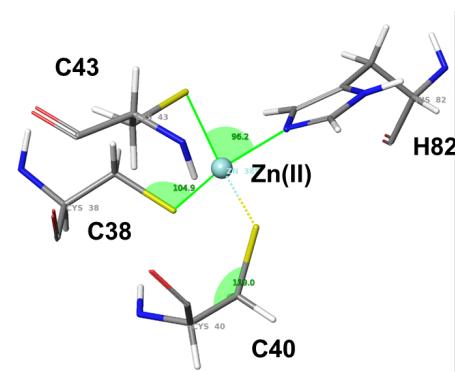
2.2. tabula

GBB pirmās koordinācijas sfēras aminoskābju salīdzinājums starp BBOX un TMLD

BBOX	TMLD	Sakritība
Y177	Y217	+
W181	W221	+
N191	D231	–
A193	A233	+
Y194	Y234	+
D204	D244	+
Y205	T245	–
P206	T246	–
N292	N334	+
T295	D337	–
Y366	Y404	+
<b>Identitāte:</b>		<b>7/11 (64 %)</b>



2.3. att. BBOX enzīma (PDB ID 3O2G) katalītiskā tetragonālā bipiramīdā.



2.4. att. BBOX enzīma (PDB ID 3O2G) strukturālais ZnCCCH motīvs.

Analizējot atvērtās BBOX struktūras konformāciju (PDB ID 4C8R, 1.5. att.), secināts, ka enzīma aktīvais centrs ir pietiekami liels, lai tajā varētu ievietot TML molekulu. Rezultātā, lai izveidotu TMLD mimētiķi, BBOX enzīmā būtu jāveic punktveida mērķa mutācijas, kas nodrošinātu jauna substrāta saistību. Mutāciju izvēle balstījās uz primāro aminoskābju atlikumu sekvenču salīdzinājuma (2.1. att.) un publicētiem datiem par TMLD mutāģenēzi [70]. No izpētītajām TMLD mutācijām pati kritiskākā mutācija saistīta ar D231, jo D231A mutācija pilnībā inaktivēja TMLD, bet D231N samazināja tā aktivitāti aptuveni par 70 % (1.12. att.). D231 aminoskābes atlikumam BBOX struktūrā atbilst N191. Savukārt, balstoties uz GBB pirmās koordinācijas sfēras analīzes datiem izriet, ka iespējamās TML pirmās koordinācijas sfēras atveidošanai būtu jāveic vismaz četras mutācijas N191D, Y205T, P206T un T295D. Ieviešot divas negatīvi lādētas aminoskābes, aktīvais centrs sagaidāmi kļūst negatīvāks. Savukārt, Y205T un P206T mutācijas palielina tā kustīgumu. Blakus esošās αKG pirmajā koordinācijas sfērā būtu jānomutē viens aminoskābes atlikums, V183F, kas, iespējams, kompensē Y205T mutāciju. Visi trīs aminoskābju atlikumi 182–184 reģionā atšķiras BBOX un TMLD enzīmiem, attiecīgi QVQ un YFT. Rezultātā, iespējams veikt vēl divas mutācijas Q182Y un Q184T, no kurām pirmā polāro aminoskābi nomaina ar telpiski lielāku aromātisko

aminoskābi, bet otrā – nomaina lielāko polāro ar mazāku polāro aminoskābi, kas varētu kompensēt šī fragmenta kustīguma samazināšanos. Kopumā aktīvajā centrā iespējams mutēt septiņas aminoskābes, taču dažas mutācijas varētu stipri ietekmēt aktīvā centra konformāciju un var sagraut BBOX *DSBH* domēnu. Savukārt, minimālais mutāciju skaits ir divas, N191D un T295D, kam būtu jāsaista TML  $\alpha$ -aminogrupa. Mutāciju ietekmes uz BBOX konformāciju un substrāta saistību izpētei tika izveidoti sekojošie četri *in silico* BBOX mutanti (nodaļa 3.9.3.):

- 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.

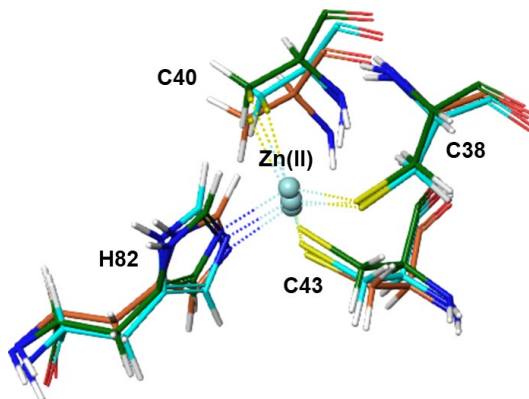
Jaunizveidoto proteīnu stabilitāti pārbaudīja ar MD. MD simulācijas plaši lieto proteīn-liganda kompleksu dinamikas pētījumiem. Tomēr, metālproteīnus joprojām uzskata par sarežģītiem objektiem jebkuriem *in silico* pētījumiem. Galvenā problēma saistīta ar metāla-proteīna un metāla-liganda saišu modelēšanu. Klasiskā molekulārā mehānika nespēj aprakstīt lādiņu sadalījumu, jo tā apskata atomus kā daļiņas, bet saites kā atsperes, neņemot vērā elektronu apvalkus. Rezultātā metālu saturošo proteīnu dinamika prasa ieviest papildus spēka lauka potenciālus (*restraint potential*) ar atbilstošām spēka konstantēm (*force constant, fc*), kas iesaldētu vajadzīgo konfigurāciju ap metāla atomu, izmantojot attālumu, leņķu vai divplakņu kakta leņķu konformacionālās brīvības ierobežošanu ap definēto līdzsvara vērtību.

Veiksmīgai BBOX mutantu MD simulācijai bija nepieciešams izstrādāt un validēt protokolu, kas ļautu saglabāt metālcentru konfigurācijas nemainīgas visā simulācijas garumā. MD aprēķinu metode nehēma (*non-heme*) Fe(II)/ $\alpha$ KG saturošiem proteīniem tika izstrādāta sadarbībā ar prof. Amedeo Caflisch un Carmen Esposito uz Jumonji histonu lizīnu demetilāzes JMJD3 jeb KDM6B bāzes [242] Eiropas Savienības 7. ietvara programmas zinātnes un tehnoloģiju attīstības projekta “InnovaBalt” ietvaros.

Darbā izmantojamā MD protokola izstrāde veikta uz BBOX (PDB ID 3O2G) bāzes. ZnCCCH motīva iesaldēšanas parametri ņemti pēc analogijas [243, 244]. Šeit iesaldētas četras koordinācijas saites un seši leņķi (3.9.3. nodaļa, 3.2. un 3.3. tab.). Atbilstošās spēka konstantes, *fc*, noteiktas eksperimentāli, veicot 10–20 ns ilgas MD simulācijas un novērtējot saišu un leņķu fluktuācijas. Izmaiņas ZnCCCH motīva konformācijā 10 ns un 20 ns garās MD simulācijās atspoguļotas 2.5. attēlā. Kā redzams, leņķi, koordinācijas saites un CB-SG-Zn(II) leņķi mainās minimāli, saglabājot sākotnējo konfigurāciju.

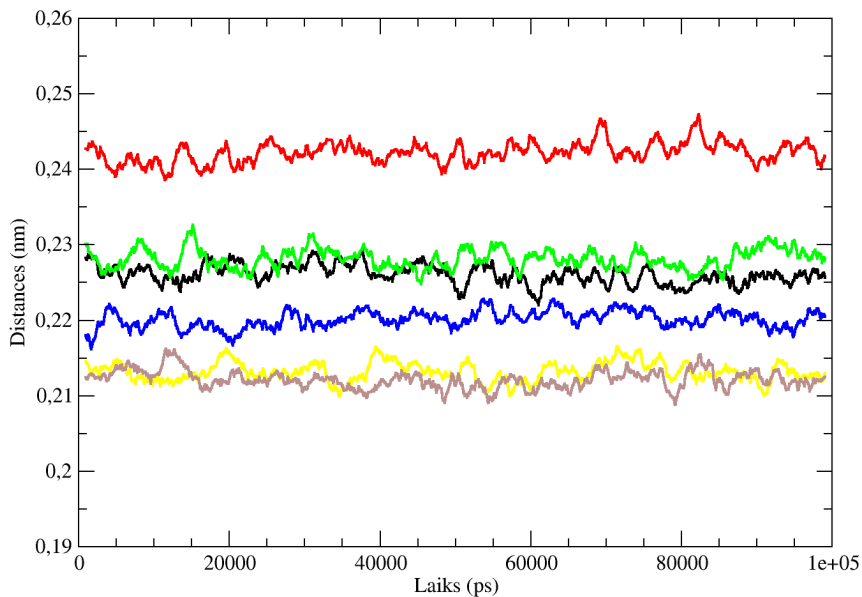
Fe(II) tetragonālās bipiramīdas iesaldēšanai testētas vairākas ierobežojošo potenciālu kombinācijas. Sākumā mēģināts iesaldēt tikai trīs 90° divplakņu kakta leņķus starp Fe(II) un trim aminoskābju atlikumiem un  $\alpha$ KG ketogrupu: (i) H202-Fe(II)-D204; (ii) D204-Fe(II)-H347; un (iii)  $\alpha$ KG(keto)-Fe(II)-H202. Taču MD laikā tetragonālā bipiramīda sāka sabrukt, neiesaldētie leņķi vairs nebija 90°, ūdens molekula pietuvinājās metālam, bet  $\alpha$ KG vairs nesaistījās pie Fe(II) bidentāta veidā. Pēc tam izmēģināja vairākas 3–4 divplakņu kakta leņķu kombinācijas, taču rezultāti visām MD bija nemainīgi un ar tik mazu ierobežojošo potenciālu skaitu nofiksēt Fe(II) tetragonālo bipiramīdu neizdevās. Izņēmumu gadījumos tika novērota arī

Fe(II) jona izspiešana no aktīvā centra. Mēģinot veikt MD simulācijas bez iesaldētās ūdens molekulas, arī novēroja bipiramīdas sabrukšanu.



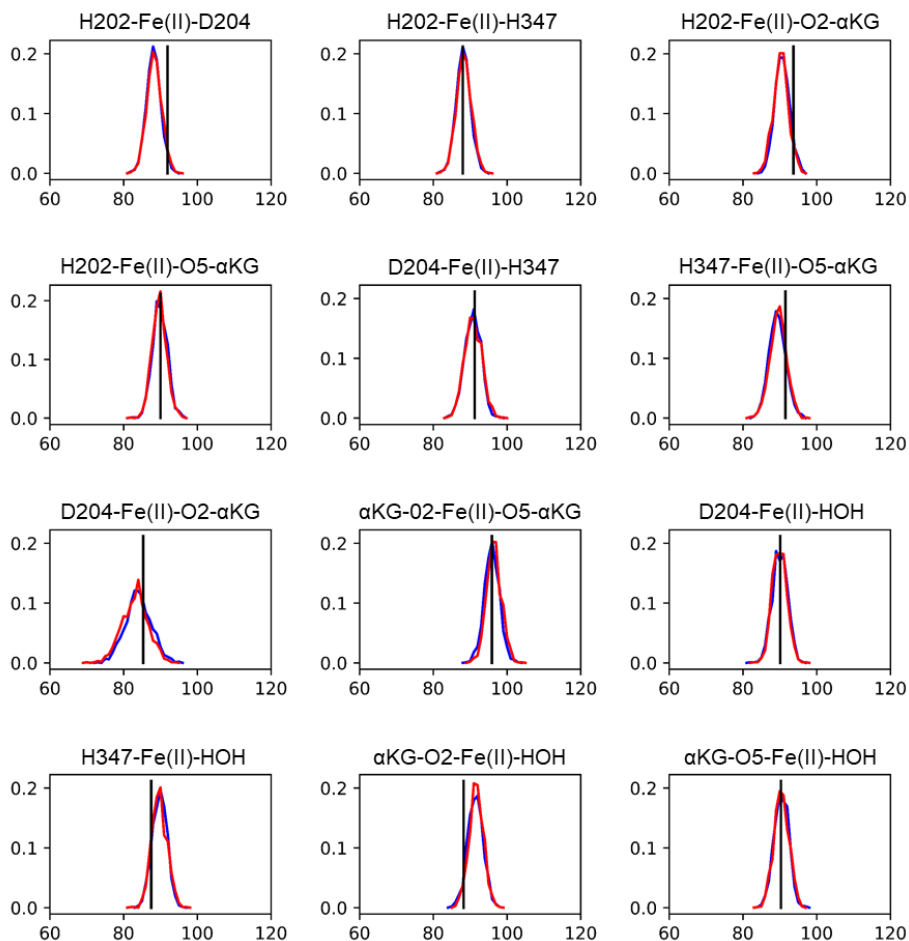
2.5. att. ZnCCCH motīvs ar iesaldētiem leņķiem un koordinācijas saitēm BBOX PDB ID 3O2G MD simulācijas laikā.

Aminoskābju atlikumu oglekļa atomi iekrāsoti atbilstoši MD simulācijas laikam: gaiši zili – struktūra pirms MD, oranži – struktūra pēc 10 ns MD, zaļi – struktūra pēc 20 ns MD. Zn(II) atspoguļo kā gaiši zilu sfēru. Koordinācijas saites ar metālu parādītas kā punktveida līnijas.



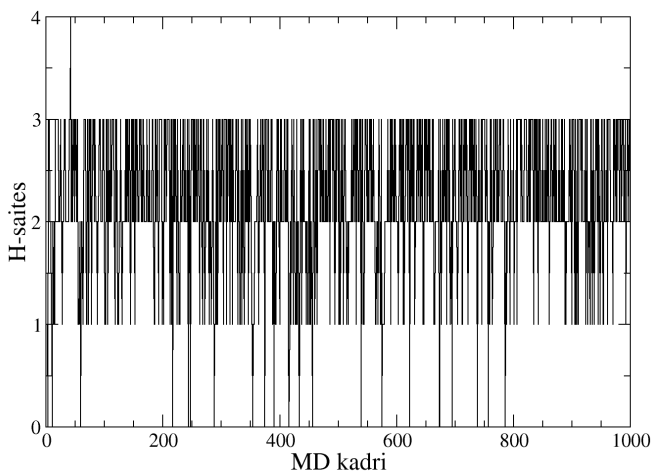
2.6. att. Fe(II) tetragonālās bipiramīdas iesaldēto koordinācijas saišu garuma fluktuācijas BBOX PDB ID 3O2G 100 ns MD simulācijā.

H202: NE2 – Fe(II) – melnā; D204: OD1 – Fe(II) – sarkanā; H347: NE2 – Fe(II) – gaiši zaļā; αKG: O2 – Fe(II) – zilā; αKG: O5 – Fe(II) – dzeltenā; HOH 744: O – Fe(II) – gaiši brūnā krāsā.



2.7. att. Fe(II) tetragonālas bipiramīdas iesaldēto divplakņu kakta leņķu izmaiņu sadalījums BBOX PDB ID 3O2G 100 ns MD simulācijas laikā.

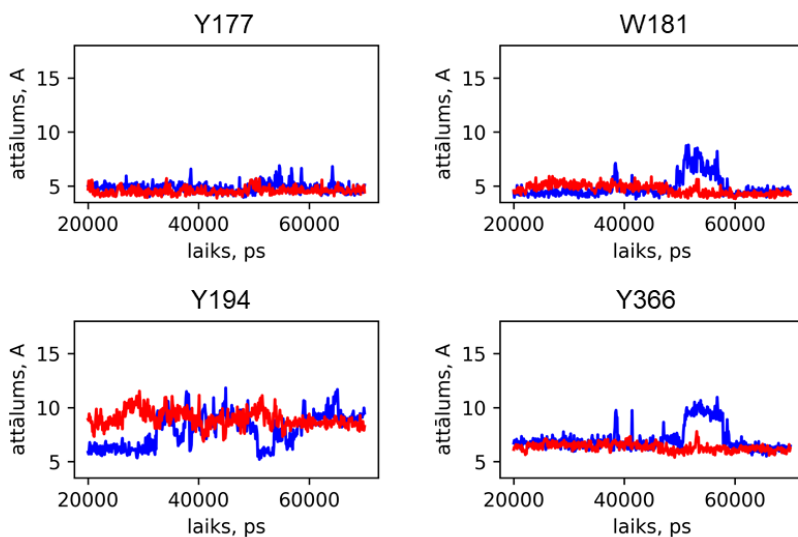
Divplakņu kakta leņķu izmaiņu sadalījums ķēdei A– zilā krāsā un ķēdei B– sarkanā krāsā; references divplakņu kakta leņķa vērtību norāda melnā vertikālā līnija.



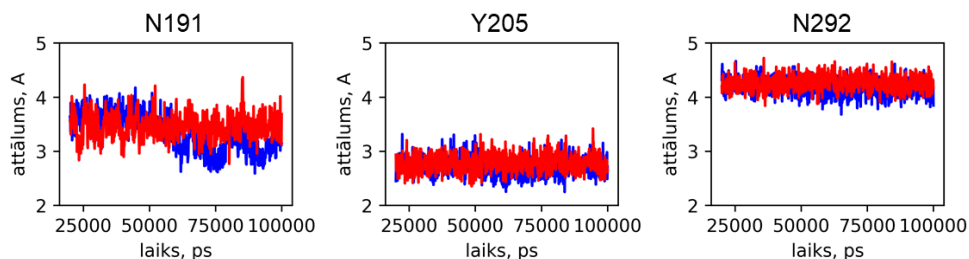
2.8. att. Ūdeņraža saišu starp  $\alpha$ KG un R349 un R360 izmaiņas BBOX PDB ID 3O2G 100 ns MD simulācijas laikā. Viens MD kadrs (*frame*) atbilst 100 ps.

Vislabākos rezultātus izdevās sasniegt iesaldējot visus 12 divplakņu kakta leņķus (2.6. att.), t. sk. arī leņķus ar ūdens molekulu (3.4. tab.). Tā kā Fe(II) kompleksiem nav publicēto parametrizācijas datu, kas atspoguļotu lādiņu sadalījumu, fiksētas arī koordinācijas saites (3.2. att.), bet salīdzinājumā ar ZnCCCH motīvu, kur Zn(II) lādiņš tika samazināts, bet četru aminoskābju lādiņi – palielināti, imitējot elektronu pārnesei (3.9.3. nodaļa), šeit  $f_c$  ir  $\sim 2,6$  reizes lielāks, lai noturētu sistēmu līdzsvarā. Fe(II) tetragonālās bipiramīdas iesaldēto koordinācijas saišu vērtību izmaiņas un divplakņu kakta leņķu izmaiņu sadalījums redzami attiecīgi 2.6. un 2.7. attēlos. Iegūtie dati rāda, ka ar ieviestajiem papildus potenciāliem iespējams veiksmīgi iesaldēt metālc centru konfigurāciju. Ūdeņraža saišu analīze  $\alpha$ KG molekulai parāda, ka ieviestie kustīguma ierobežojumi netraucē ūdeņražu saišu veidošanu ar R349 (1x) un R360 (2x), un tas saglabājas visā MD garumā (2.8. att.).

GBB ar enzīmu netiek saistīts ar papildus spēku potenciāliem, līdz ar ko tas var brīvi kustēties aktīvajā centrā un arī atsaistīties no tā. Līganda novietojuma raksturošanai, izmērītas attālumu izmaiņas MD laikā starp GBB  $\epsilon$ -N<sup>+</sup> atomu un “aromātiskā būra” (*aromatic cage*) aminoskābju atlikumu sānu ķēžu masas centriem, kas raksturo katjona- $\pi$  mijiedarbības (2.9. att.). Interesanti, ka atšķirībā no kristalogrāfiskiem datiem, Y194 un Y366 konkurē savā starpā un izspiež viens otru no kontaktu veidošanās ar GBB. Šie novērojumi korelē ar kristalogrāfiskiem datiem BBOX kompleksam ar meldoniju, kur Y366 piedalījās meldonija  $\gamma$ -NH saistībā (PDB ID 3MS5 [50]). Turklāt, tieši Y194 atrodas  $\beta$ I/ $\beta$ II cilpā (1.4. att.), kas atver un aizver aktīvo centru [53] un kas ir arī nestrukturētā BBOX apo formai (PDB ID 3N6W) [42]. Papildus noteiktas attālumu izmaiņas starp GBB  $\alpha$ -C un N191 un N292 sānu ķēdes NH<sub>2</sub> grupas slāpekli, un Y205 pamatķēdes NH grupas ūdeņraža atomu (2.10. att.), kas korelē ar ūdeņraža saitēm. Iegūtie dati liecina, ka GBB uzturas aktīvajā centrā saglabājot pamatkontaktus ar enzīmu.



2.9. att. Attālumu izmaiņas starp GBB  $\epsilon$ -N atomu un “aromātiskā būra” aminoskābju atlikumu sānu ķēdes masas centriem BBOX PDB ID 3O2G 20–70 ns MD simulācijas laikā. Enzīma ķēde A – zilā krāsā un ķēde B – sarkanā krāsā.



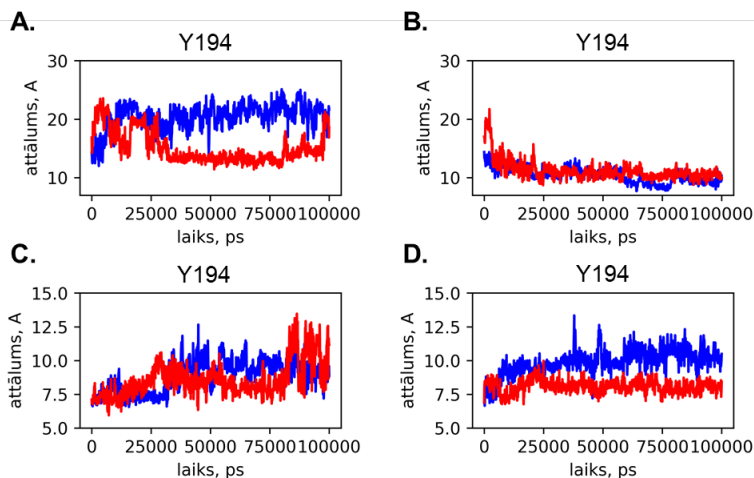
2.10. att. Attālumu izmaiņas starp GBB  $\alpha$ -C un N191 un N292 sānu ķēdes NH<sub>2</sub> grupas slāpekli un Y205 pamatķēdes NH grupas ūdeņraža atomu BBOX PDB ID 3O2G 100 ns MD simulācijas laikā. Enzīma ķēde A – zilā krāsā un ķēde B – sarkanā krāsā.

Atastos parametrus turpmāk izmantoja četrām 100 ns garām kontroles MD simulācijām labākai BBOX-GBB sistēmas dinamikas izpratnei. D261 aminoskābes atlikuma protonēšanās stāvoklis nebija skaidrs, jo enzīma struktūras sagatavošanās laikā dažos gadījumos to uzskatīja par lādētu, bet dažos – par neitrālu jeb protonētu. Savukārt, no eksperimentāliem datiem viennozīmīgi pateikt to, kādā stāvoklī ir D261, nevar. Rezultātā, sagatavoti divi dažādi BBOX PDB ID 3O2G kompleksi ar GBB un  $\alpha$ KG, kas savā starpā atšķiras tikai ar D261 protonēšanās stāvokļiem. Bez tā, veiktas MD simulācijas BBOX atvērtai formai kompleksā ar GBB un  $\alpha$ KG (PDB ID 4C8R) ar nolūku novērtēt  $\beta$ I/ $\beta$ II cilpas (1.4. att.) kustīgumu. Ņemot vērā, ka aktīvais centrs ir atvērts, GBB nespēj veidot kontaktus ar Y194 un B191 un ir pakļauts lielākai šķīdinātāja (*bulk water*) ietekmei. Rezultātā veiktas divas MD simulācijas, no kurām vienā GBB bija iesaldēts aktīvajā centrā, bet otrā – nē.

References MD simulācijas veiktas sekojošiem četriem BBOX kompleksiem:

- 1) BBOX PDB ID 3O2G kompleksā ar GBB (uz kura pamata tika izstrādāts MD protokols);
- 2) (ii) BBOX PDB ID 3O2G kompleksā ar GBB ar protonēto D261 (tālāk tekstā D261prot);
- 3) (iii) BBOX PDB ID 4C8R kompleksā ar GBB un  $\alpha$ KG;
- 4) (iv) BBOX PDB ID 4C8R kompleksā ar GBB un  $\alpha$ KG, iesaldējot GBB.

Kā jau bija sagaidāms, MD simulācijas laikā GBB atsaistījās no atvērtās BBOX struktūras (PDB ID 4C8R) pašā aprēķina sākumā. Turklāt, sākumā ligands atsaistījās no ķēdes A (pēc < 700 ps), un tikai pēc tam no ķēdes B (pēc ~ 20 ns). Bez liganda klātbūtnes, pilno  $\beta$ I/ $\beta$ II cilpas aizvēršanu 100 ns laika skalā nenovēroja. Ķēdē A šī cilpa saglabājās pilnībā atvērtā stāvoklī (2.11. att., A. zilā līkne), bet ķēdē B pēc liganda atsaistīšanās, periodā no ~ 35 līdz ~ 80 ns cilpa bija pusatvērtā stāvoklī (2.11. att., A. sarkanā līkne). Simulācijā ar iesaldēto GBB, abas enzīma ķēdes cilpas uzvedas līdzīgi un uzreiz pēc ~ 20 ns ieņēma aizvērtu konformāciju (2.11. att., B), kas sakrīt ar  $\beta$ I/ $\beta$ II cilpas kustīgumu 3O2G MD simulācijās (2.9. att., C–D). Negaidīti ligandu disociāciju novēroja arī BBOX PDB ID 3O2G simulācijā, kur tas notika vispirms ķēdē B – pēc 70 ns, bet pēc tam ķēdē A – pēc 85 ns. Kā redzams, šajā simulācijā ķēde B uzrādīja lielākas konformacionālās izmaiņas jau pēc 20 ns (2.9. att., C. sarkanā līkne). Savukārt, ķēde A bija stabila līdz pat 40 ns (2.9. att., C. zilā līkne). Līdzīgus procesus novēro arī 3O2G D261prot MD simulācijā, taču tajā cilpas konformacionālās izmaiņas ir mazākas un ligandu disociāciju nenovēro (2.9. att., D). Iegūtie dati apstiprina cilpas  $\beta$ I/ $\beta$ II augsto kustīgumu un svarīgo lomu liganda saistīšanās.

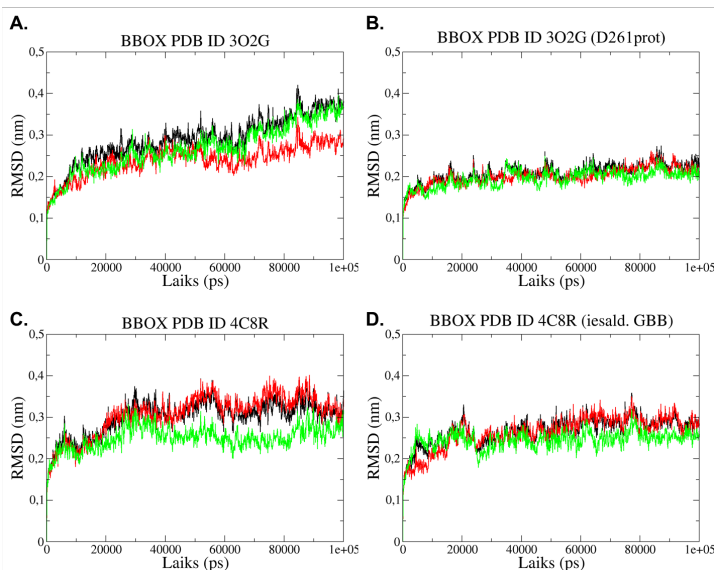


2.11. att. Attālumu izmaiņas starp Y194 sānu ķēdes masas centru un aktīvā centra masas centru BBOX 100 ns MD simulācijas laikā.

A. BBOX PDB ID 4C8R GBB nebija iesaldēts aktīvajā centrā. B. BBOX PDB ID 4C8R GBB iesaldēts aktīvajā centrā. C. BBOX PDB ID 3O2G. D. BBOX PDB ID 3O2G D261prot. Enzīma ķēde A – zilā krāsā un ķēde B – sarkanā krāsā.



Visās četrās MD simulācijās BBOX struktūras izmaiņas raksturoja ar *RMSD* aprēķiniem (2.12. att.). Atsevišķo aminoskābju atlikumu kustīguma novērtēšanai izmantoja vidējās kvadrātiskās fluktuācijas (*Root Mean Square Fluctuation, RMSF*) aprēķinus (2.13. att.). No *RMSD* datiem redzams, ka visos gadījumos pirmajās 20–30 ns notiek vislielākās izmaiņas sistēmā (2–3 Å robežās), sistēma līdzsvarojas. Turpmākās MD simulācijas laikā *RMSD* nepārsniedz 1 Å, kas liecina par sistēmas stabilitāti. *RMSD* vērtības A un C gadījumos (2.12. att.) mainās vairāk, kas liecina par šo kompleksu mazāko stabilitāti. Šajās struktūrās novēroja ligandu disociāciju, kas palielināja aktīvo centru aptverošo cilpu kustīgumu. To labi atspoguļo *RMSF* vērtības  $\beta$ I/ $\beta$ II cilpas reģionam (2.13. att.). Pārējie enzīma reģioni, izņemot *N*-termināla strukturālā domēna  $\alpha$ -spirāli (2.13. att., A), MD laikā paliek mazkustīgi un *RMSF* vērtības ir zemākas par eksperimentāliem B-faktoriem, kas liecina par sistēmas stabilitāti simulācijas laikā.

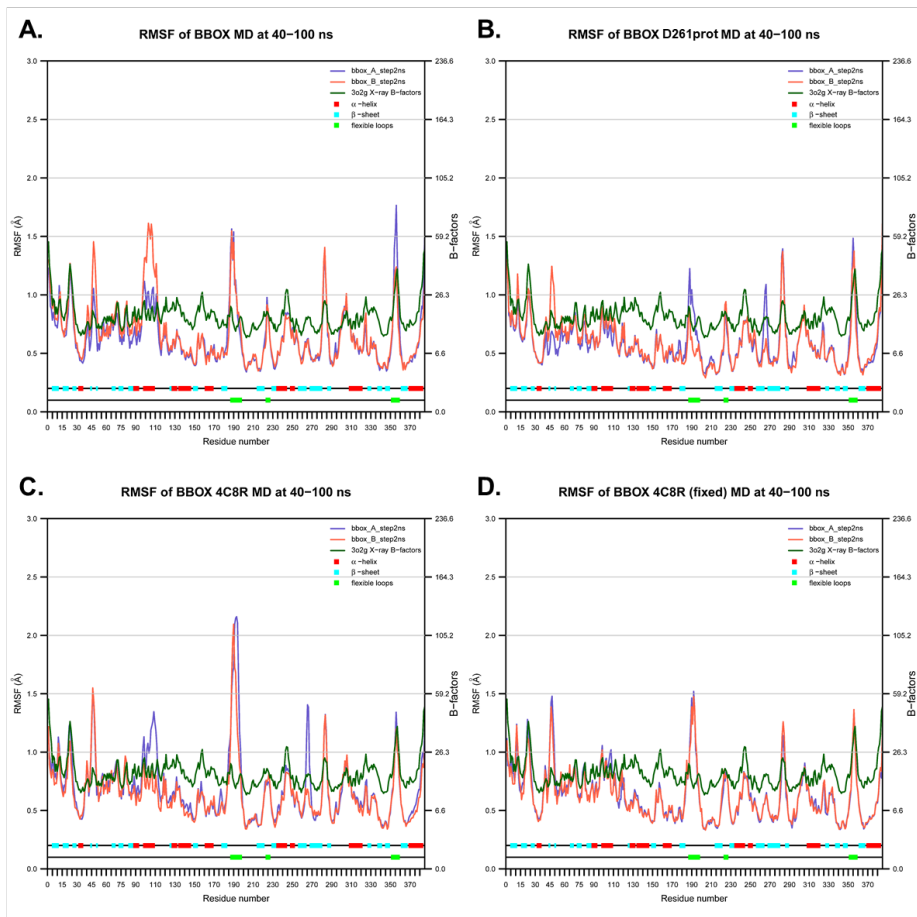


2.12. att. *RMSD* izmaiņas 100 ns MD simulācijas laikā četriem dažādiem BBOX-GBB kompleksiem.

A. BBOX PDB ID 3O2G komplekss ar GBB; B. BBOX PDB ID 3O2G ar protonēto D261prot kompleksā ar GBB; C. BBOX PDB ID 4C8R kompleksā ar GBB; D. BBOX PDB ID 4C8R kompleksā ar GBB, kas iesaldēts aktīvajā centrā. *RMSD* BBOX dimēram – melnā krāsā; *RMSD* ķēdei A – sarkanā krāsā; *RMSD* ķēdei B – gaiši zaļā krāsā.

Papildus pētīta aktīvā centra tilpuma maiņa, ko definēja kā *SASA* izmaiņu (2.14. att., A–D). Salīdzinot 3O2G un 4C8R struktūras, redzams, ka savstarpēji to aktīvo centru *SASA* atšķiras 1,4–2,3 reizes. Savukārt, MD simulācijas laikā, *SASA* mainās minimāli, ja nenotiek liganda disociācija. Gadījumos, kad ligands sāk atsaistīties no BBOX aktīvā centra, notiek  $\beta$ I/ $\beta$ II cilpas atvēršana, rezultātā novēro *SASA* pieaugumu. Ja pēc liganda disociācijas cilpa atkal aizveras, tad *SASA* samazinās. Tālāk novērtēts ūdens molekulu skaits 6 Å attālumā no substrāta (2.15. att., A–D). Kamēr ligands atrodas BBOX aktīvajā centrā, ūdens molekulu skaits ap

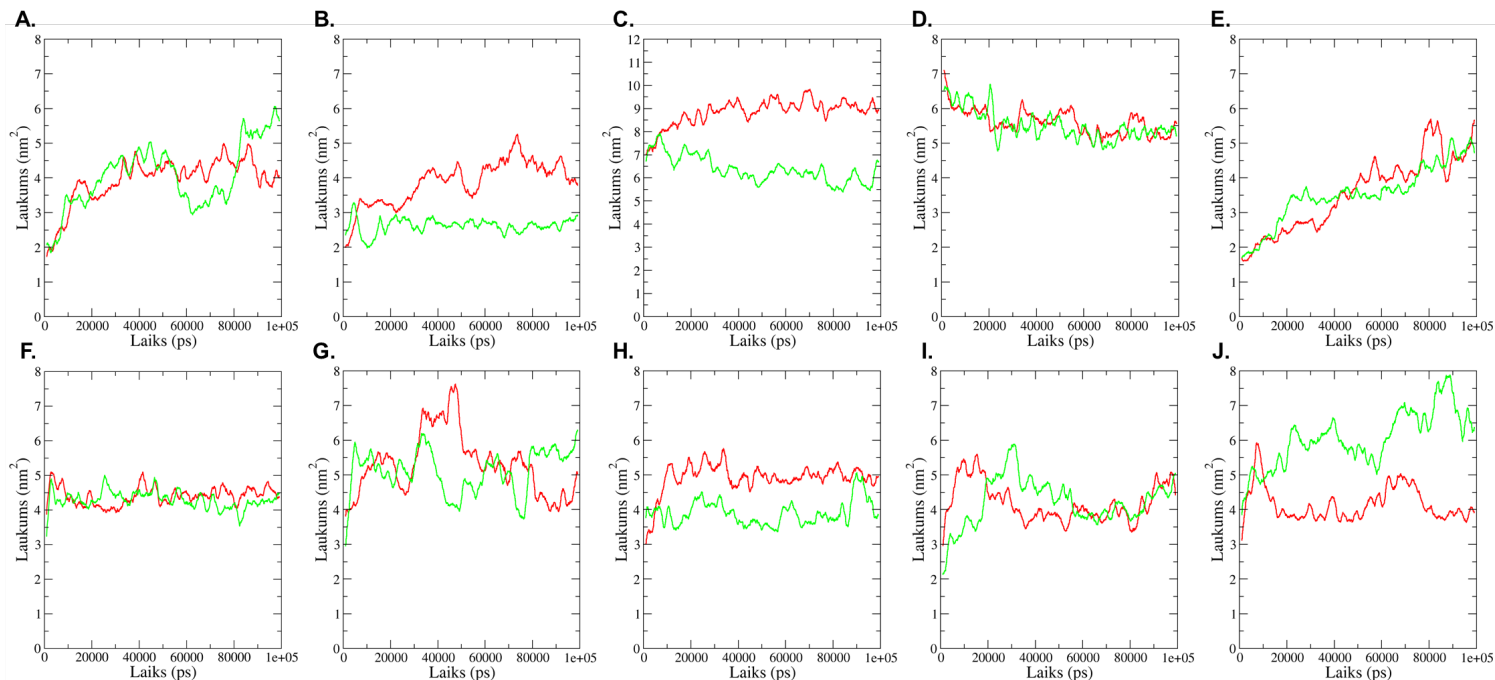
ligandu sakrīt ar ūdens molekulu skaitu aktīvajā centrā. Gadījumos, kad ligands disociē no aktīvā centra, liganda apkārtnē novēro strauju ūdens molekulu skaita pieaugumu (2.15. att., A, C, H un I). Aktīvā centra laukuma izmaiņas apkopotas 2.3. tabulā. Iegūtie dati rāda, ka 3O2G aktīvā centra laukums mainās minimāli, bet 4C8R gadījumā ievērojami samazinās un kļūst līdzīgs 3O2G gan simulācijā ar disociēto, gan arī ar iesaldēto ligandu.



2.13. att. Vidējās<sup>9</sup> *RMSF* izmaiņas katra aminoskābju atlikuma C $\alpha$  atomiem 40–100 ns MD simulācijas laikā četriem dažādiem BBOX-GBB kompleksiem ar norādītajiem kristalogrāfiem B-faktoriem no PDB ID 3O2G.

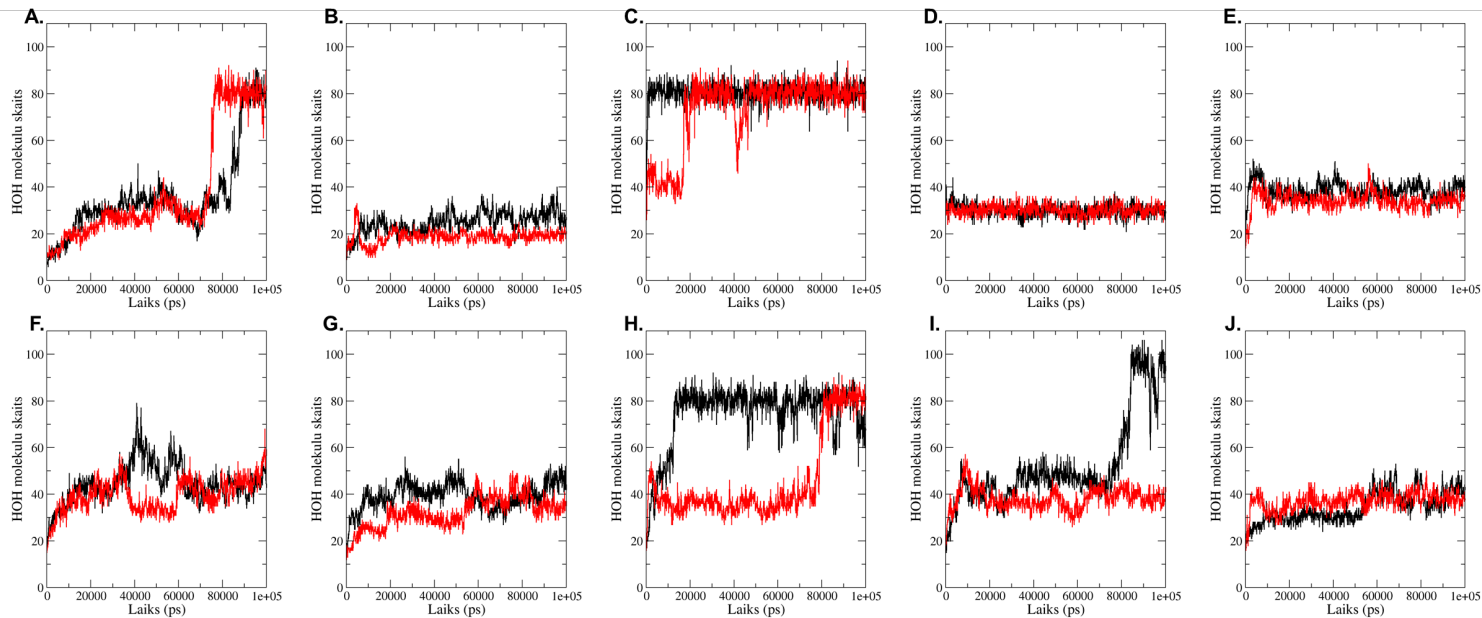
**A.** BBOX PDB ID 3O2G kompleksā ar GBB; **B.** BBOX PDB ID 3O2G ar protonēto D261prot kompleksā ar GBB; **C.** BBOX PDB ID 4C8R kompleksā ar GBB; **D.** BBOX PDB ID 4C8R kompleksā ar GBB, kas iesaldēts aktīvajā centrā. *RMSF* ķēdei A – violetā krāsā; *RMSF* ķēdei B – sarkanā krāsā. B-faktori – tumši zaļā krāsā. Otrējās struktūras elementi parādīti kā sarkani, gaiši zili vai gaiši zaļi taisnstūriši, kas attiecīgi atbilst  $\alpha$ -spirālēm,  $\beta$ -lapām vai kustīgām cilpām.

<sup>9</sup> *RMSF* sagrupēti (*clustered*) 2 ns segmentos 40–100 ns laika intervālā.



2.14. att. Enzīma aktīvajā centrā šķīdinātājam pieejamā virsmas laukuma izmaiņas MD simulācijas laikā no 0 līdz 100 ns

**A.** BBOX kompleksā ar GBB (PDB ID 3O2G); **B.** BBOX-D261prot kompleksā ar GBB (PDB ID 3O2G); **C.** BBOX atvārtā forma kompleksā ar GBB (PDB ID 4C8R); **D.** BBOX atvārtā forma kompleksā ar iesaldēto GBB (PDB ID 4C8R); **E.** BBOX-2m kompleksā ar TML (PDB ID 3O2G); **F.** BBOX-4m kompleksā ar TML (PDB ID 3O2G); **G.** BBOX-D261prot-4m kompleksā ar TML (PDB ID 3O2G); **H.** BBOX-D261prot-4m kompleksā ar GBB (PDB ID 3O2G); **I.** BBOX-5m kompleksā ar TML (PDB ID 3O2G); **J.** BBOX-7m kompleksā ar TML (PDB ID 3O2G). Enzīma ķēde A – sarkanā krāsā, un ķēde B – gaiši zaļā krāsā.



2.15. att. Ūdens molekulu skaita izmaiņas MD simulācijas laikā no 40 līdz 100 ns 6 Å attālumā no liganda (GBB vai TML).

**A.** BBOX kompleksā ar GBB (PDB ID 3O2G); **B.** BBOX-D261prot kompleksā ar GBB (PDB ID 3O2G); **C.** BBOX atvērta forma kompleksā ar GBB (PDB ID 4C8R); **D.** BBOX atvērta forma kompleksā ar iesaldēto GBB (PDB ID 4C8R); **E.** BBOX-2m kompleksā ar TML (PDB ID 3O2G); **F.** BBOX-4m kompleksā ar TML (PDB ID 3O2G); **G.** BBOX-D261prot-4m kompleksā ar TML (PDB ID 3O2G); **H.** BBOX-D261prot-4m kompleksā ar GBB (PDB ID 3O2G); **I.** BBOX-5m kompleksā ar TML (PDB ID 3O2G); **J.** BBOX-7m kompleksā ar TML (PDB ID 3O2G). Enzīma ķēde A – melnā krāsā, un ķēde B – sarkanā krāsā.

Aktīvā centra laukums pirms un pēc 100 ns MD simulācijas

Proteīns	Ķēde A, Å <sup>2</sup>		Ķēde B, Å <sup>2</sup>	
	Pirms MD	Pēc MD	Pirms MD	Pēc MD
3O2G	402,348	423,572*	401,735	304,027*
3O2G-D261prot	424,237	367,353	401,673	314,712
4C8R	599,332	419,161*	614,659	422,515*
4C8R (iesaldēts ligands)		422,291		388,100
3O2G-2m	625,434	619,437	552,885	565,813
3O2G-4m	647,633	658,511	636,698	616,046
3O2G-4m-D261prot TML	647,633	632,054	647,633	600,517
3O2G-4m-D261prot GBB	647,633		647,633	
3O2G-5m	619,201	676,169	667,786	531,344*
3O2G-7m	599,332	715,953	614,659	650,180
TMLD ( <i>AlphaFold</i> )	672,994	656,291	565,302	645,501*

\* simulācijas beigu posmā ligands atsaistījās no enzīma aktīvā centra

### 2.1.2. BBOX mutantu MD simulācijas

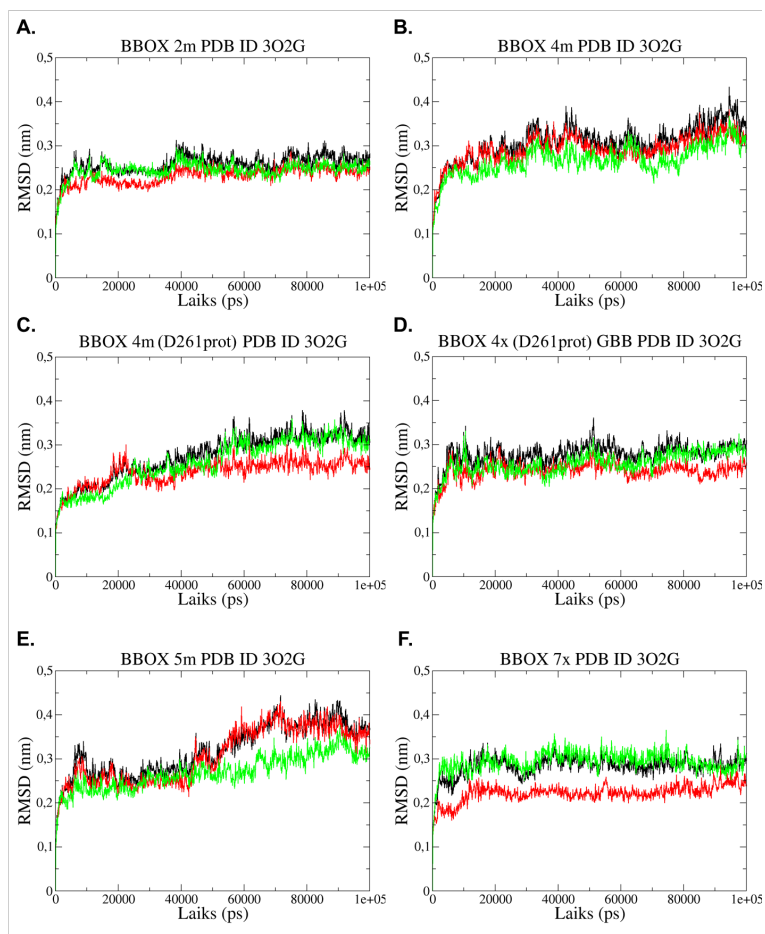
Izstrādātā metode turpmāk pielietota BBOX mutantu MD simulācijām. Ņemot vērā, ka BBOX atvērtā konformācija (PDB ID 4C8R) uzreiz sekmē liganda atsaistīšanos, BBOX mutanti izveidoti uz PDB ID 3O2G bāzes. BBOX gadījumā D261 protonēšana palielināja BBOX-GBB sistēmas stabilitāti, savukārt D261 ietekme uz BBOX mutantiem nav zināma. Lai noskaidrotu vēlamo D261 protonēšanās stāvokli, veiktas trīs MD simulācijas BBOX 4m mutantam, kas ietver sevī četras vissvarīgākās mutācijas:

- 1) BBOX-4m kompleksā ar TML;
- 2) BBOX-4m-D261prot kompleksā ar TML;
- 3) BBOX-4m-D261prot kompleksā ar GBB.

*RMSD* analīze (2.16. att., B–D) rāda, ka visas trīs BBOX-4m mutantu struktūras saglabāja stabilitāti 100 ns MD simulāciju laikā. Visos gadījumos vidējais *RMSD* MD beigu posmā bija ap ~ 3 Å (jeb 0,3 nm). *RMSF* analīze (2.17. att., B–D) rāda, ka viskustīgākā struktūras daļa ir  $\beta$ I/ $\beta$ II cilpa, kurai novēroja vislielākās fluktuācijas ķēdei B BBOX-4m kompleksā ar TML (2.17. att., B). Tikpat lielas fluktuācijas novēroja 4C8R kompleksā ar GBB (2.13. att., C). Savukārt *SASA* analīze rāda pretējo, ka šī struktūra (2.14. att., F) ir stabilāka par BBOX-4m D261prot struktūrām kompleksos ar TML vai GBB (attiecīgi 2.14. att., G un H). Novērojamās fluktuācijas visticamāk saistītas ar aktīvā centra pielāgošanos jaunam substrātam un stēriskā sprieguma (*steric strain*) novēršanu pēc mutāciju ieviešanas. Turklāt BBOX-4m-D261prot kompleksam ar GBB novēroja liganda atsaistīšanos no ķēdes A (~ 10 ns) un ķēdes B (~ 80 ns) [2.15. att., H]. Tik ātra liganda disociācija ķēdē A rāda, ka BBOX-4m struktūra vairs nespēj efektīvi saistīt GBB. Savukārt, nevienā no BBOX-4m struktūrām TML disociāciju nenovēro. Ņemot vērā to, ka D261 protonēšana būtiski neietekmē BBOX-4m-TML kompleksu, turpmākās MD simulācijas BBOX-2m, 5m un 7m mutantiem kompleksos ar TML veikti ar negatīvu lādētu D261. Salīdzinot MD simulācijas pēc to *RMSD* (2.16. att., A, E un F) un *RMSF* (2.17. att., A, E un F) radītājiem, redzams, ka visnestabilākā sistēma ir BBOX-5m, kurai pēc

80 ns novēro TML disociāciju ķēdē A (2.15. att., I). Savukārt, BBOX-7m MD simulācijas laikā ir daudz stabilāka. Kopumā, var secināt, ka V183F mutācija bez papildus mutācijām Q182Y un Q184T destabilizē BBOX sistēmu. SASA analīze (2.14. att., E, I, J) rāda, ka BBOX-7m aktīvais centrs paplašinās visvairāk un tuvojās 4C8R atvērtās konformācijas izmēriem, ko atspoguļo arī aktīvā centra laukuma mērījumi 2.3. tabulā. Turklāt BBOX-7m arī novēro TML disociācijas pazīmes, par ko liecina TML-enzīma ūdeņraža saišu sabrukšana.

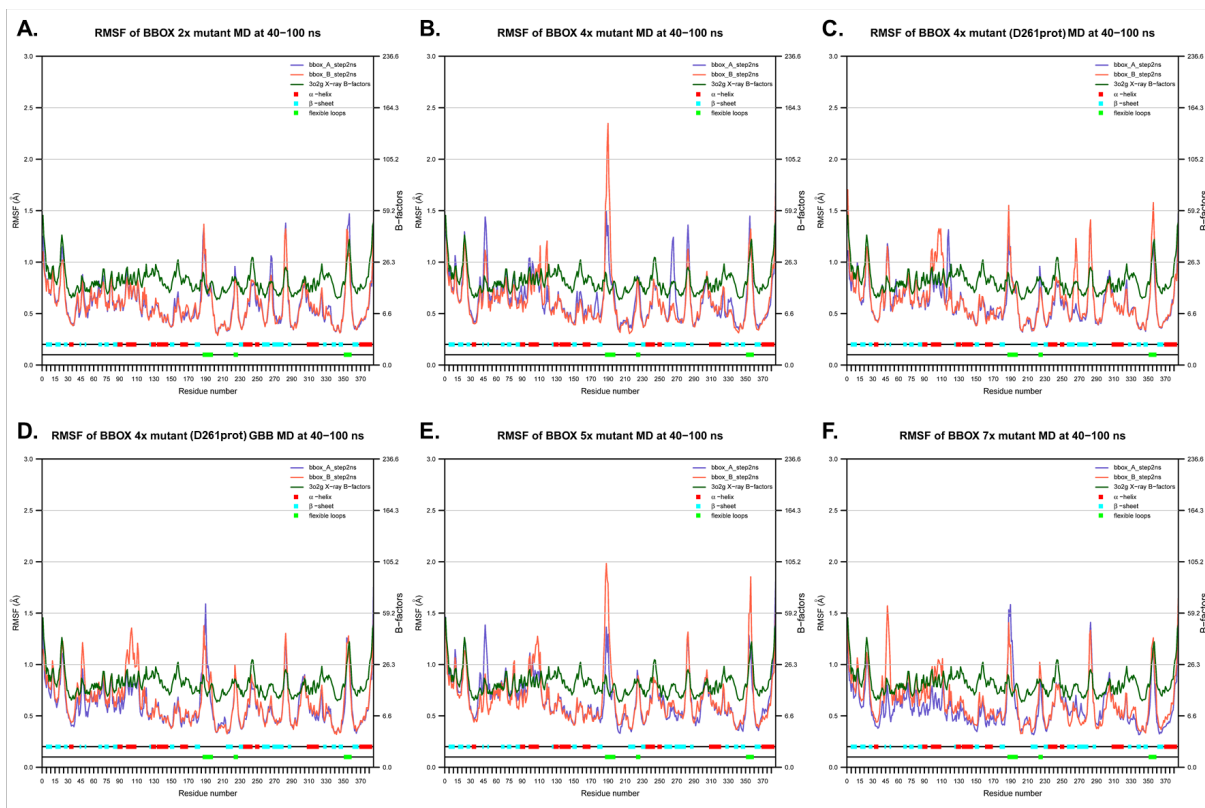
Balstoties uz četru dažādu BBOX mutantu MD datu analīzi, secināts, ka visstabilākie ir TML kompleksi ar BBOX-2m un BBOX-4m. Rezultātā tieši šīs divas struktūras turpinājumā pārbaudītas eksperimentāli.



2.16. att. RMSD izmaiņas 100 ns MD simulācijas laikā sešiem dažādiem BBOX mutantiem kompleksos ar TML vai GBB.

A. BBOX-2m kompleksā ar TML; B. BBOX-4m kompleksā ar TML; C. BBOX-4m ar protonēto D261prot kompleksā ar TML; D. BBOX-4m ar protonēto D261prot kompleksā ar GBB. E. BBOX-5m kompleksā ar TML;

F. BBOX-7m kompleksā ar TML. RMSD BBOX dimēram – melnā krāsā; RMSD ķēdei A – sarkanā krāsā; RMSD ķēdei B – gaiši zaļā krāsā.



2.17. att. Vidējās *RMSF* izmaiņas katrā aminoskābju atlikuma  $C\alpha$  atomiem 40–100 ns MD simulācijas laikā sešiem dažādiem BBOX mutantiem kompleksos ar TML vai GBB ar norādītiem kristalogrāfiskiem B-faktoriem no PDB ID 3O2G.

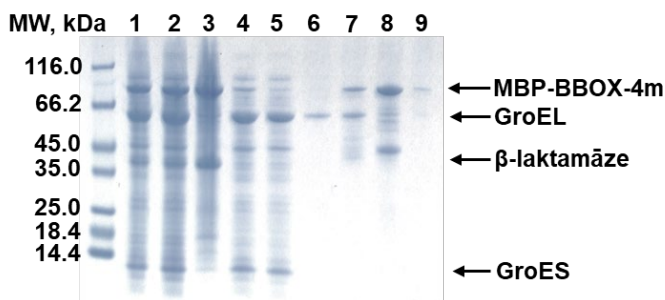
**A.** BBOX-2m kompleksā ar TML; **B.** BBOX-4m kompleksā ar TML; **C.** BBOX-4m ar protonēto D261prot kompleksā ar TML; **D.** BBOX-4m ar protonēto D261prot kompleksā ar GBB. **E.** BBOX-5m kompleksā ar TML; **F.** BBOX-7m kompleksā ar TML. *RMSF* ķēdei A – violetā krāsā; *RMSF* ķēdei B – sarkanā krāsā. B-faktori – tumši zaļā krāsā. Otrējās struktūras elementi parādīti kā sarkani, gaiši zili vai gaiši zaļi taisnstūriši, kas attiecīgi atbilst  $\alpha$ -spirālēm,  $\beta$ -lapām vai kustīgām cilpām.

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

#### 2.1.3.1. BBOX-4m iegūšana

Vispirms veikti mēģinājumi ekspresēt BBOX-4m pēc analogijas ar dabisko BBOX [42] raugu šūnās. Šie eksperimenti veikti Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā (BMC) sadarbībā ar Dr. Andri Kazāku. Diemžēl četru mutāciju ieviešana BBOX aktīvajā centrā pilnībā mainīja enzīma īpašības un pēc standarta BBOX protokola ekspresiju nenovēroja. Turklāt, līdzīgi kā TMLD, BBOX-4m ekspresējās nešķīstošā formā *E. Coli* BL21(DE3) un BL21-AI šūnu celmos bez molekulāriem šaperoniem, GroEL/ES.

Rezultātā pēc analogijas ar TMLD [245] izmēģināta BBOX-4m ekspresija kā himēriskam (*fusion*<sup>10</sup>) proteīnam ar maltozi saistošo proteīnu (*Maltose Binding Protein*, MBP) *E. Coli* BL21-AI šūnās ar GroEL/ES. Šim nolūkam komerciāli iegādātais BBOX-4m gēns modificēts ar PCR un pārklonēts uz pET-Duet vektoru, kas satur MBP proteīnu kodējošo gēnu *MalE* (3.3.2. nodaļa, 3.2. att.). MBP-BBOX-4m ekspresijas un attīrīšanas protokols ir aprakstīts 3.3.2.2. nodaļā.



2.18. att. MBP-BBOX-4m, kas ekspresēts 37 °C, attīrīšanas *SDS-PAGE*<sup>11</sup> analīze.

1. BL21-AI šūnu suspensija lizēšanas buferī pēc sonifikācijas. 2. supernatants, kas satur šķīstošo enzīmu (pēc sonifikācijas). 3. šūnu nešķīstošā daļa, kas satur nešķīstošu enzīmu (pēc centrifugācijas). 4.–5. sākuma un beigu caurplūdes (*flow through*) frakcijas no *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas, kas satur GroEL/ES,  $\beta$ -laktamāzi u.c. šķīstošus *E. Coli* proteīnus, kas nepiesaistījās pie kolonnas. 6. caurplūde no *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas mazgāšanas ar buferi A1. 7.–9. MBP-BBOX-4m saturošas secīgas frakcijas, eluētas no *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas.

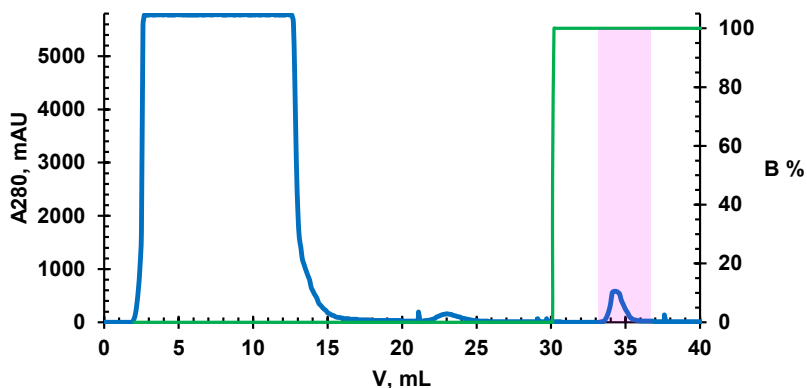
Standarta ekspresija 37 °C ļāva iegūt šķīstošu MBP-BBOX-4m, taču ļoti mazā daudzumā. Kā redzams no *SDS-PAGE* analīzes (2.18. att., 1.–3. kontroles paraugs), ap 70 % enzīma palika nešķīstošajā daļā un tikai 30 % izdevās iegūt kā šķīstošu, ko turpinājumā uznesa uz *MBP-Trap*<sup>TM</sup> afinitātes kolonnu (2.19. att.). Analizējot eluēto frakciju (2.18. att., 7.–9. kontroles paraugs), noteikts, ka pamatfrakcija satur vēlamo enzīmu ar MW ~ 87 kDa. Turpmākā attīrīšana

<sup>10</sup> *fusion* (sapludinātais) jeb himēriskais proteīns – proteīns, kas sastāv no diviem vai vairākiem kovalenti saistītiem proteīniem/proteīnu domēniem, kas dabā nav sastopami.

<sup>11</sup> *SDS-PAGE* (nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gēla elektroforēze) notiek reducējošos un denaturējošos apstākļos (augsta DTT un SDS koncentrācijas, paraugu uzsildīšana līdz 98 °C pirms eksperimenta), rezultātā visi proteīni gēlā parādās kā monomēri.

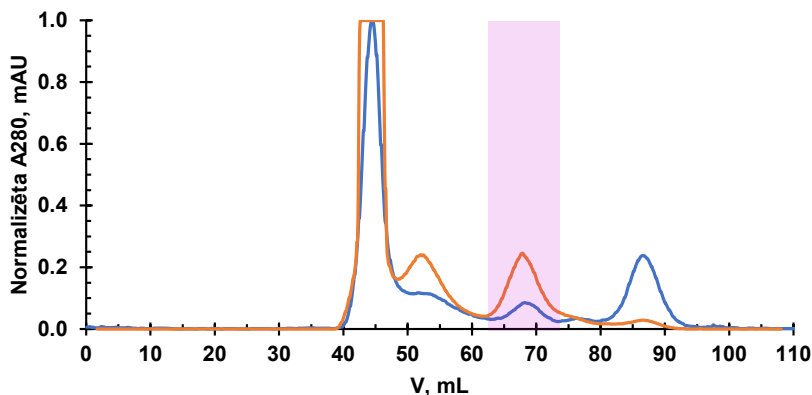


ar izmēra izslēgšanas hromatogrāfiju (*Size Exclusion Chromatography*, SEC<sup>12</sup> jeb gēlfiltrācija) (2.20. att., zilā līkne), parādīja, ka lielākā daļa no MBP-BBOX-4m ir agregātos (pīķis no 40 līdz 50 mL). Turklāt, kopā ar vēlamo enzīma dimēru (2.20. att., zilā līkne, rozā reģions, ~ 174 kDa), iespējams veidojas MBP-BBOX-4m tetramērs (~ 440 kDa) vai arī līdzīga izmēra šķīstošie agregāti. *SDS-PAGE* analīze pēc SEC hromatogrāfijas, uzrāda 95 %+ tīru proteīnu (2.21. att., 4.–5.), taču to daudzums ir ļoti mazs, ~ 0,3 mg/L *2xYT* barotnes.



2.19. att. MBP-BBOX-4m enzīma, kas ekspresēts 37 °C, attīrīšana uz *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas.

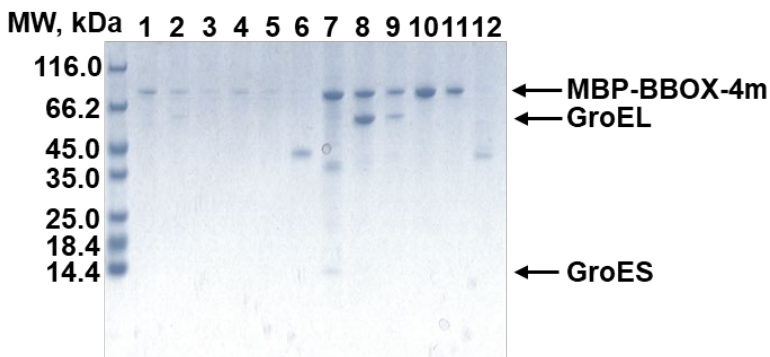
Zilā līkne – absorbcija pie 280 nm; zaļā līkne – eluējošā bufera B1 koncentrācijas izmaiņas. Rozā reģions – frakcijas, kas satur attīrītu MBP-BBOX-4m.



2.20. att. MBP-BBOX-4m enzīma SEC hromatogrammu no *HiLoad 16/600 Superdex*<sup>TM</sup> 200pg kolonnas superpozīcija.

MBP-BBOX-4m ekspresēts 37 °C – līkne zilā krāsā, un ekspresēts 16 °C – līkne oranžā krāsā. Rozā reģions parāda pīķi, kas atbilst enzīma dimēram (~ 174 kDa). Līknes normalizētas pēc absorbcijas pie 280 nm (A280).

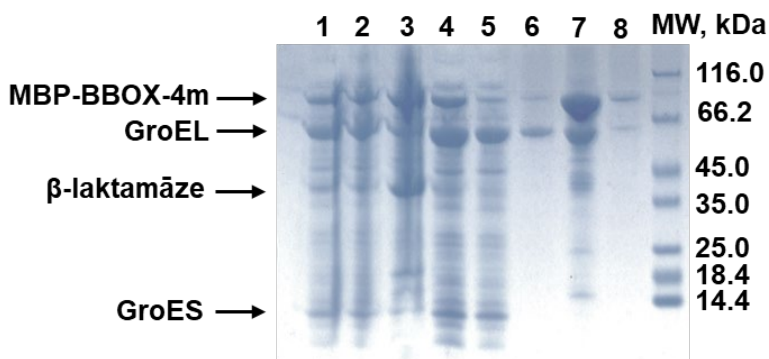
<sup>12</sup> SEC hromatogrāfijā visi proteīni sadalās pēc to izmēra. Atšķirībā no *SDS-PAGE* analīzes, šeit proteīni atrodas savā dabiskā formā, ceturtnējās struktūras netiek sagrautas.



2.21. att. MBP-BBOX-4m pēc attīrīšanas uz *SEC HiLoad 16/600 Superdex™ 200pg* kolonnas *SDS-PAGE* analīze.

1.–6. kontroles paraugs atbilst 37 °C ekspresēta MBP-BBOX-4m attīrīšanai, bet 7.–12. kontroles paraugs – 16 °C ekspresēta MBP-BBOX-4m attīrīšanai. 1., 7. paraugs – šķīstošie agregāti (40–50 mL); 2., 8. paraugs – MBP-BBOX-4m tetramērs kopā ar GroEL/ES piemaisījumu (50–60 mL); 3.–5. un 9.–11. paraugs – MBP-BBOX-4m dimērs (2.20. att., rozā reģions); 6., 12. paraugs – MBP (80–95 mL).

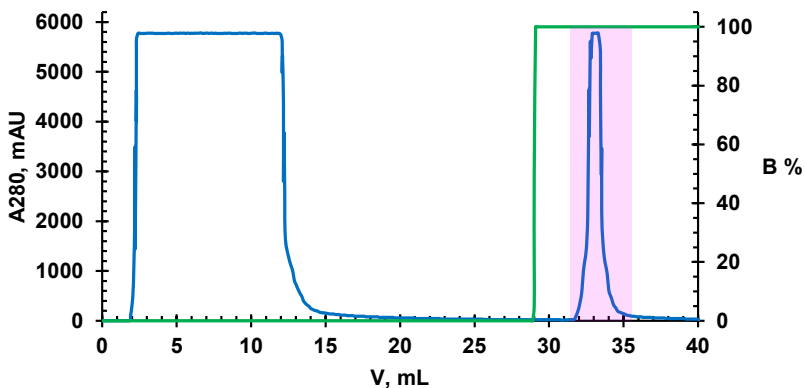
Savukārt, veicot ekspresiju 16 °C izdevās ievērojami palielināt šķīstošā enzīma daudzumu. *SDS-PAGE* analīzes dati (2.22. att., 1.–3.) parāda, ka ~ 60 % no MBP-BBOX-4m atradās šķīstošajā frakcijā. Turklāt, pēc attīrīšanas uz *MBP-Trap™* afinitātes kolonnas (2.23. att.), izdevās eluēt ~ 5 reizes intensīvāko pīķi, kas satur vēlamo enzīmu ar ~ 20 % GroEL/ES piemaisījuma (2.22. att., 7.). Turpinot parauga attīrīšanu uz *SEC* kolonnas, izdevās iegūt ~ 6 reizes vairāk enzīma dimēra (2.20. att., oranžā līkne, rozā reģions, ~ 174 kDa). *SDS-PAGE* analīze pēc *SEC* hromatogrāfijas, uzrāda 95 %+ tīru proteīnu (2.21. att., 10.–11.) ar beigu iznākumu, ~ 1,9 mg/L *2xYT* barotnes.



2.22. att. MBP-BBOX-4m, kas ekspresēts 16 °C, attīrīšanas *SDS-PAGE* analīze.

1. BL21-AI šūnu suspensija lizēšanas buferī pēc sonifikācijas. 2. šūnu nešķīstošā daļa, kas satur nešķīstošu enzīmu (pēc sonifikācijas). 3. supernatants, kas satur šķīstošo enzīmu (pēc centrifugācijas). 4.–5. sākuma un beigu caurplūdes frakcijas no *MBP-Trap™* kolonnas, kas satur GroEL/ES, β-laktamāzi u.c. šķīstošus *E. Coli* proteīnus, kas nepiesaistījās pie kolonnas. 6. caurplūde no *MBP-Trap™* kolonnas mazgāšanas ar buferi A1.

7.–8. MBP-BBOX-4m saturošas secīgas frakcijas, eluētas no *MBP-Trap™* kolonnas.



2.23. att. MBP-BBOX-4m enzīma, kas ekspresēts 16 °C, attīrīšana uz *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas.

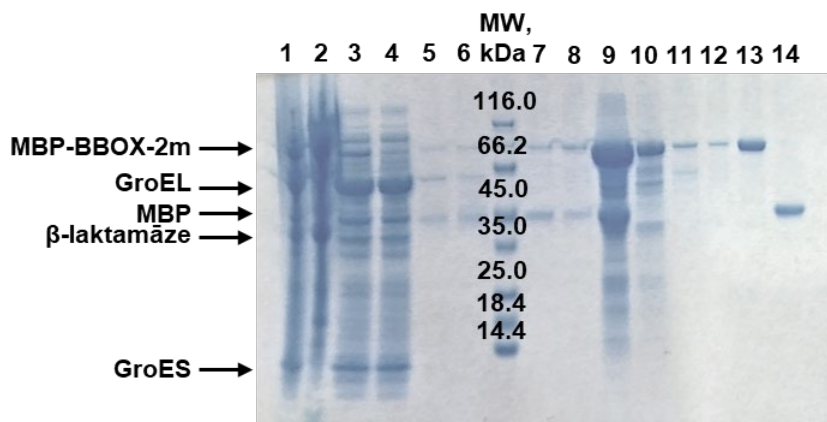
Zilā līkne – absorbēcija pie 280 nm; zaļā līkne – eluējošā bufera B1 koncentrācijas izmaiņas. Rozā reģions – frakcijas, kas satur attīrītu MBP-BBOX-4m.

#### 2.1.3.2. BBOX-2m iegūšana

Balstoties uz eksperimentāliem datiem par BBOX-4m, BBOX-2m uzreiz izveidots kā MBP-BBOX-2m *fusion* proteīns veicot punktveida mutāciju pET-Duet-MalE-BBOX-4m plazmīdā (nodaļa 3.3.2.1.). MBP-BBOX-2m ekspresēts paralēli divās temperatūrās: 37 °C un 16 °C. Atšķirībā no MBP-BBOX-4m, šeit gan 37 °C, gan 16 °C enzīms ekspresējās ļoti līdzīgi, kas liecina par lielāku šī enzīma mutanta stabilitāti.

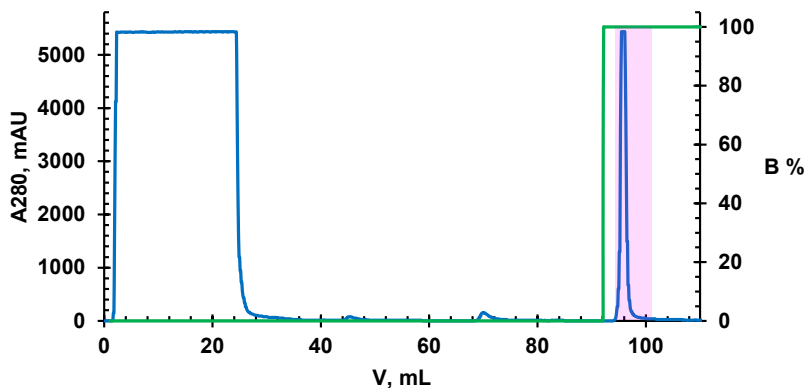
Veicot MBP-BBOX-2m attīrīšanu, novēroja, ka vismaz 50 % no enzīma paliek nešķīstošajā daļā (2.24. att., 1.–3. un 2.26. att., 1.–4.). Tomēr, paraugam, kas ekspresēts 16 °C, šķīstošā proteīna īpatsvars ir lielāks. Pēc *MBP-Trap*<sup>TM</sup> afinitātes hromatogrāfijas (2.25. un 2.27. att., rozā reģioni) no abiem paraugiem izdevās iegūt MBP-BBOX-2m ar GroEL/ES un MBP piemaisījumu (2.24. att., 9. un 2.26. att., 8.), ko tālāk attīrīja ar *SEC* hromatogrāfiju. Šeit starpība starp paraugiem ir izteikta mazāk nekā MBP-BBOX-4m gadījumā (2.20. att.). Kā redzams MBP-BBOX-2m abu *SEC* hromatogrammu superpozīcijā (2.28. att.), paraugā, kas ekspresēts 37 °C, paralēli ar MBP-BBOX-2m dimēru ekspresējies arī MBP proteīns (pīķis pie 80–95 mL). Savukārt, paraugam, kas ekspresēts 16 °C, iespējams, veidojās arī MBP-BBOX-2m tetramērs (pīķis pie 50–60 mL), bet MBP ekspresējies ievērojami mazākā daudzumā. Enzīma dimēra daudzums šeit ir par ~30 % lielāks. *SDS-PAGE* analīze pēc *SEC* hromatogrāfijas (2.24. att., 13. un 2.26. att., 12.), uzrāda 95 %+ tīru proteīnu ar beigu iznākumu:

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



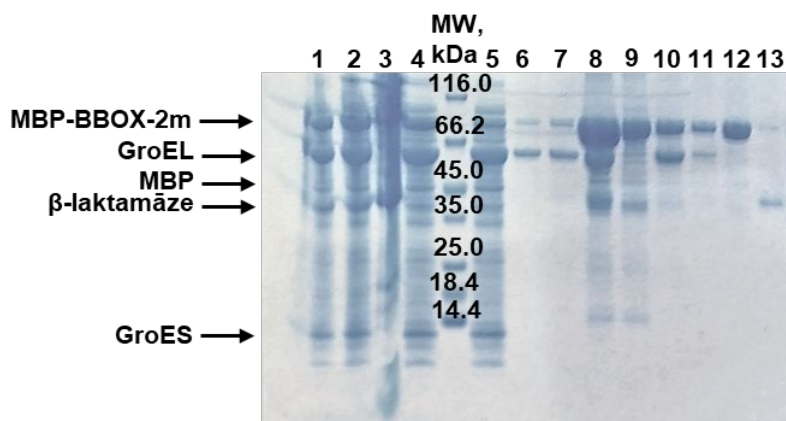
2.24. att. MBP-BBOX-2m, kas ekspresēts 37 °C, attīrīšanas SDS-PAGE analīze.

1.–3. kontroles paraugs atbilst šūnu lizēšanai, 4.–9. – attīrīšanai uz *MBP-Trap*<sup>TM</sup> afinitātes kolonnas, 10.–14. – no attīrīšanas uz *SEC* kolonnas. 1. BL21-AI šūnu suspensija lizēšanas buferī pēc sonifikācijas. 2. šūnu nešķīstošā daļa, kas satur nešķīstošu enzīmu (pēc centrifugācijas). 3. supernatants, kas satur šķīstošo enzīmu (pēc sonifikācijas). 4. caurplūde no *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas, kas satur GroEL/ES, β-laktamāzi u.c. šķīstošus *E. Coli* proteīnus, kas nepiesaistījās pie kolonnas. 5.–8. caurplūde no *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas mazgāšanas ar buferi A1. 9. MBP-BBOX-2m saturošās secīgas frakcijas, eluētas no *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas. 10. šķīstošie agregāti (40–50 mL). 11. MBP-BBOX-2m tetramērs kopā ar GroEL/ES piemaisījumu (50–60 mL). 12.–13. MBP-BBOX-2m dimērs (2.28. att., rozā reģions). 14. MBP (80–95 mL).



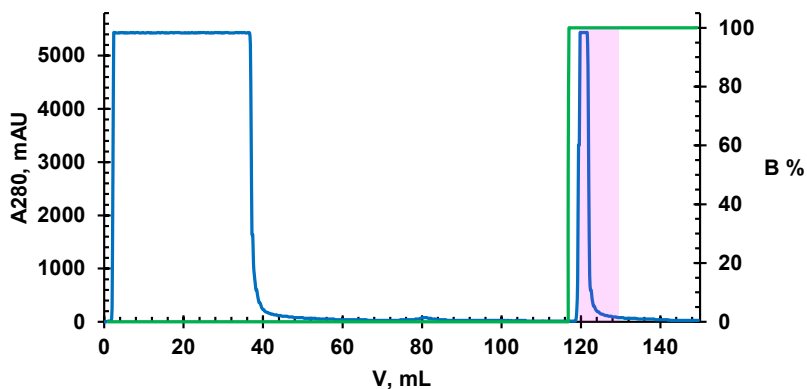
2.25. att. MBP-BBOX-2m enzīma, kas ekspresēts 37 °C, attīrīšana uz *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas.

Zilā līkne – absorbēcija pie 280 nm; zaļā līkne – eluējošā bufera B1 koncentrācijas izmaiņas. Rozā reģions – frakcijas, kas satur attīrītu MBP-BBOX-2m.



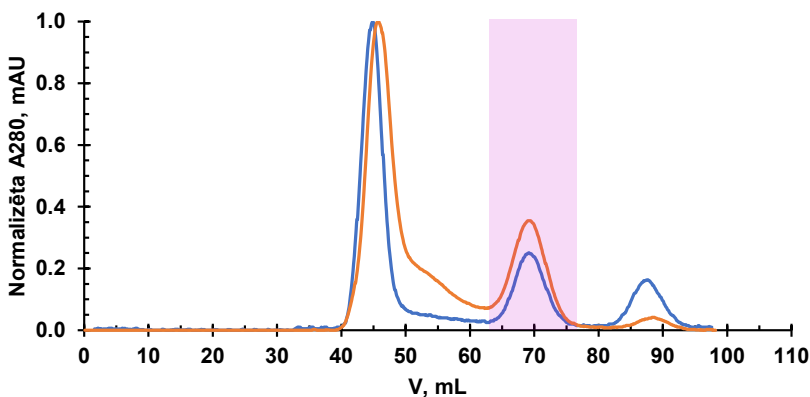
2.26. att. MBP-BBOX-2m, kas ekspresēts 16 °C, attīrīšanas *SDS-PAGE* analīze.

1.–4. kontroles paraugs atbilst šūnu lizēšanai, 5.–8. – attīrīšanai uz *MBP-Trap*<sup>TM</sup> afinitātes kolonnas, 9.–13. – no attīrīšanai uz *SEC* kolonnas. 1. BL21-AI šūnu suspensija lizēšanas buferī pirms sonifikācijas. 2. BL21-AI šūnu suspensija lizēšanās buferī pēc sonifikācijas. 3. šūnu nešķīstošā daļa, kas satur nešķīstošu enzīmu (pēc centrifugācijas). 4. supernatants, kas satur šķīstošo enzīmu (pēc sonifikācijas). 5. caurplūde no *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas, kas satur GroEL/ES, β-laktamāzi u.c. šķīstošus *E. Coli* proteīnus, kas nepiesaistījās pie kolonnas. 6.–7. caurplūde no *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas mazgāšanas ar buferi A1. 8. MBP-BBOX-2m saturošās secīgas frakcijas, eluētas no *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas. 9. šķīstošie agregāti (40–50 mL). 10. MBP-BBOX-2m tetramērs kopā ar GroEL/ES piemaisījumu (50–60 mL). 11.–12. MBP-BBOX-2m dimērs (2.28. att., rozā reģions). 13. MBP (80–95 mL).



2.27. att. MBP-BBOX-2m enzīma, kas ekspresēts 16 °C, attīrīšana uz *MBP-Trap*<sup>TM</sup> kolonnas.

Zilā līkne – absorbācija pie 280 nm; zaļā līkne – eluējošā bufera B1 koncentrācijas izmaiņas. Rozā reģions – frakcijas, kas satur attīrītu MBP-BBOX-2m.



2.28. att. MBP-BBOX-2m enzīma SEC hromatogrammu no *HiLoad 16/600 Superdex™* 200pg kolonnas superpozīcija.

MBP-BBOX-2m ekspresēts 37 °C – līkne zilā krāsā, un ekspresēts 16 °C – līkne oranžā krāsā. Rozā reģions parāda pīķi, kas atbilst enzīma dimēram (~ 174 kDa). Līknes normalizētas pēc absorbcijas pie 280 nm (A280).

Iegūtie dati pierāda, ka temperatūras samazināšana proteīnu ekspresijas laikā labvēlīgi ietekmēja proteīnu šķīdību. Samazinoties temperatūrai, visi procesi šūnā palēninās. Proteīna sintēze ribosomā arī notiek ievērojami lēnāk un, izejot no tās, proteīnam ir vairāk laika, lai ieņemtu pareizo konformāciju. Rezultātā, varbūtība, ka proteīns ieņems pareizo trešējo un ceturto struktūru palielinās.

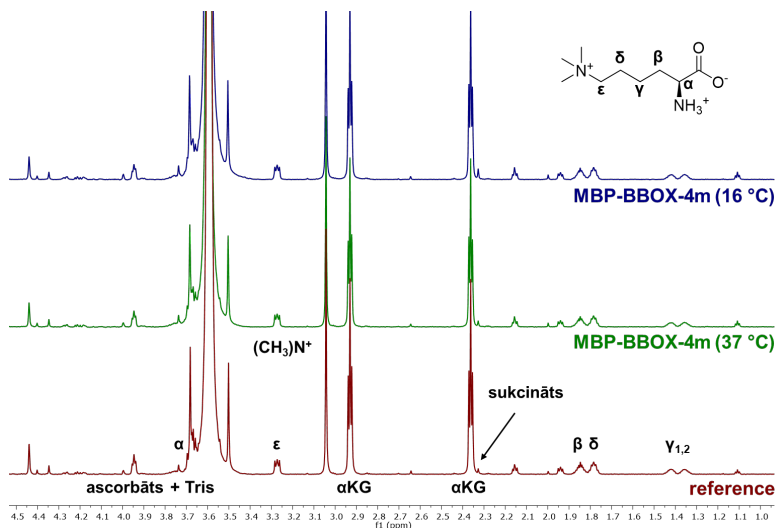
Šūnu sagraušana ar sonifikācijas metodi ir viena no nesaudzīgākajām lizēšanas metodēm, kuras norises laikā paraugs var viegli pārkārt, bet proteīns – degradēties. Viens no optimizācijas veidiem būtu nomainīt sonifikāciju ar ķīmisko lizēšanu (piemēram, šūnu apvalku sagraušana ar lizocīmu un deterģentu). Vai arī notestēt dažādu osmolītu [piemēram, trimetilamīno *N*-oksīds, *D*-trehaloze, glicīna betaīns, u.c.] piedevu ietekmi [246].

Analizējot visu četru enzīmu paraugu eksperimentālos datus, var secināt, ka mutācijas Y205T un P206T stipri destabilizē BBOX struktūru, kā rezultātā ievērojami samazinās enzīma iznākumi. Iespējams, šo mutāciju sekmīgai ieviešanai būtu jāveic papildus mutācijas otrā ligandu koordinācijas sfērā ( $> 4 \text{ \AA}$  attālumā), lai kompensētu palielināto kustīgumu aktīvā centra apkārtnē. Tomēr lielāks mutāciju skaits var stipri izmainīt BBOX struktūru, kas vairs nebūs līdzīga tai, ko apraksta esošie kristalogrāfiskie dati.

### 2.1.3.3. MBP-BBOX-4m un MBP-BBOX-2m enzīmātie testi

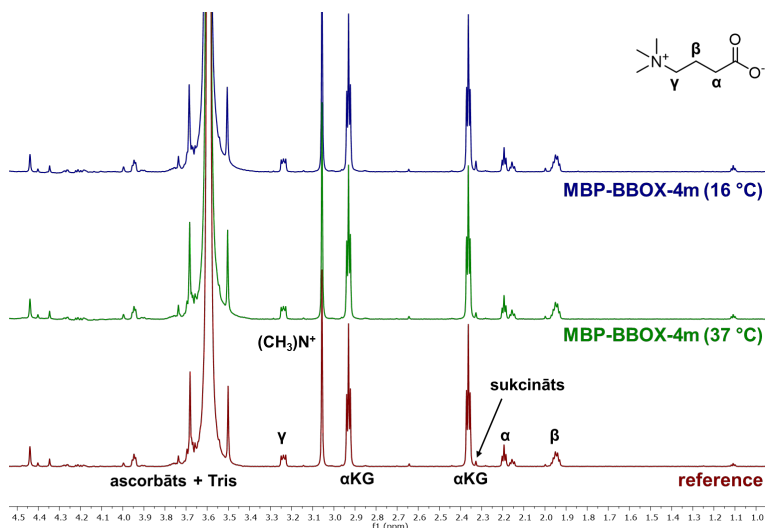
Iegūto BBOX mutantu aktivitāte pārbaudīta enzīmātajās reakcijās, ko novēroja, izmantojot KMR spektroskopiju. Ņemot vērā zemas iznākumus, MBP-BBOX-4m pārbaudīts tikai vienā enzīma koncentrācijā, 3,0  $\mu\text{M}$  – paraugam, kas ekspresēts 37 °C un 10,2  $\mu\text{M}$  – paraugam, kas ekspresēts 37 °C. Kā substrāti šeit izmantoti 200  $\mu\text{M}$  TML (2.29. att.) vai 200  $\mu\text{M}$  GBB (2.30. att.). Kā var redzēt no spektriem, nevienā no paraugiem ligandu ķīmisko

nobīžu vai signālu intensitāšu izmaiņas nenovēroja, kas liecina, ka nevienā no reakcijas maisījumiem substrāta konversija nenotika. Turklāt, sukcināta veidošanās arī nenovēro.



2.29. att. 1D  $^1\text{H}$  KMR spektri MBP-BBOX-4m enzimatiskajai reakcijai ar TML.

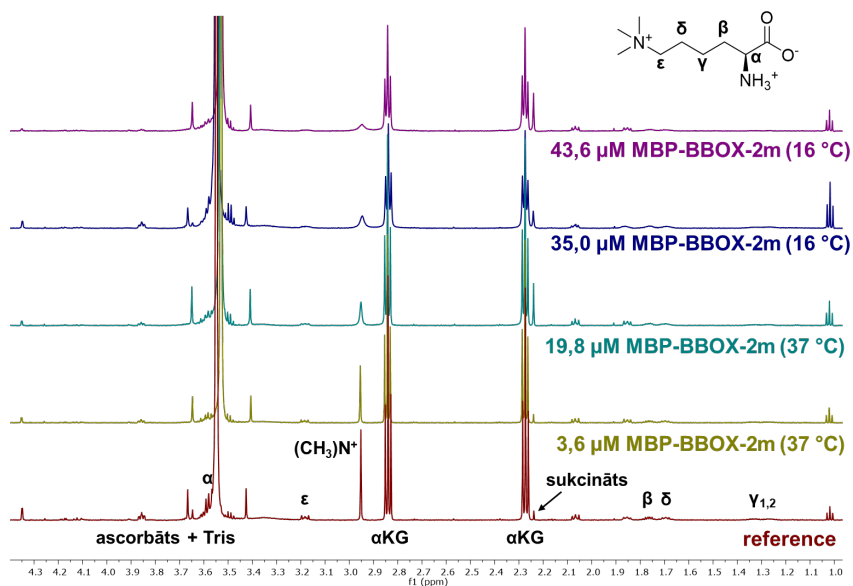
Spektrs sarkanā krāsā – enzimatiskā maisījuma referenču spektrs ar 200  $\mu\text{M}$  TML, bez enzīma pievienošanas.  
 Spektrs zaļā krāsā – 200  $\mu\text{M}$  TML kopā ar 3,0  $\mu\text{M}$  MBP-BBOX-4m (ekspressēts 37 °C) pēc 1 h inkubācijas 37 °C. Spektrs zilā krāsā – 200  $\mu\text{M}$  TML kopā ar 10,2  $\mu\text{M}$  MBP-BBOX-4m (ekspressēts 16 °C) pēc 1 h inkubācijas 37 °C.



2.30. att. 1D  $^1\text{H}$  KMR spektri MBP-BBOX-4m enzimatiskajai reakcijai ar GBB.

Spektrs sarkanā krāsā – enzimatiskā maisījuma referenču spektrs ar 200  $\mu\text{M}$  GBB, bez enzīma pievienošanas.  
 Spektrs zaļā krāsā – 200  $\mu\text{M}$  GBB kopā ar 3,0  $\mu\text{M}$  MBP-BBOX-4m (ekspressēts 37 °C) pēc 1 h inkubācijas 37 °C. Spektrs zilā krāsā – 200  $\mu\text{M}$  GBB kopā ar 10,2  $\mu\text{M}$  MBP-BBOX-4m (ekspressēts 16 °C) pēc 1 h inkubācijas 37 °C.

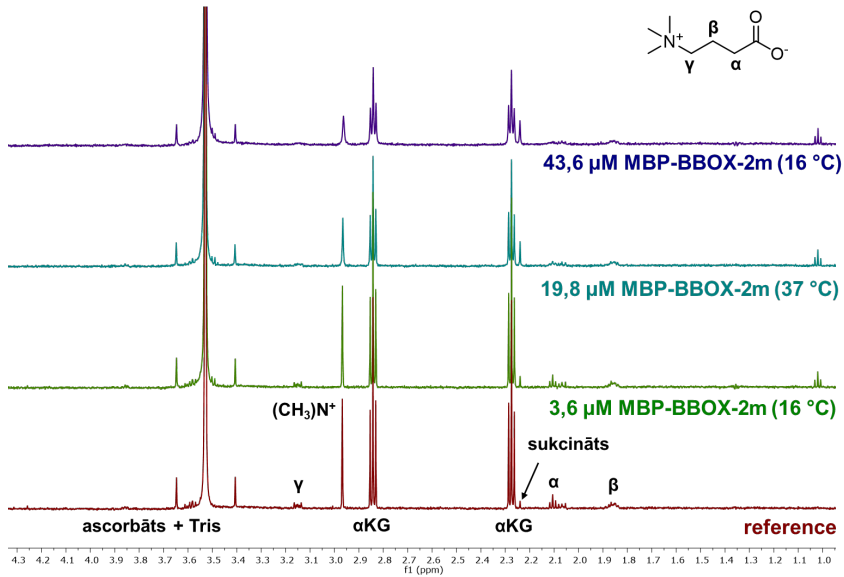
MBP-BBOX-2m enzimātiskās reakcijas tika veiktas plašākā enzīma koncentrāciju diapazonā (3,6 – 43,6 μM enzīms). Reakciju veica ar trīs potenciāliem substrātiem: TML, GBB un δ-trimetil-L-ornitīnu, kas ir par vienu CH<sub>2</sub> grupu īsāks TML analogs. Iegūtie dati saspoguļoti 2.31. – 2.33. attēlos. Abi enzīma paraugi (ekspressēti 37 °C un 16 °C) deva vienādus rezultātus. Zemās enzīma koncentrācijās (3,6 μM) spektrā nenovēroja ķīmisko nobīžu izmaiņas. Šie dati sakrīt ar iegūtajiem izmantojot MBP-BBOX-4m enzīmu. Tomēr MBP-BBOX-2m gadījumā TML savienojumam (2.31. att.), atšķirībā no GBB, enzimātiskajā maisījumā ar 3,6 μM enzīmu novēroja minimālas intensitātes izmaiņas (~ 15 %) (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup> signālam pie 2,96 ppm. Savukārt, augstākās enzīma koncentrācijas novēroja sukcināta signāla intensitātes pieaugumu 4–6 reizes salīdzinājumā ar references spektru. Piedevām, palielinot koncentrāciju līdz 19,8 μM, spektrā novēroja ievērojamu (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup> signāla līniju paplašināšanos (*line broadening*). Šis efekts kļūst arvien izteiktāks palielinot enzīma koncentrāciju līdz 43,6 μM (enzīma-liganda attiecība 1:4,6). GBB gadījumā (2.32. att.) šī signāla paplašināšanās ir ~ 4 reizes mazāk izteikta salīdzinājumā ar TML (2.31. att.) un δ-trimetil-L-ornitīnu (2.33. att.). Signāla platumu vērtības atkarībā no enzīma koncentrācijas apkopotas 2.4. tabulā. Salīdzinot enzimātiskās reakcijas spektrus visiem trim ligandiem un to signālu platumu datus, var secināt, ka MBP-BBOX-2m veidojas preference pret α-aminogrupu saturošiem substrātiem.



2.31. att. 1D <sup>1</sup>H KMR spektri MBP-BBOX-2m enzimātiskajai reakcijai ar TML.

Spektrs sarkanā krāsā – enzimātiskā 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.

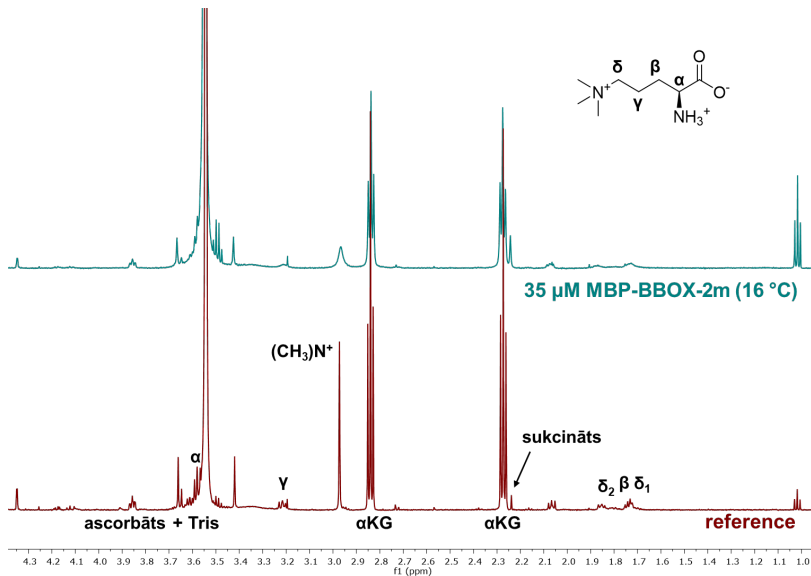




2.32. att. 1D  $^1\text{H}$  KMR spektri MBP-BBOX-2m enzimatiskajai reakcijai ar GBB.

Spektrs sarkanā krāsā – enzimatiskā maisījuma references spektrs ar 200  $\mu\text{M}$  TML, bez enzīma pievienošanas.

Spektrs zaļā krāsā – 200  $\mu\text{M}$  GBB kopā ar 3,6  $\mu\text{M}$  MBP-BBOX-2m (ekspressēts 16 °C) pēc 1 h inkubācijas 37 °C. Spektrs gaiši zilā krāsā – 200  $\mu\text{M}$  GBB kopā ar 19,8  $\mu\text{M}$  MBP-BBOX-2m (ekspressēts 37 °C) pēc 1 h inkubācijas 37 °C. Spektrs tumši zilā krāsā – 200  $\mu\text{M}$  GBB kopā ar 46,3  $\mu\text{M}$  MBP-BBOX-2m (ekspressēts 16 °C) pēc 1 h inkubācijas 37 °C.



2.33. att. 1D  $^1\text{H}$  KMR spektri MBP-BBOX-2m enzimatiskajai reakcijai ar  $\delta$ -trimetil-*L*-ornitīnu.

Spektrs sarkanā krāsā – enzimatiskā maisījuma references spektrs ar 200  $\mu\text{M}$   $\delta$ -trimetil-*L*-ornitīnu, bez enzīma pievienošanas. Spektrs gaiši zilā krāsā – 200  $\mu\text{M}$   $\delta$ -trimetil-*L*-ornitīns kopā ar 35  $\mu\text{M}$  MBP-BBOX-2m (ekspressēts 16 °C) pēc 1 h inkubācijas 37 °C.

(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup> grupas signāla platuma 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

No iegūtiem datiem redzams, ka MBP-BBOX-4m un 2m mutanti zaudēja spēju veikt enzīmātisko reakciju ar savu dabisko substrātu, GBB, taču tie arī nespēj hidroksilēt TML vai tā īstāko analogu, δ-trimetil-L-ornitīnu. Enzīma mutantu funkcionalitātes pārbaudei būtu jāmēģina realizēt enzīmātisko reakciju ar α-amino-GBB, kas ir BBOX no *Pseudomonas sp.* substrāts [56]. Savukārt, līniju platuma palielināšanās un signāla augstuma samazināšanās MBP-BBOX-2m gadījumā, liecina par to, ka veidojas enzīma-liganda komplekss, kam ir īsāks relaksācijas laiks [247].

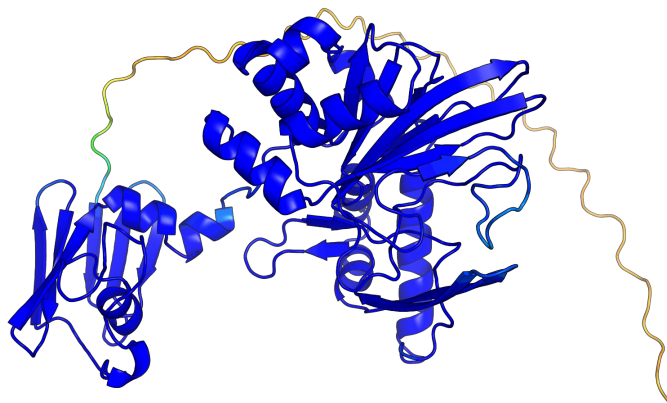
Kopumā, neraugoties uz pārlicinošiem MD simulāciju datiem, izskatās, ka katalītiskās aktivitātes saglabāšanai BBOX aktīvajā centrā būtu jāveic daudz vairāk mutāciju, lai “iemācītu” to pārstrādāt TML. Visticamāk, būtu jāpalielina βI/βII, βII/βIII un βIII/βIV cilpu garumi, kas *DSBH* struktūrā aptver aktīvo centru un piedalās substrāta saistībā. Tomēr tik lielas modifikācijas stipri ietekmētu oriģinālo BBOX struktūru un vairs neļautu izmantot BBOX modeļus ticamo ģeometrisko ierobežojumu noteikšanai struktūras-aktivitātes likumsakarību izveidei.

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

*AlphaFold* datu bāzē [220, 221] pieejama cilvēku pilna garuma TMLD struktūra, kopā ar modeļa ticamības rādītājiem, ko parāda kā krāsu gradientu (2.34. att.) [248]. Iegūtā modeļa strukturālais un katalītiskais domēni tiek uzskatīti par reģioniem ar ļoti augstu ticamību pēc pLDDT analīzes (reģioni tumši zilā krāsā). Savukārt, domēnu savienošā α-spirāle un N-terminālā mitohondriālā mērķsekvenca (*Mitochondrial Targeting Sequence*, MST, aminoskābju atlikumi 1–41) uzskatīti attiecīgi kā reģioni ar standarta un ļoti zemu ticamību.

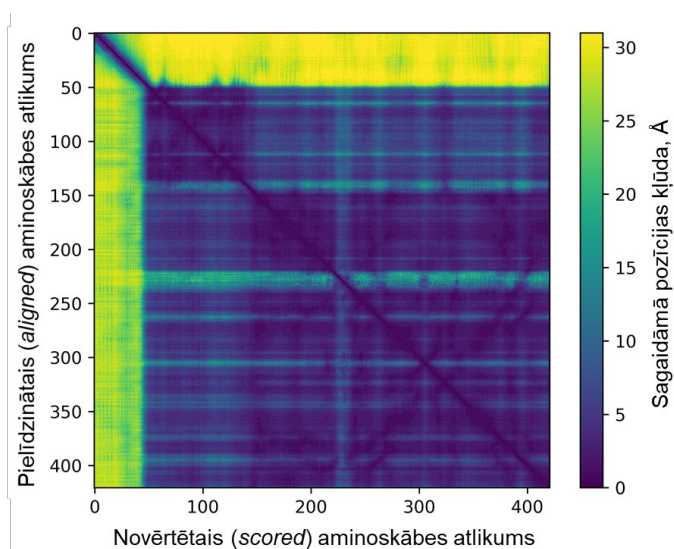
Papildus, *AlphaFold* piedāvā novērtēt modeļa kvalitāti ar izrēķināto sagaidāmās pozīcijas kļūdu, ko atspoguļo kā 2D grafiku (2.35. att.). Iegūtajā grafikā pozīciju kļūdas norāda ar krāsu gradientu sākot no tumši zila līdz spilgti dzeltenam, kur tumšākie reģioni atbilst vismazākajai pozīcijas kļūdai. Šie dati ļoti labi sakrīt ar pLDDT analīzes datiem, un apstiprina to, ka abu domēnu struktūras tiek uzskatītas kā reģioni, kas ar *AlphaFold* algoritmu paredzētas ar ļoti augstu ticamību. Atsevišķi analizējot sagaidāmās pozīciju kļūdas TMLD modeļa aktīvajā centrā, ar darba autores uzrakstīta *Python v.3* skripta palīdzību izveidots jauns 2D grafiks (2.36. att.), kas parāda pozīciju sakarības starp 15 aminoskābju atlikumiem TML un Fe(II)/αKG paredzamās saistīšanās vietas pirmajā koordinācijas sfērā. Kā redzams, visticamākais reģions

ir modelēts ap Fe(II) koordinācijas (H242, D244 un H389) un  $\alpha$ KG saistīšanās (R391 un R398) vietu. TML paredzamajā saistīšanās vietā lielākā daļa no aminoskābju atlikumiem tiek uzskatīta par reģioniem ar augstu ticamību (Y217, W221, T245, T269, N334, D337 un Y404). Savukārt trim aminoskābju atlikumiem pozīcijas kļūda ir nedaudz lielāka (F223, D231 un Y234). Šie novērojumi atspoguļo TMLD modeļa nepilnības, jo arī *AlphaFold* visticamāk to ģenerē, pamatojoties uz BBOX strukturāliem datiem, kurā D231 vietā ir N191.

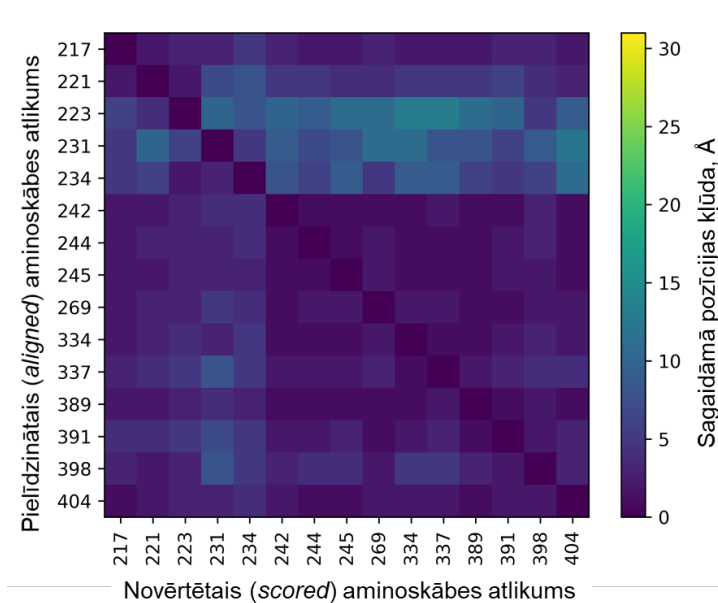


2.34. att. Pilna garuma TMLD enzīma modelis (iegūts no *AlphaFold* [220, 221] datubāzes).

Enzīms atspoguļots kā lentes, kas iekrāsotas atbilstoši pLDDT vērtībām. Varavīksnes krāsojums no sarkanā uz tumši zilo atspoguļo ļoti zemas un ļoti augstas ticamības reģionus. Izveidots *PyMOL* programmā [58].



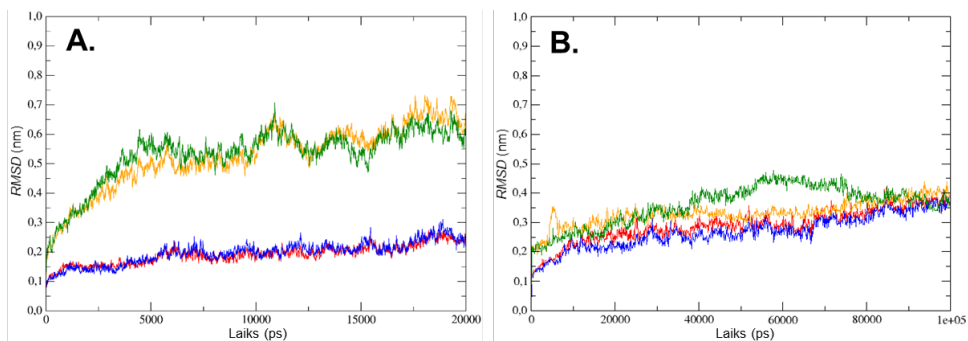
2.35. att. Sagaidāmā pozīcijas kļūda TMLD modeļa aminoskābes atlikumam  $x$ , kad aprēķinātā un eksperimentālā struktūras pielīdzinātas (*aligned*) uz aminoskābes atlikuma  $y$ , aprēķināta ar *AlphaFold*. Tumši zilie reģioni – nav kļūdas, bet dzeltenie – reģioni ar lielu pozīcijas kļūdu.



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

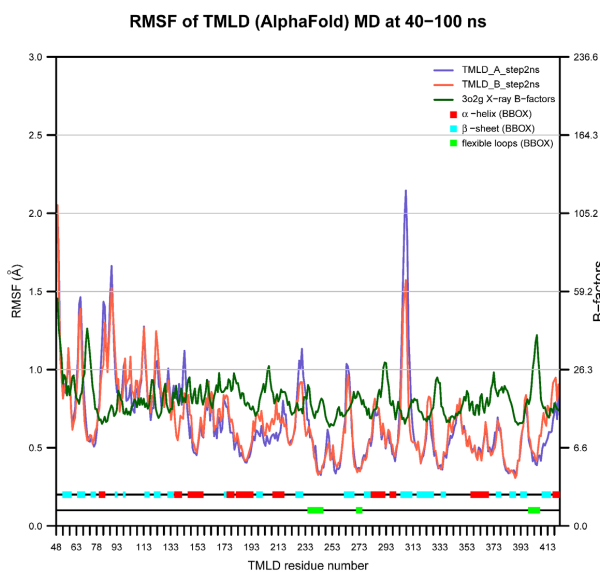
TMLD modeļa struktūras kvalitātes novērtēšana ar *Prime* programmu [249–251] uzrādīja daudz labākus struktūras kvalitātes statistiskos datus (5. pielikums), salīdzinājumā BBOX kristalogrāfisko struktūru (PDB ID 3O2G). Autores maģistra darbā [63] veikts TMLD enzīma homologisko modeļu dizains. Divas MD simulācijas ar identiskiem parametriem (3.9.4. nodaļa) veiktas *Gromacs* programmā, lai salīdzinātu iepriekš iegūtā homologiskā modeļa un *AlphaFold* modeļa struktūru stabilitāti. Kā redzams no *RMSD* aprēķina, homologiskajā modelī jau pašā simulācijas sākumā (< 5 ns) notika 6 Å lielas konformācijas izmaiņas, kas norādīja uz struktūras augsto nestabilitāti (2.37. att., A). Rezultātā, simulāciju apstādināja pēc pirmajām 20 ns. Savukārt, *AlphaFold* modelis MD simulācijas laikā uzvedās daudz stabilāk (2.37. att., B) un tā *RMSD* līdzinājās BBOX (PDB ID 3O2G) simulācijai. *RMSF* analīze (2.38. att.) TMLD (*AlphaFold*) modelim arī neparāda reģionus ar ārkārtīgi lielām fluktuācijām (*RMSF* < 2,5 Å). Visas kustīguma izmaiņas ir salīdzināmas ar BBOX vai tā mutantu *RMSF* vērtībām. Vislielākā *RMSF* vērtība atbilst  $\beta$ -*hairpin* motīvam un  $\beta$ IV/ $\beta$ V savienojošās cilpas reģionam (aminoskābju atlikumi nr. 300–313).

Kopumā TMLD modelis, kas iegūts ar mākslīgo neironu tīkla palīdzību, izskatās daudz stabilāks un ticamāks par iepriekš izveidotajiem homologiskajiem modeļiem un labi sakrīt ar eksperimentālajiem datiem no TMLD mutantiem [69]. Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, TMLD *AlphaFold* modeli turpmāk izmantoja enzīma-ligandu kompleksu modelēšanai, ar nolūku racionalizēt iegūtos eksperimentālos datus un izveidot struktūras-aktivitātes likumsakarības.



2.37. 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* [252] palīdzību [63]. **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.



2.38. att. Vidējās *RMSF* izmaiņas katra aminoskābju atlikuma  $C\alpha$  atomiem 40–100 ns MD simulācijā TMLD (*AlphaFold*) modelim kompleksā ar TML ar norādītiem kristaloģrafiskiem B-faktoriem no PDB ID 3O2G.

*RMSF* ķēdei A – violetā krāsā; *RMSF* ķēdei B – sarkanā krāsā. B-faktori – tumši zaļā krāsā. Otrējās struktūras elementi parādīti kā sarkani, gaiši zilie vai gaiši zaļie taisnstūrīši un attiecīgi atbilst  $\alpha$ -spirālēm,  $\beta$ -lapām vai kustīgām cilpām (noteikti pēc analogijas ar BBOX struktūru).

## 2.3. Aktīva MBP-TMLD iegūšanas optimizācija lielā apjomā

### 2.3.1. Ekspresijas un attīrīšanas apstākļu optimizācija

Sistemātiskai MBP-TMLD izpētei, šo enzīmu nepieciešams iegūt lielā daudzumā. Iepriekš aprakstītā metode [245] ļauj iegūt aktīvu MBP-TMLD ar iznākumu ~ 1 mg/g šūnu. Mūsu laboratorijas apstākļos maksimāli iespējamais iznākums, lietojot šo metodi, ir 6 mg/5 L *2xYT* kultūras, ar ko pilnībā pietiek enzīmātiskiem testiem, kur proteīnu izmanto nM–μM koncentrāciju diapazonā. Savukārt, lai noteiktu enzīma-ligandu saistības termodinamiku, nepieciešamas par kārtu lielāki daudzumi. Šim nolūkam bija nepieciešams optimizēt MBP-TMLD ekspresijas un attīrīšanas protokolu, lai palielinātu gala iznākumu.

#### 2.3.1.1. Ekspresijas barotnes testi

Sākumā tika pārbaudīta *E. Coli* kultivēšanas barotnes ietekme uz MBP-TMLD iznākumu un agregātu veidošanos. Eksperimentam ņemtas četras barotnes:

- 1) *LB* (*Lysogeny broth*) – standarta baktēriju ekspresijas barotne;
- 2) *2xYT* – bagātināta barotne, kurā salīdzinājumā 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 mikroelementiem<sup>13</sup>.

2.5. tabula

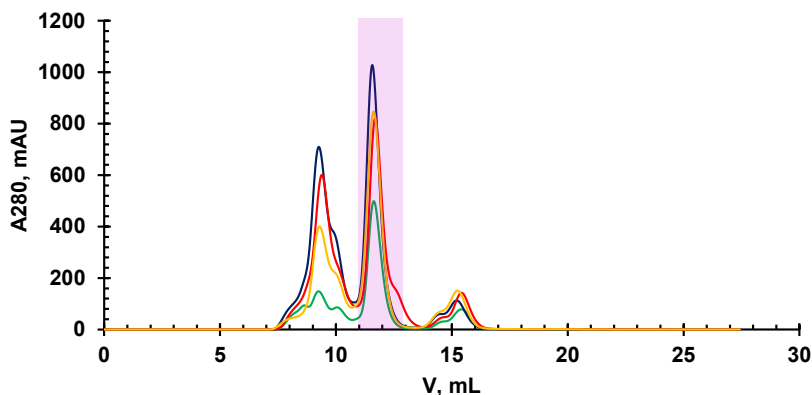
MBP-TMLD iznākumi *E. Coli* kultivēšanas barotnēs

	<i>LB</i>	<i>2xYT</i>	<i>2xYT+Zn(II)</i>	<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>MBP-Trap</i> <sup>TM</sup>	9,7 mg/L	16,5 mg/L	15,6 mg/L	14,2 mg/L
Dimēra daudzums pēc <i>SEC</i>	2,4 mg/g	2,8 mg/g	2,5 mg/g	2,6 mg/g
	0,80 mg/g	1,16 mg/g	0,93 mg/g	0,57 mg/g

Barotnes efekts uz MBP-TMLD iegūšanu novērtēts pēc dimēra iznākumiem no *SEC* hromatogrāfijas (2.5. tab., 2.39. att.). Interesanti, ka neskatoties uz to, ka *TB* barotnei būtu jāveicina šūnu augšana, BL21-AI gadījumā to nenovēroja. Turklāt, pārāk ātra augšana negatīvi ietekmēja MBP-TMLD salocīšanos, kā rezultātā iegūts divreiz mazāk enzīma dimēra nekā *2xYT* barotnē. GroEL/ES šaperonu ekspresija arī bija par ~ 30 % mazāka. Zn(II) piedeva *2xYT* barotnē gala iznākumu neietekmēja. Tomēr *SEC* hromatogrāfijā MBP-TMLD dimēra pīķim (2.39. att., rozā reģions) novērojams papildus plecs (2.39. att., 12,5–13,5 mL), kas iespējams liecina par jaunas dimēra konformācijas veidošanos, jo *SDS-PAGE* gēlā abi reģioni izskatās identiski pēc sava sastāva. Savukārt, *LB* barotnē enzīma iznākumi bija daudz zemāki nekā *2xYT*

<sup>13</sup> Mikroelementu piedevas sastāvs: 50 μM FeCl<sub>3</sub>, 20 μM CaCl<sub>2</sub>, 10 μM MnCl<sub>2</sub> un ZnSO<sub>4</sub>, 2 μM CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> un H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

un *TB* barotnēs. Balstoties uz iegūtajiem datiem, turpmāk enzīma producēšana veikta klasiskajā *2xYT* barotnē.



2.39. att. MBP-TMLD enzīma SEC hromatogrammu no *Superdex*<sup>TM</sup> 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).

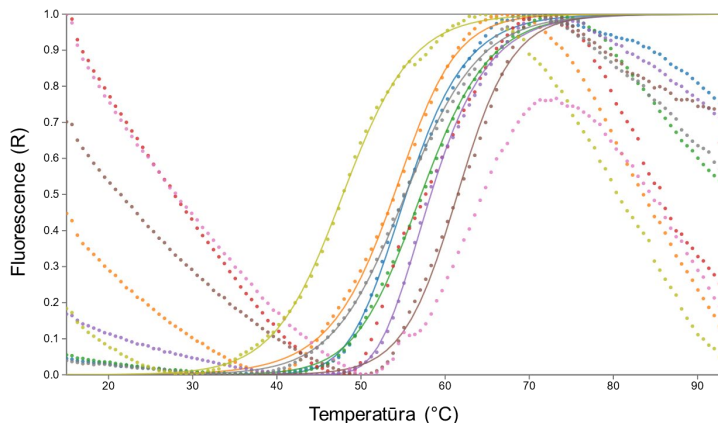
### 2.3.1.2. Stabilizējošo apstākļu meklējumi, izmantojot *TSA* metodi

Lai novērtētu pH, NaCl un KCl koncentrāciju, kā arī vairāku stabilizējošo piedevu ietekmi uz MBP-TMLD stabilitāti, tika pielietota *TSA* metode. 3.8. attēlā (160. lpp.) uzskaitīti 96 apstākļi, kas izmantoti skrīningā. No tiem A1–H7 lauciņos atrodas buferu skrīninga paraugi, bet A8–G12 – stabilizējošo piedevu paraugi vienā buferī (200 mM HEPES pH 7,5 un 400 mM NaCl). Lauciņā H12 atrodas references paraugs, kurā nav ne buferkomponenšu, ne papildus piedevu.

MBP-TMLD izoelektriskais punkts, pI, ir 6,08. Taču jāatceras, ka MBP-TMLD ir *fusion* proteīns, kas sastāv no diviem atsevišķiem proteīniem, kur MBP pI 5,4 un TMLD pI 6,82. Dažās *TSA* līknēs novēroja divus blakus esošus minimumus (5–10 °C attālumā), kas visticamāk liecina par to, ka viens no proteīniem sāk denaturēties ātrāk par otru. Turklāt TMLD dabiskā forma ir dimērs, un *TSA* metodē, iespējams, varētu novērot fluorescences signāla pieaugumu, kas saistīts ar dimēra sabrukšanu, jo atbrīvojas papildus hidrofobā virsma. Ņemot vērā augsto TMLD nestabilitāti, tika pieņemts, ka tas denaturējas pirmais. Rezultātā, visas iegūtās  $T_m$  vērtības ir lielākas par 35 °C un atbilst pirmajam minimumam. Normalizēto *TSA* līkņu piemērs redzams 2.40. attēlā, bet iegūtās  $\Delta T_m$  vērtības (relatīvi pret referenci) uzskaitītas 2.6. tabulā.

No iegūtajiem datiem redzams, ka enzīms ir maksimāli stabils pie pH 7,0 un pH 7,5, kas ir par vismaz vienu vienību lielāks nekā pI, un ir vismazāk stabils – pie pH 4,5 un pH 10,0, kas ir ļoti ekstrēmi apstākļi. Trīs buferī pie pH 8,0 enzīms arī uzrādīja pietiekami augstu stabilitāti salīdzinājumā ar MES pH 6,0. Palielinot NaCl daudzumu paraugā, lielas izmaiņas nenovēroja, tomēr enzīmu stabilizējošā sāls koncentrācija bija 200–500 mM robežās, bet sāls 1000 mM

koncentrācijā nedaudz destabilizēja enzīmu. Starpību starp NaCl un KCl nenovēroja. Interesanti, ka augstākās sāls koncentrācijās stabilizējošo efektu novēro arī 200 mM MES pH 6,0 buferim. Tas nozīmē, ka paaugstināts sāls daudzums spēj novērst proteīna agregātu veidošanos arī pie pH ~ pI, kad proteīna summārais lādiņš ir nulle. Savukārt, 10 % glicerīna piedeva stabilizēja proteīnu plašākā pH diapazonā: 6,0 – 8,0.



2.40. att. Normalizēto TSA līkņu piemērs MBP-TMLD skrīningam, variējot buferu komponentes.

MBP-TMLD buferos bez sāls piedevas: 200 mM Na acetāts pH 4,5 (dzeltenā līkne); 200 mM Na citrāts pH 5,0 (pelēkā līkne); 200 mM MES pH 6,0 (gaiši rozā līkne); 200 mM PIPES pH 7,0 (brūnā līkne); 200 mM HEPES pH 7,5 (violetā līkne); 200 mM Tris pH 8,0 (tumši rozā līkne); 200 mM Bis-Tris propāns pH 9,0 (zaļā līkne); 200 mM CAPS pH 10,0 (oranžā līkne). Reference ar ūdens piedevu bufera vietā (gaiši zilā līkne).

2.6. tabula

MBP-TMLD TSA  $\Delta T_m$  izmaiņas atkarībā no bufera sastāva

$T_m$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-5.3	-8.1	-10.6	-13.2	-18.8	-8.4	-6.6	-2.2	1.0	1.6	0.3	x
B	0.6	0.3	-1.5	-2.5	-0.2	0.1	2.3	-3.5	1.3	3.0	-11.6	-1.4
C	0.9	3.2	1.0	4.0	4.0	3.2	5.9	-1.3	x	2.4	4.7	-7.2
D	6.6	3.1	2.5	2.2	3.2	2.1	5.7	2.3	-12.7	1.9	3.4	-2.5
E	3.1	2.3	2.1	0.9	1.9	1.0	5.0	2.2	1.8	1.9	5.0	-4.1
F	0.0	0.1	-0.1	-2.6	0.7	-1.1	4.6	0.6	2.2	1.1	3.6	-4.4
G	-1.7	-1.2	-1.6	-5.5	-4.7	-5.0	-1.3	-5.3	2.4	0.7	6.1	-1.8
H	-7.7	-11.5	-11.0	-13.8	-13.3	-4.8	-7.6	1.1	2.6	0.1	4.9	Ref.

Tabulas ailes nokrāsotas atbilstoši  $\Delta T_m$  vērtības lielumam, kur sarkans – vismazākā, bet zaļš – vislielākā vērtība. x – datus nevarēja nolasīt augsta trokšņa dēļ, ko ievieš 2 % Tween-20 un 2 % Triton X-100 deterģentu piedevas.

No stabilizējošām piedevām (3.8. att., A8–G12) vienīgie, kas uzrādīja pozitīvu ietekmi uz MBP-TMLD stabilitāti, neatkarīgi no koncentrācijas, bija cukuri: D-trehaloze, D-saharoze un L-arabinoze, un L-Arg un L-Glu aminoskābju piedevas. Enzīma stabilitāti uzlaboja arī nātrija fosfāta piedeva. Tomēr ņemot vērā, ka divvērtīgu metālu fosfāta sāļi ūdenī



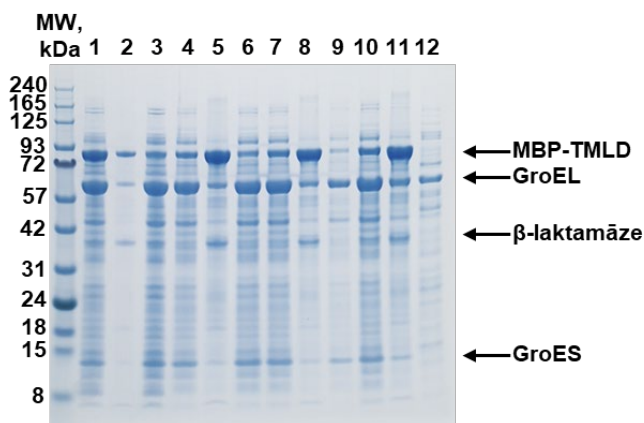
nešķīst vai šķīst ļoti slikti ( $< 50 \mu\text{M}$ ), eksperimentiem ar MBP-TMLD tie neder. Savukārt, jebkuru metālu sāļu, spirtu vai deterģentu piedevas destabilizēja enzīmu.

Rezultātā, turpmākos eksperimentos būtu jāizmanto PIPES, HEPES vai Tris buferi pH 7,0–8,0 kopā ar NaCl vai KCl  $< 1000 \text{ mM}$  koncentrācijās.

### 2.3.1.3. Stabilizējošo piedevu testi šūnu sonifikācijas laikā

Ņemot vērā pieredzi ar BBOX mutantu ekspresiju, izmēģināts ekspresēt MBP-TMLD zemākās temperatūrās. Kā redzams no *SDS-PAGE* analīzes (2.41. att., 1.–6. kontroles paraugs), ekspresējot enzīmu  $20^\circ\text{C}$ , ievērojami uzlabojās šķīstošā proteīna īpatsvars:

- 1)  $37^\circ\text{C}$ : attiecība starp šķīstošo un nešķīstošo enzīmu pēc intensitātēm *SDS-PAGE* gēlā  $\sim 40\%/60\%$  (4., 5. kontroles paraugs);
- 2)  $20^\circ\text{C}$ : attiecība starp šķīstošo un nešķīstošo enzīmu pēc intensitātēm *SDS-PAGE* gēlā  $\sim 70\%/30\%$  (1., 3. kontroles paraugs).



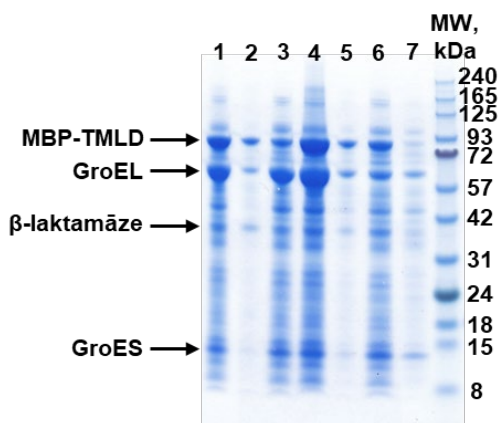
2.41. att. MBP-TMLD ekspresijas un attīrīšanas apstākļu optimizācijas  $20^\circ\text{C}$  un  $37^\circ\text{C}$  *SDS-PAGE* analīze.

1.–3. un 4.–12. kontroles paraugs atbilst enzīma porcijām, kas ekspresētas attiecīgi  $20^\circ\text{C}$  un  $37^\circ\text{C}$ .

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  $0,7 \text{ M}$  *D*-trehalozi. 1., 4., 7. un 10. paraugi – supernatants, kas satur šķīstošo enzīmu; 3., 5., 8. un 11. – šūnu nogulsnes, kas satur nešķīstošo enzīmu; 2., 6., 9. un 12. caurplūde no *HisTrap*<sup>TM</sup> kolonnas mazgāšanas ar buferi A2.

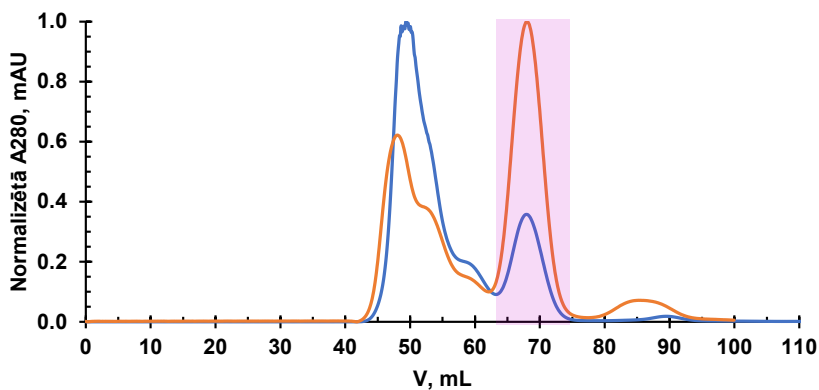
Tālāk pārbaudīta stabilizējošo piedevu ietekme uz MBP-TMLD šķīdības uzlabošanu paraugiem, kas ekspresēti  $37^\circ\text{C}$  (2.41. att., 7.–12.) un  $20^\circ\text{C}$  (2.42. att., 1.–7.). Kā stabilizējošās piedevas, atbilstoši *TSA* rezultātiem, izmantoja  $10\%$  (v/v) glicerīnu vai  $0,7 \text{ M}$  *D*-trehalozi. Kā redzams no *SDS-PAGE* gēla (2.41. att., 7., 8. un 2.42. att., 1., 2.) glicerīna piedeva minimāli palielināja šķīstošā enzīma daudzumu salīdzinājumā ar atbilstošiem paraugiem bez piedevām. Šķīdība ievērojami uzlabojās paraugos ar  $0,7 \text{ M}$  *D*-trehalozes piedevu (2.41. att., 10., 11. un 2.42. att., 4., 5.). Savukārt, maksimālais iznākums iegūts paraugam, kas ekspresēts  $20^\circ\text{C}$ . Vēl viena atšķirība no oriģinālā attīrīšanas protokola ir *HisTrap*<sup>TM</sup> afinitātes kolonnas izmantošana *MBP-Trap*<sup>TM</sup> vietā, jo *D*-trehaloze izkonkurē MBP proteīnu no saistīšanās pie kolonnas.

Salīdzinot agregātu un MBP-TMLD dimēra daudzumu pēc attīrīšanas uz *SEC* kolonnas (2.43. att.), redzams, ka paraugā, kas ekspresēts 20 °C un sonificēts *D*-trehalozes klātbūtnē, šķīstošā enzīma daudzums ir par ~ 70 % lielāks. *SDS-PAGE* analīze pēc *SEC* hromatogrāfijas, uzrāda 95 %+ tīru enzīmu (2.44. att.). 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 darba autores publikācijā [253].



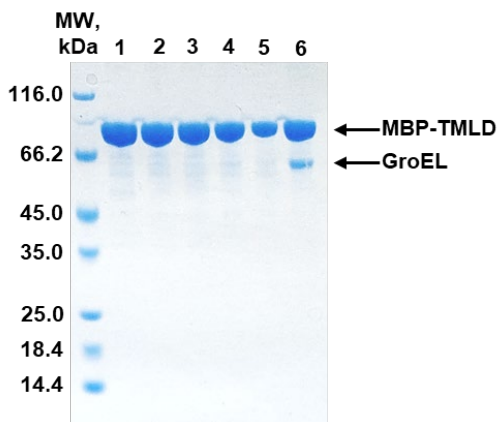
2.42. att. MBP-TMLD ekspresijas un attīrīšanas apstākļu optimizācija 20 °C *SDS-PAGE* analīze.

1.–3. kontroles paraugs – enzīma porcija sonificēta lizēšanas buferī ar 10 % (v/v) glicerīnu; 4.–7. – enzīma porcija sonificēta lizēšanas buferī ar 0,7 M *D*-trehalozi. 1. un 4. kontroles paraugs – supernatants, kas satur šķīstošo enzīmu; 2. un 5. – šūnu nogulsnes, kas satur nešķīstošo enzīmu; 3., 6. un 7. caurplūde no *HisTrap*<sup>TM</sup> kolonnas mazgāšanas ar buferi A2.



2.43. att. MBP-TMLD enzīma *SEC* hromatogrammu no *HiLoad* 16/600 *Superdex*<sup>TM</sup> 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).

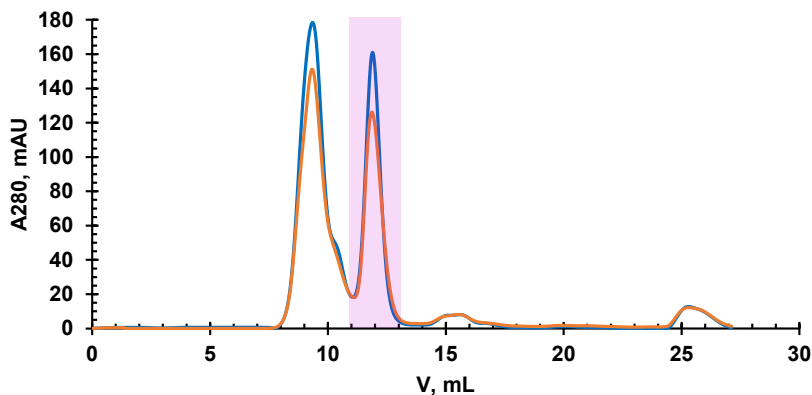


2.44. att. MBP-TMLD attīrīšanas stadiju *SDS-PAGE* analīze.

1.–3. un 4.–6. kontroles paraugs – pīķu frakcijas no *HiLoad 16/600 Superdex™ 200pg* kolonnas, kas satur MBP-TMLD un attiecas uz paraugiem, kas sonificēti attiecīgi bez un ar 0,7 M *D*-trehalozi.

### 2.3.2. EDTA ietekme uz MBP-TMLD

MBP-TMLD ir metaloenzīms, kam katalītiskai aktivitātei nepieciešams Fe(II). Veicot enzīma attīrīšanu no *E. Coli* šūnām, tās nonāk saskarsmē ar daudziem citiem metāla joniem, t. sk. arī ar Fe(II), Fe(III) un Zn(II), daži no kuriem potenciāli var piesaistīties enzīma aktīvajā centrā un šādi samazināt tā aktivitāti. Lai pārbaudītu vai MBP-TMLD aktīvajā centrā ir sastopami jebkādi metāla joni, izmēģināts apstrādāt to ar etilēndiamīntetraetiķskābi (EDTA), ko plaši pielieto kā helatējošo aģentu metālu “izņēšanai” no proteīniem.



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

MBP-TMLD attīrīts bez (līkne zilā krāsā) un ar (līkne oranžā krāsā) pirmsapstrādi ar četrcārtīgo EDTA pārākumu pirms *SEC* hromatogrāfijas. Rozā reģions parāda pīķi, kas atbilst enzīma dimēram (~ 174 kDa).

MBP-TMLD saturošās frakcijas pēc *HisTrap*<sup>TM</sup> afinitātes kolonnas tika sadalītas divās daļās. Vienai no tām pievienots EDTA 5-kārtīgā pārkumā. Otrais paraugs atstāts kā reference. Nākamajā dienā abus enzīma paraugus attīrīja uz *SEC* kolonnas. Kā redzams no hromatogrammām (2.45. att.), pirmsapstrāde ar EDTA neietekmēja enzīma struktūru vai konformāciju.

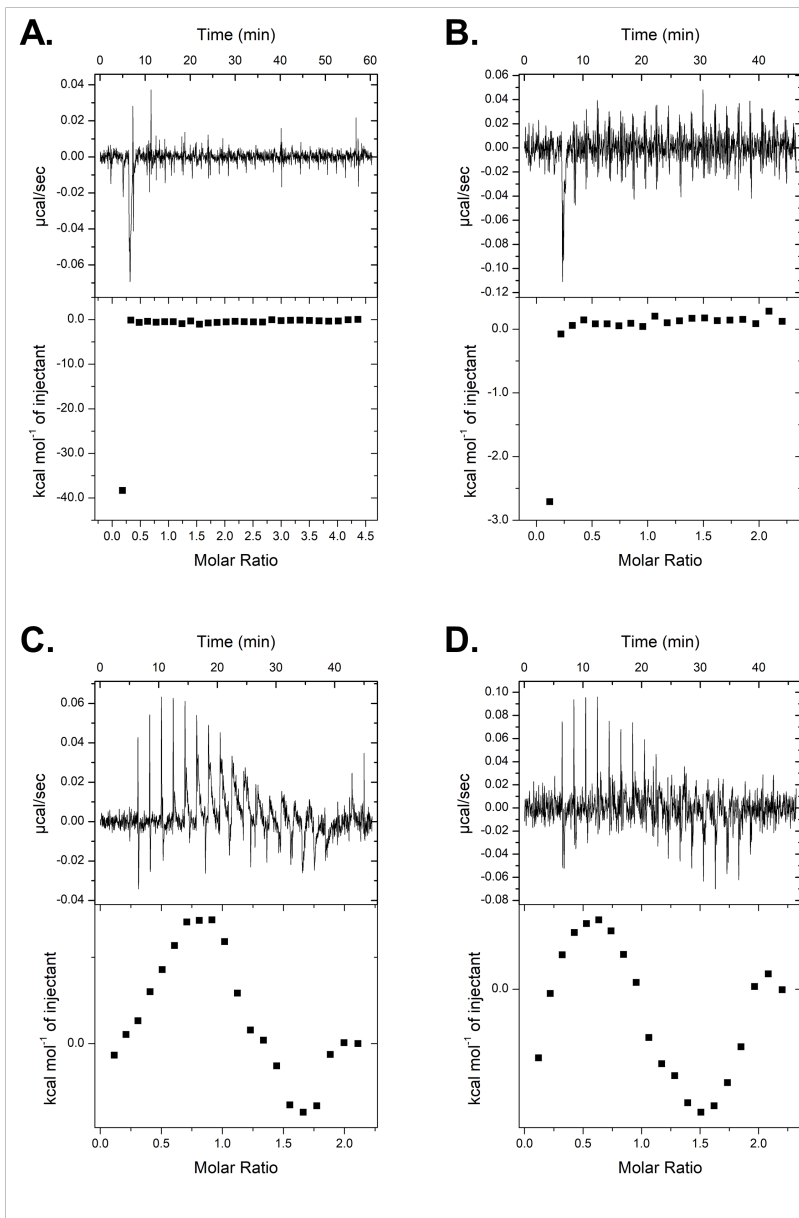
Enzīma aktivitāte pēc tam pārbaudīta ar *ITC* metodi<sup>14</sup>. Vispirms notestēts vai EDTA reaģē ar *ITC* buferi (50 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl). Kā redzams 2.46. attēlā A, HEPES buferī, kas ir 99 %+ tīrs (bioloģiskā tīrības pakāpe) ir kaut kāds neliels metālu piemaisījums, uz ko reaģē EDTA. Titrējot apo-MBP-TMLD, kas nebija apstrādāts ar EDTA, novēro termogrammu ļoti līdzīgu EDTA reakcijai ar buferi (2.46. att., B). Savukārt, piesātinot MBP-TMLD ar Zn(II) vai Zn(II)/OGA<sup>15</sup> (attiecīgi 2.46. att. C un D), novēro viļņveidīgu profilu. Tā kā enzīma piesātinājumam izmantoja divreiz lielākas kofaktoru koncentrācijas (lai pilnībā piesātinātu enzīmu), šāds *ITC* līknes izskats visticamāk liecina par to, ka šķīdumā notiek divās reakcijas: (i) ar brīviem un (ii) ar enzīmu saistītiem Zn(II) joniem. Endotermiskais efekts eksperimenta sākumā norāda, ka notiek ievērojamas konformacionālas un sistēmas solvatācijas izmaiņas (entropijas komponente). Savukārt, eksotermiskais efekts, kas dominē beigu daļā, visticamāk atspoguļo tikai brīvo jonu un EDTA saistīšanos.

Šie EDTA testi parāda, ka aktīvajā centrā nav vērā ņemamu jonu, kas reaģētu ar EDTA. Tomēr nav skaidrs, vai enzīmam ir Zn(II) pirkstu motīvs, jo EDTA ir pietiekami stiprs reaģents, lai izrautu strukturēto cinku arī no tā. Strukturētā cinka noteikšanai būtu jāizmēģina spēcīgākie helatējošie aģenti, piemēram, tādu kā Ebselen, kas ir BBOX helatējošais inhibitors ar potenciālām kardioprotektīvām īpašībām [52, 254].

Turpinot aktivitātes uzlabošanas pētījumus, pārbaudīts vai MBP-TMLD, kas nebija apstrādāts ar EDTA, spēj saistīt dabisko substrātu, TML. Pieņemot, ka aktīvajā centrā varētu būt metāla joni, kas nereaģē ar EDTA, MBP-TMLD divkārtējā pārkumā piesātināts tikai ar OGA. Pēc tam veikta izveidotā kompleksa titrēšana ar TML. Iegūtie dati (2.47. att., A) apstiprina, ka enzīma aktīvajā centrā nav vērā ņemama metālu jonu klātbūtne. Pēc tam pārbaudīta divu enzīmu paraugu, kas iegūti bez un ar EDTA pirmsapstrādi, reakcija ar TML. Abi MBP-TMLD paraugi piesātināti ar divkārtēju kofaktoru [Zn(II)/OGA] pārkumu pirms titrēšanas eksperimenta. Iegūtās līknes (2.47. att., B) ļauj secināt, ka inkubācija ar EDTA pirms *SEC* hromatogrāfijas neietekmēja enzīma aktivitāti, par ko liecina identisks līkņu izskats un vienāda stehiometrija. Iegūtie dati aprakstīti darba autores publikācijā [253].

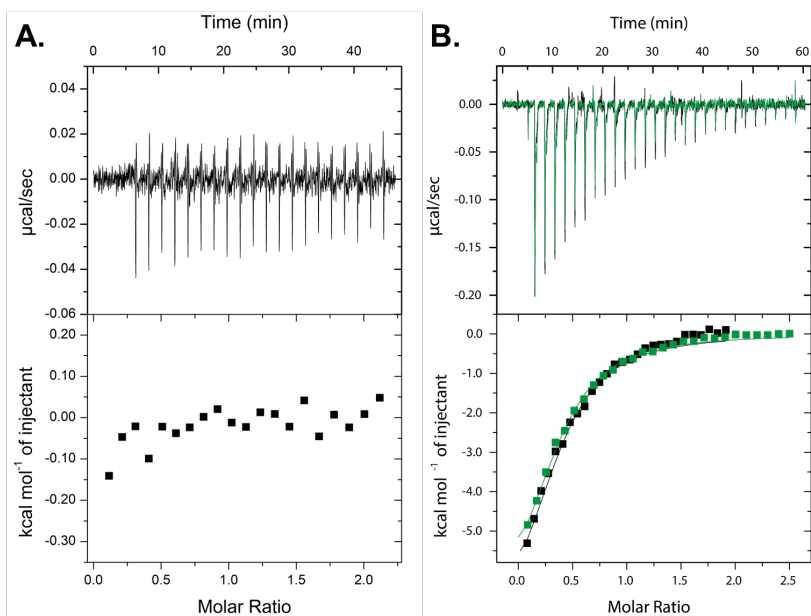
<sup>14</sup> *ITC* metodes izstrāde aprakstīta 2.4. nodaļā, bet detalizēts protokols – 3.5.1. nodaļā.

<sup>15</sup> OGA – *N*-oksalilglicīns,  $\alpha$ KG izostērs (2.48. att.)



2.46. att. ITC titrēšanas dati EDTA mijiedarbībai ar ITC buferi un MBP-TMLD, 25 °C.

**A.** ITC bufera (HEPES) titrēšana ar EDTA. **B.** apo-MBP-TMLD (bez kofaktoru pievienošanas) titrēšana ar EDTA ar matemātiski atņemt u bāzes līniju (A). **C.** MBP-TMLD kompleksa ar Zn(II) divkārtējā pārākumā titrēšana ar EDTA. **D.** MBP-TMLD kompleksa ar Zn(II)/OGA divkārtējā pārākumā titrēšana ar EDTA.

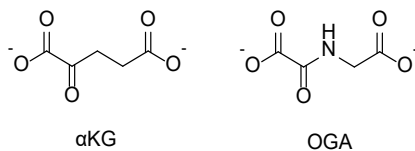


2.47. att. MBP-TMLD *ITC* titrēšanas dati uzņemti 25 °C temperatūrā.

**A.** MBP-TMLD kompleksa ar OGA (divkārtējā pārākumā) titrēšana ar TML. **B.** MBP-TMLD, kas atīrīts bez EDTA (melnā krāsā) un ar EDTA (zaļā krāsā), kompleksa 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  $\alpha$ KG. Kā parādīja iepriekšējie pētījumi (2.3.2. nodaļa), bez kofaktoru klātbūtnes dabiskā substrāta saistība pie enzīma nenotiek. Savukārt, ja pie enzīma pievieno Fe(II)/ $\alpha$ KG, novēro momentānu enzīmātisko reakciju. Rezultātā, lai novērtētu tikai liganda saistības siltumefektus, nevis reakcijas siltumefektus, dabiskie kofaktori jāaizvieto ar izostēriem, kas pildītu līdzīgu strukturālo funkciju, bet nevarētu nodrošināt enzīmātisko reakciju.



2.48. att.  $\alpha$ KG un OGA struktūru salīdzinājums.

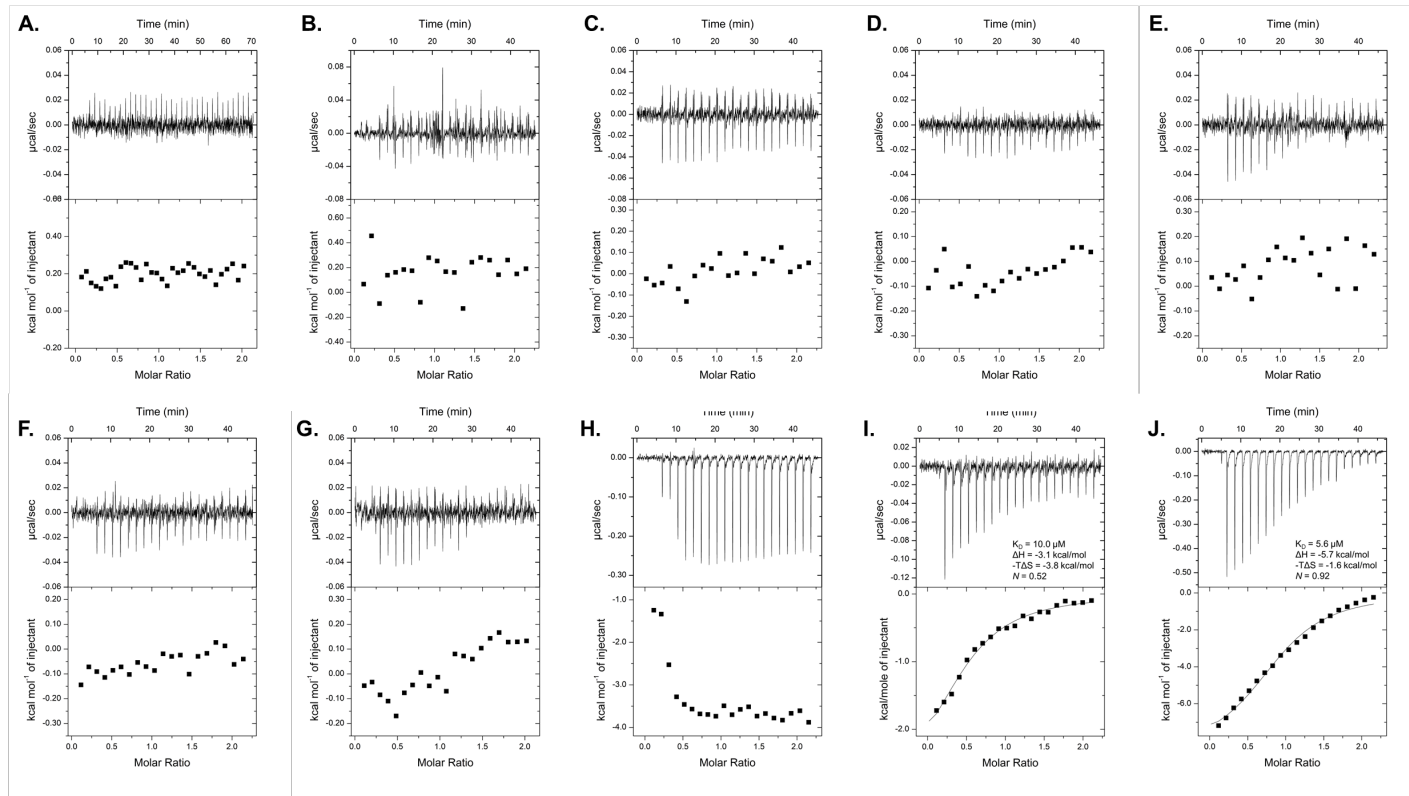
$\alpha$ KG izostērs, OGA, ir labi zināms, ko plaši pielietoja BBOX kristalizācijas un *ITC* pētījumos [50, 255]. Savstarpēji  $\alpha$ KG un OGA atšķiras tikai ar vienu grupu: CH<sub>2</sub> vietā OGA ir NH grupa (2.48. att.). Savukārt, kā Fe(II) izostērs var kalpot vairāku metālu joni, kuru izmēri ir līdzīgi kā dzelzij un kas var veidot sešas koordinācijas saites. Analizējot pieejamo informāciju par jonu rādusiem, skrīningam tika atlasīti šādi metālu sāļi: NiCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>,

CrCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> un CaCl<sub>2</sub>. Papildus pārbaudīta arī (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> kombinācija ar OGA. Pirmajā piegājienā vislielākās cerības tika liktas uz NiCl<sub>2</sub> un ZnCl<sub>2</sub>, kas deva vislabākos rezultātus *ITC* eksperimentos ar BBOX [255]. Interesanti, ka MBP-TMLD gadījumā *ITC* titrēšanas eksperimentā ar TML Ni(II)/OGA kombinācija izrādījās neaktīva (2.49. att., A). Līdzīgi, saistības siltumefektus nenovēroja OGA kombinācijās ar Cu(II), Ca(II) un Mg(II) [2.49. att., B–D]. OGA kombinācijās ar Fe(III), Mn(II) un Cr(II) novēroja minimālas siltumefekta izmaiņas (2.49. att., E–G), kas varētu atspoguļot ļoti vāju saistību. Tas nozīmē, ka šie metāli arī nespēj pietiekami stabilizēt enzīma aktīvo centru, lai notiktu substrāta saistība. Savukārt, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/OGA kombinācija izrādījās neefektīva pateicoties Fe(II) autooksidācijai HEPES buferī, kas rada ļoti lielu fona siltumefektu. Tas pilnībā aizsedz enzīma-liganda saistības siltumefektus (2.49. att., H). Vienīgie metāli, kas kombinācijā ar OGA uzrādīja ievērojamu siltumefekta izmaiņu titrēšanas eksperimentā ar TML, bija Co(II) un Zn(II) [2.49. att., I–J]. Tomēr Zn(II) gadījumā izdalītais siltums bija vismaz 4 reizes lielāks, tāpēc turpmākajos eksperimentos kā Fe(II) izostērs izmantots Zn(II).

Tā kā Zn(II) izostērs viens pats arī novērs enzīmātisko reakciju, izmēģināta arī Zn(II)/αKG kofaktoru kombinācija. Tā kā lielu izmaiņu TML saistības siltumefektus nenovēroja (2.50. att.), tad par labāko kofaktoru variantu *ITC* eksperimentiem tika atzīta Zn(II)/OGA kombinācija.

Iepriekšējos eksperimentos kofaktori tika pielikti pie enzīma divkārtējā pārkumā. Parasti titrēšanas eksperimentos novēroja stehiometriju, *N*, robežās 0,6–0,8. Rezultātā radās jautājums, vai šī stehiometrija atspoguļo attiecību aktīvs/neaktīvs enzīms, vai arī liecina par nepietiekošu enzīma piesātinājumu ar kofaktoriem. Šim nolūkam veikti trīs secīgi eksperimenti, kuros pētīts kofaktoru pārkuma efekts uz *ITC* eksperimentā novērojamo stehiometriju un enzīma aktivitāti. Iegūtie dati atspoguļoti 2.51. attēlā. Kā redzams, pie MBP-TMLD-kofaktoru attiecības ~1, novēroja *N* ~ 0,92 (2.51. att., A). Divas reizes palielinot kofaktoru koncentrāciju, stehiometrija nedaudz uzlabojās, *N* ~ 0,94 (2.51. att., B). Tomēr, ņemot vērā tik mazo izmaiņu, iespējams, ka tā ir saistīta ar paraugu sagatavošanu nevis ar kofaktoru koncentrācijas palielināšanu, jo proteīnu absolūtu viendabīgumu starp dažādiem paraugiem nodrošināt nav iespējams. Negaidīti, palielinot kofaktoru koncentrāciju līdz četrkārtējam pārkumam, novēroja stehiometrijas samazināšanos līdz *N* ~ 0,24 (2.51. att., C), kas liecina par pārāk augstas kofaktoru koncentrācijas toksiskumu MBP-TMLD enzīmam. Iespējams, tas saistīts ar Zn(II) jonu paaugstinātu spēju veicināt proteīnu izgulsnēšanu.

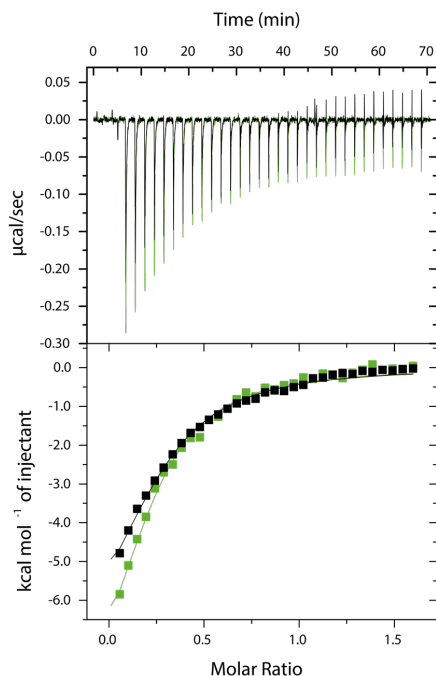
Rezultātā, turpmākajos *ITC* eksperimentos ar MBP-TMLD enzīmu kā kofaktori izmantoti Zn(II)/OGA, kas divkārtējā pārkumā tika pielikti enzīmam tieši pirms eksperimenta. Šāda pieceja deva iespēju iegūt S-tipa līknes ne tikai dabiskajam substrātam, TML, bet arī tā analogiem. Iegūtie termodinamiskie dati ir aprakstīti 2.5. nodaļā un apkopoti 2.7. tabulā. Iegūtie dati aprakstīti darba autores publikācijā [253].



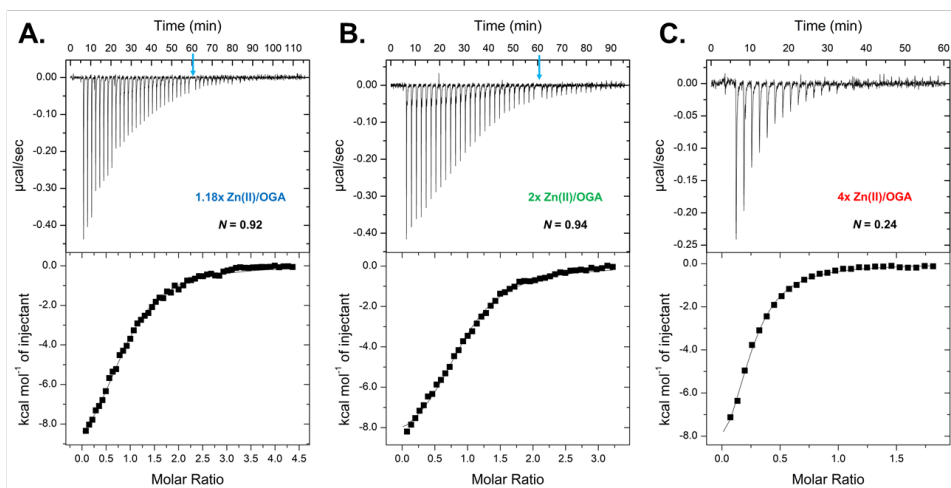
2.49. att. *ITC* titrēšanas līknes MBP-TMLD kompleksā ar OGA un dažādu metālu joniem (divkārtējā pārākumā) titrēts ar TML, 25 °C.

**A.** MBP-TMLD+OGA/Ni(II); **B.** MBP-TMLD+OGA/Cu(II); **C.** MBP-TMLD+OGA/Ca(II); **D.** MBP-TMLD+OGA/Mg(II); **E.** MBP-TMLD+OGA/Fe(III);  
**F.** MBP-TMLD+OGA/Mn(II); **G.** MBP-TMLD+OGA/Cr(II); **H.** MBP-TMLD+OGA/Fe(II); **I.** MBP-TMLD+OGA/Co(II); **J.** MBP-TMLD+OGA/Zn(II).





2.50. att. *ITC* titrēšanas līknes MBP-TMLD kompleksiem ar Zn(II)/OGA (melnā līkne) un ar Zn(II)/ $\alpha$ KG (zaļā līkne) divkārtējā pārākumā titrēts ar TML, 25 °C.



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

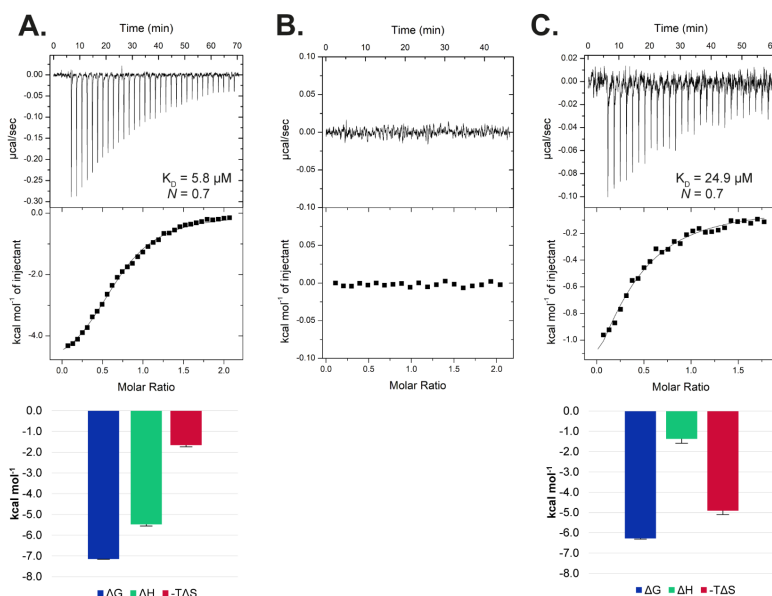
MBP-TMLD kompleksā ar Zn(II)/OGA **A.** 1,18-kārtējā pārākumā; **B.** divkārtējā pārākumā; **C.** četrkārtējā pārākumā. Gaiši zilās bultiņas parāda *ITC* šļirces atkārtotu uzpildi.

## 2.5. TMLD struktūras-aktivitātes likumsakarību izpēte

### 2.5.1. TML analoģu saistības likumsakarību izpēte

Endogēnais substrāts, TML, *ITC* eksperimentos uzrādīja eksotermisko saistības siltumefektu ar stehiometriju 1:1. Proti, viena liganda molekula saistās pie vienas MBP-TMLD monomēra molekulas (2.52. att., A). Izmaiņas aktīvā enzīma daudzumā paraugā izraisīja nelielas novirzes no  $N = 1$ , kas neietekmēja saistības termodinamisko parametru noteikšanu.

TML gadījumā noteiktā  $K_D$  vērtība ir  $5,78 \mu\text{M}$  (2.7. tab.). Termodinamiskais saistības profils parāda saistībai-labvēlīgas entalpijas,  $\Delta H$ , un entropijas,  $-\Delta S$ , komponentes (2.52. att., A). Turklāt, absolūtās vērtībās  $\Delta H$  ir 3,3 reizes lielāks nekā  $-\Delta S$ , kas liecina par dominējošo entalpijas virzīto (*enthalpy-driven*) saistības mehānismu (piemēram, caur elektrostatiskām mijiedarbībām, VdW un/vai ūdeņraža saišu veidošanos, kā arī preferenciālās desolvatācijas un konformacionālās pārvērtības). Ņemot vērā pašreizējās zināšanas par TMLD aktīvā centra struktūru, var pieņemt, ka šāds termodinamiskais profils atbilst katjona- $\pi$  mijiedarbībām ar  $\epsilon\text{-(CH}_3)_3\text{N}^+$  grupu un aminoskābju atlikumiem, kas veido “aromātisko būri” (Y217, W221, F223 un Y234), kopā ar ūdeņraža saišu veidošanos starp  $\alpha\text{-NH}_3^+$  grupu un D231, kā arī starp  $\text{COO}^-$  grupu un N334. 2.53. attēlā, A, ir atspoguļots enzīma-TML kompleksa modelis, kas iegūts ar *Induced Fit* dokinga (*IFD*) [256, 257] palīdzību, izmantojot pilna garuma TMLD modeli no *AlphaFold*. (2.34. att.) [220, 221].



2.52. 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.

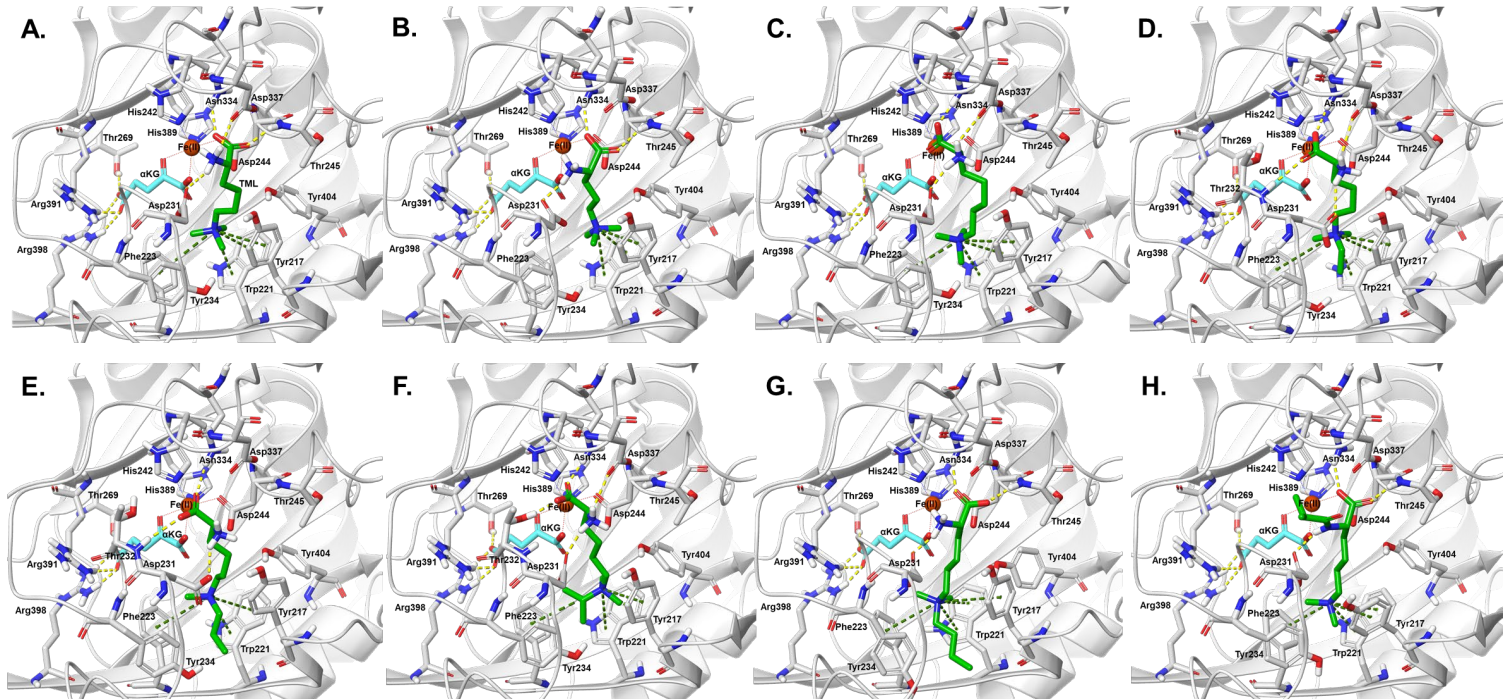
ITC termodinamiskie dati un KMR konversijas pakāpes MBP-TMLD mijiedarbībai/reakcijai ar TML un tā analogiem 25 °C temperatūrā

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

<sup>a</sup> Savienojumi 9–15 (2.54. att.) neuzrādīja saistību ITC un konversiju enzīmātiskās reakcijas eksperimentos.

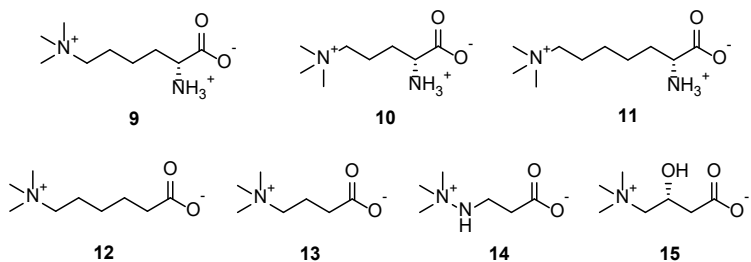
<sup>b</sup> H – hidroksilēts substrāts.

<sup>c</sup> S/H – sukcināta/hidroksilētā substrāta attiecība.



2.53. att. TMLD aktīvā centra modeļi, kas iegūti ar *IFD* ar dažādiem ligandiem, parādot apkārt esošos aminoskābju atlikumus un kofaktorus.

A. TML (1); B.  $\delta$ -trimetil-*L*-ornitīns (2); C.  $\zeta$ -trimetil-*L*-homolizīns (3); D.  $\varepsilon$ -dimetiletil-*L*-lizīns (4); E.  $\varepsilon$ -dimetilpropil-*L*-lizīns (5); F.  $\varepsilon$ -dimetilizopropil-*L*-lizīns (6); G.  $\varepsilon$ -dimetilbutil-*L*-lizīns (7); H.  $\alpha$ -*N*-izobutiril- $\varepsilon$ -trimetil-*L*-lizīns (8). Aminoskābju atlikumi atspoguļoti kā pelēkas trubiņas. Kofaktori: Fe(II) atspoguļots kā brūna lode, bet  $\alpha$ KG – kā gaiši zilas trubiņas. Ligands atspoguļots kā zaļas trubiņas. Ūdeņraža saites parādītas kā dzeltenas, bet katjonu- $\pi$  mijiedarbības – kā zaļas pārtrauktas līnijas, nepolārie ūdeņraži netiek atspoguļoti.



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

Lai izpētītu struktūras aktivitātes likumsakarības, Latvijas Organiskās sintezēs institūtā (LOSI) sintezēta virkne TML analoģu kā potenciāli TMLD inhibitori. Savienojumu dizains daļēji balstīts uz BBOX inhibitoru dizaina eksperimentāliem datiem (2.8. tab.) [255]. Ligandiem variēja alifātiskās ķēdes garumu (savienojumi 2, 3), aizvietotājus pie  $\epsilon$ -N (savienojumi 4–7) vai pie  $\alpha$ -N slāpekļa atoma (savienojums 8). Daži *D*-izomēri (savienojumi 9–11) un savienojums bez  $\alpha$ -aminogrupas (12) bija sintezēti kā negatīvā kontrole (2.54. att.). Savienojumu sintēze aprakstīta darba autores rakstā [253].

2.8. tabula

Jauno TMLD substrātu [253] un zināmo BBOX substrātu [255] salīdzinājums

#	TMLD	BBOX	BBOX PDB ID	BBOX IC <sub>50</sub> , $\mu$ M	BBOX K <sub>D</sub> , $\mu$ M
1			3O2G [50]	x	4,9 $\pm$ 0,2
	nav analoģu		3MS5 [50]	34–62	24 $\pm$ 4
4			4C5W [255]	3,3 $\pm$ 1,8	46 $\pm$ 10
5			n/d	> 1000	n/d
6			n/d	5,7 $\pm$ 1,6	n/d
7			n/d	> 1000	n/d

n/d – eksperimentālie dati BBOX enzīmam nav pieejami.

Visus savienojumus 2–15 notestēja ar ITC pēc izstrādātā protokola, līdzīgi kā TML. Sagaidāmi, visi *D*-izomēri neatkarīgi no ķēdes garuma [*D*-TML (9),  $\delta$ -trimetil-*D*-ornitīns (10), un  $\zeta$ -trimetil-*D*-homolizīns (11)], tāpat kā  $\epsilon$ -trimetilaminoheksanoāts (12) nesaistījās pie MBP-

TMLD (piemēram, 2.52. att., B). *ITC* eksperimentā saistību neuzrādīja arī  $\alpha$ -*N*-izobutiril- $\epsilon$ -trimetil-*L*-lizīns (**8**). Iegūtie dati liecina, ka veiksmīgai liganda saistībai enzīmam nepieciešama stēriski neapgrūtinātā (*unhindered*) primārā aminogrupa ar *L*-stereoķīmiju.

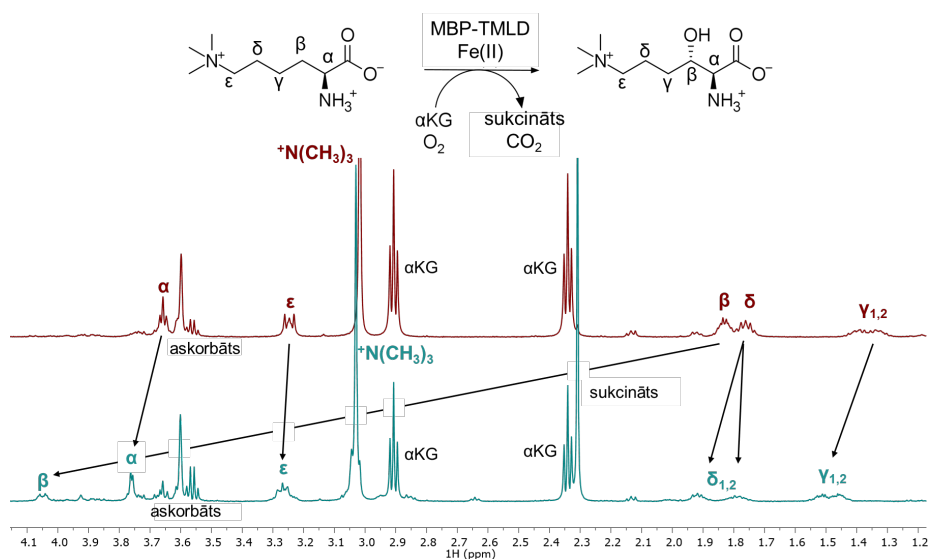
TML analogs ar īsāko alifātisko ķēdi,  $\delta$ -trimetil-*L*-ornitīns (**2**), uzrādīja afinitāti ( $K_D$  7,6  $\mu$ M) salīdzināmu ar dabiskā substrāta afinitāti. Tomēr tā entalpijas/entropijas komponentu sadalījums no TML atšķiras par 1 kcal·mol<sup>-1</sup> (2.7. tab.), kas liecina par mazāk optimālu funkcionālo grupu novietojumu. Iegūtais savienojuma **2** saistības modelis (2.53. att., B) ir ļoti līdzīgs TML, bet  $\epsilon$ -trimetilamonija grupa neieiet tikpat dziļi “aromātiskajā būrī”. Tas apstiprina 1 kcal·mol<sup>-1</sup> zudumu  $\Delta H$ .

Savienojums ar garāko alifātisko ķēdi,  $\zeta$ -trimetil-*L*-homolizīns (**3**), uzrādīja par kārtu sliktāku afinitāti, ( $K_D$  25  $\mu$ M). Turklāt, šim savienojumam titrēšanas laikā novēroja trīs reizes zemāku siltumenerģijas izdalīšanos (2.52. att., C), kas padarīja šo savienojumu grūti detektējamu pat ļoti augstās enzīma koncentrācijās (~100  $\mu$ M). Atšķirībā no TML, šim savienojumam novēroja pretējo saistības termodinamisko profilu, kurā dominēja entropijas komponente, bet  $\Delta H$  bija 3,5 reizes 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*). Savienojuma **3** kompleksa modelī (2.53. att., C) redzams, ka tas nespēj ieņemt bioaktīvo konformāciju līdzīgi savienojumiem **1** un **2**. Alifātiskā ķēde sāk savērties, bet  $\alpha$ -aminogrupa attālinās no saistības partnera (D231). Tomēr iegūtie dati liecina, ka TMLD aktīvais centrs ir pietiekami liels, lai tajā varētu ielikt telpiski lielākus savienojumus, piemēram, ciklisko TML analogu (*N*-dimetilēta piperidīna atvasinājumu).

Savienojumi ar aizvietotājiem pie  $\epsilon$ -*N*-amonija grupas [ $\epsilon$ -dimetiletil-*L*-lizīns (**4**),  $\epsilon$ -dimetilpropil-*L*-lizīns (**5**),  $\epsilon$ -dimetilizopropil-*L*-lizīns (**6**),  $\epsilon$ -dimetilbutil-*L*-lizīns (**7**)] arī uzrādīja saistību ar MBP-TMLD. Interesanti, ka BBOX gadījumā  $\gamma$ -dimetiletilamonija butirāts (etil-GBB) uzrādīja  $K_D$ , kas ir par kārtu sliktāks nekā dabiskais substrāts (2.8. tab.). Savukārt, TMLD gadījumā etil-TML  $\epsilon$ -dimetiletil-*L*-lizīns (**4**) uzrādīja tikpat augstu afinitāti kā TML (2.7. tab.). Pārējiem savienojumiem afinitāte bija nedaudz sliktāka, un tā pasliktinājās palielinoties aizvietotāja garumam: Me ~ Et > *n*-Pr > *i*-Pr > *n*-Bu. Neskatoties uz ļoti līdzīgām struktūrām, entalpijas un entropijas komponentu ieguldījums stipri atšķīrās. Tikai divi savienojumi **4** un **6** uzrādīja tādu pašu saistības profilu kā dabiskajam substrātam ar dominējošo entalpijas komponenti un lielo  $\Delta H$ . Iegūto savienojumu modeļi arī parāda, ka savienojumiem **1**, **4** un **6** ir ļoti līdzīgs novietojums aktīvajā centrā (attiecīgi 2.53. att., A, D un F) un nav soda (*penalty*) par bioaktīvās konformācijas ieņemšanu. Savukārt, savienojumi **5** un **7** uzrādīja  $\Delta H$  tuvu nullei un entropijas virzītu (*entropy-driven*) saistības mehānismu, kas līdzīgs savienojumam **3**. Iegūtie dati parāda, ka garāka *n*-alkil aizvietotāja ieviešana  $\epsilon$ -*N*-amonija grupā, tāpat kā alifātiskās ķēdes pagarināšana, izjauc substrātam līdzīgo saistības veidu MBP-TMLD aktīvajā centrā. Modelēšanas dati (attiecīgi 2.53. att., E un G) 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<sub>50</sub> vērtībām BBOX enzīmam, kur Et- un *i*-Pr- aizvietotāji deva ļoti līdzīgas un mazas IC<sub>50</sub> vērtības (darbojas kā konkurējošie inhibitori), bet *n*-Pr- un *n*-Bu- – ļoti lielas (nav inhibitori,

neietekmē hidroksilēšanās reakciju). TMLD gadījumā  $IC_{50}$  vērtības netiek publicētas saistībā ar nolūku šos datus iekļaut patenta pieteikumā.

Kopumā, *ITC* eksperimenti parādīja, ka dažiem substrātiem ir atšķirīgs saistības mehānisms salīdzinājuma ar endogēno substrātu, TML, ko parāda izmaiņas  $\Delta H$  un  $-T\Delta S$  saistības brīvās enerģijas komponentu ieguldījumā. 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.* [62]. Paraugu sagatavošana detalizēti aprakstīta 3.6. nodaļā. 2.55. attēlā parādīts piemērs pilnīgai izejvielas (TML) hidroksilēšanai līdz 2*S*,3*S*-HTML, par ko liecina signālu nobīde uz vājākiem laukiem. Vislabāk substrāta izmaiņas enzimatiskās reakcijas rezultātā novēroja pēc  $(CH_3)_2-3N^+$  grupas, kas spektrā parādās kā izolēts singlets pie 3,0–3,1 ppm. Izmantojot līniju pielāgošanas (dekonvolūcijas) metodi, veiksmīgi izdevās izmērīt atsevišķus integrāļus izejvielai un reakcijas produktam un novērtēt substrāta konversijas (hidroksilēšanas) pakāpi. Papildus novērtēta attiecība starp hidroksilēta produkta un sukcināta veidošanos (S/H) (singlets pie 2,3 ppm). Iegūtie dati apkopoti 2.7. tabulā. References paraugā dažreiz novēroja arī nelielu sukcināta veidošanos (< 8 %), kas visticamāk veidojas no  $H_2O_2$  [veidojas Fe(III) reducēšanās reakcijā ar askorbātu] reakcijas ar  $\alpha KG$ .



2.55. att. 1D  $^1H$  KMR spektri MBP-TMLD enzimatiskajai reakcijai ar TML.

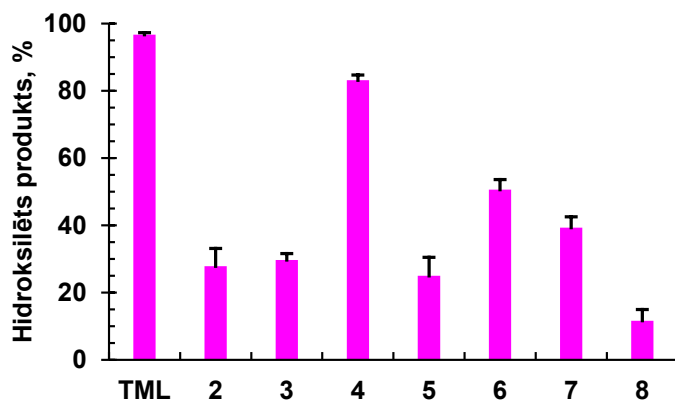
Spektri sarkanā un gaiši zilā krāsā atbilst enzimatiskās reakcijas maisījumiem bez un ar MBP-TMLD pēc 30 min inkubācijas 37 °C temperatūrā.

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, enzimatiskajā reakcijā ar savienojumu **8** novēroja 12 % hidroksilētā produkta un 4 reizes lielāku sukcināta veidošanos, kas liecina par atsaisti substrāta un  $\alpha KG$  patēriņā (*turnover*). Savukārt, TML gadījumā S/H attiecība bija

1,3 ± 0,3, kā to paredz reakcijas mehānisms. Balstoties uz šiem novērojumiem var prognozēt, ka savienojums **8** spēj ieņemt MBP-TMLD aktīvo centru (2.53. att., H), bet enzimatiskā reakcija ir ievērojami palēnināta  $\alpha$ -amīdu grupas dēļ, kas aizvietojuši  $\alpha$ -aminogrupu. Slāpekļa atoma nedalītā elektronu pāra delokalizācija neļauj notikt tā protonēšanai. Rezultātā, veidojas nekompensēts lādiņš uz D231, kas ir  $\alpha$ -aminogrupas mijiedarbības partneris. Turklāt  $\alpha$ -N-izopropil aizvietotājs palielina stēriskos traucējumus aktīvajā centrā un apgrūtina bioaktīvās konformācijas iegūšanu pateicoties C-N saites kustīguma samazinājuma. *ITC* eksperimentos šis savienojums neuzrādīja saistību vai nu pārāk zemās afinitātes dēļ, vai arī pateicoties niecīgam saistības siltumefektam, kas ir tuvs nullei ( $\Delta H \sim 0$ ) 25 °C.

Pārējie dabiskā substrāta analogi, **2–7**, veiksmīgi hidroksilēti  $\beta$ -pozīcijā, par ko liecina jauna signālā veidošanās pie  $\sim 4$  ppm. Šie dati labi korelē ar substrātu konversijas datiem, ko publicējis Al Temimi *et al.* [62]. Eksperimenti ar *fusion* MBP-TMLD un nošķelto TMLD deva ļoti līdzīgus substrātu konversijas datus. Tas norāda, ka MBP nebloķē TMLD aktīvo centru, netraucē enzimatiskai reakcijai un nemijiedarbojas ar TMLD substrātiem. Diemžēl, nošķelts TMLD (bez MBP) ļoti ātri zaudē savu aktivitāti [245], kas padara *fusion* versiju daudz piemērotāku skrīninga eksperimentiem.

Visos gadījumos, izņemot paša TML hidroksilēšanu, enzimatiskajā reakcijā ar endogēnā substrāta analogiem  $\alpha$ KG apgrozījums 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 (2.7. tab. un 2.56. att.). Šie dati atbilst iepriekšējiem BBOX enzīma bioķīmiskiem pētījumiem [56].



2.56. att. TML un tā analogu **2–8** hidroksilētā produkta veidošanās enzimatiskajā reakcijā ar MBP-TMLD.

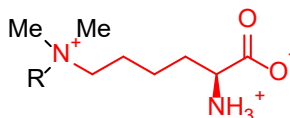
Kā var spriest no 2.56. attēla, šeit, tāpat kā *ITC* eksperimentos, veidojas divas savienojumu grupas, pamatojoties uz hidroksilētā produkta daudzumu. Vienu grupu veido savienojumi **2, 3, 5** un **7**, kas hidroksilējas 25–39 % intervālā. Pie šīs grupas var pieskaitīt arī savienojumu **8** ar 12 % konversiju. Otrā grupā ietilpst TML un savienojumi **4, 6**, kas atbilstoši noreagēja par 97 %, 83 % un 51 %. Visi šie trīs savienojumi bija vienīgie, kam *ITC* eksperimentos noteica ievērojamu  $\Delta H$  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*.

Ņemot vērā BBOX un TMLD līdzību, par ko liecina gan sekvenču salīdzinājums (2.1. att.), gan arī modelēšanas dati (2.1. un 2.2. nodaļas), mēģināts realizēt *ITC* un enzimatiskās reakcijas eksperimentus starp BBOX substrātu GBB (**13**), konkurējošo substrātu/inhibitoru melndoniju (**14**) [10, 30, 33] un reakcijas produktu, *L*-karnitīnu (**15**) un MBP-TMLD. Nevienš no savienojumiem **13–15** neuzrādīja saistības siltumefektus un nehidroksilējās enzimatiskajā reakcijā. Tas vēlreiz apstiprina to, ka TMLD un BBOX ir augsti substrātu specifiski, darbojas secīgi un *L*-karnitīna biosintēzē savstarpēji nav aizvietojami (1.2. att.).

Papildus pārbaudīts, vai kādam no savienojumiem **13–15** nepiemīt TMLD regulējošā īpašība. Šim nolūkam enzimatisko reakciju starp MBP-TMLD un TML realizēja secīgi katra no savienojuma **13–15** klātbūtnē. Tomēr, visās trīs reakcijās ieguva identisku TML konversijas rezultātu, kas sakrīt ar pašu pirmo eksperimentu bez papildus ligandu piedevām. Iegūtie dati liecina, ka BBOX substrātiem vai reakcijas produktam definētos eksperimentālos apstākļos nav *in vitro* regulācijas mehānisma pret TMLD enzīmu.



2.57. att. Kopējā TML analoģu struktūra ar strukturāli svarīgiem elementiem substrāta atpazīšanai un saistībai ar MBP-TMLD (farmakofors – sarkanā krāsā).

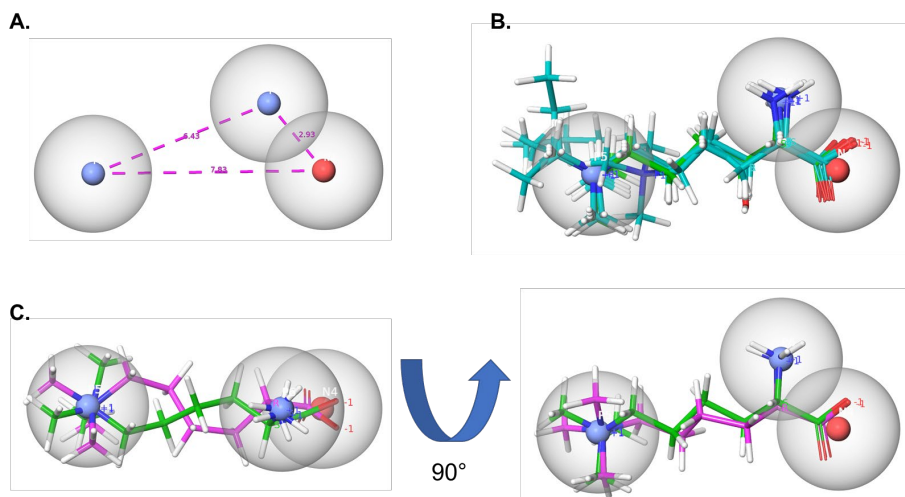
Nobeigumā, izstrādātā *ITC* metode ļauj veiksmīgi raksturot substrātam līdzīgo savienojumu saistību ar TMLD. Kombinācijā ar enzimatiskās reakcijas datiem, ko nosaka ar KMR, tas dod iespēju ne tikai noteikt saistības afinitāti, entalpiju un entropiju, bet arī noteikt ligandu potenciālu kalpot kā substrātiem. Iegūtie dati rāda, ka TMLD spēj saistīt un efektīvi pārstrādāt savienojumus, kas saistās pēc entalpijas virzīta (*enthalpy-driven*) mehānisma tāpat kā dabisks substrāts. Turklāt, vēlreiz tika apstiprināta visu trīs saistībai svarīgo farmakoforu nepieciešamība augstas afinitātes saistībai: pozitīvi lādēta protonu donējoša *2S*- $\alpha$ -aminogrupa, negatīvi lādēta karboksilgrupa un pozitīvi lādēta  $\epsilon$ -(CH<sub>3</sub>)<sub>2-3</sub>N<sup>+</sup> ceturtējā aminogrupa, kas savā starpā atdalīti ar četrām metilēngrupām (2.57. att.). Savukārt savienojumi ar garāko alifātisko ķēdi vai gariem lineāriem aizvietotājiem  $\epsilon$ -N pozīcijā, saistās pie TMLD pēc cita, entropijas virzīta (*entropy-driven*), mehānisma un hidroksilējas mazāk.  $\alpha$ KG reakcijas atasiste 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 [253]. Visi *ITC* un enzimatiskās reakcijas attēli ir pieejami raksta pielikumā.

## 2.5.2. Farmakoforā modeļa izveide

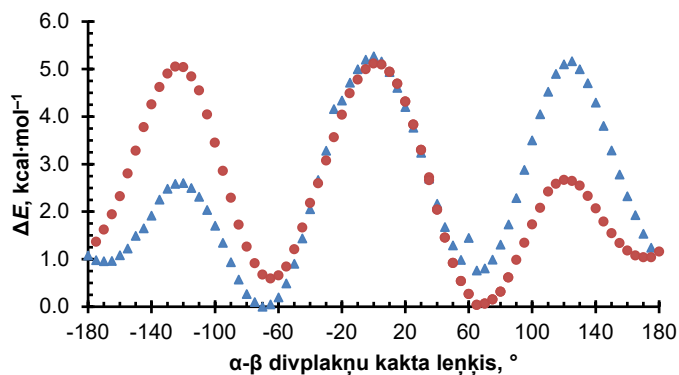
Izmantojot iegūtos eksperimentālos datus, mēģināts konstruēt farmakoforo modeli, kas pamatojoties uz eksperimentālām zināšanām, izveidotu ģeometriskus ierobežojumus, kas vēlāk būtu pielietojami ligandu bibliotēku skrīningam jauno ligandu struktūru (*scaffold*) meklējumos. Farmakoforā modeļa izveidi apgrūtināta pārāk augsta pētāmo savienojumu līdzība.

Iegūtie dati deva iespēju izveidot divus modeļus (2.58. un 2.60. att.), kas abi satur trīs kopīgas raksturiezīmes: divus pozitīvus un vienu negatīvu centru. Pirmajā modelī (2.58. att., A) neizmantoja papildus ģeometrijas ierobežojumus un pētāmie ligandi tika pielāgoti (*fitted*) modelim, balstoties tikai uz attālumiem starp lādētiem centriem (2.58. att., B). Diemžēl, iegūtais modelis nevarēja atšķirt *L*- un *D*- izomērus. Saliecot *D*-TML molekulas alifātisko ķēdi, to iespējams ielikt iegūtajā farmakoforajā modelī un sasniegt ļoti labu pārklāšanos ar lādētiem centriem (2.58. att., C). Tomēr, ņemot vērā *D*-TML  $\beta$ -CH<sub>2</sub> grupas novietojumu, šī nav reaģētspējīga konformācija. No datormodelēšanas skatu punkta atšķirt *L*- un *D*- izomērus varētu tikai tad, ja eksistētu rotācijas barjera. *L*- un *D*-TML savienojumiem izmantojot *ab initio* metodes (3.9.2. nodaļa) aprēķināta enerģijas barjera rotācijai ap C <sub>$\alpha$</sub> -C <sub>$\beta$</sub>  saiti (2.59. att.). Kā bija sagaidāms, divi enantiomēri uzrādīja identiskus rezultātus, kas savā starpā sakrīt kā spoģuattēli. Turklāt 6 kcal·mol<sup>-1</sup> barjera ir ļoti zema, kas liecina par  $\alpha$ -aminokarboksil grupas samērā brīvo rotāciju. Rezultātā, tikai un vienīgi no pētāmajiem savienojumiem nav iespējams konstruēt farmakoforo modeli, kas atlasītu *L*- un *D*- izomērus.

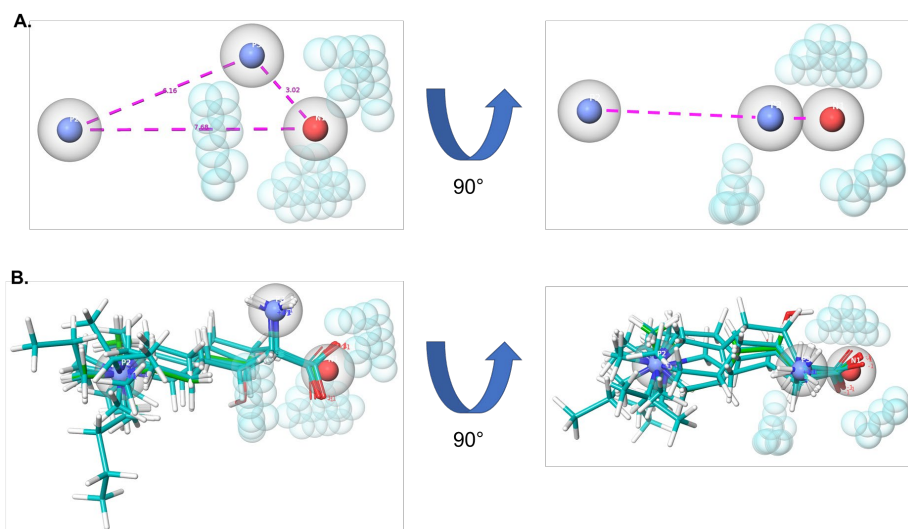


2.58. att. Pirmais farmakoforais modelis bez izslēgtiem tilpumiem, konstruēts uz TML un tā analogu bāzes pamatojoties uz *ITC* afinitātes datiem.

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 skatu punktiem. Zilās sfēras – pozitīvi lādēti centri; sarkanā sfēra – negatīvi lādēts centrs. Pelēkās sfēras – tolerances rādiuss ap lādēto centru.



2.59. att. *L*-TML (zilie trīsstūrīši) un *D*-TML (sarkanie aplīši)  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$  divplakņu kakta leņķa rotācijas barjeras profils.



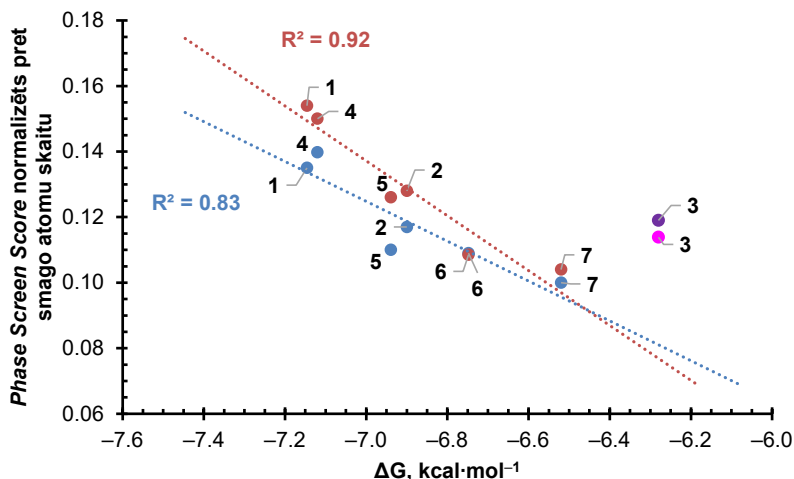
2.60. att. Otrais farmakoforais modelis ar izslēgtiem tilpumiem, konstruēts uz TML un tā analogu bāzes pamatojoties uz *ITC* afinitātes datiem.

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

Lai uzlabotu farmakoforo modeli un “iemācītu” to atlasīt *L*- izomērus no *D*- izomēriem, tika ģenerēts otrs modelis (2.60. att.), kurā ieviesti papildus stēriskie traucējumi izslēgto tilpumu veidā. Šie izslēgtie tilpumi nosacīti atveido telpiskus ierobežojumus, ar kuriem ligands saskaras enzīma aktīvajā centrā. Tās ir aizliegtās zonas, kurās nevar atrasties ligands. Kā redzams 2.60. attēlā (A), izslēgtie tilpumi koncentrējas ap  $\alpha$ -aminokarboksil galu. Viens reģions, kas atrodas uz taisnes starp pozitīvi un negatīvi lādētiem centriem, atbild par alifātiskās ķēdes

kustīguma ierobežošanu. Iegūtajā modelī varēja veiksmīgi ievietot TML, HTML un aktīvus TML analogus (2.60. att., B). Šis modelis vēl arī veiksmīgi atlasīja visus *D*-izomērus.

Lai novērtētu abu modeļu atbilstību eksperimentālajiem datiem, salīdzināja zināmās  $\Delta G$  (2.7. tab.) un *Phase Screen Score* vērtības. Teorētiski salīdzinājumam ir iespējams izmantot arī  $K_D$  vērtības, taču ņemot vērā to, ka starp  $\Delta G$  un  $K_D$  pastāv logaritmiskā sakarība [vienādojums (1.3.)], šādā salīdzinājuma lineārā sakarība starp aprēķinātām un eksperimentālām vērtībām neizpildās. Zinot, ka lielākā daļa vērtēšanas funkciju korelē ar smago atomu skaitu molekulā, no modeļiem iegūtās vērtības tika normalizētas pret smago atomu skaitu katrā savienojumā. Iegūtie dati atspoguļoti 2.61. attēlā. Analizējot pētāmo savienojumu klāstu, redzams, ka no visām septiņām vielām, kam izdevās noteikt saistības termodinamiskos parametrus, ir tikai viena viela ar stipri atšķirīgu afinitāti –  $\zeta$ -trimetil-*L*-homolizīns (**3**),  $\Delta\Delta G$  starpība starp TML un savienojumu **3** ir  $0,87 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , bet pārējās vielas atrodas vēl šaurākā aktivitāšu diapazonā un  $\Delta\Delta G$  ir  $0,63 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  (starp TML un savienojumu **7**). Rezultātā savienojumu **3** izslēdza no statistiskās analīzes (2.61. att. violets punkts pirmajam modelim un rozā punkts otrajam modelim). Pārējām vielām novēro lineāru korelāciju starp eksperimentāliem un aprēķinātajiem datiem. Pirmajam modelim  $R^2 = 0,83$ , bet otrajam –  $R^2 = 0,92$ . Abi iegūtie farmakoforie modeļi labi strādā ar TML-līdzīgām vielām. Otrais modelis (2.60. att.) deva labāku sakritību starp eksperimentālajiem un teorētiskajiem datiem, un tajā nenovēroja kļūdaini pozitīvu (*false positive*) *D*-izomēru atlasī 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. Uz doto brīdi otro farmakoforo modeli var izmantot pirms eksperimentu sērijas, lai aptuveni novērtētu jaunā savienojuma afinitāti pret TMLD.

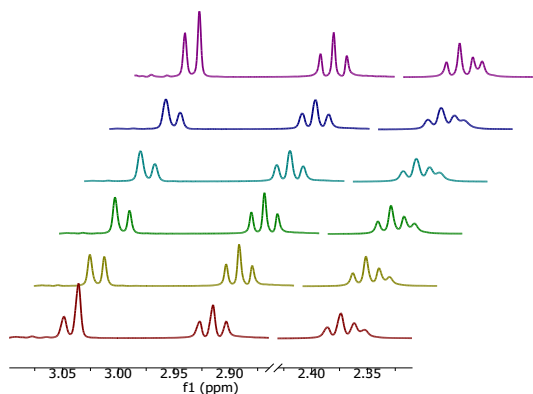


2.61. att. Eksperimentālo datu salīdzinājums ar aprēķinātām aktivitātes vērtībām, kas iegūtas no farmakoforu modeļiem bez (zilā krāsā) un ar (sarkanā krāsā) izslēgtiem tilpumiem.

Savienojums **3** (violets un rozā punkti attiecīgi pirmajam un otrajam farmakoforo modelim) izslēgts no salīdzinājuma.

### 2.5.3. TMLD enzimātiskās reakcijas izpēte

TMLD alternatīvo substrātu pētījumos parasti izmantoja 3,0–10,0  $\mu\text{M}$  enzīmu. Vērts atzīmēt, ka enzīms ir ļoti reaģētspējīgs. Gadījumos, kad paraugu inkubāciju neveic 37 °C un reakcijas maisījumu atdzesē uz ledu, spektrometrā reāllaikā var novērot kā notiek izejvielas pārvēršana par produktu un sukcināta veidošanās no  $\alpha\text{KG}$  saistītā reakcijā (2.62. att.). Variējot enzīma koncentrācijas, noteikts, ka minimālais MBP-TMLD daudzums, kas nepieciešams pilnai 200  $\mu\text{M}$  TML sagraušanai ir 460 nM un tas ilgst ~ 60 min istabas temperatūrā.



2.62. att. Reāllaika MBP-TMLD enzimātiskās reakcijas ar TML novērojums, 25 °C.

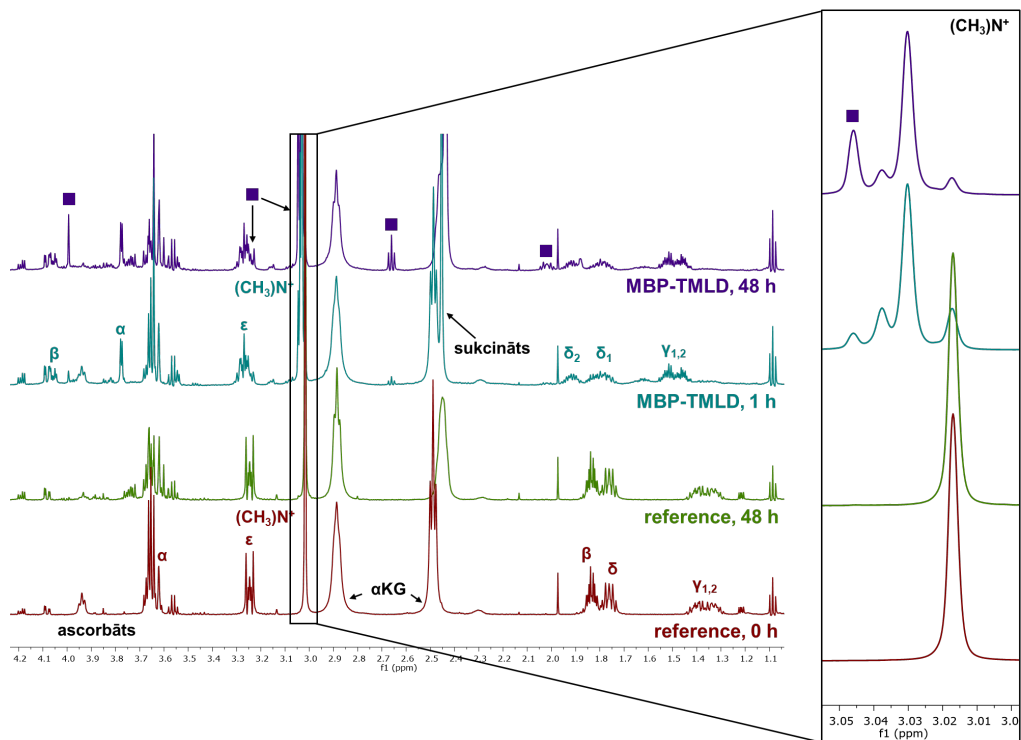
1D  $^1\text{H}$  KMR spektros atspoguļoti divi reģioni. Pirmais atbilst  $\epsilon\text{-(CH}_3)_3\text{N}^+$  (s, 3,02–3,06 ppm) un  $\alpha\text{-KG}$  (t, 2,90–2,95 ppm), otrs –  $\alpha\text{KG/sukcināta}$  (s un t, 2,34–2,40 ppm) signālu reģionam. Reakcijas laiks – 30 min. Spektri uzņemti ar 5 min intervāliem.

Savukārt, palielinātā MBP-TMLD enzīma koncentrācijā ( $\geq 15 \mu\text{M}$ ) un it īpaši Fe(II) pārākumā ( $> 500 \mu\text{M}$ ),  $\epsilon\text{-(CH}_3)_3\text{N}^+$  reģionā ap 3,0–3,1 ppm novēro trešā singleta veidošanos (2.63. att.). Papildus spektrā novēro vēl četrus jaunus signālus (2.63. att., tie atzīmēti ar violetiem kvadrātiņiem), kas liecina par papildus reakcijas produkta veidošanos. References paraugā (bez enzīma klātbūtnēs) šādas pārvērtības nenovēroja pat pēc 48 stundām. Lai pārbaudītu, vai šī viela nevar rasties radikāļu blakusreakcijas rezultātā, substrātu apstrādāja ar 1,0 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  [veidojas Fe(II) reducēšanās reakcijā ar askorbātu]. Tomēr, eksperimentos ar  $\text{H}_2\text{O}_2$  noreaģēja tikai  $\alpha\text{KG}$ , veidojot sukcinātu, bet TML un 2S,3S-HTML, kas iegūts enzimātiskajā reakcijā, nereaģēja.

Analizējot sakarības starp jauniem signāliem izmantojot 2D  $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$  COSY un 2D  $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$  TOCSY spektrus (14. un 15. pielikumi), var secināt, ka veidojas jauns  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X-CH}$  fragments. Turklāt  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$  fragmenta signālu ķīmiskās nobīdes un multiplicitāte ļoti labi korelē ar GBB līdzīga fragmenta spektru. Savukārt 2D  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  HMBC spektrā redzams (16. pielikums), ka X vistīcamāk ir karbonilgrupa ar ķīmisko nobīdi 205 ppm. Diemžēl trešā reakcijas produkta zemā iznākuma dēļ, kvalitatīvākus 2D  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  korelācijas spektrus reģistrēt neizdevās. Papildus, integrālo intensitāšu salīdzināšana pieļauj, ka veidojas arī jauna  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$  grupa. No literatūras zināms, ka BBOX spēj oksidēt *L*- un *D*-karnitīnu līdz keto- produktam (1.6. att.), turklāt nedabiskais *D*-izomērs tiek oksidēts daudz labāk nekā endogēnais

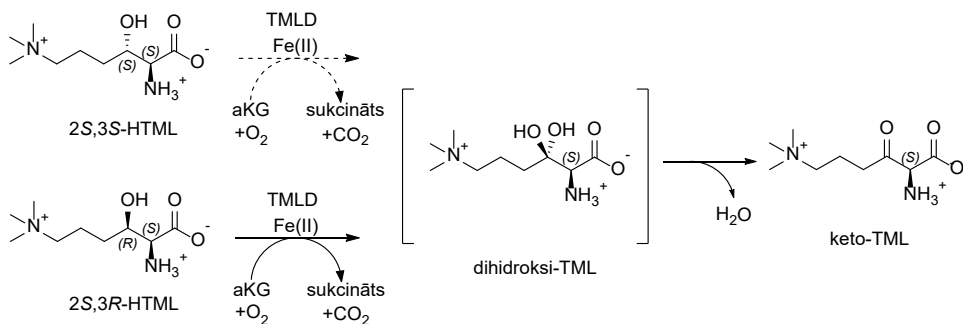
*L*-izomērs [43, 56]. Novērojams pārvērtības spektrā ar TML un MBP-TMLD līdzīgas situācijai ar 3-keto-GBB veidošanos. Iespējamās pārvērtības shēma atspoguļota 2.64. attēlā. Diemžēl darba autorei nebija pieejams tūrs enzimātiskās reakcijas produkts un tā *2S,3R* diastereomērs kā atsevišķas vielas. Tomēr, LOSI bija uztaisi HTML (**16**) diastereomēru maisījumi, kur vienā no paraugiem attiecība starp *2S,3S*- un *2S,3R*- HTML bija 1:1 (racemāts), bet otrā attiecīgi 1:3 (atsevišķo diastereomēru attiecināšana parādīta 17. pielikumā). Pieejamie HTML diastereomēru maisījumi izmantoti enzimātiskajā reakcijā ar MBP-TMLD.

Enzimātiskajā reakcijā ar HTML (*2S,3S* – *2S,3R* attiecība 1:3, 2.65. att.) arī novēroja tādu pašu signālu veidošanos kā TML enzimātiskās reakcijas produktam (2.63. att.). Turklāt, visstraujāk ar enzīmu reaģēja *2S,3R*-HTML, kas ir dabiskajam pretējais diastereomērs un neveidojās enzimātiskajā reakcijā. References paraugā šādi signāli neparādījās arī pēc 48 h inkubācijas istabas temperatūrā. Sagaidāmi, parauga apstrāde ar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neizraisīja jauna reakcijas produkta veidošanos. Enzimātiskajā reakcijā ar *rac*-HTML arī novēroja dominējošo *2S,3R*-HTML konversiju. Rezultātā var secināt, ka šī reakcija ir stereoselektīva un notiek ar MBP-TMLD enzīma starpniecību.

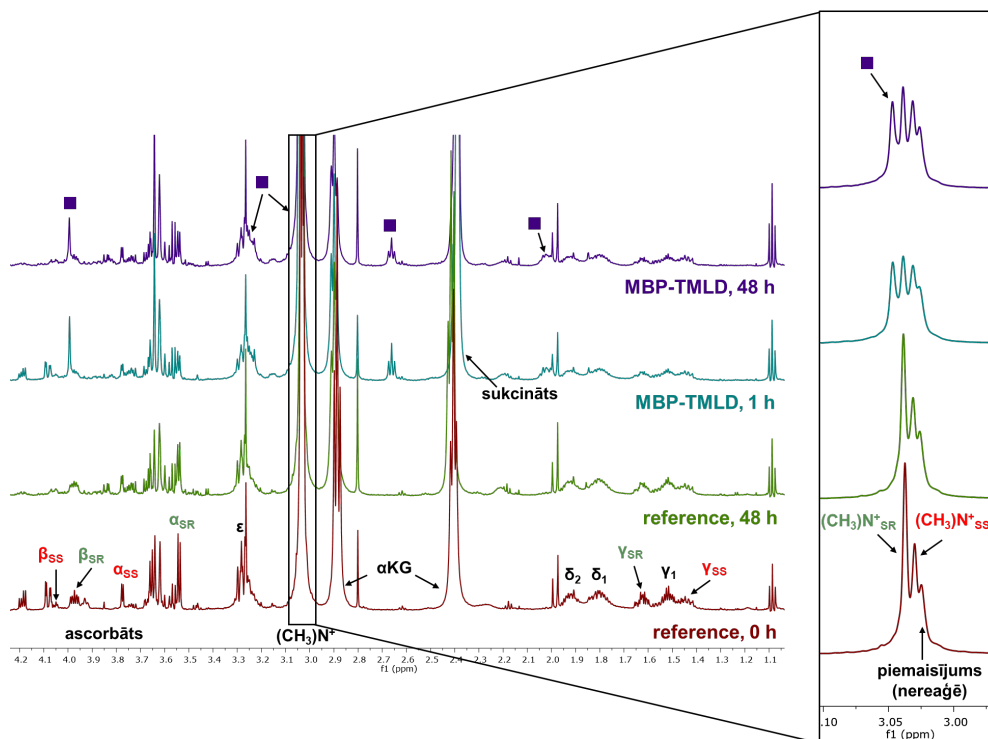


2.63. att. 1D <sup>1</sup>H KMR spektri MBP-TMLD enzimātiskajai reakcijai ar TML Fe(II) pārākumā.

Spektrs sarkanā krāsā – enzimātiskā maisījuma references spektrs ar 500 μM TML, bez enzīma pievienošanas. Spektrs zaļā krāsā – enzimātiskā maisījuma references spektrs ar 500 μM TML, bez enzīma pievienošanas pēc 48 h inkubācijas istabas temperatūrā. Spektrs gaiši zilā krāsā – 500 μM TML kopā ar 15 μM MBP-TMLD pēc 1 h inkubācijas istabas temperatūrā. Spektrs violetā krāsā – 500 μM TML kopā ar 15 μM MBP-TMLD pēc 48 h inkubācijas istabas temperatūrā. Atsevišķi izdalīts ε-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup> reģions.



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



2.65. att. 1D <sup>1</sup>H KMR spektri MBP-TMLD enzīmātiskajai reakcijai ar HTML (1:3) Fe(II) pārākumā.

Spektrs sarkanā krāsā – enzīmātiskā maisījuma references spektrs ar 500 μM HTML (1:3), bez enzīma pievienošanas. Spektrs zaļā krāsā – enzīmātiskā maisījuma references spektrs ar 500 μM HTML (1:3), bez enzīma pievienošanas pēc 48 h inkubācijas istabas temperatūrā. Spektrs gaiši zilā krāsā – 500 μM HTML (1:3) kopā ar 15 μM MBP-TMLD pēc 1 h inkubācijas istabas temperatūrā. Spektrs violetā krāsā – 500 μM HTML (1:3) kopā ar 15 μM MBP-TMLD pēc 48 h inkubācijas istabas temperatūrā. Atsevišķi izdalīts ε-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup> reģions.

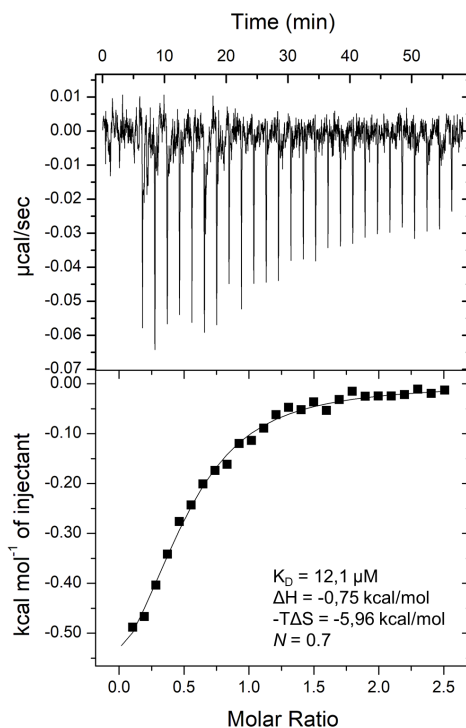
KMR konversijas pakāpes 15  $\mu\text{M}$  MBP-TMLD enzimātiskajai reakcijai ar HTML 25  $^{\circ}\text{C}$

Paraugs	H <sup>a</sup> daudzums, % <sup>16</sup>	S/H <sup>b</sup> attiecība
HTML (1:3)		
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	1 %	1,5
(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	54 %	
<i>rac</i> -HTML		
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	4 %	1,3
(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	58 %	
TML $\rightarrow$ 2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> -HTML (no enzimātiskās reakcijas maisījumā)		
1 h	7 %	x
48 h	26 %	

<sup>a</sup> H – hidroksilēts substrāts;

<sup>b</sup> S/H – sukcināta/hidroksilētā substrāta attiecība;

x – dati nav korekti nosakāmi, jo reakcija notiek pēc TML hidroksilēšanās.



2.66. att. ITC titrēšanas dati MBP-TMLD kompleksa ar Zn(II)/OGA (divkārtējā pārākumā) mijiedarbībai ar HTML (1:3), 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Datu analīzē izmantota tikai (2*S*,3*R*)-HTML koncentrācija, ko noteica ar qNMR, nevis visa HTML (1:3) diastereomēru maisījuma koncentrācija.

<sup>16</sup> Iegūtos hidroksilētā substrāta daudzumus, %, nevar tieši salīdzināt ar norādītajiem 2.7. tabulā, jo atšķiras izmantotās MBP-TMLD un Fe(II) koncentrācijas enzimātiskajā reakcijā.



Izmantojot līniju pielāgošanas (dekonvolūcijas) metodi, izdevās izmērīt katras atsevišķās  $\epsilon\text{-(CH}_3)_3\text{N}^+$  grupas integrālo intensitāti proponētajam keto-TML, HTML diastereomēram un TML trijos paraugos: HTML (1:3), *rac*-HTML un 2*S*,3*S*-HTML no TML enzimātiskās reakcijas. Iegūtie dati ir apkopoti 2.9. tabulā. Kā redzams, gadījumos, kad reakcijas maisījumā ir pieejami abi distereomēri, MBP-TMLD reaģē pārsvarā tikai ar 2*S*,3*R*-HTML. Tas rāda, ka mazi aizvietotāji tādi kā hidroksilgrupa šajā pozīcijā netraucē enzimātiskajai reakcijai. Savukārt, ja reakcijā ir pieejams tikai 2*S*,3*S*-HTML, tad enzīms spēj pārstrādāt arī to. Taču reakcija norit daudz lēnāk. Tas parāda, ka 2*S*,3*S*-HTML enzimātiskās reakcijas uzsākšanai spēj ieņemt tādu konformāciju, kurā 3*R*-protons novietojas tuvu Fe(II) jonam.

Balstoties uz iegūtajiem datiem, veikti daži *ITC* eksperimenti, kuros MBP-TMLD titrēja ar HTML (1:3). Ņemot vērā to, ka ar enzīmu reaģēja pārsvarā tikai 2*S*,3*R*-HTML, liganda koncentrācija tika pielāgota pēdējam. Reprezentatīvā titrēšanas līkne kopā ar termodinamiskajiem saistības parametriem parādīta 2.66. attēlā. HTML (1:3) saistījās pie MBP-TMLD ar afinitāti ( $K_D$  12,1 ± 0,1 μM) līdzīgu  $\epsilon$ -dimetilizopropil-*L*-lizīnam (6) un  $\epsilon$ -dimetilbutil-*L*-lizīnam (7), bet pēc entropijas virzīta (*entropy-driven*) saistības mehānisma ar  $\Delta H = -0,75 \pm 0,01 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  un  $-\Delta S = -5,96 \pm 0,04 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Tas ir pretējs TML un līdzinās savienojumu 3, 5 un 7 (2.7. tab.) saistības mehānismam. Tomēr vērts atzīmēt, ka iegūtās termodinamiskās vērtības nav absolūtas, jo nav noteikts vai otrais diastereomērs var ietekmēt enzīma-liganda saistību un kinētiku.

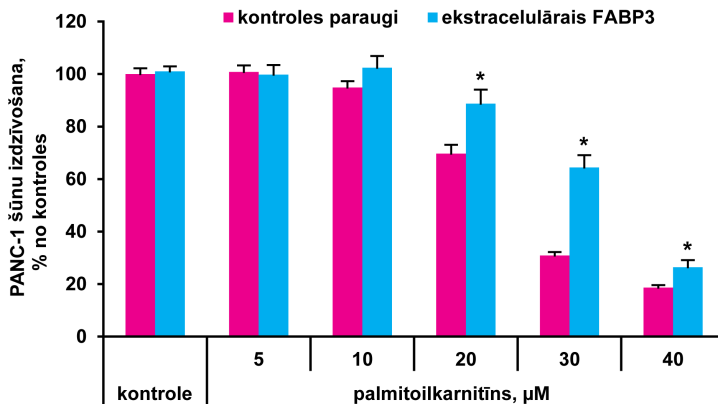
Iegūtie dati liecina, ka 3*R*-pozīcija TML molekulā potenciāli ir laba vieta gan aizvietotāju ieviešanai jauno inhibitoru dizainā, gan arī efektīvu marķieru (*probe*) ieviešanai (piemēram,  $^{19}\text{F}$  [258, 259]), jo šī pozīcija ir ļoti tuvu reakcijas centram. Tomēr, jāņem vērā, ka molekula ar trim secīgām funkcionālām grupām mēdz būt ļoti nestabila.

## 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 titrējot PANC-1<sup>17</sup> šūnas ar palmitoilkarnitīnu. PANC-1 šūnas tika izvēlētas tāpēc, ka tām ir raksturīgs zems FABP3 endogēnās ekspresijas līmenis un tās ir piemērotas transfekcijai. 2.67. attēlā var redzams, ka palmitoilkarnitīns ir toksisks šūnām ar  $\text{LC}_{50} \sim 25 \text{ }\mu\text{M}$ . Savukārt, FABP3 pievienošana palielināja šūnu dzīvotspēju vidēji par 20 %. Tomēr citoprotektīvās īpašības bija mazāk izteiktas pie augstākās pārbaudītās palmitoilkarnitīna koncentrācijas. Līdzīgi palmitoilkarnitīna citotoksiskā iedarbība tika efektīvi samazināta, iniciējot FABP3 pārekspressiju (*overexpression*) PANC-1 šūnās (2.68. att.). Dati iegūti sadarbībā ar Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratoriju (LOSI) un aprakstīti darba autores publikācijā [260].

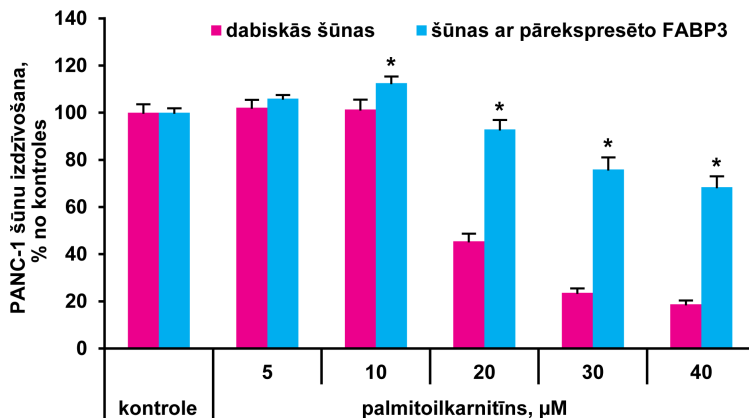
Rezultātā tika izvirzīta hipotēze, ka FABP3 spēj saistīt ne tikai TS, bet arī TS karnitīna esteru un šādi pasargāt šūnas no to augstās toksicitātes. Hipotēzes pārbaudei tika izstrādāta *ITC* metodika TS un to karnitīnu esteru testēšanai, kā arī veikti proteīnu KMR pētījumi saistības mehānisma raksturošanai.

<sup>17</sup> PANC-1 (*ATCC® CRL-1469™*) aizkuņģa dziedzera epitēlija karcinomas šūnas



2.67. att. Palmitoilkarnitīna (C16:0) toksicitāte PANC-1 šūnās pēc 4 h inkubācijas bez un ar 60 μM FABP3, ko noteica pēc MTT<sup>18</sup>-kolorimetriskās metodes<sup>19</sup>.

Rozā krāsā – referenes paraugi, kur proteīna vietā šūnām pielikts buferis. Gaiši zilā krāsā – paraugi, kuros pielikts rekombinantais FABP3. Pirmā aile – kontroles paraugi, kuriem nebija pielikts klāt palmitoilkarnitīns. 2.–6. ailē – paraugi, kuriem pielika klāt palmitoilkarnitīnu norādītajās koncentrācijās. \* norāda uz būtisku atšķirību salīdzinājumā ar šūnām, kam nebija pielikts klāt FABP3, attiecīgajā palmitoilkarnitīna koncentrācijā.



2.68. att. Palmitoilkarnitīna (C16:0) toksicitāte dabiskās un PANC-1 šūnās ar pārekspresēto (*overexpressed*) FABP3 pēc 4 h inkubācijas<sup>19</sup>.

Rozā krāsā – referenes paraugi, kur proteīna vietā šūnām pielikts buferis. Gaiši zilā krāsā – paraugi, kuros pielikts rekombinantais FABP3. Pirmā aile – kontroles paraugi, kuriem nebija pielikts klāt palmitoilkarnitīns. 2.–6. ailē – paraugi, kuriem pielika klāt palmitoilkarnitīnu norādītajās koncentrācijās. \* norāda uz būtisku atšķirību salīdzinājumā ar dabiskām šūnām pie attiecīgās palmitoilkarnitīna koncentrācijas.

<sup>18</sup> 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 (18. pielikums), ko nodrošina dzīvās šūnas metabolisms.

<sup>19</sup> Dati iegūti sadarbībā ar Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratoriju (LOSI). Izpildītāji: Kārlis Vilks un Melita Vidēja.

## 2.7. Apstākļu meklējumi FABP3 termodinamiskiem pētījumiem

### 2.7.1. TS šķīdības un šķīdumu stabilizējošo piedevu meklējumi

Iepriekš publicētajā metodē [99] dažāda garuma TS saistības termodinamikas noteikšanai izmantoja DMPC/TS liposomas (1.3.2. nodaļa). Kā rāda termodinamiskie dati (1.20. un 1.21. att.), iegūtās entalpijas un entropijas vērtības ir ļoti lielas un attiecīgi sastāda no  $-98 - -8,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $-23 - -2,1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) un  $-18 - 64 \text{ kJ mol}^{-1}$  ( $-4,3 - 15 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Šādas vērtības ir pārāk lielas, jo, piemēram, vienas ūdeņraža saites vidējā enerģija bioloģiskā sistēmā vienāda ar  $4,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  [127, 261]. Kā arī vairumam noteikto *ITC* vērtību ir  $\sim 30-40 \%$  kļūda. Iegūtās vērtības vistīcāmāk parāda termodinamiskus parametrus ne tikai liganda saistībai pie proteīna, bet arī ar DMPC liposomas sagraušanu/reorganizāciju saistītus siltumefektus, kas relatīvi slikti atkārtojās no parauga uz paraugu.

Lai iegūtu precīzākas saistības termodinamikas vērtības, kas atspoguļotu tikai proteīna-liganda saistību, bija jāizstrādā *ITC* metodika, kas ļautu strādāt ar ūdenī nešķīstošām garķēžu TS [šķīdības un kritiskās micellu veidošanās koncentrāciju (CMC) vērtības apkopotas 19. pielikumā]. Plaši lietoto alternatīvu metodi, kurā TS šķīdību uzlabo, pieliekot klāt vērša seruma albumīnu (*Bovine Serum Albumin*, BSA) [262], 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*.

Testēšana veikta ar  $500 \mu\text{M}$  laurinātu (C12:0), miristātu (C14:0), palmitātu (C16:0), laurinoilkarnitīnu (C12:0-AC) un palmitoilkarnitīnu (C16:0-AC). TS un to karnitīna esteru pamatšķīdumu sastāvs apkopots 3.5.2. nodaļā, 3.1. tabulā. No pētāmām vielām, C12:0 šķīst bez jebkādam piedevām, C14:0 – veido micellas, bet C16:0 nešķīst ūdens buferos. Glicerīna piedeva izmēģināta divās dažādās koncentrācijā  $10 \%$  (v/v) un  $20 \%$  (v/v). Tas labi stabilizēja tikai vidēja izmēra TS (līdz C14:0), bet nespēja ievērojami uzlabot garķēžu TS šķīdību. Savukārt, pieliekot klāt  $0,10 \%$  (v/v) *Triton X-100* vai *Tween-20*, savienojumu šķīdība ievērojami uzlabojās. Abi deterģenti deva ļoti līdzīgus efektus uz TS šķīdību un šķīdumu stabilitātes uzlabošanu. Tomēr ņemot vērā to, ka *Tween-20* struktūrā ir laurināts, tālākiem pētījumiem to neizmantoja.

Turpinājumā tika novērtēta TS spēja veidot micellas dažādās *Triton X-100* koncentrācijās. Daļiņu izmēra noteikšanai izmantoja *DLS* izkliedes intensitātes rādītāju. Jo mazāks ir šis skaitlis (gaismas izkliede notiek minimāli), jo viendabīgāks ir šķīdums un tajā neveidojas micellas. Iegūtie dati apkopoti 2.10. tabulā. Sākumā testēja tikai  $20 \text{ mM}$  kālija fosfāta buferi pie pH 7,6 ar  $50 \text{ mM}$  KCl (KPi) [3.2.2.3. nodaļa] ar  $0,10 \%$  (v/v) *Triton X-100* un noteica gaismas izkliedes fona intensitāti, kas atbilst viendabīgam paraugam. Pēc tam testēts šis pats buferis ar organiskā šķīdinātāja piedevu (etanols vai DMSO- $d_6$ ), kas atbilst organiskā šķīdinātāja daudzumam, ko ienes paraugā atšķaidot  $50$  vai  $25 \text{ mM}$  izejas šķīdumu līdz eksperimentā izmantojamām koncentrācijām. Interesanti, ka  $2,0 \%$  (v/v) DMSO- $d_6$  piedeva neietekmēja, bet  $0,5 \%$  (v/v) EtOH palielināja izkliedes intensitāti  $\sim 2,4$  reizes. Tālāk analizēti paraugi ar TS un to karnitīna esteriem. Kā rāda 2.10. tabulas dati, C12:0 un C14:0 ir stabilas pat pie vismazākās  $0,10 \%$

(v/v) *Triton X-100* koncentrācijas. Savukārt, C16:0 šajos apstākļos novēro ļoti lielu, ~ 31 k, izkliedes intensitāti, kas liecina par lielu daļiņu veidošanos. Divreiz samazinot palmitāta koncentrāciju, izdevās dabūt nelielu uzlabojumu, izkliedes intensitāte samazinājās ~2 reizes. Turpinot izmēģināts palielināt deterģenta koncentrāciju. 500 μM C16:0 gadījumā vislabāko rezultātu sasniedza ar 0,50 % (v/v) *Triton X-100* piedevu. Savukārt C12:0-AC un C16:0-AC izkliedes intensitāte jau sākumā bija zema un šie paraugi minimāli reaģēja uz deterģenta koncentrācijas maiņu.

2.10. tabula

*DLS* variācijas uz TS daļiņām atkarībā no *Triton X-100* koncentrācijas KPi buferī, 25 °C

<i>Triton X-100</i> konc.	Organiskā šķīdinātāja piedeva	TS	TS konc., μM	Izkliedes intensitāte, <i>kcps</i> <sup>20</sup>
0,10 %	nav	nav	nav	1782 ± 219
0,10 %	0,50 % EtOH <sup>21</sup>	nav	nav	3935 ± 813
0,10 %	2,0 % DMSO-d <sub>6</sub> <sup>22</sup>	nav	nav	1624 ± 204
0,10 %	0,50 % EtOH	C12:0	500	2868 ± 557
0,10 %	0,50 % EtOH	C14:0	500	3488 ± 400
0,10 %	0,50 % EtOH	C16:0	500	31209 ± 4629
0,10 %	0,25 % EtOH	C16:0	250	13937 ± 728
0,25 %	0,50 % EtOH	C16:0	500	7286 ± 208
0,50 %	0,50 % EtOH	C16:0	500	4537 ± 149
0,10 %	2,0 % DMSO-d <sub>6</sub>	C12:0-AC	500	3428 ± 1021
0,25 %	2,0 % DMSO-d <sub>6</sub>	C12:0-AC	500	1742 ± 118
0,50 %	2,0 % DMSO-d <sub>6</sub>	C12:0-AC	500	3208 ± 230
0,10 %	2,0 % DMSO-d <sub>6</sub>	C16:0-AC	500	2651 ± 397
0,25 %	2,0 % DMSO-d <sub>6</sub>	C16:0-AC	500	2672 ± 433
0,50 %	2,0 % DMSO-d <sub>6</sub>	C16:0-AC	500	3812 ± 351

### 2.7.2. Piedevu efekts uz FABP3 struktūru

Lai pārlicinātos, ka piedevas neietekmē FABP3 struktūru, *E. Coli* ekspresēts <sup>15</sup>N-iezīmēts FABP3 (3.3.3.2. apakšnodaļa), kuru izmantoja 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC KMR spektru iegūšanai, variējot buferu sastāvu. Kā jau bija minēts, proteīnu 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spektrs ir ļoti jutīgs uz jebkurām izmaiņām paraugā (1.5.3.1. apakšnodaļa). Rezultātā, ja kāda no piedevām ietekmētu proteīna struktūru, spektrā būtu novērojamas krosplīķu nobīdes gan <sup>1</sup>H, gan arī <sup>15</sup>N dimensijās.

Četri 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC 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 atspoguļota 2.69. attēlā (A). Kā redzams, visi četri spektri ļoti labi sakrīt savā starpā. Minimālās izmaiņas ir novērojamas desmit krosplīķiem, no kuriem viens atbilst kustīgam C-terminālajam aminoskābju atlikumam, A133 (numerācija saskaņā ar *UniProt* datubāzi, P05413 [105]). Pārējie astoņi aminoskābju atlikumi (2.69. att., B) pieder liganda ieejas portālam, bet viens, F71, – spraugas reģionam (1.17. att.), kas visi ir ļoti kustīgi FABP3 reģioni, it īpaši apo-formā. Turklāt, pH 7,6

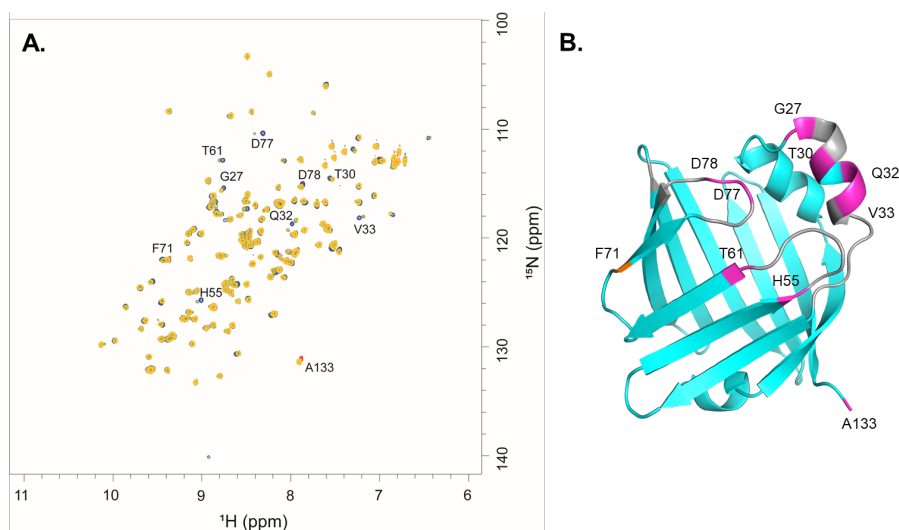
<sup>20</sup> *kcps* – fotonu skaits sekundē (*kilo counts per second*)

<sup>21</sup> Etanola (EtOH) daudzums, ko ienes reakcijas maisījumā no liganda izejas šķīduma.

<sup>22</sup> DMSO-d<sub>6</sub> daudzums, ko ienes reakcijas maisījumā no liganda izejas šķīduma.

buferī tas bija attiecināts tikai daļēji (2.69. att., B, pelēkie reģioni) pārāk ātras amīdu protonu apmaiņas ar ūdeni dēļ. Iespējams, ka izmantojamās piedevas ietekmē arī pelēko reģionu aminoskābju atlikumus. Kopumā, novērojamās izmaiņas spektrā ir tik mazas, ka FABP3 struktūru var uzskatīt par nemainīgu un inertu pret piedevām.

Pēc tam pārbaudīta FABP3 spēja saistīt ligandu iepriekš minēto piedevu klātbūtnē. Šim nolūkam FABP3 atbilstošajā buferī piesātināja ar palmitātu (C16:0), kas no TS ir visstiprākais ligands [99], un atkārtoti uzņēma četrus 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrus. Šeit problēmas ar TS šķīdību nenovēro, jo pats FABP3 darbojas kā šķīdību veicinošs aģents. Pieliekot klāt TS no izejas šķīduma, TS nekavējoties piesaistās proteīnam un brīvas TS formas ūdens buferī vai nu vispār neveidojas, vai arī veidojas ļoti mazā koncentrācijā.

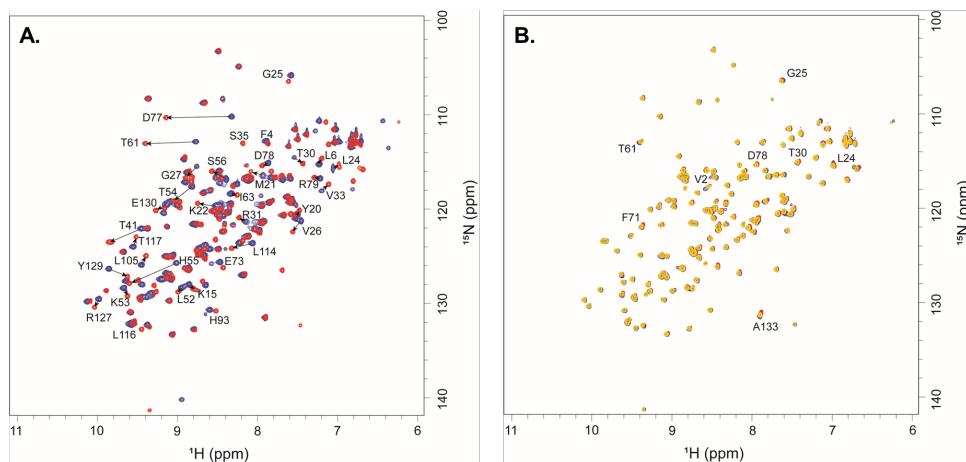


2.69. att. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC apo-FABP3 spektru superpozīcija variējot bufera piedevas un novērojamo ķīmisko nobīžu izmaiņu atspoguļojums FABP3 struktūrā (PDB ID 4TKJ).

**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; un 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, kuras nevarēja attiecināt pie pH 7,6.

Referencei, salīdzināja apo-FABP3 un FABP3-palmitāta kompleksa spektrus (2.70. att., A). Kā redzams, saistoties TS, spektrā novēro vairāku kroszpīķu ķīmisko nobīžu ļoti lielas izmaiņas. Lai būtu iespējams pateikt, kuri aminoskābju atlikumi piedalās palmitāta saistībā, tāpat kā  $^{15}\text{N}$ -FABP3 tika uztaisīts  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -dubultiezmēts FABP3, ko izmantoja pamatķēdes attiecināšanai apo- un saistītai FABP3 formai (3.8. nodaļa, un 20. un 21. pielikumi). Izmantojot iegūtos datus, tika atlasīti 34 kroszpīķi, kuriem spektrā novēroja vislielākās izmaiņas. Tie, savukārt, atbilst 34 aminoskābju atlikumiem, kas visvairāk izmainījās notiekot palmitāta saistībai. Tie atspoguļoti 2.70. attēlā (A), blakus katram kroszpīķim norādīts aminoskābju atlikuma numurs un kroszpīķa nobīdes virziens. Minētie aminoskābju atlikumi ļoti labi korelē ar literatūrā aprakstītajiem (piemēram, 1.3. tab. [94]). Savukārt, salīdzinot savstarpēji četrus FABP3-palmitāta spektrus, kas uzņemti variējot bufera piedevas, novēro ļoti augstu līdzību (2.70. att., B) tā pat kā apo-

formas spektriem (2.69. att., A). Minimālas 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 (2.69. att., A) un, kā jau minēts iepriekš, tie pieder liganda ieejas portālam un spraugas reģionam. Iegūtie dati apstiprina, ka izmantojamās piedevas neietekmē FABP3 struktūru, netraucē TS saistību un nemaina FABP3-TS kompleksa konformāciju. Iegūtie dati aprakstīti darba autores publikācijā [260].



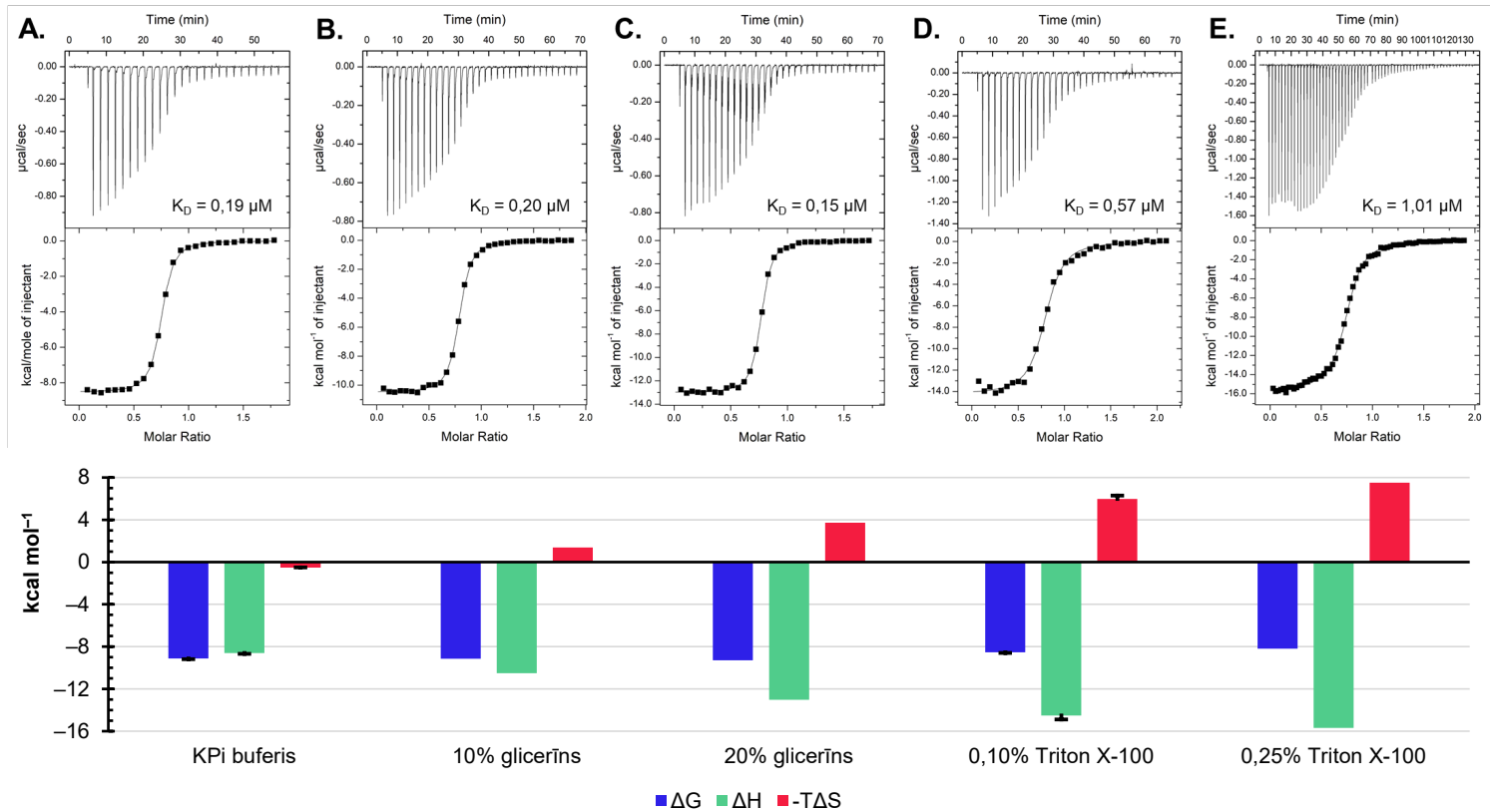
2.70. att. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC **A.** apo-FABP3 (zilā krāsā) un FABP3-palmitāta kompleksa (sarkanā krāsā) spektru superpozīcija. **B.** FABP3-palmitāta kompleksa spektru superpozīcija variējot bufera piedevas.

**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 krosipiķa 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; un ar 0,25 % (v/v) *Triton X-100* – dzeltenā krāsā.

### 2.7.3. Stabilizējošo piedevu efekts uz termodinamiskajiem saistības parametriem

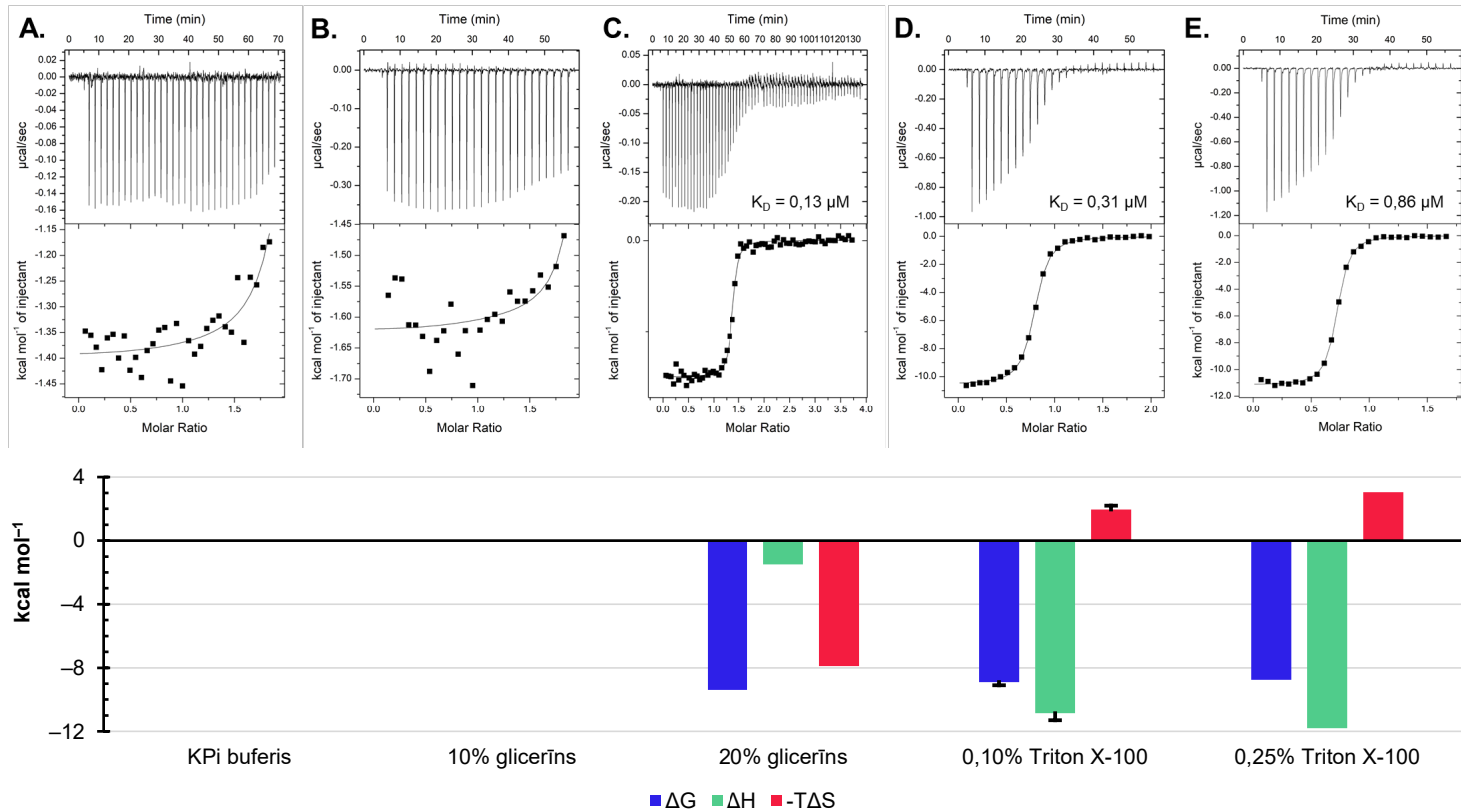
Balstoties uz iegūtajiem stabilizācijas un KMR datiem, veiktas kontroles *ITC* titrēšanas, lai novērtētu piedevu ietekmi uz FABP3-TS saistības termodinamiku un afinitāti. *ITC* eksperimenti veikti KPi buferī ar 10 % (v/v) un 20 % (v/v) glicerīna, un 0,10 % (v/v) un 0,25 % (v/v) *Triton X-100* piedevām. Turklāt, izmēģināta references titrēšana KPi buferī bez piedevām. Kontroles titrēšanas veiktas ar laurīnātu (C12:0) un miristātu (C14:0), jo tās ir garākās TS, kas šķīst ūdens buferī (19. pielikums) *ITC* eksperimentiem nepieciešamajā koncentrācijā. Iegūtie dati ir apkopoti 2.71. un 2.72. attēlos.

Laurīnāts (C12:0) uzrādīja eksotermisko saistības siltumefektu visos piecos *ITC* titrēšanas eksperimentos. No iegūtajām S-tipa līknēm tika noteikti termodinamiskie saistības parametri (2.71. att.). Sagaidāmi, C12:0 saistījās pie FABP3 ar stehiometriju,  $N = 1$ , norādot, ka viena TS



2.71. att. FABP3 mijiedarbības ar laurīnātu (C12:0) ITC titrēšanas līknes (augšā) un termodinamisko saistības parametru grafiskais atspoguļojums (apakšā) variējot buferu piedevas. Visi titrēšanas eksperimenti veikti 25 °C temperatūrā.

A. KPi buferis bez piedevām; B. KPi buferis ar 10 % (v/v) glicerīna; C. KPi buferis ar 20 % (v/v) glicerīna; D. KPi buferis ar 0,10 % (v/v) *Triton X-100*; E. KPi buferis ar 0,25 % (v/v) *Triton X-100* piedevu.



2.72. att. FABP3 mijiedarbības ar miristātu (C14:0) ITC titrēšanas līknes (augšā) un termodinamisko saistības parametru grafiskais atspoguļojums (apakšā) variējot buferu piedevas. Visi titrēšanas eksperimenti veikti 25 °C temperatūrā.

A. KPi buferis bez piedevām; B. KPi buferis ar 10 % (v/v) glicerīna; C. KPi buferis ar 20 % (v/v) glicerīna; D. KPi buferis ar 0,10 % (v/v) *Triton X-100*; E. KPi buferis ar 0,25 % (v/v) *Triton X-100* piedevu.



molekula saistās pie vienas proteīna molekulas. Neviena no piedevām  $N$  vērtību neietekmēja. Tomēr mainījās saistības stiprumi. Ja salīdzina  $K_D$  vērtības visiem pieciem titrēšanas procesiem (2.71. att.), redzams, ka buferī un glicerīnā (neatkarīgi no koncentrācijas) iegūtās vērtības ļoti labi sakrīt (vidējā vērtība  $0,18 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ). Savukārt paraugos ar 0,10 % (v/v) un 0,25 % (v/v) *Triton X-100* piedevu  $K_D$  pasliktinājās attiecīgi  $\sim 3$  un 5,3 reizēs. 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  $\Delta H$  absolūtā vērtība), piemēram, ūdeņraža saišu stiprumi [263, 264]. Iespējams, tas notiek vienlaikus ar šķīdinātāja reorganizāciju uz proteīna virsmas. Iestājoties entalpijas-entropijas kompensācijai (1.5.2.2. apakšnodaļa),  $-T\Delta S$  kļūst pozitīva, jeb saistībai nelabvēlīga. Pieaugot vides viskozitātei, šie efekti palielinās, proti,  $\Delta H$  kļūst vēl negatīvāka, bet  $-T\Delta S$  – vēl pozitīvāka. *Triton X-100* piedevas izmantošanas gadījumā novēro izteiktākas izmaiņas entalpijas un entropijas komponentēs salīdzinājumā ar 20 % (v/v) glicerīna pievienošanu. No literatūras zināms, ka *Triton X-100* spēj saistīties pie proteīniem (piemēram, BSA), t. sk. arī veidot vājas mijiedarbības uz to virsmas [265]. Iespējams, ka arī FABP3 gadījumā *Triton X-100* vai nu piesaistījās pie proteīna, vai arī izraisīja ievērojamu šķīdinātāja reorganizāciju uz tā virsmas. Turklāt, deterģenta piedeva analogi glicerīnam varēja izmainīt nekovalento mijiedarbību stiprumu.

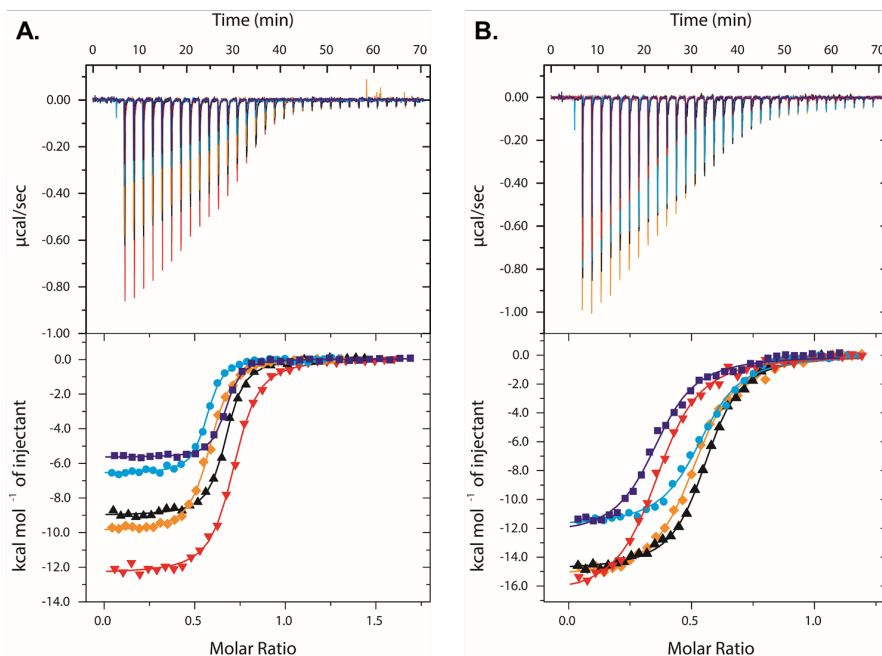
Tālāk šie paši pieci *ITC* eksperimenti tika atkārtoti ar miristātu (C14:0). Iegūtie dati rāda (2.72. att.), ka miristāts micellizējas ūdens buferī un 10 % (v/v) glicerīnā. Savukārt, 20 % (v/v) glicerīnā izdevās iegūt S-tipa eksotermisko līkni ar salīdzinoši vāju saistības stilumefektu ( $-0,20 \mu\text{cal}\cdot\text{sec}^{-1}$ ). Šeit saistības mehānisms ir entropijas virzīts (*entropy-driven*). Visticamāk, šeit dominējošie arī ir micellizēšanās efekti, kas izmainīja termodinamisko profilu. Rezultātā, iegūti dati nav izmantojami, lai noteiktu tikai “tīru” proteīna-liganda saistības stiprumu. Savukārt, *ITC* eksperimentos ar *Triton X-100*, veidojas tāda pati situācija, kā laurīnāta gadījumā. Iegūtais saistības mehānisms ir entalpijas virzīts (*enthalpy-driven*) ar saistībai nelabvēlīgu entropiju.

Salīdzinot savā starpā laurīnātu un miristātu, redzams, ka garākā TS saistās pie FABP3 nedaudz spēcīgāk, nekā īsākā. Šie rezultāti sakrīt ar literatūrā publicētiem datiem [99]. Turklāt, 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. Rezultātā, 0,10 % (v/v) *Triton X-100* tika uzskatīta kā piedevas optimāla koncentrācija tālākiem titrēšanas eksperimentiem.

#### 2.7.4. FABP3-laurīnāta saistības siltumkapacitātes noteikšana

Turpinot, *ITC* metodikas validācijai noteiktas laurīnāta (C12:0) saistības pie FABP3 siltumkapacitātes izmaiņas,  $\Delta C_p$  (1.5.2.3. apakšnodaļa), atkarībā no bufera sastāva. Šim nolūkam *ITC* eksperimenti veikti KPi buferī bez un ar 0,10 % (v/v) *Triton X-100* piedevas piecās dažādās temperatūrās: 16 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C un 37 °C (2.73. att.). No iegūtajiem entalpijas izmaiņas datiem konstruēti divi lineāri grafiki (2.74. att.). Izmantojot lineārās

regresijas analīzi, iegūtas  $\Delta C_p$  vērtības. KPi buferī bez piedevas  $\Delta C_p = -0,33 \pm 0,01 \text{ kcal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ , bet ar *Triton X-100* piedevu  $\Delta C_p = -0,22 \pm 0,02 \text{ kcal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Iegūto vērtību atšķirība ir minimāla un labi saskan ar paša fosfāta bufera ( $pK_a$  7,198)  $\Delta C_p = -0,23 \text{ kcal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  [266].



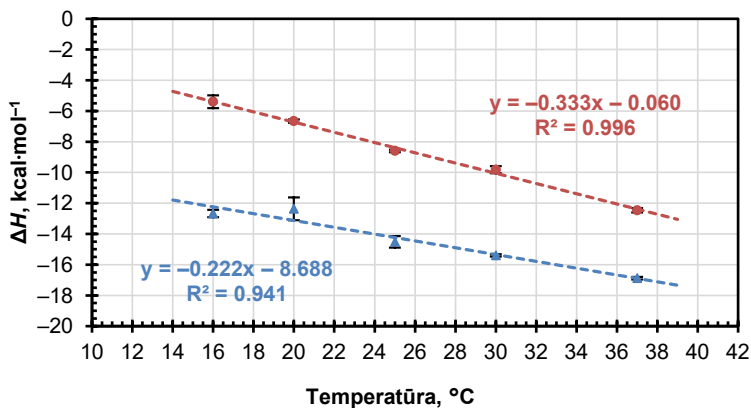
2.73. att. FABP3 mijiedarbības ar laurīnātu (C12:0) ITC titrēšanas līkņu superpozīcija variējot ITC eksperimenta temperatūru.

**A.** KPi buferis bez piedevas; **B.** KPi buferis ar 0,10 % (v/v) *Triton X-100*. Līknes sarkanā krāsā – 37 °C; līknes oranžā krāsā – 30 °C; līknes melnā krāsā – 25 °C; līknes gaiši zilā krāsā – 20 °C; līknes tumši zilā krāsā – 16 °C. Datu punkti apzīmēti ar attiecīgās krāsas apgrieztiem trīsstūrīšiem, rombiņiem, trīsstūrīšiem, aplīšiem vai kvadrātiņiem. Līknes pārliekuma punkta atšķirīgs novietojums atspoguļo aktīvā proteīna daudzuma nevienādību paraugā eksperimenta laikā.

Izmantojot termodinamiskās vērtības, kas iegūtas piecās dažādās temperatūrās un vienādojumus (1.5.) – (1.8.), izrēķināta FABP3-laurīnāta (C12:0) saistības termodinamisko parametru atkarība no temperatūras paplašinātā temperatūru diapazonā no 0 līdz 44 °C. Iegūtie grafiki parādīti 2.75. un 2.76. attēlos. Kā redzams, neatkarīgi no bufera sastāva, saistības Gibbsa brīvā enerģija,  $\Delta G$ , mainās minimāli. Toties entalpijas un entropijas komponentu ieguldījums mainījās. Buferī bez deterģenta piedevas novēro daudz straujāku  $\Delta H$  izmaiņu.  $\Delta H$  kļūst negatīvāks palielinoties temperatūrai. Līdzīgs process notiek arī buferī ar *Triton X-100*, taču taisnes slīpums ir daudz lēzenāks un  $\Delta H$  izmaiņa ir salīdzinoši mazāk izteikta. Ņemot vērā to, ka entalpija un entropija ir saistīti parametri,  $-T\Delta S$  izmaiņas abos grafikos ir līdzīgas  $\Delta H$  izmaiņām, bet ar pretēju zīmi. Proti, pieaugot temperatūrai, entropija kļūst pozitīvāka. Tāpat, buferī bez deterģenta šī izmaiņa ir daudz straujāka nekā buferī ar *Triton X-100*.

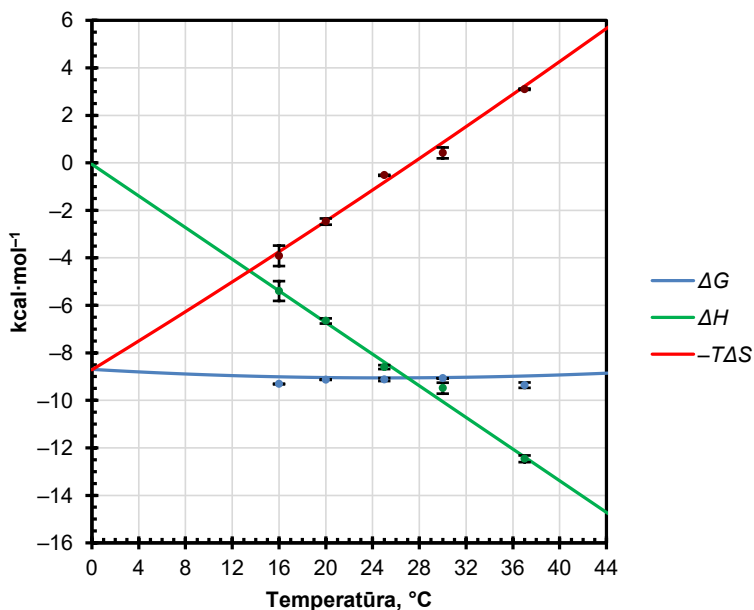
Kopumā termodinamisko parametru tendences abos buferos nemainījās, kas ļauj secināt, ka deterģenta piedeva netraucē FABP3-TS saistībai un neietekmē saistības mehānismu. Savukārt,

termodinamisko parametru variācijas saistītas ar solvatācijas apvalku reorganizāciju un nekovalento mijiedarbību enerģijas izmaiņām.



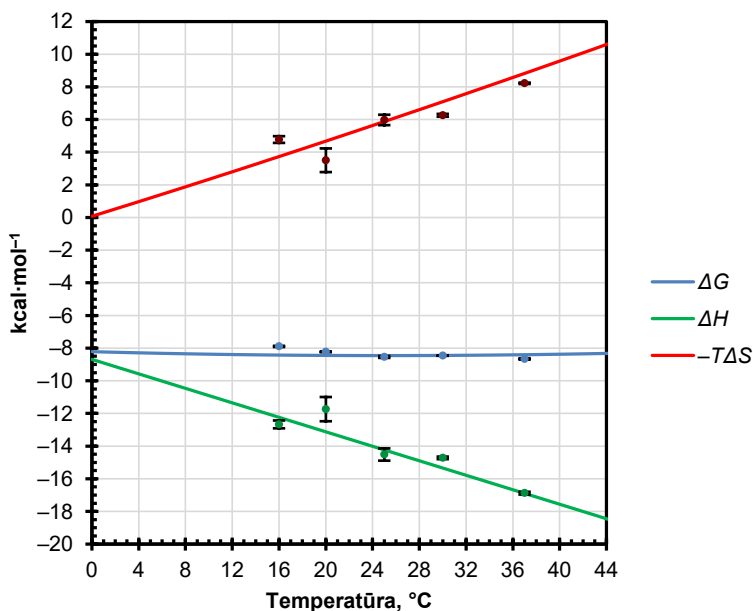
2.74. att. FABP3-laurināta saistības  $\Delta H$  atkarība no temperatūras.

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



2.75. att. FABP3-laurināta (C12:0) saistības termodinamisko parametru atkarība no temperatūras KPi buferī (bez piedevām).

Izmantotie saistības termodinamiskie parametri, noteikti pie  $t = 25$  °C:  $\Delta G = -9,05$  kcal·mol<sup>-1</sup>,  $\Delta H = -8,39$  kcal·mol<sup>-1</sup>,  $-T\Delta S = -0,82$  kcal·mol<sup>-1</sup> un  $\Delta C_p = -0,33$  kcal·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>. Eksperimentālie dati parādīti kā attiecīgās krāsas punkti ( $\Delta G$  – zilā krāsā;  $\Delta H$  – zaļā krāsā un  $-T\Delta S$  – sarkanā krāsā).



2.76. att. FABP3-laurināta (C12:0) saistības termodinamisko parametru atkarība no temperatūras KPi buferī ar 0,10 % (v/v) *Triton X-100* piedevu.

Izmantotie saistības termodinamiskie parametri, noteikti pie  $t = 25$  °C:  $\Delta G = -8,46$  kcal·mol<sup>-1</sup>,  $\Delta H = -14,23$  kcal·mol<sup>-1</sup>,  $-T\Delta S = 5,87$  kcal·mol<sup>-1</sup> un  $\Delta C_p = -0,22$  kcal·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>. Eksperimentālie dati parādīti kā attiecīgās krāsas punkti ( $\Delta G$  – zilā krāsā;  $\Delta H$  – zaļā krāsā un  $-T\Delta S$  – sarkanā krāsā).

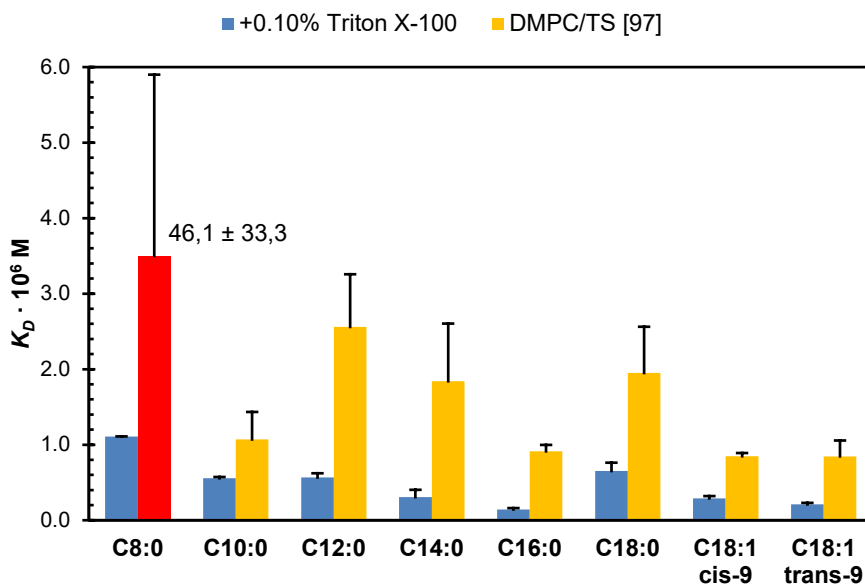
## 2.8. FABP3 termodinamiskie pētījumi

### 2.8.1. FABP3-TS saistības termodinamika

Pielietojot 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 grafiski salīdzināti ar iepriekš publicētiem datiem [99] (2.77. att.) un apkopoti 2.11. tabulā.

Kā redzams, TS saistības stiprumiem, kas noteikti ar divām dažādām pieejām, saglabājas līdzīgas tendences. Visvājāk ar FABP3 saistījās C8:0, bet visstiprāk – C16:0. C18:0 un C14:0 saistās vismaz divas reizes vājāk nekā C16:0. Tomēr, DMPC/TS gadījumā C12:0 saistījās sliktāk par C10:0, bet *Triton X-100* piedevas klātbūtnē abas TS saistījās līdzīgi. Šī ir vienīgā pozīcija, kurā nav kopīgas tendences. Nav skaidrs, kāpēc DMPC klātbūtnē C10:0 uzrādīja tik augstu afinitāti, kas ir tikai par 0,157  $\mu\text{M}$  vājāka nekā C16:0. Pamatojoties uz kristalogrāfijas datiem, C10:0 novietojums FABP3 aktīvajā centrā nav optimāls (PDB ID 4TJZ), jo neveidojas U veida konformācija.

Kopumā, datiem, kas iegūti ar *Triton X-100* piedevu ir mazāka izkliede un iegūtās termodinamiskās vērtības daudz labāk atspoguļo proteīna-liganda saistības termodinamiku (2.11. tab.). Visām izpētītajām TS saistības mehānisms bija entalpijas virzīts (*enthalpy-driven*), ar dominējošo  $\Delta H$  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.



2.77. att. Izmantojot *ITC* noteikto FABP3-TS saistības afinitāšu salīdzinājums.

Autores iegūtie dati – zilā krāsā; literatūras dati [99] – dzeltenā krāsā. Vērtība C8:0 (sarkanā krāsā) atspoguļota relatīvās vienībās pārāk lielās starpības starp datiem un kļūdas dēļ; reāla vērtība norādīta skaitliski.

Savukārt, polinepiesātinātā TS, EPA, uzrādīja samērā vāju saistību, kas bija līdzīga C8:0. Atšķirībā no C8:0, EPA gadījumā novēroja  $\Delta H$  uzlabojumu par  $\sim 9,4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , un  $-T\Delta S$  pasliktināšanos par līdzīgu vērtību. Ņemot vērā, 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 liecina  $-T\Delta S$  vērtības pieaugums. Savukārt, ierobežotais kustīgums labvēlīgi ietekmēja proteīna-liganda nekovalentās mijiedarbības. Iegūtie dati aprakstīti darba autores publikācijā [260].

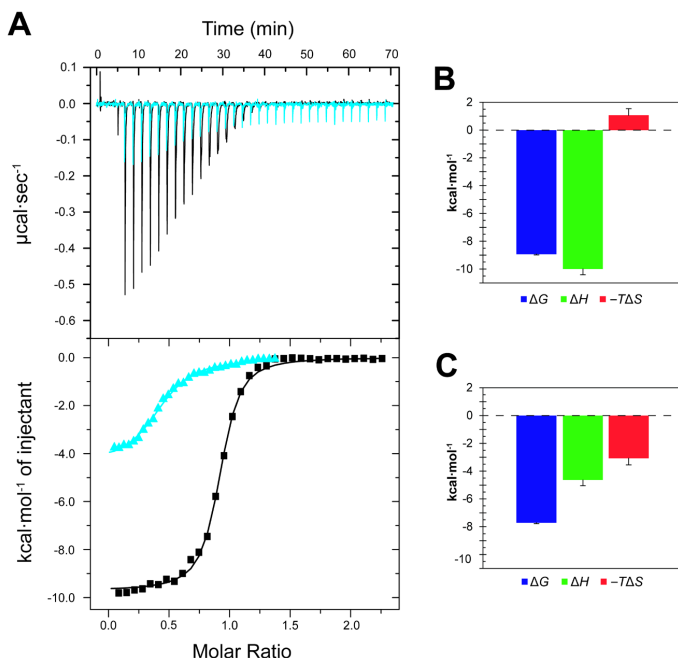
ITC termodinamiskie dati FABP3 mijiedarbībai ar TS un to esteriem KPi buferī, 25 °C

Savienojums	Sāīsinātā formula <sup>23</sup>	0,10 % (v/v) Triton X-100 piedeva	$K_D$ , $\mu\text{M}$	$\Delta G$ , $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta H$ , $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$-T\Delta S$ , $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$N^{24}$
kaprilāts	C8:0	-	$1,86 \pm 0,05$	$-7,82 \pm 0,02$	$-8,01 \pm 0,09$	$0,19 \pm 0,07$	$\sim 1,0$
		+	$1,109 \pm 0,001$	$-8,13 \pm 0,01$	$-12,6 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,3$	$\sim 1,0$
kaprināts	C10:0	-	$0,252 \pm 0,004$	$-9,01 \pm 0,01$	$-11,09 \pm 0,08$	$2,08 \pm 0,08$	$\sim 1,0$
		+	$0,56 \pm 0,02$	$-8,535 \pm 0,007$	$-13,2 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,3$	$\sim 1,0$
laurināts	C12:0	-	$0,20 \pm 0,02$	$-9,12 \pm 0,06$	$-8,60 \pm 0,08$	$-0,53 \pm 0,02$	$\sim 1,0$
		+	$0,57 \pm 0,06$	$-8,54 \pm 0,06$	$-14,5 \pm 0,4$	$6,0 \pm 0,3$	$\sim 1,0$
miristāts	C14:0	+	$0,3 \pm 0,1$	$-8,9 \pm 0,2$	$-10,9 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,2$	$\sim 1,0$
palmitāts	C16:0	+	$0,14 \pm 0,02$	$-9,34 \pm 0,07$	$-8,7 \pm 0,9$	$-0,6 \pm 0,8$	$\sim 1,0$
stearāts	C18:0	+	$0,7 \pm 0,1$	$-8,34 \pm 0,04$	$-6,4 \pm 0,4$	$-2,0 \pm 0,4$	$\sim 1,0$
oleāts	C18:1 <i>cis</i> - $\Delta^9$	+	$0,29 \pm 0,03$	$-8,93 \pm 0,06$	$-10,0 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,5$	$\sim 1,0$
elaidāts	C18:1 <i>trans</i> - $\Delta^9$	+	$0,21 \pm 0,02$	$-9,12 \pm 0,06$	$-8,0 \pm 0,9$	$-1,1 \pm 0,9$	$\sim 1,0$
eikosapenāts (EPA)	20:5 <i>cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14,17}$	+	$1,6 \pm 0,2$	$-7,90 \pm 0,07$	$-17,4 \pm 0,7$	$9,5 \pm 0,8$	$\sim 1,0$
palmitoil-CoA	C16:0-CoA	-	$8,9 \pm 1,2$	$-6,90 \pm 0,08$	$-5,04 \pm 0,09$	$-1,86 \pm 0,01$	$\sim 1,0$
EPA-karnitīns	20:5 <i>cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -AC	-	$14,83 \pm 0,08$	$-6,61 \pm 0,03$	$-2,43 \pm 0,09$	$-4,19 \pm 0,06$	$\sim 1,0$
miristoilkarnitīns	C14:0-AC	-	11,3	-6,7	-1,1	-5,7	$\sim 0,5$
oleoilkarnitīns	C18:1 <i>cis</i> - $\Delta^9$ -AC	-	$2,21 \pm 0,07$	$-7,72 \pm 0,01$	$-4,6 \pm 0,2$	$-3,1 \pm 0,2$	$\sim 0,5$
elaidoilkarnitīns	C18:1 <i>trans</i> - $\Delta^9$ -AC	-	$2,19 \pm 0,04$	$-7,72 \pm 0,02$	$-4,29 \pm 0,06$	$-3,43 \pm 0,08$	$\sim 0,5$

<sup>23</sup> Oglekļu skaits : nepiesātināto saišu skaits un to pozīcijas<sup>24</sup> 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.

## 2.8.2. FABP3-acilkarnitīnu un palmitoil-CoA saistības termodinamika

Turpinot termodinamiskos pētījumus, izmēģināts noteikt saistības parametrus TS karnitīna un CoA esteriem. Eksperimentos izmantoja šādus astoņus esterus: (i) C16:0-CoA; (ii) C8:0-karnitīns, (iii) C12:0-karnitīns, (iv) C14:0-karnitīns, (v) C16:0-karnitīns, (vi) C18:1-*cis*- $\Delta^9$ -karnitīns, (vii) C18:1-*trans*- $\Delta^9$ -karnitīns un (viii) EPA-karnitīns. Interesanti, ka salīdzinājumā ar TS, kur deterģenta piedeva netraucēja saistībai, šeit *Triton X-100* pat 0,10 % (v/v) koncentrācijā pilnībā bloķēja esteru saistību. Turklāt *Triton X-100* neietekmēja arī acilkarnitīnu paraugu daļiņu izmērus vai dispersiju *DLS* eksperimentā (2.10. tab.).



2.78. att. *ITC* titrēšanas līkņu superpozīcija un termodinamisko parametru grafiskais atspoguļojums. Visi titrēšanas eksperimenti veikti KPi buferī, 25 °C.

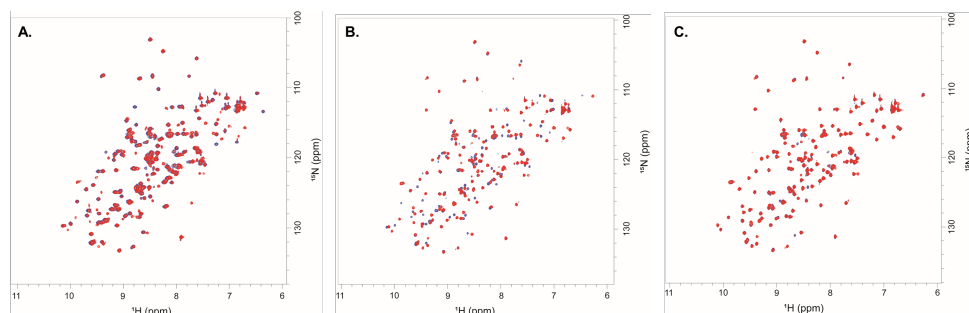
- A. FABP3 mijiedarbības ar elaidātu (melnā krāsā) un elaidoilkarnitīnu (gaiši zilā krāsā) titrēšanas līkne. B. un C. attiecīgi elaidāta un elaidoilkarnitīna termodinamisko parametru grafiskais atspoguļojums.

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*- $\Delta^9$ -karnitīni (2.11. tab.). EPA-karnitīns saistījās pie FABP3 par kārtu vājāk nekā EPA TS. Turklāt, tam realizējas cits saistības mehānisms, ar dominējošo entropijas komponenti, kas bija divreiz lielāka (absolūtos skaitļos) par  $\Delta H$ . Palmitoil-CoA gadījumā  $-T\Delta S$  efekts bija mazāk izteikts un dominēja entalpijas komponente. Šis saistības mehānisms ir vairāk līdzīgs garķēžu TS saistībai (piemēram, stearātam). C18:1-*cis/trans*- $\Delta^9$ -karnitīni arī saistījās pie FABP3 ar līdzīgu afinitāti,

kas bija par kārtu vājāka nekā atbilstošo TS  $K_D$ . Abiem mononepiesātinātajiem karnīfīna esteriem novēroja identiskus termodinamiskos saistības profilus. Salīdzinājumā, ar attiecīgām TS,  $\Delta H$  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*- $\Delta^9$ -karnīfīniem novēroja saistības stehiometrijas,  $N$ , samazinājumu no 1,0 līdz 0,5 (2.78. att.). 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. Visos gadījumos tika iegūts  $N \sim 0,5$ . Savukārt, kontroles eksperimentos ar TS šī pati proteīna partija uzradīja  $N \sim 1,0$ . Šie dati liecina, ka tika novērots jauns mononepiesātināto karnīfīnu saistības mehānisms (2.11. nodaļa). Iegūtie dati aprakstīti darba autores publikācijā [260].

### 2.8.3. Piesātināto TS karnīfīna esteru pētījumi

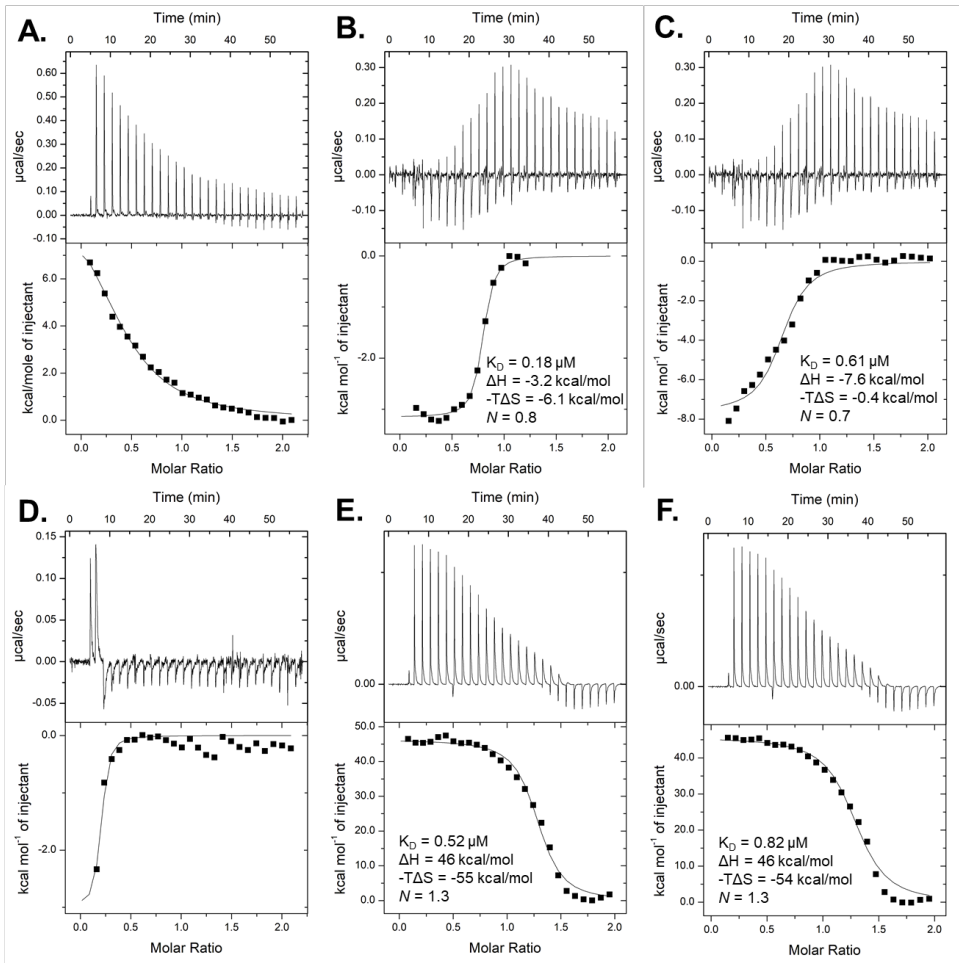
Ņemot vērā, ka mono- un polinepiesātināto TS karnīfīna esteri veiksmīgi saistījās ar FABP3, sagaidāms, ka līdzīga garuma piesātināto TS karnīfīna esteriem arī būtu jāsaistās pie FABP3, tomēr eksperimenti ar tiem nebija tik veiksmīgi (22. pielikums). Neskatoties uz labāku šķīdību ūdens buferos (it īpaši zemā pH) salīdzinājumā ar TS, garāku acilkarnīfīnu gadījumā novēro micellizēšanos, kas traucē saistībai ar FABP3. It īpaši izteikts šis efekts ir palmitoilkarnīfīnam, kam CMC ir tikai 15  $\mu\text{M}$  (19. pielikums [267]). Savukārt *ITC* eksperimentā minimālās liganda koncentrācijas būtu 200–300  $\mu\text{M}$  (atkarībā no izdalītā siltuma). Vienīgais piesātinātās TS karnīfīna 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  $\sim 0,5$  (2.11. tab.). Tas parāda, ka piesātināto un mononepiesātināto TS karnīfīna esteriem būtu jāsaistās ar FABP3 pēc līdzīga mehānisma (2.11. nodaļa). Tomēr, *ITC* eksperimentā izdalītais siltumefekts bija ļoti mazs, kas traucēja atkārtotamībai,  $\Delta H \sim -1,1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ .



2.79. att. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC apo-FABP3 un FABP3-miristāta spektru superpozīcija paraugiem ar DMPC liposomām.

A. apo-FABP3 KPi buferī bez piedevām (zilā krāsā) un apo-FABP3 DMPC klātbūtnē. B. apo-FABP3 DMPC klātbūtnē (zilā krāsā) un FABP3-DMPC/miristāta komplekss (sarkanā krāsā). C. FABP3- miristāta komplekss KPi buferī bez piedevām (zilā krāsā) un FABP3-DMPC/miristāta komplekss (sarkanā krāsā).





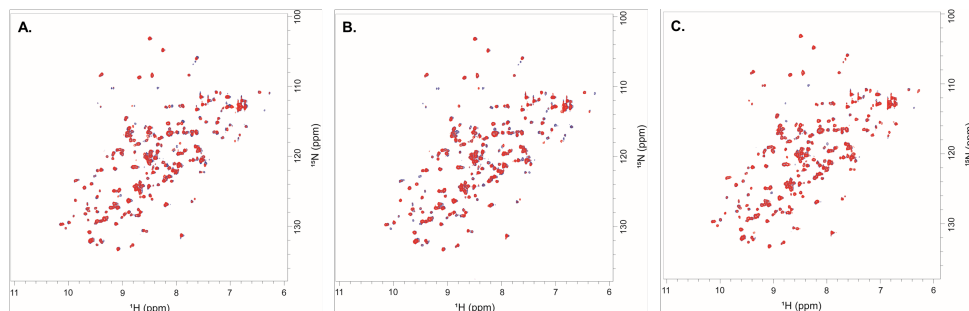
2.80. att. DMPC/laurināta (A–C) un DMPC/miristāta (D–E) liposomu ITC titrēšanas eksperimenti KPi buferī 25 °C.

- A.** DMPC/laurināta liposomu titrēšana KPi buferī (bez proteīna) – bāzes līnija. **B.** FAPB3 titrēšana ar DMPC/laurināta liposomām. **C.** FAPB3 titrēšana ar DMPC/laurināta liposomām ar atņemtu bāzes līniju. **D.** DMPC/miristāta liposomu titrēšana KPi buferī (bez proteīna) – bāzes līnija. **E.** FAPB3 titrēšana ar DMPC/miristāta liposomām. **F.** FAPB3 titrēšana ar DMPC/miristāta liposomām ar atņemtu bāzes līniju.

Palmitāta šķīdības uzlabošanai izmēģināts – pēc analogijas ar Matsuoka S. *et al* metodi [99] – uztaisīt DMPC/acilkarnitīnu liposomas. Kontrolei uztaisītas arī DMPC/laurināta un DMPC/miristāta liposomas. Validējot metodi, uzņemti 2D  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  HSQC spektri FAPB3 kompleksi ar DMPC/TS. Sākumā pārbaudīts vai DMPC pašam par sevi nav mijiedarbības ar FAPB3. Kā redzams no spektru superpozīcijas (2.79. att., A), FAPB3 ir inerts pret DMPC liposomām. Novērojamās izmaiņas ir minimālas un korelē ar izmaiņām, ko novēroja buferu piedevu testos (2.69. att.). Turklāt, DMPC netraucē TS saistībai FAPB3 aktīvajā centrā (2.79. att., B) un neietekmē kompleksa konformāciju (2.79. att., C).

Turpmāk veiktas kontroles titrēšanas, kas apkopotas 2.80. attēlā. Kā redzams no references DMPC/TS titrēšanas buferī (2.80. att., A un D), novēro liposomu šķīšanas/veidošanās endotermiskos procesus, kas ir daudz spēcīgāki nekā pašas TS saistības siltumefekti, kas turklāt ir eksotermiski. Laurinātam iegūtie termodinamiskie parametri relatīvi labi korelē ar datiem, kas iegūti izmantojot *Triton X-100* piedevu (2.11. tab.), bet miristāta gadījumā relatīvi labi sakrīt tikai  $K_D$  vērtība, bet termodinamiskie parametri vairāk atspoguļo micelizēšanās procesus nekā saistību. Iegūtie dati apstiprina lielu dispersiju nopublicētajos datos [99].

Diemžēl, pielietojot 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 (2.81. att.).



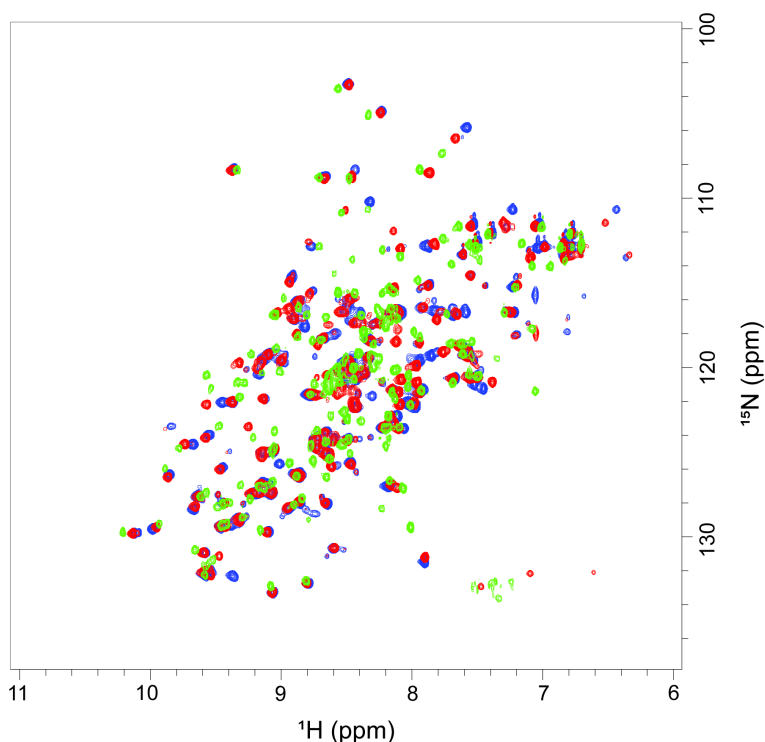
2.81. att. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru superpozīcija paraugos ar DMPC liposomām.

- A. apo-FABP3 DMPC klātbūtnē (zilā krāsā) un FABP3-DMPC/C12:0-AC komplekss (sarkanā krāsā).
- B. apo-FABP3 DMPC klātbūtnē (zilā krāsā) un FABP3-DMPC/C14:0-AC komplekss (sarkanā krāsā).
- C. apo-FABP3 DMPC klātbūtnē (zilā krāsā) un FABP3-DMPC/C16:0-AC komplekss (sarkanā krāsā).

## 2.9. Palmitoilkarnitīna efekts uz FABP3 pie zema pH

Zinot, ka acilkarnitīni labi šķīst un neveido micellas pie zema pH, īstenots FABP3-palmitoilkarnitīna saistības pētījums pie nefizioloģiskā pH. Izvēlētas divas pH vērtības, 5,4 un 3,6. No kurām pirmā pH vērtība ir par vienu vienību zemāka nekā FABP3 pI, bet otrā – mazāka par palmitoilkarnitīna pKa.

Vispirms pārbaudīts, vai proteīns ir stabils un reaģētspējīgs šajos apstākļos. Šim nolūkam  $^{15}\text{N}$ -iezīmētām apo-FABP3 nomainīja buferi izmantojot atsāļošanas metodi [manuāli, izmantojot *HiTrap™ Desalting* kolonnu (*Cytiva*)]. KPi bufera vietā izmantoja 20 mM MES pH 5,4, 50 mM NaCl vai 20 mM acetātu pH 3,6, 50 mM NaCl. Pēc tam tika uzņemti 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektri apo-proteīnam un FABP3-palmitāta kompleksiem. Kā redzams 2.82. attēlā, proteīnam saglabājas struktūra visu trīs pH buferos. Tomēr, spektros novēro lielas nobīdes krosplīķu novietojumā, jo aminoskābju atlikumiem mainās protonēšanās stāvokļi, kas savukārt izraisa izmaiņas. Pie kam, aminoskābju atlikumi, kas ir vērsti uz ārpusi (šķīdinātājam vairāk pieejami) vai atrodas kustīgajos reģionos, mainās daudz vairāk, nekā iekšpusē paslēptie (*buried*) aminoskābju atlikumi.

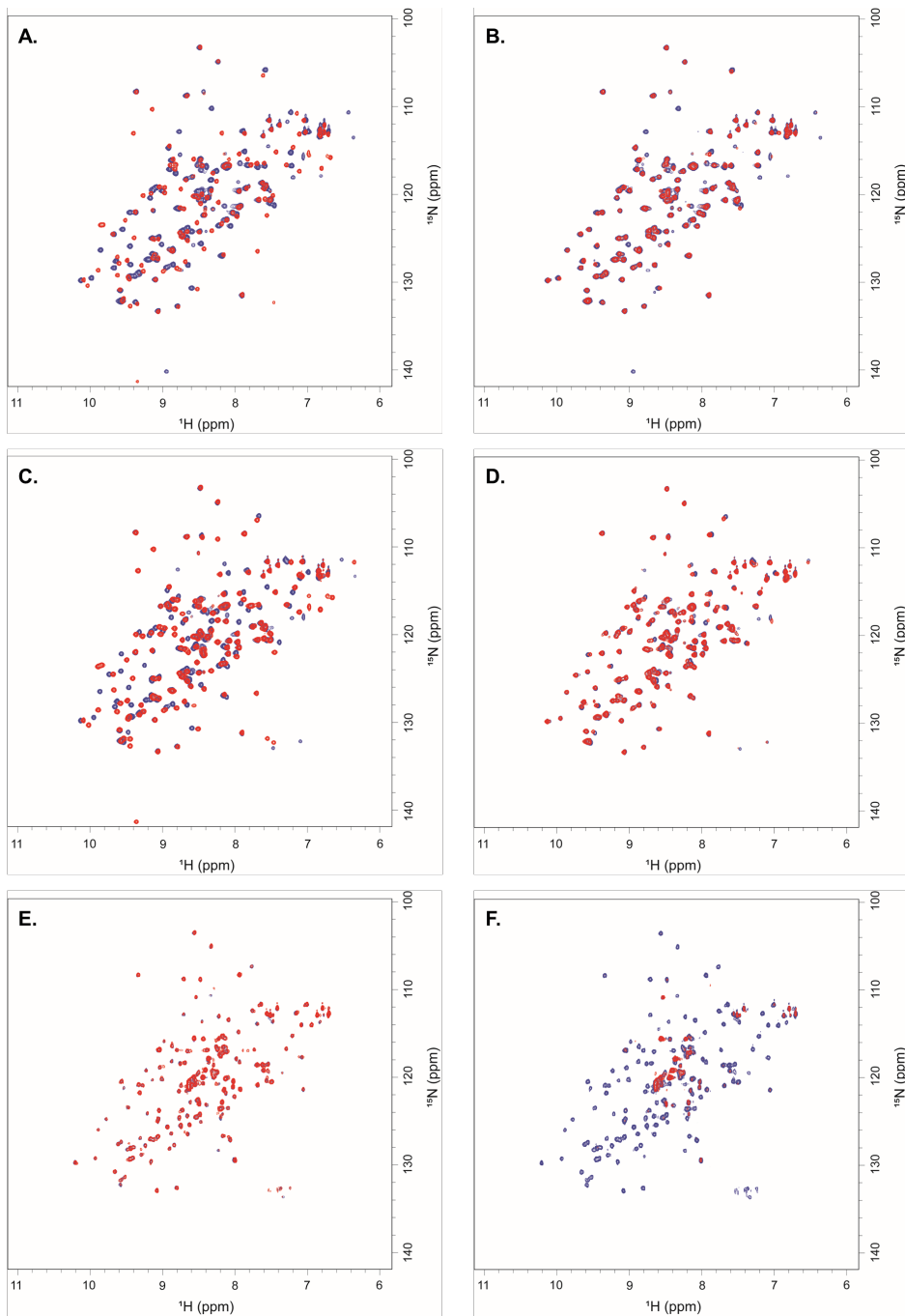


2.82. att. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru superpozīcija apo-FABP3 pie trīs dažādiem pH.

apo-FABP3: KPi buferī pH 7,6 – zilā krāsā; MES buferī pH 5,4 – sarkanā krāsā un acetāta buferī pie pH 3,6 – zaļā krāsā.

Tālāk pārbaudīta palmitāta (C16:0) un palmitoilkarnitīna (C16:0-AC) spēja saistīties pie FABP3 dažādu pH vidē. Iegūtie dati apkopoti 2.83. attēlā. Palmitāta gadījumā, proteīna-liganda saistību novēro pie pH 7,6 un pH 5,4 (2.83. att., A, C). Turklāt spektrā redzamajām ķīmisko nobīžu izmaiņām ir līdzīgas tendences (2.70. att., A). Savukārt, pie pH 3,6 (2.83. att., E) palmitāta saistību ar FABP3 vairs nenovēro. Visticamāk tas saistīts ar aminoskābju atlikumu protonēšanās stāvokļa maiņu liganda ieejas portāla apkārtnē (1.17. att.) un palmitāta karboksilgrupas protonēšanos ( $pK_a = 4,75$ ). Tas neļauj veidoties elektrostatiskām mijiedarbībām, kas virza ligandu aktīvajā centrā [100].

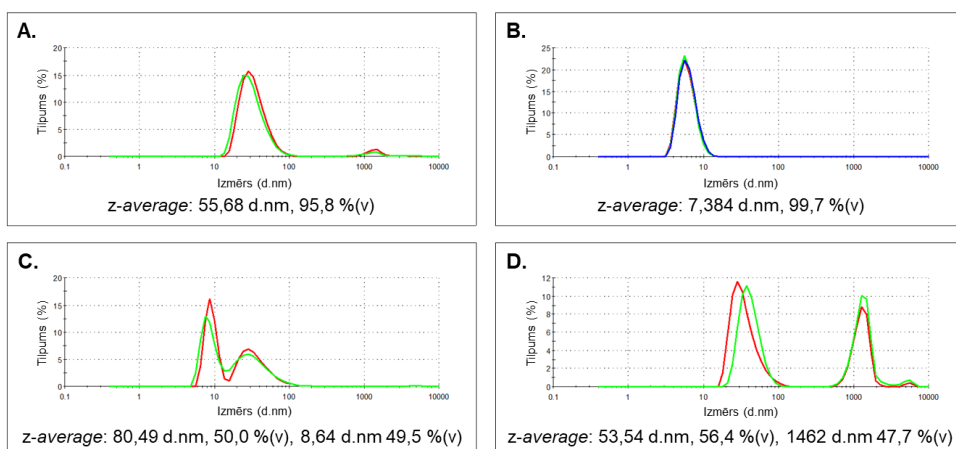
Palmitoilkarnitīna gadījumā izmaiņas spektrā pie pH 7,6 (2.83. att., B) ir daudz izteiktākas nekā pie pH 5,4 (2.83. att., D), tomēr, tās joprojām ir ļoti mazas, lai varētu viennozīmīgi runāt par kompleksa veidošanos. Savukārt, pie pH 3,6 (2.83. att., F) spektrā arī novēro proteīna signālu izzušanu, turklāt, 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 pētīti ar *DLS*.



2.83. att. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru superpozīcija.

Apo-FABP3 – zilā krāsā, un FABP3 kompleksā ar palmitātu (**A**, **C**, **E**) vai palmitoilkarnitīnu (**B**, **D**, **F**) – sarkanā krāsā, variējot buferu pH. **A**, **B** – KPi buferis, pH 7,6; **C**, **D** – MES buferis, pH 5,4; **E**, **F** – acetāta buferis, pH 3,6.

DLS dati rāda, ka apo-FABP3 daļiņu izmērs (2.84. att., A) acetāta buferī pie pH 3,6 ir ~ 56 d. nm. (95,8 %). Paraugšs ir ļoti viendabīgs ar nelielu agregātu daudzumu (< 5 %). Iegūtais izmērs sakrīt ar proteīna hidrodinamisko rādiusu. Palmitoilkarnitīna paraugs (2.84. 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 (2.84. att., C): ~ 80,5 d. nm. (50 %) un ~ 8,6 d. nm. (50 %). Kopumā, tas norāda, 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. Tas arī atbilst KMR eksperimentālajiem nosacījumiem, kur ligands bija pielikts divkārtēja pārākumā attiecībā pret proteīnu, lai panāktu pilnīgu piesātināšanos. Paraugā ar FABP3-palmitātu (2.84. att., D) arī novēro divu izmēru daļiņas, ~ 54 d. nm. (56 %) un 1462 d. nm. (48 %). Šis 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.



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

Rezultātā no iegūtajiem datiem 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. No 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru izskata var secināt, ka pie pH 5,4 krosipiķi ir daudz labāk sadalīti (labāka izšķiršana) un līniju pusplatumi ir mazāki nekā pie pH 7,6. Tas notiek amīdu protonu apmaiņas ar ūdeni ātruma palēnināšanās dēļ. Rezultātā, labākai FABP3 pamatķēdes un sānu ķēžu attiecināšanai būtu jāizmanto spektri pie zemāka pH (iepriekšējās analīzes veiktas pie pH 7,6, 20. un 21 pielikumi).

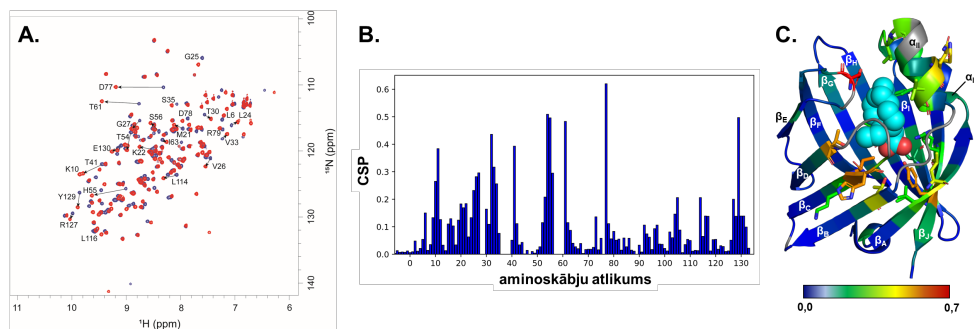
Attiecībā uz palmitoilkarnitīnu, domājams, ka tam tomēr būtu jāsaistās ar FABP3, taču pierādīt to ar fizikāli-ķīmiskām metodēm ir grūti sliktas šķīšanas un zemas CMC koncentrācijas

dēļ. Eksperimenti paaugstinātā temperatūrā (37 °C) arī nedeva pietiekošu proteīna-liganda saistību detektēšanas uzlabojumu.

## 2.10. FABP3 saistības validācija ar KMR

### 2.10.1. Ķīmisko nobīžu perturbāciju analīzes pamatprincipi

Lai novērtētu un kvantificētu KMR spektros redzamās izmaiņas, veikta *CSP* analīze. *CSP* analīzes darba plūsma atspoguļota 2.85. attēlā, bet teorija aprakstīta 1.5.3.2. apakšnodaļā. Sākumā izmantojot 3D proteīnu spektroskopiju (1.5.3.3. un 3.8. apakšnodaļas), veikta apo-proteīna un proteīna-liganda kompleksu pamatķēdes attiecīnāšana (20. un 21. pielikumi). Pēc tam, izmantojot vienādojumu (1.9.) ar mērogošanas koeficientu,  $\alpha = 0,10$ , izrēķinātas spektrā redzamās krosplīķu nobīdes, ko pēc tam vizualizē kā stabiņu diagrammu (2.85. att., B). Tā uzreiz parāda, kuri proteīna aminoskābju atlikumi visvairāk izjūt liganda saistību. Parasti tie ir tiešā kontaktā (pirmnā koordinācijas sfēra) ar ligandu, vai arī pakļaujas allostēriskiem vai konformacionāliem efektiem. Šāds atspoguļojums vislabāk ļauj salīdzināt iegūtās *CSP* vērtības gan savā starpā, gan arī starp dažādu ligandu kompleksiem. Otrais veids kā atspoguļot *CSP* ir grafiskais. Iegūtajām *CSP* vērtībām piešķir krāsu kodu gradienta veidā, kas mainās no tumši zilās uz sarkanu. Šo krāsojumu pielieto proteīna 3D struktūrai (2.85. att., C). Šāds *CSP* atspoguļojuma veids vislabāk der darbam 3D vizualizācijas programmās (piemēram, *PyMOL* [58] vai Schrodinger® Maestro [268]), kas dod iespēju detalizētāk izprast redzamo izmaiņu iemeslus un būtību kā arī novērtēt proteīna un dažādu ligandu saistības atšķirības. Atšķirībā no kristalogrāfiskiem datiem, kur proteīna-liganda komplekss atrodas nedabiskos, ekstrēmos apstākļos, šeit saistības process tiek pētīts šķīdumā, tuvu fizioloģiskiem apstākļiem.



2.85. att. *CSP* analīzes piemērs FABP3-stearāta (C18:0) kompleksam KPi buferī pie pH 7,6.

A. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru superpozīcija apo-FABP3 (zilā krāsā) un FABP3-stearāta kompleksam (sarkanā krāsā) ar daļēju attiecīnāšanu vizuāli izteiktākajām *CSP*. B. Aprēķinātās *CSP* vērtības, atspoguļotas kā stabiņu diagramma. C. *CSP* grafiskais atspoguļojums uz FABP3 struktūras (PDB ID 3WVM) pēc krāsu koda, kur tumši zilā krāsa atspoguļo nemainīgus, bet sarkanā – visvairāk izmainītus reģionus. C18:0 atspoguļots kā VdW sfēras gaiši zilā krāsā. Aminoskābju atlikumi ar vislielākajām *CSP* atspoguļotas kā attiecīgas krāsas trubiņas. 3D struktūra ģenerēta ar *PyMOL* [58].

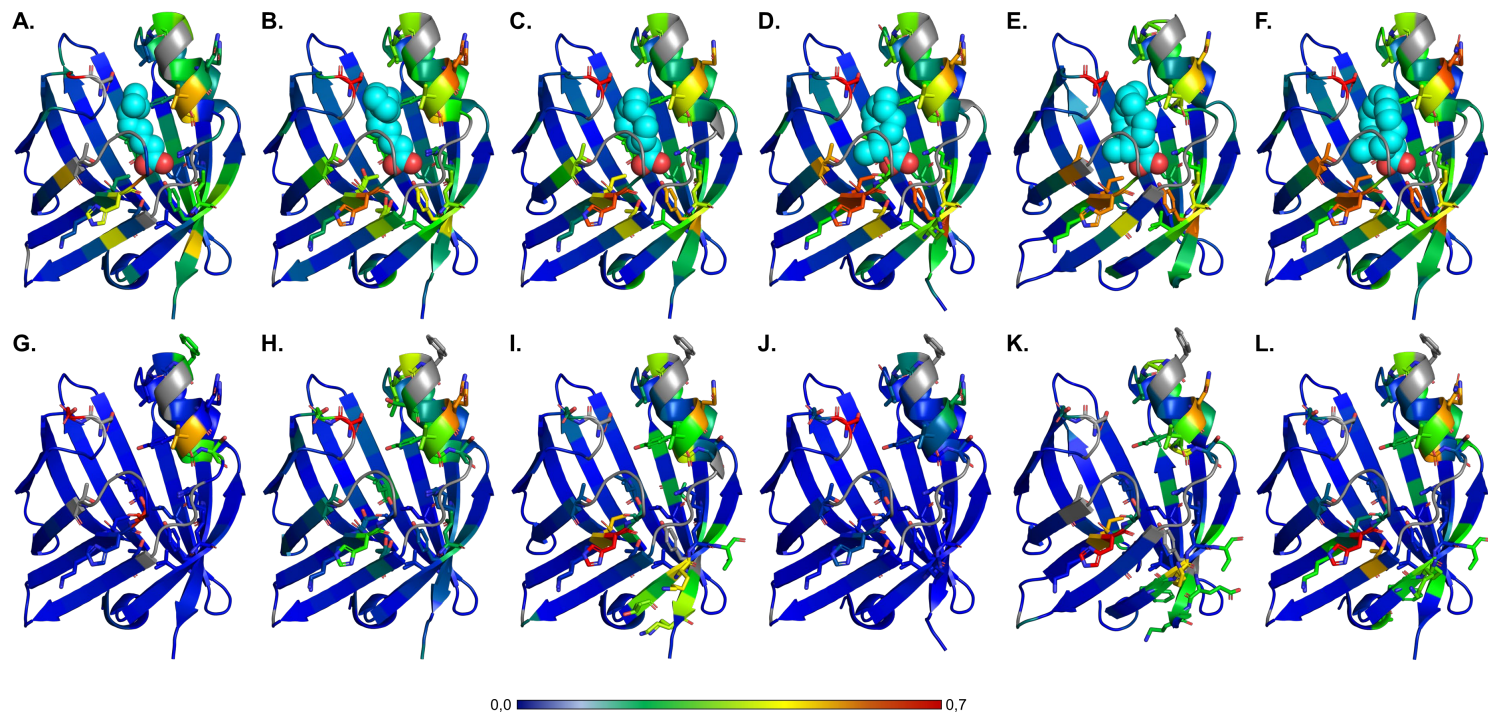
## 2.10.2. FABP3-ligandu kompleksu CSP analīze

Iepriekš aprakstītā CSP analīzes metode pielietota visiem FABP3-ligandu kompleksiem, kas pētīti šajā darbā. Kopumā analizēti 17 savienojumi, no kuriem 9 bija TS, bet 8 – TS esteri. Aprēķinātās CSP vērtības apkopotas 23. un 24. pielikumā un parādītas uz FABP3 3D struktūras ar krāsu kodiem (2.86. att.). Kā rāda iegūtie dati, TS saistība (2.85. att., A–F) izraisa vairāk izmaiņu proteīna konformācijā nekā atbilstošo TS esteri saistība (2.85. att., G–L). Turklāt, palielinoties TS garumam,  $\beta$ -mucas  $\beta_A$ – $\beta_J$  virknēs (1.17. att. un 2.85. att., C), aktīvā centra dziļumā, novērojamas lielākas perturbācijas. Kā arī visos gadījumos, izņemot C8:0-AC un C16:0-AC (2.85. att., G un J), novēro ievērojamas izmaiņas  $\alpha_{II}$  spirāles daļā, kas tuvāka liganda ieejas portālam. Diemžēl pašas ieejas portālu veidojošās cilpas netika attiecinātas pie pH 7,6 (pelēkie reģioni), taču izmaiņas tām blakus esošos aminoskābju atlikumos potenciāli liecina par šī reģiona lielām konformacionālām izmaiņām. Šie novērojumi sakrīt ar literatūras datiem par *in silico* FABP3 dinamiku, kurās Matsuoka D. *et al.* [100] pierādīja, ka apo-stāvoklī FABP3 liganda ieejas portāls ir plaši atvērts, bet notiekot saistībai tas aizveras un ieņem ciešāku konformāciju (1.18. att.).

Analizējot pozīcijas ar vislielākajām izmaiņām, ( $CSP \geq 0,2$  ppm), identificēti sekojoši 20 aminoskābju atlikumi: K10, L11, Y20\*, V26, G27, T30\*, Q32, V33, A34\*, T41, T54, H55, S56\*, T61, D77, L105\*, L114, L116\*, R127 un Y129 (2.87. att., A). Aminoskābju atlikumus, atzīmētus ar \* novēro visām TS, izņemot visīsāko, C8:0. TS esteri gadījumos, CSP uz  $\beta_A$ – $\beta_D$  lapas novēro mazāk vai vispār nenovēro. Turklāt, salīdzinot redzamās izmaiņas, novēro, ka C14:0-AC, C18:0-1-*cis/trans*- $\Delta^9$ -AC un EPA-AC (2.85. att., I, K un L) izraisa FABP3 struktūrā izmaiņas, kas visvairāk līdzinās C8:0 saistībai (2.85. att., A). Turklāt,  $\beta_I$ – $\beta_J$  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 (2.87. att., B).

Rezultātā var secināt, ka acilkarnitīni un palmitoil-CoA saistās pie FABP3 tikai vienā  $\beta$ -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. Savukārt, otrs aminoskābju atlikums, kas piedalās ūdeņraža saišu veidošanā, Y129, joprojām stipri reaģē uz liganda saistīšanu. Tas varētu veidot ūdeņraža saiti ar estera grupu. Tomēr pastāv iespēja, ka tam mainījās mijiedarbību veids, piemēram, uz hidrofobām mijiedarbībām ar TS alifātisko ķēdi. Turklāt, jāņem vērā, ka visi trīs kustīgo cilpu reģioni nav redzami KMR spektros pie pH 7,6. Viens no veidiem, ka precizēt acilkarnitīnu atrašanās vietu būtu uzņemt spektrus zemākā pH, piemēram, 5,4. Iegūtie dati aprakstīti darba autores publikācijā [260].

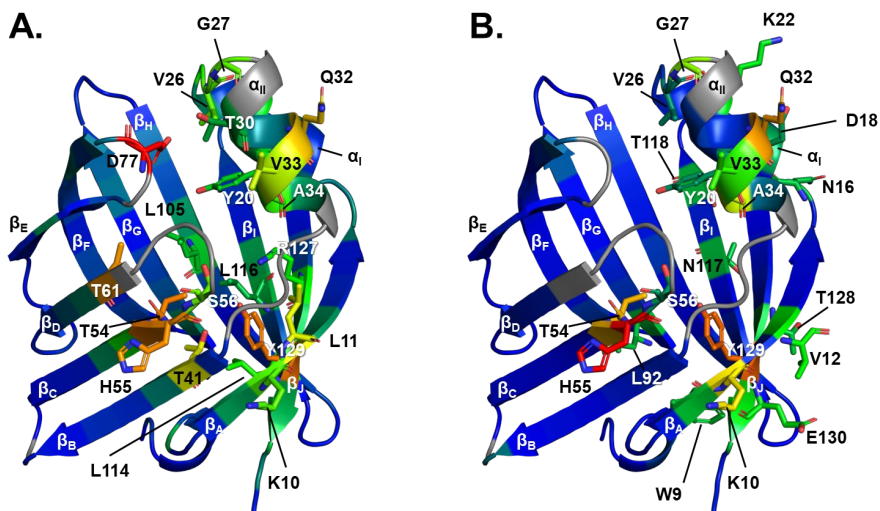
Turpinājumā mēģināts racionalizēt novērojamās izmaiņas ar IFD *in silico* metodi ģenerējot FABP3-acilkarnitīnu kompleksus.



2.86. att. CSP no 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektriem atspoguļojums uz FABP3 struktūras krāsu koda veidā, kur tumši zilā krāsā atspoguļo nemainīgus, bet sarkanā – visvairāk izmainītus reģionus.

A. FABP3 kompleksā ar C8:0 (PDB ID 7FBF). B. FABP3 kompleksā ar C12:0 (PDB ID 4TKB). C. FABP3 kompleksā ar C14:0 (PDB ID 4TKB). D. FABP3 kompleksā ar C16:0 (PDB ID 4TKJ). E. FABP3 kompleksā ar C18:1-*cis/trans*- $\Delta^9$  (PDB ID 1HMS/1HMR). F. FABP3 kompleksā ar EPA (konstruēts uz PDB ID 7FFX bāzes ar *IFD*). G. FABP3 kompleksā ar C8:0-AC. H. FABP3 kompleksā ar C12:0-AC. I. FABP3 kompleksā ar C14:0-AC. J. FABP3 kompleksā ar C16:0-AC. K. FABP3 kompleksā ar C18:1-*cis/trans*- $\Delta^9$ -AC. L. FABP3 kompleksā ar EPA-AC. Zināmās kristalogrāfiskās struktūrās TS norādīts kā VdW sfēras gaiši zilā krāsā. Aminoskābju atlikumi ar vislielākajām CSP atspoguļotas kā attiecīgas krāsas trubiņas. Struktūru numerācija (A–L) kā 24. pielikumā. Izveidots *PyMOL* programmā [58].





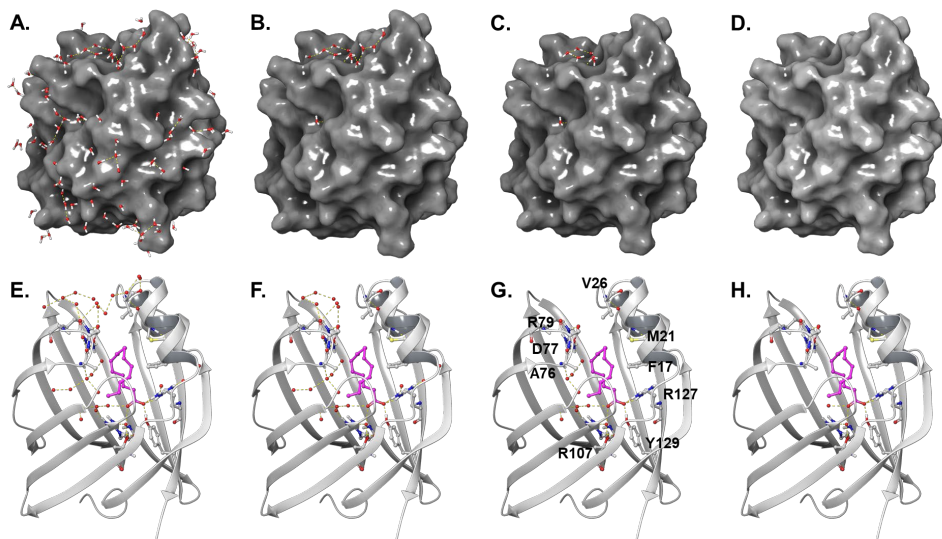
2.87. att. *CSP* atspoguļojums uz FABP3 struktūras (PDB ID 3WVM) kompleksā ar **A.** elaidātu (C18:1-*trans*- $\Delta^9$ ) un **B.** elaidoilkarnitīnu (C18:1-*trans*- $\Delta^9$ -AC) ar norādītiem mijiedarbībā iesaistītiem aminoskābju atlikumiem. Izveidots *PyMOL* programmā [58].

### 2.10.3. *IFD* aprēķini FABP3-acilkarnitīnu kompleksu izveidei

Ņemot vērā lielās izmaiņas FABP3 aktīvajā centrā, proteīna-acilkarnitīnu kompleksu modelēšanai izmantoja *IFD* metodi, ģenerējot 200 liganda konformācijas. TS saistības gadījumā novēro, ka proteīna aktīvajā centrā saglabājas daļa ūdens molekulu. Tas ir spēkā arī garķēžu TS. 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. 2.88. attēlā kristalogrāfiski parādīts ūdens molekulu novietojums FABP3-palmitāta kompleksam (PDB ID 4TKJ). Ņemot virsmas ūdens molekulas (solvatācijas apvalks, 2.88. att. A), proteīnā paliek 30 ūdens molekulas (2.88. att., B un E), no kurām lielākā daļa atrodas liganda ieejas portālā un spraugas (*gap*) rajonā. No atlikušajām 30 molekulām, tikai 24 veido ūdeņraža saites ar proteīnu (2.88. att., C un F). Savukārt ņemot visas ūdens molekulas, kas vērstas uz ārpusi (2.88. att., D), aktīvajā centrā paliek 12 ūdens molekulas (2.88. att., G), kas pārsvarā novietojas ap liganda karboksilgrupu un veido ūdeņraža saites ar T41, R106, R127 un Y129, un arī atrodas kontaktā ar D77 un R79. Tomēr septiņas ūdens molekulas bloķē spraugas reģionu. Savukārt atstājot ar ligandu kontaktējošās ūdens molekulas, paliek tikai divas (2.88. att., H). Papildus ģenerēts arī modelis bez ūdens molekulām. Pieci 4TKJ kompleksi ar 30, 24, 12, 2 un 0 ūdens molekulām tālāk tika izmantoti *IFD* SP dokinga [256, 257].

Analizējot *IFD* rezultātus, secināts, ka modeļos ar lielu ūdens molekulu daudzumu, 24–30, acilkarnitīni ieņem tādu pašu U veida konformāciju kā TS, vai arī ievietojot lādēto karnitīnu dziļi aktīvajā centrā blakus arginīniem, kas ir pretrunā ar *CSP* datiem. Molekulārā dokinga

programma nevar izspiest ūdens molekulas no FABP3 aktīvā centra un tās tiek uzskatītas par struktūras neatņemamu daļu. *IFD* aprēķina algoritma ietvaros tās var būt nedaudz nobīdītas, bet ne noņemtas. Rezultātā ūdens molekulas ierobežo aktīvā centra tilpumu un izmaina tā hidrofilicitāti, kas traucē saistīties hidrofobām TS estera daļām. Turklāt, gan spraugas, gan ieejas portāli aizpildīti ar ūdeni, kas neļauj izveidot alternatīvās konformācijas. Labākos rezultātus izdevās sasniegt, izmantojot struktūras ar 0–12 ūdens molekulām.

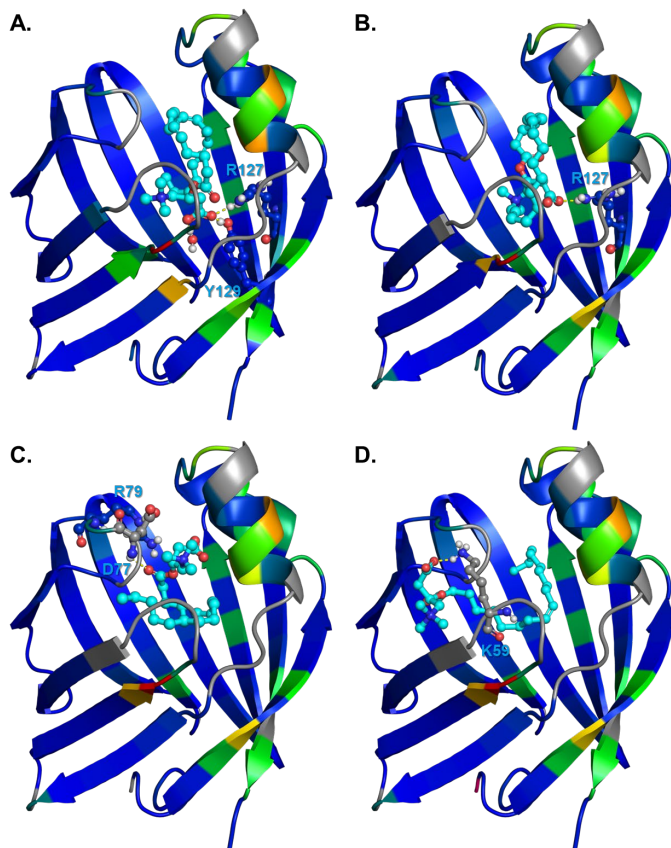


2.88. att. Ūdens molekulu novietojums FABP3-palmitāta kompleksā (PDB ID 4TKJ).

Augšā: 4TKJ struktūras ar attēlotu molekulāro virsmu (pelēkā krāsā) un atspoguļotām kristaloģrāfiskām ūdens molekulām: **A.** visas ūdens molekulas; **B.** ūdens molekulas, kas atrodas liganda ieejas portālā; **C.** ūdens molekulas, kas atrodas liganda ieejas portālā un ir ciešā kontaktā ar proteīna aminoskābju atlikumiem. **D.** visas uz ārpusi vērstās ūdens molekulas ir noņemtas. Apakšā: 4TKJ struktūra atspoguļota kā gaiši pelēkas lentes, aminoskābju atlikumi, kas piedalās liganda saistībā atspoguļoti kā gaiši pelēkas lodītes un nūjiņas (*ball and stick*), ligands atspoguļots kā rozā lodītes un nūjiņas, ūdens molekulas atspoguļotas kā sarkanas lodītes. Ūdeņraža saites atspoguļotas kā dzeltenas pārtrauktas līnijas: **E.** 4TKJ ar 30 ūdens molekulām; **F.** 4TKJ ar 24 ūdens molekulām, **G.** 4TKJ ar 12 ūdens molekulām, un **H.** 4TKJ ar divām ūdens molekulām.

Lielākā daļā kompleksos *IFD* ievietoja acilkarnitīnus tādās konformācijās, kurās *L*-karnitīna karboksilgrupa ir saistīta ar kādu no asparagīniem (R79, R107 vai R127), K59 vai Y129 FABP3 aktīvajā centrā. EPA-AC gadījumā novēroja kontaktu veidošanās tādu pašu kā garķēžu TS, proti ar R127, Y129 un ūdens molekulu (2.89. att., A). Savukārt, mono-nepiesātinātiem acilkarnitīniem novēroja trīs atšķirīgas konformācijas. Viena no tām bija līdzīga EPA-AC un garķēžu TS (2.89. att., B). Šeit *L*-karnitīna karboksilgrupa veidoja ūdeņraža saiti tikai ar R128. Tomēr Y129 atrodas pietiekami tuvu, lai pastarpināti piedalītos ūdeņraža saišu veidošanā. Otrajā konformācijā *L*-karnitīns novietojas tieši liganda ieejas portāla sākumā (2.89. att., C) un veido ūdeņraža saiti ar D77, kā arī sāls tiltiņu ar R79. Savukārt, lipofilās alkil ķēdes gals novietojas tieši spraugā starp  $\beta_D$  un  $\beta_E$  virknēm. Trešā konformācija ir viena no visinteresantākajām. Šeit *L*-karnitīns ir vērstš uz ārpusi caur spraugas reģionu (*gap*) starp  $\beta_D$ – $\beta_E$  virknēm un izveidoja ūdeņraža saiti ar K59 (2.89. att., D). Savukārt, visa liganda lipofilā

daļa paliek iekšpusē  $\beta$ -mucā, pie kam tuvāk  $\beta_I$ - $\beta_J$  virknēm, kā to arī paredz *CSP* eksperimentālie dati.



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

**A.** FABP3-oleoilkarnitīns (C18:1-*cis*- $\Delta^9$ -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 zilās lodītes un nūjiņas (*ball and stick*). Aminokābju 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 [58].

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 aminokābju atlikumiem FABP3 aktīvajā centrā, taču tas ir pretrunā ar KMR eksperimentiem, kur tādu saistību nenovēroja. Turklāt, daļā no konformācijām liganda lipofīlā daļa bija vērsta uz ārpusi un brīvi pieejama šķīdinātājam, kas ir pretrunā ar saistības mehānismu un pašu lipofīlu grupu tendenci “slēpties” no ūdens. Savukārt, mazā daļā kompleksu novēroja t.s. apgrieztu un atvērto saistības konformāciju (2.89. att., C un D), kas ievērojami labāk saskan ar eksperimentālajiem datiem. Apgrieztās

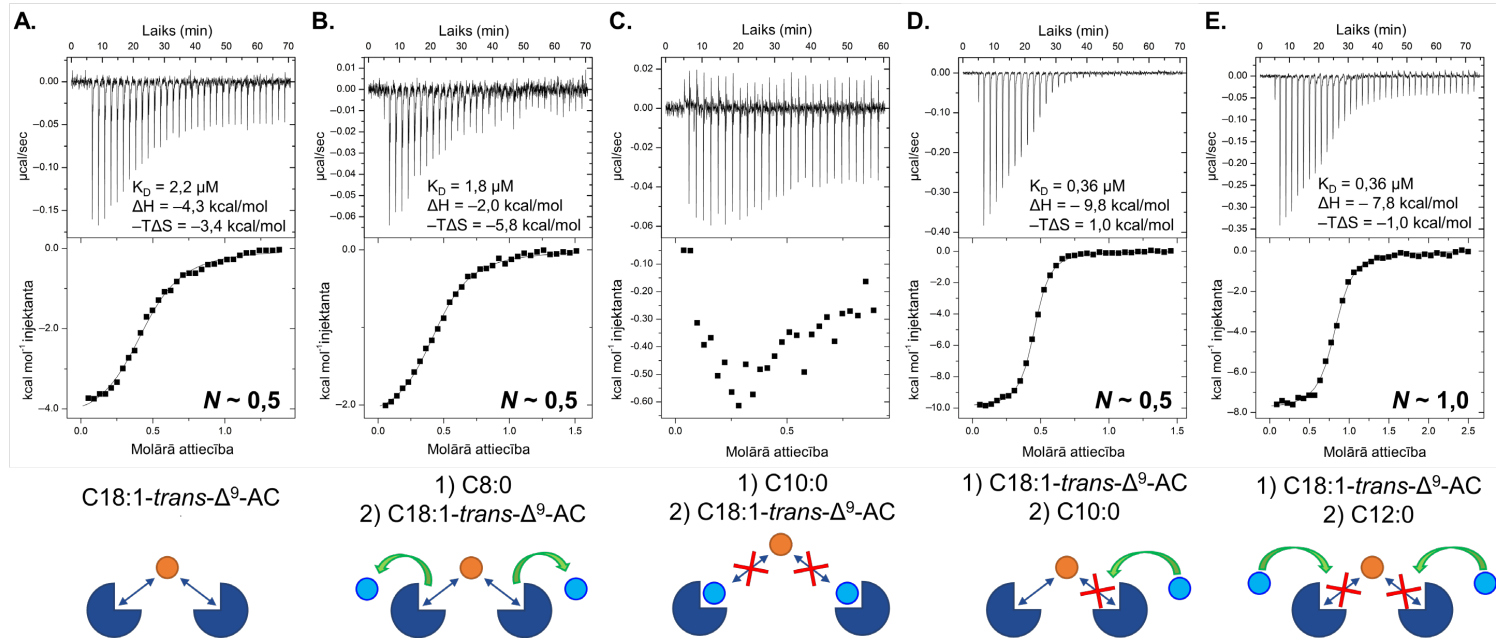
konformācijas gadījumā saistība notiek ar kustīgās cilpās aminoskābju atlikumiem (D77 un R79), kas nebija novērots pie pH 7,6. Tomēr, *CSP* izmaiņas blakus esošos aminoskābju atlikumos nenoliedz šādas konformācijas varbūtību.

No iegūtajām struktūrām nav skaidrs, kāpēc novēro tik lielas izmaiņas aktīvā centra dziļumā ( $\beta_A$  un  $\beta_B$  virkņu attiecīgi *N*- un *C*-terminālās daļas). Iespējams, *CSP* rodas no ūdens molekulu izspiešanas un reorganizācijas, vai arī no terminālo motīvu kustīguma izmaiņām. Tālākai kompleksu validācijai iespējams veikt MD simulācijas.

## 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  $\sim 0,5$  (2.78. att., 2.90. att., A). Viens no iespējamiem skaidrojumiem varētu būt tas, ka viena liganda molekula saista divas proteīna molekulas. Savukārt, ņemot vērā *in silico* datus, šāds variants būtu iespējams tikai tad, ja daļa no liganda molekulas (karnitīns vai TS) ir vērsti uz ārpusi un paliek brīvi pieejami otrai proteīna molekulai. Iespējama arī FABP3 dimēra veidošanās ar liganda starpniecību. 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. Tā kā iepriekšējos *ITC* un KMR eksperimentos nenovēroja starpību starp *cis* un *trans* izomēriem, tālākie eksperimenti veikti tikai ar *trans* izomēru. Šajos eksperimentos proteīnu sākumā piesātina līdz 98–99 % ar pirmo ligandu, kam ir zemāka afinitāte. Pēc tam pievieno otro, spēcīgāk saistošos ligandu. Ja abi ligandi konkurē par vienu un to pašu saistības vietu, tad eksperimentā novērotu tam atbilstošās izmaiņas.

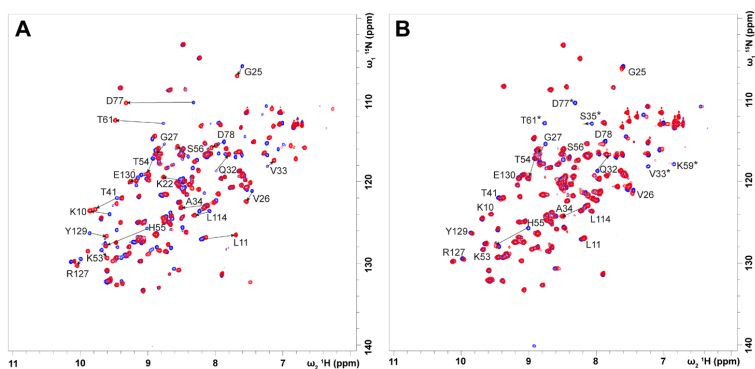
Vispirms veikti *ITC* eksperimenti. Izspiešanu mēģināja novērot starp trim dažāda garuma TS, kas šķīst ūdens buferos bez papildus piedevām. Iegūtie dati apkopoti 2.90. attēlā. Pēc iegūtajām  $K_D$  vērtībām (2.11. tab.), C8:0 un mononepiesātinātie acilkarnitīni saistās ar līdzīgu afinitāti. Pirmajā eksperimentā FABP3 piesātināja ar C8:0 un pēc tam titrēja ar elaidoilkarnitīnu (C18:1-*trans*- $\Delta^9$ -AC) [2.90. att., B]. Eksperimenta rezultātā novēroja saistību, kas līdzīga elaidoil-karnitīna saistībai apo-FABP3. Proti, C18:1-*trans*- $\Delta^9$ -AC izkonkurēja C8:0 no FABP3 aktīvajā centra, turklāt, saglabājas saistības mehānisms ar  $N \approx 0,5$ . Tas parāda, ka FABP3 ir preference pret garākām TS vai to acilkarnitīniem. Nākamajā eksperimentā (2.90. att., C) FABP3 vispirms piesātināja ar C10:0 un pēc tam atkārtoja titrēšanu ar elaidoilkarnitīnu. Šajā eksperimentā saistības siltumefektus nenovēroja. Rezultātā var secināt, ka C10:0 un C18:1-*trans*- $\Delta^9$ -AC afinitāte pret FABP3 ir vai nu līdzīga, vai arī elaidoilkarnitīnam tā ir vājāka. Lai par to pārliecinātos, veikts pretējais eksperiments, kurā proteīnu sākumā piesātināja ar C18:1-*trans*- $\Delta^9$ -AC un pēc tam titrēja ar C10:0 (2.90. 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 notiek tajā ar citu konformāciju, kurai ir vājāka afinitāte.



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

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

Kā pēdējā titrēšana šajā eksperimentu sērijā, veikta FABP3-C18:1-*trans*- $\Delta^9$ -AC kompleksa titrēšana ar C12:0 (2.90. 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 atšķirībā no C10:0, C12:0 spēj izkonkurēt mononepiesātinātos acilkarnitīnus no abām to saistīšanās vietām. Termodinamisko parametru analīze parādīja, ka konkurences eksperimentā ar C8:0 afinitāte bija par kārtu zemākā nekā eksperimentos ar C10:0 un C12:0. Savukārt, iegūtie termodinamiskie parametri ļoti labi sakrīt ar iepriekš iegūtajiem (2.11. tab.). Nelielas svārstības 1–2 kcal·mol<sup>-1</sup> robežās  $\Delta H$  un  $-T\Delta S$  lielumos novēro dēļ konkurences ar otro ligandu. Parasti, konkurences eksperimentu datus analizē izmantojot t.s. konkurences saistības modeli, kur pirms termodinamisko parametru aprēķina programmā ieraksta pirmā liganda termodinamiskos parametrus. FABP3 gadījumā šāda analīzes metode nestrādā un dod aplamus rezultātus. Iespējams, hidrofoba ligandu daba, saistības kinētika vai mehānisms traucē analīzei.

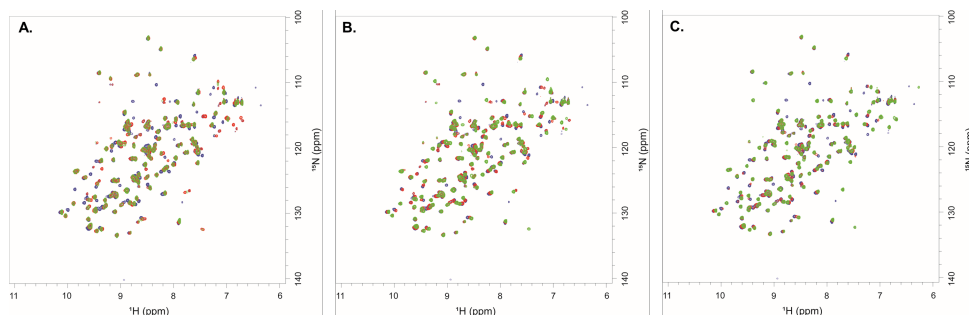


2.91. att. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru superpozīcijas ar attiecinātiem aminoskābju atlikumiem: **A.** FABP3-C8:0 un **B.** FABP3-C18:1-*trans*- $\Delta^9$ -AC kompleksiem KPi buferī pH 7,6.

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

Pati par sevi *ITC* metode nosaka ligandu konkurenci, bet nespēj viennozīmīgi pateikt, vai konkurence realizējas aktīvajā centrā vai notiek allostēriski. Termodinamiskie parametri ir tikai viens no rādītājiem, kas pasaka vai saistība notiek pēc tāda paša mehānisma kā nekonkurences jeb tiešās saistības eksperimentā. Tomēr, pilnībā izslēgt allostērisku efektu iespējamību šādi nevar. 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  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru. Pēc tam KMR stobriņā pievieno otro ligandu un atkārtoti uzņēma spektru. Referencei, 2.91. attēlā norādīti attiecinātie krospiķi, ar vislielākajām *CSP*, pēc kuriem būtu jāvadās analizējot trīs komponentu maisījumu. Vislielākā starpība abos spektros saistīta ar dažu krospiķu pazūšanu no spektra (2.91. att., B, atzīmēti ar \*). Proti, G27, R31, V33, S35, T61 un D77, kas pārsvarā atrodas FABP3  $\alpha_{II}$  spirālē.

Analizējot spektrus C8:0 un elaidoilkarnitīnu konkurences eksperimentos (2.92. att., A), bija jāvadās pēc iepriekš minēto septiņu krosipiķu pazušana no spektra. Proti, C8:0 saistoties pie proteīna, novēro vairāku signālu pārvietošanos. Savukārt, kad elaidoilkarnitīns izspieda TS no FABP3 aktīvā centrā, novēro, ka daļa signālu atgriežas sākotnējās pozīcijās, bet daļa – pazūd. Papildus kontrolei iegūto spektru pēc konkurences eksperimenta salīdzināja ar parasto FABP3-elaidoilkarnitīna kompleksu. Spektri diezgan labi saskan savā starpā, kas apstiprina elaidoilkarnitīna saistību, izkonkurējot C8:0. Šis eksperiments ļoti labi sakrīt ar *ITC* izpēšanas eksperimentu datiem.



2.92. att. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru superpozīcijas FABP3 izpēšanas eksperimentiem kompleksiem KPi buferī pH 7,6.

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

Turpmāk realizēti divi pretēji eksperimenti starp FABP3-elaidoilkarnitīna kompleksu un C10:0 un C12:0 kā konkurējošiem ligandiem. Iegūtie rezultāti redzami 2.92. 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 saistīšanas 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. Šajos eksperimenta apstākļos nevar pateikt, vai C10:0 pilnībā tikai vai daļēji izkonkurēja elaidoilkarnitīnu, jo izmaiņas, ko novēro spektrā pēc TS saistības ir daudz izteiktākas nekā acilkarnitīnu gadījumā. Toties viennozīmīgi redzams, ka TS konkurē ar acilkarnitīniem par vietu FABP3 aktīvajā centrā. Iegūtie dati ļoti labi korelē arī ar novērojumiem *ITC* eksperimentos.

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 karnitīna molekulu, taču viens pats karnitīns nesaistās pie FABP3 (saistību nenovēroja ne *ITC*, ne KMR eksperimentos). Tomēr pastāv varbūtība, ka saistība iespējama tikai karnitīna esteriem ar TS “astes” garumu  $\geq$  C14, kas darbojas kā “enkurs” un fiksē acilkarnitīnu FABP3 iekšpusē. Iegūtie dati aprakstīti darba autore publikācijā [260].



## 2.12. FABP3 substrātu klāsta paplašināšana

Apkopojot visus FABP3, TS un acilkarnītinu saistības izpētes datus, redzams, ka FABP3 spēj saistīt ne tikai dažāda garuma TS, bet arī vidēja garuma un garķēžu acilkarnītinus (2.12. tab.). Izmantotās fizikāli-ķīmiskās metodes ar augstu ticamību ļāva noteikt, ka pie FABP3 saistās mono- un polinepiesātinātie acilkarnītīni, bet uzrādot par vienu kārtu zemāku afinitāti nekā garķēžu TS. Piesātināto acilkarnītinu detektēšana apgrūtināta ar vielu slikto šķīdību ūdens buferos vajadzīgajās koncentrācijās. Tomēr, ņemot vērā pieredzi ar nepiesātinātiem acilkarnītīniem un pieredzi ar šūnu testiem (kas prasa desmit reizes mazākas koncentrācijas), var paredzēt, ka garķēžu acilkarnītīni arī saistās pie FABP3. Šajā darbā saistību izdevās detektēt tikai miristoilkarnītinam (C14:0-AC). C12:0-AC gadījumā saistība nav tik viennozīmīga. Iespējams, ka tas ir pārāk īss, lai saistītos ar FABP3. Savukārt, C8:0-AC nesaistās ar FABP3. Šim savienojumam nav šķīdības problēmu, bet tas neuzrādīja saistību nevienā no eksperimentiem. Palmitoilkarnītinam būtu jāsaistās pie FABP3 pēc analogijas ar mononepiesātinātiem acilkarnītīniem, taču ņemot vērā tā zemo CMC, eksperimentā realizēt saistību ar FABP3 neizdevās. Eksperimenti pie zema pH parādīja, ka C16:0-AC veido micellas, kas pēc tam var piesaistīties FABP3 virsmai, veidojot šķīstošus lielmolekulāros kompleksus.

Kopumā iegūtie dati nosaka, ka FABP3 spēj saistīt garķēžu acilkarnītinus un pasargāt šūnas no acilkarnītinu izraisītiem bojājumiem un potenciāli var darboties kā kardioprotektants. Pēdējo gadu progress ar uz mRNS balstītām vakcīnām (Sars-Cov-2 vakcīnas) pierādīja, ka organismā iespējams mērķtieciīgi iniciēt cilvēka šūnās kāda proteīna vai tā daļas ekspresiju. Ņemot vērā FABP3 kardioprotektīvās īpašības, viens no terapijas veidiem būtu iniciēt tā paaugstinātu ekspresiju sirds muskulī.

2.12. tabula

Apkopojums FABP3-ligandu saistības pētījumiem

Savienojums	Saisinātā formula	Saistība <i>ITC</i>	Saistība <i>KMR</i>	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> - $\Delta^9$	+	+	nav
elaidāts	C18:1 <i>trans</i> - $\Delta^9$	+	+	nav
EPA	20:5 <i>cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14,17}$	+	+	nav
palmitoil-CoA	C16:0-CoA	+	+	nav
kapriloilkarnītīns	C8:0-AC	nesaistās	nesaistās	nav
laurioilkarnītīns	C12:0-AC	nesaistās	+	nav
miristoilkarnītīns	C14:0-AC	+	+	+
palmitoilkarnītīns	C16:0-AC	nav nosakāma	tikai zemā pH	nav nosakāma
oleoilkarnītīns	C18:1 <i>cis</i> - $\Delta^9$ -AC	+	+	+
elaidoilkarnītīns	C18:1 <i>trans</i> - $\Delta^9$ -AC	+	+	+
EPA-karnītīns	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.



## 3. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

### 3.1. Aparatūra

#### 3.1.1. Iekārtas proteīnu-ligandu mijiedarbības izpētei

- 600 MHz *Bruker Avance Neo* spektrometrs, aprīkots ar četru kanālu kriozondi un Z-ass gradientiem (*Bruker BioSpin*).
- 800 MHz *Bruker Avance III HD* spektrometrs, aprīkots ar trīs kanālu istabas temperatūras zondi (TXI) un Z-ass gradientiem (*Bruker BioSpin*).
- *Applied Biosystems® 7500 Fast* reāllaika (*real-time*) fluorescences detektors.
- *MicroCal iTC200 (Malvern Panalytical)* izotermālās titrēšanas kalorimetrs.

#### 3.1.2. Iekārtas, izmantotas proteīnu ražošanā, attīrīšanā un detektēšanā

- -80 °C saldētava: *Witeg WUF-400*.
- Analītiskie svāri: *KERN ABT 120-5DM*.
- Autoklāvs: *Systec DX-65*.
- Bioloģiskās drošības skapis (laminārs): *ESCO Streamline SC2-4A1*.
- Centrifūga: *Beckman Coulter Avanti J-E*.
- Inkubators-krautītājs: *Infors HT Multitron*.
- Mikrotiļpumu UV/VIS spektrometrs: *NanoDrop 2000c*.
- pH-metrs: *Mettler Toledo, SevenCompact S220*.
- Preparatīvā proteīnu šķidrās hromatogrāfijas sistēma: *AKTA Purifier 10*.
- Preparatīvā proteīnu šķidrās hromatogrāfijas sistēma: *AKTA Pure*.
- Ultraskaņas dezintegrators (sonikātors): *Hielscher, UP200Ht*.
- Vertikālā gēla elektroforēzes sistēma: *Invitrogen XCell SureLock/Cleaver Scientific CS-300 OmniPAC*.
- Vertikālā gēla elektroforēzes sistēma: *BioRAD Mini-PROTEAN Tetra System*.

### 3.2. Reaģenti un protokoli

#### 3.2.1. Izmantotie reaģenti

Darbā izmantotie ķīmiskie reaģenti iepirkti no *Acros*, *Sigma-Aldrich*, *Carl Roth*, *Merck*, *Alfa Aesar*, *Thermo Fisher Scientific* un *Fluorochem* ar tīrību >95 %, bioloģiskā tīrības pakāpe, un izmantoti bez iepriekšējas attīrīšanas. Deiterētie šķīdinātāji pirkti no *Deutero GmbH* un *Apollo Scientific*.

### 3.2.2. Buferi un barotnes

#### 3.2.2.1. Barotnes

- *LB (Lysogeny Broth)*: 10 g/L triptons, 5 g/L rauga ekstrakts, 10 g/L NaCl.
- *LB-Agars* Petri platēm: 15 g/L agars 10 g/L triptons, 5 g/L rauga ekstrakts, 5 g/L NaCl.
- *2xYT*: 16 g/L triptons, 10 g/L rauga ekstrakts, 5 g/L NaCl.
- *TB (Terrific Broth)*: 20 g/L triptons, 24 g/L rauga ekstrakts, 4 mL/L glicerīns, 100 mL/L 0,17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /0,72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .
- *M9 (Minimal Medium)*: 12,8 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,0 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g/L NaCl, 1,0 g/L  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2,0 g/L  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -D-glikoze vai 4,0 g/L  $\alpha$ -D-glikoze, 0,3 g/L tiamīns, 100  $\mu\text{L/L}$  1,0 M  $\text{CaCl}_2$ , 1,0 mL/L 1 M  $\text{MgSO}_4$ , 10,0 mL/L vitamīnu maisījums, 10,0 mL/L mikroelementu maisījums.

#### 3.2.2.2. Buferi darbam ar BBOX mutantiem un MBP-TMLD

- Lizēšanas buferis 1: 20 mM Tris-Cl pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 tab/100 mL SigmaFAST bez-EDTA proteāžu inhibitoru kokteilis.
- Lizēšanas buferis 2: 20 mM Tris-Cl pH 8,0, 200 mM NaCl, 0,7 M *D*-trehaloze, 1 tab/100 mL SigmaFAST bez-EDTA proteāžu inhibitoru kokteilis.
- *MBP-Trap*<sup>TM</sup> buferis A1 (nesējbuferis): 20 mM Tris-Cl pH 8,0, 200 mM NaCl.
- *MBP-Trap*<sup>TM</sup> buferis B1 (eluēšanas buferis): 20 mM Tris-Cl pH 8,0, 200 mM NaCl, 20 mM *D*-maltoze.
- *HisTrap*<sup>TM</sup> buferis A2 (nesējbuferis): 20 mM Tris-Cl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10 mM imidazols.
- *HisTrap*<sup>TM</sup> buferis B2 (eluēšanas buferis): 20 mM Tris-Cl pH 8,0, 200 mM NaCl, 500 mM imidazols.
- *SEC* buferis C1 (*ITC* buferis): 50 mM HEPES-NaOH pH 7,4, 150 mM NaCl.
- *KMR* buferis D1: 10 mM Tris- $\text{d}_{11}$  pH 8,0.

#### 3.2.2.3. Buferi darbam ar FABP3

- *HisTrap*<sup>TM</sup> buferis A3 (nesējbuferis): 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10 mM imidazols.
- *HisTrap*<sup>TM</sup> buferis B3 (eluēšanas buferis): 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 200 mM NaCl, 500 mM imidazols.
- *HisTrap*<sup>TM</sup> buferis A4 (nesējbuferis): 50 mM Tris-Cl pH 8,3, 200 mM NaCl, 10 mM imidazols, 6 M guanidīns.
- *HisTrap*<sup>TM</sup> buferis B4 (eluēšanas buferis): 50 mM Tris-Cl pH 8,3, 200 mM NaCl, 500 mM imidazols, 6 M guanidīns.
- *SEC* buferis C2: 20 mM Tris-Cl pH 8,0, 100 mM NaCl
- Mazgāšanas buferis D2: 50 mM Tris-Cl pH 8,3, 6 M guanidīns, 5 mM DTT.
- Proteīna salocīšanās (*refolding*) buferis E: 20 mM Tris-Cl pH 7,5, 5 mM DTT.

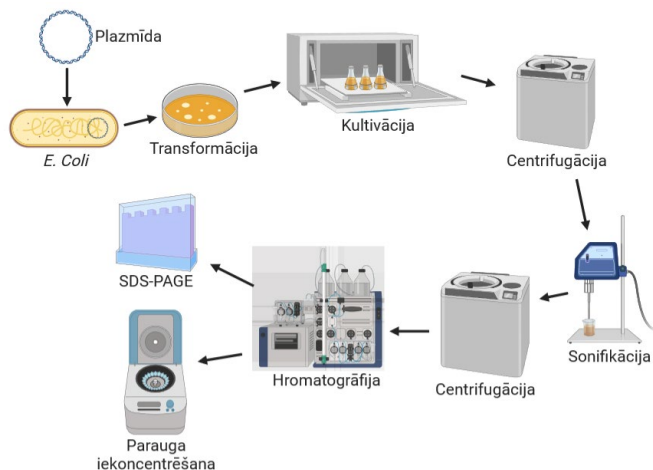
- TEV-proteāzes šķelšanās buferis F: 50 mM Tris-Cl pH 7,8, 5 mM DTT.
- KPi (kālija fosfāta buferis): 20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,6, 50 mM KCl.

### 3.3. Proteīnu iegūšana

Proteīnu producēšanas shēma atspoguļota 3.1. attēlā. Katru ekspresijas ciklu uzsāk ar proteīnu kodējošās plazmīdas transformāciju atbilstošo *E. Coli* šūnu celmā. Pēc tam transformētās kolonijas uznes uz *LB*-Agara platēm un inkubē pa nakti (16–18 h), 37 °C temperatūrā (bez kratīšanās). Proteīnu lielapjoma (piemēram, 1–5 L barotnes tilpumā) producēšanu iespējams veikt no t.s. nakts kultūras vai t.s. dienas kultūras. Pirmajā gadījumā vakarā vienu vai vairākas kolonijas inokulē mazā tilpumā, kas sastāda 1 % (v/v) no vēlamā lielapjoma ekspresijas kultūras tilpuma, bet ne mazāk par 30–50 mL. Nakts kultūru koniskajā 250 mL kolbā vai sterilās mēģenēs audzē inkubatorā-kratītājā 16–18 h, 37 °C, 200 rpm. Nākamās dienas rītā 1 % (v/v) nakts kultūras izmanto, lai inokulētu lielapjoma barotni. Pēc inokulācijas, barotni sadala vienādos daudzumos pa 2 L koniskām kolbām (ieteicamais kultūras tilpums: 250–350 mL katrā kolbā). Barotni turpina kultivēt inkubatorā-kratītājā 37 °C, 200 rpm. Šūnu augšanu kontrolē mērot kultūras optisko blīvumu, OD, pie 600 nm. Proteīna producēšanu iniciē ar izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozīdu (IPTG), kad šūnas ir eksponenciālā augšanas fāzē. Pievienotā IPTG daudzums, tāpat kā precīzs inducēšanās OD<sub>600</sub>, kas ļauj iegūt maksimālo aktīvā proteīna daudzumu ir jāoptimizē katram proteīnam. Parastiem stabiliem proteīniem indukciju veic pie OD<sub>600</sub> = 0,6 – 0,7, bet toksiskiem proteīniem – pie OD<sub>600</sub> > 1,2. IPTG daudzumu iespējams variēt no 0,02 līdz 1 mM (gala koncentrācija). Proteīniem ar šķīdības vai salocīšanās problēmām pirms indukcijas pazemina kultūras temperatūru. Atkarībā no izvēlētas temperatūras, kultivēšanu turpina 3–48 h, tik ilgi līdz notiek šūnu dalīšanās. Pēc tam kultūru centrifugē, dekantē un šūnas glabā sasaldētas –20 °C. Dienas kultūras gadījumā sākumā kultūru audzē 10–20 sterilās mēģenēs (5–7 mL barotnes katrā) 37 °C, 200 rpm līdz OD<sub>600</sub> ~ 1,0 – 1,5 (parasti tas aizņem 4–6 h). Tālāk iegūto starta kultūru izmanto lielapjoma barotnes inokulācijai, un proteīnu producēšanu turpina tāpat kā nakts kultūras gadījumā.

Proteīna attīrīšanu uzsāk ar baktēriju šūnapvalku sagraušanu, ko iespējams veikt mehāniski (sonifikācija, Frenča prese, u.c.) vai ķīmiski (deterģenti, lizocīms). Šis ir kritisks solis aktīvā proteīna iegūšanai. Attīrīšanas metodes optimizācija ietver sevī buferu komponentes, pH un stabilizējošo piedevu meklējumus. Iegūto supernatantu tālāk attīra no cietām šūnu daļiņām centrifugējot 4 °C, 15 500 – 40 000× g, 30 – 60 min. Atkarībā no proteīna veida un izmantotā bufera, piemeklē atbilstošo hromatogrāfijas metodi, kas ļauj vēlamo proteīnu attīrīt no citiem *E. Coli* proteīniem. Parasti attīrīšanu uzsāk ar afinitātes hromatogrāfiju (Ni-NTA, MBP, GST, u.c.), kur pie kolonnas saistās tikai proteīns ar atbilstošo afinitātes birku jeb sekvenci (His<sub>6</sub>, MBP vai GST *fusion* proteīns). Tālāk seko *SEC*, kur paraugā esošie proteīni atbilstošā *SEC* kolonnā sadalās pēc MW. Paraugu analīzi veic vertikālā gēla elektroforēzes sistēmā izmantojot *SDS-PAGE* plāksnītes denaturējošos apstākļos. *SDS-PAGE* plāksnē strāvas ietekmē proteīni sadalās pēc monomēra MW un paradās gēlā kā atsevišķas svītriņas. Sarežģītos gadījumos iespējams veikt katras šādas svītriņas peptīdu analīzi, lai pārliecinātos, ka iegūts vajadzīgais proteīns.

Proteīnu koncentrāciju nosaka spektrofotometriski, ar UV-VIS spektrometru un mērot proteīna absorbciju pie 280 nm un izmantojot teorētisko ekstinkcijas koeficientu,  $\epsilon$ , ko aprēķina no proteīnu aminoskābju sekvences. Darbā izmantotās plazmīdu kartes apkopotas 6.–10. pielikumos.



3.1. att. Vispārināta proteīnu iegūšanas shēma no *E. Coli* šūnām (bilde radīta ar *BioRender.com* palīdzību).

### 3.3.1. MBP-TMLD iegūšana

MBP-TMLD (cilvēku TMLD isoforma a, aminoskābju atlikumi 42–421, 6. pielikums) ko-ekspresē *E. Coli* BL21-AI (*Invitrogen*) celmā kopā ar GroEL/ES molekulāriem šaperoniem izmantojot modificētu protokolu no Kazaks *et al.* [245]. Ekspresiju katru reizi uzsāk ar pET-Duet-*MalE*-TMLD plazmīdas (kodē MBP-TMLD) transformāciju BL21-AI šūnās, kas satur pre-klonēto GroEL/ES plazmīdu. Turpinājumā šūnas kultivē *2xYT* barotnē ar pievienotām atbilstošām antibiotikām (ampicilīns un kanamicīns) 37 °C un 200 rpm līdz OD<sub>600</sub> sasniedz 0,4. Pēc tam šūnu kultūras atdzesē līdz 20 °C un turpina audzēt līdz OD<sub>600</sub> sasniedz 0,7–0,8. Šūnas inducē ar 0,2 mM IPTG un 0,2 % (w/v) *L*-arabinozes (gala koncentrācijas). Kultivēšanu turpina vēl 18–20 h. Pēc tam šūnas centrifugē 5 000× g, dekantē un uzglabā –20 °C.

Šūnas resuspendē ledus aukstā lizēšanas buferī 2 un sagrauj sonificējot. Iegūto šūnu lizātu centrifugē 20 000× g, 4 °C, 40 minūtes, filtrē caur 0,22 μm filtru un attīra pēc standarta protokola uz *HisTrap*<sup>TM</sup> HP (*Cytiva*) 5 mL kolonnas (buferi A2 un B2), kam seko attīrīšana uz *SEC* kolonnas [atkarībā no parauga daudzuma izmanto *HiLoad* 16/600 *Superdex*<sup>TM</sup> 200pg (*Cytiva*), *HiLoad* 26/600 *Superdex*<sup>TM</sup> 200pg (*Cytiva*) vai *Superdex*<sup>TM</sup> 200 *Increase* 10/300 GL (*Cytiva*)], izmantojot buferi C1. MBP-TMLD saturošās frakcijas tiek apvienotas un iekonzentrētas, izmantojot centrālās membrānas filtrus ar puscaurlaidīgu membrānu (*MWCO* 50 kDa). Koncentrēto enzīmu uzglabā 4 °C un izlieto 7–10 dienu laikā. Enzīma koncentrāciju nosaka spektrometriski, izmantojot *NanoDrop* 2000c UV-VIS spektrofotometru, izmērot absorbciju pie 280 nm un izmantojot  $\epsilon = 154\,755\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 3.3.2. BBOX mutantu iegūšana

#### 3.3.2.1. BBOX mutantu ekspresijas vektoru izveide

##### pET-Duet-BBOX-4m:

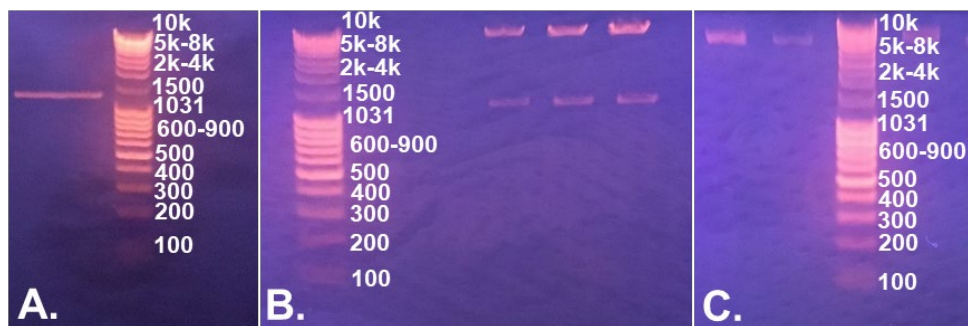
Gēns, kas kodē cilvēku BBOX četrkārtīgo mutantu N191D, Y205T, P206T un T295D (BBOX-4m), pEX-K4 vektorā kopā ar *NcoI* un *AflIII* (tas pats kas *BspTI*) restrikcijas saitēm, *N*-terminālo sešu histidīnu ( $\text{His}_6$ ) sekvenci un TEV-proteāzes šķelšanās saiti pasūtīja no *Eurofins Genomics (GmbH)*. BBOX-4m tālāk pārklonēts pET-Duet vektorā (7. pielikums) izmantojot *FastDigest NcoI (ThermoFisher Scientific)* un *FastDigest AflIII (ThermoFisher Scientific)* restrikcijas enzīmus pēc standarta *ThermoFisher* protokola (11. pielikums). Pēc tam nošķelto DNS attīra ar gēla elektroforēzi uz 1 % (w/v) agarozes gēla. Vajadzīgā izmēra DNS fragmentu (*insert*) izgriež un attīra pēc standarta protokola, izmantojot *GeneJET GEL Extraction Kit (ThermoFisher Scientific)* komplektu. Līdzīgi sagatavo pET-Duet vektoru, kuru arī "atver" ar *NcoI* un *AflIII* restrikcijas enzīmiem. Pēc tam lineāro vektoru samaisa ar proteīnu kodējošo DNS fragmentu (*insert*) attiecībās 1:3 un 1:5 un "salīmē" ar T4 DNS ligāzi (*ThermoFisher Scientific*) pēc standarta protokola (12. pielikums). Iegūto maisījumu transformē *E. Coli XL-1-blue* šūnu celmā un uzsēj uz LB-Agar platēm ar atbilstošo antibiotiku (ampicilīnu) un 16–20 h inkubē 37 °C temperatūrā. Iegūtās kolonijas izmanto jaunā DNS vektora pavairošanai pēc *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific)* protokola.

##### pET-Duet-MalE-BBOX-4m:

pET-Duet-MalE-BBOX-4m plazmīdas izveidei, BBOX-4m pārklonēts uz pET-Duet-MalE vektoru (8. pielikums) starp *StuI* un *AflIII* restrikcijas saitēm. Šīm nolūkam sākotnējā pEX-K4-BBOX-4m plazmīdā ar *PCR* palīdzību pirms  $\text{His}_6$  un TEV-šķelšanās saites sekvences ieviesta jauna restrikcijas saite, *StuI*. *PCR* reakciju realizē izmantojot oriģinālo pEX-K4-BBOX-4m kā veidni (*template*) un divus praimerus DNS nolasīšanai [tiešā (*forward*, fw) un pretējā (*reverse*, rv) virzienā] un mutāciju ieviešanai (13. pielikums):

- 1) *StuI*-fw: 5' -TTAGGCCTCGCTTGTACCATCCAAAAGGCAG-3' ;
- 2) *DuetDown*-rv: 5' -GATTATGCGGCCGTGTACAA-3' .

*PCR* reakcijas produktu attīra ar *GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific)* komplektu (3.2. att., A). Pēc tam, tāpat kā iepriekš, veic DNS fragmenta (*insert*) un pET-Duet-MalE-TMLD (3.2. att., B) vektora šķelšanu ar *FastDigest StuI (ThermoFisher Scientific)* un *FastDigest AflIII (ThermoFisher Scientific)* restrikcijas enzīmiem, attīrīšanu, ligēšanu ar T4 DNS ligāzi (*ThermoFisher Scientific*), transformāciju *XL-1-blue* šūnās un jauniegūtās plazmīdas pavairošanu (3.2. att., C). Izveidotās plazmīdas atbilstība pārbaudīta ar DNS sekvenēšanu.



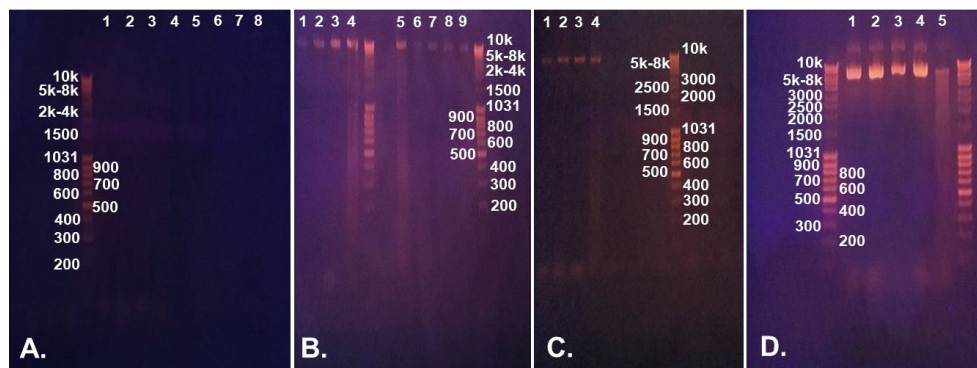
3.2. att. pET-Duet-*MalE*-BBOX-4m plazmīdas izveide.

A. Attīrīts lineārs BBOX-4m fragments (1166 bp) ar *Stul/AflIII* restrikcijas saitēm. B. pET-Duet-*MalE*-TMLD plazmīdas šķelšanas ar *Stul/AflIII* lineārs produkts (trīs atkārtējumi): pET-Duet-*MalE* (6487 bp) un TMLD (1143 bp). C. pET-Duet-*MalE*-BBOX-4m plazmīda pēc ligēšanas un pavairošanas (7653 bp).

#### pET-Duet-*MalE*-BBOX-2m:

MBP-BBOX divkārtīgs mutants N191D, T295D (MBP-BBOX-2m) bija uztaisīts no pET-Duet-*MalE*-BBOX-4m (9. pielikums) veicot specifisku mutagēnēzi (*Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit*) ar divu posmu PCR un divu praimeru palīdzību attiecīgi mainot atpakaļ T205Y un T206P (pasvītrotie fragmenti dzeltenā krāsā atspoguļo mutētos nukleotīdus):

- 1) mut-fw: 5' -GCTTTCACACTGATTA<sup>T</sup>CCAGCCCTCCATC-3' ;
- 2) mut-rv: 5' -GATGGAGGGCTGGATA<sup>T</sup>ATCAGTGTGAAAGC-3' .



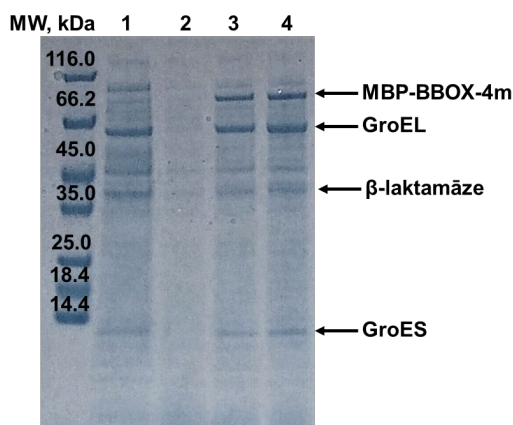
3.3. att. pET-Duet-*MalE*-BBOX-2m plazmīdas izveide divu posmu PCR, attīrīšana un pavairošana.

A. Kontroles paraugi pēc pirmā PCR posma. 1.–4. paraugs satur mut-fw un 5.–8. – mut-rv praimerus. 3., 4., 7. un 8. paraugs – satur 3 % DMSO piedevu. B. Kontroles paraugi pēc otrā PCR posma (1.–4.). 3. un 4. paraugs satur 3 % DMSO piedevu. 5. – references paraugs, kas satur līdzīga izmēra cDNS pET-Duet-*MalE*-TMLD. Kontroles paraugi (6.–9.) pēc PCR reakcijas maisījuma šķelšanās ar *DpnI*. 3. un 4. paraugs saturēja 3 % DMSO piedevas. C. Kontroles paraugi (1.–4.) pēc PCR produkta attīrīšanas uz *GeneJET* kolonnas. 3. un 4. paraugs saturēja 3 % DMSO piedevu. D. Kontroles paraugi (1.–4.) pēc DNS pavairošanas un attīrīšanas uz *GeneJET* kolonnas. 3. un 4. paraugs saturēja 3 % DMSO piedevas. 5. – references paraugs, kas satur līdzīga izmēra cDNS pET-Duet-*MalE*-TMLD.

Pusei no reakcijas maisījumiem pielika 3 % (v/v) DMSO, lai pazeminātu DNS-praimeru kušanas temperatūras. Pirmā *PCR* posmā (17 cikli) paralēli uzliek divas reakcijas, katrā liek DNS veidni (*template*) un tikai vienu no komplementāriem praimeriem (mut-fw vai mut-rv). Kontroles paraugos pēc pirmā *PCR* cikla (3.3. att., A, 1.–8.) izteiktus DNS fragmentus nenovēroja. Otrā *PCR* posmā (12 cikli) samaisa mut-fw un mut-rv reakcijas produktus attiecībā 1:1 un turpina reakciju. Kontroles paraugos pēc otrā *PCR* novēroja vēlamā izmēra DNS veidošanos, 7653 bp (3.3. att., B, 1.–4.). Veidnes DNS tālāk tika nošķelta ar *DpnI* restrikcijas enzīmu (3.3. att., B, 6.–9.). *PCR* produktu attīrīja ar *GeneJET PCR Purification Kit* (*ThermoFisher Scientific*) komplektu (3.3. att., C, 1.–4.). Fragmentu ligēšanu un plazmīdas pavairošanu veica pēc iepriekš aprakstītās metodes. Kontroles paraugi pēc plazmīdas pavairošanas arī satur vēlamā izmēra cDNS, 7653 bp (3.3. att., D, 1.–4.). Mutāciju ieviešana tika pārbaudīta ar DNS sekvenēšanas palīdzību.

### 3.3.2.2. MBP-BBOX-4m un MBP-BBOX-2m iegūšana

pET-Duet-*MalE*-BBOX-4m vai pET-Duet-*MalE*-BBOX-2m ko-ekspresē *E. Coli* BL21-AI (*Invitrogen*) celmā kopā ar GroEL/ES molekulārajiem šaperoniem izmantojot modificētu protokolu no Kazaks *et al.* [245]. Ekspresiju katru reizi uzsāk ar plazmīdas transformāciju BL21-AI šūnās, kas satur pre-klonēto GroEL/ES plazmīdu. Tālāk šūnas kultivē *2xYT* barotnē ar pievienotām atbilstošām antibiotikām (ampicilīns un kanamicīns) 37 °C un 200 rpm līdz OD<sub>600</sub> sasniedz 0,4. Pēc tam šūnu kultūras atdzēsē līdz 16 °C un turpina audzēt līdz OD<sub>600</sub> sasniedz 0,8–1,0. Šūnas inducē ar 0,2 mM IPTG un 0,2 % (w/v) *L*-arabinozi (gala koncentrācijas). Kultivēšanu turpina vēl 20 h. Pēc tam šūnas centrifugē 5 000× g, dekantē un uzglabā –20 °C. Katrā producēšanās solī ņemti kontroles paraugi, ko pēc tam analizēja ar *SDS-PAGE* (3.4. att.).



3.4. att. *SDS-PAGE* analīze MBP-BBOX-4m ekspresijai BL21-AI šūnās kopā ar molekulārajiem šaperoniem GroEL/ES 16 °C, 20 h.

1. kontroles paraugs nakts kultūrai (16 h inkubācija 37 °C). 2. kontroles paraugs tieši pirms proteīna ekspresijas indukcijas. 3. kontroles paraugs 4 h pēc proteīna ekspresijas indukcijas. 4. kontroles paraugs 20 h pēc proteīna ekspresijas indukcijas.

Šūnas resuspendē ledus aukstā lizēšanas buferī 1 un sagrauj ar sonifikāciju. Iegūto šūnu lizātu centrifugē 15 500× g, 4 °C, 45 minūtes, filtrē caur 0,22 μm filtru un attīra pēc standarta protokola uz *MBP-Trap*<sup>TM</sup> HP (*Cytiva*) 5 mL kolonnas (buferi A1 un B1), kam seko attīrīšana uz *SEC* kolonnas (*HiLoad 16/600 Superdex*<sup>TM</sup> 200pg) izmantojot buferi C1. MBP-BBOX- 4m vai 2m saturošās frakcijas apvieno un koncentrē izmantojot centrēšanas filtrus ar puscaurlaidīgu membrānu (*MWCO* 30 kDa). Koncentrēto enzīmu uzglabā 4 °C un izlieto 5 dienu laikā. Enzīma koncentrāciju nosaka spektrometriski, izmantojot *NanoDrop* 2000c UV-VIS spektrofotometru, izmērot absorbciju pie 280 nm un  $\epsilon = 140\,190\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  vai  $141\,680\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  attiecīgi 4m vai 2m MBP-BBOX mutantam.

### 3.3.3. FABP3 iegūšana

Gēns, kas kodē cilvēku FABP3, pET-15b vektorā kopā ar *NcoI* un *XhoI* restrikcijas saitēm, *N*-terminālo sešu histidīnu (His<sub>6</sub>) sekvenci un TEV-proteāzes šķelšanās saiti, tika pasūtīts no *BioCat* (*GmbH*). Ekspresijas plazmīdu pET-15b-FABP3 (10. pielikums) transformē *E. Coli* BL21(DE3) celmā.

#### 3.3.3.1. Neiezīmētā FABP3 iegūšana

Šūnas kultivē *2xYT* barotnē ar atbilstošu antibiotiku (ampicilīnu) 37 °C un 200 rpm līdz OD<sub>600</sub> sasniedz 0,6–0,7. Šūnas inducē ar 0,4 mM IPTG (gala koncentrācija) un turpina kultivēt nākamās 4 h nemainot apstākļus. Pēc tam šūnas centrifugē 7 500× g, dekantē un uzglabā –20 °C.

#### 3.3.3.2. <sup>15</sup>N-iezīmētā vai <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C-dubultiezīmētā FABP3 iegūšana

Pēc transformācijas vienu šūnu koloniju inokulē 5 mL *2xYT* barotnē ar atbilstošu antibiotiku (ampicilīnu) un kultivē 6–8 h, 37 °C un 200 rpm. Vakarā iegūto dienas kultūru ar OD<sub>600</sub> > 1 izmanto, lai inokulētu nakts kultūru M9 barotnē. Nakts kultūru kultivē 37 °C un 200 rpm 16–18 h. No rīta iegūto nakts kultūru izmanto liela tilpuma M9 kultūras inokulācijai. Tālāk šūnas kultivē 37 °C un 200 rpm līdz OD<sub>600</sub> sasniedz 0,4. Pēc tam šūnu kultūras atdzesē līdz 20 °C un turpina audzēt līdz OD<sub>600</sub> sasniedz 0,6–0,7. Šūnas inducē ar 0,4 mM IPTG (gala koncentrācija). Kultivēšanu turpina vēl 24–32 h līdz novēro šūnu dalīšanos. Pēc tam šūnas centrifugē 7 500× g, dekantē un uzglabā –20 °C.

#### 3.3.3.3. FABP3 attīrīšana

FABP3 attīrīšanu veic pēc modificēta protokola, kas aprakstīts Matsuoka S. *et al.* [99]. Šūnas resuspendē buferī A3 un sagrauj ar sonifikāciju. Šūnu lizātu centrifugē 27 000× g, 4 °C, 45 min. Supernatantu filtrē caur 0,22 μm filtru un attīra pēc standarta protokola uz *HisTrap*<sup>TM</sup> HP (*Cytiva*) 5 mL kolonnas (buferi A3 un B3), kam seko attīrīšana uz *SEC* kolonnas [*HiLoad 16/600 Superdex*<sup>TM</sup> 75pg, *HiLoad 26/600 Superdex*<sup>TM</sup> 75pg vai *Superdex*<sup>TM</sup> 75 Increase 10/300 GL (*Cytiva*), atkarībā no parauga daudzuma] izmantojot buferi C2 (3.5. att.). FABP3

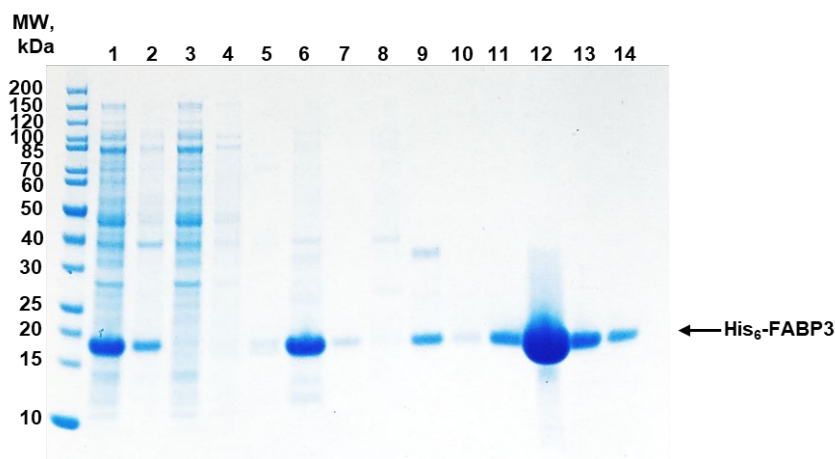


saturošās frakcijas tiek apvienotas un iekoncentrētas līdz  $15\text{--}20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  izmantojot centrēbēdzes filtrus ar puscaurlaidīgu membrānu (*MWCO* 10 kDa).

Proteīnu attauko to denaturējot A4 buferī, kas satur 6 M guanidīnu. Pēc tam proteīnu uznes uz Ni-NTA gravitācijas kolonnas, kas uzsildīta līdz  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mazgā (10 kolonnas tilpumi) ar  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  siltu buferi A4, un eluē ar buferi B4. Visas darbības veic denaturējošos apstākļos. Proteīnu dializē  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  buferī D2 izmantojot puscaurlaidīgu membrānu ar *MWCO* 12–14 kDa, lai atmazgātu imidazolu un pilnībā reducētu proteīnu. Tālāk denaturēto proteīnu atšķaida ar istabas temperatūras buferi D2 līdz koncentrācijai  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , ieliek jaunā puscaurlaidīgā membrānā ar *MWCO* 12–14 kDa un dializē pret auksto ( $4\text{--}6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) buferi E. Pakāpeniski samazinoties guanidīna koncentrācijai, notiek FABP3 savērpšanās dabiskā struktūrā. Beigās attaukoto FABP3 iekoncentrē un uznes uz *SEC* kolonnas (3.6. att., zila līkne), lai atdalītu šķīstošus agregātus un nomainītu buferi uz KPi.

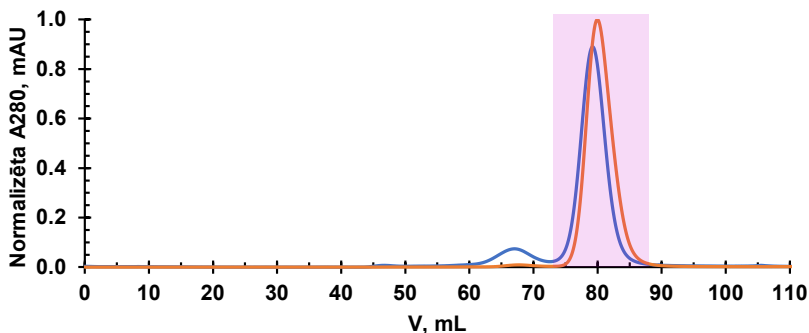
Nepieciešamības gadījumā pēc dialīzes attaukotam proteīnam ar TEV-proteāzi nošķel His<sub>6</sub> sekvenci (3.7. att.). Šķelšanu veic  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3 h. Pēc tam proteīna paraugu attīra no TEV-proteāzes un nesašķeltā FABP3 uz *HisTrap*<sup>TM</sup> HP (*Cytiva*) 5 mL kolonnas (buferi A3 un B3), savācot kolonnas caurplūdi, kas satur vajadzīgo proteīnu. Pēdējā attīrīšanās stadijā veic *SEC* hromatogrāfiju (3.6. att., oranžā līkne) izmantojot KPi buferi.

Enzīma koncentrāciju nosaka spektrometriski, ar *NanoDrop* 2000c UV-VIS spektrofotometru, mērot absorbciju pie 280 nm un izmantojot  $\epsilon = 15\,470\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  vai  $13\,980\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  attiecīgi nenošķeltām un nošķeltām FABP3.



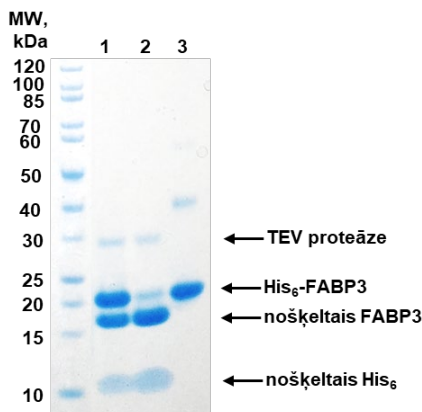
3.5. att. *SDS-PAGE* analīze FABP3 attīrīšanai no *E. Coli*.

1. šūnu suspensija pēc sonifikācijas; 2. supernatants, kas satur šķīstošo proteīnu (pēc centrifugācijas); 3. šūnu nogulsnes, kas satur nešķīstošo proteīnu (pēc centrifugācijas); 4. caurplūde no *HisTrap*<sup>TM</sup> kolonnas mazgāšanas ar buferi A3; 5. caurplūde no *HisTrap*<sup>TM</sup> kolonnas mazgāšanas ar 10 % bufera B3; 6. FABP3 saturošās frakcijas, eluētas no *HisTrap*<sup>TM</sup> kolonnas; 7. caurplūde no *HisTrap*<sup>TM</sup> kolonnas mazgāšanas ar 100 % bufera B3; 8. centrēbēdzes filtra ar puscaurlaidīgu membrānu (*MWCO* 10 kDa) caurplūde; 9.–10. šķīstošie agregāti; 11.–14. FABP3 monomērs (3.6. att., rozā reģions).



3.6. att. FABP3 SEC chromatogrammu no *HiLoad 16/600 Superdex<sup>TM</sup> 75pg* kolonnas superpozīcija.

FABP3 pirms (līkne zilā krāsā) un pēc (līkne oranžā krāsā) šķelšanās ar TEV proteāzi. Rozā reģions parāda pīķi, kas atbilst FABP3 (attiecīgi 17,0 un 15,1 kDa). Līknes normalizētas pēc absorbcijas pie 280 nm (A280).



3.7. att. *SDS-PAGE* analīze FABP3 šķelšanai ar TEV proteāzi 16 °C.

Kontroles paraugi: 1. pēc 3 h inkubācijas; 2. pēc 16 h inkubācijas; 3. reference.

### 3.4. TSA protokols

*TSA* eksperimenti veikti uz *Applied Biosystems Prism 7500 Real-Time PCR System* (*Thermo Fisher*) aparāta. 5 000x *Sypro<sup>TM</sup> Orange* fluorescējošā proteīnu iezīmēšanas aģenta izejas šķīdumu atšķaidīja 40-kārtīgi ar 10 mM *Tris-Cl* pH 8,0 buferi. Iegūtās krāsvielas šķīdumu izmantoja, lai atšķaidītu *MBP-TMLD* līdz 20  $\mu$ M koncentrācijai (divkārtīgs izejas šķīdums) un beigās iegūtu 20-kārtīgo *Sypro<sup>TM</sup> Orange* izejas šķīdumu. 96-bedrīšu termoizturīgā platē samaisa 12,5  $\mu$ L *MBP-TMLD- Sypro<sup>TM</sup> Orange* izejas šķīduma un 12,5  $\mu$ L testējamā bufera (3.8. att.). Eksperimenta laikā paraugus lineāri uzsilda no 15 °C līdz 95 °C ar 2 % temperatūras pieauguma slīpumu (*slope*), vienlaikus detektējot fluorescenci. Dati analizēti *7500 Software v.2.3* (*Thermo Fisher*) un *JavaScript Thermal Shift Analysis v.0.2.2* (*JTSA*) [269, 270] programmās.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	200 mM Na acetāts pH 4,5	200 mM Na acetāts pH 4,5 200 mM NaCl	200 mM Na acetāts pH 4,5 500 mM NaCl	200 mM Na acetāts pH 4,5 1000 mM NaCl	200 mM Na acetāts pH 4,5 500 mM KCl	200 mM Na acetāts pH 4,5 400 mM NaCl 10% DMSO	200 mM Na acetāts pH 4,5 400 mM NaCl 20% glicerīns	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM CaCl <sub>2</sub>	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM imidazols	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM Na acetāts	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 30% etilēnglikols	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 2% Triton X-100
<b>B</b>	200 mM Na citrāts pH 5,0	200 mM Na citrāts pH 5,0 200 mM NaCl	200 mM Na citrāts pH 5,0 500 mM NaCl	200 mM Na citrāts pH 5,0 1000 mM NaCl	200 mM Na citrāts pH 5,0 500 mM KCl	200 mM Na citrāts pH 5,0 400 mM NaCl 10% DMSO	200 mM Na citrāts pH 5,0 400 mM NaCl 20% glicerīns	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM CaCl <sub>2</sub>	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 0,2% Tween-20	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM Na citrāts	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 30% MPD	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 0,2% Triton X-100
<b>C</b>	200 mM MES pH 6,0	200 mM MES pH 6,0 200 mM NaCl	200 mM MES pH 6,0 500 mM NaCl	200 mM MES pH 6,0 1000 mM NaCl	200 mM MES pH 6,0 500 mM KCl	200 mM MES pH 6,0 400 mM NaCl 10% DMSO	200 mM MES pH 6,0 400 mM NaCl 20% glicerīns	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 2% Tween-20	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM Na formiāts	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 20% L-arabinoze	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 50% BugBuster
<b>D</b>	200 mM PIPES pH 7,0	200 mM PIPES pH 7,0 200 mM NaCl	200 mM PIPES pH 7,0 500 mM NaCl	200 mM PIPES pH 7,0 1000 mM NaCl	200 mM PIPES pH 7,0 500 mM KCl	200 mM PIPES pH 7,0 400 mM NaCl 10% DMSO	200 mM PIPES pH 7,0 400 mM NaCl 20% glicerīns	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 1 M guanidīns	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 30% PEG 200	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 10% L-arabinoze	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM EDTA
<b>E</b>	200 mM HEPES pH 7,5	200 mM HEPES pH 7,5 200 mM NaCl	200 mM HEPES pH 7,5 500 mM NaCl	200 mM HEPES pH 7,5 1000 mM NaCl	200 mM HEPES pH 7,5 500 mM KCl	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 10% DMSO	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 20% glicerīns	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM NH <sub>4</sub> acetāts	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM L-Arg	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 30% PEG 400	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 20% D-saharoze	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 20% izopropānols
<b>F</b>	200 mM Tris pH 8,0	200 mM Tris pH 8,0 200 mM NaCl	200 mM Tris pH 8,0 500 mM NaCl	200 mM Tris pH 8,0 1000 mM NaCl	200 mM Tris pH 8,0 500 mM KCl	200 mM Tris pH 8,0 400 mM NaCl 10% DMSO	200 mM Tris pH 8,0 400 mM NaCl 20% glicerīns	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM LiCl	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 100 mM L-Arg / 100 mM L-Glu	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 30% PEG 1000	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 10% D-saharoze	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 20% etanols
<b>G</b>	200 mM Bis-Tris propānsāns pH 9,0	200 mM Bis-Tris propāns pH 9,0 200 mM NaCl	200 mM Bis-Tris propāns pH 9,0 500 mM NaCl	200 mM Bis-Tris propāns pH 9,0 1000 mM NaCl	200 mM Bis-Tris propāns pH 9,0 500 mM KCl	200 mM Bis-Tris propāns pH 9,0 500 mM NaCl 10% DMSO	200 mM Bis-Tris propāns pH 9,0 400 mM NaCl 20% glicerīns	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM Zn acetāts	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 100 mM Na fosfāts	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 30% PEG 4000	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 20% trehaloze	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 20% ACN
<b>H</b>	200 mM CAPS pH 10,0	200 mM CAPS pH 10,0 200 mM NaCl	200 mM CAPS pH 10,0 500 mM NaCl	200 mM CAPS pH 10,0 1000 mM NaCl	200 mM CAPS pH 10,0 500 mM KCl	200 mM CAPS pH 10,0 400 mM NaCl 10% DMSO	200 mM CAPS pH 10,0 400 mM NaCl 20% glicerīns	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM Holīna Cl	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 200 mM Na fosfāts	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 30% PEG 6000	200 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 10% trehaloze	ūdens

3.8. att. TSA skrīninga buferu un stabilizējošo piedevu paraugu sastāvs

### 3.5. ITC protokoli

#### 3.5.1. ITC protokoli MBP-TMLD enzīmam

ITC eksperimenti veikti uz MicroCal™ iTC200 (Malvern Instruments Ltd.). Visas titrēšanas veiktas 25 °C temperatūrā, izmantojot 30–100 μM enzīmu buferī C1.

Metālu skrīninga eksperimentos 30 μM enzīmu, piesātinātu ar OGA un vienu no septiņiem metāliem (MnSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CrCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> vai CaCl<sub>2</sub>) divkārtējā parakumā, titrē ar 300 μM dabisko substrātu, TML.

Eksperimentos ar TML analogiem, izostēriskos kofaktorus (ZnCl<sub>2</sub> un OGA) enzīma porcijai pielika katra eksperimenta sākumā (pirms titrēšanas). Ligandu iesvari tika izšķīdināti D<sub>2</sub>O 100 mM koncentrācijā. Precīzas ligandu koncentrācijas D<sub>2</sub>O šķīdumos noteica ar kvantitatīvo KMR, kā standartu izmantojot maleīnskābi (*certified reference material TraceCERT®*).

280 μL enzīma-kofaktoru šķīduma parauga šūnā titrē ar liganda šķīdumu, ko atšķaida līdz 300–1200 μM koncentrācijai atbilstoši aktīvā enzīma koncentrācijai (attiecība enzīms-ligands 1:10). Katru titrēšanu uzsāk ar mazu 0,3 μL injekciju, kas nepieciešama difūzijas efektu kompensācijai. Atkarībā no liganda aktivitātes un izdalītajiem saistības siltumefektiem lietota viena no sekojošām titrēšanas shēmām: (i) 2,0 μL × 20 injekcijas (ātram skrīningam); (ii) 1,2 μL × 32 injekcijas – aktīviem savienojumiem ar izteiktu siltumefektu; vai (iii) 1,5 μL × 26 injekcijas – mazāk aktīviem savienojumiem ar siltumefektiem < 0,1 μcal/s. Visos gadījumos izmantoja 120 s atstarpes starp injekcijām un 600 rpm samaisīšanās ātrumu.

Katru ligandu titrēja vismaz divas reizes. Pirms datu analīzes, lai kompensētu liganda šķīšanas efektus, no enzīma titrēšanas datiem tika atņemta references bāzes līnija (vienādi mazas intensitātes signāli), ko iegūst titrējot ligandu buferī. Pirmo injekcijas punktu izslēdz no datu kopas. Iegūtos titrēšanas rezultātus analizēja ar programmu MicroCal Origin 7 SR4 (*OriginLab*), izmantojot teorētisko titrēšanas līkni (*data fitting*) pēc viena saistības centra modeļa (*one site model*).

#### 3.5.2. ITC protokoli FABP3 proteīnam

ITC eksperimenti veikti uz MicroCal™ iTC200 (Malvern Instruments Ltd.). Visas titrēšanas veiktas 25 °C temperatūrā, izņemot  $\Delta C_p$  noteikšanas eksperimentus, kas veikti piecās dažādās temperatūrās: 16 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C un 37 °C. Proteīna koncentrāciju variēja 20–120 μM robežās. Eksperimenti veikti divos buferos: (i) KPi un (ii) KPi ar 0,1 % (v/v) *Triton X-100* piedevu. Izejas šķīdumi (*stock solutions*) uztaisīti precīzus ligandu iesvarus izšķīdinot 50 % (v/v) etanolā vai DMSO-d<sub>6</sub> (3.1. tab.). Precīzas ligandu koncentrācijas tika noteiktas DMSO-d<sub>6</sub> šķīdumos ar kvantitatīvo KMR, kā standartu izmantojot maleīnskābi (*certified reference material TraceCERT®*).

TS un to esteru izejas šķīdumi (*stock solutions*)

Ligands	Forma	Koncentrācijā	Izejas šķīdums ( <i>stock solution</i> )
C8:0	K <sup>+</sup> sāls	50 mM	50 % (v/v) etanols
C10:0	K <sup>+</sup> sāls	50 mM	50 % (v/v) etanols
C12:0	K <sup>+</sup> sāls	50 mM	50 % (v/v) etanols
C14:0	K <sup>+</sup> sāls	50 mM	50 % (v/v) etanols
C16:0*	K <sup>+</sup> sāls	50 mM	50 % (v/v) etanols
C18:0*	K <sup>+</sup> sāls	50 mM	50 % (v/v) etanols
C18:1 <i>cis</i> - $\Delta^9$	skābe	50 mM	DMSO-d <sub>6</sub>
C18:1 <i>trans</i> - $\Delta^9$	skābe	50 mM	DMSO-d <sub>6</sub>
EPA	skābe	25 mM	DMSO-d <sub>6</sub>
C8:0-AC	karnīfina esteris	50 mM	DMSO-d <sub>6</sub>
C12:0-AC	karnīfina esteris	50 mM	DMSO-d <sub>6</sub>
C14:0-AC	karnīfina esteris	25 mM	DMSO-d <sub>6</sub>
C16:0-AC	karnīfina esteris	25 mM	DMSO-d <sub>6</sub>
C18:1-AC <i>cis</i> - $\Delta^9$	karnīfina esteris	50 mM	DMSO-d <sub>6</sub>
C18:1-AC <i>trans</i> - $\Delta^9$	karnīfina esteris	25 mM	DMSO-d <sub>6</sub>
EPA-AC	karnīfina esteris	25 mM	DMSO-d <sub>6</sub>
C16:0-CoA	K <sup>+</sup> sāls	50 mM	D <sub>2</sub> O

\* izšķīst pēc uzsildīšanas līdz 50–60 °C.

280  $\mu$ L proteīna šķīduma parauga šūnā titrē ar liganda šķīdumu, ko atšķaida līdz 200–2000  $\mu$ M koncentrācijai atbilstoši aktīvā attaukotā proteīna koncentrācijai (attiecība proteīns-TS 1:10 un proteīns-acilkarnitīns 1:5). Katru titrēšanu uzsāk ar mazu 0,3  $\mu$ L injekciju, kas nepieciešama difūzijas efektu kompensācijai. Balstoties uz liganda aktivitāti un izdalītiem saistības siltumefektiem tika lietota viena no sekojošām titrēšanas shēmām: (i) 1,2  $\mu$ L  $\times$  32 injekcijas – aktīviem savienojumiem; vai (ii) 1,5  $\mu$ L  $\times$  26 injekcijas – mazāk aktīviem savienojumiem. Visos gadījumos izmantoja 120 s atstarpes starp injekcijām un samaisīšanas ātrumu – 600 rpm.

Katru ligandu titrēja vismaz divas reizes. References bāzes līnija (vienādas intensitātes maza izmēra signāli), ko iegūst titrējot ligandu buferī, pirms datu analīzes tika atņemta no enzīma titrēšanas datiem, lai kompensētu liganda šķīšanas efektus. Pirmo injekcijas punktu izslēdz no datu kopas. Iegūtos titrēšanas rezultātus analizē programmā MicroCal Origin 7 SR4 (*OriginLab*) izmantojot teorētisko titrēšanas līkni (*data fitting*) pēc viena saistības centra modeļa (*one site model*).

$\Delta C_p$  noteikšana [vienādojums (1.4.)] C12:0 TS saistībai ar FABP3 veikta grafiski, tāpat kā 1.29. attēlā. Izmantojot vienādojumus (1.5.)– (1.8.) un *MS Excel*, konstruētas termodinamisko parametru atkarības no temperatūras, līdzīgi grafikiem 1.30. attēlā, buferī bez un ar deterģenta (*Triton X-100*) piedevu.

### 3.6. Enzimātiskās reakcijas protokols

MBP-TMLD enzīmātiskās reakcijas maisījumi analizēti uz 600 MHz Bruker Avance Neo spektrometra (Bruker BioSpin). Enzimātiskās reakcijas maisījums sastāvēja no 500  $\mu$ M liganda, 1500  $\mu$ M  $\alpha$ KG, 500  $\mu$ M nātrija *L*-askorbāta, 150  $\mu$ M amonija dzelzs(II) sulfāta

heksahidrāta  $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  un  $10 \mu\text{M}$  MBP-TMLD KMR buferī D1 ar 10 % (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$  piedevu. Enzimātisko reakciju iniciē ar MBP-TMLD pievienošanu. Pēc 30 min inkubācijas  $37^\circ\text{C}$ , 400 rpm mikrocentrifūgas mēģenēs, reakcijas maisījumus centrifūgē  $6\,000\times g$  un pārnes 3 mm KMR stobriņos. Kontroles paraugi (bez enzīma) tiek apstrādāti tieši tādā pat veidā. 1D  $^1\text{H}$  spektri uzņemti  $25^\circ\text{C}$  izmantojot impulsu sekvenci ar ūdens signāla nospiešanu (*excitation sculpting*), 6000,15 Hz spektra platumu, 128 uzkrājumus un relaksācijas aizturi 1,5 s. Spektri analizēti, izmantojot *MestReNova V.14.1.2 (Mestrelab Research S.L.)*. Daļēji pārklājušos signālu integrālās intensitātes noteica, izmantojot līniju pielāgošanu (dekonvolūciju). Lai novērtētu KMR metodes atkārtojamību, enzimatiskās reakcijas veiktas trīs reizes ar trim dažādām proteīnu porcijām.

MBP-BBOX-4m un MBP-BBOX-2m enzimatiskās reakcijas veiktas buferī D1 ar parasto (nedeiterēto) Tris-Cl tāpat kā MBP-TMLD. Enzimātiskās reakcijas maisījums sastāvēja no  $200 \mu\text{M}$  liganda,  $1500 \mu\text{M}$   $\alpha\text{KG}$ ,  $500 \mu\text{M}$  nātrija *L*-askorbāta,  $500 \mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  un  $3,6\text{--}43,6 \mu\text{M}$  enzīma.

### 3.7. TML analoģu KMR spektru interpretācija

**2:**  $^1\text{H}$  KMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 4,06 (t,  $J=6,0$  Hz, 1H), 3,42–3,32 (m, 2H), 3,12 (s, 9H), 2,09–1,85 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  KMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 171,7, 65,3, 52,94, 52,90, 52,86, 52,5, 26,5, 18,6.

**3:**  $^1\text{H}$  KMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 4,05 (t,  $J=6,3$  Hz, 1H), 3,35–3,28 (m, 2H), 3,11 (s, 9H), 2,06–1,88 (m, 2H), 1,87–1,77 (m, 2H), 1,61–1,38 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  KMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 172,5, 66,4, 53,0, 52,8, 29,5, 25,0, 23,7, 21,9.

**4:**  $^1\text{H}$  KMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 4,08 (t,  $J=6,3$  Hz, 1H), 3,41–3,34 (m, 2H), 3,33–3,27 (m, 2H), 3,03 (s, 6H), 2,11–1,93 (m, 2H), 1,89–1,78 (m, 2H), 1,62–1,41 (m, 2H), 1,37–1,29 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  KMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 172,0, 62,7, 59,7, 52,7, 49,94, 49,90, 49,86, 29,2, 21,5, 21,3, 7,4.

**5:**  $^1\text{H}$  KMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 4,09 (t,  $J=6,3$  Hz, 1H), 3,35–3,20 (m, 4H), 3,05 (s, 6H), 2,11–1,93 (m, 2H), 1,89–1,71 (m, 4H), 1,61–1,40 (m, 2H), 0,96 (t,  $J=7,4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  KMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 172,0, 65,1, 63,3, 52,7, 50,51, 50,47, 50,43, 29,2, 21,5, 21,3, 15,6, 9,8.

**6:**  $^1\text{H}$  KMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 4,07 (t,  $J=6,3$  Hz, 1H), 3,77–3,65 (m, 1H), 3,35–3,26 (m, 2H), 2,98 (s, 6H), 2,11–1,94 (m, 2H), 1,91–1,79 (m, 2H), 1,61–1,42 (m, 2H), 1,41–1,34 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  KMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 172,1, 65,1, 61,9, 52,8, 47,3, 29,3, 21,4, 21,3, 15,5.

**7:**  $^1\text{H}$  KMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3,41 (t,  $J=6,4$  Hz, 1H), 3,24 – 3,15 (m, 4H), 2,96 (s, 6H), 1,75 – 1,68 (m, 4H), 1,64 (dtt,  $J=15,5, 8,0, 3,4$  Hz, 2H), 1,40 – 1,26 (m, 4H), 0,87 (t,  $J=7,7$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  KMR (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  178,92, 63,94, 63,53, 55,10, 50,45, 31,95, 23,83, 21,75, 21,67, 19,05, 12,75.

**8:**  $^1\text{H}$  KMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4,11 (dd,  $J=8,9, 5,2$  Hz, 1H), 3,29 – 3,18 (m, 2H), 3,03 (s, 9H), 2,48 (p,  $J=7,1$  Hz, 1H), 1,82 – 1,75 (m, 1H), 1,76 – 1,70 (m, 2H), 1,65 (dtd,  $J=14,5, 8,7, 6,7$  Hz, 1H), 1,32 (p,  $J=8,2$  Hz, 2H), 1,04 (d,  $J=7,4$  Hz, 3H), 1,03 (d,  $J=7,4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  KMR (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  180,44, 179,00, 66,32, 54,38, 52,76, 34,96, 31,12, 21,95, 21,84, 18,95, 18,28.

**9:**  $^1\text{H}$  KMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 4,04 (t,  $J=6,3$  Hz, 1H), 3,37–3,30 (m, 2H), 3,10 (s, 3H), 2,10–1,78 (m, 4H), 1,61–1,39 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  KMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 172,2, 65,9, 52,8, 52,7, 29,2, 21,9, 21,2.

**10:**  $^1\text{H}$  KMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 4,10 (t,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 3,45–3,35 (m, 2H), 3,14 (s, 9H), 2,11–1,88 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  KMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 171,6, 65,3, 52,98, 52,94, 52,90, 52,4, 26,5, 18,7.

**11:**  $^1\text{H}$  KMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 4,07 (t,  $J=6,3$  Hz, 1H), 3,35–3,28 (m, 2H), 3,11 (s, 9H), 2,06–1,88 (m, 2H), 1,87–1,77 (m, 2H), 1,61–1,38 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  KMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 172,3, 66,4, 52,9, 52,8, 29,4, 25,0, 23,7, 21,9.

**12:**  $^1\text{H}$  KMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3,30 – 3,20 (m, 2H), 3,03 (s, 9H), 2,13 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 1,79 – 1,67 (m, 2H), 1,54 (p,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 1,33 – 1,25 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  KMR (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  183,48, 66,54, 52,73, 37,15, 25,30, 25,17, 22,02.

**16:** 2*S*,3*S*-HTML:  $^1\text{H}$  KMR (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3,93 (dt,  $^3J = 9,9, 4,0$  Hz, 1H), 3,55 (dd,  $^3J = 4,1, 1,3$  Hz, 1H), 3,26 (m, 2H), 3,03 (s, 9H), 1,90 (m, 1H), 1,79 (m, 1H), 1,48 (m, 1H), 1,44 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  KMR (151 MHz,  $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  176,10, 70,61, 66,05, 59,97, 52,78, 27,83, 19,39.

**16:** 2*S*,3*R*-HTML:  $^1\text{H}$  KMR (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3,85 (1H, dt,  $^3J = 9,6, 4,6$  Hz), 3,31 (1H, dd,  $^3J = 5,2$  Hz, 1,3 Hz), 3,28 (m, 2H), 3,04 (s, 9H), 1,90 (m, 1H), 1,79 (m, 1H), 1,51 (m, 1H), 1,48 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  KMR (151 MHz,  $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  177,50, 70,88, 66,07, 60,19, 52,81, 29,96, 19,16.

### 3.8. Proteīnu KMR

Proteīnu KMR spektri uzņemti uz 600 MHz Bruker Avance Neo spektrometra, kas aprīkots ar QCI četrkāršās-rezonanses (HFCN) kriozondi (Bruker BioSpin, GmbH). Proteīna paraugi (koncentrācija 250–350 un  $\sim 900$   $\mu\text{M}$ ) sagatavoti attiecīgi proteīna-liganda saistības pētījumiem un pamatķēdes attiecināšanai. Eksperimenti veikti divos buferos: (i) KPi un (ii) KPi ar 0,10 % (v/v) *Triton X-100* piedevu, kuriem pievienoja 7 % (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$ , 0,03 % (v/v)  $\text{NaN}_3$  un 0,01 % (v/v) SigmaFAST bez-EDTA proteāžu inhibitoru kokteiļa. Organiskā šķīdinātāja daudzums paraugā nepārsniedza 3 % (v/v).

Proteīnu pamatķēdes attiecināšanai uzņemti šādi spektri: 3D HNCA, 3D HNCO, 3D HN(CA)CO un 3D CBCA(CO)NH. Sānu ķēžu protonu ķīmisko nobīžu attiecināšanai uzņemti 3D [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ]-NOESY- $^{15}\text{N}$ -HSQC spektri ar samaisīšanās laiku (*mixing time*) 120 ms. Attiecināšana balstīta uz [97] un [96, 271] literatūras datiem, kas attiecīgi apraksta cilvēka un vērša FABP3 KMR struktūras, kas bija noteiktas atšķirīgos apstākļos nekā šajā darbā. Attiecinātās pamatķēdes ķīmiskās nobīdes apo-FABP3 un FABP3-palmitāta kompleksam apkopotas 20. un 21. pielikumos.

2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektri uzņemti apo-proteīnam un proteīna-liganda kompleksiem identiskos apstākļos CSP noteikšanai izmantojot vienādojumu (1.9.).

## 3.9. Datormodelēšana

### 3.9.1. Molekulārais dokings

#### 3.9.1.1. TMLD molekulārais dokings

Cilvēku TMLD (*UniProt* ID Q9NVH6) homologiskais modelis iegūts no *AlphaFold* proteīnu struktūru datubāzes [220, 221]. Katalītiskā domēna, kas sastāv no *DSBH* motīva un aktīvā centra modeļa ticamība tika novērtēta ar modeļa aminoskābju atlikuma uzticības rādītājiem (*per-residue confidence scores*), ko nosaka vietējā attāluma starpības tests (*local Distance Difference Test*, pLDDT) [222] un paredzamās pozīciju kļūdas. Papildus, proteīna ticamības pārskats ģenerēts ar *Prime* programmu [249–251].

TMLD struktūra sagatavota *Maestro* (*Schrödinger Inc.*) [268] programmā ar proteīna sagatavošanas apakšprogrammu (*PPW*) [272, 273]:

- nogriezta nestrukturētā mitohondriālā mērķa sekvence (*mitochondrial targeting sequence*, aminoskābju atlikumi 1–41), kam bija vismazākā ticamība (pLDDT < 50);
- pievienoti trūkstošie ūdeņraži;
- reassignētas saišu kārtas;
- protonēšanās stāvokļi pielāgoti pH 7,4;
- smagie kodoli minimizēti ar OPLS 4 spēku lauku līdz 0,3 Å konverģencei.

Kofaktori, Zn(II) un OGA, paņemti no BBOX (PDB ID 3O2G) struktūras un nomainīti uz dabiskiem Fe(II) un  $\alpha$ KG saglabājot savstarpējo novietojumu. Fe(II)- $\alpha$ KG kompleksam turpinājumā tika definētas nulles-kārtas (koordinācijas) saites un tas tika minimizēts ar *MacroModel* [274]. Pēc tam sagatavotais kofaktoru komplekss iedokots TMLD modelī ar *Glide* [275–277] programmu standarta precizitātes (SP) līmenī. Enzīma-kofaktoru komplekss vēlreiz tika optimizēts ar *PPW* apakšprogrammu pievēršot uzmanību protonēšanās stāvokļiem aktīvā centrā un minimizējot smagos atomus ar 0,5 Å konverģenci. Iegūtā struktūra izmantota dabiskā substrāta, TML, *IFD* [256, 257] SP dokingam. Struktūra ar ticamāko liganda konformāciju, kas veido visticamākos kontaktus ar enzīmu un sakrīt ar eksperimentālajiem datiem, turpmāk izmantota kā starta struktūra TML analoģu *IFD* SP dokingam lai modelēt iespējamās ligandu pozīcijas TMLD aktīvajā centrā.

#### 3.9.1.2. FABP3 molekulārais dokings

FABP3 struktūra, PDB ID 4TKJ, sagatavota *Maestro* (*Schrödinger Inc.*) [268] programmā ar *PPW* apakšprogrammu [272, 273] tāpat kā TMLD modelis. No kristalogrāfiskās struktūras izveidoti pieci modeļi variējot ūdens molekulu daudzumu aktīvajā centrā: (i) ar 30 ūdens molekulām, kas kontaktē ar ligandu un aktīvā centra aminoskābju atlikumiem; (ii) ar 24 ūdens molekulām, kas piedalās ūdeņraža saišu veidošanā ar ligandu un aktīvā centrā aminoskābju atlikumiem, bet neatrodas uz proteīna virsmas; (iii) ar 12 ūdens molekulām, kas piedalās ūdeņraža saišu veidošanā ar ligandu un aktīvā centrā aminoskābju atlikumiem un neatrodas



liganda ieejas portālā un spraugas (*gap*) reģionā; (iv) ar divām ūdens molekulām, kas ir tiešā kontaktā ar ligandu un (v) bez ūdens molekulām.

Septiņi acilkarnitīni dokoti katrā no proteīna struktūrām izmantojot *IFD SP* [256, 257]. Iegūto kompleksu validācija un ticamākās struktūras atlase balstījās uz *CSP* analīzi.

### 3.9.2. *Ab initio* aprēķini un farmakoforu modeļu izveide

TMLD ligandu struktūras vispirms optimizētas ar *ab initio* blīvuma funkcionālā teorijas (*Density Functional Theory, DFT*) kvantu ķīmiskiem aprēķiniem, izmantojot hibrīda funkcionālu B3LYP kopā ar *triple-zeta* pamatkomplektu (*basis set*) 6-311++G\*\* kopā ar polarizācijas un difūzām funkcijām uz smagiem kodoliem un ūdeņražiem, lai labāk atveidotu lādiņa sadalījumu negatīvi lādētās grupās. Solvatācijas efekta simulācijai izmantots polarizējamais nepārtrauktības modelis (*Polarizable Continuum Model*). Optimizācija veikta Gaussian 09 D.01 programmā [278]. Globāla minimuma sasniegšana novērtēta pēc vibrāciju frekvenču aprēķina, kas visos gadījumos bija pozitīvas. Tas pats teorijas līmenis izmantots divplakņu kakta leņķu rotācijas barjeras aprēķiniem, kur vēlamā divplakņu kakta leņķi mainīja pa pieciem grādiem no  $-180^\circ$  līdz  $180^\circ$ . Pēc katras leņķa maiņas struktūra tika optimizēta.

Farmakoforie modeļi ģenerēti ar *Phase* programmu [279–281]. Hipotēzes izveidei izmantotas  $K_D$  un  $\Delta G$  vērtības, kas iegūtas ar *ITC* metodi. Modelim būtu jāsadē ar vismaz 90 % aktīvo savienojumu un jāsaturs vismaz trīs kopīgas raksturīgas iezīmes ar toleranci 1,0–2,0 Å. Modeļu vērtēšana notika ar *Phase Hypo Score*, bet ligandu atlases efektivitāte – pēc *Phase Screen Score*, kas normalizēta pret smago atomu skaitu molekulā. Izveidoti divi modeļi bez un ar izslēgtiem tilpumiem (*excluded volumes*). Izslēgti tilpumi veidoti no starpības starp aktīviem un neaktīviem ligandiem.

### 3.9.3. BBOX mutantu izveide un sagatavošana molekulārajai dinamikai

BBOX mutantu izveidei izmantotas divas BBOX kristalogrāfiskās struktūras: aizvērtā (PDB ID 3O2G) un atvērtā (PDB ID 4C8R A un B ķēdes) konformācijā. Sākotnējās struktūras sagatavotas Maestro (*Schrödinger Inc.*) [268] programmā. Vispirms 3O2G aktīvajā centrā Zn(II) nomainīts uz Fe(II) un OGA ar  $\alpha$ KG. 4C8R struktūrā AR692B liganda vietā no 3O2G iekopēti Fe(II)/ $\alpha$ KG un GBB. Izmantojot *PPW* apakšprogrammu, veiktas sekojošas izmaiņas [272, 273]:

- pievienoti trūkstošie ūdeņraži;
- reassignētas saišu kārtas;
- protonēšanās stāvokļi pielāgoti pH 7,4;
- modelēti eksperimentāli nedetektēti cilpu reģioni;
- izdzēstas liekas ūdens molekulas, kas neveido kontaktus ar proteīnu vai substrātu;
- smagie kodoli minimizēti ar OPLS 4 spēku lauku līdz 0,3 Å konverģencei.

Pamatojoties uz TMLD un BBOX sekvenču sakrītību, ar *CHARMM-GUI* [282, 283] izveidoti četri BBOX mutantu modeļi:

- 1) 2m: N191D, T295D;

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

Iegūtie mutanti kompleksos ar kofaktoriem un GBB (no BBOX struktūras PDB ID 3O2G) tika minimizēti *CHARMM-GUI* vietnē. Ligandu parametrizācija veikta ar *CGenFF* [284, 285] izmantojot *CHARMM36* spēku lauku [286]. Iegūtos modeļus ielasīja Maestro (*Schrödinger Inc.*) [268] programmā, kurā veica tālāko struktūru sagatavošanu MD. Vispirms, atkārtoti palaida *PPW* apakšprogrammu, izlaboja aminoskābju atlikumu nosaukumu konfliktus, enzīmam pievienoja terminālās grupas (ACE un CT3). Aktīvajā centrā pārbaudīti aminoskābju atlikumu protonēšanās stāvokļi. Izmantojot *IFD* SP mutantos iedokots TML un no iegūtajiem kompleksiem katram mutantam atlasīts viens, kurā novēro visloģiskāko enzīma-liganda kontaktu tīklu. Izmantojot simetrijas elementus, no BBOX mutanta monomēra izveidoja homodimēru, ko pēc tam izmantoja MD simulācijās.

### 3.9.4. Molekulārā dinamika

MD simulācijas veiktas Gromacs 5.1 [287], Gromacs 2018 un Gromacs 2021 [239, 288, 289], izmantojot GPU paātrinājumu. Proteīnu un ligandu parametrizācija veikta ar *CHARMM36* spēku lauku [286]. BBOX vai TMLD dimēra struktūru ievietoja ūdens kubā ar šķautnes garumu 100 Å. Ūdens molekulas veidotas pēc *TIP3P* modeļa. Sistēmu neitralizēja ar NaCl joniem ar beigu koncentrāciju 0,15 M. Pēc tam sistēma minimizēta līdz maksimālajam spēkam, kas darbojas uz jebkuru sistēmas atomu, sasniedzot lielumu 100–1000 kJ·mol<sup>-1</sup> (atkarībā no sistēmas). Minimizētā sistēma pēc tam uzsildīta līdz 300 K un līdzsvarota 100 ps (NVT), izmantojot modificēto Berendsena termostatu, *V-rescale*, kas nodrošina pareizo kinētiskās enerģijas sadalījumu. Tālāk sekoja sistēmas spiediena izlīdzināšana līdz 1 bar 100 ps (NPT), izmantojot Berendsena barostatu. Gan NVT, gan NPT sagatavošanās simulācijās proteīna un liganda pozīcijas bija līdzsvarotas/fiksētas ap sākotnējam koordinātēm (*position restraints*), lai novērstu plašās, nedabiskās izmaiņas proteīna-liganda struktūrā. Visbeidzot, izmantojot sagatavotas struktūras 300 K un 1 bar, palaista 100 ns ilga produkcijas simulācija (*production run*) ar neierobežotu (*unrestraint*) sistēmu, izmantojot *V-rescale* termostatu un Parrinello-Rahman barostatu, saglabājot struktūras pēc katrām 20 ps. Simulācijas laika solis (*timestep*) – 2 fs.

Strukturālā ZnCCCH motīva saglabāšanai (2.4. att.), tajā tika iesaldēti nultās kārtas saites (3.2. tab.) un leņķi (3.3. tab.), kas koordinē Zn(II) ar četriem aminoskābju atlikumiem: C38, C40, C43 un H82. Koordinācijas saišu un leņķu vērtības noteiktas kristalogrāfiskajās struktūrās. Nepieciešamais spēka lielums noteikts eksperimentāli. Zn(II) lādiņš tika samazināts no +2.0 uz +0.96, bet CCCH aminoskābju atlikumu lādiņi – palielināti atbilstoši publicētiem parametrizācijas datiem līdzīgiem motīviem: cisteīnam no –1.0 uz –0.74, bet histidīnam no 0.0 uz +0.26 [243, 244]. Aktīvā centra konfigurācijas saglabāšanai, Fe(II),  $\alpha$ KG un H<sub>2</sub>O molekulas, kas koordinētas ar Fe(II), tika uzskatītas kā proteīna neatņemamas daļas. Tetragonālās bipiramīdas struktūras saglabāšanai (2.3. att.), dinamikas laikā iesaldēti attālumi (3.2. tab.) un

divplakņu kakta leņķi (3.4. tab.) starp H202, D204, H347, αKG, HOH 744 un Fe(II). TMLD modelim ZnCCCH motīvs netiek iesaldēts, jo pašreizējās modeļos to nenovēro. Visos modeļos, kas balstīti uz BBOX struktūru, tiek atrasti tikai divi no trim cisteīniem un histidīns: C80, C85 un H124.

3.2. tabula

Zn(II) un Fe(II) iesaldētie koordinācijas saišu garumi

Atoms 1	Atoms 2	Garums, nm	$f\hat{c}$ , kJ·mol <sup>-1</sup> ·nm <sup>-2</sup>
C38: SG	Zn(II)	0,233	32640
C38: SG	Zn(II)	0,233	32640
C40: SG	Zn(II)	0,233	32640
H82: NE2	Zn(II)	0,212	32640
H202: NE2	Fe(II)	0,215	83680
D204: OD1	Fe(II)	0,218	83680
H347: NE2	Fe(II)	0,218	83680
HOH 744: O	Fe(II)	0,203	83680
αKG: O2	Fe(II)	0,221	83680
αKG: O5	Fe(II)	0,220	83680

3.3. tabula

ZnCCCH motīva leņķu iesaldēšanas parametri

Atoms 1	Atoms 2	Atoms 3	Leņķis	$f\hat{c}$ , kJ·mol <sup>-1</sup> ·rad <sup>-2</sup>
C38: SG	Zn(II)	C40: SG	116,4	1500
C38: SG	Zn(II)	C43: SG	116,4	1500
C40: SG	Zn(II)	C43: SG	116,4	1500
H82: NE2	Zn(II)	C38: SG	101,3	1500
H82: NE2	Zn(II)	C40: SG	101,3	1500
H82: NE2	Zn(II)	C43: SG	101,3	1500
C38: CB	C38: SG	Zn(II)	101,8	1500
C40: CB	C40: SG	Zn(II)	101,8	1500
C43: CB	C43: SG	Zn(II)	101,8	1500

3.4. tabula

Fe(II) tetragonālās bipiramīdas divplakņu kakta leņķu iesaldēšanas parametri

Atoms 1	Atoms 2	Atoms 3	Leņķis	$f\hat{c}$ , kJ·mol <sup>-1</sup> ·rad <sup>-2</sup>
H202: NE2	Fe(II)	H347: NE2	90°	1500
H202: NE2	Fe(II)	D204: OD1	90°	1500
H202: NE2	Fe(II)	αKG: O1	90°	1500
H202: NE2	Fe(II)	αKG: O5	90°	1500
HOH 744: O	Fe(II)	H347: NE2	90°	1500
HOH 744: O	Fe(II)	D204: OD1	90°	1500
HOH 744: O	Fe(II)	αKG: O1	90°	1500
HOH 744: O	Fe(II)	αKG: O5	90°	1500
D204: OD1	Fe(II)	H347: NE2	90°	1500
H347: NE2	Fe(II)	αKG: O5	90°	1500
D204: OD1	Fe(II)	αKG: O2	104,6°	1500
αKG: O2	Fe(II)	αKG: O5	70,6°	1500

## 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 enzīmātiskās 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  $\alpha$ 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-analogu 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.

## CONCLUSIONS

1. Newly developed ITC assay allowed to characterize binding of substrate-like compounds to TMLD. In combination with the enzymatic assay data, it allowed to determine both thermodynamic parameters (binding affinity, enthalpy, and entropy) and ligand potential to serve as a substrate.
2. Two different binding mechanisms were discovered, enthalpy- and entropy-driven, that differ by ligand-caused changes in the active site of TMLD. A correlation between TMLD substrate conversion and binding mechanism was found. Substrates that bind to the TMLD by entropy-driven binding mechanisms were hydroxylated to a lesser extent.
3. Uncoupling between  $\alpha$ KG turnover and hydroxylation reaction of several TML analogues was observed. Hence, such compounds occupy the active site of TMLD for a longer period without production of the reaction product. Thus, these compounds can be used for the *de novo* design of TMLD inhibitors due to prolonged residence times.
4. The TMLD pharmacophore model developed confirms the necessity of the three functional elements for successful substrate binding. It can be used to predict binding affinities towards TMLD for new TML analogues.
5. FABP3 is potent to bind both saturated and unsaturated fatty acids as well as corresponding long-chain acylcarnitines or CoA esters [as determined by physical chemistry methods (ITC and NMR)]. Polyunsaturated acylcarnitines and CoA esters bind to FABP3 active site in the same way as fatty acids, while long-chain monounsaturated acylcarnitines bind by a different mechanism where one ligand molecule is potent to bind two protein molecules.
6. Acylcarnitines displace short fatty acids (including caprylate, C6:0) from the active site of FABP3. Caprate (C10:0) competes with acylcarnitines only for the second less potent binding site of FABP3, while laurate (C12:0) completely replaces acylcarnitines from their both binding sites.
7. The experimental data obtained suggest that FABP3 is potent to bind acylcarnitines and protect cells from their damage and acute toxicity, thus, acting similarly to a cardio-protective medicine. This suggests one of the possible therapies by initiation of the FABP3 overexpression in the target tissues (i.e., heart muscle) using mRNA vaccine approach.

## 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](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] Tahara, E. B.; Navarete, F. D. T.; Kowaltowski, A. J. Tissue-, Substrate-, and Site-Specific Characteristics of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46* (9), 1283–1297.
- [7] Kerner, J.; Hoppel, C. Fatty Acid Import into Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2000**, *1486* (1), 1–17.
- [8] 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.
- [9] Reuter, S. E.; Evans, A. M. Carnitine and Acylcarnitines: Pharmacokinetic, Pharmacological and Clinical Aspects. *Clin. Pharmacokinet.* **2012**, *51* (9), 553–572.
- [10] Dambrova, M.; Makrecka-Kuka, M.; Vilskersts, R.; Makarova, E.; Kuka, J.; Liepinsh, E. Pharmacological Effects of Meldonium: Biochemical Mechanisms and Biomarkers of Cardiometabolic Activity. *Pharmacol. Res.* **2016**, *113*, 771–780.
- [11] McGarry, J. D.; Brown, N. F. The Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase System - From Concept to Molecular Analysis. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *244* (1), 1–14.
- [12] Bruls, Y. M.; de Ligt, M.; Lindeboom, L.; Phielix, E.; Havekes, B.; Schaart, G.; Kornips, E.; Wildberger, J. E.; Hesselink, M. K.; Muoio, D.; Schrauwen, P.; Schrauwen-Hinderling, V. B. Carnitine Supplementation Improves Metabolic Flexibility and Skeletal Muscle Acetylcarnitine Formation in Volunteers with Impaired Glucose Tolerance: A Randomised Controlled Trial. *EBioMedicine* **2019**, *49* (xxxx), 318–330.
- [13] Zuurbier, C. J.; Bertrand, L.; Beauloye, C. R.; Andreadou, I.; Ruiz-Meana, M.; Jespersen, N. R.; Kula-Alwar, D.; Prag, H. A.; Eric Botker, H.; Dambrova, M.; Montessuit, C.; Kaambre, T.; Liepinsh, E.; Brookes, P. S.; Krieg, T. Cardiac Metabolism as a Driver and Therapeutic Target of Myocardial Infarction. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24* (11), 5937–5954.
- [14] Lopaschuk, G. D.; Ussher, J. R.; Folmes, C. D. L.; Jaswal, J. S.; Stanley, W. C. Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2010**, *90* (1), 207–258.
- [15] Liepinsh, E.; Skapare, E.; Kuka, J.; Makrecka, M.; Cirule, H.; Vavers, E.; Sevostjanovs,

- E.; Grinberga, S.; Pugovics, O.; Dambrova, M. Activated Peroxisomal Fatty Acid Metabolism Improves Cardiac Recovery in Ischemia-Reperfusion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2013**, *386* (6), 541–550.
- [16] Chouchani, E. T.; Pell, V. R.; Gaude, E.; Aksentijević, D.; Sundier, S. Y.; Robb, E. L.; Logan, A.; Nadtochiy, S. M.; Ord, E. N. J.; Smith, A. C.; Eyassu, F.; Shirley, R.; Hu, C.-H.; Dare, A. J.; James, A. M.; Rogatti, S.; Hartley, R. C.; Eaton, S.; Costa, A. S. H.; Brookes, P. S.; Davidson, S. M.; Duchon, M. R.; Saeb-Parsy, K.; Shattock, M. J.; Robinson, A. J.; Work, L. M.; Frezza, C.; Krieg, T.; Murphy, M. P. Ischaemic Accumulation of Succinate Controls Reperfusion Injury through Mitochondrial ROS. *Nature* **2014**, *515* (7527), 431–435.
- [17] Wong, H. S.; Dighe, P. A.; Mezera, V.; Monternier, P. A.; Brand, M. D. Production of Superoxide and Hydrogen Peroxide from Specific Mitochondrial Sites under Different Bioenergetic Conditions. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (41), 16804–16809.
- [18] Bøtker, H. E.; Cabrera-Fuentes, H. A.; Ruiz-Meana, M.; Heusch, G.; Ovize, M. Translational Issues for Mitoprotective Agents as Adjunct to Reperfusion Therapy in Patients with ST-segment Elevation Myocardial Infarction. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24* (5), 2717–2729.
- [19] Boengler, K.; Lochnit, G.; Schulz, R. Mitochondria “THE” Target of Myocardial Conditioning. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2018**, *315* (5), H1215–H1231.
- [20] Zuurbier, C. J.; Bertrand, L.; Beauloye, C. R.; Andreadou, I.; Ruiz-Meana, M.; Jespersen, N. R.; Kula-Alwar, D.; Prag, H. A.; Eric Botker, H.; Dambrova, M.; Montessuit, C.; Kaambre, T.; Liepinsh, E.; Brookes, P. S.; Krieg, T. Cardiac Metabolism as a Driver and Therapeutic Target of Myocardial Infarction. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24* (11), 5937–5954.
- [21] Rebouche, C. J. Carnitine Function and Requirements during the Life Cycle. *FASEB J.* **1992**, *6* (15), 3379–3386.
- [22] Vaz, F. M.; van Vlies, N. Chapter 13. Dioxygenases of Carnitine Biosynthesis: 6- N -Trimethyllysine and  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylases. In *2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases*; **2015**; pp 324–337.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Strijbis, K.; Vaz, F. M.; Distel, B. Enzymology of the Carnitine Biosynthesis Pathway. *IUBMB Life* **2010**, *62* (May), 357–362.
- [26] Liepinsh, E.; Makrecka-Kuka, M.; Kuka, J.; Vilskersts, R.; Makarova, E.; Cirule, H.; Loza, E.; Lola, D.; Grinberga, S.; Pugovics, O.; Kalvins, I.; Dambrova, M. Inhibition of L-Carnitine Biosynthesis and Transport by Methyl- $\gamma$ -Butyrobetaine Decreases Fatty Acid Oxidation and Protects against Myocardial Infarction. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 1319–1332.
- [27] Liepinsh, E.; Makrecka-Kuka, M.; Makarova, E.; Volska, K.; Svalbe, B.; Sevostjanovs, E.; Grinberga, S.; Kuka, J.; Dambrova, M. Decreased Acylcarnitine Content Improves Insulin Sensitivity in Experimental Mice Models of Insulin Resistance. *Pharmacol. Res.* **2015**, 1–8.
- [28] 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.
- [29] Simkhovich, B. Z.; Shutenko, Z. V.; Meirēna, D. V.; Khagi, K. B.; Mežapūķe, R. J.; Molodchina, T. N.; Kalvīņš, I. J.; Lukevics, E. 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium)Propionate(Thp)-a Novel  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase Inhibitor



- with Cardioprotective Properties. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37* (2), 195–202.
- [30] Sesti, C.; Simkhovich, B. Z.; Kalvinsh, I.; Kloner, R. A. Mildronate, a Novel Fatty Acid Oxidation Inhibitor and Antianginal Agent, Reduces Myocardial Infarct Size without Affecting Hemodynamics. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2006**, *47* (3), 493–499.
- [31] Liepinsh, E.; Vilskersts, R.; Loca, D.; Kirjanova, O.; Pugovichs, O.; Kalvinsh, I.; Dambrova, M. Mildronate, an Inhibitor of Carnitine Biosynthesis, Induces an Increase in Gamma-Butyrobetaine Contents and Cardioprotection in Isolated Rat Heart Infarction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2006**, *48* (6), 314–319.
- [32] Fujimori, D. G. A Novel Enzymatic Rearrangement. *Chem. Biol.* **2010**, *17* (11), 1269–1270.
- [33] Henry, L.; Leung, I. K. H.; Claridge, T. D. W.; Schofield, C. J.  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase Catalyses a Stevens Type Rearrangement. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (15), 4975–4978.
- [34] Rupp, H.; Zarain-Herzberg, A.; Maisch, B. The Use of Partial Fatty Acid Oxidation Inhibitors for Metabolic Therapy of Angina Pectoris and Heart Failure. *Herz* **2002**, *27* (7), 621–636.
- [35] Vilskersts, R.; Liepinsh, E.; Mateuszuk, L.; Grinberga, S.; Kalvinsh, I.; Chlopicki, S.; Dambrova, M. Mildronate, a Regulator of Energy Metabolism, Reduces Atherosclerosis in ApoE/LDLR Mice. *Pharmacology* **2009**, *83* (5), 287–293.
- [36] Hayashi, Y.; Ishida, H.; Hoshiai, M.; Hoshiai, K.; Kirimoto, T.; Kanno, T.; Nakano, M.; Tajima, K.; Miyake, H.; Matsuura, N.; Nakazawa, H. MET-88, a Gamma-Butyrobetaine Hydroxylase Inhibitor, Improves Cardiac SR Ca<sup>2+</sup> Uptake Activity in Rats with Congestive Heart Failure Following Myocardial Infarction. *Mol. Cell. Biochem.* **2000**, *209* (1–2), 39–46.
- [37] Liepinsh, E.; Kuka, J.; Svalbe, B.; Vilskersts, R.; Skapare, E.; Cirule, H.; Pugovichs, O.; Kalvinsh, I.; Dambrova, M. Effects of Long-Term Mildronate Treatment on Cardiac and Liver Functions in Rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *105* (Cpt I), 387–394.
- [38] Hayashi, Y.; Kirimoto, T.; Asaka, N.; Nakano, M.; Tajima, K.; Miyake, H.; Matsuura, N. Beneficial Effects of MET-88, a  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase Inhibitor in Rats with Heart Failure Following Myocardial Infarction. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *395* (3), 217–224.
- [39] Zaugg, C. E.; Spaniol, M.; Kaufmann, P.; Bellahcene, M.; Barbosa, V.; Tolnay, M.; Buser, P. T.; Krahenbuhl, S. Myocardial Function and Energy Metabolism in Carnitine-Deficient Rats. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60* (4), 767–775.
- [40] Degrace, P.; Demizieux, L.; Du, Z.; Gresti, J.; Caverot, L.; Djaouti, L.; Jourdan, T.; Moindrot, B.; Guillaud, J.-C.; Hocquette, J.-F.; Clouet, P. Regulation of Lipid Flux between Liver and Adipose Tissue during Transient Hepatic Steatosis in Carnitine-Depleted Rats. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (29), 20816–20826.
- [41] Liepinsh, E.; Vilskersts, R.; Skapare, E.; Svalbe, B.; Kuka, J.; Cirule, H.; Pugovichs, O.; Kalvinsh, I.; Dambrova, M. Mildronate Decreases Carnitine Availability and Up-Regulates Glucose Uptake and Related Gene Expression in the Mouse Heart. *Life Sci.* **2008**, *83* (17–18), 613–619.
- [42] 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.
- [43] 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  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase. *ChemBioChem* **2012**, *13* (11), 1559–1563.

- [44] Dambrova, M.; Liepinsh, E.; Kalvinsh, I. Mildronate: Cardioprotective Action through Carnitine-Lowering Effect. *Trends Cardiovasc. Med.* **2002**, *12* (6), 275–279.
- [45] Zvejniece, L.; Svalbe, B.; Makrecka, M.; Liepinsh, E.; Kalvinsh, I.; Dambrova, M. Mildronate Exerts Acute Anticonvulsant and Antihypnotic Effects. *Behav. Pharmacol.* **2010**, *21* (5–6), 548–555.
- [46] Jaudzems, K.; Kuka, J.; Gutsaits, A.; Zinovjevs, K.; Kalvinsh, I.; Liepinsh, E.; Liepinsh, E.; Dambrova, M. Inhibition of Carnitine Acetyltransferase by Mildronate, a Regulator of Energy Metabolism. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2009**, *24* (November 2008), 1269–1275.
- [47] Marina Makrecka-Kūka. Discovery of a Novel Cardioprotective Drug Methyl-GBB: Pharmacological Potential for Lowering Acyl-Carnitines, Riga Stradiņš University, **2015**.
- [48] Kalvinsh, I.; Dambrova, M.; Liepinsh, E.; Pugovics, O.; Vilskersts, R.; Kuka, J.; Grinberga, S.; Loza, E. Use of 4-[Ethyl(Dimethyl)Ammonio]Butanoate in the Treatment of Cardiovascular Disease. WO/2011/048201, 2011.
- [49] Kuka, J.; Vilskersts, R.; Cirule, H.; Makrecka, M.; Pugovics, O.; Kalvinsh, I.; Dambrova, M.; Liepinsh, E. The Cardioprotective Effect of Mildronate Is Diminished After Co-Treatment With  $\gamma$ -Carnitine. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2012**, *17* (2), 215–222.
- [50] 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  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase. *Chem. Biol.* **2010**, *17* (12), 1316–1324.
- [51] Zelencova, D.  $\gamma$ -Butirobetaīna Hidroksilāzes Inhibītoru Izpēte, Rīgas Tehniskā universitāte, **2013**.
- [52] Parnham, M. J.; Sies, H. The Early Research and Development of Ebselen. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86* (9), 1248–1253.
- [53] 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  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (5), 1765.
- [54] Kamps, J. J. A. G.; Khan, A.; Choi, H.; Lesniak, R. K.; Brem, J.; Rydzik, A. M.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J.; Claridge, T. D. W.; Mecinović, J. Cation- $\pi$  Interactions Contribute to Substrate Recognition in  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase Catalysis. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (4), 1270–1276.
- [55] Khan, A.; Leśniak, R. K.; Brem, J.; Rydzik, A. M.; Choi, H.; Leung, I. K. H.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J.; Claridge, T. D. W. Development and Application of Ligand-Based NMR Screening Assays for  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase. *Medchemcomm* **2016**, *7* (5), 873–880.
- [56] 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  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (33), 6354–6358.
- [57] Leśniak, R. K.; Rydzik, A. M.; Kamps, J. J. A. G.; Kahn, A.; Claridge, T. D. W.; Schofield, C. J. 19F NMR Studies on  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase Provide Mechanistic Insights and Suggest a Dual Inhibition Mode. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (98), 14717–14720.
- [58] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.2, **2021**.
- [59] Hulse, J. D.; Ellis, S. R.; Henderson, L. M. Carnitine Biosynthesis.  $\beta$ -Hydroxylation of Trimethyllysine by an  $\alpha$ -Ketoglutarate-Dependent Mitochondrial Dioxigenase. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253* (5), 1654–1659.

- [60] Hoppel, C. L.; Cox, R. A.; Novak, R. F. N6-Trimethyl-Lysine Metabolism. 3-Hydroxy-N6-Trimethyl-Lysine and Carnitine Biosynthesis. *Biochem. J.* **1980**, *188* (2), 509–519.
- [61] Sachan, D. S.; Hoppel, C. L. Carnitine Biosynthesis. Hydroxylation of N6-Trimethyl-Lysine to 3-Hydroxy-N6-Trimethyl-Lysine. *Biochem. J.* **1980**, *188* (2), 529–534.
- [62] 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.
- [63] Zelencova, D. ε-Trimetillizīna Hidroksilāze. Inhibitoru Meklējumi, Rīgas Tehniskā universitāte, **2015**.
- [64] Vaz, F. M.; Ofman, R.; Westinga, K.; Back, J. W.; Wanders, R. J. A. Molecular and Biochemical Characterization of Rat ε-N-Trimethyllysine Hydroxylase, the First Enzyme of Carnitine Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (36), 33512–33517.
- [65] Novak, R. F.; Swift, T. J.; Hoppel, C. L. N6-Trimethyl-Lysine Metabolism. Structural Identification of the Metabolite 3-Hydroxy-N6-Trimethyl-Lysine. *Biochem. J.* **1980**, *188* (2), 521–527.
- [66] 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.
- [67] 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-Nε-Trimethyllysine. *Org. Lett.* **2017**, *19* (2), 400–403.
- [68] Cunningham, B. C.; Wells, J. A. High-Resolution Epitope Mapping of HGH-Receptor Interactions by Alanine-Scanning Mutagenesis. *Science* (80-. ). **1989**, *244* (4908), 1081–1085.
- [69] 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.
- [70] 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.
- [71] Monfregola, J.; Cevenini, A.; Terracciano, A.; Van Vlies, N.; Arbucci, S.; Wanders, R. J. a; D’Urso, M.; Vaz, F. M.; Ursini, M. V. Functional Analysis of TMLH Variants and Definition of Domains Required for Catalytic Activity and Mitochondrial Targeting. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *204* (December 2004), 839–847.
- [72] Monfregola, J.; Napolitano, G.; Conte, I.; Cevenini, A.; Migliaccio, C.; D’Urso, M.; Ursini, M. V. Functional Characterization of the TMLH Gene: Promoter Analysis, in Situ Hybridization, Identification and Mapping of Alternative Splicing Variants. *Gene* **2007**, *395*, 86–97.
- [73] Poveda, J. A.; Giudici, A. M.; Renart, M. L.; Molina, M. L.; Montoya, E.; Fernández-Carvajal, A.; Fernández-Ballester, G.; Encinar, J. A.; González-Ros, J. M. Lipid Modulation of Ion Channels through Specific Binding Sites. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2014**, *1838* (6), 1560–1567.
- [74] Wahli, W.; Michalik, L. PPARs at the Crossroads of Lipid Signaling and Inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* **2012**, *23* (7), 351–363.
- [75] Shimizu, T. Lipid Mediators in Health and Disease: Enzymes and Receptors as Therapeutic Targets for the Regulation of Immunity and Inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *49* (1), 123–150.
- [76] Hotamisligil, G. S.; Bernlohr, D. A. Metabolic Functions of FABPs - Mechanisms and Therapeutic Implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11* (10), 592–605.
- [77] Gordon, G. B. Saturated Free Fatty Acid Toxicity: II. Lipid Accumulation, Ultrastructural Alterations, and Toxicity in Mammalian Cells in Culture. *Exp. Mol.*

- Pathol.* **1977**, *27* (2), 262–276.
- [78] Ockner, R. K.; Manning, J. A. Fatty Acid-Binding Protein in Small Intestine. Identification, Isolation, and Evidence for Its Role in Cellular Fatty Acid Transport. *J. Clin. Invest.* **1974**, *54* (2), 326–338.
- [79] 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.
- [80] 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.
- [81] Smathers, R. L.; Petersen, D. R. The Human Fatty Acid-Binding Protein Family: Evolutionary Divergences and Functions. *Hum. Genomics* **2011**, *5* (3), 170–191.
- [82] Bateman, A.; Martin, M. J.; Orchard, S.; Magrane, M.; Agivetova, R.; Ahmad, S.; Alpi, E.; Bowler-Barnett, E. H.; Britto, R.; Bursteinas, B.; Bye-A-Jee, H.; Coetzee, R.; Cukura, A.; da Silva, A.; Denny, P.; Dogan, T.; Ebenezer, T. G.; Fan, J.; Castro, L. G.; Garmiri, P.; Georghiou, G.; Gonzales, L.; Hatton-Ellis, E.; Hussein, A.; Ignatchenko, A.; Insana, G.; Ishtiaq, R.; Jokinen, P.; Joshi, V.; Jyothi, D.; Lock, A.; Lopez, R.; Luciani, A.; Luo, J.; Lussi, Y.; MacDougall, A.; Madeira, F.; Mahmoudy, M.; Menchi, M.; Mishra, A.; Moulang, K.; Nightingale, A.; Oliveira, C. S.; Pundir, S.; Qi, G.; Raj, S.; Rice, D.; Lopez, M. R.; Saidi, R.; Sampson, J.; Sawford, T.; Speretta, E.; Turner, E.; Tyagi, N.; Vasudev, P.; Volynkin, V.; Warner, K.; Watkins, X.; Zaru, R.; Zellner, H.; Bridge, A.; Poux, S.; Redaschi, N.; Aimo, L.; Argoud-Puy, G.; Auchincloss, A.; Axelsen, K.; Bansal, P.; Baratin, D.; Blatter, M. C.; Bolleman, J.; Boutet, E.; Breuza, L.; Casals-Casas, C.; de Castro, E.; Echioukh, K. C.; Coudert, E.; Cuche, B.; Doche, M.; Dornevil, D.; Estreicher, A.; Famiglietti, M. L.; Feuermann, M.; Gasteiger, E.; Gehant, S.; Gerritsen, V.; Gos, A.; Gruaz-Gumowski, N.; Hinz, U.; Hulo, C.; Hyka-Nouspikel, N.; Jungo, F.; Keller, G.; Kerhornou, A.; Lara, V.; Le Mercier, P.; Lieberherr, D.; Lombardot, T.; Martin, X.; Masson, P.; Morgat, A.; Neto, T. B.; Paesano, S.; Pedruzzi, I.; Pilbout, S.; Pourcel, L.; Pozzato, M.; Pruess, M.; Rivoire, C.; Sigrist, C.; Sonesson, K.; Stutz, A.; Sundaram, S.; Tognolli, M.; Verbregue, L.; Wu, C. H.; Arighi, C. N.; Arminski, L.; Chen, C.; Chen, Y.; Garavelli, J. S.; Huang, H.; Laiho, K.; McGarvey, P.; Natale, D. A.; Ross, K.; Vinayaka, C. R.; Wang, Q.; Wang, Y.; Yeh, L. S.; Zhang, J.; Ruch, P.; Teodoro, D. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (D1), D480–D489.
- [83] EMBL-EBI. ClustalW2: Multiple Sequence Alignment. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/help/faq.html> (lapa skatīta 05.06.2015.).
- [84] Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G. Fast, Scalable Generation of High-quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7* (1), 539.
- [85] Zimmerman, A. W.; Van Moerkerk, H. T. B.; Veerkamp, J. H. Ligand Specificity and Conformational Stability of Human Fatty Acid-Binding Proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2001**, *33* (9), 865–876.
- [86] Glatz, J. F. C.; Vork, M. M.; Cistola, D. P.; van der Vusse, G. J. Cytoplasmic Fatty Acid Binding Protein: Significance for Intracellular Transport of Fatty Acids and Putative Role on Signal Transduction Pathways. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* **1993**, *48* (1), 33–41.
- [87] Rolf, B.; Oudenampsen-Krüger, E.; Börchers, T.; Færgeman, N. J.; Knudsen, J.; Lezius, A.; Spener, F. Analysis of the Ligand Binding Properties of Recombinant Bovine Liver-Type Fatty Acid Binding Protein. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **1995**, *1259* (3), 245–253.
- [88] Thumser, A. E. A.; Wilton, D. C. The Binding of Cholesterol and Bile Salts to

- Recombinant Rat Liver Fatty Acid-Binding Protein. *Biochem. J.* **1996**, *320* (3), 729–733.
- [89] Furuhashi, M.; Hotamisligil, G. S. Fatty Acid-Binding Proteins: Role in Metabolic Diseases and Potential as Drug Targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (6), 489–503.
- [90] Veerkamp, J. H.; van Moerkerk, H. T. B. Fatty Acid-Binding Protein and Its Relation to Fatty Acid Oxidation. *Mol. Cell. Biochem.* **1993**, *123* (1–2), 101–106.
- [91] Binas, 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.
- [92] Schaap, F. G.; Binas, B.; Danneberg, H.; Van Der Vusse, G. J.; Glatz, J. F. C. Impaired Long-Chain Fatty Acid Utilization by Cardiac Myocytes Isolated from Mice Lacking the Heart-Type Fatty Acid Binding Protein Gene. *Circ. Res.* **1999**, *85* (4), 329–337.
- [93] Zanotti, G.; Scapin, G.; Spadon, P.; Veerkamp, J. H.; Sacchettini, J. C. Three-Dimensional Structure of Recombinant Human Muscle Fatty Acid-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (26), 18541–18550.
- [94] Young, A. C.; Scapin, G.; Kromminga, A.; Patel, S. B.; Veerkamp, J. H.; Sacchettini, J. C. Structural Studies on Human Muscle Fatty Acid Binding Protein at 1.4 Å Resolution: Binding Interactions with Three C18 Fatty Acids. *Structure* **1994**, *2* (6), 523–534.
- [95] 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.
- [96] 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.
- [97] Lücke, C.; Rademacher, M.; Zimmerman, A. W.; Van Moerkerk, H. T. B.; Veerkamp, J. H.; Rüterjans, H. Spin-System Heterogeneities Indicate a Selected-Fit Mechanism in Fatty Acid Binding to Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein (H-FABP). *Biochem. J.* **2001**, *354* (2), 259–266.
- [98] Hirose, M.; Sugiyama, S.; Ishida, H.; Niiyama, M.; Matsuoka, D.; Hara, T.; Mizohata, E.; Murakami, S.; Inoue, T.; Matsuoka, S.; Murata, M. Structure of the Human-Heart Fatty-Acid-Binding Protein 3 in Complex with the Fluorescent Probe 1-Anilinonaphthalene-8-Sulphonic Acid. *J. Synchrotron Radiat.* **2013**, *20* (6), 923–928.
- [99] 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.
- [100] 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.
- [101] Glatz, J. F. C.; van der Vusse, G. J. Cellular Fatty Acid-Binding Proteins: Their Function and Physiological Significance. *Prog. Lipid Res.* **1996**, *35* (3), 243–282.
- [102] Xu, Z.; Bernlohr, D. A.; Banaszak, L. J. The Adipocyte Lipid-Binding Protein at 1.6-Å Resolution. Crystal Structures of the Apoprotein and with Bound Saturated and Unsaturated Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (11), 7874–7884.
- [103] Armstrong, E. H.; Goswami, D.; Griffin, P. R.; Noy, N.; Ortlund, E. A. Structural Basis for Ligand Regulation of the Fatty Acid-Binding Protein 5, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$  (FABP5-PPAR $\beta/\delta$ ) Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (21), 14941–14954.

- [104] Gerwick, W. H.; Moghaddam, M.; Hamberg, M. Oxylinp Metabolism in the Red Alga *Gracilariopsis Lemaneiformis*: Mechanism of Formation of Vicinal Dihydroxy Fatty Acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *290* (2), 436–444.
- [105] UniProt. P05413 . FABPH\_HUMAN.  
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P05413/entry#sequences>.
- [106] Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. *Biophys. Rev.* **2016**, *8* (4), 409–427.
- [107] Maguire, C. M.; Rösslein, M.; Wick, P.; Prina-Mello, A. Characterisation of Particles in Solution—a Perspective on Light Scattering and Comparative Technologies. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2018**, *19* (1), 732–745.
- [108] Carvalho, P. M.; Felício, M. R.; Santos, N. C.; Gonçalves, S.; Domingues, M. M. Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. *Front. Chem.* **2018**, *6* (June), 1–17.
- [109] 3P Instruments. Particle size measurement using multiangle dynamic light scattering. <https://www.3p-instruments.com/measurement-methods/dynamic-light-scattering/>.
- [110] Dart, M. L.; Machleidt, T.; Jost, E.; Schwinn, M. K.; Robers, M. B.; Shi, C.; Kirkland, T. A.; Killoran, M. P.; Wilkinson, J. M.; Hartnett, J. R.; Zimmerman, K.; Wood, K. V. Homogeneous Assay for Target Engagement Utilizing Bioluminescent Thermal Shift. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9* (6), 546–551.
- [111] Dziekan, J. M.; Wirjanata, G.; Dai, L.; Go, K. D.; Yu, H.; Lim, Y. T.; Chen, L.; Wang, L. C.; Puspita, B.; Prabhu, N.; Sobota, R. M.; Nordlund, P.; Bozdech, Z. Cellular Thermal Shift Assay for the Identification of Drug–Target Interactions in the Plasmodium Falciparum Proteome. *Nat. Protoc.* **2020**, *15* (6), 1881–1921.
- [112] Reaction Biology. Thermal Shift Assay (TSA). <https://www.reactionbiology.com/services/biophysical-assays/thermal-shift-assay-tsa>.
- [113] Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The Use of Differential Scanning Fluorimetry to Detect Ligand Interactions That Promote Protein Stability. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (9), 2212–2221.
- [114] Huynh, K.; Partch, C. L. Analysis of Protein Stability and Ligand Interactions by Thermal Shift Assay. *Curr. Protoc. protein Sci.* **2015**, *79* (February), 28.9.1–28.9.14.
- [115] Lo, M. C.; Aulabaugh, A.; Jin, G.; Cowling, R.; Bard, J.; Malamas, M.; Ellestad, G. Evaluation of Fluorescence-Based Thermal Shift Assays for Hit Identification in Drug Discovery. *Anal. Biochem.* **2004**, *332* (1), 153–159.
- [116] Du, X.; Li, Y.; Xia, Y. L.; Ai, S. M.; Liang, J.; Sang, P.; Ji, X. L.; Liu, S. Q. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (2), 1–34.
- [117] Khatri, K. S.; Modi, P.; Sharma, S.; Deep, S. Thermodynamics of Protein-Ligand Binding. In *Frontiers in Protein Structure, Function, and Dynamics*; Springer Singapore: Singapore, **2020**; pp 145–185.
- [118] Chaires, J. B.; Hansen, L. D.; Keller, S.; Brautigam, C. A.; Zhao, H.; Schuck, P. Biocalorimetry. *Methods* **2015**, *76*, 1–2.
- [119] Tellinghuisen, J. Analysis of Multitemperature Isothermal Titration Calorimetry Data at Very Low c: Global Beats van’t Hoff. *Anal. Biochem.* **2016**, *513*, 43–46.
- [120] Jarmoskaite, I.; AlSadhan, I.; Vaidyanathan, P. P.; Herschlag, D. How to Measure and Evaluate Binding Affinities. *Elife* **2020**, *9*.
- [121] Falconer, R. J.; Schuur, B.; Mittermaier, A. K. Applications of Isothermal Titration Calorimetry in Pure and Applied Research from 2016 to 2020. *J. Mol. Recognit.* **2021**, *34* (10).
- [122] Velazquez-Campoy, A.; Freire, E. Isothermal Titration Calorimetry to Determine Association Constants for High-Affinity Ligands. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (1), 186–191.

- [123] Krainer, G.; Keller, S. Single-Experiment Displacement Assay for Quantifying High-Affinity Binding by Isothermal Titration Calorimetry. *Methods* **2015**, *76*, 116–123.
- [124] Archer, W. R.; Schulz, M. D. Isothermal Titration Calorimetry: Practical Approaches and Current Applications in Soft Matter. *Soft Matter* **2020**, *16* (38), 8760–8774.
- [125] Srivastava, V. K.; Yadav, R. Isothermal Titration Calorimetry. In *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*; Misra, G., Ed.; Academic Press, **2019**; pp 125–137.
- [126] Freyer, M. W.; Lewis, E. a. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods Cell Biol.* **2008**, *84* (07), 79–113.
- [127] Bronowska, A. K. Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases. In *Thermodynamics – Interaction Studies – Solids, Liquids and Gases*; Moreno-Pirajan, J. C., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, **2011**; pp 1–49.
- [128] Krimmer, S. G.; Klebe, G. Thermodynamics of Protein-Ligand Interactions as a Reference for Computational Analysis: How to Assess Accuracy, Reliability and Relevance of Experimental Data. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2015**, *29* (9), 867–883.
- [129] Ford, D. M. Enthalpy-Entropy Compensation Is Not a General Feature of Weak Association. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 16167–16170.
- [130] Sharp, K. Entropy--Enthalpy Compensation: Fact or Artifact? *Protein Sci.* **2001**, *10* (3), 661–667.
- [131] Whitesides, G. M.; Snyder, P. W.; Moustakas, D. T.; Mirica, K. A. Designing Ligands to Bind Tightly to Proteins. *Phys. Biol. From Atoms to Med.* **2008**, *38* (4), 189–215.
- [132] K., A. Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design. In *Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases*; InTech, **2011**; p 932.
- [133] Barratt, E.; Bingham, R. J.; Warner, D. J.; Laughton, C. A.; Phillips, S. E. V; Homans, S. W. Van Der Waals Interactions Dominate Ligand-Protein Association in a Protein Binding Site Occluded from Solvent Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (33), 11827–11834.
- [134] Emsley, J. Very Strong Hydrogen Bonding. *Chem. Soc. Rev.* **1980**, *9* (1), 91.
- [135] Davis, A. M.; Teague, S. J. Hydrogen Bonding, Hydrophobic Interactions, and Failure of the Rigid Receptor Hypothesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1999**, *38* (6), 736–749.
- [136] Bitencourt-Ferreira, G.; Veit-Acosta, M.; de Azevedo, W. F. Hydrogen Bonds in Protein-Ligand Complexes. In *Docking Screens for Drug Discovery*; **2019**; pp 93–107.
- [137] Barratt, E.; Bronowska, A.; Vondrášek, J.; Černý, J.; Bingham, R.; Phillips, S.; Homans, S. W. Thermodynamic Penalty Arising from Burial of a Ligand Polar Group Within a Hydrophobic Pocket of a Protein Receptor. *J. Mol. Biol.* **2006**, *362* (5), 994–1003.
- [138] Panigrahi, S. K.; Desiraju, G. R. Strong and Weak Hydrogen Bonds in the Protein-Ligand Interface. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2007**, *67* (1), 128–141.
- [139] Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (14), 5061–5084.
- [140] Zhou, P.; Tian, F.; Zou, J.; Shang, Z. Rediscovery of Halogen Bonds in Protein-Ligand Complexes. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2010**, *10* (4), 309–314.
- [141] Iltzsch, M. H.; Uber, S. S.; Tankersley, K. O.; el Kouni, M. H. Structure-Activity Relationship for the Binding of Nucleoside Ligands to Adenosine Kinase from *Toxoplasma Gondii*. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49* (10), 1501–1512.
- [142] Benjahad, A.; Guillemont, J.; Andries, K.; Nguyen, C. H.; Grierson, D. S. 3-Iodo-4-Phenoxy-pyridinones (IOPY's), a New Family of Highly Potent Non-Nucleoside Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (24), 4309–4312.

- [143] Perozzo, R.; Folkers, G.; Scapozza, L. Thermodynamics of Protein–Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects. *J. Recept. Signal Transduct.* **2004**, *24* (1–2), 1–52.
- [144] Hobza, P.; Selzle, H. L.; Schlag, E. W. Potential Energy Surface for the Benzene Dimer. Results of Ab Initio CCSD(T) Calculations Show Two Nearly Isoenergetic Structures: T-Shaped and Parallel-Displaced. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (48), 18790–18794.
- [145] Grover, J. R.; Walters, E. A.; Hui, E. T. Dissociation Energies of the Benzene Dimer and Dimer Cation. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91* (12), 3233–3237.
- [146] Krause, H.; Ernstberger, B.; Neusser, H. J. Binding Energies of Small Benzene Clusters. *Chem. Phys. Lett.* **1991**, *184* (5–6), 411–417.
- [147] Sinnokrot, M. O.; Sherrill, C. D. Substituent Effects in  $\Pi$ – $\pi$  Interactions: Sandwich and T-Shaped Configurations. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (24), 7690–7697.
- [148] Turk, J. A.; Smithrud, D. B. Synthesis and Physical Properties of Protein Core Mimetics. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (25), 8328–8335.
- [149] Tsuzuki, S.; Honda, K.; Uchimaru, T.; Mikami, M.; Tanabe, K. Origin of the Attraction and Directionality of the NH/ $\pi$  Interaction: Comparison with OH/ $\pi$  and CH/ $\pi$  Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (46), 11450–11458.
- [150] Diehl, C.; Engström, O.; Delaine, T.; Håkansson, M.; Genheden, S.; Modig, K.; Leffler, H.; Ryde, U.; Nilsson, U. J.; Akke, M. Protein Flexibility and Conformational Entropy in Ligand Design Targeting the Carbohydrate Recognition Domain of Galectin-3. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (41), 14577–14589.
- [151] Homans, S. W. Probing the Binding Entropy of Ligand-Protein Interactions by NMR. *ChemBioChem* **2005**, *6* (9), 1585–1591.
- [152] MacRaidl, C. A.; Daranas, A. H.; Bronowska, A.; Homans, S. W. Global Changes in Local Protein Dynamics Reduce the Entropic Cost of Carbohydrate Binding in the Arabinose-Binding Protein. *J. Mol. Biol.* **2007**, *368* (3), 822–832.
- [153] Stöckmann, H.; Bronowska, A.; Syme, N. R.; Thompson, G. S.; Kalverda, A. P.; Warriner, S. L.; Homans, S. W. Residual Ligand Entropy in the Binding of p-Substituted Benzenesulfonamide Ligands to Bovine Carbonic Anhydrase II. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (37), 12420–12426.
- [154] Jelesarov, I.; Bosshard, H. R. Isothermal Titration Calorimetry and Differential Scanning Calorimetry as Complementary Tools to Investigate the Energetics of Biomolecular Recognition. *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12* (1), 3–18.
- [155] Fischer, S.; Verma, C. S. Binding of Buried Structural Water Increases the Flexibility of Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (17), 9613–9615.
- [156] Poornima, C. S.; Dean, P. M. Hydration in Drug Design. 2. Influence of Local Site Surface Shape on Water Binding. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1995**, *9* (6), 513–520.
- [157] Langhorst, U.; Loris, R.; Denisov, V. P.; Doumen, J.; Roose, P.; Maes, D.; Halle, B.; Steyaert, J. Dissection of the Structural and Functional Role of a Conserved Hydration Site in RNase T1. *Protein Sci.* **2008**, *8* (4), 722–730.
- [158] Nagendra, H. G.; Sukumar, N.; Vijayan, M. Role of Water in Plasticity, Stability, and Action of Proteins: The Crystal Structures of Lysozyme at Very Low Levels of Hydration. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1998**, *32* (2), 229–240.
- [159] Poornima, C. S.; Dean, P. M. Hydration in Drug Design. 1. Multiple Hydrogen-Bonding Features of Water Molecules in Mediating Protein-Ligand Interactions. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1995**, *9* (6), 500–512.
- [160] Daranas, A. H.; Shimizu, H.; Homans, S. W. Thermodynamics of Binding of D-Galactose and Deoxy Derivatives Thereof to the L-Arabinose-Binding Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (38), 11870–11876.
- [161] Firestone, R. S.; Cameron, S. A.; Karp, J. M.; Arcus, V. L.; Schramm, V. L. Heat



- Capacity Changes for Transition-State Analogue Binding and Catalysis with Human 5'-Methylthioadenosine Phosphorylase. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12* (2), 464–473.
- [162] Johnson, C. M. Isothermal Titration Calorimetry. *Methods Mol. Biol.* **2021**, 2263, 135–159.
- [163] Jung, H.-I.; Bowden, S. J.; Cooper, A.; Perham, R. N. Thermodynamic Analysis of the Binding of Component Enzymes in the Assembly of the Pyruvate Dehydrogenase Multienzyme Complex of *Bacillus Stearothermophilus*. *Protein Sci.* **2002**, *11* (5), 1091–1100.
- [164] Brandts, J. F.; Lin, L. N. Study of Strong to Ultratight Protein Interactions Using Differential Scanning Calorimetry. *Biochemistry* **1990**, *29* (29), 6927–6940.
- [165] Blandamer, M. J.; Cullis, P. M.; Engberts, J. B. F. N. Titration Microcalorimetry. *J. Chem. Soc. - Faraday Trans.* **1998**, *94* (16), 2261–2267.
- [166] Velazquez-Campoy, A.; Markova, N. Isothermal Titration Calorimetry: Theory and Practice. *Malvern Panalytical Knowl. Cent.* **2015**, No. 3, 1–19.
- [167] Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. Two-dimensional Spectroscopy. Application to Nuclear Magnetic Resonance. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64* (5), 2229–2246.
- [168] Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. Investigation of Exchange Processes by Two-dimensional NMR Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71* (11), 4546–4553.
- [169] Jeener, J.; Alewaeters, G. “Pulse Pair Technique in High Resolution NMR” a Reprint of the Historical 1971 Lecture Notes on Two-Dimensional Spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2016**, *94–95*, 75–80.
- [170] Wüthrich, K. NMR Studies of Structure and Function of Biological Macromolecules (Nobel Lecture). *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (29), 3340–3363.
- [171] Banci, L.; Barbieri, L.; Calderone, V.; Cantini, F.; Cerofolini, L.; Ciofi-Baffoni, S.; Felli, I. C.; Fragai, M.; Lelli, M.; Luchinat, C.; Luchinat, E.; Parigi, G.; Piccioli, M.; Pierattelli, R.; Ravera, E.; Rosato, A.; Tenori, L.; Turano, P. Biomolecular NMR at 1.2 GHz. *arXiv Prepr. arXiv1910.07462* **2019**.
- [172] Tzeng, S.-R.; Kalodimos, C. G. Dynamic Activation of an Allosteric Regulatory Protein. *Nature* **2009**, *462* (7271), 368–372.
- [173] Bashir, Q.; Volkov, A. N.; Ullmann, G. M.; Ubbink, M. Visualization of the Encounter Ensemble of the Transient Electron Transfer Complex of Cytochrome c and Cytochrome c Peroxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (1), 241–247.
- [174] Labeikovskiy, W.; Eisenmesser, E. Z.; Bosco, D. A.; Kern, D. Structure and Dynamics of Pin1 During Catalysis by NMR. *J. Mol. Biol.* **2007**, *367* (5), 1370–1381.
- [175] Hu, F.; Luo, W.; Hong, M. Mechanisms of Proton Conduction and Gating in Influenza M2 Proton Channels from Solid-State NMR. *Science* (80-. ). **2010**, *330* (6003), 505–508.
- [176] Inomata, K.; Ohno, A.; Tochio, H.; Isogai, S.; Tenno, T.; Nakase, I.; Takeuchi, T.; Futaki, S.; Ito, Y.; Hiroaki, H.; Shirakawa, M. High-Resolution Multi-Dimensional NMR Spectroscopy of Proteins in Human Cells. *Nature* **2009**, *458* (7234), 106–109.
- [177] Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley, **1990**.
- [178] Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K. A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Enhancement (2D NOE) Experiment for the Elucidation of Complete Proton-Proton Cross-Relaxation Networks in Biological Macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95* (1), 1–6.
- [179] Bax, A.; Ikura, M.; Kay, L. E.; Barbato, G.; Spera, S. Multidimensional Triple Resonance NMR Spectroscopy of Isotopically Uniformly Enriched Proteins: A Powerful New Strategy for Structure Determination. In *Ciba Foundation Symposium 161 - Protein Conformation*; Chadwick, D. J., Widdows, K., Eds.; **2007**; pp 108–135.
- [180] Mal, T. K.; Matthews, S. J.; Kovacs, H.; Campbell, I. D.; Boyd, J. Some NMR Experiments and a Structure Determination Employing a [15N,2H] Enriched Protein. *J.*

- Biomol. NMR* **1998**, *12* (2), 259–276.
- [181] Ruschak, A. M.; Kay, L. E. Methyl Groups as Probes of Supra-Molecular Structure, Dynamics and Function. *J. Biomol. NMR* **2010**, *46* (1), 75–87.
- [182] Tugarinov, V.; Hwang, P. M.; Ollerenshaw, J. E.; Kay, L. E. Cross-Correlated Relaxation Enhanced <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C NMR Spectroscopy of Methyl Groups in Very High Molecular Weight Proteins and Protein Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (34), 10420–10428.
- [183] Pai, M. T.; Tzeng, S. R.; Kalodimos, C. G. NMR Studies of Large Protein Systems. *Adv. Biomed. Spectrosc.* **2011**, *3* (5), 61–76.
- [184] Religa, T. L.; Ruschak, A. M.; Rosenzweig, R.; Kay, L. E. Site-Directed Methyl Group Labeling as an NMR Probe of Structure and Dynamics in Supramolecular Protein Systems: Applications to the Proteasome and to the ClpP Protease. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (23), 9063–9068.
- [185] Lecoq, L.; Fogeron, M.-L.; Meier, B. H.; Nassal, M.; Böckmann, A. Solid-State NMR for Studying the Structure and Dynamics of Viral Assemblies. *Viruses* **2020**, *12* (10), 1069.
- [186] Loquet, A.; El Mammeri, N.; Stanek, J.; Berbon, M.; Bardiaux, B.; Pintacuda, G.; Habenstein, B. 3D Structure Determination of Amyloid Fibrils Using Solid-State NMR Spectroscopy. *Methods* **2018**, *138–139*, 26–38.
- [187] Rademacher, M.; Zimmerman, A. W.; Rüterjans, H.; Veerkamp, J. H.; Lücke, C. Solution Structure of Fatty Acid-Binding Protein from Human Brain. *Mol. Cell. Biochem.* **2002**, *239* (1–2), 61–68.
- [188] Gupta, S.; Bhattacharjya, S. NMR Characterization of the Near Native and Unfolded States of the PTB Domain of Dok1: Alternate Conformations and Residual Clusters. *PLoS One* **2014**, *9* (2), e90557.
- [189] Xu, S.; Ni, S.; Kennedy, M. A. NMR Analysis of Amide Hydrogen Exchange Rates in a Pentapeptide-Repeat Protein from *A. Thaliana*. *Biophys. J.* **2017**, *112* (10), 2075–2088.
- [190] Koskela, H.; Heikkinen, O.; Kilpeläinen, I.; Heikkinen, S. Rapid and Accurate Processing Method for Amide Proton Exchange Rate Measurement in Proteins. *J. Biomol. NMR* **2007**, *37* (4), 313–320.
- [191] Dass, R.; Corliano, E.; Mulder, F. A. A. Measurement of Very Fast Exchange Rates of Individual Amide Protons in Proteins by NMR Spectroscopy. *ChemPhysChem* **2019**, *20* (2), 231–235.
- [192] Cruz-Gallardo, I.; Aroca, Á.; Persson, C.; Karlsson, B. G.; Díaz-Moreno, I. RNA Binding of T-Cell Intracellular Antigen-1 (TIA-1) C-Terminal RNA Recognition Motif Is Modified by pH Conditions. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (36), 25986–25994.
- [193] Eriksson, M. A.; Härd, T.; Nilsson, L. On the pH Dependence of Amide Proton Exchange Rates in Proteins. *Biophys. J.* **1995**, *69* (2), 329–339.
- [194] Koide, S.; Jahnke, W.; Wright, P. E. Measurement of Intrinsic Exchange Rates of Amide Protons in a <sup>15</sup>N-Labeled Peptide. *J. Biomol. NMR* **1995**, *6* (3), 306–312.
- [195] Liu, H.; Farr-Jones, S.; Ulyanov, N. B.; Llinas, M.; Marqusee, S.; Groth, D.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; James, T. L. Solution Structure of Syrian Hamster Prion Protein RPrP(90-231). *Biochemistry* **1999**, *38* (17), 5362–5377.
- [196] Zuiderweg, E. R. P. Mapping Protein–Protein Interactions in Solution by NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **2002**, *41* (1), 1–7.
- [197] Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W. Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science* (80- ). **1996**, *274* (5292), 1531–1534.
- [198] Williamson, M. P. Using Chemical Shift Perturbation to Characterise Ligand Binding. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *73*, 1–16.
- [199] 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.
- [200] BMRB. Statistics Calculated for All Chemical Shifts from Atoms in the 20 Common Amino Acids. [https://bmr.io/ref\\_info/csstats.php?set=full&restyle=aa&output=html](https://bmr.io/ref_info/csstats.php?set=full&restyle=aa&output=html).
- [201] Ulrich, E. L.; Akutsu, H.; Doreleijers, J. F.; Harano, Y.; Ioannidis, Y. E.; Lin, J.; Livny, M.; Mading, S.; Maziuk, D.; Miller, Z.; Nakatani, E.; Schulte, C. F.; Tolmie, D. E.; Kent Wenger, R.; Yao, H.; Markley, J. L. BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *36* (Database), D402–D408.
- [202] Hignman, V. A. Protein NMR: A Practical Guide. <https://www.protein-nmr.org.uk/solution-nmr/spectrum-descriptions/>.
- [203] Schanda, P. Development and Application of Fast NMR Methods for the Study of Protein Structure and Dynamics, Université Joseph-Fourier- Grenoble I, **2007**.
- [204] Kim, Y. E.; Hipp, M. S.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M.; Ulrich Hartl, F. Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82* (1), 323–355.
- [205] Muntau, A. C.; Leandro, J.; Staudigl, M.; Mayer, F.; Gersting, S. W. Innovative Strategies to Treat Protein Misfolding in Inborn Errors of Metabolism: Pharmacological Chaperones and Proteostasis Regulators. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2014**, *37* (4), 505–523.
- [206] Jahn, T. R.; Radford, S. E. The Yin and Yang of Protein Folding. *FEBS J.* **2005**, *272* (23), 5962–5970.
- [207] Jaskolski, M.; Dauter, Z.; Wlodawer, A. A Brief History of Macromolecular Crystallography, Illustrated by a Family Tree and Its Nobel Fruits. *FEBS J.* **2014**, *281* (18), 3985–4009.
- [208] Bai, X.; McMullan, G.; Scheres, S. H. . How Cryo-EM Is Revolutionizing Structural Biology. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40* (1), 49–57.
- [209] Thompson, M. C.; Yeates, T. O.; Rodriguez, J. A. Advances in Methods for Atomic Resolution Macromolecular Structure Determination. *F1000Research* **2020**, *9*, 667.
- [210] Wüthrich, K. The Way to NMR Structures of Proteins. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8* (11), 923–925.
- [211] Mitchell, A. L.; Almeida, A.; Beracochea, M.; Boland, M.; Burgin, J.; Cochrane, G.; Crusoe, M. R.; Kale, V.; Potter, S. C.; Richardson, L. J.; Sakharova, E.; Scheremetjew, M.; Korobeynikov, A.; Shlemov, A.; Kunyavskaya, O.; Lapidus, A.; Finn, R. D. MGnify: The Microbiome Analysis Resource in 2020. *Nucleic Acids Res.* **2019**.
- [212] Steinegger, M.; Mirdita, M.; Söding, J. Protein-Level Assembly Increases Protein Sequence Recovery from Metagenomic Samples Manyfold. *Nat. Methods* **2019**, *16* (7), 603–606.
- [213] Dill, K. A.; Ozkan, S. B.; Shell, M. S.; Weikl, T. R. The Protein Folding Problem. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37* (1), 289–316.
- [214] Moore, P. B.; Hendrickson, W. A.; Henderson, R.; Brunger, A. T. The Protein-Folding Problem: Not yet Solved. *Science* (80-. ). **2022**, *375* (6580), 507–507.
- [215] Pearce, R.; Zhang, Y. Deep Learning Techniques Have Significantly Impacted Protein Structure Prediction and Protein Design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2021**, *68*, 194–207.
- [216] Abriata, L. A.; Tamò, G. E.; Dal Peraro, M. A Further Leap of Improvement in Tertiary Structure Prediction in CASP13 Prompts New Routes for Future Assessments. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2019**, *87* (12), 1100–1112.
- [217] Zheng, W.; Li, Y.; Zhang, C.; Pearce, R.; Mortuza, S. M.; Zhang, Y. Deep-learning Contact-map Guided Protein Structure Prediction in CASP13. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2019**, *87* (12), 1149–1164.
- [218] Wang, S.; Sun, S.; Li, Z.; Zhang, R.; Xu, J. Accurate De Novo Prediction of Protein Contact Map by Ultra-Deep Learning Model. *PLOS Comput. Biol.* **2017**, *13* (1), e1005324.

- [219] Senior, A. W.; Evans, R.; Jumper, J.; Kirkpatrick, J.; Sifre, L.; Green, T.; Qin, C.; Židek, A.; Nelson, A. W. R.; Bridgland, A.; Penedones, H.; Petersen, S.; Simonyan, K.; Crossan, S.; Kohli, P.; Jones, D. T.; Silver, D.; Kavukcuoglu, K.; Hassabis, D. Improved Protein Structure Prediction Using Potentials from Deep Learning. *Nature* **2020**, *577* (7792), 706–710.
- [220] 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.
- [221] 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.
- [222] Mariani, V.; Biasini, M.; Barbato, A.; Schwede, T. LDDT: A Local Superposition-Free Score for Comparing Protein Structures and Models Using Distance Difference Tests. *Bioinformatics* **2013**, *29* (21), 2722–2728.
- [223] Henzler-Wildman, K.; Kern, D. Dynamic Personalities of Proteins. *Nature* **2007**, *450* (7172), 964–972.
- [224] Singh, D. B. *Frontiers in Protein Structure, Function, and Dynamics*, third.; Singh, D. B., Tripathi, T., Eds.; Springer, **2020**.
- [225] Wei, G.; Xi, W.; Nussinov, R.; Ma, B. Protein Ensembles: How Does Nature Harness Thermodynamic Fluctuations for Life? The Diverse Functional Roles of Conformational Ensembles in the Cell. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (11), 6516–6551.
- [226] Ansari, A.; Berendzen, J.; Bowne, S. F.; Frauenfelder, H.; Iben, I. E.; Sauke, T. B.; Shyamsunder, E.; Young, R. D. Protein States and Proteinquakes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82* (15), 5000–5004.
- [227] Zwier, M. C.; Chong, L. T. Reaching Biological Timescales with All-Atom Molecular Dynamics Simulations. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10* (6), 745–752.
- [228] Gelpi, J.; Hospital, A.; Goñi, R.; Orozco, M. Molecular Dynamics Simulations: Advances and Applications. *Adv. Appl. Bioinforma. Chem.* **2015**, No. December, 37.
- [229] Dror, R. O.; Jensen, M. Ø.; Borhani, D. W.; Shaw, D. E. Exploring Atomic Resolution Physiology on a Femtosecond to Millisecond Timescale Using Molecular Dynamics Simulations. *J. Gen. Physiol.* **2010**, *135* (6), 555–562.
- [230] Hollingsworth, S. A.; Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* **2018**, *99* (6), 1129–1143.
- [231] Lee, E. H.; Hsin, J.; Sotomayor, M.; Comellas, G.; Schulten, K. Discovery Through the Computational Microscope. *Structure* **2009**, *17* (10), 1295–1306.
- [232] Ingólfsson, H. I.; Arnarez, C.; Periole, X.; Marrink, S. J. Computational ‘Microscopy’ of Cellular Membranes. *J. Cell Sci.* **2016**.
- [233] Kalita, J.; Shukla, R.; Tripathi, T. Structural Basis of Urea-induced Unfolding of *Fasciola Gigantica* Glutathione S-transferase. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234* (4), 4491–4503.
- [234] Kalita, P.; Shukla, H.; Das, K. C.; Tripathi, T. Conserved Arg451 Residue Is Critical for Maintaining the Stability and Activity of Thioredoxin Glutathione Reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *674*, 108098.

- [235] Paquet, E.; Viktor, H. L. Molecular Dynamics, Monte Carlo Simulations, and Langevin Dynamics: A Computational Review. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–18.
- [236] Sonkar, A.; Shukla, H.; Shukla, R.; Kalita, J.; Tripathi, T. Unfolding of *Acinetobacter Baumannii* MurA Proceeds through a Metastable Intermediate: A Combined Spectroscopic and Computational Investigation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *126*, 941–951.
- [237] Singh, S.; Singh, V. K. Molecular Dynamics Simulation: Methods and Application. In *Frontiers in Protein Structure, Function, and Dynamics*; Singh, D., Tripathi, T., Eds.; Springer Singapore: Singapore, **2020**; pp 213–238.
- [238] Guvench, O.; MacKerell, A. D. Comparison of Protein Force Fields for Molecular Dynamics Simulations. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *443*, 63–88.
- [239] Bauer, P.; Hess, B.; Lindhal, E. GROMACS 2022.3 Manual. *Zendo* **2022**.
- [240] *2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases*; Schofield, C., Hausinger, R., Eds.; Metallobiology; Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2015**.
- [241] Martinez, S.; Hausinger, R. P. Catalytic Mechanisms of Fe(II)- and 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (34), 20702–20711.
- [242] Esposito, C.; Wiedmer, L.; Cafilisch, A. In Silico Identification of JMJD3 Demethylase Inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* **2018**, *58* (10), 2151–2163.
- [243] Bredenberg, J.; Nilsson, L. Modeling Zinc Sulfhydryl Bonds in Zinc Fingers. *Int. J. Quantum Chem.* **2001**, *83* (3–4), 230–244.
- [244] Peters, M. B.; Yang, Y.; Wang, B.; Füsti-Molnár, L.; Weaver, M. N.; Merz, K. M. Structural Survey of Zinc-Containing Proteins and Development of the Zinc AMBER Force Field (ZAFF). *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6* (9), 2935–2947.
- [245] Kazaks, A.; Makrecka-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.
- [246] Leibly, D. J.; Nguyen, T. N.; Kao, L. T.; Hewitt, S. N.; Barrett, L. K.; van Voorhis, W. C. Stabilizing Additives Added during Cell Lysis Aid in the Solubilization of Recombinant Proteins. *PLoS One* **2012**, *7* (12).
- [247] Maity, S.; Gundampati, R. K.; Suresh Kumar, T. K. NMR Methods to Characterize Protein-Ligand Interactions. *Nat. Prod. Commun.* **2019**, *14* (5), 1934578X1984929.
- [248] Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial. AlphaFold structure prediction. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9NVH6>.
- [249] Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Xiang, Z.; Honig, B. On the Role of the Crystal Environment in Determining Protein Side-Chain Conformations. *J. Mol. Biol.* **2002**, *320* (3), 597–608.
- [250] Jacobson, M. P.; Pincus, D. L.; Rapp, C. S.; Day, T. J. F.; Honig, B.; Shaw, D. E.; Friesner, R. A. A Hierarchical Approach to All-Atom Protein Loop Prediction. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2004**, *55* (2), 351–367.
- [251] Schrödinger Release 2022-1: Prime, Schrödinger, **2021**.
- [252] Prime, Version 4.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2015**.
- [253] Zelencova-Gopejenko, D.; Grandane, A.; Loza, E.; Lola, D.; Sipola, A.; Liepinsh, E.; Arsenyan, P.; Jaudzems, K. Binding versus Enzymatic Processing of  $\epsilon$ -Trimethyllysine Dioxygenase Substrate Analogues. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13* (11), 1723–1729.
- [254] Rydzik, A. M.; Brem, J.; Struwe, W. B.; Kochan, G. T.; Benesch, J. L. P.; Schofield, C. J. Ejection of Structural Zinc Leads to Inhibition of  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (21), 4954–4957.
- [255] 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  $\gamma$ -Butyrobetaine Hydroxylase. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (6), 2213–2236.
- [256] Schrödinger Release 2022-1: Induced Fit Docking Protocol; Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Prime, Schrödinger, **2021**.
- [257] 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.
- [258] Rydzik, A. M.; Leung, I. K. H.; Thalhammer, A.; Kochan, G. T.; Claridge, T. D. W.; Schofield, C. J. Fluoromethylated Derivatives of Carnitine Biosynthesis Intermediates – Synthesis and Applications. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (10), 1175–1177.
- [259] Vijayendar Reddy, Y.; Al Temimi, A. H. K.; Mecinović, J. Fluorinated Trimethyllysine as a 19 F NMR Probe for Trimethyllysine Hydroxylase Catalysis. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (6), 1350–1354.
- [260] 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.
- [261] Freire, E.; Kawasaki, Y.; Velazquez-Campoy, A.; Schon, A. Characterisation of Ligand Binding by Calorimetry. In *Biophysical Approaches Determining ligand Binding to Biomolecular Targets: Detection, Measurement and Modelling*; Podjarny, A., Dejaegere, A., Kieffer, B., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, **2011**; pp 275–299.
- [262] 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.
- [263] Nakagawa, H.; Oyama, T. Molecular Basis of Water Activity in Glycerol–Water Mixtures. *Front. Chem.* **2019**, *7* (November), 1–9.
- [264] Fisher, T. R.; Zhou, G.; Huang, L.; Shi, Y. How Does Hydrogen Bond Network Analysis Reveal the Golden Ratio of Water–Glycerol Mixtures? *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22* (5), 2887–2907.
- [265] Singh, S. K.; Kishore, N. Thermodynamic Insights into the Binding of Triton X-100 to Globular Proteins: A Calorimetric and Spectroscopic Investigation. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (19), 9728–9737.
- [266] 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.
- [267] Yalkowsky, S. H.; Zograf, G. Some Micellar Properties of Long-Chain Acylcarnitines. *J. Colloid Interface Sci.* **1970**, *34* (4), 525–533.
- [268] Schrödinger Release 2022-1: Maestro, Schrödinger, **2021**.
- [269] Bond, P. JTSA. <http://paulsbond.co.uk/jtsa>.
- [270] Schulz, M. N.; Landström, J.; Hubbard, R. E. MTSA—A Matlab Program to Fit Thermal Shift Data. *Anal. Biochem.* **2013**, *433* (1), 43–47.
- [271] Lücke, C.; Lassen, D.; Kreienkamp, H. -J.; Spener, F.; Rüterjans, H. Sequence-specific 1H-NMR Assignment and Determination of the Secondary Structure of Bovine Heart Fatty-acid-binding Protein. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210* (3), 901–910.
- [272] Madhavi Sastry, G.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W. Protein and Ligand Preparation: Parameters, Protocols, and Influence on Virtual Screening Enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2013**, *27* (3), 221–234.
- [273] Schrödinger Release 2022-1: Protein Preparation Wizard, Schrödinger, **2021**.
- [274] Schrödinger Release 2022-1: MacroModel, Schrödinger, **2021**.
- [275] Schrödinger Release 2022-1: Glide, Schrödinger, **2021**.
- [276] Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin,

- P. S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1739–1749.
- [277] Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1750–1759.
- [278] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian 09, Revision D.01. *Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT 06492, USA, 2013*.
- [279] Schrödinger Release 2021-4: Phase, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020., **2020**.
- [280] Dixon, S. L.; Smondyrev, A. M.; Knoll, E. H.; Rao, S. N.; Shaw, D. E.; Friesner, R. A. PHASE: A New Engine for Pharmacophore Perception, 3D QSAR Model Development, and 3D Database Screening: 1. Methodology and Preliminary Results. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2006**, *20* (10–11), 647–671.
- [281] Dixon, S. L.; Smondyrev, A. M.; Rao, S. N. PHASE: A Novel Approach to Pharmacophore Modeling and 3D Database Searching. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67* (5), 370–372.
- [282] Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29* (11), 1859–1865.
- [283] Jo, S.; Cheng, X.; Islam, S. M.; Huang, L.; Rui, H.; Zhu, A.; Lee, H. S.; Qi, Y.; Han, W.; Vanommeslaeghe, K.; MacKerell, A. D.; Roux, B.; Im, W. CHARMM-GUI PDB Manipulator for Advanced Modeling and Simulations of Proteins Containing Nonstandard Residues. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; **2014**; pp 235–265.
- [284] Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell, A. D. CHARMM General Force Field: A Force Field for Drug-like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Fields. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (4), 671–690.
- [285] Yu, W.; He, X.; Vanommeslaeghe, K.; MacKerell, A. D. Extension of the CHARMM General Force Field to Sulfonyl-Containing Compounds and Its Utility in Biomolecular Simulations. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33* (31), 2451–2468.
- [286] Best, R. B.; Zhu, X.; Shim, J.; Lopes, P. E. M.; Mittal, J.; Feig, M.; MacKerell, A. D. Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone  $\phi$ ,  $\psi$  and Side-Chain  $\chi$  1 and  $\chi$  2 Dihedral Angles. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8* (9), 3257–3273.
- [287] Abraham, M. J.; van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Team, G. development. *GROMACS User Manual v. 5.1*; Uppsala, Swdan, **2015**.
- [288] Pronk, S.; Páll, S.; Schulz, R.; Larsson, P.; Bjelkmar, P.; Apostolov, R.; Shirts, M. R.; Smith, J. C.; Kasson, P. M.; van der Spoel, D.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS 4.5: A High-Throughput and Highly Parallel Open Source Molecular Simulation Toolkit.

- Bioinformatics* **2013**, *29* (7), 845–854.
- [289] Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. Gromacs: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1–2*, 19–25.
- [290] Markley, J. L.; Bax, A.; Arata, Y.; Hilbers, C. W.; Kaptein, R.; Sykes, B. D.; Wright, P. E.; Wüthrich, K. Recommendations for the Presentation of NMR Structures of Proteins and Nucleic Acids. *J. Mol. Biol.* **1998**, *280* (5), 933–952.
- [291] Ralston, A. W.; Hoerr, C. W. The Solubilities of the Normal Saturated Fatty Acids. *J. Org. Chem.* **1942**, *07* (6), 546–555.
- [292] Vorum, H.; Brodersen, R.; Kragh-Hansen, U.; Pedersen, A. O. Solubility of Long-Chain Fatty Acids in Phosphate Buffer at PH 7.4. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **1992**, *1126* (2), 135–142.
- [293] Stanley, F. E.; Warner, A. M.; Schneiderman, E.; Stalcup, A. M. Rapid Determination of Surfactant Critical Micelle Concentrations Using Pressure-Driven Flow with Capillary Electrophoresis Instrumentation. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (47), 8431–8434.
- [294] Ho, J. K.; Duclos, R. I.; Hamilton, J. A. Interactions of Acyl Carnitines with Model Membranes. *J. Lipid Res.* **2002**, *43* (9), 1429–1439.
- [295] 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.



## PATEICĪBAS

Šī darba izstrādāšana nebūtu iespējama bez daudz cilvēku līdzdalības. Paldies šiem cilvēkiem par viņu nesavtīgo darbu, sadarbību un dalīšanos ar zināšanām!

Pirmkārt, visdziļākā pateicība manam pirmajam zinātniskajam vadītājam *Dr. habil. chem.* Edvardam Liepiņam, kas iepazīstināja mani ar zinātnes pasauli, iedvesmoja un atbalstīja vispirms bakalaura un maģistra studijās, bet pēc tam – arī doktorantūras sākumā. Ļoti skumji, ka profesors Edvards Liepiņš pārāgri aizgāja no dzīves, taču viņš nekad netiks aizmirsts, un atmiņas par viņu paliks autores sirdī uz visiem laikiem.

Otrkārt, paldies darba zinātniskajam vadītājam *prof. Dr. chem.* Kristapam Jaudzemam, par vērtīgām idejām un diskusijām darba izstrādes gaitā!

Īpašs paldies maniem kolēģiem Latvijas Organiskās sintēzes institūtā *Dr. chem.* Pāvelam Arsenjanam, *prof. Dr. pharm.* Maijai Dambrovai un *Dr. pharm.* Edgaram Liepiņam par nodērtīgām diskusijām, ieteikumiem un ieguldījumu kopīgo publikāciju tapšanā!

Liels paldies cilvēkiem, kas palīdzējuši sasniegt darba rezultātus: *Dr. chem.* Aigai Grandānai un *Dr. chem.* Eināram Ložam par savienojumu sintēzi, Melitai Vidējai un *Ph. D.* Kārlim Vilkam par bioloģiskās aktivitātes un šūnu testiem!

Sirsnīgi pateicos Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra darbiniekiem – *Dr. biol.* Andrim Kazākam un *prof. Dr. biol.* Kasparam Tāram – par iegūtiem ģenētiskiem un bioloģiskiem materiāliem, palīdzību darbā ar BBOX mutantiem un vērtīgiem padomiem un diskusijām, kas izglītoja mani molekulārās bioloģijas jomā!

Paldies *prof. Ph. D. Amedeo Caflisch* un *Ph. D. Carmen Esposito*, kas iepazīstināja mani ar jaunākajām skaitļošanas metodēm manas vizītes laikā Cīrihes Universitātē “*InnovaBalt*” projektā!

Īpašs paldies maniem kolēģiem no Fizikāli Organiskās ķīmijas laboratorijas KMR grupas par vērtīgiem ierosinājumiem un daudzām stimulējošām diskusijām!

Paldies arī Rīgas Tehniskajai universitātei, kas ir mana *Alma Mater*!

Sirsnīgs paldies ģimenei un īpašs paldies Aleksejam par bezgalīgo pacietību un atbalstu visā doktorantūras studiju laikā!

Visbeidzot, paldies valsts pētījumu programmas “Biomedicīna sabiedrības veselībai” projektam Nr. 2 “Diabēta un kardiovaskulāro komplikāciju molekulārie mehānismi, farmakoģenētika un jauni ārstniecības līdzekļi”, Eiropas Savienības 7. ietvara programmas zinātnes un tehnoloģiju attīstības projektam “*InnovaBalt*” un Latvijas Organiskās sintēzes institūtam (studentu granti nr. IG-2020-02, IG-2021-02, IG-2022-04 un IG-2023-04) par finansiālo atbalstu doktorantūras studiju laikā!

# PIELIKUMI

**Aminoskābju saīsinājumi**

A	Ala	alanīns	$\text{CH}_3-$
C	Cys	cisteīns	$\text{HSCH}_2-$
D	Asp	asparagīnskābe	$\text{HOOCCH}_2-$
E	Glu	glutamīnskābe	$\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2-$
F	Phe	fenilalanīns	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-$
G	Gly	glicīns	$\text{H}-$
H	His	histidīns	$\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2\text{CH}_2-$ (satur imidazola grupu)
I	Ile	izoleicīns	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$
K	Lys	lizīns	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$
L	Leu	leicīns	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2-$
M	Met	metionīns	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2-$
N	Asn	asparagīns	$\text{H}_2\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2-$
P	Pro	prolīns	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (ciklisks amīns)
Q	Gln	glutamīns	$\text{H}_2\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$
R	Arg	arginīns	$\text{H}_2\text{N}(\text{NH})\text{C}-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$
S	Ser	serīns	$\text{HOCH}_2-$
T	Thr	treonīns	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})-$
V	Val	valīns	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$
W	Trp	triptofāns	$\text{C}_8\text{H}_6\text{NCH}_2-$ (satur indola grupu)
Y	Tyr	tirozīns	$\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2-$

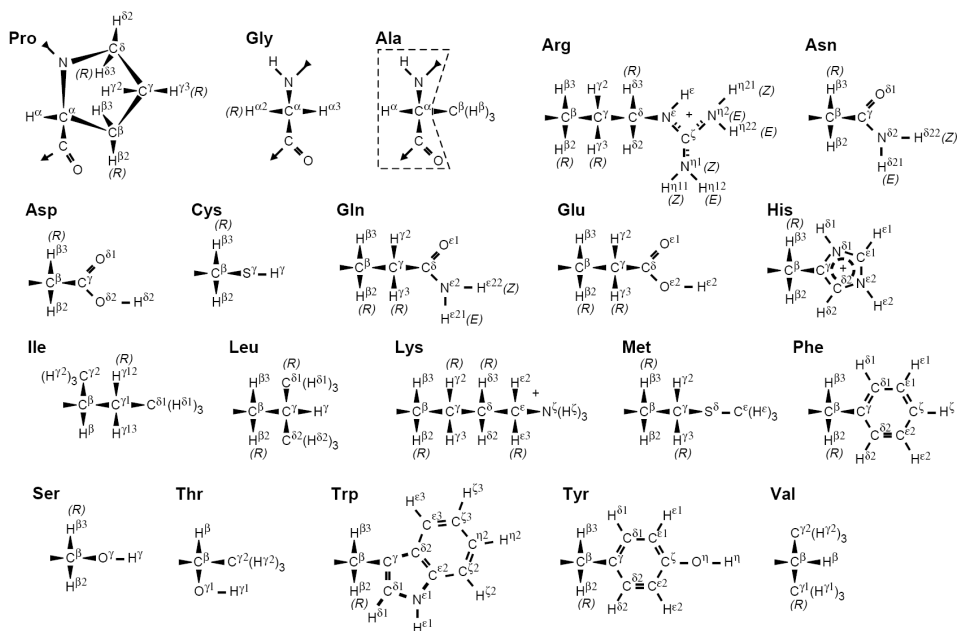
## Taukskābju (TS) un to sāļu nosaukumi

TS nosaukums (IUPAC)	TS nosaukums (triviālais)	TS nosaukums sāls vai estera formai	Oglekļu skaits:nepiesātināto saišu skaits un pozīcija
Piesātinātās TS			
<i>n</i> -heksānskābe	kapronskābe	kaproāts	C6:0
<i>n</i> -oktānskābe	kaprīliskābe	kaprilāts	C8:0
<i>n</i> -dekānskābe	kaprīnskābe	kaprināts	C10:0
<i>n</i> -dodekānskābe	laurīnskābe	laurināts	C12:0
<i>n</i> -tetradekānskābe	miristīnskābe	miristāts	C14:0
<i>n</i> -heksadekānskābe	palmitīnskābe	palmitāts	C16:0
<i>n</i> -oktadekānskābe	stearīnskābe	stearāts	C18:0
eikozānskābe	arahīnskābe	arahāts	C20:0
dokozānskābe	behenskābe	behenāts	C22:0
tetrakozānskābe	lignocerīnskābe	linocerāts	C24:0
Mononepiesātinātās TS			
<i>cis</i> -9-oktadecēnskābe	oleīnskābe	oleāts	C18:1 <i>cis</i> - $\Delta^9$
<i>trans</i> -9-oktadecēnskābe	elaidīnskābe	elaidāts	C18:1 <i>trans</i> - $\Delta^9$
Polinepiesātinātās TS			
<i>cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14-eikozāntetraēnskābe	arahidonskābe (ARA)	arahidonāts	20:4 <i>cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14}$
<i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14,14-eikozānpentaēnskābe	eikosapenskābe (EPA)	eikosapenāts	20:5 <i>cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14,17}$
<i>cis,cis,cis,cis,cis,cis</i> -4,7,10,13,16,19-dokozānheksaēnskābe	cervonskābe (DHA)	cervonāts	22:6 <i>cis</i> - $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$

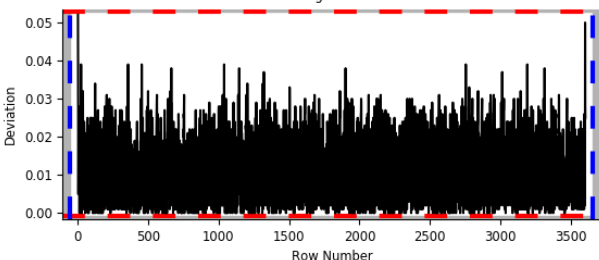
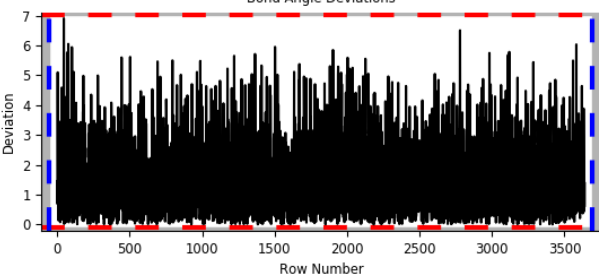
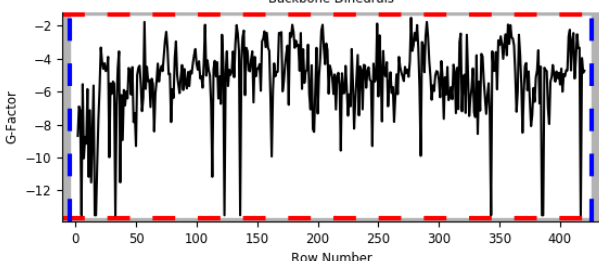
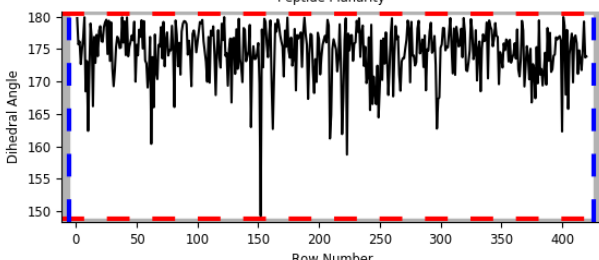
## Biežāk izmantotie 2D KMR spektri

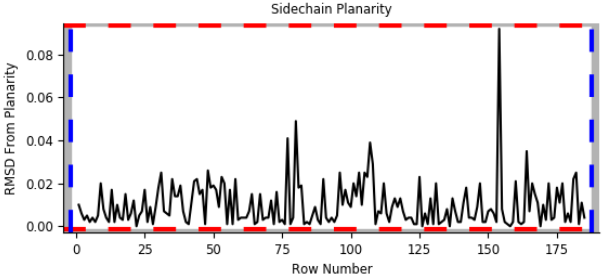
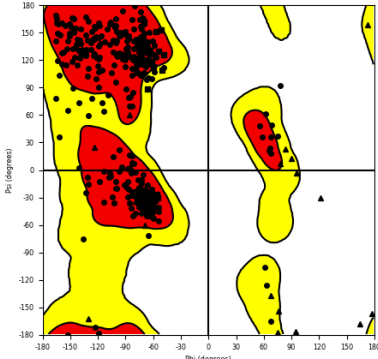




























































Dimensijas	Saīsinājums	Nosaukums	Spinu korelācija
2D	COSY	<i><b>C</b>ORrelation Spectroscop<b>Y</b></i>	caur vienu spinu sadarbības konstanti
2D	TOCSY	<i><b>T</b>OTAL Corelation Spectroscop<b>Y</b></i>	vienā spinu sistēmā caur 1–5 saitēm
2D	NOESY	<i>Nuclear <b>O</b>verhauser Effect Spectroscop<b>Y</b></i>	caur telpu, attālumā līdz 5–7 Å
2D	ROESY	<i>Rotating-frame <b>O</b>verhauser Effect Spectroscop<b>Y</b></i>	caur telpu, attālumā līdz 5–7 Å
2D	HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>	caur vienu $^1\text{H-X}$ spinu sadarbības konstanti
2D	HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>	caur vienu $^1\text{H-X}$ spinu sadarbības konstanti
2D	HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>	caur $^1\text{H-X}$ spinu sadarbības konstanti caur 2–3 saitēm $^{2,3}J_{\text{X,H}}$

## Rekomendējamie aminoskābju atlikumu atomu nosaukumi [290]

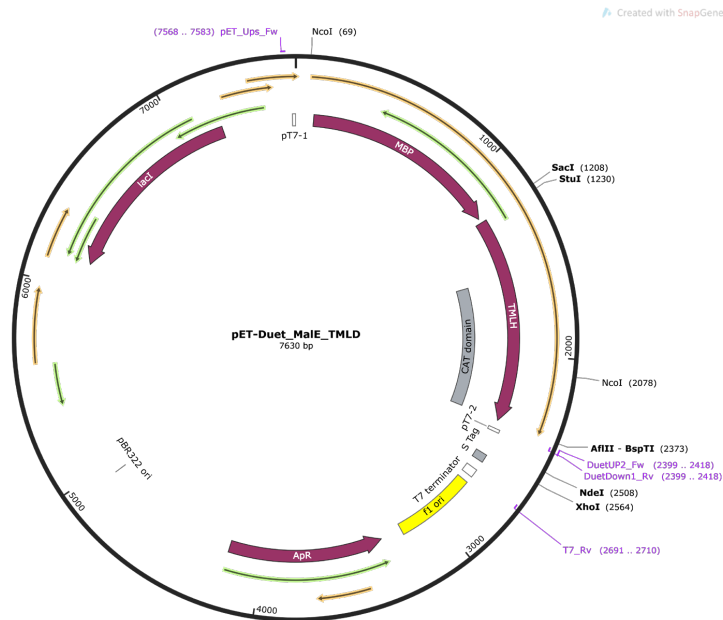


TMLD *AlphaFold* modeļa kvalitātes rādītāji

Kvalitātes rādītājs	Kvalitātes rādītāja grafiskais atspoguļojums
Saišu garumu novirzes	<p style="text-align: center;">Bond Length Deviations</p> 
Saišu leņķu novirzes	<p style="text-align: center;">Bond Angle Deviations</p> 
Pamatvirknes divplakņu kakta leņķu novirzes	<p style="text-align: center;">Backbone Dihedrals</p> 
Peptīdu planaritāte	<p style="text-align: center;">Peptide Planarity</p> 

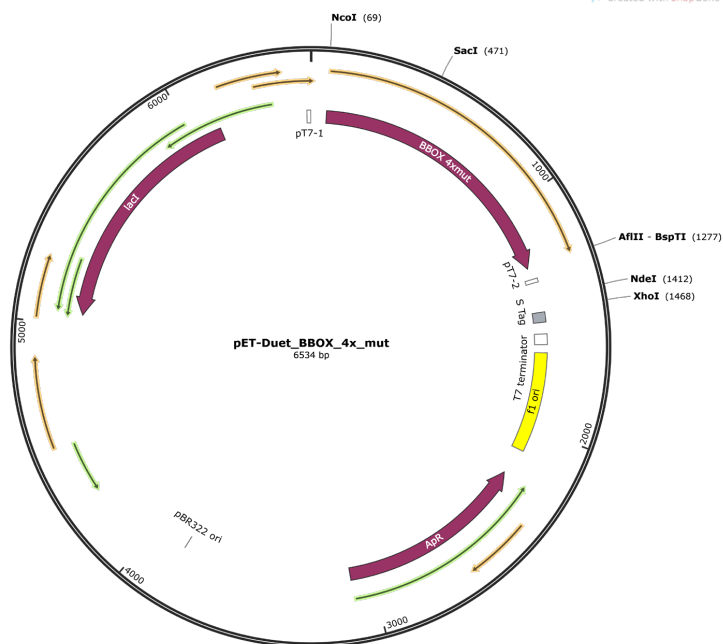
Kvalitātes rādītājs	Kvalitātes rādītāja grafiskais atspoguļojums																				
Sānu ķēžu planaritāte																					
Ramachandran grafiks																					
Statistisko rādītāju apkopojums	<table border="0"> <tr> <td> <u>Ligand RSCC</u></td> <td> <u>Binding Site RSCC</u></td> <td> <u>Isolated Waters Clusters</u></td> <td> <u>Missing Loops</u></td> </tr> <tr> <td> <u>Protein Packing</u></td> <td> <u>Binding Site Packing</u></td> <td> <u>Non-Binding Site Packing</u></td> <td> <u>Buried Unsatisfied donor</u></td> </tr> <tr> <td> <u>Buried unsatisfied acceptor</u></td> <td> <u>Waters with no HB partners</u></td> <td> <u>Steric Clashes</u></td> <td> <u>Bond Length Deviations</u></td> </tr> <tr> <td> <u>Bond Angle Deviations</u></td> <td> <u>Backbone Dihedrals</u></td> <td> <u>Sidechain Dihedrals</u></td> <td> <u>Unusual B-factors</u></td> </tr> <tr> <td> <u>Peptide Planarity</u></td> <td> <u>Sidechain Planarity</u></td> <td> <u>Improper Torsions</u></td> <td> <u>Missing Atoms</u></td> </tr> </table>	 <u>Ligand RSCC</u>	 <u>Binding Site RSCC</u>	 <u>Isolated Waters Clusters</u>	 <u>Missing Loops</u>	 <u>Protein Packing</u>	 <u>Binding Site Packing</u>	 <u>Non-Binding Site Packing</u>	 <u>Buried Unsatisfied donor</u>	 <u>Buried unsatisfied acceptor</u>	 <u>Waters with no HB partners</u>	 <u>Steric Clashes</u>	 <u>Bond Length Deviations</u>	 <u>Bond Angle Deviations</u>	 <u>Backbone Dihedrals</u>	 <u>Sidechain Dihedrals</u>	 <u>Unusual B-factors</u>	 <u>Peptide Planarity</u>	 <u>Sidechain Planarity</u>	 <u>Improper Torsions</u>	 <u>Missing Atoms</u>
 <u>Ligand RSCC</u>	 <u>Binding Site RSCC</u>	 <u>Isolated Waters Clusters</u>	 <u>Missing Loops</u>																		
 <u>Protein Packing</u>	 <u>Binding Site Packing</u>	 <u>Non-Binding Site Packing</u>	 <u>Buried Unsatisfied donor</u>																		
 <u>Buried unsatisfied acceptor</u>	 <u>Waters with no HB partners</u>	 <u>Steric Clashes</u>	 <u>Bond Length Deviations</u>																		
 <u>Bond Angle Deviations</u>	 <u>Backbone Dihedrals</u>	 <u>Sidechain Dihedrals</u>	 <u>Unusual B-factors</u>																		
 <u>Peptide Planarity</u>	 <u>Sidechain Planarity</u>	 <u>Improper Torsions</u>	 <u>Missing Atoms</u>																		





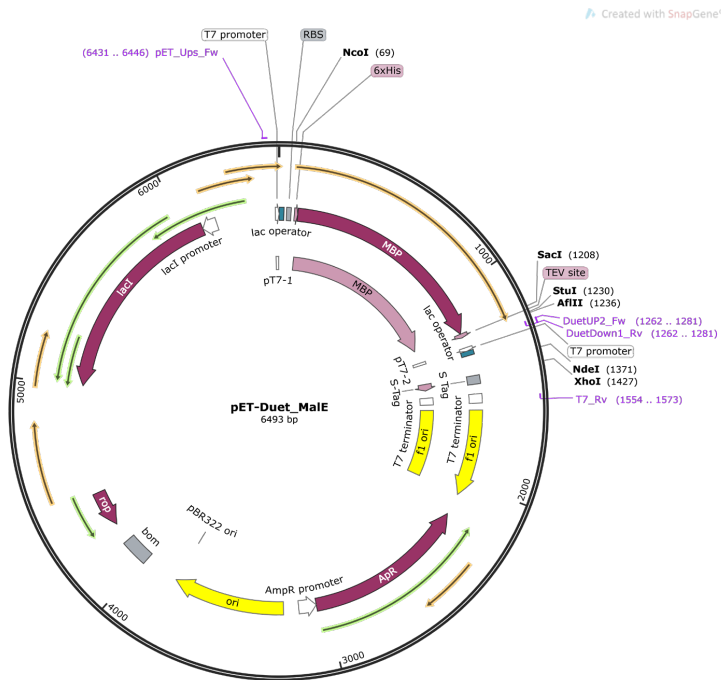
pET-Duet-MalE-TMLD plazmīdas karte, kas ietver sevī MBP-TMLD gēnu.

Oranžās un zaļās bultiņas parāda atvērtās lasīšanas rāmjus (*open reading frame*, ORF). *lacI* – *lac* represors, kas neļauj notikt transkripcijai *E. Coli* pirms IPTG pievienošanas. ApR – β-laktamāze, kas nodrošina ampicilīna rezistenci. *NcoI*, *SacI*, *StuI*, *AflII*, *NdeI*, *XhoI* – restrikcijas enzīmu atpazīšanas pozīcijas. Rozā krāsā ārpus plazmīdas riņķa norādītas DNS praimeru saistīšanas vietas.



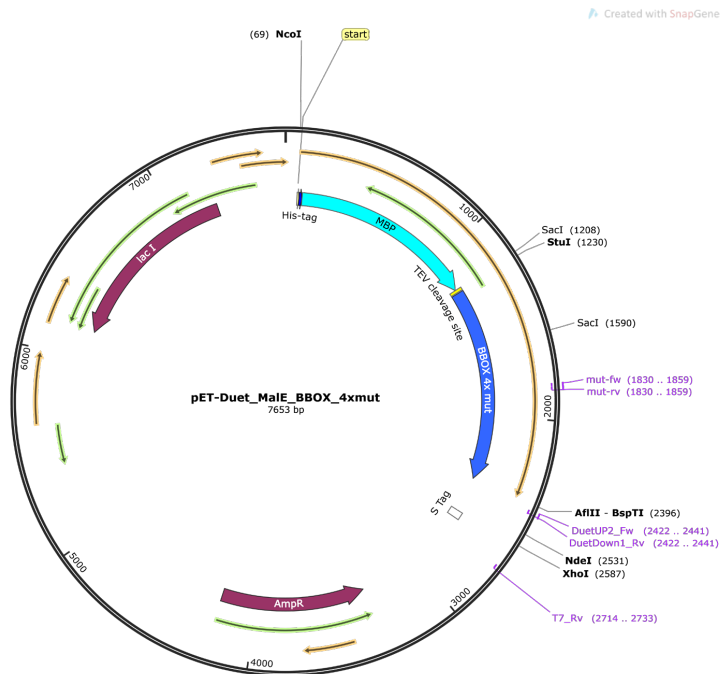
pET-Duet-BBOX-4x-mutanta plazmīdas karte, kas ietver sevī BBOX-4x-mutanta gēnu.

Oranžās un zaļās bultiņas parāda atvērtās lasīšanas rāmjus (*open reading frame*, ORF). *lacI* – *lac* represors, kas neļauj notikt transkripcijai *E. Coli* pirms IPTG pievienošanas. *ApR* –  $\beta$ -laktamāze, kas nodrošina ampicilīna rezistenci. *NcoI*, *SacI*, *StuI*, *AflII*, *NdeI*, *XhoI* – restrikcijas enzīmu atpazīšanas pozīcijas.



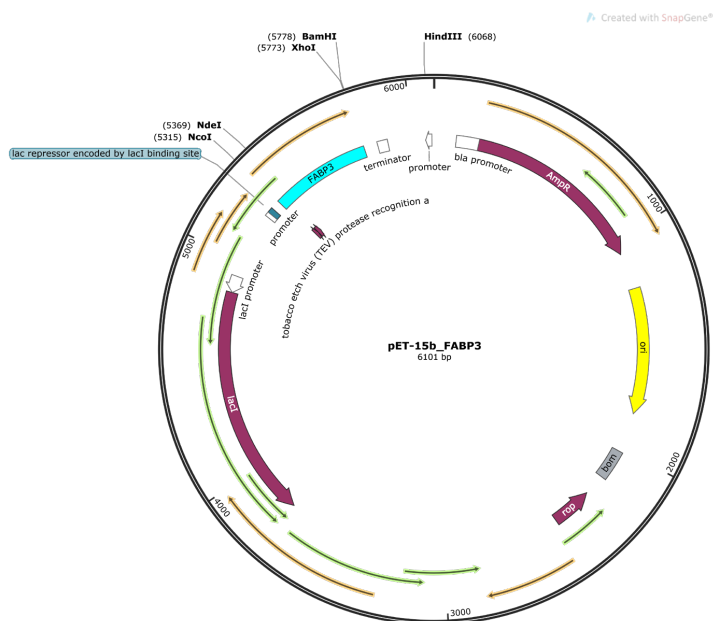
pET-Duet-MalE plazmīdas karte, kas ietver sevī MBP gēnu.

Oranžās un zaļās bultiņas parāda atvērtās lasīšanas rāmjus (*open reading frame*, ORF). lacI – lac represors, kas neļauj notikt transkripcijai *E. Coli* pirms IPTG pievienošanas. ApR – β-laktamāze, kas nodrošina ampicilīna rezistenci. *NcoI*, *SacI*, *StuI*, *AflIII*, *NdeI*, *XhoI* – restrikcijas enzīmu atpazīšanas pozīcijas. Rozā krāsā ārpus plazmīdas riņķa norādītas DNS praimeru saistīšanas vietas.



pET-Duet-MalE-BBOX-4x-mutanta plazmīdas karte, kas ietver sevī MBP-BBOX-4x-mutanta gēnu.

Oranzās un zaļās bultiņas parāda atvērtās lasīšanas rāmjus (*open reading frame*, ORF). lacI – lac represors, kas neļauj notikt transkripcijai *E. Coli* pirms IPTG pievienošanas. AmpR – β-laktamāze, kas nodrošina ampicilīna rezistenci. NcoI, SacI, StuI, AflII, NdeI, XhoI – restrikcijas enzīmu atpazīšanas pozīcijas. Rozā krāsā ārpus plazmīdas riņķa norādītas DNS praimeru saistīšanas vietas.



pET-15b-FABP3 plazmīdas karte, kas ietver sevī FABP3 gēnu.

Oranžās un zaļās bultiņas parāda atvērtās lasīšanas rāmjus (*open reading frame*, ORF). *lacI* – *lac* represors, kas neļauj notikt transkripcijai *E. Coli* pirms IPTG pievienošanas. AmpR – β-laktamāze, kas nodrošina ampicilīna rezistenci. *NcoI*, *NdeI*, *XhoI*, *BamHI*, *HindIII* – restrikcijas enzīmu atpazīšanas pozīcijas.

Protokols ātrai DNS šķelšanai ar restrikcijas enzīmiem (*ThermoFisher Scientific*)

1.	Istabas temperatūrā pagatavo sekojošo maisījumu (nemainot secību):
	14 $\mu$ L dejonizētā ūdens
	2 $\mu$ L 10X <i>FastDigest Green Buffer</i>
	2 $\mu$ L DNS (līdz 1 $\mu$ g)
	1 $\mu$ L <i>FastDigest</i> enzīms 1
	1 $\mu$ L <i>FastDigest</i> enzīms 2
2.	Saudzīgi samaisa un centrifugē.
3.	Inkubē 37 °C ūdens vannā 5–60 min.
4.	Inaktivē restrikcijas enzīmus (nav obligāti)

DNS fragmenta ligēšana ar T4 DNS ligāzi (*ThermoFisher Scientific*)

1.	Turot reaģentus uz ledus, pagatavo sekojošo maisījumu (nemainot secību):
	DNS lineārs vektors: 20–100 ng
	Lineārs DNS fragments ( <i>insert</i> ): attiecībās 1:3 vai 1:5 (pārākumā)
	2 µL 10X T4 DNS ligāzes buferis
	1–5 aktivitātes vienības T4 DNS ligāzes
	līdz 20 µL dejonizētā ūdens
2.	Saudzīgi samaisa un centrifugē.
3.	Inkubē 22 °C 10–60 min.
4.	Transformē 5 µL reakcijas maisījumā 50 µL ķīmiski kompetentās šūnās.

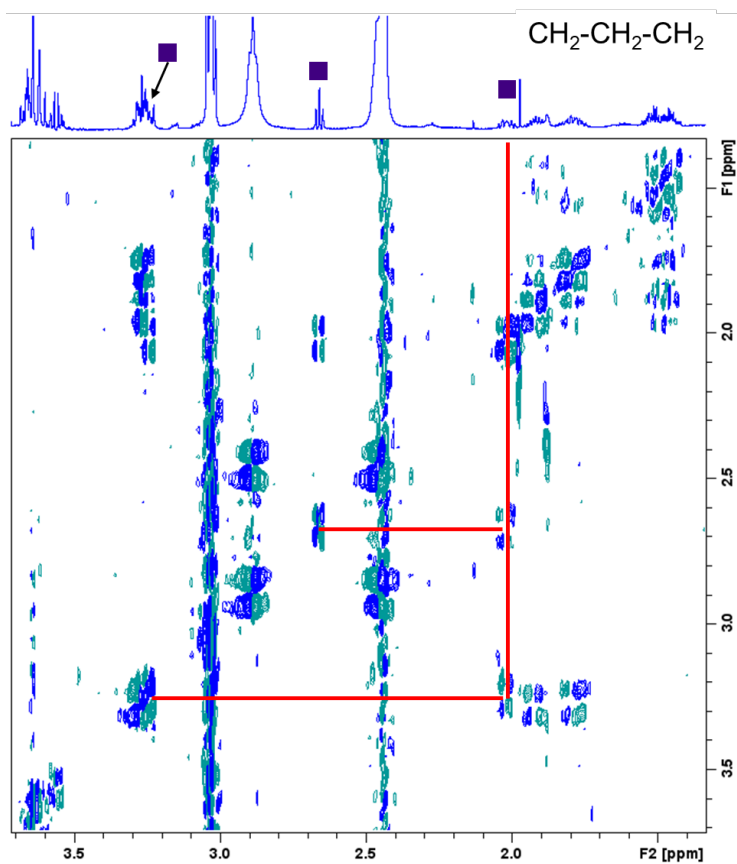
*Phusion Hot Start II* augstās precizitātes DNS polimerāzes PCR protokols (*ThermoFisher Scientific*)

1.	Turot reaģentus uz ledu, pagatavo sekojošu maisījumu (nemainot secību):			
	līdz 20 µL dejonizētā ūdens			
	4 µL 5X <i>Phusion HF</i> buferis			
	0,4 µL dNTPs			
	0,5 µM praimeris fw			
	0,5 µM praimeris rv			
	1 pg – 10 ng oriģinālā DNS ( <i>templāte</i> )			
	0,6 µL DMSO (pēc izvēlēs, GC-bagātiem fragmentiem)			
	0,2 µL <i>Phusion Hot Start II</i> augstās precizitātes DNS polimerāze			
2.	Saudzīgi samaisa un centrifugē.			
3.	Veic PCR reakciju ar sekojošiem iestatījumiem (trīs soļu protokols):			
	Sākotnējā DNS denaturācija	98 °C	30 s	1 cikls
	Denaturācija	98 °C	10 s	25–35 cikli
	<i>Annealing</i>	50–72 °C*	30 s	
	Pieaudzēšana ( <i>Extension</i> )	72 °C	30 s/kb <sup>25</sup>	
	Beigu pieaudzēšana ( <i>Final Extension</i> )	72 °C	10 min	1 cikls
	Atdzesēšana/uzglabāšana	4 °C		
4.	PCR maisījumam pievieno 1 µL <i>FastDigest DpnI</i> restrikcijas enzīma, lai sagrautu sākotnējo DNS. Maisījumu 30–60 minūtēs inkubē 37 °C ūdens vannā.			
5.	PCR produkta pēcapstrāde (ligēšana, attīrīšana, uzglabāšana –20 °C, u.c.),			

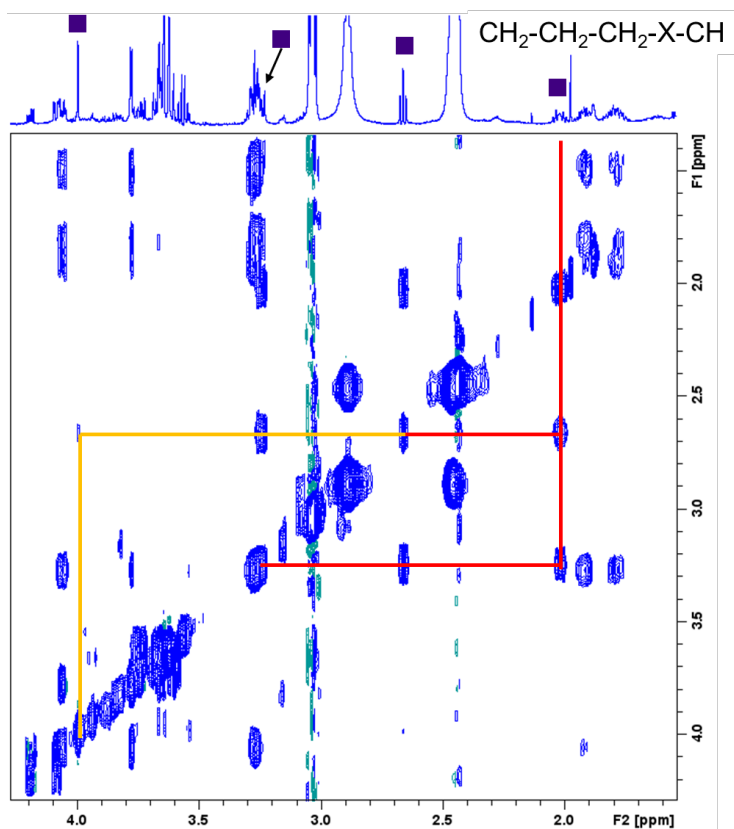
\* atkarībā no praimeru kušanas temperatūras,  $T_m$ .

<sup>25</sup> kb – kilobāze

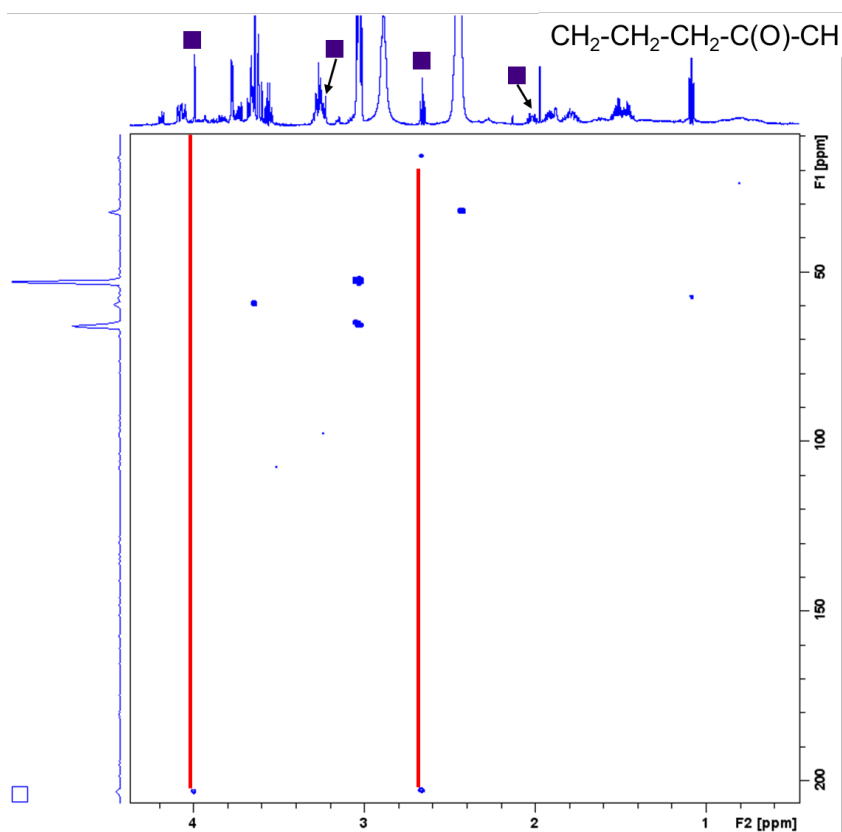




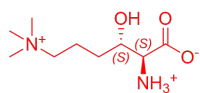
2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQF-COSY spektra fragments MBP-TMLD enzimatiskās reakcijas maisījumam ar TML Fe(II) pārākumā, kurā novēroja trešā reakcijas produkta veidošanos (signāli atzīmēti ar violetiem kvadrātiņiem). Sarkanās līnijas parāda krosipīkus starp jaunizveidojušies signāliem.



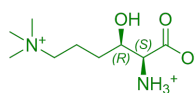
2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY spektra fragments MBP-TMLD enzimatiskās reakcijas maisījumam ar TML Fe(II) pārākumā, kurā novēroja trešā reakcijas produkta veidošanos (signāli atzīmēti ar violetiem kvadrātiņiem). Sarkanās līnijas parāda krosipīkus, ko novēroja 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQF-COSY spektrā, bet dzeltenā krāsā – jauno krosipīki starp jaunizveidojušies signāliem.



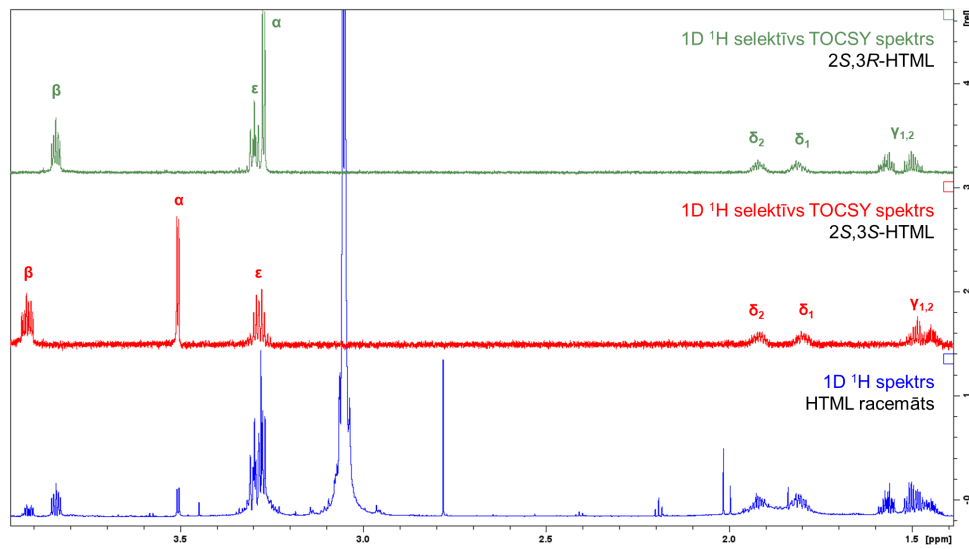
2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spektrs MBP-TMLD enzimatiskās reakcijas maisījumam ar TML Fe(II) pārākumā, kurā novēroja trešā reakcijas produkta veidošanos (signāli atzīmēti ar violetiem kvadrātiņiem). Sarkanās līnijas parāda krosipīkus starp jaunizveidoto signālu blakus esošajiem oglekļiem un protoniem.



2S,3S-HTML

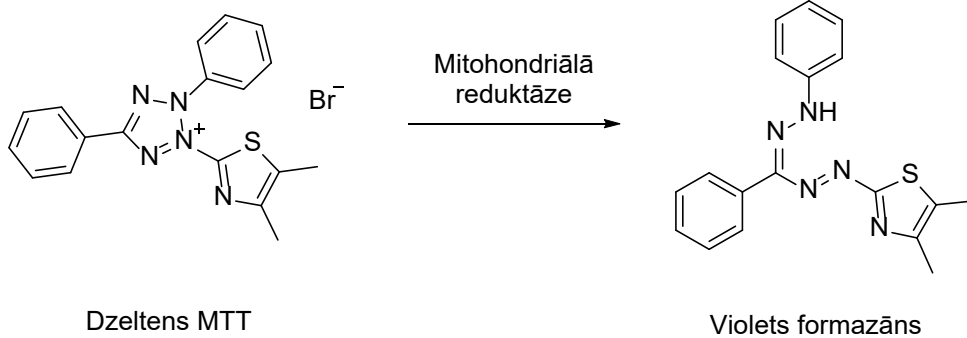


2S,3R-HTML



HTML 2S,3S un 2S,3R diastereomēru maisījuma attiecināšana izmantojot 1D  $^1\text{H}$  selektīvos TOCSY spektrus.

Dzeltēnās MTT krāsvielas reducēšanās reakcija līdz violetam formazānam.



## Piesātināto TS šķīdība un CMC ūdenī

TS	Oglekļu skaits	Šķīdība, mg/L H <sub>2</sub> O 20 °C [291, 292]	CMC, mM	Ref.
kaprilāts	C8:0	680	300	[293]
kapriloilkarnitīns	C8:0-AC	šķīst	> 1	[294]
kaprināts	C10:0	150	86	[293]
laurināts	C12:0	55	25,12	[295]
laurinoilkarnitīns	C12:0-AC	šķīst	1,5	[267]
miristāts	C14:0	20	6,92	[295]
miristoilkarnitīns	C14:0-AC	šķīst zemā pH	0,15	[267]
palmitāts	C16:0	7,2	3,16	[295]
palmitoilkarnitīns	C16:0-AC	šķīst zemā pH	0,015	[267]
palmitoil-CoA	C16:0-CoA	šķīst	0,035	[294]
stearāts	C18:0	2,9	0,87	[295]

## Apo-FABP3 pamatķēdes attiecinašana KPī buferī pH 7,6, 25 °C

#		HN	N	HA		CA	CO
1	M	8,078	121,094	4,397		54,284	54,284
2	V	8,605	117,784	4,332		61,278	61,278
3	D	7,890	119,164	4,214		54,056	54,056
4	A	7,729	120,503	4,031		51,487	51,487
5	F	7,931	112,673	4,131		57,681	57,681
6	L	7,288	115,154	4,144		53,199	53,199
7	G	8,732	108,696	4,091	3,660	41,325	41,325
8	T	8,193	116,655	4,742		60,079	60,079
9	W	9,498	127,866	5,088		52,628	52,628
10	K	9,740	124,449	5,082		51,829	51,829
11	L	8,250	126,913	3,514		54,113	54,113
12	V	9,217	120,180	4,460		58,880	58,880
13	D	7,618	119,139	4,724		51,658	51,658
14	S	8,189	115,106	4,707		54,769	54,769
15	K	8,914	127,859	4,724		52,628	52,628
16	N	9,371	119,184	4,689		52,172	52,172
17	F	8,502	120,616	4,681		58,680	58,680
18	D	8,790	118,237	4,689		55,454	55,454
19	D	7,750	116,919	4,147		54,427	54,427
20	Y	7,584	120,746	4,175		59,279	59,279
21	M	8,012	116,534	3,552		55,312	55,312
22	K	8,582	119,681	3,785		57,110	57,110
23	S	7,659	116,631	4,039		58,737	58,737
24	L	7,118	116,067	3,521		52,857	52,857
25	G	7,653	105,797	4,108	3,598	42,267	42,267
26	V	7,499	120,958	3,696		60,107	60,107
27	G	8,799	115,264	3,879	3,764	42,752	42,752
30	T	7,607	114,374	3,864		62,362	62,362
31	R	8,209	121,053	4,671		56,796	56,796
32	Q	8,036	118,570	4,682		55,397	55,397
33	V	7,279	118,000	3,792		61,906	61,906
34	A	8,210	122,887	3,819		51,515	51,515
35	S	8,116	112,765	4,689		57,767	57,767
40	T	8,865	116,432	5,300		58,875	58,875
41	T	9,512	121,899	5,234		58,880	58,880
42	I	9,442	129,141	5,091		57,795	57,795
43	I	9,200	126,667	5,081		58,452	58,452
44	E	9,136	127,327	4,701		51,572	51,572
45	K	8,591	120,107	4,925		52,628	52,628
46	N	8,547	124,181	4,682		49,517	49,517
48	D	8,640	125,704	4,443		51,087	51,087
49	I	7,631	118,946	4,045		57,196	57,196
50	L	8,845	132,568	4,690		51,258	51,258
51	T	8,532	115,851	4,953		58,452	58,452
52	L	9,005	128,208	5,234		51,715	51,715
53	K	9,724	128,189	5,053		51,801	51,801
54	T	8,879	117,467	5,058		58,623	58,623
55	H	9,073	125,467	5,498		51,030	51,030
56	S	8,444	116,917	4,703		54,627	54,627
61	T	8,823	112,724	4,718		57,510	57,510
62	E	8,554	120,632	5,041		53,456	53,456
63	I	8,393	118,284	4,759		57,139	57,139
64	S	8,172	116,829	5,587		54,484	54,484
65	F	8,395	119,298	4,443		53,028	53,028
66	K	8,732	118,165	4,736		51,344	51,344
67	L	9,100	124,714	4,3900		53,485	53,485
68	G	9,420	108,230	4,161	3,338	43,437	43,437
69	V	7,562	120,443	4,354		59,222	59,222
70	E	9,116	133,141	4,927		54,398	54,398

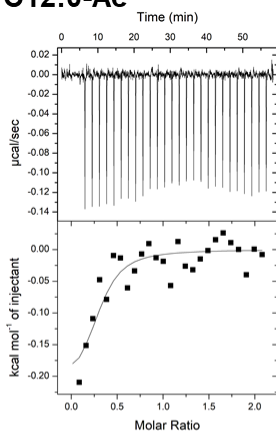
#		HN	N	HA		CA	CO
71	F	9,427	121,818	4,970		52,914	52,914
72	D	8,519	119,849	5,074		51,829	51,829
73	E	8,531	125,461	4,699		52,029	52,029
74	T	8,779	124,540	5,178		58,423	58,423
75	T	9,144	119,067	4,320		59,022	59,022
77	D	8,375	110,192	4,443		49,945	49,945
78	D	7,918	114,986	3,968		53,428	53,428
79	R	7,277	116,631	4,020		53,171	53,171
80	K	8,279	123,431	4,777		53,057	53,057
81	V	8,935	116,046	5,058		55,283	55,283
82	K	8,853	121,500	4,847		51,458	51,458
83	S	9,196	124,839	5,723		54,541	54,541
84	I	8,314	117,251	4,144		58,651	58,651
85	V	9,647	130,798	5,338		57,053	57,053
86	T	8,965	117,022	4,654		56,625	56,625
87	L	8,474	122,233	5,208		50,802	50,802
88	D	8,921	126,219	4,870		50,117	50,117
90	G	8,488	108,287	4,654	3,853	42,392	42,392
91	K	7,684	118,582	4,865		52,172	52,172
92	L	8,654	124,110	4,847		50,773	50,773
93	V	9,628	131,975	3,970		60,735	60,735
94	H	8,663	130,552	5,340		49,745	49,745
95	L	9,159	129,607	4,935		51,144	51,144
96	Q	8,711	123,642	4,953		51,344	51,344
97	K	9,066	119,499	5,410		52,942	52,942
98	W	8,235	126,867	4,844		54,912	54,912
99	D	9,178	121,731	4,161		52,686	52,686
100	G	8,289	104,786	3,853	3,529	43,308	43,308
101	Q	8,416	120,222	4,320		51,144	51,144
102	E	8,161	116,820	5,621		52,058	52,058
103	T	8,981	114,662	5,322		57,081	57,081
104	T	7,899	116,558	5,287		57,167	57,167
105	L	9,510	125,820	4,960		52,657	52,657
106	V	9,244	127,309	4,707		59,194	59,194
107	R	8,921	126,305	5,499		51,658	51,658
108	E	8,835	121,500	4,847		51,487	51,487
109	L	8,720	124,852	5,164		50,573	50,573
110	I	8,781	124,071	4,085		57,881	57,881
111	D	9,366	128,933	4,192		52,657	52,657
112	G	8,533	103,163	4,161	3,563	42,752	42,752
113	K	8,000	121,326	4,830		52,514	52,514
114	L	8,122	123,470	4,548		51,658	51,658
115	I	9,387	128,770	4,736		56,425	56,425
116	L	9,634	132,101	5,232		49,655	49,655
117	T	9,606	123,852	5,182		58,908	58,908
118	L	9,619	131,795	5,197		51,175	51,175
119	T	8,561	116,424	5,428		59,137	59,137
120	H	9,441	131,966	4,970		54,627	54,627
121	G	8,914	116,660	4,513		44,293	44,293
122	T	8,822	117,672	4,671		58,651	58,651
123	A	8,743	128,418	4,550		49,693	49,693
124	V	8,169	122,784	5,023		58,309	58,309
125	C	9,503	129,173	5,245		52,425	52,425
126	T	8,037	122,136	5,199		58,423	58,423
127	R	10,037	129,340	4,764		52,029	52,029
128	T	8,525	119,476	4,988		59,719	59,719
129	Y	9,913	126,189	5,523		53,599	53,599
130	E	9,193	119,444	5,290		51,286	51,286
131	K	9,266	127,272	3,801		54,094	54,094
132	E	8,705	127,957	4,250		53,770	53,770
133	A	7,946	131,245	4,006		50,973	50,973



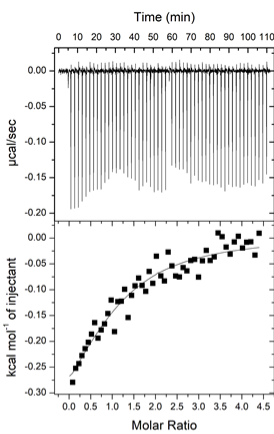
## FABP3-palmitāta (C16:0) pamatķēdes attiecināšana KPi buferī pH 7,6, 25 °C

#		HN	N	HA		CA	CO
1	M	8,000	121,179	4,397		54,284	174,991
2	V	8,635	117,732	4,332		61,278	173,838
3	D	7,889	119,099	4,214		54,056	175,560
4	A	7,720	120,368	4,031		51,487	175,591
5	F	7,916	112,855	4,131		57,681	173,161
6	L	7,253	114,464	4,144		53,199	174,345
7	G	8,713	108,564	4,091	3,660	41,325	168,488
8	T	8,169	116,454	4,742		60,079	170,025
9	W	9,537	127,335	5,088		52,628	172,271
10	K	9,734	124,341	5,082		51,829	173,161
11	L	8,223	126,727	3,514		54,113	174,20
12	V	9,209	119,710	4,460		58,880	172,977
13	D	7,645	119,152	4,724		51,658	170,994
14	S	8,200	115,172	4,707		54,769	170,126
15	K	8,852	128,221	4,826		52,628	173,358
16	N	9,371	119,184	4,689		52,172	173,115
17	F	8,559	120,189	4,681		58,680	174,822
18	D	8,747	118,240	4,689		55,454	175,345
19	D	7,749	116,277	4,147		54,427	176,344
20	Y	7,527	119,945	4,175		59,279	172,977
21	M	8,134	115,801	3,212		55,312	175,790
22	K	8,801	119,200	3,785		57,110	177,482
23	S	7,647	116,271	4,039		58,737	177,482
24	L	7,035	115,180	3,521		52,857	174,822
25	G	7,665	106,232	4,108	3,598	42,267	171,962
26	V	7,611	122,213	3,696		60,107	174,161
27	G	8,945	116,263	3,879	3,764	42,752	171,452
30	T	7,485	114,960	3,864		62,362	172,979
31	R	8,279	120,704	3,906		56,796	175,406
32	Q	7,830	116,456	3,712		55,397	175,229
33	V	7,163	117,157	3,792		61,906	175,497
34	A	8,164	122,774	3,819		51,515	176,867
35	S	8,231	112,833	4,689		57,767	177,049
40	T	8,872	116,409	5,300		58,875	171,932
41	T	9,890	123,321	5,234		58,880	169,795
42	I	9,509	129,427	5,091		57,795	172,347
43	I	9,164	126,711	5,081		58,452	172,808
44	E	9,112	127,125	4,701		51,572	170,693
45	K	8,582	120,021	4,925		52,628	171,655
46	N	8,543	124,110	4,682		49,517	172,654
48	D	8,625	125,640	4,443		51,087	171,762
49	I	7,618	118,823	4,045		57,196	173,451
50	L	8,835	132,602	4,762		51,258	172,209
51	T	8,523	115,865	4,953		58,452	169,410
52	L	9,046	128,567	5,234		51,715	173,542
53	K	9,677	128,999	5,053		51,801	172,822
54	T	9,093	118,848	5,058		58,623	170,779
55	H	9,653	127,691	5,498		51,030	171,993
56	S	8,621	115,798	4,703		54,627	169,518
61	T	9,452	112,839	4,718		57,510	171,117
62	E	8,526	120,857	5,041		53,456	171,762
63	I	8,306	118,313	4,759		57,139	171,055
64	S	8,197	116,652	5,587		54,484	170,145
65	F	8,376	119,384	4,443		53,028	169,472
66	K	8,724	118,113	4,736		51,344	175,206
67	L	9,108	124,913	4,390		53,485	176,528
68	G	9,413	108,154	4,161	3,338	43,437	170,686
69	V	7,566	120,470	4,354		59,222	173,638
70	E	9,113	133,160	4,927		54,398	172,516

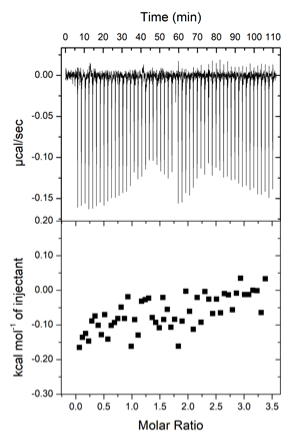
#		HN	N	HA	CA	CO
71	F	9,424	121,797	4,970	52,914	170,179
72	D	8,507	119,791	5,074	51,829	172,439
73	E	8,479	126,019	4,699	52,029	171,593
74	T	8,776	124,587	5,178	58,423	173,161
75	T	9,101	118,993	4,320	59,022	174,284
77	D	9,194	110,117	4,443	49,945	170,148
78	D	7,990	115,193	3,968	53,428	173,300
79	R	7,343	116,458	4,020	53,171	172,746
80	K	8,233	123,169	4,777	53,057	173,515
81	V	8,906	115,787	5,058	55,283	172,839
82	K	8,809	121,351	4,847	51,458	174,053
83	S	9,184	124,867	5,723	54,541	169,147
84	I	8,354	117,391	4,144	58,651	169,912
85	V	9,641	130,666	5,338	57,053	172,684
86	T	8,945	116,472	4,654	56,625	169,704
87	L	8,469	122,133	5,208	50,802	173,146
88	D	8,918	126,091	4,870	50,117	174,473
90	G	8,478	108,295	4,654	3,853	42,392
91	K	7,669	118,513	4,865		52,172
92	L	8,711	124,061	4,847		50,773
93	V	9,595	131,801	4,778		60,735
94	H	8,571	130,605	5,340		49,745
95	L	9,150	129,538	4,935		51,144
96	Q	8,576	123,033	4,953		51,344
97	K	9,021	119,625	5,410		52,942
98	W	8,207	126,703	4,844		54,912
99	D	9,191	121,591	4,161		52,686
100	G	8,284	104,703	3,853	3,529	43,308
101	Q	8,436	120,174	4,320		51,144
102	E	8,129	116,494	5,621		52,058
103	T	8,958	114,312	5,322		57,081
104	T	7,876	115,801	5,287		57,167
105	L	9,444	124,756	4,960		52,657
106	V	9,178	127,073	4,707		59,194
107	R	8,917	126,195	5,499		51,658
108	E	8,757	121,444	4,847		51,487
109	L	8,705	125,064	5,164		50,573
110	I	8,814	124,181	4,085		57,881
111	D	9,316	128,561	4,192		52,657
112	G	8,538	103,084	4,161	3,563	42,752
113	K	7,991	121,326	4,830		52,514
114	L	8,372	123,941	4,548		51,658
115	I	9,342	127,934	4,736		56,425
116	L	9,605	131,982	5,232		49,655
117	T	9,566	122,785	5,182		58,908
118	L	9,583	131,676	5,197		51,175
119	T	8,497	116,587	5,428		59,137
120	H	9,400	132,284	4,970		54,627
121	G	8,878	116,943	4,513		44,293
122	T	8,515	116,503	4,671		58,651
123	A	8,815	128,409	4,550		49,693
124	V	8,161	122,699	5,023		58,309
125	C	9,522	129,160	5,245		52,425
126	T	8,024	122,327	5,199		58,423
127	R	10,087	130,211	4,764		52,029
128	T	8,623	120,003	4,988		59,719
129	Y	9,674	126,927	5,523		53,599
130	E	9,318	119,937	5,290		51,286
131	K	9,185	127,190	3,801		54,094
132	E	8,736	127,482	4,250		53,770
133	A	7,948	131,288	3,962		50,973

C12:0-karnitīna un C16:0-karnitīna esteru *ITC* titrēšanas līknes variējot KPi bufera piedevas**C12:0-Ac**

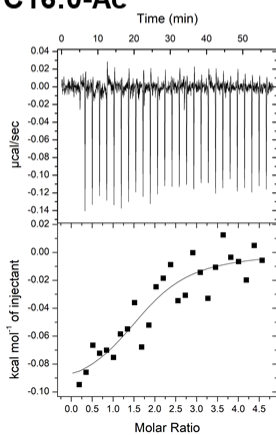
KPi-1 buferis



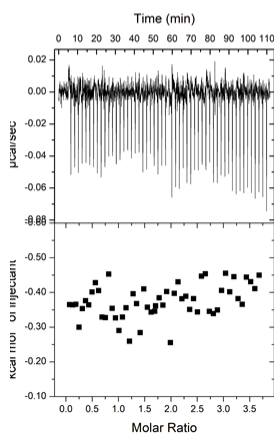
10% (v/v) glicerīns



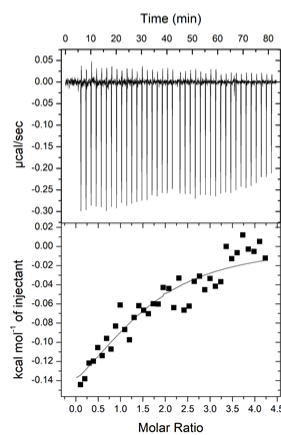
0.10% (v/v) Triton X-100

**C16:0-Ac**

KPi-1 buferis



10% (v/v) glicerīns



0.10% (v/v) Triton X-100

## CSP vērtības FABP3-TS un FABP3-TS esteru kompleksiem

#		C8:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18-1- cis/trans- $\Delta^9$	EPA	C14:0- AC	C16:0- CoA	C18-1- cis/trans- $\Delta^9$ -AC	EPA-AC
1	M	0,013	0,005	0,005	0,022	0,009	0,004	0,005	0,004	0,019	0,005	0,004
2	V	0,067	0,049	0,049	0,012	0,048	0,048	0,049	0,025	0,043	0,019	0,024
3	D	0,014	0,012	0,012	0,009	0,011	0,009	0,009	0,005	0,010	0,005	0,004
4	A	0,021	0,213	0,213	0,017	0,021	0,022	0,212	0,049	0,011	0,056	0,215
5	F	0,044	0,052	0,052	0,057	0,054	0,057	0,056	0,010	0,017	0,012	0,012
6	L	0,117	0,124	0,132	0,133	0,150	0,150	0,143	0,032	0,048	0,040	0,038
7	G	0,016	0,002	0,002	0,010	0,014	0,009	0,012	0,008	0,007	0,008	0,007
8	T	0,026	0,025	0,026	0,023	0,035	0,028	0,029	0,286	0,023	0,019	0,015
9	W	0,081	0,099	0,096	0,116	0,133	0,133	0,133	0,158	0,161	0,160	0,177
10	K	0,248	0,222	0,261	0,269	0,265	0,270	0,252	0,412	0,273	0,422	0,267
11	L	0,323	0,323	0,379	0,383	0,384	0,391	0,378	0,030	0,037	0,030	0,028
12	V	0,183	0,152	0,152	0,115	0,126	0,126	0,119	0,191	0,199	0,193	0,196
13	D	0,048	0,055	0,040	0,036	0,033	0,031	0,026	0,006	0,014	0,003	0,009
14	S	0,027	0,013	0,019	0,014	0,013	0,017	0,011	0,006	0,024	0,015	0,018
15	K	0,084	0,100	0,097	0,109	0,110	0,110	0,105	0,024	0,019	0,021	0,021
16	N	0,101	0,109	0,174	0,000	0,129	0,099	0,112	0,030	0,039	0,148	0,186
17	F	0,117	0,091	0,058	0,085	0,103	0,103	0,081	0,023	0,093	0,013	0,015
18	D	0,040	0,183	0,154	0,026	0,034	0,035	0,129	0,129	0,122	0,129	0,153
19	D	0,120	0,144	0,124	0,101	0,124	0,123	0,121	0,077	0,083	0,076	0,067
20	Y	0,149	0,173	0,196	0,190	0,183	0,177	0,184	0,180	0,092	0,143	0,153
21	M	0,102	0,155	0,133	0,146	0,169	0,153	0,146	0,062	0,064	0,064	0,056
22	K	0,158	0,163	0,163	0,175	0,184	0,185	0,181	0,175	0,175	0,182	0,181
23	S	0,086	0,048	0,067	0,068	0,063	0,048	0,069	0,031	0,047	0,029	0,033
24	L	0,147	0,132	0,141	0,092	0,133	0,120	0,117	0,040	0,043	0,036	0,040
25	G	0,076	0,170	0,047	0,145	0,232	0,224	0,209	0,071	0,111	0,067	0,058
26	V	0,251	0,297	0,296	0,270	0,282	0,277	0,269	0,120	0,138	0,127	0,100
27	G	0,325	0,345	0,324	0,280	0,296	0,282	0,314	0,326	0,309	0,310	0,297
28	F											
29	A											
30	T	0,187	0,205	0,177	0,166	0,164	0,154	0,161	0,080	0,136	0,077	0,072
31	R	0,149	0,130	0,132	0,108	0,109	0,099	0,100	0,055	0,084	0,043	0,041
32	Q	0,493	0,562	0,506	0,450	0,436	0,451	0,497	0,472	0,487	0,469	0,469

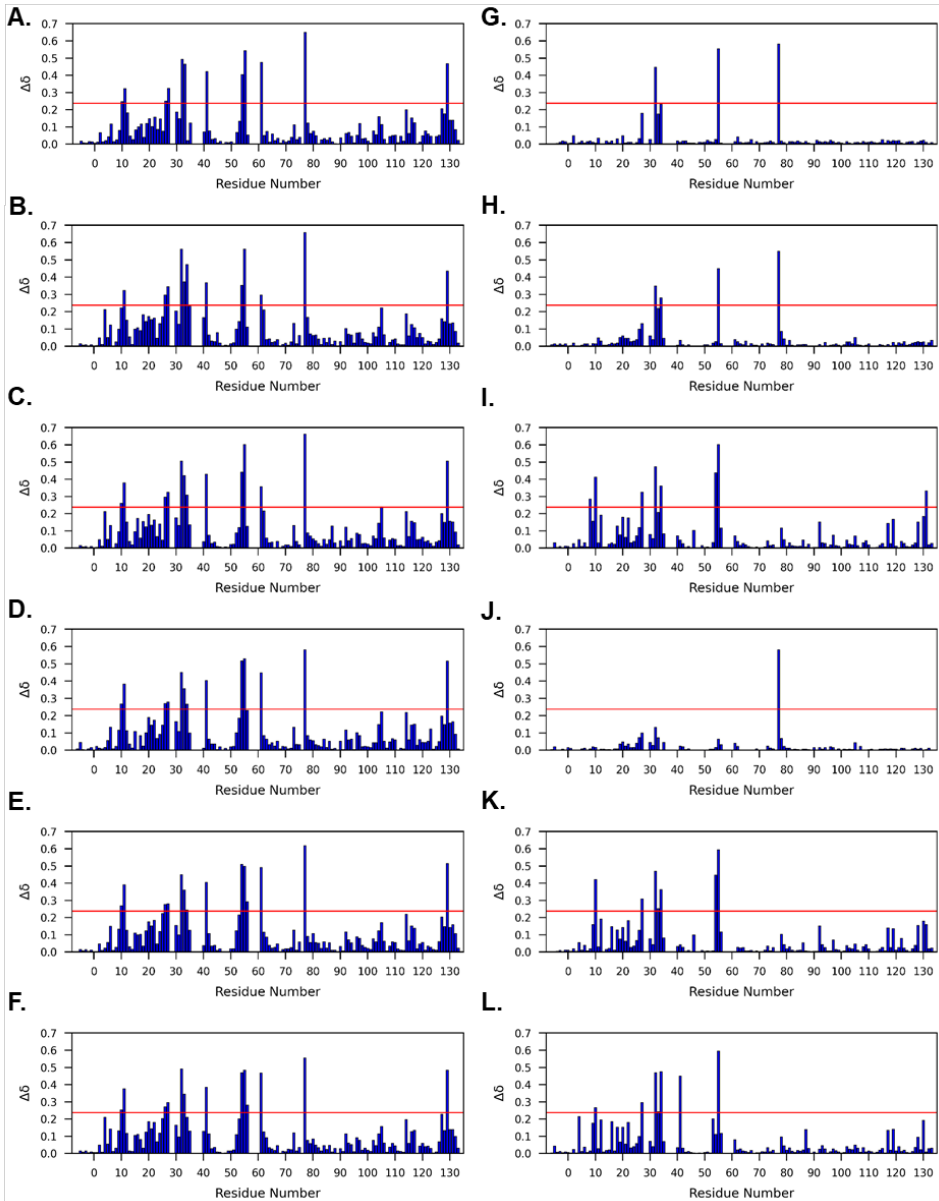
#		C8:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18-1- <i>cis/trans</i> - $\Delta^9$	EPA	C14:0- AC	C16:0- CoA	C18-1- <i>cis/trans</i> - $\Delta^9$ -AC	EPA-AC
33	V	0,466	0,374	0,422	0,357	0,317	0,360	0,344	0,207	0,386	0,253	0,243
34	A	0,021	0,472	0,309	0,267	0,256	0,245	0,452	0,361	0,183	0,363	0,476
35	S	0,123	0,231	0,135	0,100	0,076	0,127	0,131	0,084	0,088	0,082	0,070
36	M											
37	T											
38	K											
39	P											
40	T	0,072	0,166	0,038	0,013	0,051	0,038	0,130	0,072	0,050	0,033	0,035
41	T	0,422	0,368	0,430	0,403	0,393	0,404	0,384	0,046	0,433	0,042	0,450
42	I	0,078	0,065	0,074	0,066	0,111	0,109	0,113	0,025	0,057	0,028	0,032
43	I	0,029	0,032	0,029	0,038	0,034	0,034	0,028	0,005	0,008	0,005	0,008
44	E	0,033	0,028	0,035	0,038	0,043	0,039	0,036	0,010	0,011	0,010	0,013
45	K	0,008	0,081	0,009	0,004	0,001	0,010	0,008	0,002	0,002	0,001	0,006
46	N	0,017	0,020	0,008	0,020	0,014	0,018	0,008	0,103	0,004	0,099	0,004
47	G											
48	D	0,011	0,008	0,008	0,011	0,010	0,004	0,008	0,001	0,000	0,001	0,003
49	I	0,009	0,005	0,005	0,000	0,004	0,002	0,005	0,015	0,010	0,010	0,002
50	L	0,014	0,016	0,021	0,019	0,016	0,018	0,018	0,005	0,002	0,005	0,007
51	T	0,003	0,021	0,022	0,022	0,027	0,020	0,021	0,006	0,005	0,006	0,010
52	L	0,068	0,099	0,089	0,101	0,115	0,125	0,110	0,001	0,014	0,005	0,003
53	K	0,133	0,144	0,120	0,187	0,208	0,215	0,202	0,033	0,011	0,008	0,202
54	T	0,405	0,353	0,441	0,517	0,509	0,510	0,466	0,438	0,423	0,448	0,111
55	H	0,543	0,563	0,602	0,530	0,496	0,499	0,487	0,602	0,588	0,596	0,596
56	S	0,054	0,112	0,127	0,232	0,295	0,292	0,276	0,117	0,112	0,117	0,117
57	T											
58	F											
59	K											
60	N											
61	T	0,476	0,296	0,357	0,447	0,483	0,492	0,467	0,071	0,479		0,081
62	E	0,051	0,210	0,217	0,087	0,115	0,116	0,222	0,041	0,043	0,028	0,021
63	I	0,074	0,041	0,058	0,064	0,087	0,087	0,091	0,017	0,027	0,024	0,027
64	S	0,012	0,044	0,032	0,033	0,040	0,039	0,031	0,029	0,030	0,026	0,016
65	F	0,060	0,024	0,034	0,043	0,027	0,023	0,029	0,020	0,009	0,006	0,012
66	K	0,021	0,027	0,002	0,025	0,020	0,028	0,018	0,009	0,007	0,008	0,006
67	L	0,034	0,039	0,039	0,054	0,039	0,048	0,046	0,005	0,005	0,009	0,018

#		C8:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18-1- <i>cis/trans</i> - $\Delta^9$	EPA	C14:0-AC	C16:0-CoA	C18-1- <i>cis/trans</i> - $\Delta^9$ -AC	EPA-AC
68	G	0,007	0,001	0,001	0,008	0,003	0,003	0,001	0,002	0,005	0,001	0,001
69	V	0,023	0,012	0,012	0,022	0,017	0,015	0,014	0,006	0,020	0,006	0,005
70	E	0,013	0,018	0,018	0,019	0,018	0,019	0,018	0,001	0,008	0,001	0,005
71	F	0,020	0,007	0,018	0,009	0,018	0,019	0,020	0,001	0,001	0,002	0,011
72	D	0,040	0,026	0,010	0,012	0,025	0,025	0,024	0,008	0,014	0,013	0,009
73	E	0,113	0,134	0,132	0,134	0,136	0,128	0,123	0,042	0,057	0,035	0,034
74	T	0,027	0,015	0,040	0,034	0,016	0,013	0,015	0,016	0,018	0,008	0,011
75	T	0,041	0,063	0,019	0,033	0,058	0,058	0,038	0,019	0,029	0,026	0,020
76	A											
77	D	0,651	0,658	0,662	0,580	0,620	0,617	0,556				
78	D	0,124	0,168	0,089	0,087	0,111	0,091	0,077	0,117	0,141	0,102	0,096
79	R	0,063	0,073	0,070	0,060	0,056	0,056	0,059	0,050	0,058	0,043	0,045
80	K	0,076	0,062	0,054	0,056	0,083	0,109	0,084	0,010	0,025	0,018	0,020
81	V	0,049	0,066	0,042	0,033	0,051	0,056	0,048	0,032	0,044	0,030	0,033
82	K	0,004	0,042	0,025	0,027	0,055	0,053	0,034	0,014	0,013	0,012	0,014
83	S	0,026	0,011	0,011	0,020	0,015	0,021	0,017	0,011	0,001	0,005	0,006
84	I	0,033	0,046	0,053	0,064	0,059	0,059	0,047	0,009	0,018	0,009	0,018
85	V	0,024	0,023	0,022	0,017	0,027	0,024	0,023	0,013	0,020	0,013	0,014
86	T	0,038	0,049	0,049	0,053	0,058	0,054	0,049	0,048	0,051	0,054	0,021
87	L	0,014	0,012	0,130	0,007	0,015	0,011	0,200	0,007	0,004	0,007	0,140
88	D	0,004	0,030	0,030	0,011	0,011	0,011	0,030	0,023	0,007	0,005	0,030
89	G											
90	G	0,038	0,029	0,042	0,054	0,033	0,033	0,031	0,005	0,009	0,005	0,009
91	K	0,005	0,006	0,012	0,004	0,008	0,006	0,012	0,005	0,002	0,005	0,002
92	L	0,063	0,102	0,122	0,118	0,106	0,117	0,112	0,153	0,038	0,153	0,026
93	V	0,069	0,070	0,044	0,060	0,074	0,071	0,064	0,031	0,032	0,043	0,047
94	H	0,046	0,065	0,057	0,065	0,062	0,054	0,052	0,028	0,045	0,026	0,027
95	L	0,008	0,019	0,005	0,004	0,017	0,009	0,011	0,006	0,008	0,006	0,004
96	Q	0,053	0,077	0,087	0,103	0,093	0,090	0,088	0,018	0,048	0,007	0,011
97	K	0,120	0,081	0,079	0,086	0,106	0,080	0,079	0,076	0,061	0,070	0,027
98	W	0,032	0,043	0,025	0,021	0,037	0,039	0,024	0,016	0,026	0,016	0,017
99	D	0,034	0,024	0,029	0,022	0,036	0,027	0,029	0,013	0,015	0,013	0,009
100	G	0,018	0,020	0,024	0,019	0,021	0,021	0,024	0,002	0,002	0,002	0,003
101	Q	0,006	0,015	0,014	0,015	0,012	0,015	0,013	0,007	0,011	0,007	0,007
102	E	0,077	0,079	0,070	0,043	0,081	0,078	0,079	0,046	0,052	0,038	0,040

#		C8:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18-1- cis/trans- $\Delta^9$	EPA	C14:0- AC	C16:0- CoA	C18-1- cis/trans- $\Delta^9$ -AC	EPA-AC
103	T	0,056	0,057	0,056	0,044	0,060	0,059	0,051	0,022	0,036	0,022	0,025
104	T	0,161	0,112	0,145	0,148	0,146	0,123	0,117	0,018	0,044	0,018	0,023
105	L	0,115	0,223	0,241	0,223	0,206	0,171	0,159	0,070	0,081	0,046	0,050
106	V	0,028	0,067	0,060	0,053	0,088	0,063	0,063	0,014	0,016	0,011	0,031
107	R	0,004	0,005	0,008	0,014	0,006	0,006	0,008	0,004	0,017	0,004	0,008
108	E	0,045	0,024	0,046	0,050	0,035	0,034	0,039	0,032	0,033	0,032	0,034
109	L	0,051	0,038	0,057	0,067	0,054	0,059	0,058	0,043	0,012	0,043	0,010
110	I	0,052	0,043	0,053	0,059	0,050	0,056	0,045	0,018	0,017	0,018	0,016
111	D	0,010	0,014	0,014	0,000	0,011	0,018	0,014	0,002	0,017	0,002	0,011
112	G	0,046	0,010	0,017	0,013	0,014	0,013	0,016	0,004	0,003	0,004	0,003
113	K	0,018	0,010	0,010	0,008	0,013	0,010	0,009	0,005	0,023	0,005	0,008
114	L	0,201	0,188	0,214	0,220	0,206	0,220	0,198	0,017	0,023	0,017	0,020
115	I	0,063	0,061	0,068	0,061	0,065	0,065	0,060	0,027	0,043	0,027	0,030
116	L	0,153	0,127	0,158	0,147	0,139	0,152	0,128	0,007	0,151	0,007	0,003
117	T	0,125	0,109	0,148	0,152	0,138	0,138	0,148	0,144	0,135	0,141	0,135
118	L	0,003	0,052	0,050	0,030	0,012	0,019	0,005	0,025	0,028	0,025	0,019
119	T	0,012	0,076	0,051	0,062	0,053	0,047	0,043	0,168	0,035	0,137	0,141
120	H	0,050	0,051	0,064	0,046	0,054	0,057	0,058	0,013	0,022	0,013	0,016
121	G	0,078	0,014	0,037	0,045	0,018	0,013	0,040	0,004	0,022	0,025	0,040
122	T	0,060	0,032	0,044	0,052	0,031	0,035	0,044	0,040	0,080	0,080	0,013
123	A	0,046	0,027	0,028	0,124	0,028	0,028	0,026	0,028	0,021	0,023	0,020
124	V	0,001	0,013	0,013	0,006	0,010	0,016	0,005	0,010	0,012	0,010	0,006
125	C	0,045	0,022	0,036	0,023	0,012	0,012	0,009	0,006	0,007	0,002	0,004
126	T	0,053	0,044	0,043	0,051	0,051	0,061	0,064	0,018	0,018	0,019	0,013
127	R	0,206	0,161	0,202	0,197	0,200	0,203	0,227	0,030	0,055	0,040	0,036
128	T	0,176	0,142	0,150	0,149	0,138	0,149	0,135	0,152	0,152	0,154	0,095
129	Y	0,468	0,436	0,506	0,516	0,497	0,516	0,485		0,505	0,513	0,022
130	E	0,140	0,131	0,158	0,158	0,139	0,142	0,139	0,185	0,201	0,181	0,193
131	K	0,139	0,136	0,153	0,165	0,139	0,159	0,142	0,332	0,152	0,161	0,010
132	E	0,085	0,086	0,094	0,094	0,099	0,107	0,097	0,019	0,019	0,020	0,028
133	A	0,022	0,019	0,019	0,008	0,022	0,022	0,032	0,028	0,023	0,024	0,032

CSP vērtības noteiktās robežās iekrāsotas attiecīgi zilā krāsā: 0,100 – 0,149; dzeltenā krāsā: 0,150 – 0,199; zaļā krāsā: > 0,200.

Ailes pelēkā krāsā – ķīmiskās nobīdes nav attiecinātas.



Grafisks atspoguļojums stabiņu diagrammas veidā pamatķēdes amīdu  $^1\text{H}$  un  $^{15}\text{N}$  CSP FABP3-ligandu kompleksiem KPi buferī (pH 7,6), 25 °C

A. C8:0. B. C12:0. C. C14:0. D. C16:0. E. C18:1-*cis/trans*- $\Delta^9$ . F. EPA. G. C8:0-AC. H. C12:0-AC. I. C14:0-AC. J. C16:0-AC. K. C18:1-*cis/trans*- $\Delta^9$ -AC. L. EPA-AC. Sarkana līnija parāda vidējo CSP vērtību plus viena standartnovirze. Aminoskābju atlikumi ar CSP vērtību virs sakārtnās līnijas uzskatītas par aminoskābju atlikumiem ar nozīmīgu ķīmisko nobīzi starpību.





**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 Struktūrbioģijas un zāļvielu dizaina laboratorijā (iepriekš Fizikāli Organiskās ķīmijas laboratorijā) *Dr. chem.* Kristapa Jaudzema vadībā. Doktorantūras laikā studējusi aprēķinu ķīmiju Cīrihes Universitātē (*InnovaBalt* projektā) un struktūrbioģiju 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.