



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie
Wydział Chemii

Paulina Wróbel

ROZPRAWA DOKTORSKA

"Badania strukturalne oddziaływania wybranych związków trójcyklicznych z nowymi wariantami β -laktoglobuliny posiadającymi modyfikacje w rejonie kieszeni wiążącej"

Praca wykonana w
Zakładzie Krystalochemii i Krystalofizyki UJ
w Zespole Biokrystalografii

pod kierunkiem
prof. dr hab. Krzysztofa Lewińskiego
oraz **dr Joanny Loch**

Kraków 2022

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania dla mojego promotora **prof. dr hab. Krzysztofa Lewińskiego** za poświęcony czas, cenne uwagi i sugestie, które wpłynęły na ostateczny kształt tej pracy oraz okazaną życzliwość i pomoc.

Dziękuję również mojej promotor pomocniczej **dr Joannie Loch** za możliwość prowadzenia badań pod jej kierownictwem i przekazaną przez te lata wiedzę, jak również za niezastąpioną pomoc w planowaniu doświadczeń i rozwiązywaniu problemów. Dziękuję za poświęcenie niezliczonych godzin nad sprawdzaniem kolejnych wersji tej pracy oraz za cenne wskazówki, motywację i cierpliwość.

Chciałabym złożyć również serdecznie podziękowania dla Pana **dr Piotra Bonarka** za pomoc podczas projektowania i wykonywania badań związanych z pomiarami biofizycznymi, za ogrom życzliwości i poświęcony czas podczas dyskusji i analizy otrzymanych wyników.

Składam również serdeczne podziękowania **pracownikom Zespołu Biokrytalografii**, w szczególności **dr hab. Katarzynie Kurpiewskiej** za wsparcie podczas pisania rozprawy doktorskiej oraz za cenne, merytoryczne uwagi.

Dziękuję również mojej rodzinie, przyjaciółom i Marcinowi za ogromne wsparcie i otuchę w trudnych chwilach oraz cierpliwość. Szczególnie dziękuję mojemu tacie, który zawsze wierzył w moje możliwości i motywował podczas tych lat.

Lista zastosowanych skrótów

- α 1aG** - *α 1-acid Glycoprotein*, α 1-kwaśna glikoproteina osocza
- AMT** - *Amitriptyline*, amitryptylina
- AMX** - *Amoxapine*, amoksapina
- ANS** - *8-Anilinonaphthalene-1-sulfonic acid*, kwas 8-anilinonaftalenosulfonowy
- BBP** - *Bilin-Binding Protein*, białko wiążące biline
- BLG** - *β -lactoglobulin*, β -laktoglobulina
- BSA** - *Bovine Serum Albumin*, surowicza albumina wołowa
- CD** - *Circular Dichroism*, dichroizm kołowy
- CET** - *Cetirizine*, cetyryzyna
- CLO** - *Clomipramine*, klomipramina
- CPZ** - *Chlorpromazine*, chlorpromazyna
- DES** - *Desipramine*, dezypramina
- DigA** - *Digoxigenin binding Anticalin*, antykalina wiążąca digoksygeninę
- DMSO** - *Dimethyl Sulfoxide*, dimetylosulfotlenek
- DOX** - *Doxepine*, doksepina
- FABP** - *Fatty Acid-Binding Protein*, białka wiążące kwasy tłuszczowe
- FLU** - *Fluphenazine*, flufenazyna
- FPLC** - *Fast Protein Liquid Chromatography*, szybka chromatografia cieczowa białek
- HSA** - *Human Serum Albumin*, ludzka albumina
- ICD** - *Induced Circular Dichroism*, indukowany sygnał CD
- IPTG** - *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*, izopropyl- β -d-1-tiogalaktopiranozyd
- KET** - *Ketotifen*, ketotifen
- LB** - *Lysogeny Broth*, pożywka LB (dosł. bulion lizogeny)
- LCN** - *Lipocalin*, lipokaliny
- mAB** - *monoclonal Antibody*, przeciwciała monoklonalne
- nanoDSF** - *nanoDifferential Scanning Fluorimetry*, różnicowa fluorymetria skaningowa
- NMR** - *Nuclear Magnetic Resonance*, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
- OD₆₀₀** - *Optical Density*, gęstość optyczna próbki mierzona przy długości fali 600 nm
- PCR** - *Polymerase Chain Reaction*, łańcuchowa reakcja polimerazy
- PDB** - *Protein Data Bank*, baza danych struktur białkowych
- PSMA** - *Prostate-Specific Membrane Antigen*, antygen błonowy specyficzny dla prostaty

RBP - *Retinol Binding Protein*, białka wiążące retinol

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecylu sodu

TLC - *Tear Lipocalin*, lipokalina-1

TRIS - *Tris(hydroxymethyl)aminomethane*, tris(hydroksymetylo)aminometan

VEGF-A - *Vascular Endothelial Growth Factor A*, czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego A

WT - *Wild Type*, dzika forma β -laktoglobuliny posiadająca mutację L1A/I2S

Abstrakt (PL)

Białka z rodziny lipokalin, w tym β -laktoglobulina, mogą być modyfikowane w celu zmiany ich powinowactwa do ligandów. Wykorzystując ukierunkowaną mutagenezę otrzymano nowe mutanty β -laktoglobuliny (BLG) o zmienionym kształcie kieszeni wiążącej. Nowe warianty BLG wykorzystywane w tej pracy: F105L/L39A/M107W (LAW), I56F/L39A/M107W (FAW), I56F/L39A/I71W (FA71W) oraz L58F/V92Y (58F/92Y), zostały zaprojektowane tak, aby dodatkowe reszty aromatyczne wprowadzone w rejonie hydrofobowej kieszeni wiążącej sprzyjały rozpoznawaniu i wiązaniu leków zawierających fragmenty aromatyczne.

Docelową grupą ligandów, których oddziaływanie z mutantami BLG badano, były leki przeciwpsychotyczne i przeciwdepresyjne, które są często przedawkowywane i mogą być toksyczne dla człowieka. Badane leki można podzielić na cztery grupy: (1) leki trójcykliczne z łańcuchem alifatycznym: amitryptylina (AMT), klomipramina (CLO), doksepina (DOX), (2) leki trójcykliczne zawierające cykliczny fragment alifatyczny: ketotifen (KET), amoksapina (AMX), (3) ligandy zawierające ugrupowanie fenotiazynowe: flufenazyna (FLU), chloropromazyna (CPZ) oraz (4) cetyryzyna (CET). Wszystkie nowe warianty testowano również pod kątem ich powinowactwa do nasyconych kwasów tłuszczowych (palmitynowego lub mirystynowego), które są uznawane za naturalne ligandy BLG.

Podstawową metodą badawczą zastosowaną w tej pracy była krystalografia rentgenowska, natomiast jej uzupełnieniem była spektroskopia dichroizmu kołowego (CD), która umożliwiła oszacowanie stałej dysocjacji (K_d) dla wybranych kompleksów białko-ligand oraz różnicowa fluorescencja w skali nano (nanoDSF), która umożliwiała wyznaczenie stabilności termicznej (T_m) mutantów.

Dla większości badanych kompleksów białko-lek otrzymano dobrej jakości kryształy, które pozwoliły na wyznaczenie wysokorozdzielczych struktur krystalicznych. Analiza wyników wykazała, że najmniej selektywnym wariantem BLG jest mutant FAW, który miał zdolność wiązania niemal wszystkich badanych leków (AMT, CLO, DOX, KET, FLU i CPZ). Wariant LAW okazał się najbardziej selektywnym mutantem, wiążącym jedynie związki z grupy fenotiazyn: FLU i CPZ. Wysoka selektywność LAW związana była m.in. z kształtem kieszeni wiążącej w formie apo. Wariant FA71W wykazywał selektywność pośrednią pomiędzy LAW, a FAW, a związane ligandy wymuszały niewielkie zmiany w położeniu łańcuchów bocznych we wnętrzu β -baryłki. Struktury kompleksów białko-ligand były stabilizowane głównie za pomocą oddziaływań hydrofobowych. Uzyskane przy pomocy CD stałe dysocjacji K_d wykazały, że nowe warianty BLG miały największe powinowactwo do związków zawierających układ fenotiazynowy.

Abstract (ENG)

Proteins of the lipocalin family, including β -lactoglobulin, can be modified to change their affinity for ligands. Using site-directed mutagenesis, new β -lactoglobulin (BLG) mutants with modified binding pockets were obtained. The new BLG variants used in this work: F105L/L39A/M107W (LAW), I56F/L39A/M107W (FAW), I56F/L39A/I71W (FA71W) and L58F/V92Y (58F/92Y), with additional aromatic residues introduced in the region of the hydrophobic binding pocket were designed to promote recognition and binding of drugs that contain aromatic fragments.

The antipsychotic and antidepressant drugs were selected for the studies of their interactions with BLG because these drugs are often overdosed and can be toxic to humans. The drugs can be divided into four groups: (1) tricyclic drugs with an aliphatic chain: amitriptyline (AMT), clomipramine (CLO), doxepin (DOX), (2) tricyclic drugs containing a cyclic aliphatic fragment: ketotifen (KET), amoxapine (AMX), (3) ligands containing a phenothiazine group: flufenazine (FLU), chlorpromazine (CPZ), and (4) cetirizine (CET). All new variants were also tested for their affinity to fatty acids (palmitic or myristic), which are considered natural BLG ligands.

The main research method used in this work was X-ray crystallography, which was complemented by circular dichroism spectroscopy (CD) to estimate the dissociation constant (K_d) for selected protein-ligand complexes, and by nanoscale differential scanning fluorescence (nanoDSF) to determine the thermal stability (T_m) of the mutants.

For most of the protein-ligand complexes, good quality crystals suitable for diffraction measurements were obtained. Analysis of the results showed that the lowest selectivity was observed for the FAW variant, which had the ability to bind almost all the drugs tested in this work: AMT, CLO, DOX, KET, FLU and CPZ. In contrast, the LAW variant proved to be the most selective binding only compounds from the phenothiazine group: FLU and CPZ. This high selectivity was related mostly to the shape of the binding pocket in the apo form of LAW. Moreover, the FA71W variant showed selectivity intermediate between LAW and FAW. The changes in the positions of side chains in β -barrel were observed. The main interactions that stabilized the protein-ligand complexes were hydrophobic interactions. All new BLG variants showed the highest affinity for compounds containing the phenothiazine system.

Spis treści

Podziękowania	2
Lista zastosowanych skrótów	3
Abstrakt (PL)	5
Abstract (ENG)	6
1. Wstęp	10
1.1. Właściwości i występowanie wołowej β -laktoglobuliny (BLG)	10
1.2. Struktura BLG	11
1.3. Przejście Tanforda	13
1.4. Kompleksy naturalnej β -laktoglobuliny z ligandami	14
1.4.1. Kompleks naturalnej β -laktoglobuliny z retinolem	15
1.4.2. Kompleksy naturalnej β -laktoglobuliny z kwasami tłuszczowymi	16
1.4.3. Kompleks naturalnej β -laktoglobuliny z witaminą D ₃	16
1.4.4. Kompleksy naturalnej β -laktoglobuliny z lekami	17
1.5. Miejsca wiązania ligandów w cząsteczce naturalnej β -laktoglobuliny	18
1.6. Potencjalne wykorzystanie lipokalin w medycynie	19
1.6.1. Antykaliny – zmodyfikowane lipokaliny	21
1.7. Rekombinowana wołowa β -laktoglobulina	22
1.7.1. Mutacje w kieszeni wiążącej rekombinowanej β -laktoglobuliny	22
1.7.2. Struktury przestrzenne nowych wariantów rekombinowanej β -laktoglobuliny	24
1.7.2.1. Warianty rekombinowanej BLG wiążące endogenne kwas palmitynowy	24
1.7.2.2. Kompleksy wariantów rekombinowanej β -laktoglobuliny z kwasem mirystynowym	25
1.7.2.3. Kompleksy nowych wariantów rekombinowanej β -laktoglobuliny z tetrakainą	26
1.7.2.4. Kompleksy nowych wariantów rekombinowanej β -laktoglobuliny z chloropromazyną	27
1.7.2.5. Kompleksy nowych wariantów rekombinowanej β -laktoglobuliny z dezypraminą	28
1.8. Nowe warianty rekombinowanej BLG oraz leki wybrane do badań	28
1.9. Metody badawcze wykorzystywane do monitorowania oddziaływań BLG-ligand	30
1.9.1. Zastosowanie krystalografii do badań kompleksów białko-ligand	30
1.9.2. Badania strukturalne oddziaływania trójcyklicznych leków z białkami	31
1.9.3. Zastosowanie dichroizmu kołowego do badań kompleksów białko-ligand	33
2. Cel pracy	35
3. Materiały i metody	36
3.1. Mutageneza	36

3.2. Przygotowanie komórek kompetentnych <i>E.coli</i> metodą chemiczną	36
3.3. Transformacja komórek kompetentnych metodą szoku cieplnego.....	36
3.4. Namnażanie i izolacja wektorów plazmidowych	37
3.5. Ekspresja nowych wariantów BLG	37
3.6. Oczyszczanie nowych wariantów BLG.....	37
3.7. Krystalizacja	38
3.8. Pomiary dyfraktometryczne oraz rozwiązywanie struktury	38
3.9. Dichroizm kołowy oraz pomiary stabilności termicznej	39
4. Wyniki.....	40
4.1. Mutageneza.....	40
4.2. Ekspresja i oczyszczanie nowych wariantów BLG	40
4.3. Pomiary stabilności termicznej nowych wariantów BLG	41
4.4. Krystalizacja nowych wariantów BLG z trójcyklicznymi lekami.....	42
4.5. Pomiary dyfraktometryczne i udokładnianie struktur	43
4.6. Wariant F105L/L39A/M107W (LAW)	47
4.6.1. Struktura formy bez liganda.....	47
4.6.2. Struktury kompleksów LAW-FLU oraz LAW-CPZ	47
4.6.3. Wyznaczanie stałej wiązania ligandów z pomocą CD.....	49
4.7. Wariant I56F/L39A/107W (FAW)	51
4.7.1. Struktura formy bez liganda (PDB id: 7Q17).....	51
4.7.2. Analiza struktury kompleksu FAW-AMT	51
4.7.3. Analiza struktury kompleksu FAW-CLO	52
4.7.4. Analiza struktury kompleksu FAW-DOX	53
4.7.5. Analiza struktury kompleksu FAW-KET	54
4.7.6. Analiza struktury kompleksu FAW-FLU	55
4.7.7. Analiza struktury kompleksu FAW-CPZ.....	55
4.7.8. Badanie oddziaływania wariantu FAW z ligandami za pomocą CD	56
4.8. Wariant I56F/L39A/I71W (FA71W).....	58
4.8.1. Struktura formy bez liganda.....	58
4.8.2. Analiza struktury kompleksu FA71W-CET	59
4.8.3. Analiza struktury kompleksu FA71W-KET	60
4.8.4. Analiza struktury kompleksu FA71W-AMX.....	61
4.8.5. Analiza struktury kompleksu FA71W-FLU	62
4.8.6. Analiza struktury FA71W-CPZ.....	62
4.8.7. Badanie oddziaływania wariantu FA71W z ligandami za pomocą CD	63
4.9. Wariant L58F/V92Y (58F/92Y).....	64

4.9.1. Analiza struktury kompleksu 58F/92Y-AMX	65
4.9.2. Badanie oddziaływania wariantu L58F/V92Y z ligandem za pomocą CD	66
4.10. Natywna forma białka	67
5. Dyskusja wyników	68
5.1. Wpływ mutacji na stabilność termiczną nowych wariantów BLG.....	68
5.2. Oddziaływanie trójcyklicznych leków z β -laktoglobuliną i innymi z białkami	70
5.2.1. Trójcykliczne leki z alifatycznym łańcuchem	71
5.2.2. Trójcykliczne leki z cyklicznym fragmentem alifatycznym.....	72
5.2.3. Pochodne fenotiazyny.....	73
5.2.4. Cetyryzyna.....	73
5.2.5. Wiązanie leków do β -laktoglobuliny monitorowane przy pomocy CD.....	74
5.3. Wpływ mutacji na selektywność wiązania w fazie krystalicznej wybranych leków do nowych wariantów BLG	76
5.3.1. Powinowactwo nowych wariantów BLG do kwasów tłuszczowych.....	77
5.3.2. Selektywność wiązania trójcyklicznych leków z łańcuchem alifatycznym (AMT, CLO, DOX) przez wariant FAW.....	78
5.3.3. Selektywność wiązania trójcyklicznych leków z cyklicznym, alifatycznym łańcuchem (KET, AMX)	81
5.3.4. Wiązanie pochodnych fenotiazyny	83
5.3.5. Selektywne wiązanie cetyryzyny w kieszeni wiążącej FA71W	85
5.3.6. Wiązanie amoksapiny do wariantu 58F/92Y	86
5.3.7. Zależność pomiędzy typem mutacji, a selektywnością wiązania	87
5.4. Nowe warianty BLG jako selektywne i specyficzne transportery leków	88
6. Wnioski.....	90
7. Podsumowanie	94
8. Bibliografia.....	95
9. Suplement do pracy	113

1. Wstęp

1.1. Właściwości i występowanie wołowej β -laktoglobuliny (BLG)

β -Laktoglobulina (BLG) jest małym, globularnym białkiem (Vetri & Militello 2005) występującym w mleku krowim oraz mleku innych przeżuwaczy (Duo et al. 2018). Stanowi ono około 50-55% wszystkich białek serwatkowych (H. C. Liu et al. 2007). β -Laktoglobulina po raz pierwszy została wyizolowana w 1934 roku przez A. H. Palmera (Palmer 1934). Pierwszą dyfrakcję promieni rentgenowskich na kryształach BLG odnotowano w 1938 roku, jednak strukturę białka z rozdzielczością 2.8Å wyznaczono dopiero w 1986 roku (Papiz et al. 1986). Pierwsze struktury wołowej β -laktoglobuliny, wykazały duże podobieństwo BLG do białek wiążących retinol, co pozwoliło na zaklasyfikowanie laktoglobuliny do białek z rodziny lipokalin (Crowther et al. 2016). Lipokaliny stanowią różnorodną grupę białek, z których większość wiąże małe, hydrofobowe ligandy (G. Kontopidis et al. 2004). Lipokaliny charakteryzują się niską homologią na poziomie sekwencji, zwykle od 30% do 40% podobieństwa, ale podobną strukturą trzeciorzędową (Klaver et al. 2020). Ze względu na wysoką zawartość BLG w serwatce mleka krowiego oraz łatwość jej oczyszczania, bydlęca BLG stanowi modelowe białko wielu badań biofizycznych, dotyczących m.in. fałdowania czy stabilności. Do tej pory jednak, nie udało się jednoznacznie ustalić fizjologicznej funkcji laktoglobuliny (Crowther et al. 2016). BLG może brać udział w regulacji enzymów oraz nabywaniu biernej odporności u noworodków (cieląt) (G. Kontopidis et al. 2004). Podejrzewa się również, że BLG może wpływać na odpowiedź immunologiczną oraz proliferację komórek (C. Tai et al. 2016). Możliwe jest także, że białko mogło stracić swoją podstawową funkcję w trakcie ewolucji i obecnie wykazuje jedynie właściwości odżywcze (J. I. Loch et al. 2012).

Ze względu na zdolność do wiązania w β -baryłce szerokiej grupy hydrofobowych ligandów, tj. kwasów tłuszczowych i ich pochodnych, witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, związków fenolowych, (J. I. Loch et al. 2013), leków (Shahraki & Shiri 2018), a także karotenoidów (C. Liu et al. 2018) przypuszcza się, że BLG jest zaangażowana w ich transport oraz wychwyt w organizmie źródłowym (G. Kontopidis et al. 2004). Dodatkowo BLG wykazuje duże możliwości wykorzystywania jako potencjalny transporter środków terapeutycznych (Bijari et al. 2019). Zdolność do wiązania chemioterapeutyków (Leilabadi-Asl et al. 2018) oraz tworzenia nanocząstek (Shafaei et al. 2017) pozwala przypuszczać, że może ona stanowić obiecujący system dostarczania leków. Inne badania pokazują, że BLG wykazuje właściwości przeciwutleniające, prawdopodobnie dzięki wolnej grupie tiolowej Cys121 (H. C. Liu et al. 2007). Bydlęca BLG jest odporna na proteolizę, a także jest stabilna przy niskim pH, przez co w większości pozostaje nienaruszona po przejściu przez żołądek (Qin et al. 1998). Wysoka termoodporność przy bardzo niskim pH ok.1, łatwość wiązania ligandów oraz fakt, że BLG jest jednym ze składników mleka dodatkowo pozwala sugerować, że białko to może być idealnym

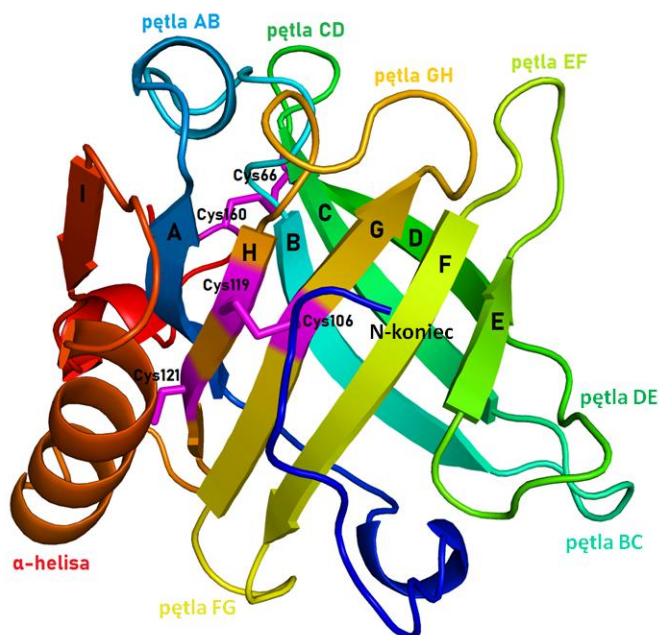
narzędziem molekularnym do doustnego dostarczania leków. Wadą może być fakt, że jest ono głównym alergenem mleka (Labra-Núñez et al. 2021) (Olivier et al. 2012). Jednak kilka ostatnich badań wykazało możliwość obniżenia immunogenności BLG poprzez zastosowanie metod fizycznych, chemicznych, bądź poprzez zastosowanie inżynierii genetycznej (Varlamova & Zaripov 2020) (Kanjarawi et al. 2011) (El Mecherfi et al. 2015). Wśród nich wyróżnić można: kowalencyjne przyłączanie fragmentów glikolu polietylenowego (PEG) (Luo et al. 2019), glikację bądź nieenzymatyczną glikozylację (S. Yang et al. 2020) oraz zastosowanie nanodispersyjnych systemów *Solid-in-Oil* (S/O) (Kitaoka et al. 2020). Jedną z możliwych metod obniżenia alergenicności BLG jest również mutageneza, np. alanina w pozycji 86 zastąpiona glutaminą eliminuje niektóre epitopy ze struktury białka (Kazem-Farzandi et al. 2015).

Do tej pory opisano co najmniej jedenaście naturalnych odmian BLG (Crowther et al. 2016). W krowim mleku zidentyfikowano kilka izoform β -laktoglobuliny, jednak najpowszechniejsze są warianty A i B. Wariant B różni się od wariantu A sekwencją aminokwasową w dwóch pozycjach: 64 (Asp_A → Gly_B) oraz 118 (Val_A → Ala_B) (J. I. Loch et al. 2013). Zmiany te skutkują różnicami we właściwościach biofizycznych i biochemicznych m.in. różnej wartości pI, stabilności cieplnej, temperatury i szybkości denaturacji, wrażliwości na związki chemiczne oraz powinowactwa do kwasów tłuszczowych (Varlamova & Zaripov 2020). Dodatkowo wykazano, że odpowiedź immunologiczna u myszy jest silniejsza na wariant B niż na wariant A (Oliveira et al. 2001). Pomimo zmian w sekwencji aminokwasowej, oba warianty nie wykazują istotnej zmiany w strukturze przestrzennej (Bello 2020).

1.2. Struktura BLG

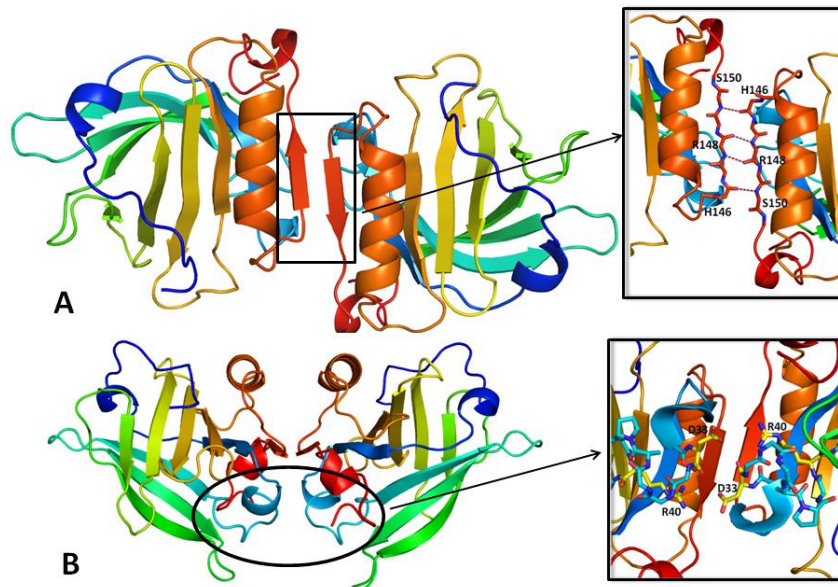
Głównym elementem strukturalnym oraz miejscem wiązania ligandów w cząsteczce BLG jest β -baryłka zbudowana z 8 wstęg antyrównoległego arkusza β . Pierwszą część arkusza β stanowią nici A-D, natomiast drugą, przeciwną nici E-H (G. Kontopidis et al. 2004). Dziewiąta nić I bierze udział w tworzeniu dimeru (J. I. Loch et al. 2013) wraz z pętlą łączącą nici A i B (Crowther et al. 2016) (**Rysunek 1**). Gęste upakowanie łańcuchów bocznych w obszarze N-końcowym oraz w dolnej części białka prowadzi do utworzenia hydrofobowej wnęki we wnętrzu β -baryłki. Przeciwna strona β -baryłki, otoczona jest natomiast czterema elastycznymi pętlami AB, CD, EF oraz GH, które stanowią wejście do miejsca wiążącego (G. Kontopidis et al. 2004) (**Rysunek 1**). W strukturze BLG występuje również α -helisa, położona po zewnętrznej stronie β -baryłki (Crowther et al. 2016). Jest ona częścią pętli HI i stanowi element motywu β - α - β z udziałem nici H oraz I (J. Loch et al. 2011). Krótsze helisy 3_{10} położone są w C- i N-końcowych fragmentach BLG. Dodatkowo helisa 3_{10} umiejscowiona jest w długiej pętli AB i wraz z nicią I znajduje się na styku dimeru (**Rysunek 2**) (Uhrínová et al. 2000).

Każdy monomer laktoglobuliny zawiera pięć reszt cysteinowych (**Rysunek 1**). Cztery z nich uczestniczą w tworzeniu mostków disiarczkowych. Pierwszy pomiędzy Cys66, a Cys160 łączy C-koniec z pętlą CD, natomiast drugi, pomiędzy Cys106, a Cys119 łączy nici G i H (Uhrínová et al. 2000). W natywnej formie białka wolna grupa tiolowa pochodząca z Cys121 ukryta jest w hydrofobowej wnęce pomiędzy α -helisą, a β -baryłką (Miriani et al. 2014) i zwykle nie uczestniczy w tworzeniu wiązań disiarczkowych (Uhrínová et al. 2000). Odpowiednie rozmieszczenie mostków disiarczkowych jest kluczowe dla prawidłowego fałdowania BLG (Crowther et al. 2016) (**Rysunek 1**).



Rysunek 1. Struktura wołowej BLG z zaznaczonymi wstęgami A-I, pętlami oraz resztami Cys (różowy).

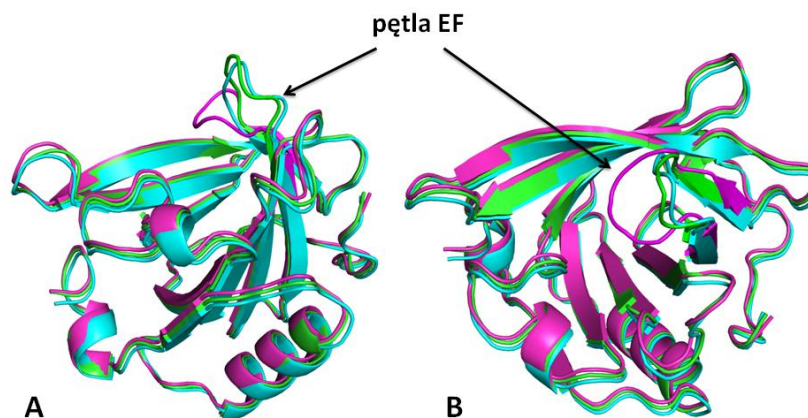
W warunkach fizjologicznych BLG występuje w formie dimeru. Interfejs dimeru składa się z dwóch nici I oraz fragmentów dwóch pętli AB. Pomiedzy wstęgami I tworzą się cztery wiązania wodorowe, natomiast pomiedzy pętlami AB występuje przyciąganie elektrostatyczne (tj. mostki solne) między dodatnio naładowaną Arg40 oraz ujemnie naładowaną Asp33 (**Rysunek 2**) (Sakurai & Goto 2002). Poniżej pH 3 BLG ulega dysocjacji na monomery o masie cząsteczkowej 18.4 kDa, składające się ze 162 aminokwasów (Oliveira et al. 2001). Co ciekawe, monomer białka zachowuje swoją natywną konformację (sfałdowanie) nawet w pH 2 (Kuwata et al. 2008). W zależności od temperatury, pH oraz stężenia soli, BLG może występować w formie monomeru, dimeru lub oktameru (Gottschalk et al. 2003).



Rysunek 2. (A) Struktura dimeru BLG z zaznaczonymi resztami tworzącymi wiązania wodorowe oraz (B) tworzącymi mostki solne.

1.3. Przejście Tanforda

Wejście do β -baryłki BLG otaczają cztery bardzo elastyczne pętle: AB, CD, EF oraz GH. Pętle BC, DE oraz FG znajdują się w dolnej części baryłki (*Rysunek 1*) i wykazują znacznie mniejszą elastyczność konformacyjną. Wołowa β -laktoglobulina przyjmuje różne stany konformacyjne w zależności od pH (Qin et al. 1998). Przejściem Tanforda nazywamy zmiany konformacyjne bydlęcej BLG przy pH ok. 7, które pierwotnie zostały zidentyfikowane na podstawie optycznej dyspersji rotacyjnej oraz dostępności grup tiolowych (Qin et al. 1998) (Sakurai & Goto 2006). Porównując struktury krystaliczne przy pH 6.2, 7.1 oraz 8.2 stwierdzono, że za przejście Tanforda odpowiadają konformacyjne zmiany w pętli EF (reszty 85-90) (Qin et al. 1998) (*Rysunek 3*). Pętla EF działa jak swego rodzaju „pokrywka”, która w zależności od pH otwiera bądź zamyka wejście do kieszeni wiążącej. Zmiany konformacyjne zależne od pH obejmują również pętlę GH (Sakurai & Goto 2006).



Rysunek 3. (A) Widok z boku oraz (B) widok z góry na pozycje pętli EF w strukturze BLG w zależności od pH. Struktura w pH 6.2 (PDB id: 3BLG, kolor różowy) przedstawia pętlę EF w konformacji zamkniętej, natomiast struktury w pH 7.1 (PDB id: 1BSY, kolor zielony) oraz pH 8.2 (PDB id: 2BLG, kolor błękitny) z pętlą EF w otwartej konformacji.

Przy niskich wartościach pH pętla EF znajduje się w pozycji zamkniętej i blokuje wejście do baryłki, a tym samym utrudnia związanie liganda w hydrofobowej wnęce. Taka konformacja pętli stabilizowana jest głównie poprzez oddziaływania wodorowe pomiędzy grupą karboksylową Glu89 (anormalne pK_a 7.3), a grupą karbonylową Ser116 (Bello 2020). W $pH > 7$ pętla EF występuje w konformacji otwartej, dając swobodny dostęp do kieszeni wiążącej. Postawiono zatem hipotezę, że w warunkach zbliżonych do tych, panujących w żołądku pętla EF zamyka β -baryłkę w celu ochrony przed kwaśnym środowiskiem związanego we wnętrzu liganda. Natomiast w zasadowym środowisku, takim jakie panuje w dwunastnicy pętla otwiera się, umożliwiając swobodny dostęp do liganda. Potwierdzeniem tej hipotezy może być fakt, że we wszystkich rozwiązanych do tej pory strukturach przy $pH > 7$, zarówno z ligandem, jak i bez liganda pętla EF występuje w otwartej konformacji (Labra-Núñez et al. 2021).

W najnowszych badaniach uzyskano jednak kompleks BLG-SDS w środowisku kwaśnym (pH 4.2). Otrzymano kryształy w grupie przestrzennej $P22_12_1$, które rozpraszały promieniowanie do 2.4 Å. Rozwiązana struktura pokazała, że pętla EF pomimo obecności liganda pozostaje zamknięta i dodatkowo oddziałuje z polarną grupą liganda. Co ciekawe, poza ligandem związanym w baryłce, jedna cząsteczka SDS została zlokalizowana również w przestrzeni interfejsu dimeru (Labra-Núñez et al. 2021).

W celu dokładniejszego zbadania zjawiska przejścia Tanforda, poza metodami krystalograficznymi (Qin et al. 1998), wykorzystano również spektroskopię NMR (Sakurai & Goto 2006) oraz symulacje komputerowe MD (*ang. Molecular Dynamics Simulations*) (Bello 2020) (Fogolari et al. 2005). Symulacje komputerowe potwierdzają, że konformacja pętli EF zależy od protonacji/deprotonacji Glu89 (Fogolari et al. 2005). Z badań NMR wynika natomiast, że przejście Tanforda może być bardziej złożonym zjawiskiem, w który poza pętlą EF zaangażowana jest również pętla GH oraz wiązania wodorowe między resztami Ile84, Asn90 i Glu108. Przed zmianą konformacyjną pętli EF dochodzi do nietypowej zmiany w konformacji pętli GH w trakcie kontaktu z pętlą EF. Wzrost pH powoduje deprotonację grup karboksylowych i zerwanie wiązań wodorowych, a tym samym „otwarcie” baryłki (Sakurai & Goto 2006) (Sakurai et al. 2009).

1.4. Kompleksy naturalnej β -laktoglobuliny z ligandami

Pierwsze wzmianki o ligandzie związanym z BLG pojawiły się w pracy Davisa i Dubosa z 1947. Odkryli oni, że laktoglobulina wiąże, słabiej niż surowicza albumina, kwas oleinowy (Davis & Dubos 1947). Dwa lata później McMeekin opisał wiązanie dodecylosiarczanu sodu (SDS) do natywnej formy BLG (McMeekin et al. 1949). Od tego czasu wykazano, że laktoglobulina może wiązać w baryłce wiele hydrofobowych ligandów np. retinol, kwasy tłuszczowe i ich pochodne, witaminę D, cholesterol, kurkuminę, protoporfirynę IX, związki aromatyczne, katechiny (Le Maux et al. 2014). Jednak za naturalne ligandy BLG uważa się kwas

palmitynowy oraz retinol, które wiązane są z porównywalnym powinowactwem (J. I. Loch et al. 2012).

1.4.1. Kompleks naturalnej β -laktoglobuliny z retinolem

Motyw strukturalny występujący w rdzeniu β -laktoglobuliny jest bardzo podobny do tego, występującego w białku wiążącym retinol (RBP *ang. Retinol Binding Protein*) (Taheri-Kafrani et al. 2008). Pierwsze porównania sekwencji aminokwasowej wołowej BLG z ludzkim białkiem wiążącym retinol wykazały homologię na poziomie 25%. Pozwoliło to przypuszczać, że laktoglobulina może być zaangażowana w transport i metabolizm retinolu (Godovac-Zimmermann et al. 1985). W 1972 po raz pierwszy korzystając z pomiarów fluorescencji wykazano, że laktoglobulina, podobnie jak RBP tworzy rozpuszczalne w wodzie kompleksy z retinolem (Pérez & Calvo 1995). Pierwsza hipoteza dotycząca sposobu wiązania retinolu bazowała na analizach krystalograficznych. Sugerowano, że retinol jest głęboko związany w β -baryłce i oddziałuje z resztami Trp19 oraz Lys70 (Papiz et al. 1986). Bazując na badaniach w roztworze, drugim zaproponowanym miejscem wiązania retinolu była hydrofobowa wnęka znajdująca się na powierzchni kieszeni wiążącej pomiędzy β -baryłką, a α -helisą (Pérez & Calvo 1995).

Zdeponowana w PDB struktura kompleksu BLG-retinol (PDB id: 1GX8) wykazała, że retinol jest wyraźnie widoczny w centralnym miejscu hydrofobowej wnęki. W odróżnieniu od hydrofobowej części retinolu, hydrofilowy „ogon” liganda jest słabiej widoczny na mapie gęstości elektronowej. Ligand wymusza również zmiany pozycji łańcuchów bocznych Phe105 oraz Met107. W przedstawionej strukturze jedynym wiązaniem wodorowym pomiędzy ligandem, a białkiem, jest wiązanie pomiędzy grupą hydroksylową retinolu, a Glu62 (G. Kontopidis et al. 2002). Wołowa BLG wykazuje również zdolność do wiązania pochodnych retinolu np. kwasu retinowego (Zsila et al. 2002), octanu retinolu (Dufour & Haertlé 1991), immobilizowanego *trans*-retinalu (Jang & Swaisgood 1990) oraz β -jononów (Dufour & Haertlé 1991). Miejsca wiązania retinoidów w cząsteczce BLG wciąż budzą kontrowersje, gdyż niektóre analizy wskazują, że kwas palmitynowy i retinol konkurują o to samo miejsce wiązania (G. Kontopidis et al. 2002), natomiast inne sugerują, że ligandy wiążą się w różnych miejscach (Frapin et al. 1993). Kolejne badania wiązania ligandów wykazały, że ko-krystalizacja BLG z mieszaniną retinol/kwas palmitynowy sprzyja wiązaniu kwasu tłuszczowego w baryłce (G. Kontopidis et al. 2002). Cząsteczka kwasu w przeciwieństwie do retinolu jest w stanie wnikać głębiej do kieszeni wiążącej, przez co zwiększa się liczba oddziaływań hydrofobowych stabilizujących kompleks (G. Kontopidis et al. 2002).

1.4.2. Kompleksy naturalnej β -laktoglobuliny z kwasami tłuszczowymi

W 1970 roku Spector i Fletcher wykazali, że BLG oddziałuje *in vivo* z kwasami tłuszczowymi. Powinowactwo do liganda maleje zgodnie z kolejnością: kwas palmitynowy (C16), kwas stearynowy (C18), kwas oleinowy (C18) oraz kwas laurynowy (C12) (Spector & Fletcher 1970). Jak wcześniej wspomniano kwas palmitynowy uważany jest za naturalny ligand β -laktoglobuliny. BLG może jednak wiązać również inne kwasy składające się z 8-20 atomów węgla (J. I. Loch et al. 2012). Badania strukturalne kompleksów BLG-kwas palmitynowy wykazały, że 16-węglowy kwas palmitynowy związany jest we wnętrzu β -baryłki i dobrze odpowiada geometrii kieszeni wiążącej (J. I. Loch et al. 2012). Ligand przyjmuje wydłużoną geometrię (J. I. Loch et al. 2012) oraz konformację *gauche* (J. I. Loch et al. 2012) (G. Kontopidis et al. 2002). Kwas palmitynowy tworzy wiązania wodorowe z polarnymi resztami znajdującymi się w pętli CD tj. Glu62 oraz Lys69. Reszty te oddziałują również między sobą (J. I. Loch et al. 2012).

Badania przeprowadzone dla innych kwasów tłuszczowych: stearynowego, mirystynowego oraz laurynowego wykazały, że sposób wiązania jest taki sam jak dla kwasu palmitynowego (J. I. Loch et al. 2012). Pojedyncza cząsteczka liganda związana jest w hydrofobowej wnęce. Łańcuch węglowodorowy znajduje się we wnętrzu baryłki, natomiast grupa karboksylowa zlokalizowana jest przy wejściu do kieszeni wiążącej (J. I. Loch et al. 2012). Ze względu na różne długości łańcucha węglowodorowego, a tym samym inną pozycję grupy karboksylowej przy wejściu do baryłki, obserwuje się odmienne oddziaływania białko-ligand. Dla kwasu stearynowego wiązanie wodorowe występuje jedynie z resztą Glu62, w kompleksie BLG-kwas mirystynowy z resztą Lys69 oraz cząsteczką wody, natomiast w przypadku kwasu laurynowego z Glu62 oraz Lys69 (J. I. Loch et al. 2012).

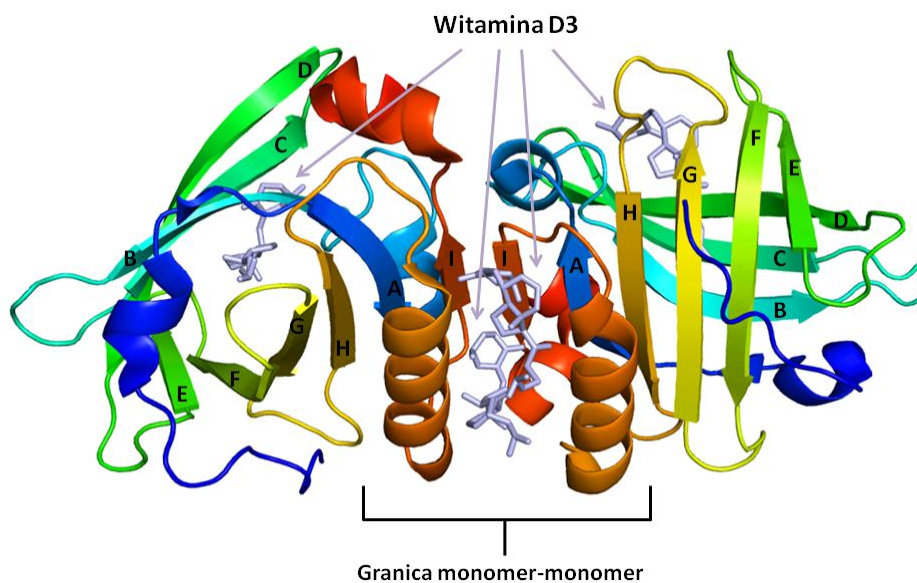
Przez długi czas uważano, że kwasy tłuszczowe zbudowane z mniej niż 12 atomów węgla nie wiążą się do BLG (Frapin et al. 1993). Badania krystalograficzne oraz spektroskopowe pokazały jednak, że istnieją kompleksy z krótkimi 8- i 10-węglowymi kwasami tłuszczowymi: kaprylowym oraz dekanowym. W obu przypadkach ligand jest związany w hydrofobowej kieszeni wiążącej (J. Loch et al. 2011). BLG wykazuje również duże powinowactwo do długołańcuchowych nienasyconych kwasów tłuszczowych m.in. 18-węglowego kwasu oleinowego i linolowego (J. I. Loch et al. 2013), *cis*-linolenowego oraz γ -linolenowego (Frapin et al. 1993). Wykazano, że powinowactwo dla nienasyconych kwasów tłuszczowych w konformacji *cis* jest wyższe niż dla izomerów *trans* (Frapin et al. 1993).

1.4.3. Kompleks naturalnej β -laktoglobuliny z witaminą D₃

Przez długi czas miejsce wiązania witaminy D₃ budziło pewne kontrowersje. Większość badań wskazywała na typowe wiązanie w β -baryłce (M. C. Yang et al. 2008). Jednak niektóre

badania w roztworze sugerowały, że może istnieć inne miejsce wiązania, o niższym powinowactwie do hydrofobowych ligandów, znajdujące się na zewnętrznej stronie β -baryłki (Narayan & Berliner 1998) (Q. Wang et al. 1997). Badania w roztworze wykazały, że w przypadku kwasu palmitynowego oraz retinolu maksymalna stechiometria wiązania białko-ligand wynosiła 1:1 podczas gdy dla kompleksu BLG-witamina D₃ stechiometria była równa 1:2 (Q. Wang et al. 1997). Podobne obserwacje przedstawiono również w innej pracy (M. C. Yang et al. 2008). Dodatkowo, badania prowadzone przy różnym pH pokazały, że dla pH mniejszego od 6, pętla EF pozostaje w konformacji zamkniętej i zgodnie z oczekiwaniami, zdolność wiązania retinolu i kwasu palmitynowego zmniejsza się. Natomiast w tych samych warunkach białko nadal wykazywało zdolność wiązania witaminy D₃ (M. C. Yang et al. 2008). Uzyskane wyniki sugerowały dwie możliwości: BLG wiąże dwie cząsteczki liganda w tym samym miejscu, bądź białko posiada drugie, alternatywne miejsce wiązania (M. C. Yang et al. 2008).

Do tej pory jedyną strukturą krystaliczną, potwierdzającą alternatywne miejsce wiązania naturalnej β -laktoglobuliny jest struktura BLG z witaminą D₃ (M. C. Yang et al. 2008). Z badań krystalograficznych wynika, że jedna cząsteczka witaminy D₃ związana jest w β -baryłce, natomiast druga cząsteczka związana jest w pobliżu C-końca między α -helisą, a wstęgą I w pobliżu reszt 136-149, na granicy monomer-monomer (**Rysunek 4**). Struktura ta została zdeponowana w PDB (PDB id: 2GJ5) (M. C. Yang et al. 2008).



Rysunek 4. Struktura kompleksu BLG-witamina D₃ (kolor jasnofioletowy, reprezentacja patyczkowa). Ligand w kieszeni wiążącej oraz na powierzchni białka (PDB id: 2GJ5) (M. C. Yang et al. 2008).

1.4.4. Kompleksy naturalnej β -laktoglobuliny z lekami

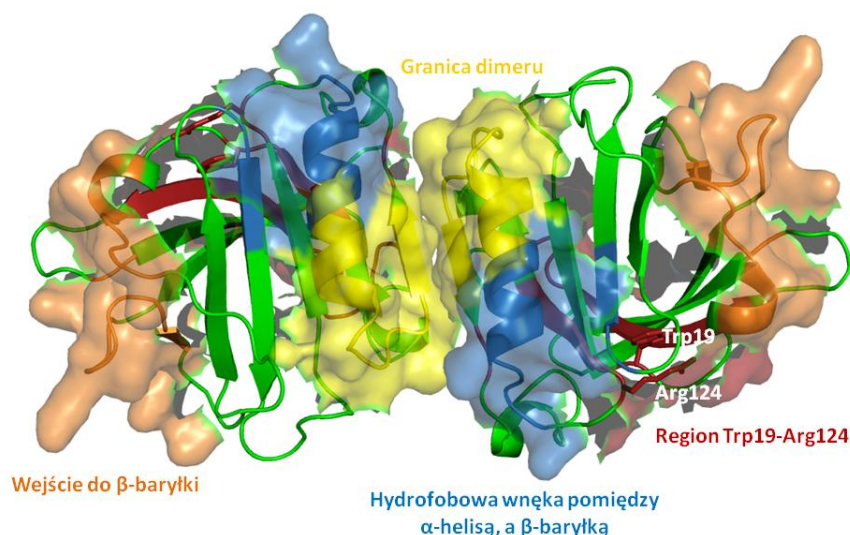
β -Laktoglobulina jako białko należące do rodziny lipokalin posiada zdolność do wiązania i transportu różnych leków. Ta cecha BLG sprawia, że jest ona interesującym obiektem do potencjalnego wykorzystania jako nowy typ transporterów leków (Richter et al. 2014). Wśród leków wiążących się do BLG można wyróżnić leki znieczulające tj. tetrakainę oraz pramoksynę

(J. I. Loch et al. 2015), antybiotyki takie jak doksorubicyna (Agudelo et al. 2012), kanamycyna oraz cyprofloksacyna (Mehraban et al. 2017), leki psychotyczne np. chlorpromazyna (Bhattacharyya & Das 2001), leki przeciwnowotworowe: oksaliplatyna (Ghalandari et al. 2015), fluorouracyl (5-FU) oraz kompleksy palladu (Leilabadi-Asl et al. 2018), chemioterapeutyki np. norfloksacyna (Paul et al. 2014), pochodne kurkuminy jako potencjalne leki przeciwcukrzycowe (Yousefi et al. 2021) oraz metalo-leki tj. *cis*-platyna (Paquin et al. 2015).

Mimo wielu doniesień przedstawiających oddziaływanie β -laktoglobuliny z lekami, w większości są to badania oddziaływania w roztworze bądź teoretyczne symulacje komputerowe. Wśród zdeponowanych struktur w PDB wyróżnić można jedynie strukturę kompleksu naturalnej BLG z tetrakiną (PDB id: 4Y0P) oraz pramoksyną (PDB id: 4Y0Q, 4Y0R) (J. I. Loch et al. 2015). Analiza tych struktur wykazała, że β -baryłka zapewnia odpowiednie środowisko do wiązania 6-węglowych pierścieni aromatycznych oraz, że związanie liganda nie wpływa na konformację łańcucha głównego (J. I. Loch et al. 2015).

1.5. Miejsca wiązania ligandów w cząsteczce naturalnej β -laktoglobuliny

Jak u większości lipokalin, głównym miejscem wiązania BLG jest hydrofobowe wnętrze β -baryłki, w której mieści się zwykle pojedyncza cząsteczka liganda. Zostało to potwierdzone przez liczne badania spektroskopowe (Vanaei et al. 2020), (Al-Shabib et al. 2020), (Zhan et al. 2020), kalorymetryczne (Zhan et al. 2020) (J. Loch et al. 2011) (J. I. Loch et al. 2012) (J. I. Loch et al. 2013) oraz krystalograficzne (J. I. Loch et al. 2015). Wciąż jednak, niektórzy autorzy postulują, że naturalna β -laktoglobulina posiada również inne, dodatkowe miejsca wiązania zlokalizowane poza główną kieszenią wiążącą (Domínguez-Ramírez et al. 2013) (Xu et al. 2019) (Cho et al. 1994) (**Rysunek 5**).



Rysunek 5. Struktura dimeru BLG z zaznaczonymi alternatywnymi miejscami wiążącymi (J. I. Loch et al. 2022).

Za pierwsze dodatkowe miejsce wiązania β -laktoglobuliny uważa się miejsce na granicy dimeru pomiędzy α -helisą, a wstęgą I w okolicach reszt 139-146. Pierwszą strukturą krystaliczną

naturalnej BLG potwierdzającą ligand związany na zewnątrz baryłki jest struktura kompleksu z witaminą D₃ (**Rysunek 3**) (M. C. Yang et al. 2008). W ostatnich badaniach wykazano również, że w środowisku kwasowym (pH 4.2) jedna cząsteczka SDS została związana poza baryłką (Labra-Núñez et al. 2021). Interfejs dimeru, jest również miejscem, w którym wykryto wiązanie dezypraminy, trójcyklicznego leku antydepresyjnego w strukturze mutantów rekombinowanej β -laktoglobuliny (J. I. Loch et al. 2022).

Z badań prowadzonych w roztworze przy użyciu wygaszenia fluorescencji wykazano, że wiązanie kwasu foliowego zachodzi w hydrofobowej wnęce pomiędzy α -helisą, a β -baryłką (Liang & Subirade 2012). Ten sam region odnotowano dla wiązania oligosacharydów (Birch et al. 2021). Brakuje jednak jakichkolwiek struktur krystalicznych potwierdzających tę hipotezę. Na podstawie badań fluorescencyjnych, dichroizmu kołowego, badań spektroskopowych oraz metod obliczeniowych wykazano, że związki należące do grupy antrachinonów (reina, emodyna, chryzofanol) wiązały się w pobliżu Trp19 i Arg124 (Xu et al. 2019). Podobne wyniki otrzymano dla resweratolu, związku polifenolowego (Zhang et al. 2014). Wysokorozdzielcza struktura krystaliczna mutanta rekombinowanej β -laktoglobuliny I56F z tetrakainą ujawniła, że ligand związany był w pobliżu Trp19 i Arg124, natomiast ligand nie występował w kieszeni β -baryłki (J. I. Loch et al. 2021).

Na podstawie badań spektroskopowych oraz metod obliczeniowych wykazano, że organiczny związek ANS wiąże się do kolejnego postulowanego miejsca wiązania ligandów, którym jest region przy wejściu do β -baryłki (Collini et al. 2003). Potwierdzeniem tej hipotezy są otrzymane struktury krystaliczne mutantów rekombinowanej BLG z dezypraminą. Pokazują one, że ligand może jednocześnie występować w kieszeni wiążącej, przy wejściu do β -baryłki oraz na styku dimerów (J. I. Loch et al. 2022).

1.6. Potencjalne wykorzystanie lipokalin w medycynie

Wołowa β -laktoglobulina należy do rodziny lipokalin – różnorodnych, małych białek, które zazwyczaj przechowują lub transportują wrażliwe chemicznie oraz słabo rozpuszczalne związki biologiczne m.in. witaminy, hormony steroidowe, substancje zapachowe oraz różne metabolity wtórne (Dartt 2011). Lipokaliny stanowią dużą grupę różnorodnych białek o niskiej masie cząsteczkowej (18-40kDa) (Dartt 2011). Posiadają one od 100 do 300 reszt aminokwasowych i działają głównie pozakomórkowo (Du et al. 2015). Lipokaliny zawierają zwykle jeden lub dwa mostki disiarczkowe, jednak istnieją też lipokaliny, które są ich pozbawione (Hohlbaum & Skerra 2007).

Białka z rodziny lipokalin należą do nadrodziny białek nazywanych kalcynami (Dartt 2011). Występują zarówno u eukariotów jak i u prokariotów, jednak znaleziono je głównie u kręgowców (Dartt 2011). Poza lipokalinami należą do niej białka wiążące kwasy tłuszczowe, awidyny oraz inhibitory metaloproteinaz (Dartt 2011). Białka te są szeroko rozpowszechnione

i pełnią ważne funkcje biologiczne w różnych organizmach od bakterii po ludzi (Dartt 2011). Lipokality oprócz podstawowej funkcji jaką jest transport różnych związków, związane są z wieloma procesami biologicznymi. Niektóre z nich są związane z zaburzeniami patofizjologicznymi, dlatego mogą być wykorzystywane jako potencjalne cele terapeutyczne (Schlehuber & Skerra 2005).

W ludzkim genomie do tej pory zidentyfikowano geny 37 lipokality (Du et al. 2015). U ludzi lipokality stanowią białka wydzielnicze, które występują między innymi w osoczu krwi, łzach oraz innych płynach ustrojowych w tym także w wydzielinach narządów płciowych (Schiefner & Skerra 2000). Niektóre z tych białek można przypisać do pewnych klas i tak na przykład białka oznaczone symbolem FABP są to lipokality wiążące kwasy tłuszczowe, ORM są to białka osocza transportujące leki i inne substancje, natomiast białka RBP wiążą retinol (Du et al. 2015). Ludzkie lipokality występują w osoczu oraz innych płynach tkankowych jako rozpuszczalne białka w stężeniu do 1 mg/ml. Ich swobodna dystrybucja w ciele decyduje o możliwości ich potencjalnego wykorzystania jako białek nośnikowych (Hohlbaum & Skerra 2007). Oprócz wykorzystania ich zdolności do wiązania małych ligandów, lipokality stanowią również dobrą bazę do projektowania rekombinowanych białek wiążących, nazywanych antyklinami (Achatz et al. 2022).

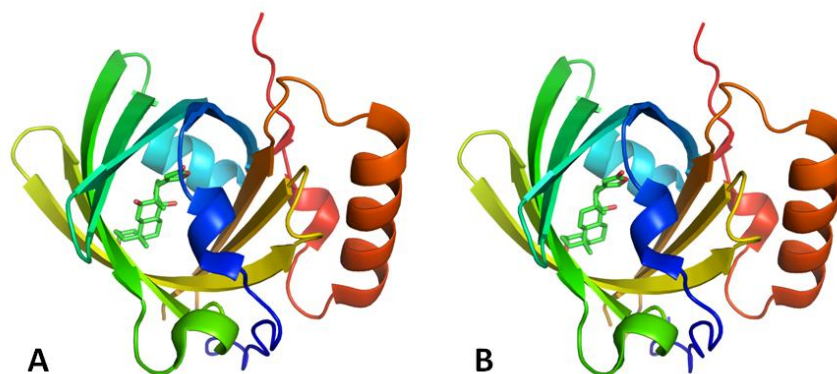
W porównaniu do przeciwciał wykorzystywanych w terapii wielu chorób (Lu et al. 2020), antykality które mogą stanowić ich alternatywę wykazują szereg zalet (Rothe & Skerra 2018). Rozmiar lipokality jest znacznie mniejszy niż immunoglobulin przez co penetracja przez tkanki jest łatwiejsza. Mały, pojedynczy łańcuch polipeptydowy zapewnia szereg korzyści w inżynierii białek, medycynie i biotechnologii. Przeciwciała natomiast zbudowane są z dwóch łańcuchów: lekkiego i ciężkiego (Achatz et al. 2022). Co więcej, dzięki czterem elastycznym, zmiennym strukturalnie pętłom miejsce wiązania lipokality jest łatwiejsze do modyfikacji (Deuschle et al. 2021). Tylko niewielka liczba lipokality jest glikozylowana, zatem mogą być z łatwością wytwarzane z wykorzystaniem mikrobiologicznych systemów ekspresyjnych, podczas gdy glikozylowane przeciwciała wymagają drogich hodowli eukariotycznych, których optymalizacja jest czasochłonna (Skerra 2008). Zmodyfikowane lipokality stanowią nową klasę biofarmaceutyków o wysokim potencjale klinicznym, będących alternatywą dla przeciwciał (Rothe & Skerra 2018). Białka te są badane pod kątem różnych, innowacyjnych zastosowań np. w terapii raka, astmy, anemii czy zaburzeń metabolicznych (Deuschle et al. 2021). Biofarmaceutyki oparte na lipokality wykazały we wczesnych badaniach klinicznych dużą tolerancję i bezpieczeństwo (Rothe & Skerra 2018).

1.6.1. Antykaliny – zmodyfikowane lipokaliny

Światowy rynek farmaceutyczny coraz bardziej zdominowany jest przez biofarmaceutyki. Wśród nich najskuteczniejszą klasę leków stanowią przeciwciała monoklonalne (mAb). Jedynie w latach 2015-2018, przeciwciała stanowiły 53% wszystkich nowych biofarmaceutyków zatwierdzonych do badań klinicznych (Deuschle et al. 2021). Lipokaliny charakteryzują się prostą architekturą, a stosując ukierunkowaną, losową mutagenezę w połączeniu z technikami selekcji molekularnej można modyfikować pętle otaczające wejście do β -baryłki lipokalin, a tym samym zmienić ich selektywność i powinowactwo do ligandów (Achatz et al. 2022). Antykaliny można również wytwarzać jako białka fuzyjne lub koniugaty z różnymi modułami efektorowymi (Deuschle et al. 2021).

Pierwszą dokładnie opisaną antykaliną było zmodyfikowane białko BBP (*Bilin Binding Protein*), którego naturalnym ligandem jest bilina, pochodna protoporfiryny (IX) (Schlehuber & Skerra 2002). Dokonano 16 modyfikacji (mutacji) w obszarze czterech elastycznych pętli BBP (Schlehuber & Skerra 2005), otrzymując antykalinę DigA która wykazywała zdolność wiązania z wysokim powinowactwem dwóch leków nasercowych, digitoksygeniny i digoksygeniny, straciła natomiast powinowactwo do naturalnego liganda, biliny (**Rysunek 6**) (Schlehuber & Skerra 2002). W miejscu wiążącym antykalinę DigA16, ligand umieszczony jest pomiędzy łańcuchem bocznym Trp i dwoma resztami Tyr, dodatkowo łańcuch boczny His kieszeni wiążącej DigA16 wykazuje indukowane dopasowanie do tworzenia kompleksu z digoksygeniną, co uważano za typowe dla przeciwciał (Schlehuber & Skerra 2005).

Wprowadzając mutacje w ludzkiej lipokalinie TLC (*ang. Tear Lipocalin*) udało się zaprojektować antykalinę wiążącą i blokującą czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego A (*ang. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-A*), który odgrywa główną rolę w angiogenezie i jest kluczowy dla wzrostu guza i przerzutów (Meyer et al. 2015). Zmodyfikowana lipokalina LCN2 zapobiega natomiast odkładaniu się β -amyloidu w mózgu dzięki czemu znajduje potencjalne zastosowanie w leczeniu choroby Alzheimera (Rauth et al. 2016). Modyfikując ludzką lipokalinę LCN2 udało się też otrzymać obiecującą antykalinę, rozpoznającą ludzki antygen błonowy specyficzny dla raka prostaty (PSMA). Może być zatem wykorzystywana w obrazowaniu raka prostaty, a nawet jako nośnik leków w terapii nowotworowej (Barinka et al. 2016). Antykaliny mogą być również wykorzystywane jako znaczniki obrazowania molekularnego w diagnozowaniu glejaka (Albrecht et al. 2016). Jednym z mechanizmów działania antykalin jest też antagonistyczne oddziaływanie z wybranymi receptorami komórkowym: antykaliny blokują ich interakcję z naturalnymi cząsteczkami sygnałowymi (Gebauer & Skerra 2012). Antykaliny mogą być również nośnikami enzymów, radionuklidów czy toksycznych związków działających bezpośrednio na zmienioną chorobowo komórkę (Schlehuber & Skerra 2005).



Rysunek 6. (A) Struktura antykliny DigA z cząsteczką digoksygeniny (reprezentacja patyczkowa, kolor zielony) (PDB id: 1LKE) oraz (B) digitoksygeniny (reprezentacja patyczkowa, kolor zielony) (PDB id: 1LNM) w kieszeni wiążącej.

1.7. Rekombinowana wołowa β -laktoglobulina

Rekombinowane białka obecnie stanowią nową klasę terapeutyków wykorzystywanych w innowacyjnych terapiach (Sauna et al. 2017). Najnowsze osiągnięcia inżynierii białek pozwalają na otrzymanie białek o określonych, pożądanych właściwościach, a zarazem bezpiecznych dla pacjenta (Sauna et al. 2017) (Rothe & Skerra 2018). Naturalna wołowa β -laktoglobulina ze względu na specyficzne wiązanie się z lekami chemioterapeutycznymi (Leilabadi-Asl et al. 2018) jest dobrym kandydatem jako potencjalny transporter środków terapeutycznych (Pujara et al. 2021). Wysoka stabilność BLG w środowisku kwaśnym (Ghalandari et al. 2014), biodegradowalność (Ghalandari et al. 2015) oraz kontrolowane uwalnianie zawartości (Shafaei et al. 2017) jest wykorzystywane w tworzeniu terapeutyków na bazie nanocząstek do doustnego podawania (Shafaei et al. 2017). Ostatnie badania pokazują, że nanoczątki BLG-pektyna, jako nośniki kompleksów platyny mogą być wykorzystywane w terapii przeciwko rakowi okrężnicy (Izadi et al. 2016). Produkcja rekombinowanej β -laktoglobuliny oraz możliwość jej modyfikacji na drodze mutagenyzy otwiera możliwości tworzenia wysoce selektywnych i specyficznych transporterów molekularnych.

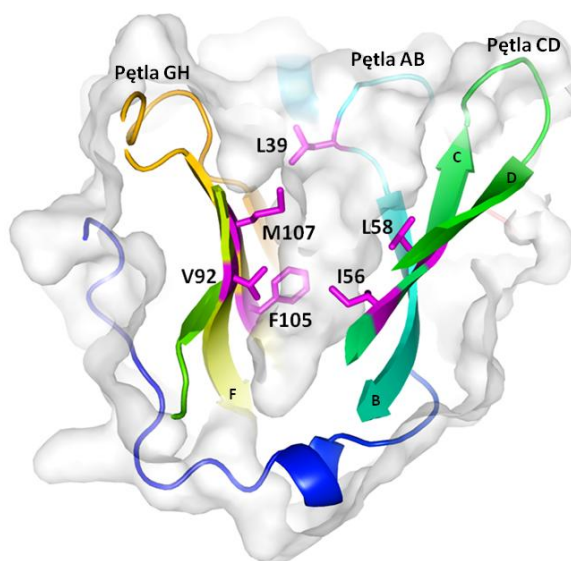
1.7.1. Mutacje w kieszeni wiążącej rekombinowanej β -laktoglobuliny

Opisane do tej pory mutacje BLG związane były przede wszystkim ze zmianami właściwości fizykochemicznych białka (Jaya et al. 2004) (Yagi et al. 2003). Pojedyncze mutacje w sekwencji aminokwasowej BLG posłużyły między innymi do poprawy wydajności ekspresji w komórkach drożdży (mutacja W19Y) (Katakura et al. 1999), do zbadania równowagi monomer-dimer poprzez wprowadzenie mutacji w pętli AB (Asp33, Arg40) stabilizującej dimer (Sakurai & Goto 2002) oraz do zbadania wpływu mutacji C121S na proces agregacji oraz stabilności konformacyjnej (Jaya et al. 2004).

Mutagenyzy nie przeprowadzono jednak w kieszeni wiążącej w celu zmiany specyficzności wiązania ligandów. Takie badania są niezbędne do projektowania wariantów BLG o wysokiej

stabilności i wysokim powinowactwie do liganda (Bonarek et al. 2020). W zespole Biokrytalografii ZKiK Wydziału Chemii UJ od 2011 roku prowadzone są systematyczne badania nowych wariantów β -laktoglobuliny, które posiadają mutacje w rejonie kieszeni wiążącej. Początkowa faza badań opierała się na wyborze odpowiednich miejsc mutacji zmieniających geometrię kieszeni wiążącej, ale nie wpływających na stabilność białka. Wybrano osiem potencjalnych miejsc mutacji: Leu39, Val43, Ile56, Leu58, Val92, Phe105, Met107 oraz Leu122 (Bonarek et al. 2020). Reszta Leu39, znajduje się w pętli AB przy wejściu do baryłki, reszty Ile56, Val92, Phe105, Val43 oraz Leu122 znajdują się w środkowej części baryłki, natomiast reszty Leu58 i Met107 w górnej jej części (Bonarek et al. 2020).

Wybór alternatywnych aminokwasów opierał się na analizie białek pochodzących z organizmów ssaczych i wykazujących wysokie strukturalne podobieństwo do wołowej β -laktoglobuliny, jednak niską homologię sekwencji (Bonarek et al. 2020). Porównanie tych białek pokazało, że hydrofobowe aminokwasy można zastąpić alifatycznymi i aromatycznymi. Na tej podstawie zaprojektowano i wyprodukowano 9 wariantów BLG, posiadających pojedyncze mutacje w rejonie kieszeni wiążącej, jednak tylko 7 z nich (**Rysunek 7**) odpowiednio się sfałdowało i było w formie rozpuszczalnej: L39Y, I56F, L58F, V92F, V92Y, F105L i M107L (Bonarek et al. 2020). Wszystkie nowe warianty były pochodnymi dzięki formie (WT) β -laktoglobuliny zawierającej mutację L1A/I2S na N-końcu ułatwiającą odcięcie metioniny (Bonarek et al. 2020).



Rysunek 7. Wybrane miejsca pojedynczych mutacji w kieszeni wiążącej β -laktoglobuliny. Modyfikacje wprowadzane w tych miejscach pozwalały na otrzymanie poprawnie sfałdowanych i rozpuszczalnych nowych wariantów BLG.

Wprowadzone mutacje nie wpływały na stałą dimeryzacji, strukturę drugorzędową białka oraz na zmiany konformacyjne zależne od pH, natomiast przyczyniły się do zmian w stabilności chemicznej i termicznej białek (Bonarek et al. 2020). Badania przy użyciu fluorescencji, dichroizmu kołowego, miareczkowania kalorymetrycznego oraz krytalografii pokazały, że najbardziej obiecującymi wariantami do dalszej zaawansowanej mutagenezy są: L39Y, I56F,

L58F i F105L (Bonarek et al. 2020). Warianty L58F i L39Y charakteryzowały się największą stabilnością chemiczną i termiczną, natomiast I56F i F105L posiadają skróconą kieszeń wiążącą, dzięki czemu stanowią dobrą bazę do projektowania bardziej złożonych mutantów BLG z powinowactwem do wybranych związków aromatycznych w tym leków (Bonarek et al. 2020).

Wariant F105L wykazywał zwiększoną stabilnością termiczną w porównaniu do dzikiej formy (WT), co ciekawe podobny efekt zaobserwowano również dla wariantów posiadających dodatkowe mutacje: F105L/L39A oraz F105L/L39A/M107F (J. I. Loch et al. 2018). Podobna sytuacja miała miejsce dla mutantu I56F a także wariantów I56F/L39A oraz I56F/L39A/M107F, dla których zaobserwowano obniżenie termostabilności (J. I. Loch et al. 2018). Właściwości pojedynczego mutantu pozostają zatem zachowane nawet w obecności innych mutacji.

Innymi zaproponowanymi mutantami BLG były warianty zawierające pojedyncze mutacje: L39K oraz F105A. Badania wariantu L39K pokazały, że białko to w odróżnieniu od mutantu L39Y wykazuje bardzo niską wydajność ekspresji. Zmiany struktury drugorzędowej widoczne na widmach CD oraz słabe rozpraszanie promieni rentgenowskich wskazywały, że wprowadzenie dodatnio naładowanej lizyny destabilizuje strukturę białka (J. I. Loch et al. 2021). W przypadku wariantu F105A wymiana fenyloalaniny na alaninę nie wpłynęła na wyniki pomiarów CD (J. I. Loch et al. 2021).

1.7.2. Struktury przestrzenne nowych wariantów rekombinowanej β -laktoglobuliny

Mutacje wprowadzone w obszarze miejsca wiążącego miały na celu zmianę powinowactwa do ligandów. Wnętrze β -baryłki jest na tyle elastyczne, że możliwe były mutacje zarówno w środkowej, jak i górnej części kieszeni wiążącej. Kryształy odpowiednie do pomiarów dyfrakcyjnych otrzymano dla wszystkich wariantów zawierających pojedyncze mutacje, za wyjątkiem V92Y oraz V92F (Bonarek et al. 2020). W większości przypadków otrzymano kryształy w grupie przestrzennej $P3_221$. Wyjątkiem był wariant F105L ($C222_1$) oraz M107L ($P22_12_1$) (Bonarek et al. 2020).

1.7.2.1. Warianty rekombinowanej BLG wiążące endogenny kwas palmitynowy

Zanim odpowiedni protokół oczyszczania rekombinowanej β -laktoglobuliny został opracowany (J. I. Loch et al. 2016), struktury krystaliczne pokazywały, że endogenne ligandy (kwasy tłuszczowe) blokują wewnątrz baryłki uniemożliwiające wiązanie innych ligandów (J. I. Loch et al. 2016). Wykorzystywany obecnie protokół oczyszczania białka, pozwala wyeliminować ten problem przynajmniej dla większości nowych wariantów tj. F105L, I56F, L58F, M107W natomiast pomimo prób, obecność endogennych kwasów tłuszczowych wciąż obserwowano dla mutantów L39Y, L39K oraz F105A (Bonarek et al. 2020) (J. I. Loch et al. 2021).

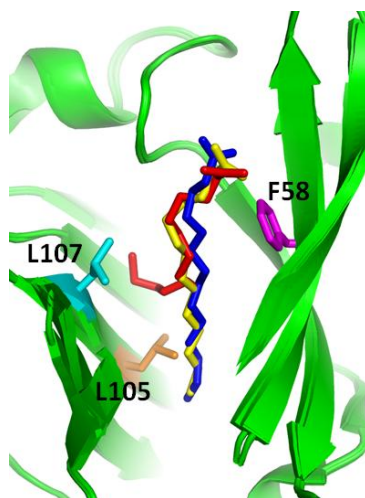
Mutacja L39Y występuje w pętli AB u wejścia do baryłki. Podstawiona tyrozyna wpasowuje się w przestrzeń pomiędzy pętlami AB i GH i jest stabilizowana poprzez wiązania wodorowe z hydroksylową grupą N90 pętli EF. Pomimo krystalizacji mutantu L39Y bez dodatku liganda, na mapie gęstości elektronowej zauważono w kieszeni wiążącej gęstość pasującą do 16-węglowego kwasu palmitynowego (PDB id: 7BH0) (Bonarek et al. 2020). Obecność endogenego kwasu tłuszczowego zauważono również w strukturze wariantu L39K (PDB id: 7BGZ) zarówno podczas krystalizacji z dodatkiem kwasu palmitynowego jak i bez dodatku liganda (J. I. Loch et al. 2021). Ta właściwość wariantu L39K była zaskakująca, gdyż łańcuch boczny lizyny 39 znajduje się pomiędzy pętlami AB oraz GH i nie oddziałuje z ligandem oraz innymi resztami białkowymi (J. I. Loch et al. 2021). W wariacie F105A, alanina znajduje się na sztywniej wstędze F, a jej krótki łańcuch boczny powiększa miejsce wiązania. Mutant F105A jest kolejnym przykładem nowego wariantu BLG, w którym kieszeń wiążąca zablokowana jest przez endogeny kwas tłuszczowy (PDB id: 7BGA) (J. I. Loch et al. 2021).

1.7.2.2. Kompleksy wariantów rekombinowanej β -laktoglobuliny z kwasem mirystynowym

β -Laktoglobulina wykazuje największe powinowactwo do 16-węglowego kwasu palmitynowego. Jednak w pierwszym etapie badań oddziaływania kwasów tłuszczowych z nowymi wariantami BLG wykorzystano 14-węglowy kwas mirystynowy, który ma wyższą rozpuszczalność w wodzie oraz nie tworzy osadu w kroplach, zaburzającego proces krystalizacji. Badania takie były prowadzone dla wariantów L58F, F105L oraz M107L (Bonarek et al. 2020).

Zastąpienie leucyny, fenyloalaniną w pozycji 58 nie wpływa na konformację łańcucha białkowego, stabilizuje jedynie górną część kieszeni wiążącej. Struktura krystaliczna formy apo (PDB id: 6QPE) oraz kompleksu L58F z kwasem mirystynowym pokazała, że mutacja nie wpływa ani na konformację białka, ani na sposób wiązania liganda (*Rysunek 8*) (Bonarek et al. 2020). Struktura krystaliczna wariantu F105L wykazała duże zaburzenia konformacyjne C- i N-końcowych fragmentów oraz wszystkich elastycznych pętli (PDB id: 7BGX). Mutacja w pozycji 105 powoduje skrócenie kieszeni wiążącej, jednak białko zachowuje możliwość wiązania 14-węglowego kwasu mirystynowego. Ligand znajduje się w „zgiętej” konformacji, która sprzyja dodatkowym oddziaływaniom hydrofobowym, stabilizującym białko i związany w jego wnętrzu ligand (J. I. Loch et al. 2021). Dodatkowo, związanie liganda powoduje zmianę pozycji łańcucha bocznego M107, ruch pętli EF oraz wstęg F i G, co pokazuje, że zmodyfikowana kieszeń wiążąca jest w stanie „dopasować się” do obecności nawet relatywnie dużego liganda (*Rysunek 8*) (Bonarek et al. 2020). Struktura krystaliczna wariantu M107L wykrystalizowanego bez liganda ujawniła nietypową, częściowo zamkniętą konformację pętli EF (PDB id: 6RYT) (Bonarek et al. 2020). W strukturze kompleksu z kwasem mirystynowym pętla EF występuje w typowo otwartej konformacji. Zastąpienie metioniny przez leucynę powiększa wejście do kieszeni wiążącej w rejonie pętli AB, która zachowała wydłużony kształt. Kwas mirystynowy związany do

wariantu M107L przyjmuje wydłużoną konformację typową dla BLG (**Rysunek 8**) (Bonarek et al. 2020).



Rysunek 8. Struktury kompleksu rekombinowanej BLG z zaznaczonym kwasem mirystynowym: wariant L58F (PDP id: 6RWP, MYR kolor niebieski), wariant M107L (PDP id: 6RWR, MYR kolor żółty) oraz wariant F105L (PDP id: 6RWQ, MYR kolor czerwony).

1.7.2.3. Kompleksy nowych wariantów rekombinowanej β -laktoglobuliny z tetrakainą

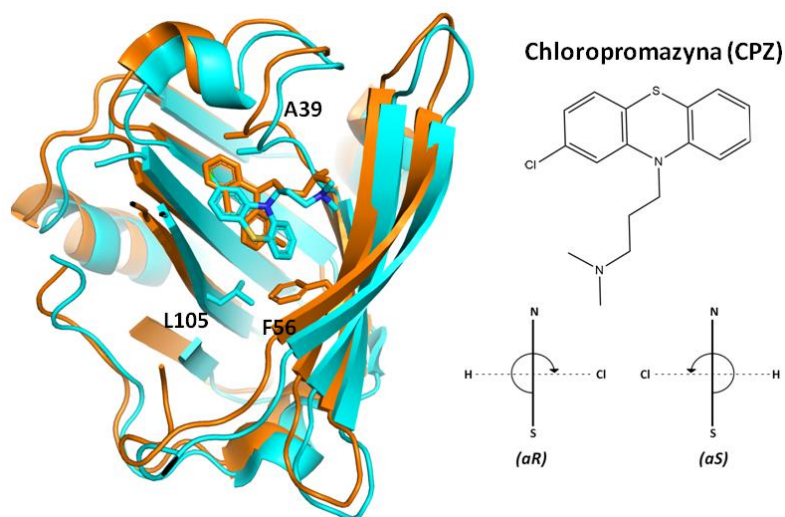
Tetrakaina (TET) jest pochodną kwasu p-aminobenzoowego, stosowaną jako lek znieczulający. Jest to modelowy, amfifilowy ligand o wydłużonej strukturze, zawierający pierścień aromatyczny oraz dwa krótkie fragmenty alifatyczne (J. I. Loch et al. 2021). Ligand ten wiąże się z wołową BLG z mniejszym powinowactwem niż kwasy tłuszczowe (J. I. Loch et al. 2015). Pomimo obecności pierścienia aromatycznego, a co za tym idzie mniejszą elastycznością, tetrakaina wiąże się w β -baryłce naturalnej BLG w taki sam sposób jak kwasy tłuszczowe (J. I. Loch et al. 2021).

Kieszon wiążąca nowych wariantów L58F oraz M107L, podobnie jak w formie dzikiej (WT) i naturalnej laktoglobuliny ma wydłużony kształt. W kompleksach wariantów L58F oraz M107L z tetrakainą ligand występuje w takiej samej konformacji jak w przypadku naturalnego białka: krótki, alifatyczny łańcuch znajduje się w dolnej części kieszeni, natomiast pierścień aromatyczny w środkowej części (J. I. Loch et al. 2021). Wariant I56F posiada natomiast skróconą kieszeń wiążącą. Ko-krystalizacja tego mutantu z tetrakainą doprowadziła do uzyskania kryształów o nietypowej rombowej symetrii $P2_12_12_1$. Analiza struktur pokazała, że duży łańcuch boczny fenyloalaniny utrudnia wiązanie kwasów tłuszczowych oraz tetrakainy w β -baryłce. W wariacie I56F tetrakaina związana została natomiast poza β -baryłką, w niewielkiej wnęce utworzonej pomiędzy dwiema częściami białka w pobliżu Arg124 (PDP id: 7BF8) (J. I. Loch et al. 2021).

1.7.2.4. Kompleksy nowych wariantów rekombinowanej β -laktoglobuliny z chloropromazyną

Nowe mutanty β -laktoglobuliny o skróconych miejscach wiążących (I56F oraz F105L) stanowiły dobrą bazę do projektowania kolejnych wariantów zawierających dodatkowe modyfikacje i wykazujących powinowactwo do wybranych leków. Krystalizacja wołowej BLG z chloropromazyną (lek neuroleptyczny o działaniu przeciwpsychotycznym) wykazała, że ligand nie wiąże się do białka, dlatego zaprojektowano oraz wyprodukowano nowe warianty laktoglobuliny: I56F/L39A, I56F/L39A/M107F, F105L/L39A oraz F105L/L39A/M107F (J. I. Loch et al. 2018).

Mutacje w pozycjach 105 i 56 powodują skrócenie β -baryłki. Zastąpienie leucyny w pozycji 39 przez alaninę miało na celu poszerzenie kieszeni wiążącej, a tym samym uzyskanie odpowiedniego kształtu dla trójcyklicznych związków (**Rysunek 9**). Natomiast wprowadzenie fenyloalaniny w pozycji 107 do podwójnych mutantów I56F/L39A oraz F105L/L39A miało za zadanie stworzenie oddziaływań π - π z pierścieniem aromatycznym chloropromazyny (J. I. Loch et al. 2018). Struktury kompleksów podwójnych i potrójnych mutantów z chloropromazyną (CPZ) potwierdziły, że wprowadzone mutacje przekształciły kieszeń wiążącą, umożliwiając wiązanie trójcyklicznych układów (J. I. Loch et al. 2018). Co ciekawe, badania tych kompleksów wykazały zaskakujące stereoselektywne wiązanie konformerów chloropromazyny wykazujących chiralność aksjalną (osiową). Nomenklatura tych konformerów została określona zgodnie z regułami zawartymi w pracy B. Testy (B. Testa 2013). Warianty zawierające mutacje I56F preferowały wiązanie (*aR*)-CPZ, natomiast warianty z mutacjami F105L (*aS*)-CPZ (J. I. Loch et al. 2018) (**Rysunek 9**).



Rysunek 9. Struktury kompleksu rekombinowanej BLG z chloropromazyną. Wariant I56F/L39A (PDP id: 5NUJ) kolor pomarańczowy oraz wariant F105L/L39A (PDP id: 5NUM) kolor błękitny. Struktura chloropromazyny oraz jej chiralne konformery.

1.7.2.5. Kompleksy nowych wariantów rekombinowanej β -laktoglobuliny z dezypraminą

Nowe warianty β -laktoglobuliny zawierające potrójne mutacje w rejonie kieszeni wiążącej zostały zaprojektowane w ten sposób aby wiązać trójcykliczne leki antydepresyjne m.in. dezypraminę. W przeprowadzonych badaniach skupiono się nad analizą oddziaływań pomiędzy wariantami I56F/L39A/M107F (FAF) oraz I56F/L39A/M107W (FAW), a dezypraminą (DES) (J. I. Loch et al. 2022).

W przypadku wariantu I56F/L39A/M107F trzy pierścienie fenyloalaniny w pozycjach 56, 105 oraz 107 tworzą odpowiednie, hydrofobowe środowisko dla aromatycznego liganda. Otrzymano kryształy kompleksu z dezypraminą o symetrii grupy przestrzennej $I2_12_12_1$ z dimerem w jednostce asymetrycznej. Analiza struktury wykazała, że ligand wiązał się nie tylko w β -baryłce obu podjednostek, ale także w przestrzeni pomiędzy monomerami (interfejs dimeru). Co więcej dodatkowa cząsteczka dezypraminy związana była w górnej części β -baryłki jednej z podjednostek (J. I. Loch et al. 2022).

Dla kompleksu wariantu I56F/L39A/M107W otrzymano dwie formy krystaliczne. Pierwszą z nich była $I2_12_12_1$. Parametry komórki oraz sposób upakowania były takie same jak dla kompleksu FAF. Białko w formie dimerycznej związało cztery cząsteczki dezypraminy w tych samych miejscach jak w przypadku kompleksu FAF-DES. Drugą formą krystaliczną była $P3_221$ z jednym łańcuchem białkowym w jednostce asymetrycznej. W tym przypadku jedna cząsteczka liganda związana była w baryłce (J. I. Loch et al. 2022).

Uzyskane wyniki pokazały, że wprowadzając odpowiednie mutacje w kieszeni wiążącej BLG, można uzyskać warianty o zwiększonym powinowactwie do trójcyklicznych leków. Są to też pierwsze struktury krystalograficzne, potwierdzające istnienie innych, alternatywnych miejsc wiązania liganda poza β -baryłką, kiedy pętla EF ma konformację otwartą.

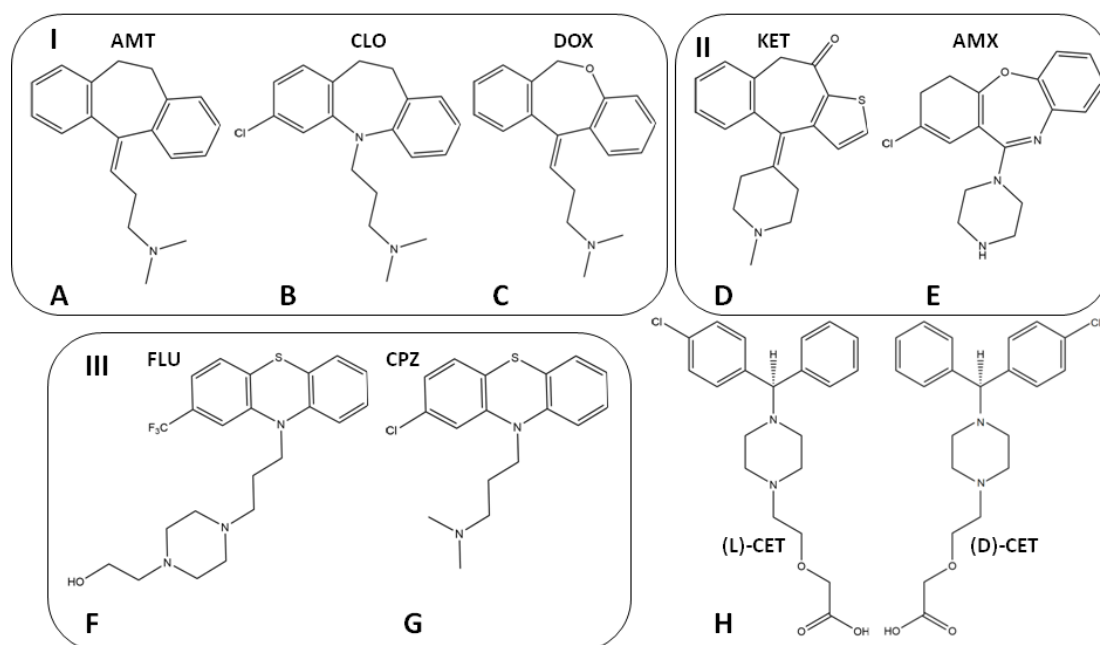
1.8. Nowe warianty rekombinowanej BLG oraz leki wybrane do badań

Na potrzeby badań strukturalnych i biofizycznych prowadzonych w ramach tej pracy wybrano najbardziej reprezentatywne mutanty β -laktoglobuliny posiadające wielokrotne substytucje we wnętrzu β -baryłki, tj. wariant I56F/L39A/M107W (FAW), dla którego strukturę formy apo znano już wcześniej (J.I. Loch et al. 2022) oraz nowo zaprojektowane warianty F105L/L39A/M107W (LAW), I56F/L39A/I71W (FA71W) oraz L58F/V92Y (58F/92Y). Podczas prowadzonych badań analizowano oddziaływanie trójcyklicznych, aromatycznych ligandów z w/w nowymi wariantami BLG. Wybrane leki często stosowane są w próbach samobójczych (Hawton et al. 2010) (Berling & Isbister 2015).

Testowane leki można podzielić według dwóch kryteriów. Pierwszym z nich jest podział ze względu na sposób działania (kryterium funkcjonalne), tj. wyróżniamy grupę trójcyklicznych leków antydepresyjnych: amitryptylinę (AMT), klomipraminę (CLO), doksepinę (DOX) oraz

amoksapinę (AMX), które stosowane są w leczeniu depresji, nerwobóli, migren czy nadpobudliwości ruchowej (Liebelt 2015). Pierwsze wzmianki o niepożądanych efektach przedawkowania cyklicznych antydepresantów pojawiły się w 1959 roku, dwa lata po rozpoznaniu ich klinicznej przydatności. Obecnie leki te są uznawane za jedne z najczęściej spożywanych substancji w samozatruciu (Kerr et al. 2001). Drugą grupę leków badanych w tej pracy stanowiły pochodne fenotiazyny: chloropromazyna (CPZ) oraz flufenazyna (FLU), które stosowane są jako leki przecipsychotyczne (Buszman et al. 2008). Natomiast ostatnią, trzecią grupą ligandów, były leki przeciwhistaminowe: ketotifen (KET) oraz cetyryzyna (CET), antagoniści receptora histaminowego H₁, powszechnie stosowane w leczeniu alergii oraz niekiedy jako leki uspokajające bez recepty. Ze względu na działanie silnie uspakajające, leki te są czasem intencjonalnie przyjmowane w bardzo dużych ilościach, co prowadzi do przedawkowania, które jest szkodliwe dla życia i zdrowia (Thomas 2016).

Kiedy bierzemy pod uwagę szkielet strukturalny leku (kryterium strukturalne), badane w pracy ligandy można podzielić na cztery grupy: (1) trójcykliczne leki z alifatycznym łańcuchem, w tej grupie wyróżniamy AMT, CLO oraz DOX; (2) trójcykliczne leki zawierające cykliczny fragment alifatyczny: KET, AMX; (3) ligandy zawierające ugrupowanie fenotiazynowe: FLU, CPZ oraz (4) cetyryzynę (CET), która nie posiada układu trójcyklicznego, ale jej dwa pierścienie aromatyczne układają się w przestrzeni w sposób zbliżony do pierścieni aromatycznych leków z grup 1-3 (*Rysunek 10*). Podczas analizy wyników, specyficzność i selektywność wybranych wariantów BLG względem wybranych ligandów analizowano stosując drugie (strukturalne) kryterium podziału.



Rysunek 10. Wzory strukturalne testowanych leków: (A) amitryptyliny, (B) klomipraminy, (C) doksepiny, (D) ketotifenu, (E) amoksapiny, (F) flufenazyny, (G) chloropromazyny oraz (H) cetyryzyny.

1.9. Metody badawcze wykorzystywane do monitorowania oddziaływań BLG-ligand

Pierwsze informacje o możliwościach wiązania liganda w β -baryłce BLG zostały przedstawione 1947 (Davis & Dubos 1947). Jednak dopiero w latach 60 XX wieku zaczęto wyznaczać stałe wiązania metodą dializy równowagowej (Wishnia & Pinder 1966) oraz fluorescencji (Futterman & Heller 1972). Obecny rozwój różnych technik badawczych, pozwala na wykorzystywanie wielu metod w celu lepszego wyjaśnienia zjawisk zachodzących w strukturach białkowych.

Ze względu na fakt, że β -laktoglobulina jest modelową lipokaliną, wiele różnych metod było stosowanych do badania jej oddziaływań z ligandami. Metody *in silico*, m.in. dokowanie molekularne oraz symulacje komputerowe wykorzystywane były w badaniach interakcji pomiędzy BLG, a flawonoidami (T. Li et al. 2018) (Sahihi 2016), kapsaicyną (Zhan et al. 2020) czy retinolem (K. Ahmadi et al. 2015). Często metody te były następnie porównywane z metodami spektroskopowymi, które stanowią kolejną grupę najczęściej wykorzystywanych technik monitorowania oddziaływań BLG z ligandami. Wśród nich wyróżnić warto spektroskopię NMR (Sakurai et al. 2009), dichroizm kołowy (CD) (Xu et al. 2019) oraz spektroskopię fluorescencyjną (D'Alfonso et al. 1999). Metody te są często stosowane równolegle, aby uzyskać dokładniejsze wyniki i lepiej zrozumieć zachodzące procesy (Gomaa et al. 2016) (Rudra et al. 2018). Do określenia termodynamiki oddziaływań białko-ligand, najczęściej wykorzystywaną metodą jest izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC) (Hadian et al. 2016). Technika ta stosowana była do wyznaczenia parametrów wiązania kwasu kaprylowego i kaprynowego (J. Loch et al. 2011), kwasów tłuszczowych (J. Loch et al. 2011)(J. I. Loch et al. 2013) czy strychniny (Rudra et al. 2018). Wśród mniej powszechnych metod stosowanych do monitorowania oddziaływania BLG z ligandami wyróżnić można: transmisyjną mikroskopię elektronową (Bekale et al. 2014), dynamiczne rozpraszanie światła (DSL, *ang. Dynamic Light Scattering*) (Świątek et al. 2019) czy wykorzystanie mikrowagi kwarcowej (QCM, *ang. Quartz Crystal Microbalance*) (Świątek et al. 2019).

1.9.1. Zastosowanie krystalografii do badań kompleksów białko-ligand

Metody krystalograficzne są potężnym narzędziem badań interakcji białko-ligand. Poza informacjami o miejscu wiązania liganda, możemy również uzyskać informacje dotyczące stabilizacji kompleksu oraz rodzaju oddziaływań pomiędzy białkiem, a ligandem. Jak wcześniej wspomniano metoda ta była wykorzystywana do badania kompleksów BLG z ligandami (M. C. Yang et al. 2008) (J.I. Loch et al. 2022).

Krystalografia rentgenowska to multidyscyplinarna nauka łącząca elementy fizyki, chemii, matematyki, biologii, biofizyki i medycyny. Odegrała ona zasadniczą rolę w wielu badaniach naukowych, co doprowadziło do imponującej liczby laureatów Nagrody Nobla, głównie

w dziedzinie chemii i fizyki. Wśród nich wyróżnić można nagrodę dla Röntgena za odkrycie promieni X (Röntgen & Stanton 1896), von Lauego za odkrycie zjawiska dyfrakcji (Laue 1915) czy Bragga za badanie struktur krystalicznych (Bragg & Bragg 1913). Kiedy w 1971 roku powstał Protein Data Bank (Stubbs 2006) zdeponowanych struktur białkowych było tylko siedem (Stubbs 2006) natomiast dziś jest ich ponad 167 000 i znaczna większość z nich (ok. 87%) została uzyskana dzięki krystalografii rentgenowskiej. Głównymi czynnikami odpowiadającymi za tę wciąż rosnącą liczbę struktur są postępy w technologii komputerowej, dostarczającej komputery o większej mocy obliczeniowej oraz lepsze algorytmy, rozwój inżynierii genetycznej białek, pozwalającej na łatwą produkcję pożądaných białek w komórkach bakteryjnych oraz zastosowanie synchrotronów, jako źródła promieniowania rentgenowskiego (Stubbs 2006).

Podstawowym narzędziem badawczym wykorzystywanym w tej pracy były właśnie metody krystalograficzne. Dostarczają one informacji nie tylko na temat struktury białka i sposobie wiązania ligandów ale również o dynamice i naturze makrocząsteczek (Patel et al. 2014). Taki kompletny zestaw danych pochodzących z pojedynczego eksperymentu jest trudny do uzyskania innymi metodami (Patel et al. 2014). Podwójna helisa DNA Watsona i Cricka (Watson & Crick 1953) struktura penicyliny (D. C. Hodgkin 1949) i witaminy B12 (D. C. Hodgkin 1957) autorstwa Dorothy Hodgkin, czy wyznaczenie struktury proteazy wirusa HIV (Navia et al. 1989) doprowadziły do głębszego zrozumienia ważnych procesów życiowych, a tym samym mechanizmów powstawania chorób i odkryć nowych leków (Su et al. 2015).

Krystalografia była często wykorzystywana jako metoda uzupełniająca do potwierdzania sposobu wiązania ligandów zidentyfikowanych przez inne biofizyczne metody (Patel et al. 2014). Udowodniono jednak, że metoda ta dostarcza informacje, które umożliwiają szybką i sprawną ocenę wiązania ligandów (Patel et al. 2014), co czyni ją jedną z wiodących metod przesiewowych badań powinowactwa w projektowaniu leków (Schiebel et al. 2016). Wysokorozdzielcze struktury krystaliczne pokazują z detalami trójwymiarowy obraz miejsca wiązania. W porównaniu z innymi metodami, krystalografia nie ma sobie równych pod względem zakresu powinowactwa liganda (od zakresów nanomolowych do milimolowych) i wielkości docelowej makrocząsteczki (Patel et al. 2014).

1.9.2. Badania strukturalne oddziaływania trójcyklicznych leków z białkami

Przeszukując bazę PDB (*Protein Data Bank*) zauważyć można, że dla leków testowanych w ramach tej pracy, jak dotąd największą liczbę kompleksów białko-ligand uzyskano dla chloropromazyny (*Tabela 1*). Wyznaczono struktury kompleksów tego leku z lipokalinami takimi jak α 1-kwaśna glikoproteina (Nishi et al. 2011) czy wariantami rekombinowanej BLG: FA, FAF, LA oraz LAF (J. I. Loch et al. 2018). We wszystkich w/w kompleksach, chloropromazyna w miejscu wiążącym stabilizowana była głównie przez oddziaływania hydrofobowe. Takie same wyniki otrzymano dla kompleksów tego leku z NCS-1/Ric8a, kompleksem białkowym

współregulującym liczbę synaps oraz uwalnianie neuroprzekaźników (Mansilla et al. 2017), białkiem prionowym (Baral et al. 2014) oraz w kompleksie chloropromazyny z bakteriofagiem PRD1 zawierającym białkowy kapsyd (Duyvesteyn et al. 2021). Jako modelowy lek z grupą fenotiazynową, chloropromazyna była również ko-krystalizowana z ludzkim białkiem S100-B (Weber 2010) oraz z prokariotycznym receptorem GABA (Nys et al. 2016).

Kolejnymi ligandami, które również były ko-krystalizowane z białkami są trójcykliczne leki z alifatycznym łańcuchem: amitryptylina, klomipramina oraz doksepina (**Tabela 1**). Amitryptylina, podobnie jak chloropromazyna była poprzednio ko-krystalizowana z ludzką lipokaliną $\alpha 1$ -kwaśną glikoproteiną (Nishi et al. 2011). Ligand związany był w kieszeni wiążącej i był zaangażowany w tworzenie oddziaływań C-H \cdots π (Nishi et al. 2011). Struktury kompleksów z klomipraminą otrzymano dla glikoproteiny wirusa Ebola. Obecność liganda potwierdzono w hydrofobowej wnęce (Zhao et al. 2018). Otrzymano także kompleksy klomipraminy z receptorami LeuT (Singh et al. 2007) oraz LeuBAT (H. Wang et al. 2013). W bazie PDB znaleźć można tylko jedną strukturę kompleksu białkowego z doksepiną. Ligand (DOX) związany został do ludzkiego receptora histaminowego H1, w hydrofobowej kieszeni utworzonej przez boczne łańcuchy α helis (Shimamura et al. 2011). W tych badaniach zastosowano mieszaninę enancjomerów E i Z doksepiny. Struktura krystaliczna receptora H1 pokazała, że preferowanym enancjomerem był enancjomer E (Shimamura et al. 2011).

Jedyna struktura kompleksu z cetyryzyną dostępna w PDB, to kompleks z końską albuminą surowiczą ESA. Struktura ta wykazała, że ligand związany została w dwóch hydrofobowych wnękach: miejscu wiązania kwasów tłuszczowych oraz nowym miejscu wiązania zlokalizowanym na styku domen IA oraz IB, pomiędzy helisami (Handing et al. 2016). Co ciekawe, miejsca wiązania liganda były zupełnie różne od tych proponowanych po wielu badaniach opartych na dializie równowagowej czy badaniach fluorescencyjnych (Hegde et al. 2011) (Bree et al. 2002). Wyniki te pokazują, jak potężnym narzędziem są badania strukturalne. Cząsteczka stabilizowana była oddziaływaniami hydrofobowymi oraz dodatkowo mostkami solnymi (Handing et al. 2016). W lecznictwie stosuje się aktywny izomer lewoskrętny (L), tj. lewocetyryzynę, która wykazuje silniejsze działanie (Nalluri & Kumar 2020). W ESA-CET w obu miejscach wiązania pozycja atomu Cl nie była jednoznaczna i nie udało się określić konformacji tego leku (Handing et al. 2016).

Do tej pory, jedyną strukturą kompleksu białkowego z amoksapiną (AMX) zdeponowaną w PDB, jest struktura w której amoksapina połączona z kwasem glukuronowym (GlcA) związana jest w kompleksie z bakteryjną β -glukuronidazą (GUS) (Pellock et al. 2018).

Jak pokazuje **Tabela 1**, do tej pory w bazie PDB nie ma żadnych struktur kompleksów białkowych z flufenazyną oraz ketotifenem.

Tabela 1. Struktury dostępne w bazie PDB, w których zidentyfikowano ligandy testowane w tej pracy.

Ligand	Białko	PDB id [referencja]	Literatura
Amitryptylina	Wariant A ludzkiej α 1-kwaśnej glikoproteiny	3APV	(Nishi et al. 2011)
	Receptor kinazy tyrozynowej TrkA	4CRP	(Shoemark et al. 2015)
Klomipramina	Glikoproteina wirusa Ebola	6G9I	(Zhao et al. 2018)
	LeuT (transporter leucyny)	2Q6H	(Singh et al. 2007)
	LeuT (transporter leucyny)	2QEI	(Singh et al. 2007)
	LeuBAT (transporter aminokwasów)	4MMA	(H. Wang et al. 2013)
Doksepina	Receptor histaminowy	3RZE	(Shimamura et al. 2011)
Amoksapina (związana z glukuronidem)	β -glukuronidaza	6D4O	(Pellock et al. 2018)
Chlorpromazyna	Wariant A ludzkiej α 1-kwaśnej glikoproteiny	3APX	(Nishi et al. 2011)
	Rekombinowana BLG, wariant FA	5NUJ	(J. I. Loch et al. 2018)
	Rekombinowana BLG, wariant FAF	5NUK	(J. I. Loch et al. 2018)
	Rekombinowana BLG, wariant LAF	5NUN	(J. I. Loch et al. 2018)
	Rekombinowana BLG, wariant LA	5NUM	(J. I. Loch et al. 2018)
	Podjednostka receptora GABA	5LG3	(Nys et al. 2016)
	Bakteriofag PRD1, główne białko kapsydu P3	7OOK	(Duyvesteyn et al. 2021)
	Białko S100-B	3LK0	(Weber 2010)
	Białko prionowe PrPC	4MA8	(Baral et al. 2014)
Kompleks NCS-1/Ric8a	5G08	(Mansilla et al. 2017)	
Cetyryzyna	Końska surowicza albumina (ESA)	5DQF	(Handing et al. 2016)

1.9.3. Zastosowanie dichroizmu kołowego do badań kompleksów białko-ligand

Drugą metodą eksperymentalną zastosowaną w tej pracy, stanowiącą uzupełnienie metod krystalograficznych, był dichroizm kołowy (CD), który posłużył do określenia rzędu wielkości powinowactwa dla badanych kompleksów BLG-ligand. Metoda CD jest wykorzystywana do badania oddziaływań białko-ligand od czasu dostępności odpowiednich urządzeń, tj. od końca lat 60 ubiegłego wieku (Greenfield 1999).

Dichroizm kołowy może być wykorzystywany do śledzenia wiązania małych cząsteczkowych ligandów do białek (Siligardi et al. 2014), peptydów (Doderio et al. 2011) czy kwasów nukleinowych (Chang et al. 2012) pod warunkiem spełnienia jednego z dwóch kryteriów: ligand musi wiązać się w sposób wywołujący aktywność optyczną w chromoforach liganda albo wiązanie musi powodować zmiany konformacyjne w makrocząsteczce (Greenfield 1999). Makrocząsteczki, w tym białka, ze względu na swoją chiralność mają zdolność do wywoływania asymetrii niektórych achiralnych cząsteczek ligandów podczas ich odwracalnego wiązania. W konsekwencji, takie cząsteczki wykazują indukowaną aktywność optyczną w zależności od

charakteru miejsc wiązania, ich stereochemii, liczby czy położenia. Tak indukowana aktywność optyczna może być badana przy użyciu dichroizmu kołowego (Zsila et al. 2005).

Dichroizm kołowy jest to też doskonała technika do określania termodynamiki i kinetyki fałdowania i denaturacji białek (Greenfield 1999). Rozwój technik komputerowych sprawia, że analiza eksperymentów termodynamicznych i kinetycznych, poprzez śledzenie zmian w widmach CD, staje się znacznie prostsza, zwiększając użyteczność tej metody (Greenfield 1999). W porównaniu do innych technik, metody CD są znacznie mniej wymagające, zarówno pod względem zużycia próbki, jak i czasu. Ponadto, CD pozwala na łatwe monitorowanie procesu wiązania w różnych warunkach eksperymentalnych i badanie dynamiki procesu wiązania (Tedesco & Bertucci 2015). Ponadto, możliwe jest uzyskanie szczegółowych informacji o sposobie wiązania, ponieważ jednym z głównych źródeł ICD jest zmiana konformacyjna obu oddziałujących cząsteczek po związaniu. W ten sposób można zbadać stereoselektywność procesu wiązania i można określić konformację leku związanego z białkiem docelowym, nawet gdy cząsteczka gościa nie jest chiralna (Tedesco & Bertucci 2015). Informacja ta może pomóc w odkrywaniu leków, dostarczając szczegółów na temat oddziaływania małej cząsteczki z docelowym receptorem (Tedesco & Bertucci 2015). Śledzenie indukowanego sygnału CD pozwala nie tylko na poznanie mechanizmu całego procesu, ale także na ilościową charakterystykę procesu wiązania w stanie równowagi bez ingerencji w ten proces, ułatwiając w ten sposób wyznaczenie stałych powinowactwa (Bertucci et al. 2010).

2. Cel pracy

β -Laktoglobulina (BLG), podobnie jak inne białka z rodziny lipokalin z powodzeniem może być modyfikowana przy zastosowaniu metod inżynierii genetycznej. Wprowadzone zmiany mogą wpływać zarówno na właściwości biofizyczne białka, jak i na jego powinowactwo do ligandów. Rekombinowane białka są rosnącą grupą innowacyjnych środków terapeutycznych. Zmodyfikowana BLG może być potencjalnie wykorzystane w medycynie do wychwytywania i usuwania z organizmu związków toksycznych. Zrozumienie w jaki sposób określony typ mutacji wpływa na selektywność i specyficzność wiązania ligandów pozwoli w przyszłości na produkowanie białek, o zwiększonym powinowactwie do określonych ligandów.

Celem pracy jest zaprojektowanie i otrzymanie nowych wariantów β -laktoglobuliny, a następnie zbadanie jak wybrane mutacje wpływają na zdolność oddziaływania białka z testowanymi ligandami o niewielkiej masie cząsteczkowej. Jako modelowe ligandy wybrano głównie cząsteczki o geometrii trójcyklicznej m.in. leki przeciwpsychotyczne i antydepresyjne, które są często przedawkowywane w próbach samobójczych.

Do otrzymania nowych wariantów β -laktoglobuliny z modyfikacjami w obszarze kieszeni wiążącej: F105L/L39A/M107W (LAW), I56F/L39A/M107W (FAW), I56F/L39A/I71W (FA71W) oraz L58F/V92Y (58F/92Y) zostanie wykorzystana ukierunkowana mutagenaza, natomiast metody krystalograficzne (krystalizacja białek, wyznaczanie struktur krystalicznych) oraz biofizyczne (CD, nanoDSF) posłużą do określenia czynników wpływających na selektywność wiązania testowanych ligandów.

3. Materiały i metody

3.1. Mutageneza

Pierwszym etapem ukierunkowanej mutagenezy w kieszeni wiążącej białka było odpowiednie zaprojektowanie starterów przy użyciu programu *SnapGene* (W. Tee 2020): reverse primer: 5'GGTTTTTTCGGCAATCCATTTTTCTGGGCAC oraz forward primer: 5'GTGCCAGAAAAAATGGATTGCCGAAAAAACC. Następnie w celu otrzymania nowych wariantów BLG skorzystano z protokołu *QuickChange* (Xia et al. 2015). W pierwszym etapie reakcji PCR przeprowadzano denaturację w 95°C przez 30s, w kolejnych cyklach etap ten skrócono do 10s, przyłączanie starterów (annealing) prowadzono w temperaturze 50-60°C przez 15s, ostatni etap elongacji prowadzono w 72°C przez 4 minuty. Cały cykl powtórzono 20 razy. Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze firmy *BioRad*. Mutacje wprowadzono do genu BLG wklonowanego do wektora plazmidowego pET-DUET-1 (*Novagen*) w miejscu MCS2 pomiędzy NdeI–AvrII. Używany wektor plazmidowy dodatkowo zawierał gen bakteryjnej izomerazy wiązania disiarczkowego DsbC wklonowany w pozycji MCS1, w miejscu pomiędzy enzymami restrykcyjnymi NcoI-HindIII. Wszystkie nowe warianty BLG są pochodnymi dzikiej formy (WT) zawierającej mutację L1A/I2S na N-końcu, ułatwiającą odcięcie metioniny (J. I. Loch et al. 2016). Obecność odpowiednich mutacji potwierdzono za pomocą sekwencjonowania DNA (*Genomed S.A.*).

3.2. Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli* metodą chemiczną

Bakterie *E. coli* hodowano w płynnej pożywce LB (*BioShop*) bez antybiotyków (50 ml) aż do uzyskania wartości OD₆₀₀ (*Optical Density*) w zakresie 0.3-0.5. Następnie całość inkubowano na lodzie przez 10 minut. Po tym czasie hodowle bakterii zwirowano. Osad bakteryjny zawieszono w ½ objętości wyjściowej hodowli roztworu w 50 mM CaCl₂ i inkubowano na lodzie. Roztwór ponownie zwirowano. Uzyskany osad zawieszono w 1/15 objętości wyjściowej hodowli roztworu w 50 mM CaCl₂ z 10% glicerolem. Uzyskaną zawiesinę rozdzielono do sterylnych probówek typu eppendorf i przechowywano w temperaturze –80°C. Wszystkie etapy przygotowania komórek kompetentnych przeprowadzano w sterylnych warunkach (pod komorą laminarną).

3.3. Transformacja komórek kompetentnych metodą szoku cieplnego

Do komórek kompetentnych *E. coli* dodawano DNA (wektor plazmidowy) i całość delikatnie mieszano. Następnie inkubowano na lodzie przez około 40 minut. Po tym czasie komórki poddawano szokowi cieplnemu poprzez umieszczenie ich na 45 sekund w termobloku nagrzanym do 42°C i ponownie umieszczano na lodzie na 2 minuty. Do mieszaniny dodano 1 ml ogrzanego

do 37°C LB bez antybiotyków i umieszczono w cieplarni w temperaturze 37°C na 30 minut. Po inkubacji zawiesinę bakterii zwirowano, zlano 1 ml nadsącza, a w pozostałej objętości zawieszono osad bakteryjny. Zawiesinę wysiewano na stałej pożywce LB (z podłożem agarozowym) z odpowiednimi antybiotykami.

3.4. Namnażanie i izolacja wektorów plazmidowych

Do komórek kompetentnych *DH5α* wprowadzono na drodze transformacji przy pomocy szoku cieplnego wektor plazmidowy pET-DUET-1 z wklonowanym genem danego wariantu białka. Zawiesinę wysiewano na szalce ze stałą pożywką LB wraz z ampicyliną (100 µg/ml) i umieszczano na noc w cieplarni w temperaturze 37°C. Następnego dnia przygotowano po 8 ml LB wraz z antybiotykami i umieszczano w nich pojedyncze kolonie bakteryjne. Całość zostawiono na całą noc w 37°C. Po tym czasie izolowano plazmidowe DNA korzystając z komercyjnego zestawu *Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EURX)*. Wyizolowane wektory plazmidowe przenoszono do sterylnych probówek typu eppendorf i mierzono ich stężenie korzystając ze spektrofotometru *NanoDrop2000 (ThermoScientific)*. W ostatnim etapie wykonywano elektroforezę w żelu agarozowym. W tym celu sporządzano 25 ml 0,8% (w/v) żelu. Próbkę przygotowywano poprzez zmieszanie wyizolowanego DNA oraz buforu *Loading Dye (6X) (ThermoScientific)* i nakładano na żel. Elektroforezę prowadzono na aparacie *PowerPac Basic (Bio-Rad)*.

3.5. Ekspresja nowych wariantów BLG

Kompetentne komórki *E. coli Origami B (DE3)* transformowano wektorem pET-DUET-1 i hodowano całą noc w 37°C na płytkach ze stałą pożywką LB z agarozą zawierających 100 µg/ml ampicyliny, 15 µg/ml kanamycyny i 12.5 µg/ml tetracykliny. Pojedyncze kolonie przenoszono do ok. 5ml płynnej pożywki LB zawierającej te same antybiotyki i hodowano przez całą noc w 37°C. Następnego dnia zwiększano płynne hodowle do ok. 100 ml i inkubowano przez noc w 37°C. Kolejnego dnia 100 ml całonocnej hodowli dodawano do 1L płynnej pożywki LB wraz z antybiotykami i inkubowano na wytrząsarce w 37°C do momentu osiągnięcia OD₆₀₀ ok.1.0. Następnie ekspresję białka indukowano 0.5 mM IPTG. Po indukcji temperaturę obniżano do ok. 25°C i pozostawiano na noc. Po zakończeniu hodowli zawiesiny bakteryjne wirowano, a osad przechowywano w -80°C.

3.6. Oczyszczanie nowych wariantów BLG

Nowe warianty β-laktoglobuliny oczyszczone zostały zgodnie z wcześniej opublikowanym protokołem (J. I. Loch et al. 2016) z wykorzystaniem systemu *ÄKTA Purifier10 FPLC (GE Healthcare)*. Osad komórkowy zawieszono w 50mM buforze fosforanowym pH 6.5, sonikowano,

a następnie zwirowano (15 000xG, 20minut, 4°C). W pierwszym etapie białko oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej. Otrzymany lizat nakładano na kolumnę XK 16/20 wypełnioną złożem *Fractogel EMD TMAE (S) (Merck Millipore)*. Białka wymywane były gradientem 2M NaCl rozpuszczonym w tym samym buforze. Zebrane frakcje analizowano metodą SDS-PAGE. Próbki zawierające β -laktoglobulinę poddano kolejnemu etapowi oczyszczania, tj. filtracji żelowej. Próbki nakładano na kolumnę XK 16/100 (*GE Healthcare*) wypełnioną złożem *Sephadex G75 (GE Healthcare)*. Zebrane frakcje ponownie analizowano metodą SDS-PAGE.

3.7. Krystalizacja

Przed krystalizacją próbki zawierające β -laktoglobulinę zagęszczono do uzyskania stężenia ok. 20-30 mg/ml przy użyciu filtrów *Amicon Centrifugal Filter Units (10 kDa) (EMD Millipore)*. Stężenie białka mierzono za pomocą spektrofotometru *NanoDrop2000 (ThermoScientific)*. Dokładną masę oraz molowy współczynnik ekstynkcji dla każdego wariantu ustalono korzystając z serwera *Expasy*, z programu *ProtParam*. Wartości te wynosiły odpowiednio $M=18260.13$ Da, $\epsilon=22710$ M⁻¹cm⁻¹ dla wariantu LAW, $M=18328.16$ Da, $\epsilon=22710$ M⁻¹cm⁻¹ dla wariantu FAW, $M=18346.20$ Da, $\epsilon=22710$ M⁻¹cm⁻¹ dla wariantu FA71W oraz $M=18379.27$ Da, $\epsilon=18700$ M⁻¹cm⁻¹ dla wariantu 58F/92Y. Warianty BLG krystalizowano metodą dyfuzji przez fazę gazową, techniką wiszącej kropli. Jako precypitantu użyto 2.0-3.0 M siarczan amonu w 0.5 M lub 1M TRIS-HCl pH 7.5-8.5. 2 μ l białka mieszano z 2 μ l precypitanta oraz 0.5 μ l 10 mM liganda. Podczas prowadzonych badań skupiono się na sprawdzeniu oddziaływania BLG z ośmioma trójcyklicznymi lekami: AMT, CLO, DOX, CET, FLU oraz CPZ występowały w postaci chlorowodoru rozpuszczalnego w wodzie, natomiast KET rozpuszczony został w DMSO, a AMX w metanolu. Dodatkowo wszystkie warianty były także testowane pod kątem powinowactwa do kwasów tłuszczowych (palmitynowy oraz mirystynowy) jako naturalnych ligandów BLG.

3.8. Pomiary dyfraktometryczne oraz rozwiązywanie struktury

Pomiary dyfraktometryczne wykonywano na dyfraktometrze *XtaLAB Synergy-S* wyposażonym w detektor *HyPix-6000HE (Rigaku Oxford Diffraction)* oraz dyfraktometrze *SuperNova* z detektorem *Atlas CCD (Rigaku Oxford Diffraction)*. Dane zbierano w 100 K przy użyciu promieniowania CuK α . Przed pomiarem kryształy zanurzano w krioprotektancie składającym się z precypitanta oraz 20% glicerolu. Obrazy dyfrakcyjne przetwarzano za pomocą programu *Crysalis^{PRO} (Rigaku Oxford Diffraction)*. Niektóre dane dyfrakcyjne zebrane zostały przy użyciu promieniowania synchrotronowego DESY w Hamburgu na linii P13 oraz BESSY w Berlinie na linii 41.1.

Struktury rozwiązano używając metody podstawienia molekularnego w programie *Phaser* (Read et al. 2013) i udokładniono przy użyciu *Refmac5* (Murshudov et al. 2011) z pakietu *CCP4* (Winn et al. 2011). Mapy gęstości elektronowej analizowano przy użyciu programu *Coot* (Winn et al. 2011). Do wizualizacji i analizy struktur posłużył program *PyMol* (Yuan et al. 2017) oraz serwer *Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP)* (Salentin et al. 2015), natomiast do walidacji serwery: *MolProbity* (V. B. Chen et al. 2010), *PDB Validation* (Young et al. 2017), *PDB REDO* (Joosten et al. 2012) oraz *Achesym* (Kowiel et al. 2014).

3.9. Dichroizm kołowy oraz pomiary stabilności termicznej

Dichroizm kołowy (CD) posłużył do oszacowania stałej dysocjacji białko-ligand. Pomiary wykonywane były na spektrofotometrze *JASCO J-815* w temperaturze pokojowej przy użyciu kuwet kwarcowych o długości optycznej równej 10 mm. Do pomiarów w zakresie bliskiego UV wykorzystano 20 mM lub 200 mM białko w 50 mM buforze fosforanowym pH 6.5. W pierwszym etapie wykonano pomiary dla samego białka, a następnie dla białka z dodatkiem liganda w proporcji 1:1 oraz 1:2. Dla kompleksów, gdzie zauważono zmiany w widmie wykonano kompletne miareczkowanie. Próbkę białka miareczkowano 10 mM roztworem liganda aż do jego 3-krotnego nadmiaru. Pomiary powtórzono 3-krotnie i uśredniono. Przebieg pomiarów analizowany był za pomocą programu *Spectra Manager*. W programie *Origin* widma CD zostały skorygowane poprzez odjęcie tła pochodzącego od buforu. Do oszacowania stałych K_d zastosowano jednomiejscowy model wiązania. Jest to najprostsz model, opisany małą liczbą parametrów. Do wyznaczenia stałej wiązania skorzystano z programu *Origin*, do którego wprowadzono równanie na frakcję związaną wyprowadzone z prostego modelu dysocjacji $BL \rightarrow B + L$:

$$\theta = \frac{(K_d + [L_0] + n[B_0]) - \sqrt{(K_d + [L_0] + n[B_0])^2 - 4n[B_0][L_0]}}{2n[B_0]}$$

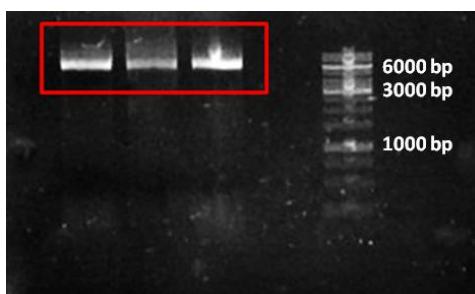
Gdzie θ jest frakcją obsadzonych miejsc wiążących. W równaniu tym mamy dwa parametry: K_d oraz n . Jako n rozumiemy liczbę miejsc wiążących, które przyjęto jako 1. Równanie to jest wykorzystywane w regresji nieliniowej, w analizie której program *Origin* stosuje algorytm iteracyjny Levenberga-Marquardta. Wyznaczone stałe K_d , posłużyły do określenia powinowactwa nowych wariantów BLG do leków.

Pomiary termostabilności (nanoDSF) wykonano na urządzeniu Prometheus NT.48 (*NanoTemper Technologies GmbH*). Próbkę białka o stężeniu ok. 20-30 mg/ml umieszczono w specjalnych kapilarach. Skany przeprowadzano w zakresie od 20°C do 95°C przy wzroście temperatury 1°C/min. Fluorescencja przy 330 nm i 350 nm była monitorowana przez cały czas wzrostu temperatury. Dane analizowane były przy użyciu oprogramowania Prometheus: *PR.ThermControl*, *PR.ChemControl* oraz *PR.TimeControl* (*NanoTemper Technologies GmbH*).

4. Wyniki

4.1. Mutageneza

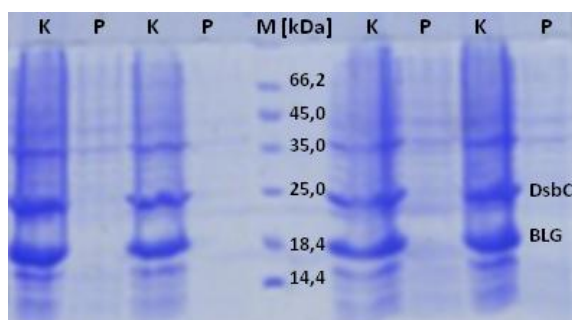
Stosując procedurę *QuickChange* według której, już wcześniej udało się otrzymać w Zespole Biokrytalografii ZKiK Wydziału Chemii UJ nowe warianty BLG, w tym FAW (J. I. Loch, 2022) LAW oraz 58F/92Y otrzymałam nowy wariant β -laktoglobuliny: **I56F/L39A/I71W (FA71W)**. W pierwszym etapie po reakcji PCR, wykonano elektroforezę w żelu agarozowym w celu analizy uzyskanego plazmidu. Następnie do komórek kompetentnych *DH5 α* wprowadzono na drodze transformacji przy pomocy szoku cieplnego rekombinowane DNA, w następnej kolejności plazmid wyizolowano i sprawdzono jego czystość za pomocą elektroforezy DNA (**Rysunek 11**). Dzięki sekwencjonowaniu (*Genomed S.A.*) potwierdzono obecność pożądanej mutacji.



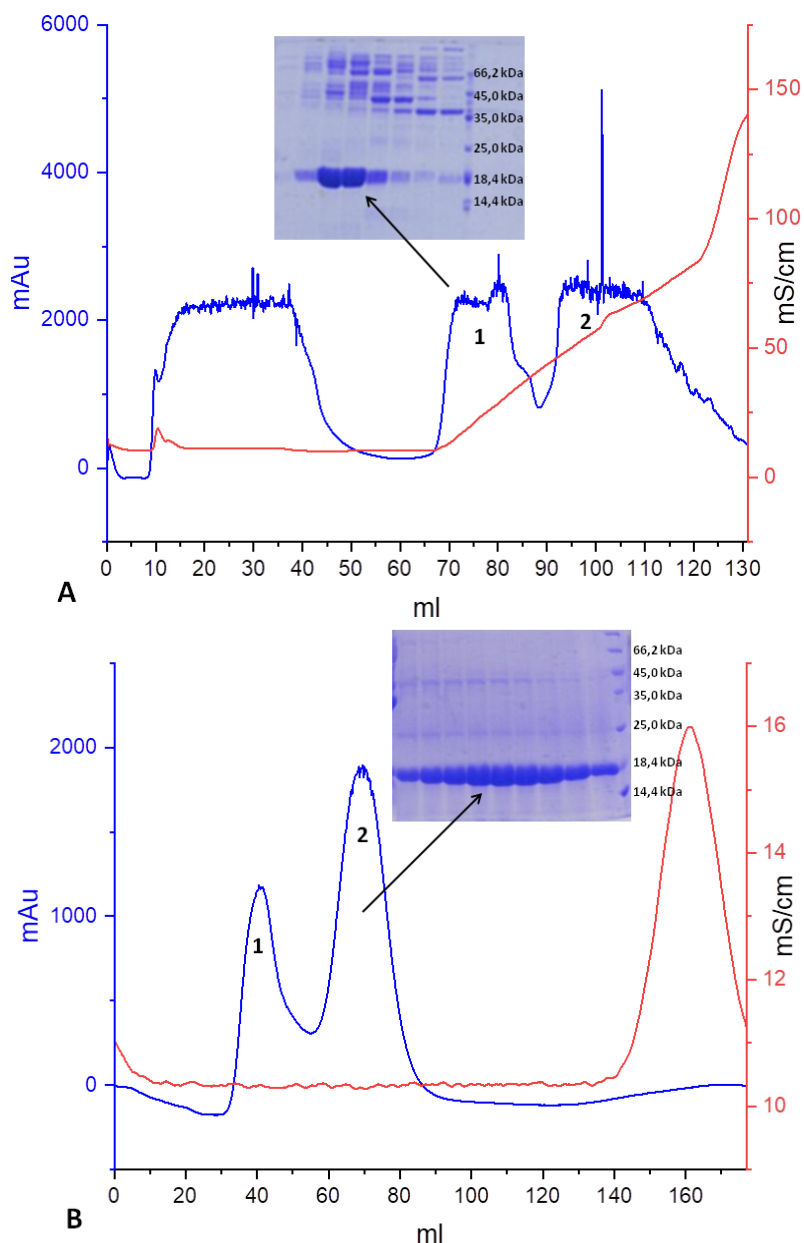
Rysunek 11. Wyniki elektroforezy w żelu agarozowym po izolacji plazmidu FA71W.

4.2. Ekspresja i oczyszczanie nowych wariantów BLG

Korzystając z wcześniej już opracowanego protokołu ekspresji i oczyszczania BLG (J. I. Loch et al. 2016) z sukcesem udało się otrzymać i oczyścić nowe warianty β -laktoglobuliny w ilościach niezbędnych do kolejnych etapów badań. Po etapie ekspresji wykonywano elektroforezę SDS-PAGE w celu weryfikacji czy zaszła ekspresja nowych wariantów BLG (~18.4 kDa) oraz izomerazy DsbC (~24 kDa) (**Rysunek 12**), która niezbędna jest do poprawnego fałdowania BLG oraz jej mutantów podczas ekspresji w komórkach *E. coli* (Nozach et al. 2013). SDS-PAGE stosowano także po kolejnych etapach oczyszczania (J. I. Loch et al. 2016) tj. chromatografii jonowymiennej (**Rysunek 13A**) oraz sączeniu molekularnym (**Rysunek 13B**).



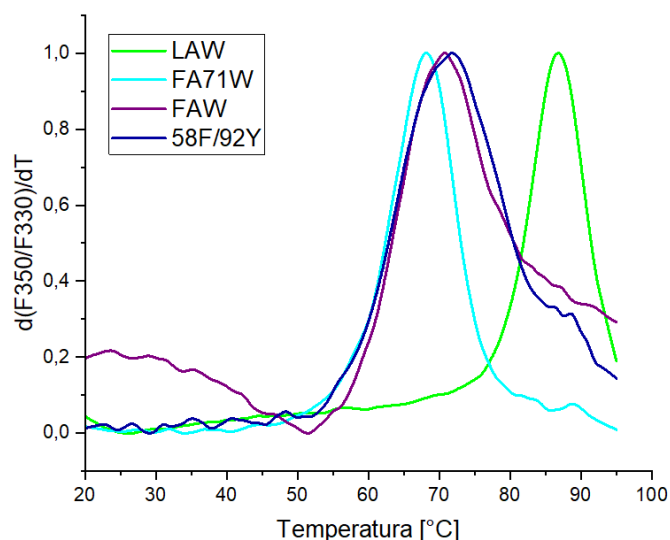
Rysunek 12. Kontrola ekspresji za pomocą elektroforezy SDS-PAGE, gdzie: K - próbki po ekspresji, P - próbki przed ekspresją, M - marker



Rysunek 13. Przykładowe chromatogramy wraz z żelami SDS-PAGE (A) po chromatografii jonowymiennej oraz (B) po sączeniu molekularnym otrzymane podczas oczyszczania wariantu FA71W.

4.3. Pomiary stabilności termicznej nowych wariantów BLG

Stabilność termiczna wszystkich nowych mutantów analizowanych w tej pracy, tj. F105L/L39A/M107W (LAW), I56F/L39A/M107W (FAW), I56F/L39A/I71W (FA71W) oraz L58F/V92Y (58F/92Y) wyznaczana została za pomocą metody różnicowej fluorymetrii skaningowej w skali nano (nanoDSF). Pomiary wykonywane w zakresie 20-95°C wykazały obecność jednego przejścia termicznego dla wszystkich badanych wariantów (*Rysunek 14*). W celu wyznaczenia temperatury denaturacji każdego z badanych wariantów (*Tabela 2*) skorzystano z wyników obliczonej pierwszej pochodnej stosunku intensywności fluorescencji przy 350 i 330 nm (F350/F330).



Rysunek 14. Znormalizowane krzywe denaturacji termicznej dla badanych wariantów BLG.

Uzyskane wyniki pokazały, że największą stabilność termiczną wykazuje wariant LAW, natomiast najmniejszą stabilnością charakteryzuje się wariant FA71W. Pozostałe dwa mutanty tj. FAW oraz 58F/92Y prezentują zbliżone wartości T_m . W **Tabeli 2** zestawiono wartości T_m dla badanych wariantów BLG. Zostały one porównane z wyznaczoną wcześniej temperaturą denaturacji dla dzikiej formy BLG (WT) (J. I. Loch et al. 2018).

Tabela 2. Stabilność termiczna dzikiej formy (WT) oraz badanych mutantów BLG.

Wariant BLG	WT	LAW	FAW	FA71W	58F/92Y
T_m [°C]	79.9	86.4	70.5	68.1	71.8

4.4. Krystalizacja nowych wariantów BLG z trójcyklicznymi lekami

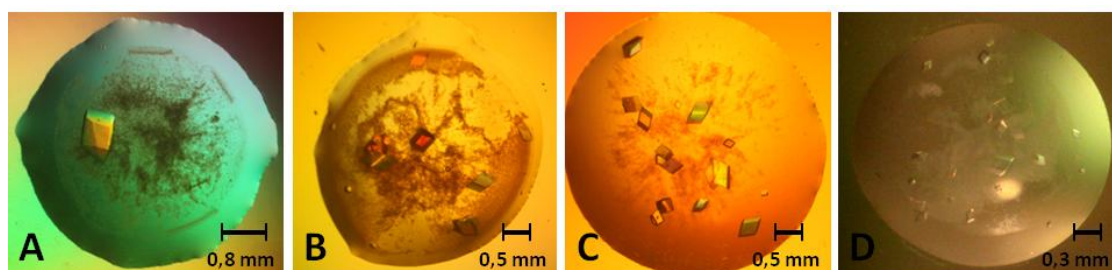
Podstawowym narzędziem badawczym stosowanym w tej pracy są metody krystalograficzne, które pozwalają na stosunkowo szybką ocenę zdolności wiązania wybranych leków trójcyklicznych przez nowe warianty β -laktoglobuliny. Analiza strukturalna wymaga jednak optymalizacji warunków krystalizacji w celu otrzymania kryształów pozwalających na zbieranie wysokiej jakości danych dyfrakcyjnych. Z tego powodu, jednym z najważniejszych zadań w mojej pracy było znalezienie optymalnych warunków krystalizacji kompleksów BLG z lekami trójcyklicznymi. Aby to osiągnąć, testowano warunki krystalizacji różniące się wartością pH buforu, stężeniem precypitanta oraz stężeniem białka. Dla większości badanych par białko-ligand uzyskano dobrej jakości kryształy, odpowiednie do pomiarów dyfrakcyjnych przy użyciu dyfraktometru monokrystalicznego lub promieniowania synchrotronowego. W **Tabeli 3** przedstawiono najważniejsze obserwacje z przeprowadzonych eksperymentów, a poniżej zdjęcia kryształów (**Rysunek 15**) wybranych kompleksów każdego z badanych wariantów białka. Wyznaczone struktury krystaliczne kompleksów białko-ligand zostaną omówione szczegółowo w kolejnych rozdziałach pracy.

Tabela 3. Zestawienie wyników eksperymentów krystalizacyjnych skorelowane z analizą wyznaczonych struktur krystalicznych. Legenda: NIE – ligand nie związał się, TAK – ligand związany wewnątrz baryłki

<i>Mutant</i>	<i>LAW</i>	<i>FAW</i>	<i>FA71W</i>	<i>58F/92Y</i>
<i>AMT</i>	NIE	TAK	NIE	-
<i>CLO</i>	NIE	TAK	NIE	-
<i>DOX</i>	NIE	TAK	×	NIE
<i>KET</i>	NIE	TAK	TAK	NIE
<i>AMX</i>	NIE	NIE	TAK	TAK
<i>FLU</i>	TAK	TAK	TAK	NIE
<i>CPZ</i>	TAK	TAK	TAK	NIE
<i>CET</i>	NIE	NIE	TAK	×
<i>PAL</i>	NIE	NIE	NIE	NIE
<i>MYR</i>	NIE	NIE	NIE	NIE

- wysyp drobnych kryształów nieodpowiednich do badań dyfrakcyjnych

* nie krystalizuje

**Rysunek 15.** Zdjęcia wybranych kryształów kompleksów (A) LAW-FLU, (B) FAW-DOX, (C) FA71W-KET oraz (D) 58F/92Y-AMX.

Dodatkowo w celach porównawczych wykonano również próby ko-krystalizacji natywnej formy BLG ze wszystkimi ośmioma testowanymi ligandami (**Rysunek 10**). Eksperymenty krystalizacyjne w warunkach stosowanych dla nowych wariantów BLG zakończyły się niepowodzeniem dla formy natywnej, gdyż nie udało się zaobserwować wzrostu kryształów.

4.5. Pomiary dyfraktometryczne i udokładnianie struktur

Podczas prowadzonych badań dla większości kompleksów białko-ligand otrzymano kryształy odpowiednie do pomiarów dyfraktometrycznych. Dane dyfrakcyjne przedstawione w tej pracy zebrano w sumie dla **36 kryształów**. W **Tabelach 4, 5, 6** zestawiono statystyki przetwarzania danych oraz udokładniania struktur kompleksów, w których potwierdzono obecność liganda w kieszeni wiążącej. W suplemencie do pracy, zamieszczonym na końcu rozprawy doktorskiej, zamieszczono statystyki przetwarzania danych z pomiarów, dla których struktury zostały rozwiązane, ale mapy gęstości pokazały, że ligand nie związał się do białka. Z tego względu nie podejmowano dalszych prób udokładniania tych struktur.

Tabela 4. Statystyka przetwarzania danych dyfrakcyjnych oraz udokładniania struktur

Wariant	F105L/L39A/M107W (LAW)			LF8F/V92Y (58F/92Y)	
Ligand	Forma apo	FLU	CPZ	Forma apo	AMX
Statystyka przetwarzania danych					
Źródło promieniowania	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Berlin BESSY II
Długość fali [Å]	1.54184	1.54184	1.54184	1.54184	0.97630
Grupa przestrzenna	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$
Parametry komórki elementarnej [Å]	a=b=52.30, c=111.69	a=b=53.58, c=110.97	a=b=52.63, c=109.85	a=b=52.54, c=110.99	a=b=52.84, c=109.53
Zakres rozdzielczości [Å]	17.59-2.20 (2.27-2.20)*	19.27-1.84 (1.88-1.84)	16.99-2.10 (2.16-2.10)	21.05-1.80 (1.84-1.80)	54.77-1.80 (1.84-1.80)
Całkowita liczba refleksów	76408	56885	35606	167480	318198
Kompletność [%]	99.0 (94.1)	95.2 (82.2)	99.7 (99.9)	99.9 (100.0)	100.0 (100.0)
Liczba refleksów symetrycznie niezależnych	9383 (808)	15823 (801)	10782 (845)	17110 (989)	17098 (1005)
$I/\sigma(I)$	12.7 (2.9)	11.4 (1.6)	5.3 (1.8)	17.1 (1.7)	14.5 (1.4)
CC(1/2)	0.998 (0.846)	0.998 (0.701)	0.995 (0.761)	0.999 (0.608)	0.998 (0.637)
Redundancja	8.6 (8.1)	3.6 (2.9)	3.3 (2.9)	9.8 (6.1)	18.6 (18.7)
R_{merge}	0.104 (0.658)	0.064 (0.597)	0.093 (0.495)	0.077 (0.925)	0.098 (1.911)
R_{meas}	0.119 (0.746)	0.082 (0.764)	0.110 (0.607)	0.085 (1.113)	0.103 (2.016)
Statystyka udokładniania struktur					
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.226/0.285	0.228/0.279	0.208/0.275	0.195/0.228	0.215/0.275
RMSD dla dł. wiązań (Å)	0.007	0.009	0.008	0.009	0.008
RMSD dla kątów (°)	1.476	1.612	1.489	1.587	1.457
Liczba refleksów użytych w udokładnianiu (zestaw testowy)	8214 (1144)	14674 (1115)	9646 (1111)	15955 (1120)	16000 (1057)
Diagram Ramachandrana (%) Favoured/allowed/outliers	96/4/0	95/5/0	94/6/0	96/4/0	97/3/0
Liczba atomów białka/cząsteczek wody	1159/31	1258/52	1228/65	1226/78	1198/51

*wartości w nawiasie odnoszą się do najwyższego zakresu rozdzielczości

Tabela 5. Statystyka przetwarzania danych dyfrakcyjnych oraz udokładniania struktur

Mutant	I56F/L39A/M107W (FAW)					
Ligand	AMT	CLO	DOX	KET	FLU	CPZ
Statystyka przetwarzania danych						
Źródło promieniowania	SuperNova	Synergy-S	Synergy-S	SuperNova	Hamburg DESY	SuperNova
Długość fali [Å]	1.54184	1.54184	1.54184	1.54184	0.77490	1.54184
Grupa przestrzenna	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$
Parametry komórki elementarnej [Å]	a=b=53.57, c=113.19	a=b=53.25, c=112.56	a=b=53.41, c=113.06	a=b=53.62, c=113.19	a=b=53.46, c=113.95	a=b=53.39, c=114.00
Zakres rozdzielczości [Å]	16.75-1.90 (1.94-1.90)	21.34-1.70 (1.73-1.70)	20.31-1.68 (1.71-1.68)	17.48-2.30 (2.38-2.30)	56.97-1.47 (1.50-1.47)	17.28 (1.85) 1.89 (1.85)
Całkowita liczba refleksów	29608	187917	97673	30328	647887	52300
Kompletność [%]	92.9 (93.4)	99.9 (99.1)	99.5 (99.9)	99.4 (99.8)	99.9 (98.2)	99.9 (100.0)
Liczba refleksów symetrycznie niezależnych	14080 (929)	21037 (1085)	21834 (1116)	8811 (856)	32896 (1574)	16689 (991)
$I/\sigma(I)$	14.7 (3.0)	22.2 (1.8)	18.6 (1.4)	10.5 (2.5)	24.4 (1.5)	21.0 (2.2)
CC(1/2)	0.998 (0.799)	1.000 (0.687)	1.000 (0.561)	0.994 (0.668)	0.999 (0.667)	0.999 (0.863)
Redundancja	2.1 (1.6)	8.9 (5.1)	4.5 (2.8)	3.4 (2.4)	19.7 (18.9)	3.1 (2.4)
R_{merge}	0.034 (0.335)	0.055 (0.713)	0.037 (0.852)	0.093 (0.446)	0.054 (2.511)	0.037 (0.298)
R_{meas}	0.048 (0.474)	0.062 (0.882)	0.042 (0.750)	0.106 (0.568)	0.057 (2.644)	0.045 (0.379)
Statystyka udokładniania struktur						
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.181/0.231	0.215/0.246	0.247/0.270	0.190/0.267	0.205/0.232	0.186/0.230
RMSD dla dł. wiązań (Å)	0.007	0.009	0.010	0.008	0.012	0.008
RMSD dla kątów (°)	1.551	1.626	1.697	1.471	1.795	1.515
Liczba refleksów użytych w udokładnianiu (zestaw testowy)	14069 (1135)	19937 (1017)	20776 (1042)	7669 (1109)	31840 (1006)	15559 (1094)
Diagram Ramachandrana (%)	96/4/0	96/4/0	96/4/0	96/4/0	94/6/0	94/6/0
Favoured/allowed/outliers	96/4/0	96/4/0	96/4/0	96/4/0	94/6/0	94/6/0
Liczba atomów białka/cząsteczek wody	1262/124	1270/102	1229/76	1231/41	1265/96	1249/93

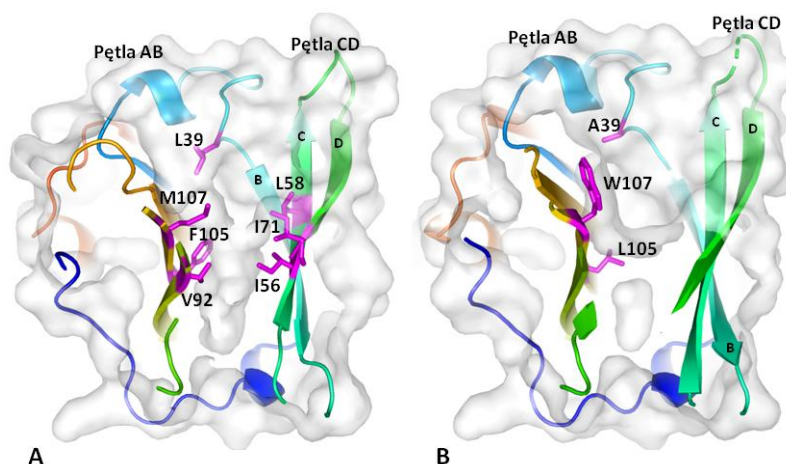
Tabela 6. Statystyka przetwarzania danych dyfrakcyjnych oraz udokładniania struktur

Mutant	I56F/L39A/I71W (FA71W)					
Ligand	Forma apo	CET	KET	AMX	FLU	CPZ
Statystyka przetwarzania danych						
Źródło promieniowania	Synergy-S	Synergy-S	SuperNova	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S
Długość fali [Å]	1.54184	1.54184	1.54184	1.54184	1.54184	1.54184
Grupa przestrzenna	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$
Parametry komórki elementarnej [Å]	a=b=52.69, c=111.21	a=b=53.49, c=110.32	a=b=53.75, c=109.31	a=b=53.49, c=110.04	a=b=53.57, c=109.93	a=b=53.23, c=109.80
Zakres rozdzielczości [Å]	19.99-1.60 (1.63-1.60)	26.45-2.00 (2.05-2.00)	21.41-1.75 (1.78-1.75)	19.58-1.80 (1.84-1.80)	28.76-2.00 (2.05-2.00)	21.25-1.80 (1.84-1.80)
Całkowita liczba refleksów	89195	96451	213346	75471	92914	78723
Kompletność [%]	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	99.9 (100.0)	99.4 (98.5)	100.0 (100.0)	99.6 (99.3)
Liczba refleksów symetrycznie niezależnych	24020 (1107)	13416 (978)	19109 (1033)	17410 (1011)	12921 (925)	17250 (1012)
$I/\sigma(I)$	16.4 (1.2)	20.3 (2.1)	10.5 (1.6)	21.0 (1.7)	16.6 (4.0)	21.5 (2.5)
CC(1/2)	0.999 (0.511)	0.999 (0.727)	0.996 (0.618)	0.999 (0.756)	0.998 (0.845)	1.000 (0.845)
Redundancja	3.7 (2.5)	7.2 (5.0)	11.2 (8.2)	4.3 (2.8)	7.2 (5.1)	4.6 (3.0)
R_{merge}	0.031 (0.802)	0.060 (0.558)	0.120 (0.945)	0.036 (0.582)	0.074 (0.367)	0.033 (0.402)
R_{meas}	0.039 (1.098)	0.070 (0.685)	0.125 (1.012)	0.043 (0.755)	0.085 (0.459)	0.040 (0.525)
Statystyka udokładniania struktur						
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.189/0.228	0.212/0.266	0.216/0.262	0.229/0.283	0.203/0.247	0.212/0.253
RMSD dla dł. wiązań (Å)	0.009	0.007	0.008	0.009	0.010	0.011
RMSD dla kątów (°)	1.601	1.479	1.515	1.613	1.623	1.715
Liczba refleksów użytych w udokładnianiu (zestaw testowy)	22817 (1168)	12318 (1063)	17964 (1116)	16306 (1066)	11735 (1159)	16105 (1095)
Diagram Ramachandrana (%)	96/4/0	96/4/0	97/3/0	96/4/0	96/4/0	97/3/0
Favoured/allowed/outliers	96/4/0	96/4/0	97/3/0	96/4/0	96/4/0	97/3/0
Liczba atomów białka/cząsteczek wody	1191/102	1268/59	1229/73	1237/73	1258/52	1249/98

4.6. Wariant F105L/L39A/M107W (LAW)

4.6.1. Struktura formy bez liganda

Wariant LAW został zaprojektowany w oparciu o wcześniejsze analizy (Bonarek et al. 2020) (J. I. Loch et al. 2021) (J. I. Loch et al. 2018), które wykazały, że mutacja w pozycji 105, powoduje skrócenie kieszeni wiążącej, natomiast zastąpienie leucyny w pozycji 39 przez alaninę umożliwia poszerzenie miejsca wiążącego w kierunku pętli AB (J.I. Loch et al. 2022). Taka zmiana geometrii umożliwiła uzyskanie wariantów, które miały możliwość akomodacji leków trójcyklicznych we wnętrzu β -baryłki (J. I. Loch et al. 2018), gdyż aromatyczna reszta w pozycji 107 stabilizowała ligand poprzez tworzenie oddziaływań π - π *stacking* (J. I. Loch et al. 2018). Porównanie kształtu miejsca wiążącego w formie dzikiej BLG oraz w wariantcie LAW jest przedstawione na *Rysunku 16*.



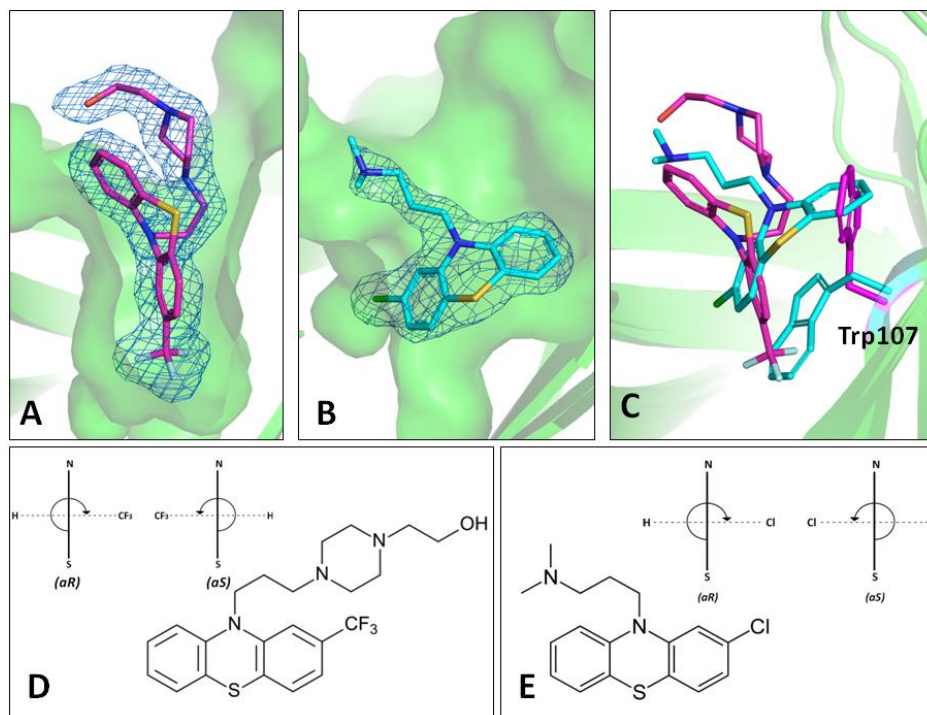
Rysunek 16. Kształt kieszeni wiążącej (A) dzikiej formy BLG (WT, PDB id: 1BSY) oraz (B) wariantu LAW.

Przeprowadzone eksperymenty krystalizacyjne wykazały, że wariant LAW ko-krystalizował ze wszystkimi badanymi ligandami (*Tabela 3*). Dla wszystkich otrzymanych kryształów zebrano dane dyfrakcyjne (zakres rozdzielczości 2.30-1.84 Å), jednak wyznaczone struktury pokazały jednoznacznie, że ligand związany został w β -baryłce jedynie dla kompleksów LAW-FLU (flufenazyne) oraz LAW-CPZ (chloropromazyne) (*Tabela 4*).

4.6.2. Struktury kompleksów LAW-FLU oraz LAW-CPZ

Kryształy wariantu LAW odpowiednie do pomiarów dyfraktometrycznych uzyskano w kroplach zawierających 2.4-2.8 M siarczan amonu w 0.5 M Tris-HCl pH 8.5 z dodatkiem 10 mM liganda (flufenazyne lub chloropromazyne) (10-krotny nadmiar molowy). Struktury kompleksów wyznaczono z maksymalną rozdzielczością równą 1.84 Å (LAW-FLU) lub 1.86Å (LAW-CPZ). Wyznaczone struktury miały symetrię grupy przestrzennej $P3_221$. W jednostce

asymetrycznej znajdował się pojedynczy łańcuch białka, stanowiący podjednostkę homodimeru β -laktoglobuliny. Zgodnie z oczekiwaniami (krystalizacja w pH 8.5) (Bello 2020), pętla EF występowała w konformacji otwartej, natomiast w rejonie pętli GH zaobserwowano nieuporządkowanie. Wyznaczone mapy gęstości elektronowej pokazały jednoznacznie, że w obu strukturach w kieszeni wiążącej widoczna jest gęstość odpowiadająca kształtom i rozmiarom liganda użytego do ko-krystalizacji (**Rysunek 17 A, B**). Udokładnienie wykazało pełne obsadzenie liganda w każdej ze struktur.

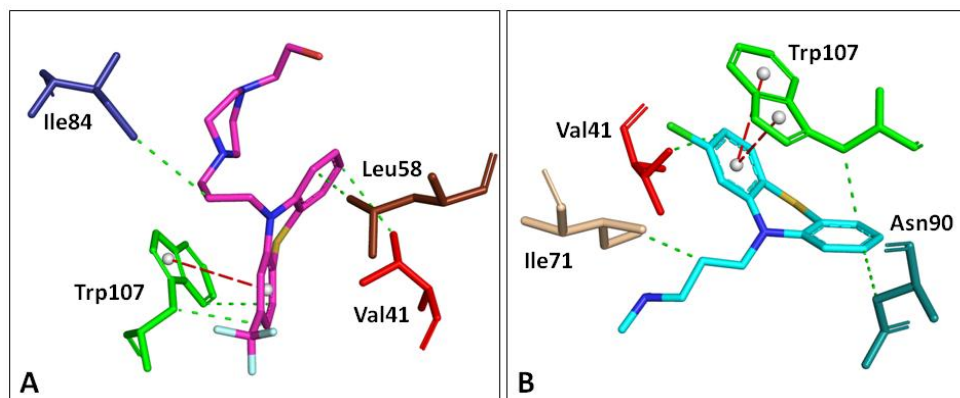


Rysunek 17. Mapa gęstości elektronowej $2F_o-F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksów (A) LAW-FLU oraz (B) LAW-CPZ. (C) Porównanie położenia ligandów w kieszeni wiążącej oraz konformacji Trp107 (kolor różowy kompleks z flufenazyną, kolor niebieski z chlorpromazyną). Struktury ligandów oraz ich chiralne konformacje: (D) flufenazyna oraz (E) chlorpromazyna.

W kompleksie LAW-FLU, grupa trifluorometylowa ($-CF_3$) związana z trójcykliczną aromatyczną częścią liganda, skierowana jest do wnętrza β -baryłki, a fragment zawierający trzy pierścienie wypełnia całą dostępną przestrzeń w zmodyfikowanym miejscu wiążącym (**Rysunek 17A**). Alifatyczny pierścień piperazynowy flufenazyny jest zlokalizowany jest w górnej części β -baryłki. Struktura kompleksu LAW-FLU stabilizowana jest głównie poprzez oddziaływania hydrofobowe (**Rysunek 18A**), wśród nich wyróżnić można oddziaływanie z resztami Val41 (3.7 Å), Leu58 (3.4Å), Ile84 (3.8Å) oraz Trp107 (3.7Å). Dodatkowo jeden z pierścieni aromatycznych flufenazyny zaangażowany jest w tworzenie oddziaływań typu π - π *stacking* z pierścieniem indolowym Trp107 (4.4Å).

W strukturze kompleksu LAW-CPZ, atom chloru połączony z aromatycznym ugrupowaniem fenotiazynowym skierowany jest w kierunku reszt Leu58, Val41 oraz Ile56, natomiast alifatyczny „ogon” liganda skierowany jest w kierunku wejścia do β -baryłki. Porównując struktury

kompleksów LAW-CPZ oraz LAW-FLU zauważyć można różnice w położeniu łańcucha bocznego Trp107, który w zależności od typu liganda obrócony jest o 180° i skierowany do wejścia lub wnętrza miejsca wiążącego (**Rysunek 17C**). Podobnie jak w kompleksie LAW-FLU, strukturę kompleksu LAW-CPZ stabilizują oddziaływania hydrofobowe z resztami: Val41 (2.8Å), Ile71 (3.3Å), Asn90 (3.8Å), Trp107 (3.4Å). Co więcej, oba pierścienie Trp107 tworzą oddziaływania typu π - π *stacking* z jednym z pierścieni chloropromazyny (**Rysunek 18B**).



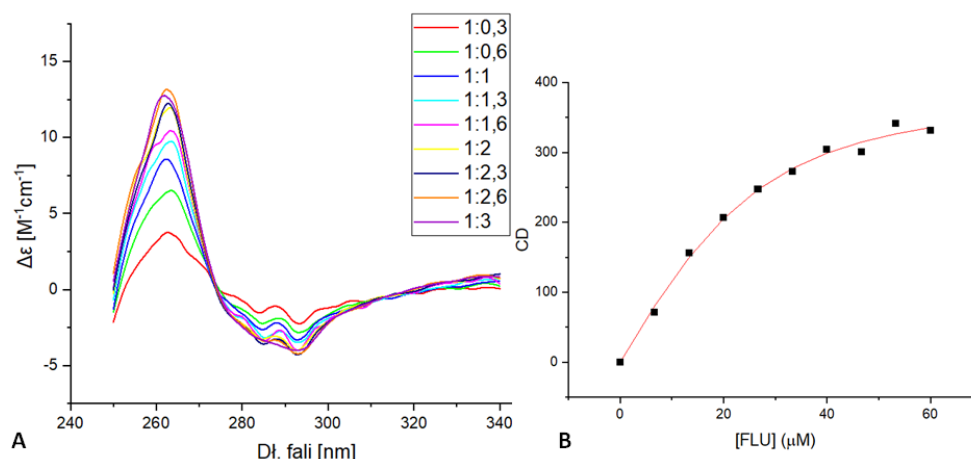
Rysunek 18. Oddziaływania stabilizujące cząsteczkę (A) flufenazyny (kolor różowy) oraz (B) chloropromazyny (kolor niebieski) w kieszeni wiążącej wariantu LAW. Czerną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływania π - π , natomiast zielonymi oddziaływania hydrofobowe.

Ze względu na fakt, że ugrupowanie aromatyczne w chloropromazynie nie jest płaskie, w zależności od pozycji atomu chloru cząsteczka chloropromazyny może występować w postaci dwóch chiralnych konformerów: (*aR*)CPZ oraz (*aS*)CPZ (**Rysunek 17E**). Analiza struktur kompleksu LAW-CPZ potwierdziła wcześniejsze badania (J. I. Loch et al. 2018), w których wykazano, że warianty zawierające mutacje F105L preferują wiązanie konformera (*aS*)CPZ. Ze względu na wygięcie układu trójpierścieniowego, struktura flufenazyny, również może tworzyć chiralne konformery (*aR*) lub (*aS*) (**Rysunek 17D**) (Bernard Testa 2013). Analizując strukturę kompleksu LAW z flufenazyną dostrzec można, że w odróżnieniu od chloropromazyny, w kieszeni wiążącej znajduje się (*aR*)FLU.

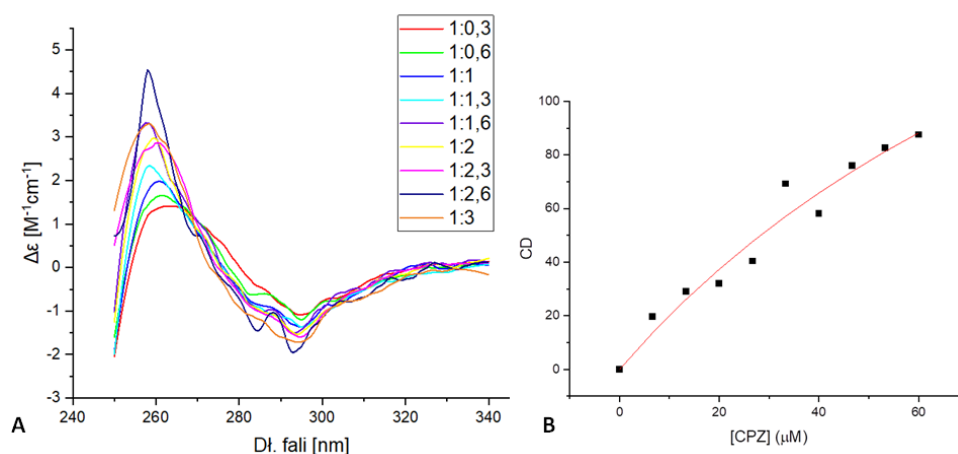
4.6.3. Wyznaczanie stałej wiązania ligandów z pomocą CD

Pomimo tego, że roztwory samych ligandów wykorzystywanych w tej pracy nie dają sygnału CD, indukowany sygnał CD (ICD) może pojawić się po przyłączeniu cząsteczki liganda do białka. Taki sygnał jest wynikiem interakcji molekularnych pomiędzy związkem chiralnym i achiralnym. Pierwszym etapem było sprawdzenie, czy dodatek liganda do roztworu białka zmienia sygnał CD. Dodatek liganda w stosunku 1:1 oraz 1:2 powodował wyraźny wzrost sygnału przy ok. 265 nm zarówno podczas miareczkowania wariantu LAW flufenazyną, jak i chloropromazyną. Otrzymane widma CD zostały zamieszczone w suplemencie do pracy (**Rysunek S1**). W kolejnym etapie wykonano pełne miareczkowanie roztworów LAW ligandem.

Białko o stężeniu 20 μM miareczkowano roztworami leków aż do 3-krotnego nadmiaru liganda. Każdy pomiar powtórzono 3-krotnie. Dane przedstawiono na **Rysunku 19** i **20**.



Rysunek 19. (A) Wyniki pomiarów ICD po miareczkowaniu wariantu LAW roztworem flufenazyny aż do 3-krotnego nadmiaru leku. (B) Najlepsze dopasowanie danych eksperymentalnych do jednoniejsowego modelu wiązania.



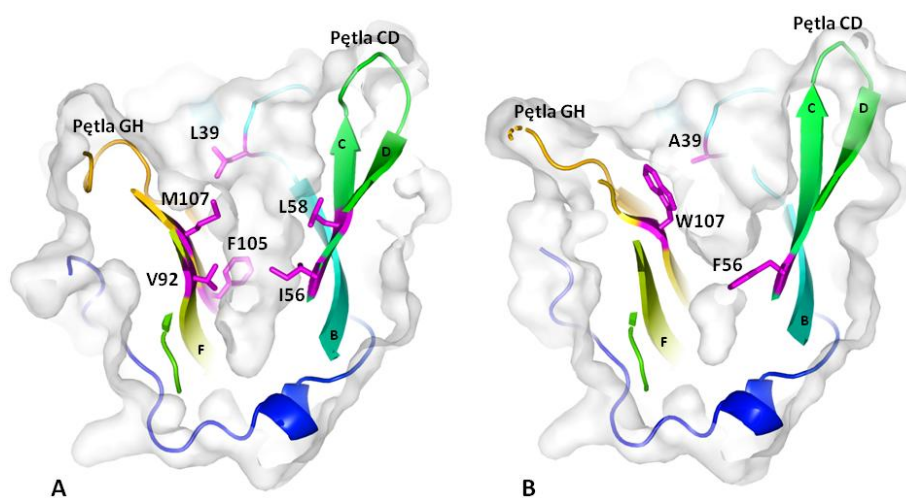
Rysunek 20. (A) Wyniki pomiarów ICD po miareczkowaniu wariantu LAW roztworem chloropromazyny aż do 3-krotnego nadmiaru leku. (B) Najlepsze dopasowanie danych eksperymentalnych do jednoniejsowego modelu wiązania.

Na **Rysunkach 19** i **20** widać wyraźne zmiany sygnału przy 265 nm. Stosując jednoniejskowy model wiązania na podstawie otrzymanych wyników pomiaru ICD obliczono stałą dysocjacji K_d , która wyniosła odpowiednio dla flufenazyny: $7.1 \pm 4.5 \mu\text{M}$ oraz dla chloropromazyny: $97.0 \pm 76.1 \mu\text{M}$. Zdecydowanie mniejsza stała dysocjacji wyznaczona dla kompleksu LAW-FLU pokazuje, że wariant LAW charakteryzuje się wyższym powinowactwem do flufenazyny.

4.7. Wariant I56F/L39A/107W (FAW)

4.7.1. Struktura formy bez liganda (PDB id: 7Q17)

Wariant I56F/L39A/M107W (FAW) posiada resztę aromatyczną (Phe) w pozycji 56 oraz w pozycji 107, reszty te mogą potencjalnie tworzyć oddziaływania typu π - π *stacking* z ligandami. W tym mutancie, podobnie jak w wariancie LAW (**Rozdział 4.6**), zastąpienie leucyny w pozycji 39 przez alaninę posłużyło do poszerzenia kieszeni wiążącej w kierunku pętli AB. Porównanie kształtu miejsca wiążącego w formie dzikiej laktoglobuliny (PDB id: 1BSY) oraz w mutancie FAW (PDB id: 7Q17) przedstawiono na **Rysunku 21**.



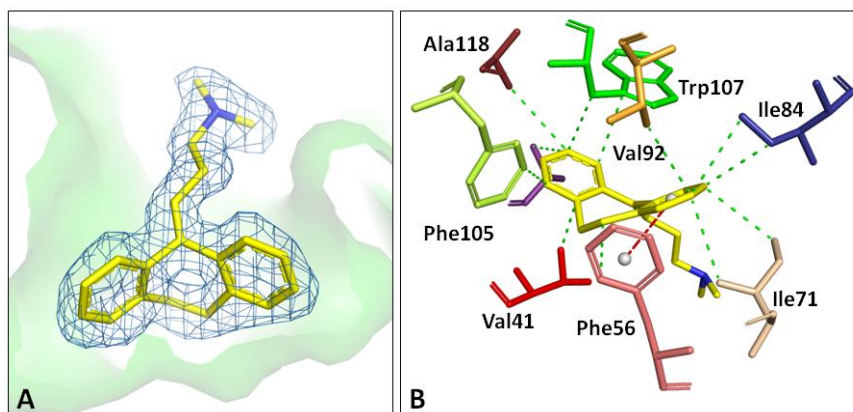
Rysunek 21. Kształt kieszeni wiążącej (A) dzikiej formy BLG (WT, PDB id: 1BSY) oraz (B) wariantu FAW (PDB id: 7Q17).

Największą liczbę struktur kompleksów białko-ligand analizowanych w tej pracy wyznaczono właśnie dla wariantu FAW. Obecność liganda w kieszeni wiążącej potwierdzono dla amitryptyliny (AMT), kломipraminy (CLO), flufenazyny (FLU), doksepiny (DOX), ketotifenu (KET) oraz chloropromazyny (CPZ) (**Tabela 3**). Wszystkie otrzymane kryształy FAW miały symetrię grupy przestrzennej $P3_221$ (**Tabela 5**). We wszystkich strukturach pętla EF występowała w konformacji otwartej, obserwowano również częściowe nieuporządkowanie pętli GH. Porównując struktury wszystkich otrzymanych kompleksów FAW zauważyć można, że trójcykliczny fragment leku zlokalizowany był zawsze w górnej części β -baryłki, natomiast alifatyczne części liganda znajdowały się bliżej wejścia do kieszeni wiążącej.

4.7.2. Analiza struktury kompleksu FAW-AMT

Strukturę kompleksu mutanta FAW z amitryptyliną wyznaczono z rozdzielczością 1.9 Å. Kryształy rosły w warunkach 2.4 M siarczan amonu w 1M Tris pH 8.5. Udokładnianie wykazało, że kieszeń wiążąca była całkowicie obsadzona ligandem. Trójcykliczna, aromatyczna

część leku ulokowała się w pobliżu reszt Ile71, Ala118, Trp107, Ile84 oraz Val41 (**Rysunek 22A**).



Rysunek 22. (A) Mapa gęstości elektronowej $2F_o-F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksu FAW-AMT oraz (B) oddziaływania stabilizujące cząsteczkę amitryptyliny w kieszeni wiążącej wariantu FAW. Czerwoną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływanie typu π - π (*edge-to-face*), natomiast zieloną oddziaływania hydrofobowe.

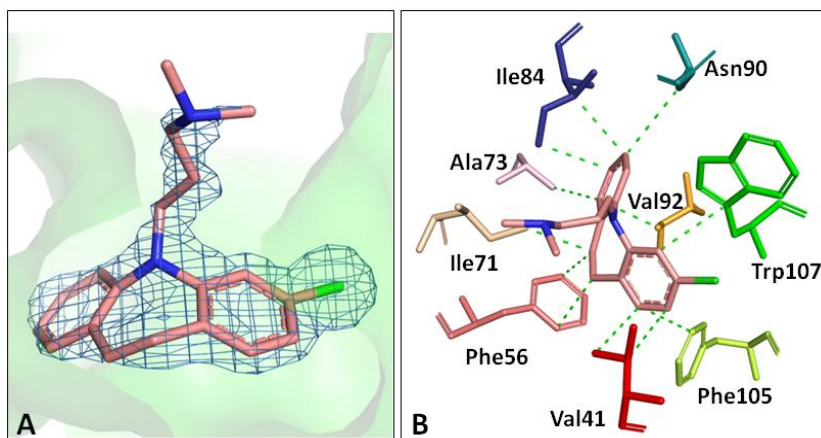
Analizując otrzymaną strukturę kompleksu FAW-AMT zauważyć można, że ligand, chociaż położony jest w pobliżu reszt aromatycznych, stabilizowany jest głównie przez sieć oddziaływań hydrofobowych. Wśród niepolarnych oddziaływań można zauważyć jedno bardziej specyficzne oddziaływanie typu π - π *stacking*. Zgodnie z oczekiwaniami, które towarzyszyły projektowaniu wariantu FAW, wprowadzenie w pozycji 56 aromatycznego aminokwasu przyczyniło się do stabilizacji cząsteczki liganda w kieszeni wiążącej poprzez oddziaływanie π - π (*edge-to-face*) z aromatycznym pierścieniem amitryptyliny. Cząsteczka liganda oddziałuje także z resztami Val41, Ile71, Phe105, Val92, Trp107, Ala118 oraz Ile84 poprzez oddziaływania hydrofobowe. W oddziaływaniach bierze udział tylko trójcykliczna część liganda, natomiast alifatyczny łańcuch nie tworzy interakcji z resztami białka (**Rysunek 22B**).

4.7.3. Analiza struktury kompleksu FAW-CLO

Dobrej jakości kryształy wariantu FAW w obecności klomipraminy (CLO) otrzymano w kroplach, w których precypitatem był 2.2 M siarczan amonu w 0.5 M Tris-HCl o pH 8.5. Strukturę kompleksu FAW-CLO wyznaczono z rozdzielczością 1.7 Å (**Tabela 5**). Obliczone mapy gęstości elektronowej pokazały, że w rejonie kieszeni wiążącej była bardzo dobrze widoczna gęstość odpowiadająca kształtem i rozmiarem klomipraminie, która znajdowała się w roztworze krystalizacyjnym (**Rysunek 23A**). Można zaobserwować, że podobnie jak w kompleksie z FAW-AMT (**Rozdział 4.7.2.**), aromatyczne ugrupowanie klomipraminy usytuowane jest głębiej w hydrofobowym wnętrzu baryłki, a alifatyczny fragment zlokalizowany jest bliżej wejścia do baryłki.

Struktura FAW-CLO pokazała, że klomipramina stabilizowana jest w miejscu wiążącym jedynie oddziaływaniami hydrofobowymi. Aromatyczna część liganda tworzy dwa oddziaływania

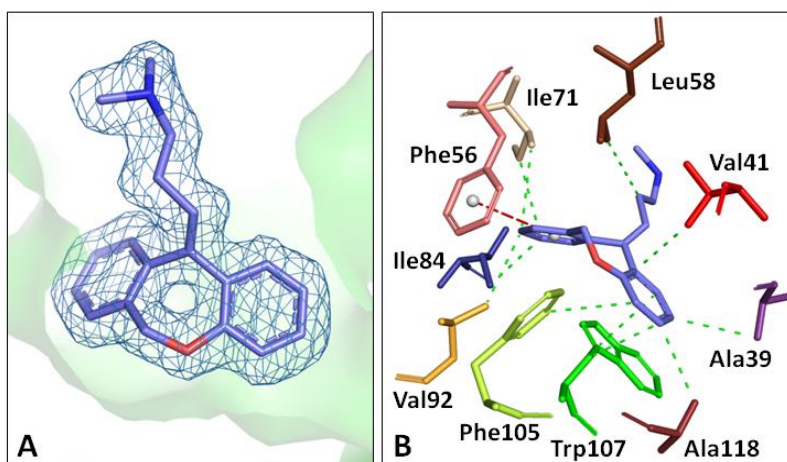
z Ile84, jedno krótsze (3.3Å) oraz drugie dłuższe (3.5Å). Podobna sytuacja występuje dla Val41 (3.8Å, 3.9Å). Bliższe oddziaływania hydrofobowe występują z Ile71 (3.4Å) oraz Val92 (3.0Å). Natomiast oddziaływania z aminokwasami Asn90, Trp107, Phe105, Phe56, Ala73 oraz Val41 są słabsze (3.7-4.0Å) (**Rysunek 23 B**).



Rysunek 23. (A) Mapa gęstości elektronowej $2F_o - F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksu FAW-CLO oraz (B) oddziaływania stabilizujące cząsteczkę kломipraminy w kieszeni wiążącej wariantu FAW. Zieloną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływania hydrofobowe.

4.7.4. Analiza struktury kompleksu FAW-DOX

Pomiary dyfrakcyjne kompleksu wariantu z doksepina (FAW-DOX) wykonano dla kryształów otrzymanych w kroplach zawierających 2.4 M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ w 0.5 M Tris-HCl pH 8.5. W kieszeni wiążącej, podobnie jak w poprzednich omawianych kompleksach (**Rozdział 4.7.1. oraz 4.7.2.**), widoczna była gęstość elektronowa odpowiadająca dodanemu ligandowi (**Rysunek 24A**). Położenie trójcyklicznego ugrupowania leku było identyczne jak w kompleksie FAW z amitryptyliną (**Rozdział 4.7.2.**), co jest zrozumiałe ze względu na fakt, że oba te ligandy są strukturalnymi analogami (**Rysunek 10**). Doksepina jest stabilizowana w kieszeni wiążącej głównie przez oddziaływania hydrofobowe (**Rysunek 24B**). Aromatyczna, trójcykliczna część leku oddziałuje z resztami Ala39, Val41, Ile84, Val92 oraz Ala118, dodatkowo z Ile71 występują dwa oddziaływania, jedno krótsze 3.7Å oraz dłuższe 4.0Å, podobnie z Trp107 (3.7Å, 3.8Å). Alifatyczny ogon stabilizowany jest jedynie przez oddziaływanie hydrofobowe z Leu58. Dodatkowo aromatyczny pierścień doksepiny tworzy oddziaływanie typu π - π (*edge-to-face*) z Phe56 (**Rysunek 24B**).

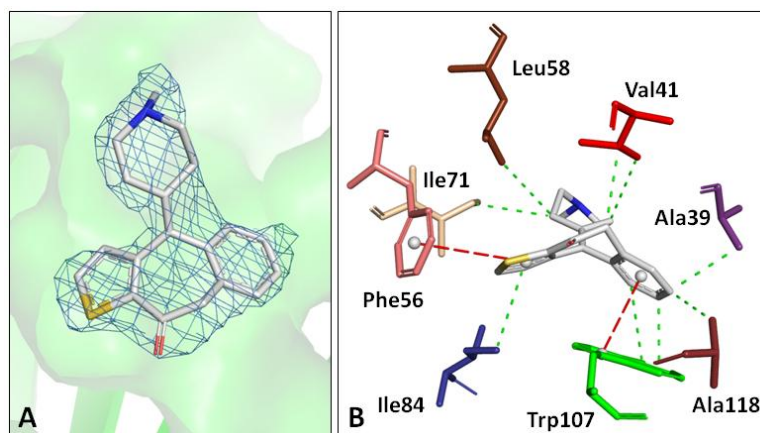


Rysunek 24. (A) Mapa gęstości elektronowej $2F_o-F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksu FAW-DOX oraz (B) oddziaływania stabilizujące cząsteczkę doksepiny w kieszeni wiążącej wariantu FAW. Czerwoną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływanie π - π , natomiast zieloną oddziaływania hydrofobowe.

4.7.5. Analiza struktury kompleksu FAW-KET

Kryształy wariantu I56F/L39A/M107W z dodatkiem ketotifenu (KET) otrzymano dla całego zakresu stężeń tj. 2.0-3.0 M siarczanu amonu w 0.5 M Tris-HCl pH 8.5. Jednak większość z tych kryształów bardzo słabo rozpraszała promieniowanie rentgenowskie, dlatego strukturę kompleksu FAW-KET wyznaczono z nieco słabszą rozdzielczością 2.3 \AA (**Tabela 5**). Pomimo relatywnie słabej rozdzielczości, mapy gęstości elektronowej potwierdziły jednoznacznie obecność liganda w β -baryłce (**Rysunek 25A**). Ligand położony był bliżej wejścia do β -baryłki, w porównaniu do pozostałych kompleksów, FAW-AMT oraz FAW-DOX.

Cząsteczka ketotifenu stabilizowana jest głównie oddziaływaniami hydrofobowymi, w których biorą udział reszty: Ile71, Ile84, Val41, Leu58, Ala118 oraz Ala39. Fenyloalanina w pozycji 56 tworzy oddziaływanie π - π (*edge-to-face*) z pierścieniem tiofenu liganda. Pirolowy pierścień tryptofanu w pozycji 107 tworzy oddziaływanie π - π (*face-to-face*) z pierścieniem benzenowym leku, natomiast benzenowy pierścień Trp107 tworzy dwa oddziaływania hydrofobowe z cząsteczką liganda, jedno krótsze 3.2 \AA oraz drugie dłuższe 3.8 \AA (**Rysunek 25B**).

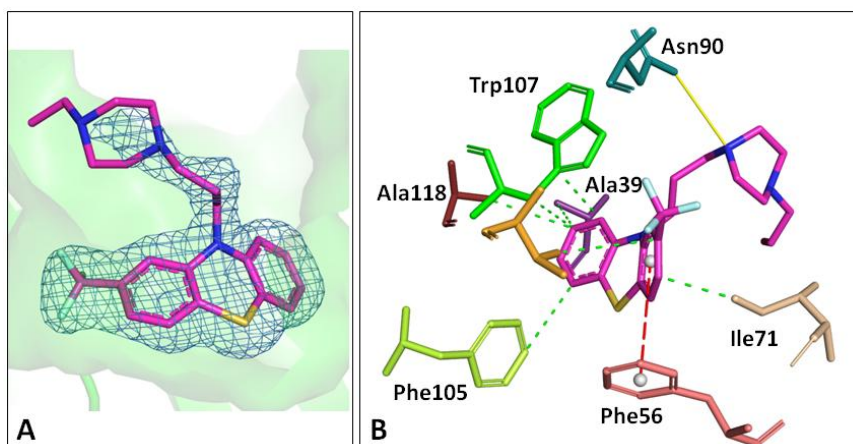


Rysunek 25. (A) Mapa gęstości elektronowej $2F_o-F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksu FAW-KET oraz (B) oddziaływania stabilizujące cząsteczkę ketotifenu w kieszeni wiążącej wariantu FAW. Czerwoną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływanie π - π , natomiast zieloną oddziaływania hydrofobowe.

4.7.6. Analiza struktury kompleksu FAW-FLU

Ko-kryształizacja wariantu FAW z flufenazyną (FLU) pokazała, że kryształy odpowiednie do pomiarów dyfraktometrycznych otrzymano w kroplach zawierających 2.4 oraz 2.6 M siarczan amonu w 0.5 M Tris-HCl pH 8.5. Dane dyfrakcyjne zebrane zostały przy użyciu promieniowania synchrotronowego DESY w Hamburgu z maksymalną rozdzielczością 1.47 Å (**Tabela 5**). Już pierwsze mapy gęstości elektronowej pokazały, że w kieszeni wiążącej znajduje się ligand: bardzo dobrze był widoczny trójcykliczny, aromatyczny fragment leku z podstawnikiem $-CF_3$, natomiast gęstość dla alifatycznego fragmentu FLU była wyraźnie słabsza, co świadczy o nieuporządkowaniu tego fragmentu leku (**Rysunek 26A**).

Analiza oddziaływań stabilizujących strukturę kompleksu pokazała, że fenyloalanina w pozycji 56 tworzy oddziaływanie π - π (*edge-to-face*) z jednym z aromatycznych pierścieni liganda. Z tym samym pierścieniem flufenazyny, reszty Ile71 oraz Val92 tworzą oddziaływania hydrofobowe. Natomiast z drugim pierścieniem benzenowym flufenazyny oddziałują reszty Phe105, Ala39, Ala118 oraz Trp107. Tryptofan w pozycji 107 tworzy dwa oddziaływania hydrofobowe o odległościach 3.6Å oraz 3.9Å. Dodatkowo strukturę kompleksu stabilizuje wiązanie wodorowe o długości 3.05 Å pomiędzy atomem azotu cyklicznego, alifatycznego łańcucha, a Asn90. Preferowanym konformerem flufenazyny jest (*aS*)FLU (**Rysunek 26B**).

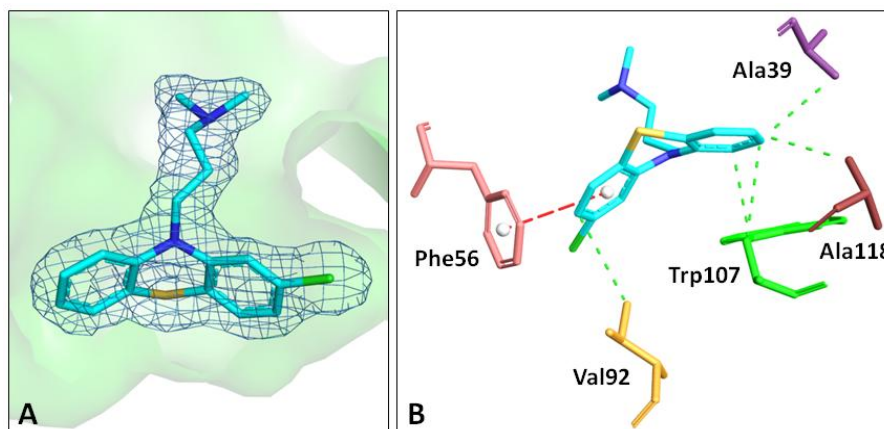


Rysunek 26. (A) Mapa gęstości elektronowej $2F_o - F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksu FAW-FLU oraz (B) oddziaływania stabilizujące cząsteczkę flufenazyny w kieszeni wiążącej wariantu FAW. Czerwoną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływanie π - π , natomiast zieloną oddziaływania hydrofobowe. Żółta linia prezentuje wiązanie wodorowe.

4.7.7. Analiza struktury kompleksu FAW-CPZ

Najlepszej jakości kryształy wariantu FAW w obecności chloropromazyny (CPZ) urosły w kroplach zawierających 2.4-2.6 M siarczanu amonu w 0.5 M Tris-HCl pH 8.0. Dane dyfrakcyjne dla kryształów tego kompleksu zebrano z rozdzielczością do 2.0 Å (**Tabela 5**). Na różnicowej mapie Fouriera, w kieszeni wiążącej bardzo dobrze widoczna była gęstość elektronowa odpowiadająca chloropromazynie (**Rysunek 27A**).

Kompleks FAW-CPZ jest kolejnym przykładem kompleksu BLG-ligand, w którym ligand stabilizowany jest głównie przez hydrofobowe oddziaływania z resztami obecnymi w kieszeni wiążącej. W interakcje z jednym pierścieniem benzenowym chloropromazyny zaangażowane są reszty Ala39 oraz Ala118, dodatkowo Trp107 tworzy dwa oddziaływania hydrofobowe (3.4Å, 3.7Å) (**Rysunek 27B**). Z drugim aromatycznym pierścieniem chloropromazyny oddziałuje reszta Val92. Co więcej, Phe56 tworzy oddziaływania typu π - π (*edge-to-face*). Co ciekawe, wariant FAW preferuje konformer *aS*-CPZ, podobnie jak w kompleksie LAW-CPZ (**Rozdział 4.6.2, Rysunek 17B, E**).



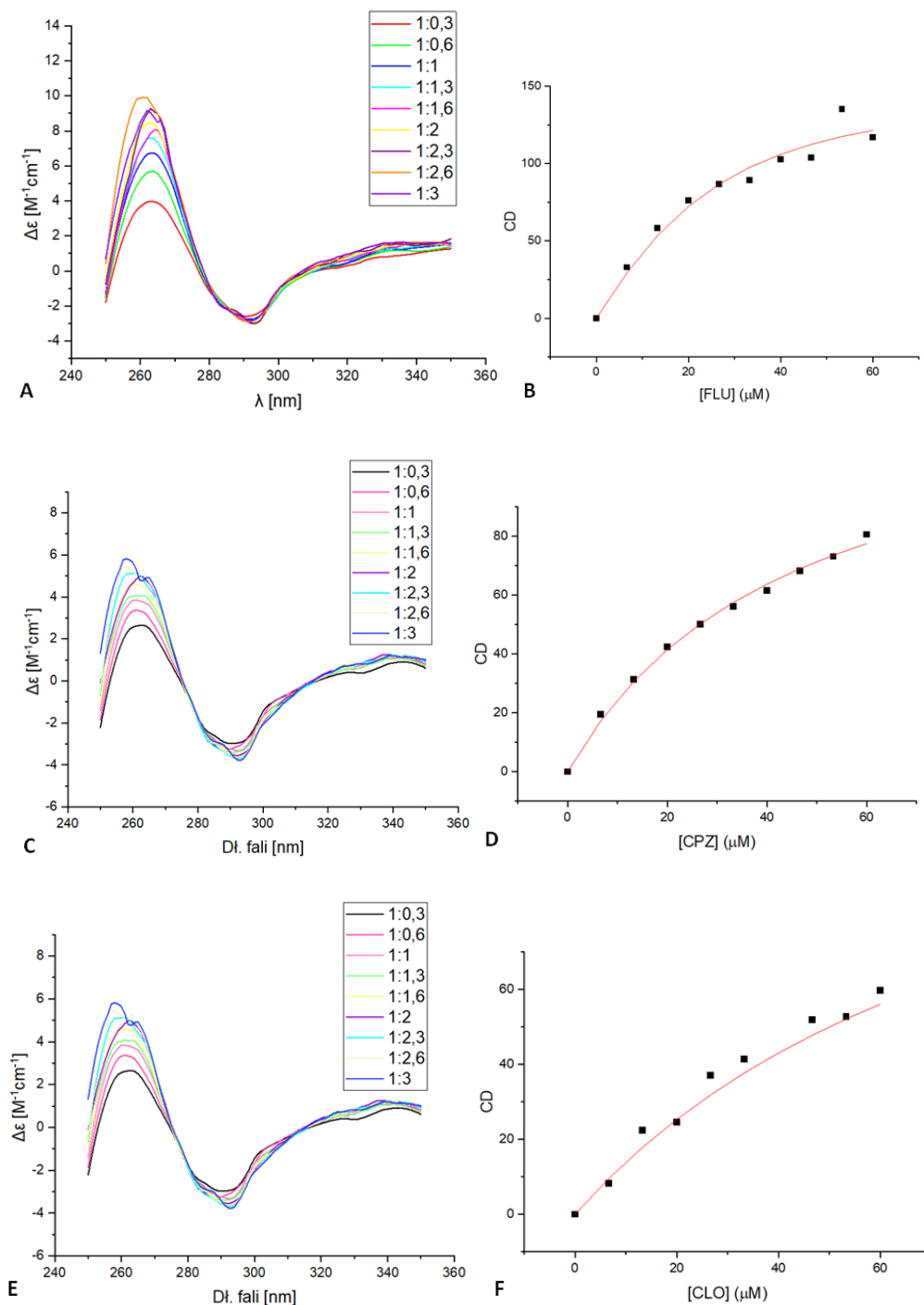
Rysunek 27. (A) Mapa gęstości elektronowej $2F_o - F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksu FAW-CPZ oraz (B) oddziaływania stabilizujące cząsteczkę chloropromazyny w kieszeni wiążącej wariantu FAW. Czerwoną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływanie π - π , natomiast zieloną oddziaływania hydrofobowe.

4.7.8. Badanie oddziaływania wariantu FAW z ligandami za pomocą CD

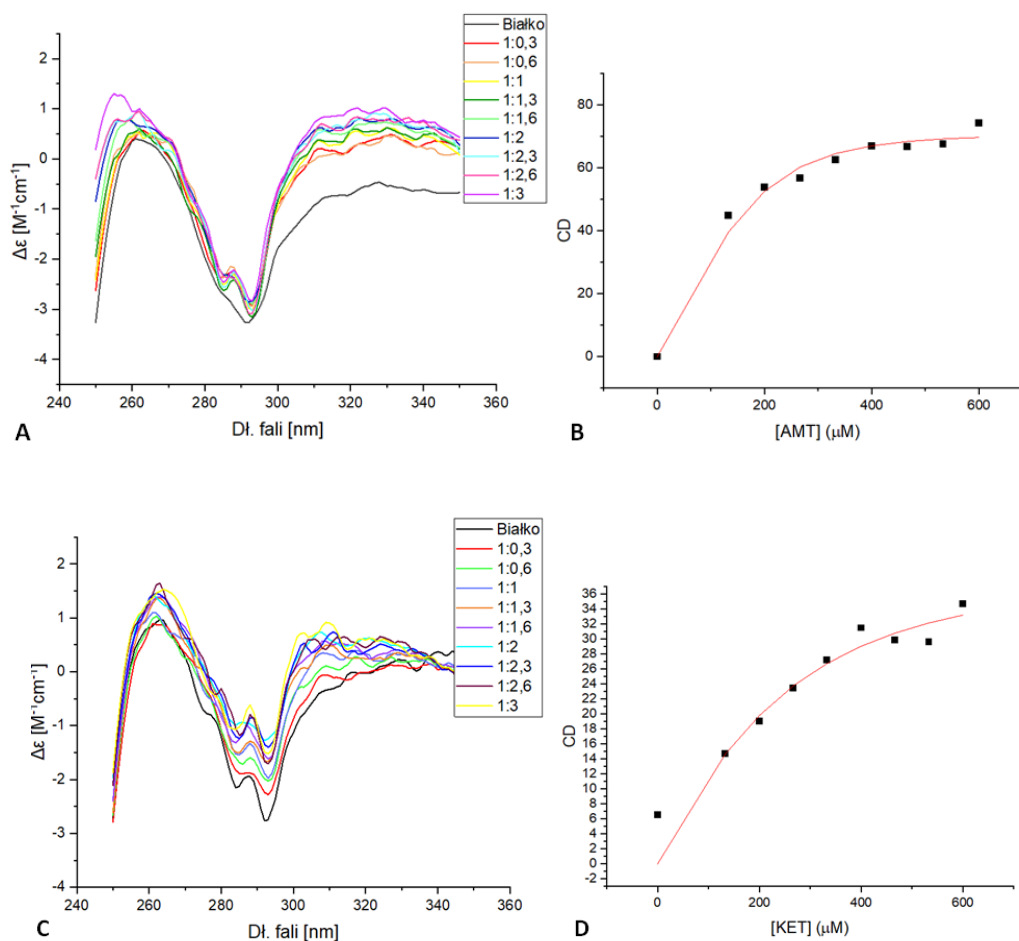
Badanie oddziaływania białko-ligand przy pomocy indukowanego sygnału CD wykonano dla wszystkich ligandów, których wiązanie do wariantu FAW zidentyfikowano za pomocą metod krystalograficznych. W pierwszej kolejności wykonano pomiary dla roztworu FAW z dodatkiem liganda w stosunku 1:1 oraz 1:2. Zmiany w sygnale CD zauważono dla kompleksów z klomipraminą, chloropromazyną oraz flufenazyną. Dla kompleksu z flufenazyną, wzrost sygnału występował przy ok. 265 nm, podobne wyniki otrzymano dla chloropromazyny. Dodatek klomipraminy skutkowało wzrostem sygnału CD w obszarze 300-320 nm. Widma CD zostały zamieszczone w suplemencie dołączonym do pracy (**Rysunek S2**).

W następnej kolejności wykonano miareczkowanie ligandem aż do jego 3-krotnego nadmiaru (**Rysunek 28**). Na podstawie otrzymanych wyników, stosując jednomiejscowy model wiązania wyznaczono stałe K_d , które wynosiły odpowiednio: $12.4 \pm 6.5 \mu\text{M}$ dla kompleksu FAW-FLU, $24.5 \pm 5.3 \mu\text{M}$ dla kompleksu FAW-CPZ oraz $46.9 \pm 15.7 \mu\text{M}$ dla kompleksu FAW-CLO. Otrzymane wyniki pokazują, że FAW to kolejny wariant BLG (podobnie do LAW), który wykazuje największe powinowactwo do flufenazyny. Pierwsze, wstępne pomiary CD w obecności amitryptyliny, doksepiny oraz ketotifenu nie wykazały znaczących zmian sygnału

CD. Badania powtórzono dla wyższego stężenia białka (200 μM). Białko ponownie miareczkowano do 3-krotnego nadmiaru leku (AMT oraz KET) (**Rysunek 29**). Wyniki miareczkowania pokazały, że w tych warunkach, zaobserwowano zmianę sygnału. Wyznaczone na tej podstawie stałe K_d wyniosły odpowiednio $32.8 \pm 13.2 \mu\text{M}$ oraz $152.8 \pm 101.6 \mu\text{M}$. Dodatek doksepiny do wyższego stężenia białka nie spowodował zmian w sygnale CD.



Rysunek 28. Wyniki pomiarów ICD dla miareczkowania 20 μM mutantu FAW roztworem (A) flufenazyny (C) chloropromazyny oraz (E) klomipraminy aż do 3-krotnego nadmiaru liganda oraz (B, D, F) najlepsze dopasowanie danych eksperymentalnych do jednoniejscowego modelu wiązania.

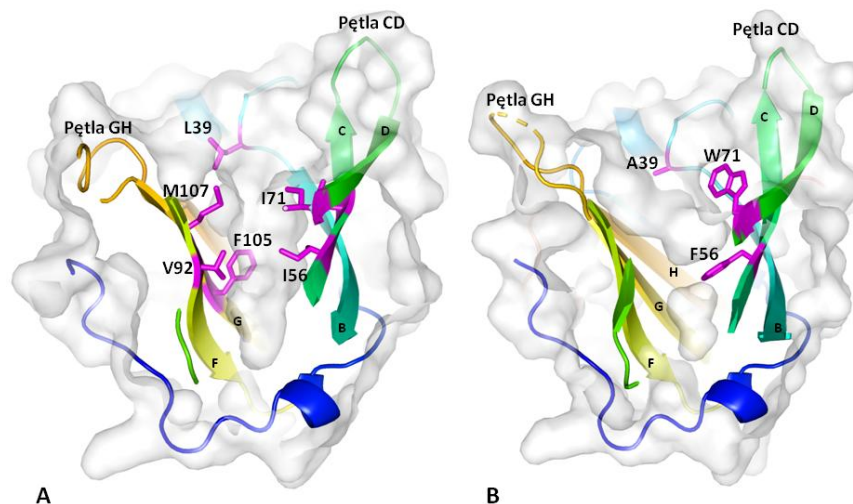


Rysunek 29. Wyniki pomiarów ICD dla miareczkowania 200 μM FAW roztworem (A) amitryptyliny oraz (C) ketotifenu aż do 3-krotnego nadmiaru liganda oraz (B, D) najlepsze dopasowanie danych eksperymentalnych do jednoniejscowego modelu wiązania.

4.8. Wariant I56F/L39A/I71W (FA71W)

4.8.1. Struktura formy bez liganda

Mutant I56F/L39A/I71W, podobnie jak wariant FAW (**Rozdział 4.7.**), został zaprojektowany w oparciu o analizę struktury podwójnego wariantu I56F/L39A (FA) (J. I. Loch et al. 2018). Zastąpienie izoleucyny w pozycji 71 aromatycznym tryptofanem miało za zadanie stabilizację wiązania liganda poprzez tworzenie oddziaływań typu π - π , jednak w odróżnieniu od pozycji 107 (warianty LAW, FAW), mutacja 71 zlokalizowana jest po przeciwnej stronie miejsca wiążącego, tj. w wariantach FAW oraz LAW miejsce mutacji znajdowało się na β -wstędze G, natomiast mutacja I71W położona była na przeciwległej β -wstędze D (**Rysunek 30 A, B**).



Rysunek 30. Kształt kieszeni wiążącej (A) dzięki formy BLG (WT, PBD id: 1BSY) oraz (B) wariantu FA71W.

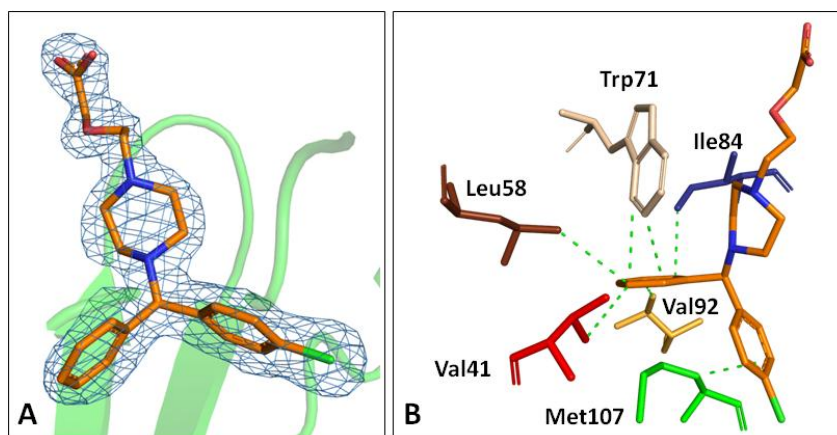
Analizując wyznaczone struktury krystaliczne zaobserwowano, że wariant FA71W tworzy kompleksy z pięcioma ligandami: cetyryzyną (CET), ketotifenem (KET), amoksapiną (AMX), flufenazyną (FLU) oraz chlorpromazyną (CPZ) (*Tabela 3*). Struktury te zostaną szczegółowo omówione w kolejnych podrozdziałach. Wszystkie wyznaczone struktury były izomorficzne i miały symetrię grupy przestrzennej $P3_221$ (*Tabela 6*). Podobnie jak dla struktur kompleksów LAW i FAW, we wszystkich wyznaczonych kompleksach FA71W pętla EF występowała w otwartej konformacji, obserwowano też częściowe nieuporządkowanie pętli GH. Analizując położenie ligandów w kieszeni wiążącej, zauważyć można, że w każdym z wyznaczonych kompleksów, sposób wiązania liganda był bardzo podobny, tj. trójcykliczne aromatyczne pierścienie liganda związane były w głębszej, hydrofobowej części kieszeni wiążącej, natomiast alifatyczne elementy znajdowały się bliżej wejścia do β -baryłki.

4.8.2. Analiza struktury kompleksu FA71W-CET

Wśród badanych w tej pracy potencjalnych ligandów nowych wariantów β -laktoglobuliny (*Rysunek 10*), cetyryzyna (CET) została związana (zidentyfikowana) jedynie w kieszeni wiążącej wariantu FA71W (*Tabela 3*). Krysztály kompleksu FA71W-CET odpowiednie do pomiarów dyfraktometrycznych otrzymano w kroplach, w których precypitantem był 2.4 M siarczan amonu w 1 M Tris-HCl pH 8. Otrzymane trygonalne krysztály rozpraszały promieniowanie rentgenowskie do 2.0 Å (*Tabela 6*). Już na pierwszej różnicowej mapie Fouriera, w kieszeni wiążącej FA71W bardzo dobrze widoczna była gęstość elektronowa odpowiadająca cetyryzynie. Udokładnianie pokazało całkowite obsadzenie liganda w kieszeni wiążącej (*Rysunek 31A*). Jak wspomniano w *Rozdziale 4.8.1*, aromatyczny element leku usytuowany był w baryłce w pobliżu reszt Phe56, Phe105, Trp71 oraz Met107, natomiast alifatyczny ogon znajdował się w górnej części kieszeni, u wejścia do baryłki. Cetyryzyna jest związkiem chiralnym występuje w postaci

dwóch enancjomerów L i D (Nalluri & Kumar 2020) (**Rysunek 10**). Przeprowadzone badania potwierdziły, że w kieszeni wiążącej FA71W został związany właśnie lewoskrętny enancjomer CET (L-CET).

Cząsteczka cetyryzyny stabilizowana jest w kieszeni FA71W przez oddziaływania hydrofobowe pomiędzy łańcuchami bocznymi, a aromatycznymi pierścieniami leku. W te oddziaływania zaangażowane są reszty Val92, Ile84, Leu58, Val41, Met107, Val92 oraz Trp71. Tryptofan w pozycji 71 tworzy dwa oddziaływania hydrofobowe z pierścieniem benzenowym cetyryzyny (3.4 Å oraz 3.6 Å) (**Rysunek 30 B**). Alifatyczny ogon nie bierze udziału w żadnej interakcji z resztami aminokwasowymi białka.

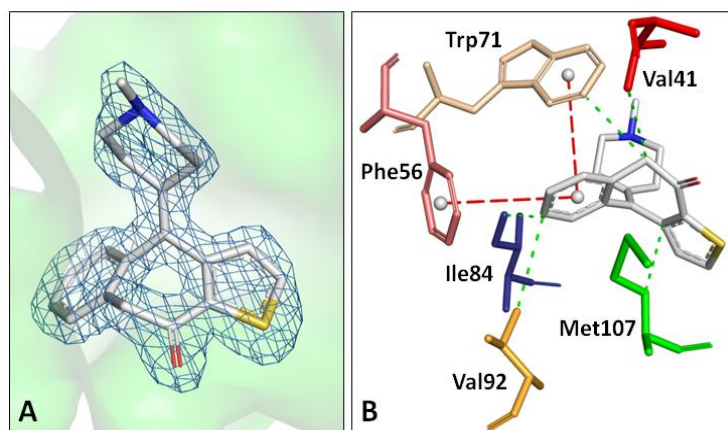


Rysunek 31. (A) Mapa gęstości elektronowej $2F_o - F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksu FA71W-CET oraz (B) oddziaływania stabilizujące cząsteczkę cetyryzyny w kieszeni wiążącej wariantu FA71W. Zieloną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływania hydrofobowe.

4.8.3. Analiza struktury kompleksu FA71W-KET

Kryształy kompleksu FA71W-KET otrzymano z 2.8 M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ w 0.5 M Tris-HCl pH 8.5. Wzrost dobrej jakości kryształów obserwowano też w kroplach z 2.6-3.0 M siarczanem amonu, jednak pomiary wykonano dla kryształów z pierwszego warunku krystalizacyjnego. Strukturę kompleksu FA71W-KET wyznaczono z rozdzielczością 1.8 Å (**Tabela 6**). Mapy gęstości elektronowej jednoznacznie potwierdziły obecność liganda (z pełnym obsadzeniem) w kieszeni wiążącej FA71W (**Rysunek 32A**).

Trójcykliczny element ketotifenu znajduje się w pobliżu Phe56, Val92, Trp71 oraz Met107. Wśród oddziaływań hydrofobowych wyróżnić można oddziaływania z Val41, Met107, Val92, Ile84 czy Trp71. Reszty Phe56, a także Trp71 odpowiadają za oddziaływania typu π - π (*edge-to-face*) z aromatycznym pierścieniem benzenowym leku. (**Rysunek 32 B**).

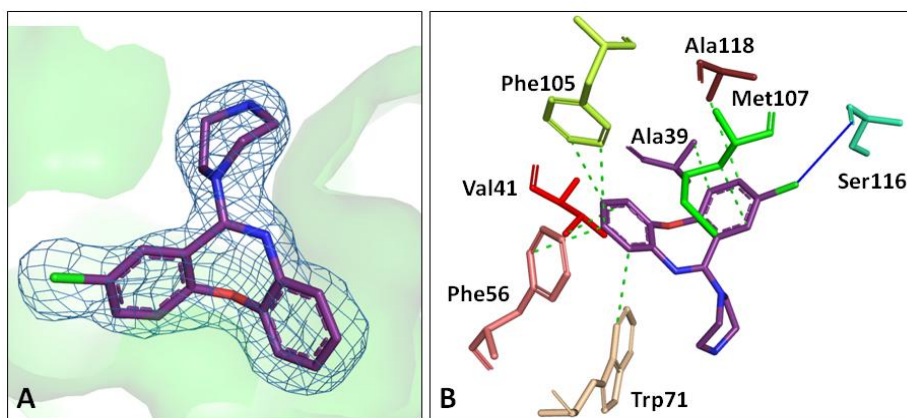


Rysunek 32. (A) Mapa gęstości elektronowej $2F_o-F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksu FA71W-KET oraz (B) oddziaływania stabilizujące cząsteczkę ketotifenu w kieszeni wiążącej wariantu FA71W. Zieloną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływania hydrofobowe, a czerwoną przerywaną linią zaznaczono oddziaływania typu $\pi-\pi$.

4.8.4. Analiza struktury kompleksu FA71W-AMX

Dobrej jakości kryształy dla kompleksu FA71W-AMX otrzymano dla białka o stężeniu ok. 23.5 mg/ml, przy użyciu 2.4-3.0 M siarczanu amonu w 0.5 M Tris-HCl pH 8.5. Dane zebrano z rozdzielczością 1.8 Å (**Tabela 6**). W kieszeni wiążącej bardzo dobrze widoczna była gęstość potwierdzająca związaną amoksapiny (**Rysunek 33A**). Analizując strukturę kompleksu FA71W-AMX zauważono, że trójcykliczny pierścień leku położony jest głębiej w β -baryłce w pobliżu Met107.

Ligand w kompleksie FA71W-AMX, stabilizowany jest głównie oddziaływaniami hydrofobowymi. Zaangażowane są w nie reszty: Ala39, Ala118, Val41, Met107, Phe105, Phe56 oraz Trp71. Co ciekawe, pomimo bliskiej obecności reszt aromatycznych w pobliżu benzenowego pierścienia amoksapiny nie występują żadne oddziaływania $\pi-\pi$. Wśród reszt wchodzących w interakcje z ligandem, zauważyć również można serynę w pozycji 116, która tworzy wiązanie halogenowe z atomem chloru przyłączonym do leku (3.5Å) (**Rysunek 33B**). Alifatyczna, cykliczna część liganda nie bierze udziału w oddziaływaniach z białkiem.

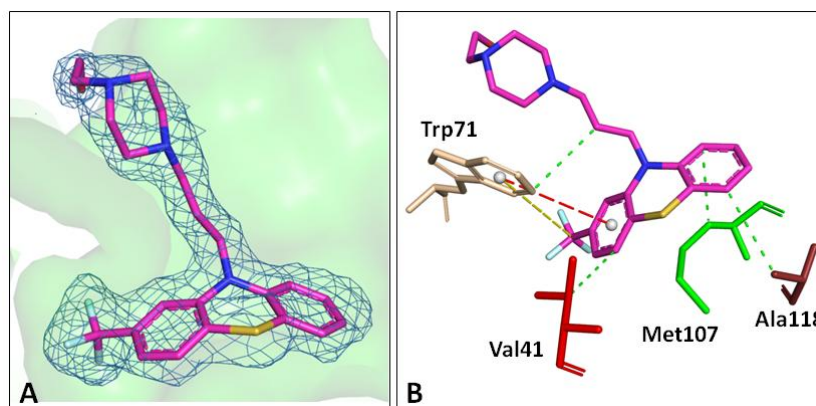


Rysunek 33. (A) Mapa gęstości elektronowej $2F_o-F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksu FA71W-AMX oraz (B) oddziaływania stabilizujące cząsteczkę amoksapiny w kieszeni wiążącej wariantu FA71W. Zieloną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływania hydrofobowe, natomiast niebieska linia reprezentuje wiązanie halogenowe.

4.8.5. Analiza struktury kompleksu FA71W-FLU

Dane dyfrakcyjne dla kompleksu wariantu FA71W z flufenazyną (FLU) zebrano z maksymalną rozdzielczością 2.0 Å (**Tabela 6**) dla kryształów otrzymanych w kroplach zawierających 2.6 M siarczan amonu w 1M Tris-HCl pH 8. Mapy gęstości potwierdziły, że w kieszeni wiążącej związana była cząsteczka flufenazyny (**Rysunek 34A**)

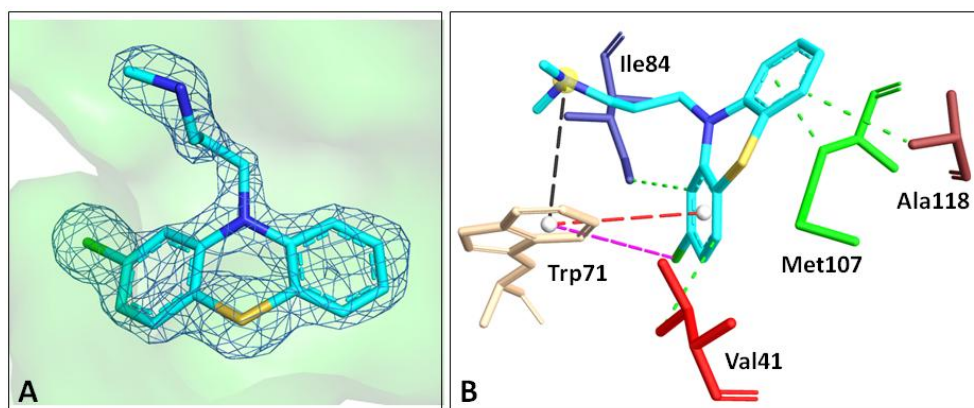
Jeden z pierścieni ugrupowania fenotiazynowego flufenazyny tworzy oddziaływania hydrofobowe z Met107 oraz Ala118. Natomiast drugi pierścień benzenowy oddziałuje z Val41 oraz wchodzi w interakcje z Trp71 tworząc oddziaływanie typu π - π (*edge-to-face*). Co więcej ta sama reszta aminokwasowa tworzy specyficzne oddziaływanie R-CF₃... π z ugrupowaniem trifluorometylowym. Dodatkowo, tryptofan w pozycji 71 oddziałuje z alifatycznym łańcuchem liganda (3.9Å). Analizując strukturę kompleksu FA71W-FLU zauważyć można, że podobnie jak w kompleksie z FAW (**Rozdział 4.7.6.**, **Rysunek 26**), ligand przyjmuje konformację (*aS*) w kieszeni wiążącej.



Rysunek 34. (A) Mapa gęstości elektronowej $2F_o-F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksu FA71W-FLU oraz (B) oddziaływania stabilizujące cząsteczkę flufenazyny w kieszeni wiążącej wariantu FA71W. Czerwoną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływanie π - π , zieloną oddziaływania hydrofobowe, natomiast żółtą oddziaływanie CF₃... π .

4.8.6. Analiza struktury FA71W-CPZ

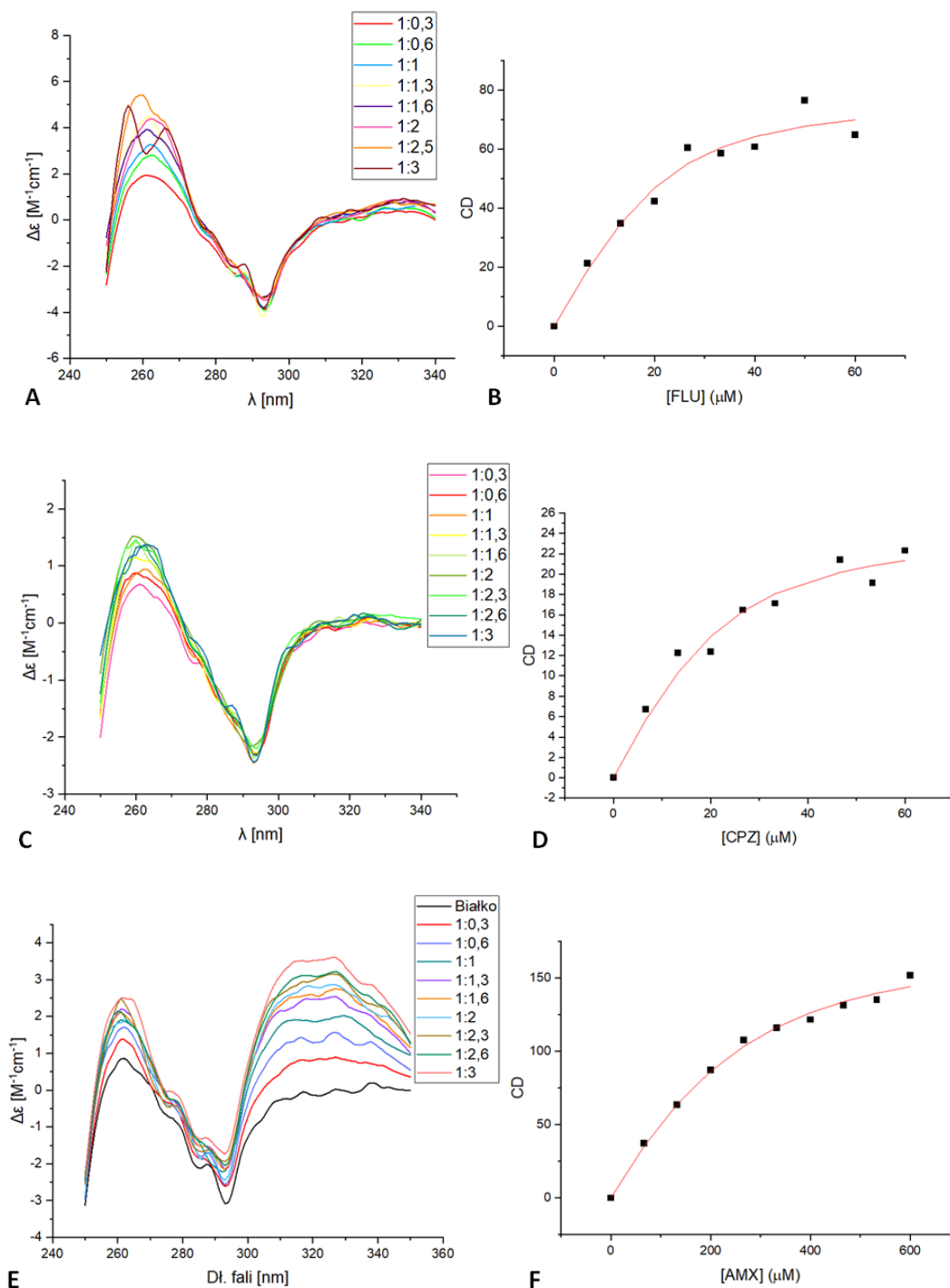
Kryształy kompleksu FA71W-CPZ rosły w całym zakresie stężeń precypitanta tj. w 2.0-3.0 M siarczanie amonu w 0.5 M Tris-HCl pH 8. Dane dyfrakcyjne zebrano z rozdzielczością 1.7 Å (**Tabela 6**). Na mapie gęstości elektronowej wyraźnie widoczna była gęstość odpowiadająca chloropromazynie (**Rysunek 35A**). Porównując otrzymaną strukturę z innymi strukturami kompleksów FA71W zauważyć można, że położenie aromatycznej, trójpierścieniowej grupy chloropromazyny jest takie samo jak w kompleksie z flufenazyną, a preferowanym konformerem chloropromazyny jest *aS*-konformer. Pierwszy z pierścieni aromatycznych chloropromazyny tworzy oddziaływania hydrofobowe z Ala118 oraz Met107, natomiast drugi z Val41 oraz Ile84. Trp71 tworzy oddziaływanie typu π - π (*edge-to-face*) z aromatycznym pierścieniem leku oraz dodatkowo tworzy oddziaływanie π -kation z atomem azotu alifatycznego łańcucha. Co więcej Trp71 tworzy oddziaływanie R-Cl... π z atomem chloru (**Rysunek 35B**).



Rysunek 35. (A) Mapa gęstości elektronowej $2F_o - F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksu FA71W-CPZ oraz (B) oddziaływania stabilizujące cząsteczkę chloropromazyny w kieszeni wiążącej wariantu FA71W. Czerwoną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływanie π - π , zieloną oddziaływanie hydrofobowe. Czarna przerywana linia reprezentuje oddziaływanie π -kation, natomiast różowa Cl- π .

4.8.7. Badanie oddziaływania wariantu FA71W z ligandami za pomocą CD

Dla potwierdzonych metodami krystalograficznymi kompleksów wariantu FA71W z lekami wyznaczono stałe dysocjacji za pomocą CD. Podobnie jak w innych kompleksach (**Rozdział 4.6.3., Rozdział 4.7.8.**) badania rozpoczęto od sprawdzenia zmian sygnału CD po dodatku liganda do $20 \mu\text{M}$ roztworu białka. Zmiany zauważono przy ok. 265 nm dla flufenazyny oraz chloropromazyny oraz przy ok. $320\text{-}330 \text{ nm}$ dla amoksapiny. Otrzymane widma CD zamieszczono na końcu w suplemencie do pracy (**Rysunek S3**). Następnym krokiem było wykonanie miareczkowania aż do 3-krotnego nadmiaru liganda (**Rysunek 36**). Stosując jednomicowy model wiązania wyznaczono stałe K_d dla kompleksu z flufenazyną oraz chloropromazyną, które wyniosły odpowiednio: $5.1 \pm 3.4 \mu\text{M}$ oraz $6.9 \pm 4.6 \mu\text{M}$. Dla kompleksu FA71W-AMX zaobserwowano liniowy charakter zmian oraz bardzo duży błąd przekraczający wartość stałej K_d , co świadczy o bardzo niskim powinowactwie FA71W do tego liganda. Dlatego dla amoksapiny konieczne było powtórzenie pomiarów z zastosowaniem większego stężenia białka ($200 \mu\text{M}$). Dzięki temu wyznaczono stałą K_d , która wyniosła $149.2 \pm 30.6 \mu\text{M}$. Dodatkowe badania z wyższym stężeniem białka wykonano również dla cetyryzyny oraz ketotifenu, dla których początkowo zmiana sygnału CD nie była zauważalna, jednak zastosowanie takiego podejścia nadal nie przyniosło pożądanych rezultatów.

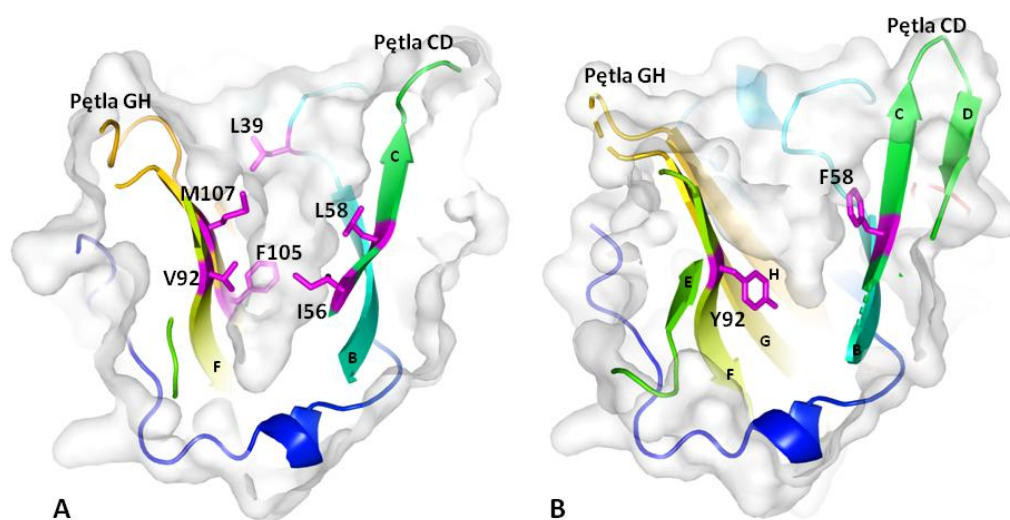


Rysunek 36. Wyniki pomiarów ICD dla miareczkowania FA71W roztworem (A) amitryptyliny, (C) chlorpromazyny oraz (E) amoksapiny aż do 3-krotnego nadmiaru liganda oraz (B, D, F) najlepsze dopasowanie danych eksperymentalnych do jednoniejsowego modelu wiązania.

4.9. Wariant L58F/V92Y (58F/92Y)

Wariant L58F/V92Y został zaprojektowany w oparciu o analizę wariantów L58F oraz V92Y (Bonarek et al. 2020). Wcześniejsze badania pokazały, że mutacja wprowadzona w pozycji 58 stabilizuje białko (Bonarek et al. 2020) nie zmieniając znacznie geometrii kieszeni wiążącej, dlatego startowy, pojedynczy mutant L58F był dobrym kandydatem do projektowania innych

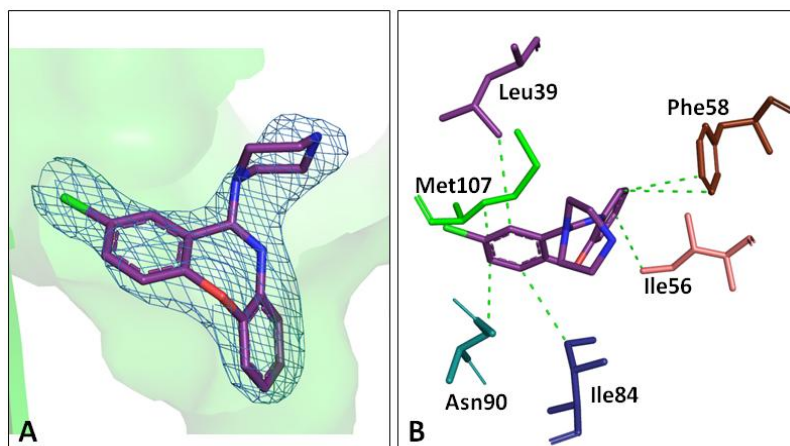
wariantów, posiadających wiele mutacji w kieszeni wiążącej, zmieniających jej kształt i preferencje wiążące. Wprowadzenie w pozycji 92 aromatycznego pierścienia tyrozyny, miało na celu skrócenie miejsca wiązania, a tym samym stworzenie przestrzeni odpowiedniej dla ligandów o niewielkiej masie (**Rysunek 37**). Ko-kryształizacja mutantu 58F/92Y z ligandami była najbardziej czasochłonna i problematyczna. Próby optymalizacji warunków kryształizacji, bardzo często prowadziły do wysypu dużej ilości drobnych kryształów (rozmiary ok. 0.1 mm). Próby przeprowadzone dla amitryptyliny oraz kломipraminy zakończyły się niepowodzeniem i dla tych kompleksów nie udało się zebrać danych dyfraktometrycznych. Pomiar dyfraktometryczny zebrano dla 7 kryształów otrzymanych w kroplach z dodatkiem pozostałych ligandów (**Tabela 3**) jednak obecność liganda związanego do białka zaobserwowano tylko dla amoksapiny (AMX).



Rysunek 37. Kształt kieszeni wiążącej (A) dzikiej formy BLG (WT) oraz (B) wariantu L58F/V92Y.

4.9.1. Analiza struktury kompleksu 58F/92Y-AMX

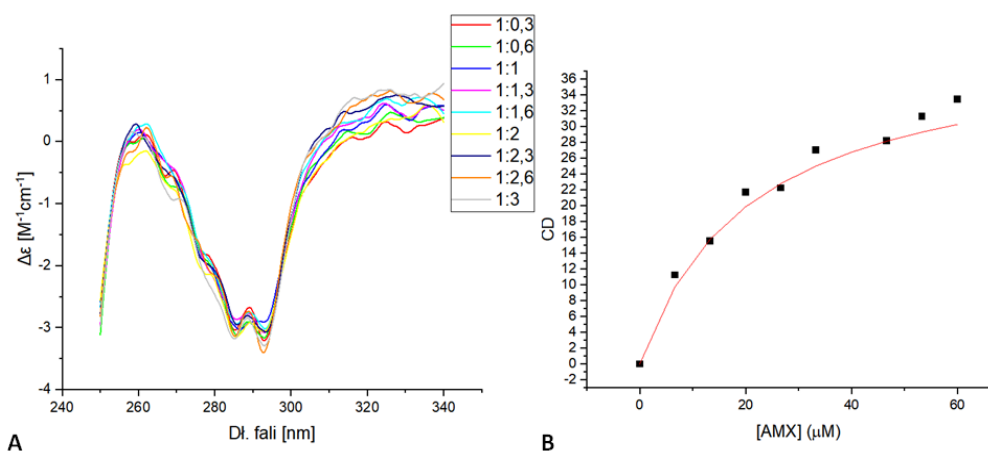
Kryształy odpowiednie do pomiarów dyfraktometrycznych otrzymano w kroplach, w których precypitantem był 2.8 M siarczan amonu w 0.5M Tris-HCl pH 8.5. Otrzymano trygonalne kryształy, o symetrii grupy przestrzennej $P3_221$, które rozpraszały z maksymalną rozdzielczością 2.0 Å (**Tabela 4**). Na mapie Fouriera, w kieszeni wiążącej widoczna była gęstość elektronowa odpowiadająca trójcyklicznemu, aromatycznemu elementowi amoksapiny (**Rysunek 38A**), jednak ligand miał tylko częściowe obsadzenie. Podobnie jak w innych kompleksach, np. FA71W-AMX (**Rozdział 4.8.4**), część aromatycznego układu trójpierścieniowego amokspainy znajdowała się głębiej w β -baryłce, natomiast alifatyczny pierścień piperazynowy położony jest trochę wyżej, w okolicy pętli EF. W kompleksie 58F/92Y-AMX ligand stabilizowany jest przez oddziaływania hydrofobowe. Zaangażowane są w nie resztki: Leu39, Met107, Ile56, Ile84, Asn90 oraz Phe56, która tworzy dwa oddziaływania (**Rysunek 38 B**).



Rysunek 38. (A) Mapa gęstości elektronowej $2F_0-F_c$ (1.0σ) wokół liganda dla kompleksu 58F/92Y-AMX oraz (B) oddziaływania stabilizujące cząsteczkę amoksapiny w kieszeni wiążącej wariantu 58F/92Y. Zieloną, przerywaną linią zaznaczono oddziaływania hydrofobowe.

4.9.2. Badanie oddziaływania wariantu L58F/V92Y z ligandem za pomocą CD

Przeprowadzając wstępne miareczkowanie roztworu wariantu L58F/V92Y amoksapiną, zauważono wzrost sygnału przy 265 nm oraz przy ok. 320 nm po dodatku leku w stosunku 1:1 oraz 1:2. Widmo zamieszczono w suplemencie do pracy (**Rysunek S4**). W następnym kroku wykonano miareczkowanie ligandem (**Rysunek 39**) do momentu uzyskania 3-krotnego nadmiaru amoksapiny. Największe zmiany zauważono przy ok. 310-330 nm. Z uzyskanych danych, udało się wyznaczyć stałą K_d dla kompleksu 58F/92Y-AMX wynoszącą $7.4 \pm 3.1 \mu\text{M}$.

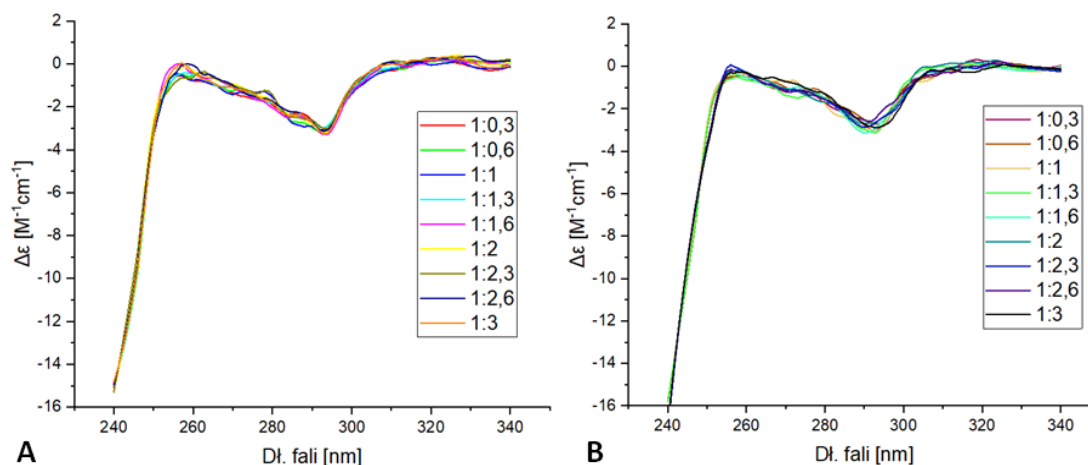


Rysunek 39. (A) Wyniki pomiarów ICD dla miareczkowania 58F/92Y roztworem amoksapiny aż do 3-krotnego nadmiaru liganda oraz (B) najlepsze dopasowanie danych eksperymentalnych do jednoniejscowego modelu wiązania.

4.10. Natywna forma białka

W celach porównawczych wykonano próby krystalizacji natywnej formy białka ze wszystkimi testowanymi ligandami. Nie udało się jednak otrzymać kryształów odpowiednich do badań dyfraktometrycznych. Wcześniejsze badania prowadzone w Zespole Biokrytalografii związane z krystalizacją natywnej formy białka z chloropromazyną, cetyryzyną oraz amitryptyliną zakończyły się uzyskaniem kryształów odpowiednich do pomiarów dyfraktometrycznych. Uzyskane dane wykazały jednak brak liganda w kieszeni wiążącej białka.

Pomimo niepowodzeń w eksperymentach krystalizacyjnych, postanowiono wykonać pomiary CD dla natywnej formy β -laktoglobuliny. Zastosowano taką samą procedurę jak dla poprzednich badanych nowych wariantów BLG. Roztwór białka o stężeniu 20 μ M miareczkowano 10 mM roztworem liganda, aż do jego 3-krotnego nadmiaru. We wszystkich badanych układach białko-ligand nie zaobserwowano znaczących zmian w sygnale CD. Przykładowe widma pokazano na **Rysunku 40**.



Rysunek 40. Wyniki pomiarów ICD dla miareczkowania natywnej formy BLG roztworem (A) amitryptyliny oraz (B) ketotifenu aż do 3-krotnego nadmiaru liganda.

5. Dyskusja wyników

5.1. Wpływ mutacji na stabilność termiczną nowych wariantów BLG

Jak wielokrotnie udowodniano (Bonarek et al. 2020) (Kazem-Farzandi et al. 2015) (Jaya et al. 2004), pojedyncze mutacje mogą mieć znaczący wpływ na strukturę i funkcję białka oraz jego właściwości fizykochemiczne (Keppler et al. 2014). Nieodwracalne rozfałdowanie białek, czyli ich denaturacja, jest główną przyczyną utraty funkcji biologicznych białek, zatem kluczowe jest jak najlepsze zrozumienie tego procesu. Denaturacja termiczna może być kontrolowana (przyspieszana lub opóźniana) na drodze różnych modyfikacji, w tym ukierunkowanej mutagenezy (Maschberger et al. 2015).

Bydlęca BLG ulega nieodwracalnej denaturacji w temperaturze powyżej 60°C (Jaya et al. 2004). Po podgrzaniu powyżej 60°C natywna BLG ulega zmianom konformacyjnym prowadzącym to powstawania agregatów (Cho et al. 1994). Pomimo braku jednoznacznych dowodów, niektóre badania sugerują, że kluczową rolę w tym procesie odgrywa wolna reszta Cys121 (Jaya et al. 2004) (Batt et al. 1994). Zastąpienie cysteiny w pozycji 121 przez serynę wykazało, że mutant C121S jest mniej odporny na denaturację pod wpływem temperatury niż natywne białko (Jaya et al. 2004). W celu zwiększenia stabilności białka zaproponowano zastąpienie Cys121, strukturalnie podobną i chemicznie obojętną alaniną, jednak mutacja C121A spowodowała nieprawidłowe fałdowanie białka, które powodowało jego akumulację w ciałkach inkluzyjnych (Batt et al. 1994). Kolejnymi zaproponowanymi mutacjami były A132C oraz L104C, które miały na celu zaangażowanie wolnej grupy tiolowej Cys121 w tworzenie dodatkowego mostka disiarczkowego. Stabilność termiczna obu badanych mutantów wzrosła o ok. 8-10°C (Batt et al. 1994).

Przy projektowaniu terapeutycznych wariantów BLG niezwykle istotne są informacje dotyczące wpływu mutacji wprowadzonych w obszarze kieszeni wiążącej na stabilność białka. Systematyczne badania Zespołu Biokrytalografii ZKiK Wydziału Chemii UJ pokazały, że pojedyncze mutacje w górnej części β -baryłki oraz w pobliżu wejścia do miejsca wiązania tj. L39Y, L58F, F105L oraz M107L zwiększają stabilność BLG o ok. 5°C (**Tabela 7**). Natomiast mutacje I56F oraz V92Y destabilizują białko i obniżają jego temperaturę denaturacji. Zastąpienie Val92 przez fenyloalaninę nie wpływa znacząco na T_m białka (Bonarek et al. 2020) (**Tabela 7**).

Badania podwójnych i potrójnych mutantów β -laktoglobuliny: F105L/L39A (LA), F105L/L39A/M107F (LAF), I56F/L39A (FA) oraz I56F/L39A/M107F (FAF) przy użyciu metod CD i nanoDSF (które dały bardzo zbliżone wyniki) wykazały, że dzika forma białka (WT) oraz warianty FA oraz FAF wykazują jednostopniowy proces denaturacji, natomiast warianty z mutacją F105L prezentują dwustopniowy proces destabilizacji białka. Co więcej, warianty z mutacją I56F obniżają termiczną stabilność białka, natomiast te z mutacją F105L wykazują odwrotny efekt (J. I. Loch et al. 2018) (**Tabela 7**). Podobne badania przeprowadzono dla mutantu

I56F/L39A/M107W (FAW). Wartość temperatury denaturacji dla tego wariantu była bardzo zbliżona do tej, wyznaczonej dla FAF i ponownie potwierdzono, że mutacja I56F obniża stabilność białka (J.I. Loch et al. 2022).

Podczas badań prowadzonych na potrzeby tej pracy wykonałam badania termostabilności nowych wariantów BLG przy użyciu metody nanoDSF. Najwyższą stabilnością charakteryzował się mutant LAW, natomiast najmniejszą FA71W (**Tabela 7**). Porównując wyniki uzyskane dla nowych wariantów BLG: LAW, FAF, FA71W, 58F/92Y z danymi literaturowymi (J. I. Loch et al. 2018) (Bonarek et al. 2020) (**Tabela 7**) potwierdzić można wcześniejsze wnioski, że mutacja w pozycji 105, w której sztywny aromatyczny pierścień fenyloalaniny, został zastąpiony przez alifatyczny aminokwas powoduje wzrost stabilności białka. W podwójnym mutancie LA, zastąpienie w pozycji 39 polarnej leucyny mniejszą alaniną, w niewielkim stopniu obniża stabilność białka (dane z pomiarów nanoDSF) (J. I. Loch et al. 2018). Natomiast w potrójnych mutantach LAW oraz LAF wprowadzenie dodatkowej aromatycznej reszty w pozycji 107 zwiększa tę stabilność.

Tabela 7. Stabilność termiczna dzikiej formy (WT) oraz mutantów BLG.

Wariant	Skrót	T _m [°C]		Literatura
		CD	nanoDSF	
Natywna	WT	77.5	79.7	(J. I. Loch et al. 2018)
L39Y	-	82.1	-	(Bonarek et al. 2020)
V92F	-	76.2	-	(Bonarek et al. 2020)
M107L	-	81.5	-	(Bonarek et al. 2020)
F105L	-	82.8	-	(Bonarek et al. 2020)
F105L/L39A	LA	81.1	64.3, 80.4	(J. I. Loch et al. 2018)
F105L/L39A/M107F	LAF	87.7	63.5, 85.3	(J. I. Loch et al. 2018)
F105L/L39A/M107W*	LAW	-	86.4*	-
I56F	-	71.0	-	(Bonarek et al. 2020)
I56F/L39A	FA	68.9	68.7	(J. I. Loch et al. 2018)
I56F/L39A/M107F	FAF	71.7	71.3	(J. I. Loch et al. 2018)
I56F/L39A/M107W	FAW	72.3	72.0	(J.I. Loch et al. 2022)
I56F/L39A/M107W*	FAW*	-	70.5*	-
I56F/L39A/I71W*	FA71W	-	68.1*	-
L58F	-	83.0	-	(Bonarek et al. 2020)
V92Y	-	64.7	-	(Bonarek et al. 2020)
L58F/V92Y*	-	-	71.8*	-

*wyniki pomiarów wykonanych do niniejszej rozprawy doktorskiej.

Jak już wcześniej wspomniano, dane literaturowe pokazują, że wszystkie nowe warianty BLG z mutacją I56F charakteryzują się niższą temperaturą denaturacji w porównaniu do natywnej/dzikiej formy białka. Wprowadzenie dodatkowej mutacji L39A do białka z mutacją I56F powoduje dodatkowe obniżenie jego stabilności. Podobne wyniki uzyskano dla podwójnego mutantu LA, w którym mutacja L39A obniżyła temperaturę denaturacji o ok. 3°C w porównaniu do pojedynczego mutantu F105L. Wprowadzenie dodatkowej zmiany do mutantu FA, tj. sztywnego, aromatycznego aminokwasu (Trp lub Phe) w pozycji 107, w wyniku której powstają

warianty FAW lub FAF, zwiększa nieznacznie stabilność białka. Ciekawą obserwacją są wyniki z pomiarów nanoDSF dla wariantu FA71W. Porównując wartości T_m wariantów FAW (70.5°C) oraz FA71W (68.1°C) zauważyć można, że na stabilność białka ma wpływ nie tylko rodzaj, ale również miejsce wprowadzenia mutacji (**Tabela 7**). Termiczna denaturacja jest zjawiskiem złożonym, na który duży wpływ ma struktura drugo- i trzeciorzędowa białka (Rodrigues et al. 2020). Natomiast w warunkach fizjologicznych równowaga monomer-dimer BLG może zostać zaburzona poprzez zmiany pH, stężenie białka czy siłę jonową (Rodrigues et al. 2020). Porównując dane literaturowe dla FAW (Bonarek et al. 2020) z otrzymanymi wynikami, zauważyć można różnice w uzyskanych T_m (**Tabela 7**). Te niewielkie różnice w temperaturach denaturacji wariantu FAW mogą wynikać np. z wykorzystania do pomiarów białka o różnym stężeniu.

Jak pokazują wcześniejsze badania pojedyncza mutacja L58F zwiększa stabilność białka, natomiast pojedyncza mutacja V92Y ją obniża (**Tabela 7**) (Bonarek et al. 2020). W podwójnym mutancie L58F/V92Y zauważyć można spadek temperatury denaturacji w stosunku do formy natywnej BLG, a tym samym destabilizujący efekt zestawu substytucji L58F/V92Y (**Tabela 7**). Można zatem stwierdzić, że mutacja V92Y (środkowa część baryłki) ma większy wpływ na stabilność białka niż podstawienie L58F.

Analizując **Tabelę 7** można wysnuć wniosek, że projektując nowe, termo-stabilne warianty BLG warto skupić się na wprowadzaniu zmian w środkowej części β -baryłki m.in. w pozycjach 56, 71, 105 oraz 92. Zmiany wprowadzane w tych miejscach, powodują, że stabilność termiczna zwiększa się, kiedy w w/w pozycjach znajdują się reszty alifatyczne takie jak leucyna, natomiast duże aromatyczne aminokwasy w tych pozycjach destabilizują białko. Odpowiednie dalsze mutacje wprowadzające niepolarne łańcuchy boczne np. Leu, Ile, Val czy Phe w górnej części kieszeni wiążącej tj. w pozycjach 58 oraz 105, mogą dodatkowo stabilizować białko.

5.2. Oddziaływanie trójcyklicznych leków z β -laktoglobuliną i innymi z białkami

Natywna BLG posiada kieszeń wiążącą o wydłużonym kształcie i hydrofobowym charakterze (Bonarek et al. 2020), która przystosowana jest do wiązania hydrofobowych alifatycznych fragmentów. Jednak ostatnie badania pokazują, że BLG jest dobrym kandydatem jako potencjalny nośnik wielu terapeutycznych związków (Agudelo et al. 2012) (Leilabadi-Asl et al. 2018). Inżynieria białek stanowi potężne narzędzie do projektowania białek o nowych, unikalnych właściwościach (Z. Chen & Zeng 2016). Białka z rodziny lipokalin z powodzeniem mogą być modyfikowane w celu zmiany selektywności wiązania i powinowactwa do szerokiego spektrum celów molekularnych (Deuschle et al. 2021). Stosując ukierunkowaną mutagenezę w rejonie kieszeni wiążącej, można z powodzeniem przeprojektować β -laktoglobulinę (BLG) w celu stworzenia serii (biblioteki) mutantów BLG o różnej geometrii miejsca wiążącego, a tym

samym różnym powinowactwie do ligandów. Nowe warianty BLG analizowane w tej pracy, zostały zaprojektowane tak, aby z wysokim powinowactwem wiązać związki zawierające trójcykliczne układy, w tym wybrane leki (**Rysunek 10**). Przegląd literaturowy jasno pokazuje, że oddziaływania trójcyklicznych leków badane były głównie w kontekście oddziaływań z białkami osocza (albuminy, kwaśna $\alpha 1$ -glikoproteina), pełniącymi funkcje transportowe (Raoufinia et al. 2016) oraz docelowymi receptorami tych leków (Kanba & Richelson 1984) (Perona et al. 2020).

5.2.1. Trójcykliczne leki z alifatycznym łańcuchem

Przedstawione w pracy badania pokazały, że pierwszy z testowanych ligandów tj. amitryptylina (AMT) została związana tylko w kieszeni wiążącej mutantu FAW (**Rozdział 4.7.2**). W dostępnej literaturze brakuje jakichkolwiek informacji na temat oddziaływania amitryptyliny z β -laktoglobuliną. Jednak do tej pory opublikowano kilka prac na temat interakcji tego leku z albuminami surowicy ludzkiej HSA (*ang. Human Serum Albumin*) oraz wołowej BSA (*ang. Bovine Serum Albumin*) (Khan et al. 2011) (Banerjee et al. 2006) (Leis et al. 2002). Wszystkie badania wykonywane były w roztworze i wykorzystywały takie metody jak: ITC, CD czy spektroskopię fluorescencyjną. Wyniki ITC zależne od temperatury (badania wykonywano od 10°C do 30°C) wykazały, że amitryptylina wiąże się do BSA ze stechiometrią od ok. 1:1.2 do 1:2.9 (Banerjee et al. 2006). Co więcej wiązanie amitryptyliny potwierdzono również w kompleksach z hemoglobina (Hb) (Maurya et al. 2017) oraz $\alpha 1$ -kwaśną glikoproteina osocza (*ang. $\alpha 1$ -acid Glycoprotein, $\alpha 1aG$*) i jej wariantami (C. B. Eap, C. Cuendet 1988). Co ciekawe, $\alpha 1aG$ również należy do rodziny lipokalin (Ruiz 2021) i jest głównym transporterem amitryptyliny (Schley & Müller-Oerlinghausen 1986).

Obecność klomipraminy (CLO), kolejnego testowanego leku, podobnie jak dla amitryptyliny, potwierdzono jedynie we wnętrzu baryłki mutantu FAW (**Rozdział 4.7.3**). Jest to również jedyna jak do tej pory struktura BLG z klomipraminą. Spektroskopowe badania oddziaływania klomipraminy z białkami były poprzednio wykonywane dla HSA (Rub et al. 2017). Inne badania opierające się na molekularnym dokowaniu wykazały aktywność allosteryczną dla tego leku w kompleksach z transporterami dopaminy (Ravna et al. 2009) oraz transporterem serotoniny i jego mutantami (Plenge et al. 2012). Przytoczone wyżej dane, wskazują, że wyznaczona przeze mnie struktura kompleksu FAW-CLO jest jak dotąd jedyną, która pokazuje wiązanie tego leku do białek z rodziny lipokalin. Jako, że klomipramina podobnie jak amitryptylina jest transportowana w osoczu przez $\alpha 1aG$ (Nyberg & Mårtensson 1984) uzyskany kompleks potwierdza, że również lipokaliny inne niż $\alpha 1aG$ mogą wiązać klomipraminę.

Doksepina (DOX) jest strukturalnym analogiem amitryptyliny i klomipraminy i obecność tego liganda potwierdzono także w kieszeni wiążącej mutantu FAW. Uzyskane dane jasno wskazują na jednomiejscowy model wiązania, natomiast z badań *in vivo* z wykorzystaniem tkanki

mózgowej szczura wynika, że doksepina wiąże się w dwóch miejscach z histaminowym receptorem H1 (H1R) (Taylor & Richelson 1982). Dwa lata później wykonano podobne badania z wykorzystaniem ludzkiej tkanki, które potwierdziły wiązanie doksepiny z wysokim powinowactwem w dwóch miejscach wiążących receptora histaminowego H1 (Kanba & Richelson 1984). Uzyskano również strukturę krystaliczną kompleksu H1R-DOX (PDB id: 3RZE). Spektroskopowe badania w roztworze potwierdziły natomiast wiązanie chlorowodoru doksepiny do BSA (Kandagal et al. 2006). Co ciekawe, wykazano, że doksepina wiąże się również do receptora ACE2, który jest kluczowym receptorem komórkowym wirusa SARS-CoV-2, przez co zmniejsza wskaźnik infekcji o 25.82 % (Ge et al. 2021). Te informacje wskazują na nową potencjalną drogę wykorzystania doksepiny w terapii COVID-19 (Ge et al. 2021), a więc zachowanie tego leku w kompleksach z białkami warte jest dalszych badań strukturalnych i biofizycznych. W kontekście przytoczonych wyżej danych literaturowych, uzyskane przez mnie wyniki pokazują, że lek ten może być wiązany przez niewielkie białko z rodziny lipokalin.

5.2.2. Trójcykliczne leki z cyklicznym fragmentem alifatycznym

Niewiele jest informacji na temat oddziaływania ketotifenu (KET) oraz amoksapiny z cząsteczkami białek. Z badań *in vitro* wynika, że ketotifen wpływa na odpowiedź immunologiczną, poprzez hamowanie proliferacji limfocytów T, hamowanie wytwarzania interleukin przez limfocyty T, hamowanie ekspresji receptora IgE przez limfocyty oraz hamowanie indukowanego uwalniania histaminy (Marks & Shuster 1972). Z przedstawionych w tej pracy badań wynika, że wiąże się on z dwoma wariantami BLG: FAW oraz FA71W (**Rozdziały 4.7.5; 4.8.3**).

Badania strukturalne potwierdziły obecność amoksapiny (AMX) w β -baryłce dwóch nowych wariantów BLG: FA71W oraz 58F/92Y (**Rozdziały 4.8.4; 4.9**). Wysokowydajne badania przesiewowe wykazały, że amoksapina zmniejsza wytwarzanie β -amyloidu poprzez oddziaływanie z serotoninowym receptorem HTR6 (X. Li et al. 2017). Co więcej wykazano, że lek ten może selektywnie tłumić transkrypcję genów odporności na β -laktamy (Gillard et al. 2018) oraz znacząco hamuje wzrost *Salmonelli* poprzez stopowanie hydrolizy d-glukoronidów (grupa glikozydów, pochodne kw. glukuronowego) (Burin & Shah 2021).

Wyznaczone przeze mnie struktury kompleksów nowych wariantów BLG z tymi ligandami jako pierwsze pokazują jaką geometrię/konformację przyjmują te leki w kieszeni wiążącej nowych wariantów BLG oraz sposób ich oddziaływania z cząsteczką modelowej lipokaliny.

5.2.3. Pochodne fenotiazyny

Przeprowadzone badania krystalograficzne i biofizyczne pokazały, że flufenazyna (FLU) wiąże się z wysokim powinowactwem do LAW, FAW oraz FA71W. Badania spektroskopowe potwierdziły wiązanie tego leku do ludzkiej albuminy (Jing et al. 2017). Natomiast inne badania pokazały, że flufenazyna poprzez wiązanie się z wysokim powinowactwem, ze stechiometrią ok. 2:5 z ludzką apolipoproteiną apoC-II sprzyja tworzeniu się włókien amyloidowych (Zlatic et al. 2015). Coraz więcej informacji wskazuje na możliwe właściwości cytotoksyczne flufenazyny względem komórek rakowych (Klutzný et al. 2017) (Menilli et al. 2019). Przedstawione w pracy wyniki, pokazują, wiązanie jednej cząsteczki leku we wnętrzu BLG i nie wskazują na jakiegokolwiek inne, alternatywne miejsca wiązania. Przedstawione przez mnie wyniki są pierwszymi danymi strukturalnymi kompleksów białkowych z flufenazyną.

Obecność jednej cząsteczki chlorpromazyny potwierdzono we wnętrzu wariantów LAW, FAW oraz FA71W. Spektroskopowe badania *in vivo* kompleksów chlorpromazyny z wołową albuminą (BSA) pokazały, że stechiometria wiązania wynosiła 1:0.9 co wskazuje na jedno, niezależne miejsce wiązania (Khatun et al. 2020). Uzyskane wyniki dotyczące stechiometrii wiązania BSA-CPZ, są zbieżne z tymi uzyskanymi dla kompleksów BLG-CPZ dla których potwierdzono obecność jednej cząsteczki leku w kieszeni wiążącej rekombinowanej BLG (**Rozdział 1.7.2.4**) (J. I. Loch et al. 2018). Co więcej, potwierdzono również wiązanie tego leku do ludzkiej α 1-kwaśnej glikoproteiny (Huang et al. 2012). Przedstawione w tej pracy struktury kompleksów nowych wariantów BLG z chlorpromazyną pozwalają na dokładniejszą analizę sposobów oddziaływania tego leku z białkami z rodziny lipokalin, oraz wpływu mutacji na specyficzność wiązania tego liganda.

5.2.4. Cetyryzyna

Cetyryzyna jest lekiem stosowanym w terapii w postaci racematu. Oba enancjomery tego leku wiążą się z ludzkim receptorem histaminowym H1 (Perona et al. 2020). W osoczu krwi cetyryzyna występuje w formie obojnaczej, a ponad 90% leku krążącego w organizmie wiąże się z surowiczą ludzką albuminą HSA (Perona et al. 2020). Badania nowych wariantów BLG wykazały, że pojedyncza cząsteczka cetyryzyny związana została w hydrofobowej β -baryłce wariantu FA71W, jednak nie udało się wyznaczyć stałej K_d dla tego kompleksu. Rozwiązana struktura kompleksu końskiej albuminy surowiczej ESA z cetyryzyną (Handing et al. 2016) posłużyła do komputerowego modelowania oddziaływania tego związku z ludzką albuminą HSA. Dane te potwierdziły wysokie powinowactwo do wiązania w hydrofobowych miejscach albuminy (Perona et al. 2020). Dane strukturalne kompleksu FA71W-CET są pierwszymi danymi pokazującymi wiązanie tego leku do BLG.

5.2.5. Wiązanie leków do β -laktoglobuliny monitorowane przy pomocy CD

Białka zbudowane są z chiralnych podjednostek, które wytwarzają sygnał CD gdy przez ich roztwory przechodzi światło spolaryzowane kołowo prawo- i lewoskrętnie (Miles et al. 2021). Oddziaływanie molekularne pomiędzy chiralnymi związkami (nieracemicznymi), a achiralnymi może powodować indukowany sygnał CD (ICD) (Allenmark 2003). Metody ICD były często stosowane w celu uzyskania informacji o miejscach wiązania leków do białek osocza w szczególności albumin (Bertucci et al. 2010) (Ascoli et al. 1995), α 1-kwaśnej glikoproteiny (Zsila et al. 2005) czy ludzkiej albuminy osocza (HSA) (Rahman et al. 1993).

Uzyskane za pomocą CD parametry wiązania są porównywalne z tymi, otrzymanymi innymi metodami (Ascoli et al. 1995) (Zsila et al. 2005) (Russeva & Mihailova 1999). Podobne wnioski wysnuto podczas analizy oddziaływania mutantów BLG z dezypraminą, gdzie wyniki ICD były zgodne z tymi uzyskanymi za pomocą ITC (J.I. Loch et al. 2022). Podczas eksperymentów przeprowadzonych na potrzeby tej pracy udało się wyznaczyć stałe wiązania dla niektórych kompleksów białko-ligand. Wszystkie wyniki zebrano w **Tabeli 8**. Dla stałych równowagi K_d za istotne można przyjąć różnice o rząd wielkości, dlatego otrzymane niepewności wyników są akceptowalne (Koenig et al. 2012)

Tabela 8. Stałe wiązania (K_d [μ M]) kompleksów nowych wariantów BLG z ligandami wyznaczone za pomocą ICD.

<i>Mutant</i>	<i>LAW</i>	<i>FAW</i>	<i>FA71W</i>	<i>58F/92Y</i>
<i>Ligand</i>				
<i>AMT</i>	-	32.8 \pm 13.2	-	-
<i>CLO</i>	-	46.9 \pm 15.7	-	-
<i>DOX</i>	-	*	-	-
<i>KET</i>	-	152.8 \pm 101.6	*	-
<i>AMX</i>	-	-	149.2 \pm 30.6	7.4 \pm 3.1
<i>CPZ</i>	97.0 \pm 76.1	24.5 \pm 5.3	6.9 \pm 4.6	-
<i>FLU</i>	7.1 \pm 4.5	12.4 \pm 6.5	5.1 \pm 3.4	-
<i>CET</i>	-	-	*	-

- badania krystalograficzne nie potwierdziły obecności liganda w kieszeni wiążącej

* nie udało się wyznaczyć stałej wiązania za pomocą metody ICD

Jak wynika z **Tabeli 8** warianty LAW, FAW oraz FA71W wykazują największe powinowactwo do flufenazyny, dla której K_d mieszczą się w przedziale od 5.1 do 12.4 μ M. Wyznaczona stała wiązania K_a do ludzkiej albuminy osocza (HSA) była równa $2.52 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (dla 290 K) (K_d rzędu 39.7 μ M) (Jing et al. 2017), co wskazuje, że BLG ma większe powinowactwo do flufenazyny niż inne białko osocza (**Tabela 9**). Kolejnym preferowanym ligandem przez warianty LAW, FAW oraz FA71W jest chloropromazyna. Wcześniejsze pomiary kalorymetryczne ITC wykonane dla oddziaływania wariantów β -laktoglobuliny: FA, FAF, LA, LAF z chloropromazyną oraz wyznaczone stałe asocjacji K_a pokazały, że warianty LA oraz LAF

wykazują powinowactwo do tego leku, rzędu 10.0 oraz $15.4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ (K_d rzędu $65\text{-}100 \text{ }\mu\text{M}$) (J. I. Loch et al. 2018). Wyniki te są zatem zgodne z tymi otrzymanymi dla badanego wariantu LAW. Natomiast mutanty FA oraz FAF wykazywały powinowactwo K_a ok. 4.2 oraz $8.1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ (K_d rzędu $120\text{-}230 \text{ }\mu\text{M}$) (J. I. Loch et al. 2018). Wartości te są zdecydowanie wyższe niż dla wariantów FAW oraz FA71W. Świadczy to o tym, że wprowadzenie do kieszeni wiążącej tryptofanu w środkowej części baryłki zwiększa powinowactwo pochodnych wariantu FA do chloropromazyny. Podobne wyniki otrzymano podczas badania powinowactwa desypraminy do FAW oraz FAF (J.I. Loch et al. 2022). Chloropromazyna wykazuje mniejsze powinowactwo do białek osocza w porównaniu do BLG. Obliczona stała wiązania na podstawie badań ITC *in vivo* kompleksów chloropromazyny z wołową albuminą (BSA) była równa $1.40 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Khatun et al. 2020). Natomiast powinowactwo (K_a) ludzkiej $\alpha 1$ -kwaśnej glikoproteiny określone na podstawie analizy kalorymetrycznej wynosiło $46\ 000 \text{ M}^{-1}$ w buforze HEPES pH 7.4 w temperaturze 30°C (Huang et al. 2012) (**Tabela 9**).

Z porównania stałych wiązania kompleksów nowych wariantów BLG oraz białek osocza z lekami (**Tabela 9**) wynika, że kompleksy wariantów FAW, LAW oraz FA71W z flufenazyną oraz chloropromazyną wykazują powinowactwo wyższe niż dla kompleksów z białkami osocza: BSA, HSA czy *alaG*.

Tabela 9. Zestawienie stałych wiązania K_d kompleksów nowych wariantów BLG oraz białek osocza z lekami

	Stała K_d [μM] kompleksów białko-ligand					
	FAW	LAW	FA71W	BSA	HSA	<i>alaG</i>
AMT	32.8	-	-	*od 4.7 do 46.3 (Banerjee et al. 2006)	-	*5.0 (Schley & Müller-Oerlinghausen 1986)
CLO	46.9	-	-	1.3 (Abdul et al. 2014)	*od 16.8 do 29.5 (Rub et al. 2017)	72.0 (Nyberg & Mårtensson 1984)
FLU	12.4	7.1	5.1	-	*39.7 (Jing et al. 2017)	-
CPZ	24.5	97.0	6.9	*71.4 (Khatun et al. 2020)	-	*21.7 (Huang et al. 2012)

* przybliżone wartości K_d zostały przeliczone na podstawie danych literaturowych dotyczących stałych K_a

Wiązanie klomipraminy zaobserwowano jedynie dla wariantu FAW (**Tabela 3**). Stała K_d była rzędu $50 \text{ }\mu\text{M}$, co świadczy o większym powinowactwie tego leku do BLG niż do *alaG*. W osoczu klomipramina wiązana jest przez kwaśną glikoproteinę ze stałą K_d $7.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (Nyberg & Mårtensson 1984). Badania wiązania tego leku do BSA wykazały, że wołowa albumina wykazuje największe powinowactwo do klomipraminy w 45°C , przy 295 nm (K_d $0.13 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) (Abdul et al. 2014). Natomiast spektroskopowe badania oddziaływania klomipraminy z HSA pozwoliły na wyznaczenie stałej wiązania K_a w różnych temperaturach, które zawierały się w zakresie od 3.39 do $5.96 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Rub et al. 2017). Zaprezentowane wyniki pokazują większe powinowactwo tego leku do albumin osocza (**Tabela 9**).

Amitryptylina wiąże się do BSA ze stałą asocjacji w zakresie od 2.16 ± 1.17 do 21.3 ± 9.1 (10^4 M^{-1}) (wyniki ITC zależne od temperatury), natomiast do αLaG z K_a na poziomie $2.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Schley & Müller-Oerlinghausen 1986). Porównując te wyniki z wynikami otrzymanymi dla nowych wariantów BLG zauważyć można, że amitryptylina wiąże się z większym powinowactwem do BSA oraz αLaG (**Tabela 9**).

Wyznaczone stałe wiązania kompleksów amoksapiny z FA71W oraz 58F/92Y znacznie różnią się między sobą. Mniejsze powinowactwo do tego leku wykazuje wariant FA71W. Amoksapina została związana z największym powinowactwem do wariantu 58F/92Y (**Tabela 8**). K_d dla kompleksu 58F/92Y-AMX jest jednak znacznie niższa niż wartości rzędu nM otrzymane z badań *in vitro* oddziaływania amoksapiny z receptorami dopaminowymi (Nasu et al. 2000) oraz serotoninowymi (Viggers et al. 1993). Dla wariantu FAW najmniejsze powinowactwo, czyli największą wartość K_d uzyskano dla wiązania ketotifenu, co potwierdzają dane krystalograficzne, gdyż na mapie gęstości elektronowej widoczne było nieuporządkowanie, szczególnie w rejonie alifatycznego, cyklicznego fragmentu tego leku (**Rysunek 22**).

Zmian sygnału ICD nie zaobserwowano dla kompleksów FAW-DOX, FA71W-CET oraz FA71W-KET i pomimo wykonania dodatkowych pomiarów dla wyższych stężeń, nie udało się wyznaczyć stałych K_d . Powstawanie sygnału ICD jest efektem wielu składowych, które mogą się wzmacniać bądź wygaszać, dlatego nie dla wszystkich kompleksów można zarejestrować zmiany indukowanego sygnału CD. Inne badania pokazują jednak, że stałe K_d wiązania doksepiny czy cetyryzyny do ludzkiego receptora histaminowego H1 są wielkościami rzędu nM. Dla doksepiny wielkość ta wynosi 2.2 nM natomiast dla cetyryzyny 160 nM (Shimamura et al. 2011). Biorąc jednak pod uwagę stężenia ligandów w kropli krystalizacyjnej, które były rzędu mM można się spodziewać, że powinowactwo do doksepiny czy cetyryzyny do BLG będzie niższe niż rzędu nM.

5.3. Wpływ mutacji na selektywność wiązania w fazie krystalicznej wybranych leków do nowych wariantów BLG

Przeprowadzone badania krystalograficzne pokazują, że najlepsze warunki do wzrostu dobrej jakości kryształów to 2.4-2.8 M siarczan amonu w 0.5 M Tris-HCl pH 8.5. Dla wszystkich badanych kompleksów otrzymano trygonalne kryształy o symetrii grupy przestrzennej $P3_221$, które w jednostce asymetrycznej zawierały pojedynczy łańcuch białkowy. Tak jak oczekiwano, w pH powyżej 7 pętla EF występowała w pozycji otwartej, natomiast obserwowano częściowe nieuporządkowanie pętli GH. We wszystkich otrzymanych kompleksach, ligand związany był we wnętrzu zmodyfikowanej β -baryłki.

Celem mojej pracy było zbadanie wpływu mutacji we wnętrzu baryłki β -laktoglobuliny na zdolność oddziaływania nowych wariantów BLG z trójcyklicznymi ligandami o niewielkiej masie cząsteczkowej. Wydłużony kształt kieszeni wiążącej natywnej formy białka (Bonarek et al.

2020) sprawia, że wśród wielu prac dotyczących wiązania ligandów w β -baryłce BLG, dominują badania opisujące wiązanie hydrofobowych alifatycznych ligandów we wnętrzu baryłki: kwasów tłuszczowych (Le Maux et al. 2014) (J. I. Loch et al. 2013) (Spector & Fletcher 1970), retinolu, retinoidów, karotenoidów (Mensi et al. 2013) czy SDS (Gutiérrez-Magdaleno et al. 2013). Przeprowadzone przeze mnie badania strukturalne wykazały, że wprowadzone modyfikacje zmieniły geometrię β -baryłki, dzięki czemu nowe warianty β -laktoglobuliny zyskały powinowactwo do ligandów z aromatycznymi elementami. Analizując wyniki badań krystalizacyjnych wraz z wyznaczonymi strukturami, można zauważyć pewną prawidłowość dotyczącą specyficzności i selektywności wiązania trójcyklicznych leków przez nowe warianty BLG (*Tabela 10*).

Tabela 10. Zestawienie wyników eksperymentów krystalizacyjnych skorelowane z analizą wyznaczonych struktur krystalicznych. Legenda: NIE – ligand nie związał się, TAK – ligand związany wewnątrz baryłki.

<i>Mutant</i>	<i>LAW</i>	<i>FAW</i>	<i>FA71W</i>	<i>58F/92Y</i>
<i>Ligand</i>	<i>Grupa 1</i>			
<i>AMT</i>	NIE	TAK	NIE	BRAK POMIARU*
<i>CLO</i>	NIE	TAK	NIE	BRAK POMIARU*
<i>DOX</i>	NIE	TAK	NIE KRYSZALIZUJE	NIE
<i>Grupa 2</i>				
<i>KET</i>	NIE	TAK	TAK	NIE
<i>AMX</i>	NIE	NIE	TAK	TAK
<i>Grupa 3</i>				
<i>CPZ</i>	TAK	TAK	TAK	NIE
<i>FLU</i>	TAK	TAK	TAK	NIE
<i>Grupa 4</i>				
<i>CET</i>	NIE	NIE	TAK	NIE KRYSZALIZUJE
<i>Grupa 5</i>				
<i>PAL</i>	NIE	NIE	NIE	NIE
<i>MYR</i>	NIE	NIE	NIE	NIE

* wysyp drobnych kryształów nieodpowiednich do badań dyfrakcyjnych

5.3.1. Powinowactwo nowych wariantów BLG do kwasów tłuszczowych

Kwasy tłuszczowe (FA, *ang. Fatty Acid*) są kwasami karboksylowymi z łańcuchami węglowodorowymi zawierającymi od 3 do 40 atomów węgla. Wyznaczona w 1999 roku struktura krystaliczna jasno wykazała obecność cząsteczki kwasu palmitynowego we wnętrzu β -baryłki, stabilizowanej oddziaływaniami hydrofobowymi (Wu et al. 1999). Postuluje się, że kwasy tłuszczowe są naturalnymi ligandami BLG oraz że β -laktoglobulina jest zaangażowana w ich transport w przewodzie pokarmowym cieląt (Ragona et al. 2000). Do tej pory wiele badań udowodniło zdolność wiązania zarówno długo- jak i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (Ragona et al. 2000) (J. I. Loch et al. 2012) (J. I. Loch et al. 2013). Co więcej zaobserwowano również spontaniczne ich wiązanie w kieszeni wiążącej rekombinowanej BLG (PDB id: 5HTD) (J. I. Loch et al. 2016) oraz w wariantach F105A (PDB id: 7BGA), L39Y (PDB id: 7BH0) oraz L39K (PDB id: 7BGZ) (Bonarek et al. 2020).

W omawianej pracy jako modelowe cząsteczki do badań krystalizacyjnych wybrano kwas palmitynowy (PAL) oraz kwas mirystynowy (MYR). BLG ma najwyższe powinowactwo do kwasu palmitynowego (J. I. Loch et al. 2012), natomiast kwas mirystynowy wykazuje większą rozpuszczalność w wodzie i nie tworzy silnego osadu w kropli (Bonarek et al. 2020). Wykonano ko-krystalizację wariantów LAW, FAW, FA71W oraz 58F/92Y z tymi ligandami. Dla każdej pary białko-ligand otrzymano dobrej jakości kryształy odpowiednie do pomiarów dyfraktometrycznych. Analiza danych strukturalnych wykazała jednak brak liganda w miejscu wiązania (dane z pomiarów umieszczono w suplemencie do pracy, *Tabela S1*).

Przedstawione wyniki jasno pokazują, że mutacje wprowadzone w kieszeni wiążącej BLG, zmieniają nie tylko jej geometrię ale również powinowactwo do ligandów. Skrócenie β -baryłki uniemożliwia wiązanie alifatycznych kwasów tłuszczowych. Obecne w cytoplazmie podczas ekspresji, bądź też pochodzące z uszkodzonych błon komórkowych i obecne podczas oczyszczania kwasy tłuszczowe nie mogą więc spontanicznie wiązać się w kieszeni wiążącej nowych wariantów BLG, a tym samym nie zaburzają procesu wiązania docelowych ligandów, czyli leków z aromatycznymi, trójcyklicznymi układami. Wprowadzone mutacje zapobiegają zatem temu zjawisku i zwiększają prawdopodobieństwo związania cząsteczki leków. Każdy z nowych wariantów miał jednak niższe powinowactwo do leków niż do naturalnych ligandów (J. I. Loch et al. 2012), aspekt ten wymaga więc poprawy w toku ewentualnych dalszych prac związanych z inżynierią BLG.

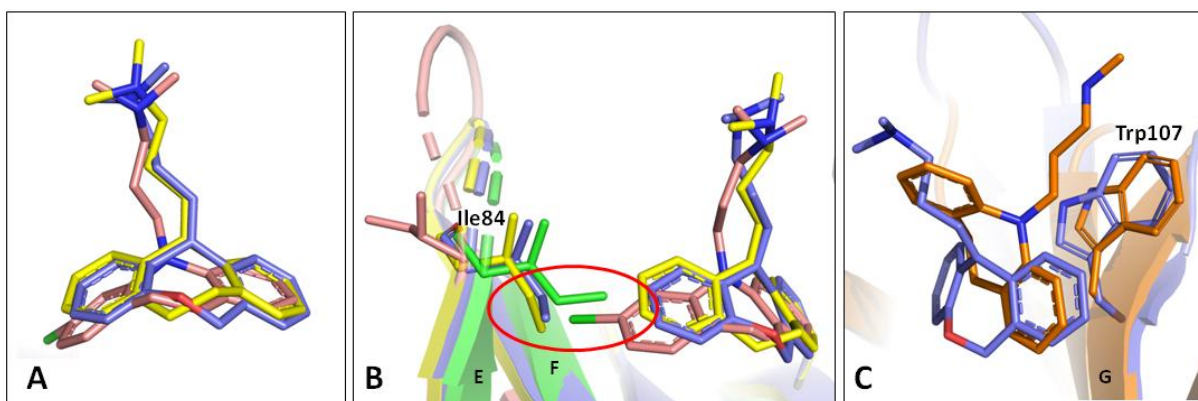
5.3.2. Selektywność wiązania trójcyklicznych leków z łańcuchem alifatycznym (AMT, CLO, DOX) przez wariant FAW

Obecność trójcyklicznych leków z alifatycznym łańcuchem tj. amitryptyliny, klomipraminy i doksepiny potwierdzono jedynie w kieszeni wiążącej wariantu FAW (*Tabela 10*), co świadczy o selektywności (a także specyficzności) wiązania tych leków przez ten wariant. Porównując położenie ligandów w kieszeni wiążącej, zauważyć można że aromatyczne fragmenty leków usytuowane są w górnej części baryłki, wokół reszt Ile71, Leu84 oraz Trp107, natomiast alifatyczny fragment skierowany jest ku wejściu do kieszeni wiążącej oraz jest wygięty w stronę nici D (*Rysunek 42*). Cząsteczki leków stabilizowane są głównie oddziaływaniami hydrofobowymi co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami (Nishi et al. 2011) (Shimamura et al. 2011) (Zhao et al. 2018).

Trójcykliczna część amitryptyliny oraz doksepiny zajmuje praktycznie to samo miejsce w przestrzeni β -baryłki, natomiast trójpierścieniowa część klomipraminy, wraz z przyłączonym chlorem skierowana jest w kierunku reszty Ile84 (*Rysunek 41A*). Takie położenie klomipraminy wymusza obrót Ile84 o ok. 180° (*Rysunek 41B*). We wcześniejszych badaniach wykazano, że preferowanym enancjomerem w kompleksie ludzkiego receptora histaminowego H1 z doksepiną

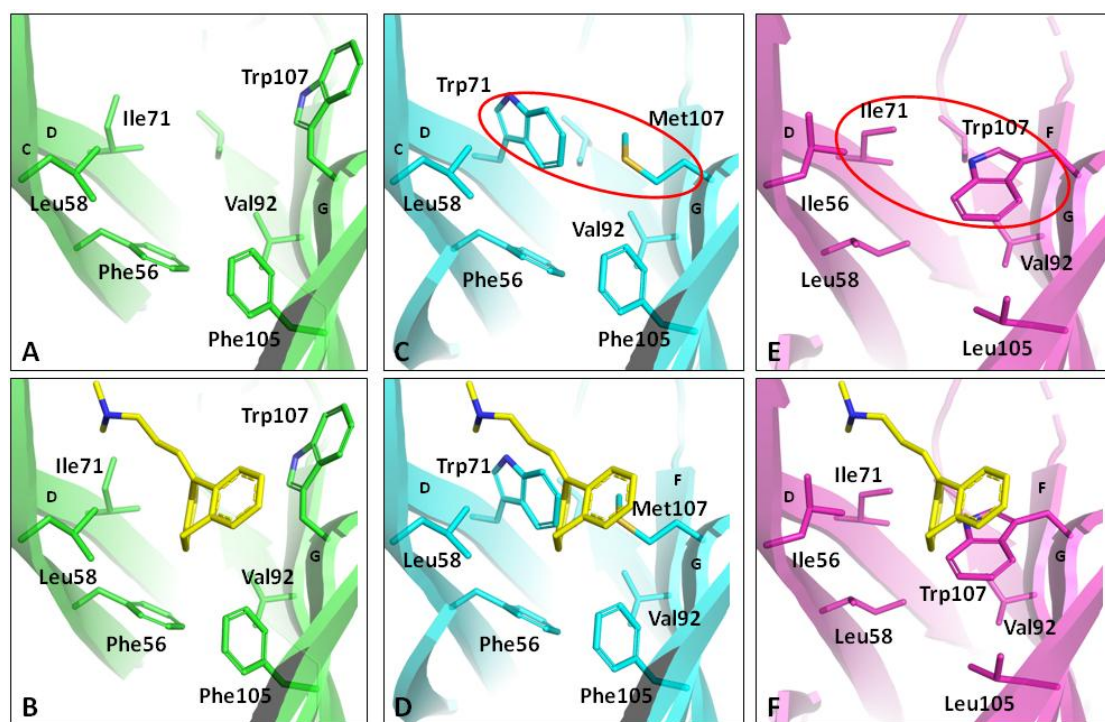
był enancjomer E (Shimamura et al. 2011). W kompleksie FAW-DOX związany został E-izomer, jednak do krystalizacji użyto odczynnika ze znaczną przewagą E-izomeru (85%), dlatego na podstawie otrzymanych wyników nie można określić stereoselektywności wiązania tego leku przez FAW.

Porównując formę apo wariantu FAW ze strukturami kompleksów nie zauważono żadnych innych znaczących zmian w kieszeni wiążącej. Wcześniejsze badania dotyczące kompleksów FAW z dezypraminą (DES), związkiem strukturalnie podobnym do amitryptyliny, klomipraminy oraz doksepiny wykazały, że może on zostać związany nie tylko w kieszeni wiążącej FAW, ale również u wejścia do β -baryłki oraz na styku dimerów (J. I. Loch et al. 2022). W uzyskanych przeze mnie strukturach nie zaobserwowałam wiązania testowanych leków poza β -baryłką. Porównując wiązanie dezypraminy oraz doksepiny do FAW zauważyć można, że trójcykliczny fragment dezypraminy ułożony jest prawie prostopadle względem aromatycznego układu doksepiny (**Rysunek 41 C**), dzięki temu cząsteczka DES znajduje się pomiędzy parą oddziaływań C-H \cdots π utworzoną przez reszty Val41 oraz Trp107, znajdujące się po przeciwnych stronach pierścienia (J. I. Loch et al. 2022). Co ciekawe, formę trygonalną kompleksu FAW-DES, z pojedynczym ligandem w baryłce udało się uzyskać tylko raz, natomiast preferowana była forma rombowa (J. I. Loch et al. 2022) z kilkoma cząsteczkami leku związanymi do białka. Dla kompleksów wariantu FAW z amitryptyliną, klomipraminą oraz doksepiną za każdym razem otrzymano kryształy o symetrii grupy przestrzennej P3₂21, z ligandem związanym wewnątrz baryłki. Otrzymane dane wskazują, że kieszeń wiążąca FAW ma geometrię dopasowaną rozmiarem i kształtem do rozmiarów tych leków, co nie wywołuje zmian konformacyjnych (poza niewielkim ruchem Ile84) w cząsteczce białka pod wpływem wiązania tych ligandów oraz decyduje o braku selektywności wariantu FAW względem tych związków oraz powoduje podobną specyficzność wiązania (**Tabela 10**).



Rysunek 41. (A) Porównanie położenia amitryptyliny (kolor żółty), klomipraminy (kolor jasnoróżowy) i doksepiny (kolor fioletowy). (B) Zmiana położenia Ile84 w kompleksach FAW-AMT (kolor żółty), FAW-CLO (kolor jasnoróżowy), FAW-DOX (kolor fioletowy) oraz formy apo FAW (kolor zielony). (C) Porównanie położenia cząsteczki dezypraminy (PDB id: 7Q19, kolor pomarańczowy) (J. I. Loch et al. 2022) oraz doksepiny (kolor fioletowy) w FAW.

Analizując formy apo wariantów LAW, FAW oraz FA71W zauważyć można, że w wariacie FAW ugrupowanie indolowe Trp107, jest skierowane wzdłuż nici G w kierunku pętli GH, czyli wejścia do baryłki, dodatkowo konformacja Ile71, która jest obrócona w kierunku nici D sprawiają, że w górnej części kieszeni wiążącej jest odpowiednia przestrzeń dla trójcyklicznych elementów leków (**Rysunek 42 A, B**). Jest to znacząca różnica w stosunku do wariantów LAW oraz FA71W wpływająca na powinowactwo FAW do leków z grupy 1 (amitryptylina, klomipramina, doksepina). W formie apo wariantu FA71W duże, aromatyczne ugrupowanie Trp71 oraz łańcuch boczny Met107 skierowane są do wnętrza baryłki, przez co tworzą zawadę steryczną, zwężając wejście do kieszeni wiążącej i tym samym uniemożliwiając związanie ligandów grupy 1 (**Tabela 10**) (**Rysunek 42 C, D**). W wariacie LAW, tryptofan w pozycji 107 oraz izoleucyna 71 w odróżnieniu od wariantu FAW skierowane są do wnętrza baryłki, przez co blokują dostęp do β -baryłki i uniemożliwiają wiązanie tych leków (**Rysunek 42 E, F**).



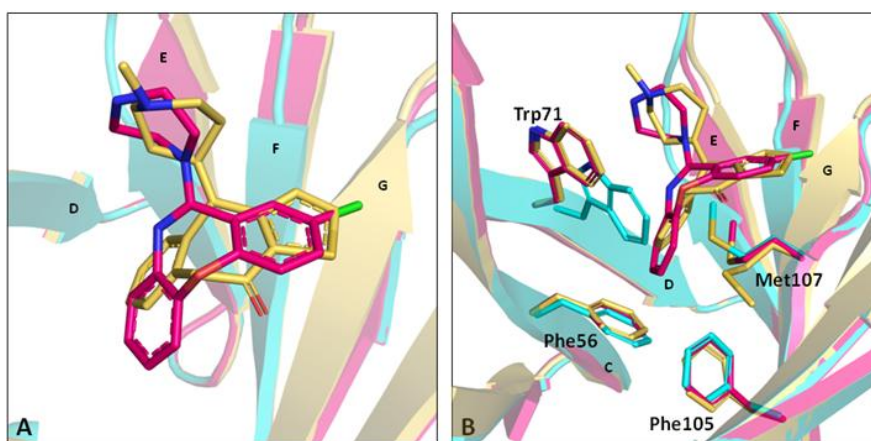
Rysunek 42. Widok z góry na położenie reszt w kieszeni wiążącej formy apo wariantów (A) FAW, (C) FA71W oraz (E) LAW. Dolny panel (widok z boku) przedstawia porównawcze położenie amitryptyliny (kolor żółty) w kieszeni wiążącej formy apo wariantów (B) FAW, (D) FA71W oraz (F) LAW.

Nałożenie struktury kompleksu FAW-AMT z formami apo LAW oraz FA71W (**Rysunek 42 B, D, F**) pokazuje, że kluczowymi resztami, odpowiadającymi za selektywność wiązania leków z grupy 1 przez wariant FAW są Ile71 oraz Trp107. Ważna jest ich odpowiednia konformacja, w której łańcuchy boczne skierowane są wzdłuż arkuszy β , ułatwiając tym samym dostęp do β -baryłki. Takie same obserwacje dotyczące wymuszania przez pozycje łańcucha bocznego Trp107 określonych oddziaływań liganda z FAW przedstawiono w badaniach strukturalnych kompleksu FAW-DES (J. I. Loch et al. 2022).

5.3.3. Selektywność wiązania trójcyklicznych leków z cyklicznym, alifatycznym łańcuchem (KET, AMX)

Analiza struktur kompleksów FA71W z ketotifenem oraz amoksapiną potwierdziła, że FA71W może wiązać oba te ligandy. Porównując położenie tych ligandów w β -baryłce można zauważyć, że aromatyczne ugrupowanie ketotifenu przesunięte jest w kierunku nici G, natomiast obecność atomu chloru w strukturze amoksapiny, usytuowanego również w pobliżu nici G wymusza przesunięcie całej cząsteczki leku w kierunku środka baryłki (**Rysunek 43 A**).

Nalozone struktury kompleksów FA71W-KET oraz FA71W-AMX z formą apo wariantu FA71W ujawniły zmiany konformacyjne łańcucha bocznego Trp71 oraz Met107 (**Rysunek 43 B**). W formie apo pierścień indolowy Trp107 skierowany jest w głąb baryłki, natomiast związanie cząsteczki amoksapiny lub ketotifenu powoduje przesunięcie go w kierunku wejścia do baryłki wzdłuż tej samej płaszczyzny (**Rysunek 43 B**). Dodatkowo zauważyć można zmiany w położeniu łańcucha bocznego Met107. Jak wspomniano w **Rozdziale 5.3.2** Met107 w formie apo wariantu FA71W skierowana jest do wnętrza baryłki i przyjmuje niemal prostopadłe ułożenie względem osi kieszeni wiążącej, natomiast struktury kompleksów wykazały, że związanie liganda wymusza zmianę konformacyjną łańcucha bocznego tego aminokwasu. W kompleksie z amoksapiną jest on skierowany ku wejściu do β -baryłki, co jest uzasadnione przesunięciem aromatycznego układu tego leku w głąb baryłki. Natomiast w kompleksie z ketotifenem, Met107 skierowana jest w głąb baryłki, tworząc przestrzeń dla przesuniętej w kierunku nici G cząsteczki leku (**Rysunek 43 B**).



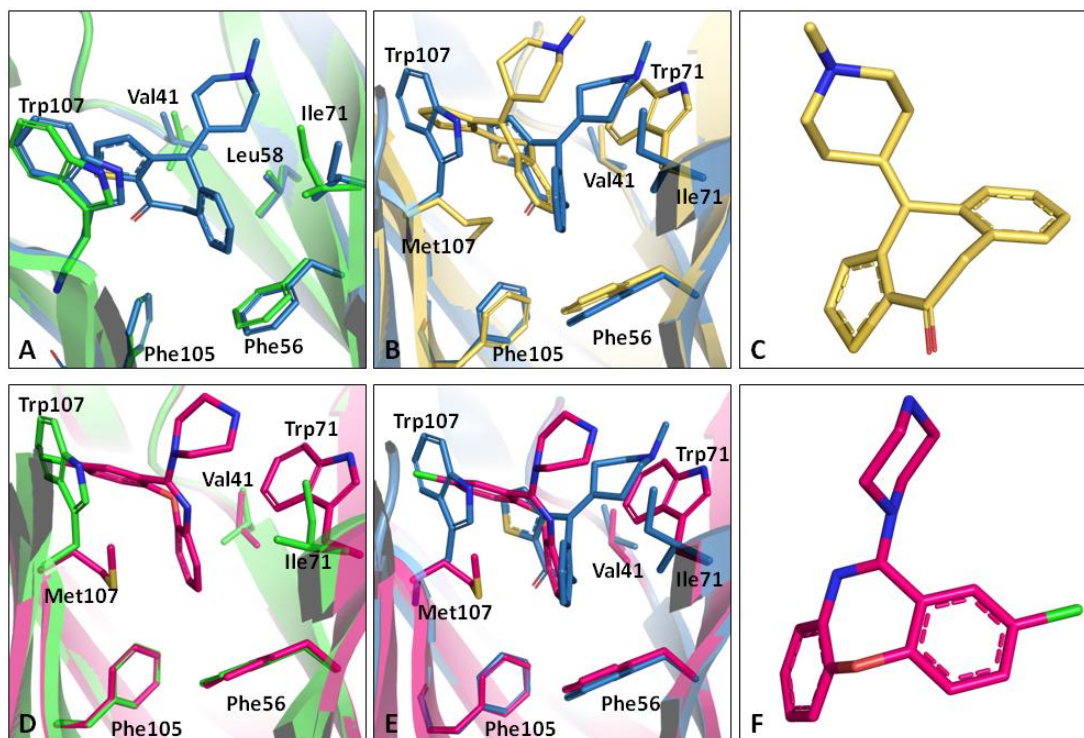
Rysunek 43. (A) Porównanie położenia cząsteczki amoksapiny (kolor różowy) oraz ketotifenu (kolor żółty) w kieszeni wiążącej FA71W oraz (B) nałożenie struktur kompleksów FA71W-KET (kolor żółty), FA71W-AMX (kolor różowy) z formą apo wariantu FA71W (kolor niebieski).

Jak pokazują analizowane struktury kompleksów FA71W z ketotifenem oraz amoksapiną, kieszeń wiążąca tego wariantu jest w stanie dopasować się do ligandów grupy 2 (**Tabela 10**) poprzez zmiany konformacyjne łańcuchów bocznych między innymi Trp71 oraz Met107.

Obecność ketotifenu potwierdzono również w strukturze kompleksu z mutantem FAW. Położenie tego leku jest bardzo podobne do położenia ligandów grupy 1 (AMT, CLO, DOX).

Porównując formę apo FAW ze strukturą kompleksu FAW-KET (**Rysunek 44 A**), jedyną różnicą w kieszeni wiążącej jest położenie reszty Ile71, która zmienia swoją konformację, aby zwiększyć przestrzeń dla liganda. Analiza struktur FAW-KET oraz FA71W-KET, pokazała że ze względu na obecność dużej reszty tryptofanowej po przeciwnych stronach baryłki tj. w pozycji 71 lub 107 ligand przesunięty jest w przestrzeni miejsca wiązania (**Rysunek 44 B**), co potwierdza wcześniejsze obserwacje dotyczące wymuszania przez pozycje łańcucha bocznego Trp107 określonych oddziaływań liganda z FAW (J. I. Loch et al. 2022) (**Rozdział 5.3.2.**), ale także pozwala wnioskować, że nie tylko Trp107 ale również Trp71 wymusza określoną pozycję i oddziaływanie liganda w kieszeni wiążącej wariantów FAW oraz FA71W.

Co ciekawe, pomimo odpowiedniej przestrzeni w kieszeni wiążącej FAW, wariant ten nie związał amoksapiny. Porównując formę apo FAW z FA71W-AMX (**Rysunek 44 D**), zauważyć można, że w kompleksie FA71W z amoksapiną, przyłączony do trójcyklicznego układu atom chloru zajmuje miejsce, w którym w formie apo FAW znajduje się Trp107. Jak pokazano na **Rysunku 44 E**, w kompleksie FAW-KET, struktura białka wymusiła określone położenie liganda i jego przesunięcie w przestrzeni baryłki. Różnice w strukturze obu ligandów (**Rysunek 44 C, F**) w tym większą sztywność ugrupowania aromatycznego amoksapiny oraz obecność atomu chloru, sprawiają, że amoksapina nie mogła dopasować się do kieszeni wiążącej FAW.



Rysunek 44. Porównanie struktury kompleksu FAW-KET (kolor niebieski) z (A) formą apo FAW (kolor zielony) oraz (B) FA71W-KET (kolor żółty). Porównanie struktury kompleksu FA71W-AMX (kolor różowy) z (D) formą apo FAW (kolor zielony) oraz (E) strukturą FAW-KET (kolor niebieski). Struktury (C) ketotifenu oraz (F) amoksapiny.

Analiza danych dyfraktometrycznych nie potwierdziła obecności ketotifenu oraz amoksapiny w kieszeni wiążącej wariantu LAW. Jak wspomniano w **Rozdziale 5.3.2.** grupa indolowa Trp107

blokuje wejście do baryłki, uniemożliwiając związanie tych ligandów (**Rysunek 42 E**). Co więcej, brak aromatycznych reszt w dolnej części baryłki tj. Phe56 czy Phe105, które stabilizują cząsteczki ligandów w strukturach z FAW i FA71W (**Rozdziały 4.7.5, 4.8.3, 4.8.4.**) poprzez oddziaływania π - π mogą decydować o braku powinowactwa LAW do tych leków.

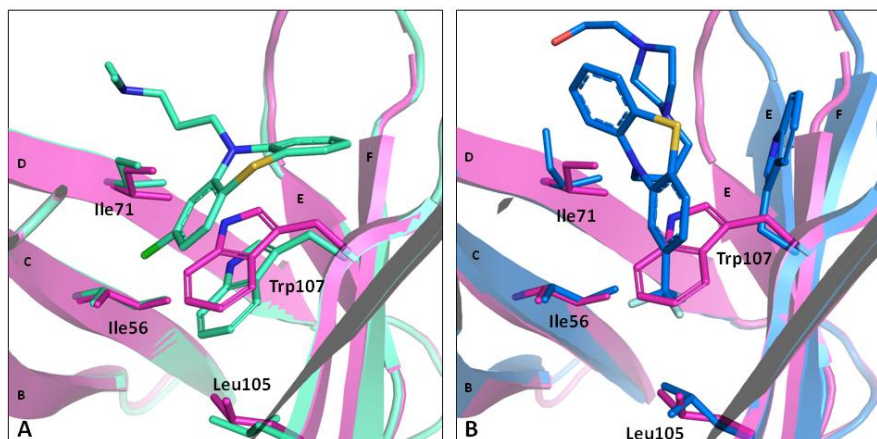
5.3.4. Wiązanie pochodnych fenotiazyny

Testowane pochodne fenotiazyny tj. chloropromazyna (CPZ) oraz flufenazyna (FLU) zostały związane w β -baryłce LAW, FAW oraz FA71W co pokazuje, że te leki mają odpowiednią geometrię aby dopasować się do różnych kształtów kieszeni wiążących. Dane zebrane w **Tabeli 1** również pokazują, że największa liczba struktur krystalicznych kompleksów białkowych zdeponowanych w PDB odnosi się do kompleksów z chloropromazyną. Jednak do tej pory nie ma żadnych struktur kompleksów białkowych z flufenazyną, co pokazuje że wyznaczone przez mnie struktury po raz pierwszy określają konformację tego liganda w kompleksie z cząsteczką białka oraz są dobrym uzupełnieniem dla wyników wiązania związków fenotiazynowych do białek otrzymanych dla badań roztworze (Nishi et al. 2011) (J. I. Loch et al. 2018).

Chloropromazyna jako jedyny z testowanych w tej pracy leków, był wykorzystywany w badaniach oddziaływania wariantów BLG z ligandami (J. I. Loch et al. 2018). Badania te wskazywały na stereoselektywne wiązanie tego leku przez warianty LA, LAF, FA oraz FAF. Oba chiralne konformery zostały już wcześniej rozpoznane w strukturze krystalicznej chloropromazyny (McDowell 1969). Analiza struktur kompleksów LAW-CPZ oraz LAW-FLU pokazała, że ligandy te ze względu na sztywny układ fenotiazynowy wymuszają zmiany konformacyjne w białku. W kompleksie LAW-CPZ Trp107 został przesunięty w głąb baryłki i przyjął konformację, aby aromatyczny pierścień benzenowy z przyłączonym atomem chloru znajdował się bezpośrednio nad pierścieniem indolowym (**Rysunek 45 A**). Dzięki temu ligand stabilizowany był przez oddziaływania π - π . Analiza struktur kompleksu LAW-CPZ potwierdziła wcześniejsze badania (J. I. Loch et al. 2018), w których wykazano, że warianty zawierające mutacje F105L preferują wiązanie konformera (α S)CPZ. Ten sam konformer został związany w wariacie A ludzkiej α 1-kwaśnej glikoproteiny (Nishi et al. 2011). Struktury krystaliczne pochodnych fenotiazyny, pokazują że sztywny, hydrofobowy fragment trójcykliczny odpowiada za niezwykle właściwości tych związków, w tym za ściśle upakowanie cząsteczek w komórce elementarnej kryształu (Petrus et al. 2015).

Flufenazyna jeszcze silniej niż chloropromazyna wymusiła zmiany konformacyjne w LAW. Łańcuch boczny Trp107, który w formie apo skierowany był do wnętrza baryłki został obrócony w kierunku wejścia do baryłki, wzdłuż nici G. Dzięki temu powstała odpowiednia przestrzeń dla trójcyklicznego fragmentu leku, który związał się równolegle do osi baryłki (**Rysunek 45 B**).

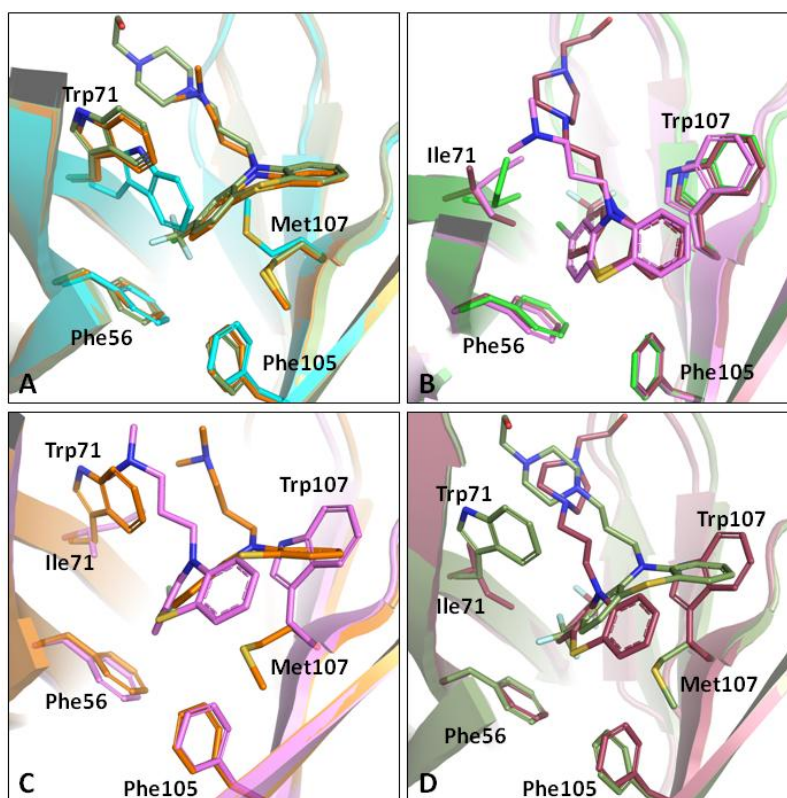
Dodatkowo, związany lek wymusił zmianę konformacyjną Ile71 aby zwiększyć przestrzeń dla leku. Preferowanym konformerem flufenazyny był *aR*-konformer (**Rysunek 45 B**).



Rysunek 45. Porównanie struktury formy apo wariantu LAW (kolor różowy) z (A) kompleksem LAW-CPZ (kolor zielony) oraz (B) LAW-FLU (kolor niebieski).

W kompleksach FA71W-CPZ oraz FA71W-FLU fragmenty fenotiazynowe położone są praktycznie w tym samym miejscu we wnętrzu β -baryłki. Porównując te struktury z formą FA71W bez liganda zauważyć można, że wiązanie cząsteczki leku wiąże się ze zmianą konformacyjną Met107 oraz Trp71 (**Rysunek 46 A**). W kompleksach z FAW nie zauważono żadnych znaczących zmian, co świadczy o tym, że kieszeń wiążąca tego wariantu generuje przestrzeń wystarczającą dla związania tych związków (**Rysunek 46 B**). Porównując położenie chloropromazyny w strukturze kompleksów z FAW oraz FA71W (**Rysunek 46 C**) zauważyć można, że podstawienie dużego aromatycznego aminokwasu (tryptofanu) po przeciwległych stronach baryłki tj. w pozycji 107 oraz 71 skutkuje przesunięciem liganda w kierunku przeciwnym do dużego łańcucha bocznego tryptofanu tj. w kompleksie FAW-CPZ ligand przesunięty jest w kierunku nici B, C, D, natomiast w kompleksie FA71W-CPZ w kierunku przeciwnych nici E, F, G. Podobna sytuacja ma miejsce dla kompleksów z flufenazyną (**Rysunek 46 D**). Preferowanym konformerem chloropromazyny jest (*aS*)CPZ. Natomiast warianty FAW oraz FA71W związały w β -baryłce (*aS*)-konformer flufenazyny, co sugeruje, że flufenazyna przyjmuje konformację komplementarną do kształtu kieszeni wiążącej.

Porównując kompleksy nowych wariantów BLG z flufenazyną oraz chloropromazyną z kompleksami dla ligandów takich jak amitryptylina, klomipramina czy doksepina, można zauważyć, że wiązanie sztywnego układu fenotiazynowego wywołuje większe re-aranżacje łańcuchów bocznych wewnątrz β -baryłki, niż akomodacja bardziej elastycznych ligandów z grupy 1 i 2. Można więc stwierdzić, że w wypadku kompleksów z flufenazyną oraz chloropromazyną to ligand wymusza położenie łańcuchów bocznych i powoduje dostosowanie kształtu kieszeni do swojej geometrii, a nie odwrotnie: to nie wyjściowy kształt kieszeni decyduje o powinowactwie do FLU czy CPZ, tak jak w przypadku kompleksów z AMT, CLO czy DOX (**Rozdział 5.3.2**).



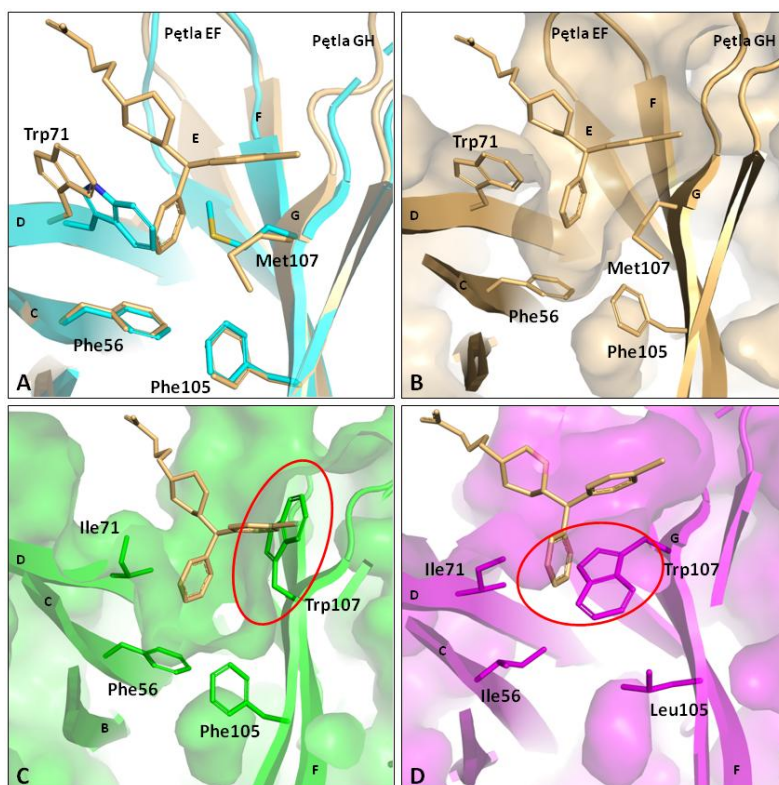
Rysunek 46. (A) Porównanie struktury formy apo wariantu FA71W (kolor niebieski) z kompleksami FA71W-CPZ (kolor pomarańczowy) i FA71W-FLU (kolor zielony). (B) Porównanie struktury formy apo wariantu FAW (kolor zielony) z kompleksami FAW-CPZ (kolor różowy) i FAW-FLU (kolor brązowy). Nałożenie struktur kompleksów FAW oraz FA71W z (C) chloropromazyną oraz (D) flufenazyną

5.3.5. Selektywne wiązanie cetyryzyny w kieszeni wiążącej FA71W

W kompleksie FA71W-CET na mapie gęstości elektronowej bardzo dobrze widoczna była gęstość wskazująca na pozycję atomu chloru, a tym samym pokazująca, że w kieszeni związana została (L)-cetyryzyna. W kompleksie cetyryzyny z końską albuminą osocza (ESA) w obu miejscach wiązania pozycja atomu Cl nie była jednoznaczna (Handing et al. 2016).

Porównanie formy apo FA71W ze strukturą kompleksu FA71W-CET wykazały, że tak jak w innych kompleksach FA71W, fragment aromatyczny leku zlokalizowany jest nad Met107, która zmienia swoją konformację. Dodatkowo reszta Trp71 ulega przesunięciu wzdłuż nici D, tak aby zwiększyć przestrzeń w baryłce dla liganda. Długi łańcuch alifatyczny cetyryzyny skierowany jest ku wejściu do baryłki w pobliżu pętli EF (**Rysunek 47 A**). Porównując strukturę kompleksu FA71W-CET z formami bez liganda wariantów LAW oraz FAW, zauważyć można że ligand idealnie dopasowuje się do kształtu kieszeni wiążącej FA71W. Jeden z pierścieni benzenowych zlokalizowany jest głębiej w kieszeni wiążącej, we wnęce utworzonej przez Trp71, Met107, Phe105 oraz Phe56, natomiast drugi pierścień z przyłączonym atomem chloru zajmuje obszar nad Met107 w pobliżu pętli GH (**Rysunek 47 B**). W formie apo wariantu FAW, duży łańcuch boczny Trp107 skierowany jest ku wejściu do baryłki i tym samym tworzy zawadę steryczną dla pierścienia benzenowego z atomem chloru cetyryzyny (**Rysunek 47 C**), natomiast

w wariantcie LAW, ta sama reszta, skierowana ku dolnej części kieszeni wiążącej ogranicza przestrzeń dla drugiego pierścienia benzenowego leku (**Rysunek 47 D**). Analiza tych struktur wykazała, że duży łańcuch boczny (np. tryptofan) w pozycji 107 uniemożliwia związanie cetyryzyny. FA71W-CET jest pierwszą strukturą lipokaliny z tym ligandem. Wyniki te wskazują, że wariant FA71W jest wysoce selektywny względem tego leku

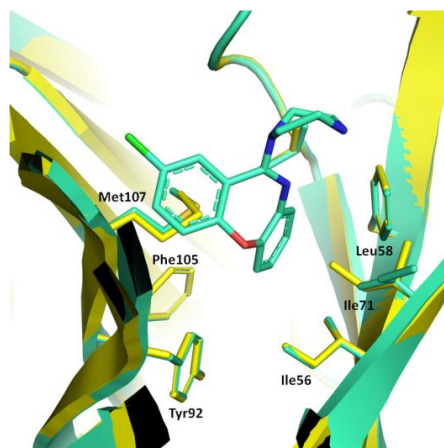


Rysunek 47. (A) Porównanie struktury formy apo wariantu FA71W (kolor niebieski) z kompleksem FA71W-CET (kolor beżowy). (B) Kształt kieszeni wiążącej FA71W w kompleksie z cetyryzyną. Porównanie położenia cetyryzyny (kolor beżowy) w kieszeni wiążącej wariantu (C) FAW oraz (D) LAW.

5.3.6. Wiązanie amoksapiny do wariantu 58F/92Y

Analizując otrzymaną strukturę kompleksu 58F/92Y-AMX nie zauważono znaczących zmian pomiędzy formą 58F/92Y bez liganda, a strukturą kompleksu z amoksapiną. Zmianie uległa jedynie konformacja Ile71, która w formie apo skierowana była do wnętrza baryłki, natomiast w kompleksie z ligandem została odwrócona w stronę nici D (**Rysunek 48**). Niewielki rozmiar amoksapiny w porównaniu do pozostałych testowanych ligandów (**Rysunek 10**) może być kluczowy w procesie wiązania ligandów do wariantu 58F/92Y. Obecność tego leku potwierdzono też w kompleksie z mutantem FA71W. Jak przedstawiono w **Rozdziale 5.3.3.** związanie liganda spowodowało zmiany konformacyjne Trp71 oraz Met107, gdyż w tym wariantcie w miejscu wiążącym było na tyle miejsca, aby zmiany te zaszły. Wcześniejsze badania pokazały, że konformacja łańcucha bocznego Met107 zależy od obecności liganda w baryłce (J. Loch et al. 2011) (Sawyer & Kontopidis 2000), co potwierdziły inne badania struktury pojedynczego

mutanta L58F z tetrakainą (PDP id: 7BF7) (J. I. Loch et al. 2021). W kompleksie 58F/92Y-AMX ligand dopasował się do kieszeni wiążącej nie wywołując zmian w konformacji Met107. Może to sugerować, że w odróżnieniu do pozostałych badanych wariantów BLG, kieszeń wiążąca wariantu 58F/92Y jest mniej elastyczna, przez co nie może dopasować się do geometrii liganda. Brak struktur z innymi ligandami wariantu 58F/92Y potwierdza, że mutacje w 58F/92Y zlokalizowane są w sposób, uniemożliwiający zmiany konformacyjne, pozwalające na „elastyczną” adaptację kieszeni wiążącej do kształtu liganda. Mutant 58F/92Y akceptuje więc jedynie cząsteczki, które pasują kształtem i rozmiarem do architektury kieszeni wiążącej.



Rysunek 48. Porównanie struktury formy apo wariantu 58F/92Y (kolor zielony) z kompleksem 58F/92Y-AMX (kolor żółty).

5.3.7. Zależność pomiędzy typem mutacji, a selektywnością wiązania

Modyfikacje w rejonie kieszeni wiążącej mogą znacząco wpływać nie tylko na stabilność białka, ale przede wszystkim na powinowactwo białka do ligandów (Bonarek et al. 2020). Analiza struktur ujawniła, że najbardziej obiecującymi wariantami wiążącymi małowcząsteczkowe ligandy z układami aromatycznymi są warianty oparte na podwójnym mutancie I56F/L39A tj. FAW oraz FA71W. Szczególnie interesująca jest budowa kieszeni wiążącej FAW, w której Trp107 przyjmuje konformację przylegającą do nici G, a Ile71 ma łańcuch skierowany ku nici D. Dzięki temu tworzy się odpowiednia przestrzeń dla aromatycznych układów leków. Taka budowa pozwala sugerować, że FAW jest idealnym kandydatem do dalszych badań nad selektywnością i specyficznością wiązania leków trójcyklicznych, zwłaszcza leków z grupy 1 (**Tabela 10**).

Wprowadzenie dużego, aromatycznego łańcucha bocznego fenyloalaniny w pozycji 56 skraca kieszeń wiążącą FAW oraz FA71W, dzięki czemu nowe białko traci zdolność wiązania kwasów tłuszczowych. Dodatkowo, wprowadzenie tryptofanu po przeciwległych stronach baryłki w pozycji 71 (nić D) bądź 107 (nić G) sprzyja stabilizacji wiązania liganda poprzez oddziaływania π - π . W natywnej formie BLG wiązanie alifatycznych ligandów, np. kwasu palmitynowego skutkowało zmianami konformacyjnymi Met107 oraz Phe105 (Sawyer & Kontopidis 2000). Podobne zmiany zauważono w kompleksach BLG z retinolem (G. Kontopidis

et al. 2002). Wyznaczone struktury krystaliczne nowych wariantów BLG z ligandami (**Tabela 4, 5, 6**) wykazały, że większość z mutantów posiada swoisty mechanizm dostosowania miejsca wiązania do geometrii cząsteczki liganda. Głównie zaangażowane w to były reszty w górnej części baryłki w pozycji 71 (Ile, Trp) oraz 107 (Met, Trp). Skrócenie kieszeni wiążącej sprawiło, że łańcuchy boczne aminokwasów znajdujących się w środkowej części baryłki, tj. Phe56 oraz Phe105 nie odgrywały tak istotnej roli w wiązaniu ligandów, jak w kompleksach natywnej formy białka z alifatycznymi ligandami (G. Kontopidis et al. 2002) (Sawyer & Kontopidis 2000).

5.4. Nowe warianty BLG jako selektywne i specyficzne transportery leków

Wcześniejsze badania pokazują, że natywna BLG może wiązać i transportować różne hydrofobowe ligandy (Berino et al. 2019) (Ragona et al. 2000) (Dufour & Haertlé 1991). Wynika to ze struktury tej lipokaliny, w której głównym miejscem wiązania jest hydrofobowa β -baryłka o wydłużonym kształcie (Sakurai & Goto 2006). Jednak wiele badań wskazuje na inne alternatywne miejsca wiązania liganda (J. I. Loch et al. 2022) (Domínguez-Ramírez et al. 2013) (Xu et al. 2019) (M. C. Yang et al. 2008). Pomimo hipotetycznej transportowej funkcji β -laktoglobuliny, pełni ona też ważną rolę odżywczą, ponieważ zawiera znaczne ilości egzogennych aminokwasów niezbędnych do prawidłowego rozwoju człowieka (Shafaei et al. 2017). Ostatnie publikacje wskazują na potencjalną rolę BLG jako nośnika różnych ligandów, w tym leków. BLG może być nośnikiem kurkuminy, która wykazuje działanie przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i antyoksydacyjne (Sneharani et al. 2010), kwasu foliowego (Liang & Subirade 2010) czy też może pełnić rolę transportera związków przeciwcukrzycowych (Mehraban et al. 2013).

Rekombinowane białka są rosnącą grupą innowacyjnych środków terapeutycznych (Sauna et al. 2017). Zastosowanie ukierunkowanej mutagenyzy pozwala na modyfikację kieszeni wiążącej, tak aby dostosować ją do wiązania określonej grupy związków. Przedstawione w tej pracy nowe warianty BLG, szczególnie FAW oraz FA71W wydają się obiecującymi nośnikami leków. Mogą one też zostać potencjalnie wykorzystane w systemach dializy pozaustrojowej, jako cząsteczki wspomagające odtruwanie organizmu. Jednak, aby nowe warianty mogły być zastosowane w ten sposób, muszą posiadać powinowactwo do leków takie samo lub większe niż białka osocza, z którymi leki trójcykliczny się wiążą. Ten warunek spełniają kompleksy wariantów FAW, LAW, a także FA71W z flufenazyną oraz chlorpromazyną (**Tabela 9**).

Zmodyfikowanie kieszeni wiążącej pozwoliło na otrzymanie nowych wariantów BLG wykazujących selektywność i specyficzność do określonej grupy trójcyklicznych leków. Wariant FAW charakteryzował się najmniejszą selektywnością wiążąc prawie wszystkie testowane ligandy, natomiast wariant LAW był selektywny względem ligandów z układem fenotiazynowym. Oba warianty FAW oraz FA71W posiadają unikalną kombinację właściwości,

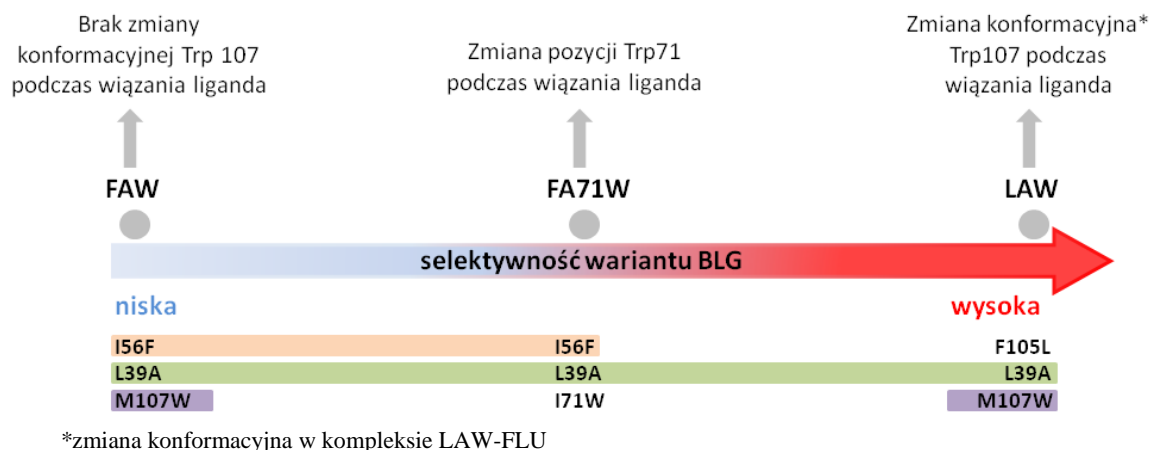
które mogą stanowić świetną bazę do dalszych badań nad selektywnością wiązania ligandów. Wadą tych mutantów jest jednak obniżona termostabilność w porównaniu do dzikiej formy białka (WT) (**Tabela 2**). Zwiększenie stabilności tych wariantów wymaga dalszej pracy, co pozwoli zwiększyć prawdopodobieństwo ich potencjalnego zastosowania w medycynie.

6. Wnioski

1. Selektywność wiązania ligandów przez nowe warianty BLG zawierające resztę Trp w zmodyfikowanej kieszeni wiążącej jest determinowana przede wszystkim wyjściowym kształtem kieszeni w formie apo. Na ten kształt wpływa głównie pozycja i konformacja tryptofanu, który był obecny w pozycji 107 (FAW, LAW) oraz w pozycji 71 (FA71W). Obecność pozostałych mutacji w analizowanych wariantach FAW oraz FA71W, tj. L39A oraz I56F, w mniejszym stopniu wpływa na selektywność, gdyż z dwóch mutantów, FAW oraz FA71W, bardziej selektywny jest FA71W, w którym to wyjściowa pozycja Trp71 decyduje o preferencjach wiązania liganda. Oba mutanty LAW i FAW mają taką samą mutację L39A, resztę Trp w pozycji 107 oraz różne podstawienia w pozycjach 56 (I56F, FAW) oraz 105 (F105L, LAW). Dla tych dwóch wariantów o specyficzności bardziej decyduje mutacja w pozycji 105, gdyż obecność Leu105 w LAW wymusza inną konformację Trp107 w formie apo, co przekłada się na późniejszą zdolność akomodacji trójpierścieniowych ligandów. Na podstawie analizy otrzymanych wyników można stwierdzić, że:

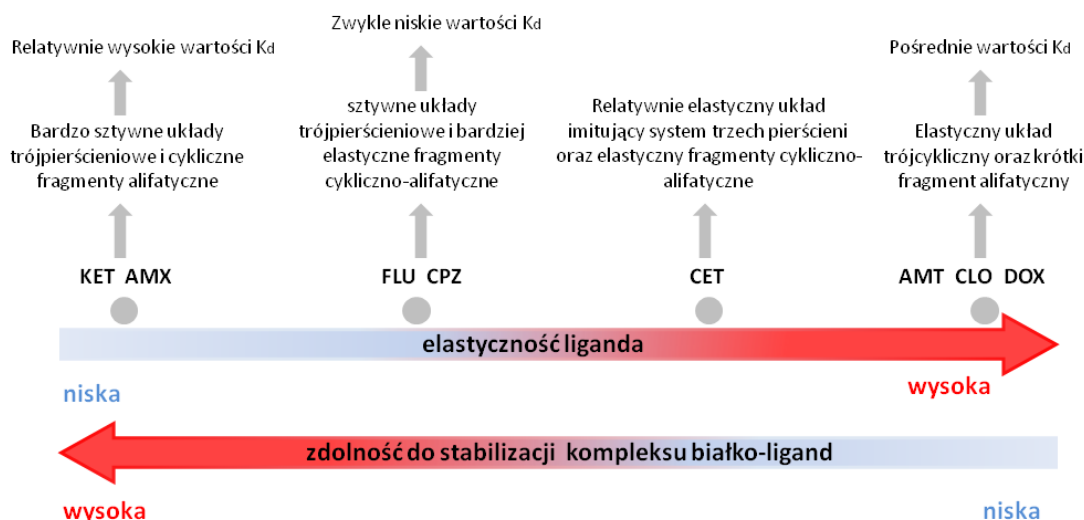
- a) Najmniej selektywny, a więc posiadający zdolność akomodacji niemal całej gamy leków testowanych w ramach tej pracy jest wariant FAW (**Rysunek 49**); podczas wiązania leków do FAW nie obserwuje się zmiany konformacji łańcucha bocznego Trp107; kieszeń wiążąca w swojej pierwotnej geometrii jest więc zdolna do akomodacji pojedynczej cząsteczki leku właściwie niezależnie od jego geometrii (rozmiaru i kształtu); wyjątkiem od tych obserwacji, były zmiany konformacyjne zmiany Trp107, które opisano wcześniej w kompleksach FAW z dezypraminą (J. I. Loch et al. 2022); zmiany te zmieniły też ilość cząsteczek liganda związanych do dimeru FAW, jednak dla ligandów testowanych w ramach tej pracy, podobnych zmian nie zaobserwowano.
- b) Najbardziej selektywnym wariantem okazał się wariant LAW (**Rysunek 49**), który wiązał jedynie fenotiazyny: flufenazynę oraz chloropromazynę; wysoka selektywność związana była również z kształtem kieszeni wiążącej w formie apo LAW, w której wyjściowa pozycja Trp107 znacznie spłaszczała miejsce wiążące i blokowała dostęp do hydrofobowej części β -baryłki; do kieszeni wiążącej w tej postaci dopasowana kształtem była jedynie chloropromazyna ze względu na obecność chloru oraz sztywnego układu trzech pierścieni; związanie znacznie większego układu trójpierścieniowego FLU, z przyłączoną grupą $-CF_3$ wymagało zmiany konformacyjnej Trp107; pozostałe ligandy miały zbyt elastyczny układ trójpierścieniowy (grupa 1, CET) lub kształt, który nie odpowiadał rozmiarom miejsca wiążącego.

- c) Wariant FA71W, wykazywał selektywność pośrednią pomiędzy LAW and FAW (**Rysunek 49**); wiązanie ligandów do tego wariantu wymagało nieznacznej zmiany pozycji, ale bez zmiany konformacji łańcucha bocznego Trp71; taka zmiana generowana była obecnością relatywnie sztywnego układu trójpierścieniowego liganda (kryterium to spełniały ligandy z grupy 2, 3 oraz CET); ligandy z grupy pierwszej (AMT, CLO, DOX), które są elastyczne i łatwo zmieniają konformację, nie są na tyle sztywne, aby być stabilnie związane we wnętrzu baryłki i są eliminowane przez wariant FA71W.



Rysunek 49. Schemat przedstawiający wnioski dotyczące selektywności wiązania nowych wariantów BLG. Kierunek strzałki oraz kolor czerwony określają warianty o największej selektywności, natomiast kolor niebieski o najmniejszej selektywności. Poniżej strzałki przedstawiono mutacje, które obecne są w danym wariantach, tj. mutacja L39A (kolor zielony) występuje we wszystkich wariantach, mutacja I56F w mutantach FAW, FA71W (kolor pomarańczony), mutacja M107W (kolor fioletowy) w wariantach FAW, LAW, mutacja I71W tylko w FA71W oraz mutacja F105L tylko w LAW.

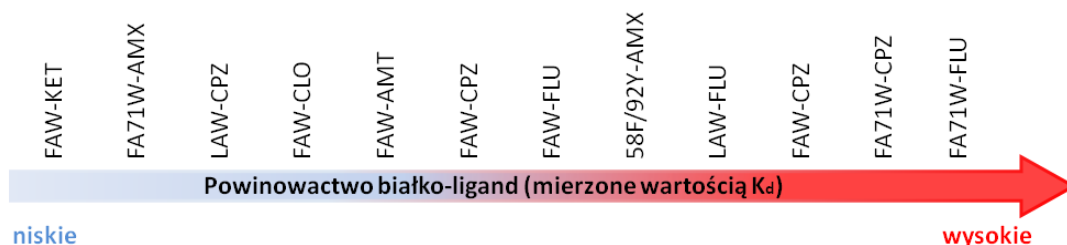
2. Elastyczność, a więc zdolność do swobodnej zmiany konformacji układu trójpierścieniowego liganda, decyduje o zdolności akomodacji i stabilizacji w β -baryłce wariantów o płytkim miejscu wiążącym w formie apo (FA71W, LAW) (**Rysunek 50**). Wniosek ten potwierdzają obserwacje oddziaływania fenotiazyn (CPZ, FLU) z wariantami LAW, FAW oraz FA71W. Sztywne układy fenotiazynowe zdecydowanie trudniej zmieniają konformację układu trójpierścieniowego (Dutkiewicz et al. 2010), niż elastyczne układy amitryptyliny (AMT), klomipraminy (CLO) i doksepiny (DOX), które fluktuują w sposób ciągły pomiędzy konformacją wygiętą, łódkową i krzesłkową (Bindya et al. 2007). Sztywne ligandy fenotiazynowe lokują się więc łatwo w dużej kieszeni wiążącej wariantu FAW, a także mają zdolność do stabilizacji zmian pozycyjnych lub konformacyjnych Trp w wariantach FA71W oraz LAW, tworząc kompleksy z tymi wariantami w fazie krystalicznej. Ligandy, które w centrum układu trójpierścieniowego posiadają pierścień dibenzocykloheptadienowy (tj. AMT, CLO) lub są pochodnymi dibenzoksepin (DOX), tworzą kompleksy w fazie krystalicznej tylko z tym wariantem (FAW), w którym wiązaniu liganda nie towarzyszą znaczne zmiany pozycyjne i konformacyjne reszt aminokwasowych, a sztywność liganda nie jest wymagana do stabilizacji kompleksu białko-ligand.



Rysunek 50. Schemat przedstawiający wnioski dotyczące elastyczności konformacyjnej ligandów, a tym samym ich zdolności do stabilizacji kompleksów białko-ligand. Kierunek strzałki oraz kolor czerwony określają ligandy o największej elastyczności oraz największej zdolności do stabilizacji struktury kompleksów.

Dla ligandów z grupy 2, czyli ketotifenu (KET) oraz amoksapiny (AMX), zdolność akomodacji w miejscu wiążącym jest determinowana przez dwa czynniki, tj. sztywność układu trójcyklicznego, która stabilizuje zmiany pozycyjne w cząsteczce białka (kompleksy FA71W-AMX, FA71W-KET) oraz geometrię kieszeni wiążącej liganda, która musi być dopasowana zarówno do kształtu układu trójcyklicznego jak i do położenia cyklicznego fragmentu liganda, który jest sztywno związany z układem trójcyklicznym i nie ma możliwości swobodnej zmiany konformacji (kompleksy FAW-KET, FA71W-AMX, FA71W-KET a także 58F/92Y-AMX).

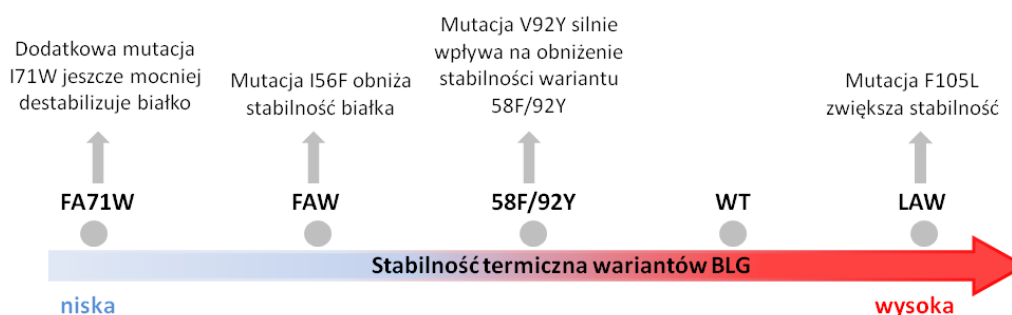
3. Powinowactwo wiązania liganda przez białko mierzona wartością K_d nie zależy systematycznie od typu mutanta, czy rodzaju liganda, jest natomiast indywidualną właściwością wybranej pary białko-ligand, zależną od typu i ilości oddziaływań specyficznych/niespecyficznych pomiędzy ligandem a białkiem, a także komplementarności kształtu kieszeni wiążącej i liganda (**Rysunek 51**).



Rysunek 51. Schemat przedstawiający wnioski dotyczące powinowactwa wiązania ligandów dla kompleksów białko-ligand. Kierunek strzałki oraz kolor czerwony określają pary białko-ligand o najwyższej stałej K_d .

Najwyższe powinowactwo odnotowano jednak dla tych kompleksów białko-ligand (pary FA71W-FLU, FA71W-CPZ), w których potwierdzono obecność relatywnie specyficznych oddziaływań R-Cl $\cdots\pi$ oraz R-CF $_3\cdots\pi$ (Imai et al. 2008) przy jednoczesnej obecności oddziaływań $\pi\cdots\pi$ (*edge-to-face*) pomiędzy cząsteczką liganda a resztami białka.

4. Na stabilność termiczną nowych wariantów BLG silny wpływ mają mutacje wprowadzone w środkowej części β -baryłki; mutacje I56F oraz V92Y silnie obniżają stabilność białka. Zastąpienie Phe107 leucyną wpływa stabilizująco na białko i zwiększa jego temperaturę denaturacji (**Rysunek 52**).



Rysunek 52. Schemat przedstawiający wnioski dotyczące stabilności termicznej nowych wariantów BLG. Kierunek strzałki oraz kolor czerwony określają warianty o najwyższej stabilności.

Wprowadzenie reszt alifatycznych takich jak leucyna w miejsce dużych aromatycznych aminokwasów w środkowej części baryłki znacznie zwiększa stabilność białka; zamiana alifatycznych reszt aminokwasowych na duże, sztywne, aromatyczne aminokwasy obniża temperaturę denaturacji białka.

7. Podsumowanie

W czasie badań prowadzonych na potrzeby tej pracy:

- wykonałam ok. 112 hodowli bakteryjnych na dużą skalę (1L) w celu ekspresji nowych wariantów BLG;
- wykonałam ok. 52 cykli oczyszczania białek (chromatografia jonowymienna oraz sączenie molekularne);
- wykonałam ok. 136 elektroforez SDS-PAGE;
- nastawiłam ok. 948 kropli krystalizacyjnych w celu ko-krystalizacji nowych wariantów BLG z testowanymi lekami;
- wykonałam 55 niskotemperaturowych pomiarów dyfraktometrycznych, w tym wyznaczyłam 17 struktur kompleksów nowych wariantów BLG z lekami oraz 22 struktury bez liganda;
- wykonałam 37 pomiarów ICD w celu wyznaczenia przybliżonych wartości K_d .

8. Bibliografia

- Abdul, Malik, Javed Masood, Abdullah M Asiri, and Rizwan Hasan. 2014. "Study on the Interaction between Amphiphilic Drug and Bovine Serum Albumin : A Thermodynamic and Spectroscopic Description." *Journal of Luminescence* 155: 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.06.009>.
- Achatz, S., A. Jarasch, and A. Skerra. 2022. "Structural Plasticity in the Loop Region of Engineered Lipocalins with Novel Ligand Specificities, so-Called Anticalins." *Journal of Structural Biology: X* 6: 100054. <https://doi.org/10.1016/j.yjsbx.2021.100054>.
- Agudelo, Daniel, Marc Beauregard, Gervais Bérubé, and Heidar Ali Tajmir-Riahi. 2012. "Antibiotic Doxorubicin and Its Derivative Bind Milk β -Lactoglobulin." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 117: 185–92. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.09.014>.
- Al-Shabib, Nasser Abdulatif, Javed Masood Khan, Ajamaluddin Malik, Md Tabish Rehman, Mohamed F. AlAjmi, Fohad Mabood Husain, Malik Hisamuddin, and Nojood Altwaijry. 2020. "Molecular Interaction of Tea Catechin with Bovine β -Lactoglobulin: A Spectroscopic and in Silico Studies." *Saudi Pharmaceutical Journal* 28 (3): 238–45. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.01.002>.
- Albrecht, Valerie, Antonia Richter, Sarah Pfeiffer, Michaela Gebauer, Simon Lindner, Eugenie Gieser, Ulrich Schüller, et al. 2016. "Anticalins Directed against the Fibronectin Extra Domain B as Diagnostic Tracers for Glioblastomas." *International Journal of Cancer* 138 (5): 1269–80. <https://doi.org/10.1002/ijc.29874>.
- Allenmark, Stig. 2003. "Induced Circular Dichroism by Chiral Molecular Interaction." *Chirality* 15 (5): 409–22. <https://doi.org/10.1002/chir.10220>.
- Ascoli, Giorgio, Carlo Bertucci, and Piero Salvadori. 1995. "Stereospecific and Competitive Binding of Drugs to Human Serum Albumin: A Difference Circular Dichroism Approach." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84 (6): 737–41. <https://doi.org/10.1002/jps.2600840615>.
- Banerjee, Tuhina, Sreelekha K. Singh, and Nand Kishore. 2006. "Binding of Naproxen and Amitriptyline to Bovine Serum Albumin: Biophysical Aspects." *Journal of Physical Chemistry B* 110 (47): 24147–56. <https://doi.org/10.1021/jp062734p>.
- Baral, Pravas Kumar, Mridula Swayampakula, Manoj Kumar Rout, Nat N.V. Kav, Leo Spyropoulos, Adriano Aguzzi, and Michael N.G. James. 2014. "Structural Basis of Prion Inhibition by Phenothiazine Compounds." *Structure* 22 (2): 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.11.009>.
- Barinka, Cyril, Jakub Ptacek, Antonia Richter, Zora Novakova, Volker Morath, and Arne Skerra. 2016. "Selection and Characterization of Anticalins Targeting Human Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)." 1–11. <https://doi.org/10.1093/protein/gzv065>.
- Batt, Carl A., John Brady, and Lindsay Sawyer. 1994. "Design Improvements of β -Lactoglobulin." *Trends in Food Science and Technology* 5 (8): 261–65. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0924-2244(94)90019-1).
- Bekale, L., P. Chanphai, S. Sanyakamdhorn, D. Agudelo, and H. A. Tajmir-Riahi. 2014. "Microscopic and Thermodynamic Analysis of PEG- β -Lactoglobulin Interaction." *RSC Advances* 4 (59): 31084–93. <https://doi.org/10.1039/c4ra03303e>.
- Bello, Martiniano. 2020. "Structural Mechanism of the Tanford Transition of Bovine β -Lactoglobulin through Microsecond Molecular Dynamics Simulations." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 0 (0): 1–13. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1844062>.
- Berino, Romina P., Germán D. Báez, Griselda A. Ballerini, Emilce E. Llopert, Pablo A. Busti, Andrea Moro, and

- Néstor J. Delorenzi. 2019. "Interaction of Vitamin D3 with Beta-Lactoglobulin at High Vitamin/Protein Ratios: Characterization of Size and Surface Charge of Nanoparticles". *Food Hydrocolloids*. Vol. 90. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.027>.
- Berling, Ingrid, and Geoffrey K. Isbister. 2015. "Prolonged QT Risk Assessment in Antipsychotic Overdose Using the QT Nomogram." *Annals of Emergency Medicine* 66 (2): 154–64. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2014.12.005>.
- Bernard Testa. 2013. "REVIEW Organic Stereochemistry." *Helvetica Chimica Acta* 96.
- Bertucci, Carlo, Marco Pistolozzi, and Angela De Simone. 2010. "Circular Dichroism in Drug Discovery and Development: An Abridged Review." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (1): 155–66. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3959-2>.
- Bhattacharyya, Jaya, and Kali P. Das. 2001. "Interactions of Chlorpromazine with Milk Proteins." *Molecular and Cellular Biochemistry* 221 (1–2): 11–15. <https://doi.org/10.1023/A:1010847621496>.
- Bijari, Nooshin, Sirous Ghobadi, and Katayoun Derakhshandeh. 2019. "β-Lactoglobulin-Irinotecan Inclusion Complex As a New Targeted Nanocarrier for Colorectal Cancer Cells." *Research in Pharmaceutical Sciences* 14 (3): 216–27. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.258488>.
- Bindya, S., Wing Tak Wong, M. A. Ashok, H. S. Yathirajan, and R. S. Rathore. 2007. "Amitriptylinium Picrate: Conformational Disorder." *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications* 63 (9): 546–48. <https://doi.org/10.1107/S0108270107037468>.
- Birch, Johnny, Sanaullah Khan, Mikkel Madsen, Christian Kjeldsen, Marie Sofie Møller, Emil G.P. Stender, Günther H.J. Peters, Jens Duus, Birthe B. Kragelund, and Birte Svensson. 2021. "Binding Sites for Oligosaccharide Repeats from Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides on Bovine β-Lactoglobulin Identified by NMR Spectroscopy." *ACS Omega* 6 (13): 9039–52. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00060>.
- Bonarek, Piotr, Joanna I. Loch, Magdalena Tworzydło, David R. Cooper, Katarzyna Milto, Paulina Wróbel, Katarzyna Kurpiewska, and Krzysztof Lewiński. 2020. "Structure-Based Design Approach to Rational Site-Directed Mutagenesis of β-Lactoglobulin." *Journal of Structural Biology* 210 (2): 107493. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107493>.
- Bragg, W H, and W L Bragg. 1913. "The Reflection of X-Rays by Crystals." *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* 88 (605): 428–38. <https://doi.org/10.1098/rspa.1913.0040>.
- Bree, Françoise, Laetitia Thiault, Gwenaëlle Gautiers, Margherita Strolin Benedetti, Eugène Baltes, Jean Pierre Rihoux, and Jean Paul Tillement. 2002. "Blood Distribution of Levocetirizine, a New Non-Sedating Histamine H1-Receptor Antagonist, in Humans." *Fundamental and Clinical Pharmacology* 16 (6): 471–78. <https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2002.00111.x>.
- Burin, Raquel, and Devendra H. Shah. 2021. "Phenelzine and Amoxapine Inhibit Tyramine and D-Glucuronic Acid Catabolism in Clinically Significant Salmonella in a Serotype-Independent Manner." *Pathogens* 10 (4). <https://doi.org/10.3390/pathogens10040469>.
- Buszman, Ewa, A. Beberok, R. Rózańska, and A. Orzechowska. 2008. "Interaction of Chlorpromazine, Fluphenazine and Trifluoperazine with Ocular and Synthetic Melanin in Vitro." *Pharmazie* 63 (5): 372–76. <https://doi.org/10.1691/ph.2008.7663>.

- C. B. Eap, C. Cuendet, P. Baumann. 1988. "Binding of Amitriptyline to to α 1 -Acid Glycoprotein and and Its Variants" 5880: 767–70.
- Chang, Yu Ming, Cammy K.M. Chen, and Ming Hon Hou. 2012. "Conformational Changes in DNA upon Ligand Binding Monitored by Circular Dichroism." *International Journal of Molecular Sciences* 13 (3): 3394–3413. <https://doi.org/10.3390/ijms13033394>.
- Chen, Vincent B., W. Bryan Arendall, Jeffrey J. Headd, Daniel A. Keedy, Robert M. Immormino, Gary J. Kapral, Laura W. Murray, Jane S. Richardson, and David C. Richardson. 2010. "MolProbity: All-Atom Structure Validation for Macromolecular Crystallography." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66 (1): 12–21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>.
- Chen, Zhen, and An Ping Zeng. 2016. "Protein Engineering Approaches to Chemical Biotechnology." *Current Opinion in Biotechnology* 42: 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.07.007>.
- Cho, Yunje, Carl A. Batt, and Lindsay Sawyer. 1994. "Probing the Retinol-Binding Site of Bovine β -Lactoglobulin." *Journal of Biological Chemistry* 269 (15): 11102–7. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)78097-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)78097-1).
- Cho, Yunje, Wei Gu, Steve Wakins, Sam Pin Lee, Tae Rak Kim, John W. Brady, and Carl A. Batt. 1994. "Thermostable Variants of Bovine β -Lactoglobulin." *Protein Engineering, Design and Selection* 7 (2): 263–83. <https://doi.org/10.1093/protein/7.2.263>.
- Collini, Maddalena, Laura D'Alfonso, Henriette Molinari, Laura Ragona, Maddalena Catalano, and Giancarlo Baldini. 2003. "Competitive Binding of Fatty Acids and the Fluorescent Probe 1-8-Anilino-naphthalene Sulfonate to Bovine β -Lactoglobulin." *Protein Science* 12 (8): 1596–1603. <https://doi.org/10.1110/ps.0304403>.
- Crowther, Jennifer M., Geoffrey B. Jameson, Alison J. Hodgkinson, and Renwick C.J. Dobson. 2016. "Structure, Oligomerisation and Interactions of β -Lactoglobulin." *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects*. <https://doi.org/10.5772/62992>.
- D'Alfonso, Laura, Maddalena Collini, and Giancarlo Baldini. 1999. "Evidence of Heterogeneous 1-Anilino-naphthalene-8-Sulfonate Binding to β -Lactoglobulin from Fluorescence Spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1432 (2): 194–202. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00105-3).
- Dartt, Darlene A. 2011. "Tear Lipocalin : Structure and Function." *The Ocular Surface* 9 (3): 126–38. [https://doi.org/10.1016/S1542-0124\(11\)70022-2](https://doi.org/10.1016/S1542-0124(11)70022-2).
- Davis, Bernard D., and Rene J. Dubos. 1947. "The Binding of Fatty Acids by Serum Albumin. A Protective Growth Factor in Bacteriological Media," no. 2: 215–28.
- Deuschle, Friedrich Christian, Elena Ilyukhina, and Arne Skerra. 2021. "Anticalin® Proteins: From Bench to Bedside." *Expert Opinion on Biological Therapy* 21 (4): 509–18. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1839046>.
- Dodero, Veronica Isabel, Zulma Beatriz Quirolo, and Maria Alejandra Sequeira. 2011. "Biomolecular studies by circular dichroism" *Frontiers in Bioscience* 16 (8000): 61–73.
- Domínguez-Ramírez, Lenin, Elizabeth Del Moral-Ramírez, Paulina Cortes-Hernández, Mariano García Garibay, and Judith Jiménez-Guzmán. 2013. " β -Lactoglobulin's Conformational Requirements for Ligand Binding at the Calyx and the Dimer Interphase: A Flexible Docking Study." *PLoS ONE* 8 (11): 1–13.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079530>.
- Dorothy Crowfoot Hodgkin, et al. 1957. "The Structure of Vitamin B12 I. An Outline of the Crystallographic Investigation of Vitamin B12." *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* 242: 228–63.
- Du, Ze-peng, Bing-li Wu, Xuan Wu, Xuan-hao Lin, Xiao-yang Qiu, Xiao-fen Zhan, Shao-hong Wang, et al. 2015. "OPEN A Systematic Analysis of Human Lipocalin Family and Its Expression in Esophageal Carcinoma." *Nature Publishing Group*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep12010>.
- Dufour, Eric, and Tomasz Haertlé. 1991. "Binding of Retinoids and β -Carotene to β -Lactoglobulin. Influence of Protein Modifications." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular* 1079 (3): 316–20. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(91\)90075-B](https://doi.org/10.1016/0167-4838(91)90075-B).
- Duo, Jia, Joanne Bruno, Alexander Kozhich, Donata David-Brown, Linlin Luo, Suk Kwok, Rasa Santockyte, et al. 2018. "Surface Plasmon Resonance as a Tool for Ligand-Binding Assay Reagent Characterization in Bioanalysis of Biotherapeutics." *Bioanalysis*. Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0271>.
- Dutkiewicz, Grzegorz, B. P. Siddaraju, H. S. Yathirajan, B. Narayana, and Maciej Kubicki. 2010. "The Crystal Structure of Fluphenazinium Dipicrate Dimethylsulphoxide Solvate." *Journal of Chemical Crystallography* 40 (11): 970–74. <https://doi.org/10.1007/s10870-010-9773-z>.
- Duyvesteyn, Helen M.E., Isaac Santos-Pérez, Francesca Peccati, Ane Martinez-Castillo, Thomas S. Walter, David Reguera, Felix M. Goñi, et al. 2021. "Bacteriophage PRD1 as a Nanoscaffold for Drug Loading." *Nanoscale* 13 (47): 19875–83. <https://doi.org/10.1039/d1nr04153c>.
- Fogolari, Federico, Elisabetta Moroni, Marcin Wojciechowski, Maciej Baginski, Laura Ragona, and Henriette Molinari. 2005. "MM/PBSA Analysis of Molecular Dynamics Simulations of Bovine β -Lactoglobulin: Free Energy Gradients in Conformational Transitions?" *Proteins: Structure, Function and Genetics* 59 (1): 91–103. <https://doi.org/10.1002/prot.20384>.
- Frapin, Danielle, Eric Dufour, and Tomasz Haertle. 1993. "Probing the Fatty Acid Binding Site of β -Lactoglobulins." *Journal of Protein Chemistry* 12 (4): 443–49. <https://doi.org/10.1007/BF01025044>.
- Futterman, S., and J. Heller. 1972. "The Enhancement of Fluorescence and the Decreased Susceptibility to Enzymatic Oxidation of Retinol Complexed with Bovine Serum Albumin, -Lactoglobulin, and the Retinol-Binding Protein of Human Plasma." *Journal of Biological Chemistry* 247 (16): 5168–72. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)44953-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)44953-3).
- Ge, Shuai, Xiangjun Wang, Yajing Hou, Yuexin Lv, Cheng Wang, and Huaizhen He. 2021. "Repositioning of Histamine H1 Receptor Antagonist: Doxepin Inhibits Viropexis of SARS-CoV-2 Spike Pseudovirus by Blocking ACE2." *European Journal of Pharmacology* 896 (76): 173897. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173897>.
- Gebauer, Michaela, and Arne Skerra. 2012. "Anticalins : Small Engineered Binding Proteins Based on the Lipocalin Scaffold. Protein Engineering for Therapeutics" Part B. 1st ed. Vol. 503. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396962-0.00007-0>.
- Ghalandari, Behafarid, Adeleh Divsalar, Mahbube Eslami-Moghadam, Ali Akbar Saboury, Thomas Haertlé, Massoud Amanlou, and Kazem Parivar. 2015. "Probing of the Interaction Between β -Lactoglobulin and the Anticancer Drug Oxaliplatin." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175 (2): 974–87. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1341-0>.

- Ghalandari, Behafarid, Adeleh Divsalar, Ali Akbar Saboury, and Kazem Parivar. 2014. "The New Insight into Oral Drug Delivery System Based on Metal Drugs in Colon Cancer Therapy through β -Lactoglobulin/Oxali-Palladium Nanocapsules." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 140: 255–65. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.08.003>.
- Ghalandari, Behafarid, Adeleh Divsalar, Ali Akbar Saboury, and Kazem Parivar. 2015. " β -Lactoglobulin Nanoparticle as a Chemotherapy Agent Carrier for Oral Drug Delivery System." *Journal of the Iranian Chemical Society* 12 (4): 613–19. <https://doi.org/10.1007/s13738-014-0519-2>.
- Gillard, Kyra, Heather B. Miller, and Meghan S. Blackledge. 2018. "Tricyclic Amine Antidepressants Suppress β -Lactam Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) by Repressing MRNA Levels of Key Resistance Genes." *Chemical Biology and Drug Design* 92 (5): 1822–29. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13361>.
- Godovac-Zimmermann, Jasminka, Amedeo Conti, Jone Liberatori, and Gerhard Braunitzer. 1985. "Homology between the Primary Structures of β -Lactoglobulins and Human Retinol-Binding Protein: Evidence for a Similar Biological Function?" *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 366 (1): 431–34. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1985.366.1.431>.
- Gomaa, A. I., F. Nsonzi, J. Sedman, and A. A. Ismail. 2016. "Enhanced Unfolding of Bovine β -Lactoglobulin Structure Using Microwave Treatment: A Multi-Spectroscopic Study." *Food Biophysics* 11 (4): 370–79. <https://doi.org/10.1007/s11483-016-9451-6>.
- Gottschalk, Michael, Kandadai Venu, and Bertil Halle. 2003. "Protein Self-Association in Solution: The Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor Decamer." *Biophysical Journal* 84 (6): 3941–58. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75122-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75122-4).
- Greenfield, Norma J. 1999. "Applications of Circular Dichroism in Protein and Peptide Analysis." *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 18 (4): 236–44. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(98\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(98)00112-5).
- Gutiérrez-Magdaleno, Gabriel, Martiniano Bello, M. Carmen Portillo-Téllez, Adela Rodríguez-Romero, and Enrique García-Hernández. 2013. "Ligand Binding and Self-Association Cooperativity of β -Lactoglobulin." *Journal of Molecular Recognition* 26 (2): 67–75. <https://doi.org/10.1002/jmr.2249>.
- Hadian, Mohammad, Seyed Mohammad Hashem Hosseini, Asgar Farahnaky, Gholam Reza Mesbahi, Gholam Hossein Yousefi, and Ali Akbar Saboury. 2016. "Isothermal Titration Calorimetric and Spectroscopic Studies of β -Lactoglobulin-Water-Soluble Fraction of Persian Gum Interaction in Aqueous Solution." *Food Hydrocolloids* 55: 108–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.006>.
- Handing, Katarzyna B., Ivan G. Shabalin, Karol Szlachta, Karolina A. Majorek, and Wladek Minor. 2016. "Crystal Structure of Equine Serum Albumin in Complex with Cetirizine Reveals a Novel Drug Binding Site." *Molecular Immunology* 71: 143–51. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.02.003>.
- Hawton, Keith, Helen Bergen, Sue Simkin, Jayne Cooper, Keith Waters, David Gunnell, and Navneet Kapur. 2010. "Toxicity of Antidepressants: Rates of Suicide Relative to Prescribing and Non-Fatal Overdose." *British Journal of Psychiatry* 196 (5): 354–58. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.109.070219>.
- Hegde, Ashwini H., B. Sandhya, Shankara S. Kalanur, and J. Seetharamappa. 2011. "Binding Mechanism of Bioactive Cetirizine Hydrochloride to Sudlow's Site I of Serum Albumins." *Journal of Solution Chemistry* 40 (2): 182–97. <https://doi.org/10.1007/s10953-010-9640-8>.
- Hodgkin, D C. 1949. "The X-Ray Analysis of the Structure of Penicillin." *Adv Sci.* 6 (22): 85–89.

- Hohlbaum, Andreas M, and Arne Skerra. 2007. "Anticalins ® : The Lipocalin Family as a Novel Protein Scaffold for the Development of next-Generation Immunotherapies," 491–501.
- Huang, Johnny X., Matthew A. Cooper, Mark A. Baker, Mohammad A.K. Azad, Roger L. Nation, Jian Li, and Tony Velkov. 2012. "Drug-Binding Energetics of Human α -1-Acid Glycoprotein Assessed by Isothermal Titration Calorimetry and Molecular Docking Simulations." *Journal of Molecular Recognition* 25 (12): 642–56. <https://doi.org/10.1002/jmr.2221>.
- Imai, Yumi N., Yoshihisa Inoue, Isao Nakanishi, and Kazuo Kitaura. 2008. "C1- π Interactions in Protein-Ligand Complexes." *Protein Science* 17 (7): 1129–37. <https://doi.org/10.1110/ps.033910.107>.
- Izadi, Zhila, Adeleh Divsalar, Ali Akbar Saboury, and Sawyer Lindsay. 2016. " β -Lactoglobulin-Pectin Nanoparticle-Based Oral Drug Delivery System for Potential Treatment of Colon Cancer." *Chemical Biology & Drug Design*, February. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12748>.
- J.I. Loch, Barciszewski Jakub, Śliwiak Joanna, Bonarek Piotr, Wróbel Paulina, Pokrywska Kinga, Shabalin G. Ivan, Minor Wladek, Jaskolski Mariusz, Lewiński Krzysztof. 2022. "New Ligand-Binding Sites Identified in the Crystal Structures of β -Lactoglobulin Complexes with Desipramine." *IUCrJ*, no. 9: 386–98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1107/S2052252522004183>.
- Jang, Hae Dong, and Harold E. Swaisgood. 1990. "Analysis of Ligand Binding and β -Lactoglobulin Denaturation by Chromatography on Immobilized Trans-Retinal." *Journal of Dairy Science* 73 (8): 2067–74. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78886-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78886-8).
- Jaya, Damien, Jean Charles Gaudin, Jean Marc Chobert, Tatiana V. Burova, Carl Holt, Iain McNae, Lindsay Sawyer, and Thomas Haertlé. 2004. "A Recombinant C121S Mutant of Bovine β -Lactoglobulin Is More Susceptible to Peptic Digestion and to Denaturation by Reducing Agents and Heating." *Biochemistry* 43 (20): 6312–21. <https://doi.org/10.1021/bi0362469>.
- Jing, Jiao Jiao, Bin Liu, Xin Wang, Xin Wang, Ling Ling He, Xue Yuan Guo, Ming Ling Xu, Qian Yu Li, Bo Gao, and Bo Yang Dong. 2017. "Binding of Fluphenazine with Human Serum Albumin in the Presence of Rutin and Quercetin: An Evaluation of Food-Drug Interaction by Spectroscopic Techniques." *Luminescence* 32 (6): 1056–65. <https://doi.org/10.1002/bio.3291>.
- Joosten, Robbie P., Krista Joosten, Garib N. Murshudov, and Anastassis Perrakis. 2012. "PDB-REDO: Constructive Validation, More than Just Looking for Errors." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 68 (4): 484–96. <https://doi.org/10.1107/S0907444911054515>.
- Kanba, Shigenobu, and Elliott Richelson. 1984. "Histamine H1 Receptors in Human Brain Labelled with [3 H]Doxepin." *Brain Research* 304 (1): 1–7. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90856-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90856-4).
- Kandagal, P. B., J. Seetharamappa, S. Ashoka, S. M.T. Shaikh, and D. H. Manjunatha. 2006. "Study of the Interaction between Doxepin Hydrochloride and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Techniques." *International Journal of Biological Macromolecules* 39 (4–5): 234–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.03.027>.
- Kanjarawi, Reem, Christophe Dercamp, Nathalie Etchart, Karine Adel-Patient, Jean François Nicolas, Bertrand Dubois, and Dominique Kaiserlian. 2011. "Regulatory T Cells Control Type i Food Allergy to Beta-Lactoglobulin in Mice." *International Archives of Allergy and Immunology* 156 (4): 387–96. <https://doi.org/10.1159/000323940>.
- Katakura, Yoshinori, Akio Ametani, Mamoru Totsuka, Shin Ya Nagafuchi, and Shuichi Kaminogawa. 1999.

- “Accelerated Secretion of Mutant β -Lactoglobulin in *Saccharomyces Cerevisiae* Resulting from a Single Amino Acid Substitution.” *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1432 (2): 302–12. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00099-0).
- Kazem-Farzandi, Najmeh, Asghar Taheri-Kafrani, and Thomas Haertle. 2015. “The Ala86Gln Mutant β -Lactoglobulin Has Increased Ligand Binding and Decreased Immunoreactivity Properties.” *International Journal of Biological Macromolecules* 81: 340–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.013>.
- Keppler, Julia K., Frank D. Sönnichsen, Peter Christian Lorenzen, and Karin Schwarz. 2014. “Differences in Heat Stability and Ligand Binding among β -Lactoglobulin Genetic Variants A, B and C Using ¹H NMR and Fluorescence Quenching.” *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1844 (6): 1083–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.02.007>.
- Kerr, Gary W., A. C. McGuffie, and S. Wilkie. 2001. “Tricyclic Antidepressant Overdose: A Review.” *Emergency Medicine Journal* 18 (4): 236–41. <https://doi.org/10.1136/emj.18.4.236>.
- Khan, Abbul Bashar, Javed Masood Khan, Mohd Sajid Ali, Rizwan Hasan Khan, and Kabir ud Din. 2011. “Spectroscopic Approach of the Interaction Study of Amphiphilic Drugs with the Serum Albumins.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 87 (2): 447–53. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.06.007>.
- Khatun, Samima, Riyazuddeen, and Faizan Abul Qais. 2020. “In-Vitro Binding Analysis of Bovine Serum Albumin with Sulindac/Chlorpromazine: Spectroscopic, Calorimetric and Computational Approaches.” *Journal of Molecular Liquids* 299: 112124. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112124>.
- Khorsand Ahmadi, Sabra, Maryam Mahmoodian Moghadam, Parisa Mokaberi, Mohammad Reza Saberi, and Jamshidkhan Chamani. 2015. “A Comparison Study of the Interaction between β -Lactoglobulin and Retinol at Two Different Conditions: Spectroscopic and Molecular Modeling Approaches.” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 33 (9): 1880–98. <https://doi.org/10.1080/07391102.2014.977351>.
- Kitaoka, Momoko, Wei Xiao, Qingliang Kong, Yoshiro Tahara, Noriho Kamiya, and Masahiro Goto. 2020. “A Solid-in-Oil Nanodispersion System for Transcutaneous Immunotherapy of Cow’s Milk Allergies.” *Pharmaceutics* 12 (3): 1–12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030205>.
- Klaver, Dominik, Beate Posch, Anita Geisler, Martin Hermann, Norbert Reider, and Christine Heufler. 2020. “Peptides from Allergenic Lipocalins Bind to Formyl Peptide Receptor 3 in Human Dendritic Cells to Mediate TH2 Immunity.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 145 (2): 654–65. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.07.008>.
- Klutznny, Saskia, Ralf Lesche, Matthias Keck, Stefan Kaulfuss, Andreas Schlicker, Sven Christian, Carolyn Sperl, et al. 2017. “Functional Inhibition of Acid Sphingomyelinase by Fluphenazine Triggers Hypoxia-Specific Tumor Cell Death.” *Cell Death and Disease* 8 (3): 1–15. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.130>.
- Koenig, Bernd W., Sven Schünke, Matthias Stoldt, and Dieter Willbold. 2012. “NMR Methods for the Determination of Protein-Ligand Interactions.” *Protein-Ligand Interactions* 44 (0): 71–98. <https://doi.org/10.1002/9783527645947.ch5>.
- Kontopidis, G., C. Holt, and L. Sawyer. 2004. “Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function.” *Journal of Dairy Science* 87 (4): 785–96. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73222-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1).
- Kontopidis, George, Carl Holt, and Lindsay Sawyer. 2002. “The Ligand-Binding Site of Bovine β -Lactoglobulin: Evidence for a Function?” *Journal of Molecular Biology* 318 (4): 1043–55.

- [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00017-7).
- Kowiel, Marcin, Mariusz Jaskolski, and Zbigniew Dauter. 2014. "ACHESYM: An Algorithm and Server for Standardized Placement of Macromolecular Models in the Unit Cell." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 70 (12): 3290–98. <https://doi.org/10.1107/S1399004714024572>.
- Kuwata, Kazuo, Seiichi Era, Masaru Hoshino, Vincent Forge, Yuji Goto, and Carl A. Batt. 2008. "Solution Structure and Dynamics of Bovine β -Lactoglobulin A." *Protein Science* 8 (11): 2541–45. <https://doi.org/10.1110/ps.8.11.2541>.
- Labra-Núñez, Alfonso, Luis Fernando Cofas-Vargas, Gabriel Gutiérrez-Magdaleno, Homero Gómez-Velasco, Annia Rodríguez-Hernández, Adela Rodríguez-Romero, and Enrique García-Hernández. 2021. "Energetic and Structural Effects of the Tanford Transition on Ligand Recognition of Bovine β -Lactoglobulin." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 699 (December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108750>.
- Laue, Max Von. 1915. "Concerning the Detection of X-Ray Interferences." *Nobel Lecture*, 347–55. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Concerning+the+detection+of+X-ray+interferences#0>.
- Leilabadi-Asl, Amineh, Adeleh Divsalar, Ali Akbar Saboury, and Kazem Parivar. 2018. "Probing the Interaction of Two Chemotherapeutic Drugs of Oxali-Palladium and 5-Fluorouracil Simultaneously with Milk Carrier Protein of β -Lactoglobulin." *International Journal of Biological Macromolecules* 112 (2017): 422–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.067>.
- Leis, David, Silvia Barbosa, David Attwood, Pablo Taboada, and Víctor Mosquera. 2002. "Influence of the PH on the Complexation of an Amphiphilic Antidepressant Drug and Human Serum Albumin." *Journal of Physical Chemistry B* 106 (35): 9143–50. <https://doi.org/10.1021/jp020761j>.
- Li, Ti, Peng Hu, Taotao Dai, Panying Li, Xiaoqin Ye, Jun Chen, and Chengmei Liu. 2018. "Comparing the Binding Interaction between β -Lactoglobulin and Flavonoids with Different Structure by Multi-Spectroscopy Analysis and Molecular Docking." *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 201 (2017): 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.011>.
- Li, Xiaohang, Qinying Wang, Tingting Hu, Ying Wang, Jian Zhao, Jing Lu, and Gang Pei. 2017. "A Tricyclic Antidepressant, Amoxapine, Reduces Amyloid- β Generation through Multiple Serotonin Receptor 6-Mediated Targets." *Scientific Reports* 7 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04144-3>.
- Liang, Li, and Muriel Subirade. 2010. " β -Lactoglobulin/Folic Acid Complexes: Formation, Characterization, and Biological Implication." *Journal of Physical Chemistry B* 114 (19): 6707–12. <https://doi.org/10.1021/jp101096r>.
- Liang, Li, and Muriel Subirade. 2012. "Study of the Acid and Thermal Stability of β -Lactoglobulin-Ligand Complexes Using Fluorescence Quenching." *Food Chemistry* 132 (4): 2023–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.043>.
- Liebelt, Erica L. 2015. "71: Cyclic Antidepressants." *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*, 10e, no. October: 1–39.
- Liu, Chengzhen, Zhuzhu Liu, Xun Sun, Shuaizhong Zhang, Shuhui Wang, Fuxian Feng, Dongfeng Wang, and Ying Xu. 2018. "Fabrication and Characterization of β -Lactoglobulin-Based Nanocomplexes Composed of Chitosan Oligosaccharides as Vehicles for Delivery of Astaxanthin." Research-article. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry* 66 (26): 6717–26. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00834>.
- Liu, H. C., W. L. Chen, and S. J.T. Mao. 2007. “Antioxidant Nature of Bovine Milk β -Lactoglobulin.” *Journal of Dairy Science* 90 (2): 547–55. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71538-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71538-2).
- Loch, Joanna I., Piotr Bonarek, Agnieszka Polit, Mateusz Jabłoński, Mateusz Czub, Xinxia Ye, and Krzysztof Lewiński. 2015. “ β -Lactoglobulin Interactions with Local Anaesthetic Drugs - Crystallographic and Calorimetric Studies.” *International Journal of Biological Macromolecules* 80: 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.013>.
- Loch, Joanna I., Piotr Bonarek, Agnieszka Polit, Sylwia Świątek, Marta Dziedzicka-Wasylewska, and Krzysztof Lewiński. 2013. “The Differences in Binding 12-Carbon Aliphatic Ligands by Bovine β -Lactoglobulin Isoform A and B Studied by Isothermal Titration Calorimetry and X-Ray Crystallography.” *Journal of Molecular Recognition* 26 (8): 357–67. <https://doi.org/10.1002/jmr.2280>.
- Loch, Joanna I., Piotr Bonarek, Monika Siuda, Paulina Wróbel, and Krzysztof Lewiński. 2021. “Interactions of New Lactoglobulin Variants with Tetracaine: Crystallographic Studies of Ligand Binding to Lactoglobulin Mutants Possessing Single Substitution in the Binding Pocket.” *Acta Biochimica Polonica* 68 (1). https://doi.org/10.18388/abp.2020_5593.
- Loch, Joanna I., Piotr Bonarek, Magdalena Tworzydło, Ilona Łazińska, Joanna Szydłowska, Joanna Lipowska, Katarzyna Rzęsikowska, and Krzysztof Lewiński. 2018. “The Engineered β -Lactoglobulin with Complementarity to the Chlorpromazine Chiral Conformers.” *International Journal of Biological Macromolecules* 114: 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.074>.
- Loch, Joanna I., Piotr Bonarek, Magdalena Tworzydło, Agnieszka Polit, Barbara Hawro, Aneta Łach, Eryk Ludwin, and Krzysztof Lewiński. 2016. “Engineered β -Lactoglobulin Produced in E. Coli: Purification, Biophysical and Structural Characterisation.” *Molecular Biotechnology* 58 (10): 605–18. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9960-z>.
- Loch, Joanna I., Agnieszka Polit, Piotr Bonarek, Dominika Olszewska, Katarzyna Kurpiewska, Marta Dziedzicka-Wasylewska, and Krzysztof Lewiński. 2012. “Structural and Thermodynamic Studies of Binding Saturated Fatty Acids to Bovine β -Lactoglobulin.” *International Journal of Biological Macromolecules* 50 (4): 1095–1102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.03.002>.
- Loch, Joanna I., Piotr Bonarek, Agnieszka Polit, Delphine Riès, Marta Dziedzicka-Wasylewska, and Krzysztof Lewiński. 2013. “Binding of 18-Carbon Unsaturated Fatty Acids to Bovine β -Lactoglobulin—Structural and Thermodynamic Studies.” *International Journal of Biological Macromolecules* 57 (June): 226–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.021>.
- Loch, Joanna, Agnieszka Polit, Andrzej Görecki, Piotr Bonarek, Katarzyna Kurpiewska, Marta Dziedzicka-Wasylewska, and Krzysztof Lewiński. 2011. “Two Modes of Fatty Acid Binding to Bovine β -Lactoglobulin- Crystallographic and Spectroscopic Studies.” *Journal of Molecular Recognition* 24 (2): 341–49. <https://doi.org/10.1002/jmr.1084>.
- Lu, Rwei Min, Yu Chyi Hwang, I. Ju Liu, Chi Chiu Lee, Han Zen Tsai, Hsin Jung Li, and Han Chung Wu. 2020. “Development of Therapeutic Antibodies for the Treatment of Diseases.” *Journal of Biomedical Science* 27 (1): 1–30. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>.
- Luo, Shunjing, Xuli Lu, Chengmei Liu, Junzhen Zhong, Lei Zhou, and Tingting Chen. 2019. “Site Specific PEGylation of β -Lactoglobulin at Glutamine Residues and Its Influence on Conformation and

- Antigenicity.” *Food Research International* 123 (January): 623–30.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.038>.
- Mansilla, Alicia, Antonio Chaves-Sanjuan, Nuria E. Campillo, Ourania Semelidou, Loreto Martínez-González, Lourdes Infantes, Juana María González-Rubio, et al. 2017. “Interference of the Complex between NCS-1 & Ric8a with Phenothiazines Regulates Synaptic Function & Is an Approach for Fragile X Syndrome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (6): E999–1008.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1611089114>.
- Marks, J., and S. Shuster. 1972. “Dermatological Disorders.” *Clinics in Haematology* 1 (3): 533–51.
https://doi.org/10.5005/jp/books/11083_15.
- Maschberger, Melanie, Marie Resch, Stefan Duhr, and Dennis Breitsprecher. 2015. “Exploring Protein Stability by NanoDSF Prometheus NT.48 – The Stability Expert.” *NanoTemper Technologies GmbH*.
www.nanotemper-technologies.com.
- Maurya, Neha, Jitendra Kumar Maurya, Meena Kumari, Abbul Bashar Khan, Ravins Dohare, and Rajan Patel. 2017. “Hydrogen Bonding-Assisted Interaction between Amitriptyline Hydrochloride and Hemoglobin: Spectroscopic and Molecular Dynamics Studies.” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 35 (6): 1367–80. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1184184>.
- Maux, Solène Le, Saïd Bouhallab, Linda Giblin, André Brodkorb, and Thomas Croguennec. 2014. “Bovine β -Lactoglobulin/Fatty Acid Complexes: Binding, Structural, and Biological Properties.” *Dairy Science and Technology* 94 (5): 409–26. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0160-y>.
- McDowell, J. J. H. 1969. “The Crystal and Molecular Structure of Chlorpromazine.” *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry* 25 (11): 2175–81.
<https://doi.org/10.1107/s0567740869005437>.
- McMeekin, T. L., B. D. Polis, E. S. Della Monica, and J. H. Custer. 1949. “A Crystalline Compound of β -Lactoglobulin with Dodecyl Sulfate.” *Journal of the American Chemical Society* 71 (11): 3606–9.
<https://doi.org/10.1021/ja01179a008>.
- Mecherfi, Kamel Eddine El, Olivier Rouaud, Sébastien Curet, Hanane Negaoui, Jean Marc Chobert, Omar Kheroua, Djamel Saidi, and Thomas Haertlé. 2015. “Peptic Hydrolysis of Bovine Beta-Lactoglobulin under Microwave Treatment Reduces Its Allergenicity in an Ex Vivo Murine Allergy Model.” *International Journal of Food Science and Technology* 50 (2): 356–64. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12653>.
- Mehraban, Mohammad Hossein, Salman Odooli, Reza Yousefi, Rasoul Roghanian, Majid Motovali-Bashi, Ali Akbar Moosavi-Movahedi, and Younes Ghasemi. 2017. “The Interaction of Beta-Lactoglobulin with Ciprofloxacin and Kanamycin; a Spectroscopic and Molecular Modeling Approach.” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 35 (9): 1968–78. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1203819>.
- Mehraban, Mohammad Hossein, Reza Yousefi, Asghar Taheri-Kafrani, Farhad Panahi, and Ali Khalafi-Nezhad. 2013. “Binding Study of Novel Anti-Diabetic Pyrimidine Fused Heterocycles to β -Lactoglobulin as a Carrier Protein.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 112: 374–79.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.013>.
- Menilli, Luca, Aída Nelly García-Argáez, Lisa Dalla Via, and Giorgia Miolo. 2019. “The Neuroleptic Drug Fluphenazine Induces a Significant UVA-Mediated Cytotoxic Effect on Three Human Cancer Cell Lines through Apoptosis.” *Photochemical and Photobiological Sciences* 18 (9): 2232–39.

- <https://doi.org/10.1039/c9pp00023b>.
- Mensi, Azza, Y van Choiset, Hanitra Rabesona, Thomas Haertlé, Patrick Borel, and Jean Marc Chobert. 2013. “Interactions of β -Lactoglobulin Variants A and B with Vitamin A. Competitive Binding of Retinoids and Carotenoids.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (17): 4114–19.
<https://doi.org/10.1021/jf400711d>.
- Meyer, Todd, Ali Amirkhosravi, Laurent P Audoly, Andreas M Hohlbaum, and Arne Skerra. 2015. “Functional Characterization of a VEGF-A-Targeting Anticalin , Prototype of a Novel Therapeutic Human Protein Class.” <https://doi.org/10.1007/s10456-015-9490-5>.
- Miles, A. J., Robert W. Janes, and B. A. Wallace. 2021. “Tools and Methods for Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins: A Tutorial Review.” *Chemical Society Reviews* 50 (15): 8400–8413.
<https://doi.org/10.1039/d0cs00558d>.
- Miriani, Matteo, Ivano Eberini, Stefania Iametti, Pasquale Ferranti, Cristina Sensi, and Francesco Bonomi. 2014. “Unfolding of Beta-Lactoglobulin on the Surface of Polystyrene Nanoparticles: Experimental and Computational Approaches.” *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 82 (7): 1272–82.
<https://doi.org/10.1002/prot.24493>.
- Murshudov, Garib N., Pavol Skubák, Andrey A. Lebedev, Navraj S. Pannu, Roberto A. Steiner, Robert A. Nicholls, Martyn D. Winn, Fei Long, and Alexei A. Vagin. 2011. “REFMAC5 for the Refinement of Macromolecular Crystal Structures.” *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 67 (4): 355–67. <https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>.
- Nalluri, Buchi N, and Tharun Kumar. 2020. “Development of validated chiral RP-HPLC-PDA method for the estimation of cetirizine enantiomers in bulk and dosage forms”. <https://doi.org/10.20959/wjpps20208-16799>.
- Narayan, Mahesh, and Lawrence J. Berliner. 1998. “Mapping Fatty Acid Binding to β -Lactoglobulin: Ligand Binding Is Restricted by Modification of Cys 121.” *Protein Science* 7 (1): 150–57.
<https://doi.org/10.1002/pro.5560070116>.
- Nasu, Risa, Hirotami Matsuo, Hitomi Takanaga, Hisakazu Ohtani, and Yasufumi Sawada. 2000. “Quantitative Prediction of Catalepsy Induced by Amoxapine , Cinnarizine and Cyclophosphamide in Mice” 138 (April): 129–38.
- Navia, Manuel A., Paula M.D. Fitzgerald, Brian M. McKeever, Chih Tai Leu, Jill C. Heimbach, Wayne K. Herber, Irving S. Sigal, Paul L. Darke, and James P. Springer. 1989. “Three-Dimensional Structure of Aspartyl Protease from Human Immunodeficiency Virus HIV-1.” *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/337615a0>.
- Nishi, Koji, Tomomi Ono, Teruya Nakamura, Naoko Fukunaga, Miyoko Izumi, and Hiroshi Watanabe. 2011. “Structural Insights into Differences in Drug-Binding Selectivity between Two Forms of Human α 1-Acid Glycoprotein Genetic Variants , the A and F1 * S Forms * ” 286 (16): 14427–34.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.208926>.
- Nozach, Hervé, Carole Fruchart-Gaillard, François Fenaille, Fabrice Beau, Oscar Henrique Pereira Ramos, Badreddine Douzi, Natalie J. Saez, et al. 2013. “High Throughput Screening Identifies Disulfide Isomerase DsbC as a Very Efficient Partner for Recombinant Expression of Small Disulfide-Rich Proteins in E. Coli.” *Microbial Cell Factories* 12 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-37>.

- Nyberg, Gösta, and Erik Mårtensson. 1984. "Determination of Free Fractions of Tricyclic Antidepressants." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 327 (3): 260–65. <https://doi.org/10.1007/BF00502459>.
- Nys, Mieke, Eveline Wijckmans, Ana Farinha, Özge Yoluk, Magnus Andersson, Marijke Brams, Radovan Spurny, et al. 2016. "Allosteric Binding Site in a Cys-Loop Receptor Ligand-Binding Domain Unveiled in the Crystal Structure of ELIC in Complex with Chlorpromazine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (43): E6696–6703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603101113>.
- Oliveira, Kesley M. G., Vera L. Valente-Mesquita, Michelle M. Botelho, Lindsay Sawyer, Sérgio T. Ferreira, and Igor Polikarpov. 2001. "Crystal Structures of Bovine β -Lactoglobulin in the Orthorhombic Space Group C222 1 ." *European Journal of Biochemistry* 268 (2): 477–84. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.01918.x>.
- Olivier, Celso Eduardo, Regiane Patussi dos Santos Lima, Daiana Guedes Pinto, Raquel Acácia Pereira Gonçalves dos Santos, Grayce Katlen Moreno da Silva, Sônia Letícia Silva Lorena, Mariana Battaglin Villas-Boas, Flávia Maria Netto, and Ricardo de Lima Zollner. 2012. "In Search of a Tolerance-Induction Strategy for Cow's Milk Allergies: Significant Reduction of Beta-Lactoglobulin Allergenicity via Transglutaminase/Cysteine Polymerization." *Clinics* 67 (10): 1171–79. [https://doi.org/10.6061/clinics/2012\(10\)09](https://doi.org/10.6061/clinics/2012(10)09).
- Palmer, A.H. 1934. "The Preparation of a Crystalline Globulin From the Albumin Fraction of Cow'S Milk." *Journal of Biological Chemistry* 104 (2): 359–72. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)75774-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)75774-8).
- Papiz, M. Z., L. Sawyer, E. E. Eliopoulos, A. C.T. North, J. B.C. Findlay, R. Sivaprasadarao, T. A. Jones, M. E. Newcomer, and P. J. Kraulis. 1986. "The Structure of β -Lactoglobulin and Its Similarity to Plasma Retinol-Binding Protein." *Nature* 324 (6095): 383–85. <https://doi.org/10.1038/324383a0>.
- Paquin, Francis, Jonathan Rivnay, Alberto Salleo, Natalie Stingelin, and Carlos Silva. 2015. "Multi-Phase Semicrystalline Microstructures Drive Exciton Dissociation in Neat Plastic Semiconductors." *J. Mater. Chem. C* 3: 10715–22. <https://doi.org/10.1039/b000000x>.
- Patel, Disha, Joseph D. Bauman, and Eddy Arnold. 2014. "Advantages of Crystallographic Fragment Screening: Functional and Mechanistic Insights from a Powerful Platform for Efficient Drug Discovery." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 116 (2–3): 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.08.004>.
- Paul, Bijan K., Narayani Ghosh, and Saptarshi Mukherjee. 2014. "Binding Interaction of a Prospective Chemotherapeutic Antibacterial Drug with β -Lactoglobulin: Results and Challenges." *Langmuir* 30 (20): 5921–29. <https://doi.org/10.1021/la501252x>.
- Pellock, Samuel J, Benjamin C Creekmore, William G Walton, Naimee Mehta, Kristen A Biernat, Andrew P Cesmat, Yamuna Ariyaratna, et al. 2018. "Gut Microbial β -Glucuronidase Inhibition via Catalytic Cycle Interception." <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00239>.
- Pérez, Maria Dolores, and Miguel Calvo. 1995. "Interaction of β -Lactoglobulin with Retinol and Fatty Acids and Its Role as a Possible Biological Function for This Protein: A Review." *Journal of Dairy Science* 78 (5): 978–88. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76713-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76713-3).
- Perona, Almudena, M. Piedad Ros, Alberto Mills, Antonio Morreale, and Federico Gago. 2020. "Distinct Binding of Cetirizine Enantiomers to Human Serum Albumin and the Human Histamine Receptor H1." *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 34 (10): 1045–62. <https://doi.org/10.1007/s10822-020-00328-8>.

- Petrus, Joanna, Bogusława Czarnik-Matusewicz, Rafał Petrus, Katarzyna Cieślak-Boczula, Agata Jaszczyszyn, and Kazimierz Gąsiorowski. 2015. "Fluphenazine: From an Isolated Molecule to Its Interaction with Lipid Bilayers." *Chemistry and Physics of Lipids* 186: 51–60.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.01.002>.
- Plenge, Per, Lei Shi, Thijs Beuming, Jerez Te, Amy Hauck Newman, Harel Weinstein, Ulrik Gether, and Claus J. Loland. 2012. "Steric Hindrance Mutagenesis in the Conserved Extracellular Vestibule Impedes Allosteric Binding of Antidepressants to the Serotonin Transporter." *Journal of Biological Chemistry* 287 (47): 39316–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371765>.
- Pujara, Naisarg, Rabina Giri, Kuan Yau Wong, Zhi Qu, Prarthana Rewatkar, Md Moniruzzaman, Jakob Begun, Benjamin P. Ross, Michael McGuckin, and Amirali Popat. 2021. "PH – Responsive Colloidal Carriers Assembled from β -Lactoglobulin and Epsilon Poly-L-Lysine for Oral Drug Delivery." *Journal of Colloid and Interface Science* 589: 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.12.054>.
- Qin, Bin Y., Maria C. Bewley, Lawrence K. Creamer, Heather M. Baker, Edward N. Baker, and Geoffrey B. Jameson. 1998. "Structural Basis of the Tanford Transition of Bovine β -Lactoglobulin." *Biochemistry* 37 (40): 14014–23. <https://doi.org/10.1021/bi981016t>.
- Ragona, Laura, Lucia Zetta, Federico Fogolari, Henriette Molinari, Dolores M. Pérez, Pilar Puyol, Kees De Kruif, Frank Löhr, and Heinz Rüterjans. 2000. "Bovine β -Lactoglobulin: Interaction Studies with Palmitic Acid." *Protein Science* 9 (7): 1347–56. <https://doi.org/10.1110/ps.9.7.1347>.
- Rahman, Mohammed Habibur, Toru Maruyama, Tomoko Okada, Teruko Imai, and Masaki Otagiri. 1993. "Study of Interaction of Carprofen and Its Enantiomers with Human Serum Albumin-II. Stereoselective Site-to-Site Displacement of Carprofen by Ibuprofen." *Biochemical Pharmacology* 46 (10): 1733–40. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90577-J](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90577-J).
- Raoufinia, Ramin, Ali Mota, Neda Keyhanvar, Fatemeh Safari, Sara Shamekhi, and Jalal Abdolalizadeh. 2016. "Overview of Albumin and Its Purification Methods." *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 6 (4): 495–507. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.063>.
- Rauth, Sabine, Dominik Hinz, B Michael, Markus Uhrig, Manuel Mayhaus, Matthias Riemenschneider, and Arne Skerra. 2016. "High-Affinity Anticalins with Aggregation-Blocking Activity Directed against the Alzheimer β -Amyloid Peptide," 1563–78. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160114>.
- Ravna, Aina W., Ingebrigt Sylte, and Svein G. Dahl. 2009. "Structure and Localisation of Drug Binding Sites on Neurotransmitter Transporters." *Journal of Molecular Modeling* 15 (10): 1155–64. <https://doi.org/10.1007/s00894-009-0478-1>.
- Read, Randy J., Paul D. Adams, and Airlie J. McCoy. 2013. "Intensity Statistics in the Presence of Translational Noncrystallographic Symmetry." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 69 (2): 176–83. <https://doi.org/10.1107/S0907444912045374>.
- Richter, A., E. Eggenstein, and A. Skerra. 2014. "Anticalins: Exploiting a Non-Ig Scaffold with Hypervariable Loops for the Engineering of Binding Proteins." *FEBS Letters* 588 (2): 213–18. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.006>.
- Rodrigues, Rui M., Zita Avelar, António A. Vicente, Steffen B. Petersen, and Ricardo N. Pereira. 2020. "Influence of Moderate Electric Fields in β -Lactoglobulin Thermal Unfolding and Interactions." *Food Chemistry* 304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125442>.

- Röntgen, W. C., and A. Stanton. 1896. "On a New Kind of Rays - Röntgen, W. C. - Translated by Stanton A. from the Sitzungsberichte Der Würzburger Physic-Medic. Gesellschaft." *Nature* 23 (January): 185–88.
- Rothe, Christine, and Arne Skerra. 2018. "Anticalin® Proteins as Therapeutic Agents in Human Diseases." *BioDrugs* 32 (3): 233–43. <https://doi.org/10.1007/s40259-018-0278-1>.
- Rub, Malik Abdul, Javed Masood Khan, Naved Azum, and Abdullah M. Asiri. 2017. "Influence of Antidepressant Clomipramine Hydrochloride Drug on Human Serum Albumin: Spectroscopic Study." *Journal of Molecular Liquids* 241: 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.143>.
- Rudra, Suparna, Abhisek Jana, Nayim Sepay, Biman Kumar Patel, and Ambikesh Mahapatra. 2018. "Characterization of the Binding of Strychnine with Bovine β -Lactoglobulin and Human Lysozyme Using Spectroscopic, Kinetic and Molecular Docking Analysis." *New Journal of Chemistry* 42 (11): 8615–28. <https://doi.org/10.1039/c8nj00810h>.
- Ruiz, Mario. 2021. "Into the Labyrinth of the Lipocalin α 1-Acid Glycoprotein." *Frontiers in Physiology* 12 (June): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.686251>.
- Russeva, Veska, and Dia Mihailova. 1999. "Binding of Phenylbutazone to Human Serum Albumin: Characterization and Identification of Binding Sites." *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 49 (3): 255–58. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1300410>.
- Sahihi, Mehdi. 2016. "In-Silico Study on the Interaction of Saffron Ligands and Beta-Lactoglobulin by Molecular Dynamics and Molecular Docking Approach." *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics* 55 (1): 73–84. <https://doi.org/10.1080/00222348.2015.1125066>.
- Sakurai, Kazumasa, and Yuji Goto. 2002. "Manipulating Monomer-Dimer Equilibrium of Bovine β -Lactoglobulin by Amino Acid Substitution." *Journal of Biological Chemistry* 277 (28): 25735–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203659200>.
- Sakurai, Kazumasa, and Yuji Goto. 2006. "Dynamics and Mechanism of the Tanford Transition of Bovine β -Lactoglobulin Studied Using Heteronuclear NMR Spectroscopy." *Journal of Molecular Biology* 356 (2): 483–96. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.038>.
- Sakurai, Kazumasa, Tsuyoshi Konuma, Masanori Yagi, and Yuji Goto. 2009. "Structural Dynamics and Folding of β -Lactoglobulin Probed by Heteronuclear NMR." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1790 (6): 527–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.04.003>.
- Salentin, Sebastian, Sven Schreiber, V. Joachim Haupt, Melissa F. Adasme, and Michael Schroeder. 2015. "PLIP: Fully Automated Protein-Ligand Interaction Profiler." *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W443–47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv315>.
- Sauna, Zuben E., H. A. Daniel Lagassé, Aikaterini Alexaki, Vijaya L. Simhadri, Nobuko H. Katagiri, Wojciech Jankowski, and Chava Kimchi-Sarfaty. 2017. "Recent Advances in (Therapeutic Protein) Drug Development." *F1000Research* 6. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9970.1>.
- Sawyer, Lindsay, and George Kontopidis. 2000. "The Core Lipocalin, Bovine β -Lactoglobulin." *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1482 (1–2): 136–48. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00160-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00160-6).
- Schiebel, Johannes, Nedyalka Radeva, Stefan G. Krimmer, Xiaojie Wang, Martin Stieler, Frederik R. Ehrmann, Kan Fu, et al. 2016. "Six Biophysical Screening Methods Miss a Large Proportion of Crystallographically Discovered Fragment Hits: A Case Study." *ACS Chemical Biology* 11 (6): 1693–1701.

- <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b01034>.
- Schiefner, Andre, and Arne Skerra. 2000. "The Menagerie of Human Lipocalins : A Natural Protein Scaffold for Molecular Recognition of Physiological Compounds." <https://doi.org/10.1021/ar5003973>.
- Schlehuber, Steffen, and Arne Skerra. 2002. "Tuning Ligand Affinity, Specificity, and Folding Stability of an Engineered Lipocalin Variant - A so-Called 'anticalin' - Using a Molecular Random Approach." *Biophysical Chemistry* 96 (2–3): 213–28. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00026-1](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00026-1).
- Schlehuber, Steffen, and Arne Skerra. 2005. "Lipocalins in Drug Discovery: From Natural Ligand-Binding Proteins to 'Anticalins.'" *Drug Discovery Today* 10 (1): 23–33. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03294-5](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03294-5).
- Schley, J., and B. Müller-Oerlinghausen. 1986. "Investigation of the Binding of Various Tricyclic Neuroleptics and Antidepressants to A1-acid Glycoprotein." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 38 (2): 102–6. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1986.tb04520.x>.
- Shafaei, Zahra, Behafarid Ghalandari, Akbar Vaseghi, Adeleh Divsalar, Thomas Haertlé, Ali Akbar Saboury, and Lindsay Sawyer. 2017. "β-Lactoglobulin: An Efficient Nanocarrier for Advanced Delivery Systems." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 13 (5): 1685–92. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.03.007>.
- Shahraki, Somaye, and Fereshteh Shiri. 2018. "Binding Interaction of Isoxsuprine Hydrochloride and Levothyroxine to Milk β-Lactoglobulin; from the Perspective of Comparison." *International Journal of Biological Macromolecules* 109: 576–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.117>.
- Shimamura, Tatsuro, Mitsunori Shiroishi, Simone Weyand, Hirokazu Tsujimoto, Graeme Winter, Vsevolod Katritch, Ruben Abagyan, et al. 2011. "Structure of the Human Histamine H₁ Receptor Complex with Doxepin." *Nature* 475 (7354): 65–72. <https://doi.org/10.1038/nature10236>.
- Shoemark, Debbie K, Christopher Williams, Mark S Fahey, Judy J Watson, Sue J Tyler, Simon J Scoltock, Rosamund Z Ellis, et al. 2015. "Design and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Structure Determination of the Second Extracellular Immunoglobulin Tyrosine Kinase A (TrkA_{IG2}) Domain Construct for Binding Site Elucidation in Drug Discovery."
- Siligardi, Giuliano, Rohanah Hussain, Simon G. Patching, and Mary K. Phillips-Jones. 2014. "Ligand- and Drug-Binding Studies of Membrane Proteins Revealed through Circular Dichroism Spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1838 (1 PARTA): 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.019>.
- Singh, Satinder K., Atsuko Yamashita, and Eric Gouaux. 2007. "Antidepressant Binding Site in a Bacterial Homologue of Neurotransmitter Transporters." *Nature* 448 (7156): 952–56. <https://doi.org/10.1038/nature06038>.
- Skerra, Arne. 2008. "Alternative Binding Proteins : Anticalins – Harnessing the Structural Plasticity of the Lipocalin Ligand Pocket to Engineer Novel Binding Activities" 275: 2677–83. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06439.x>.
- Sneharani, Athahalli H., Jimsheena V. Karakkat, Sridevi Annapurna Singh, and A. G. Appu Rao. 2010. "Interaction of Curcumin with SS-Lactoglobulin; Stability, Spectroscopic Analysis, and Molecular Modeling of the Complex." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (20): 11130–39. <https://doi.org/10.1021/jf102826q>.

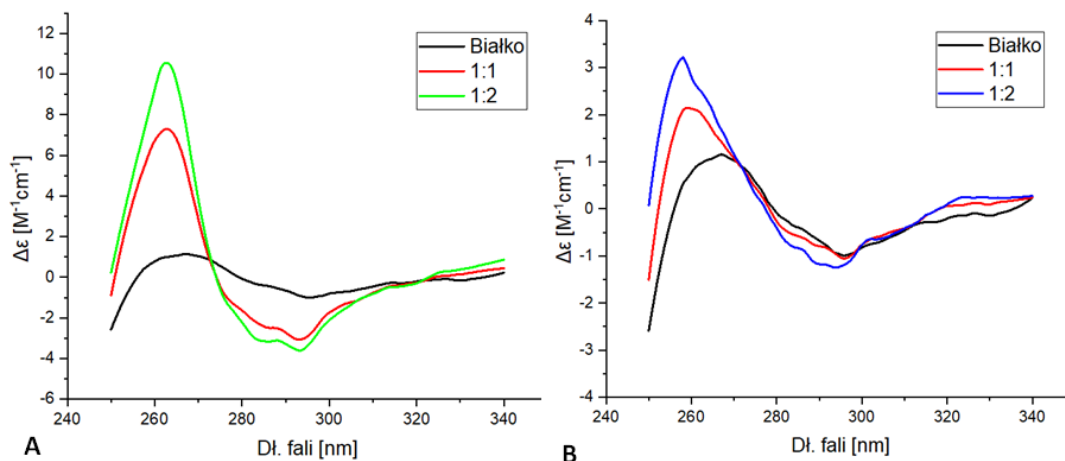
- Spector, Arthur A., and John E. Fletcher. 1970. "Binding of Long Chain Fatty Acids to β -Lactoglobulin." *Lipids* 5 (4): 403–11. <https://doi.org/10.1007/BF02532106>.
- Stubbs, M. T. 2006. *Protein Crystallography. Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Vol. 3.
- Su, Xiao Dong, Heng Zhang, Thomas C. Terwilliger, Anders Liljas, Junyu Xiao, and Yuhui Dong. 2015. "Protein Crystallography from the Perspective of Technology Developments." *Crystallography Reviews* 21 (1–2): 122–53. <https://doi.org/10.1080/0889311X.2014.973868>.
- Świątek, S., P. Komorek, G. Turner, and B. Jachimska. 2019. " β -Lactoglobulin as a Potential Carrier for Bioactive Molecules." *Bioelectrochemistry* 126: 137–45. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.12.006>.
- Taheri-Kafrani, Asghar, Abdol Khalegh Bordbar, Seyed Habib Allah Mousavi, and Thomas Haertlé. 2008. " β -Lactoglobulin Structure and Retinol Binding Changes in Presence of Anionic and Neutral Detergents." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (16): 7528–34. <https://doi.org/10.1021/jf801179k>.
- Tai, Chun San, Yi Yun Chen, and Wen Liang Chen. 2016. " β -Lactoglobulin Influences Human Immunity and Promotes Cell Proliferation." *BioMed Research International* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7123587>.
- Taylor, John E., and Elliott Richelson. 1982. "High-Affinity Binding of [3H]Doxepin to Histamine H1-Receptors in Rat Brain: Possible Identification of a Subclass of Histamine H1-Receptors." *European Journal of Pharmacology* 78 (3): 279–85. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(82\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(82)90029-2).
- Tedesco, Daniele, and Carlo Bertucci. 2015. "Induced Circular Dichroism as a Tool to Investigate the Binding of Drugs to Carrier Proteins: Classic Approaches and New Trends." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 113: 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.024>.
- Thomas, Simon H.L. 2016. "Antihistamine Poisoning." *Medicine (United Kingdom)* 44 (3): 141–42. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2015.12.002>.
- Uhrínová, Stanislava, Mark H. Smith, Geoffrey B. Jameson, Dusan Uhrín, Lindsay Sawyer, and Paul N. Barlow. 2000. "Structural Changes Accompanying PH-Induced Dissociation of the β -Lactoglobulin Dimer." *Biochemistry* 39 (13): 3565–74. <https://doi.org/10.1021/bi992629o>.
- Vanaei, Shohreh, Mohammad Salemizadeh Parizi, Saeed Abdolhosseini, and Iman Katouzian. 2020. "Spectroscopic, Molecular Docking and Molecular Dynamic Simulation Studies on the Complexes of β -Lactoglobulin, Safranal and Oleuropein." *International Journal of Biological Macromolecules* 165: 2326–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.139>.
- Varlamova, E. G., and O. G. Zaripov. 2020. "Beta-Lactoglobulin–Nutrition Allergen and Nanotransporter of Different Nature Ligands Therapy with Therapeutic Action." *Research in Veterinary Science* 133 (June): 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.014>.
- Vetri, Valeria, and Valeria Militello. 2005. "Thermal Induced Conformational Changes Involved in the Aggregation Pathways of Beta-Lactoglobulin." *Biophysical Chemistry* 113 (1): 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.07.042>.
- Viggers, J A, D J Heal, and W R Buckett. 1993. "[³H] Paroxetine Binding In Rat Frontal Cortex Strongly Correlates With [³H] 5-HT Uptake : Effect Of Administration Of Various Antidepressants Treatments" 32 (8): 737–43.
- Wang, Hui, April Goehring, Kevin H Wang, Aravind Penmatsa, Ryan Ressler, and Eric Gouaux. 2013. "Structural Basis for Action by Diverse Antidepressants on Biogenic Amine Transporters." *Nature* 503

- (7474): 141–45. <https://doi.org/10.1038/nature12648>.
- Wang, Qiwu, Jonathan C. Allen, and Harold E. Swaisgood. 1997. “Binding of Vitamin D and Cholesterol to β -Lactoglobulin.” *Journal of Dairy Science* 80 (6): 1054–59. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76030-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76030-2).
- Watson, J. D., and F. H. Crick. 1953. “The Structure of DNA.” *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 18: 123–31. <https://doi.org/10.1101/SQB.1953.018.01.020>.
- Weber, David. 2010. “In Vitro Screening and Structural Characterization of Inhibitors of the S100B-P53 Interaction.” *International Journal of High Throughput Screening*, 109. <https://doi.org/10.2147/ijhts.s8210>.
- Winn, Martyn D., Charles C. Ballard, Kevin D. Cowtan, Eleanor J. Dodson, Paul Emsley, Phil R. Evans, Ronan M. Keegan, et al. 2011. “Overview of the CCP4 Suite and Current Developments.” *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 67 (4): 235–42. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>.
- Wishnia, Arnold, and Thomas W. Pinder. 1966. “Hydrophobic Interactions in Proteins. The Alkane Binding Site of β -Lactoglobulins A and B.” *Biochemistry* 5 (5): 1534–42. <https://doi.org/10.1021/bi00869a013>.
- Wong, Tuck Seng, and Kang Lan Tee. 2020. “A Practical Guide to Protein Engineering”. <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-56898-6>.
- Wu, Su Ying, M. Dolores Pérez, Pilar Puyol, and Lindsay Sawyer. 1999. “ β -Lactoglobulin Binds Palmitate within Its Central Cavity.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (1): 170–74. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.1.170>.
- Xia, Yongzhen, Wenqiao Chu, Qingsheng Qi, and Luying Xun. 2015. “New Insights into the QuikChange™ Process Guide the Use of Phusion DNA Polymerase for Site-Directed Mutagenesis.” *Nucleic Acids Research* 43 (2): e12. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1189>.
- Xu, Haoxie, Yuqin Lu, Tingting Zhang, Ke Liu, Lizhong Liu, Zhendan He, Bingqi Xu, and Xuli Wu. 2019. “Characterization of Binding Interactions of Anthraquinones and Bovine β -Lactoglobulin.” *Food Chemistry* 281 (December 2018): 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.077>.
- Yagi, Masanori, Kazumasa Sakurai, Chitkala Kalidas, Carl A. Batt, and Yuji Goto. 2003. “Reversible Unfolding of Bovine β -Lactoglobulin Mutants without a Free Thiol Group.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 47009–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308592200>.
- Yang, Ming Chi, Hong Hsiang Guan, Ming Yih Liu, Yih Hung Lin, Jinn Moon Yang, Wen Liang Chen, Chun Jung Chen, and Simon J.T. Mao. 2008. “Crystal Structure of a Secondary Vitamin D3 Binding Site of Milk β -Lactoglobulin.” *Proteins: Structure, Function and Genetics* 71 (3): 1197–1210. <https://doi.org/10.1002/prot.21811>.
- Yang, Ming Chi, Hong Hsiang Guan, Jinn Moon Yang, Cheng Neng Ko, Ming Yih Liu, Yih Hung Lin, Yen Chieh Huang, Chun Jung Chen, and Simon J.T. Mao. 2008. “Rational Design for Crystallization of β -Lactoglobulin and Vitamin D3 Complex: Revealing a Secondary Binding Site.” *Crystal Growth and Design* 8 (12): 4268–76. <https://doi.org/10.1021/cg800697s>.
- Yang, Sen, Zong cai Tu, Hui Wang, and Tao Huang. 2020. “The Reduction in the Immunoglobulin G and Immunoglobulin E Binding Capacity of β -Lactoglobulin via Spray-Drying Technology.” *Journal of Dairy Science* 103 (4): 2993–3001. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17322>.
- Young, Jasmine Y., John D. Westbrook, Zukang Feng, Raul Sala, Ezra Peisach, Thomas J. Oldfield, Sanchayita

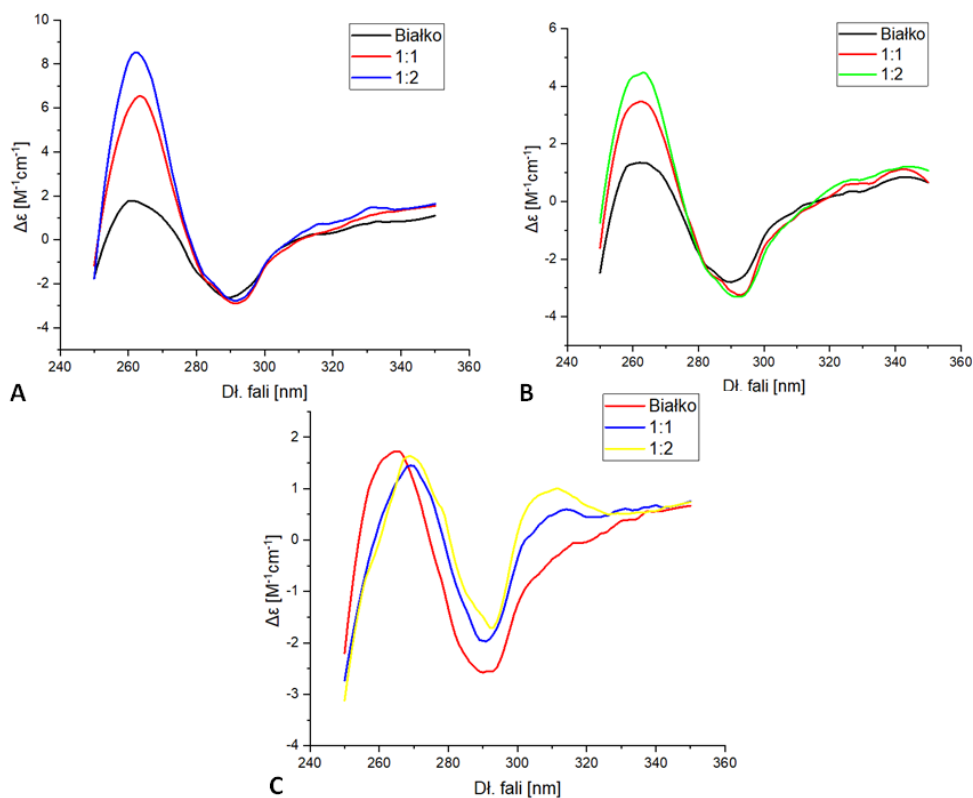
- Sen, et al. 2017. "OneDep: Unified WwPDB System for Deposition, Biocuration, and Validation of Macromolecular Structures in the PDB Archive." *Structure* 25 (3): 536–45.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2017.01.004>.
- Yousefi, Afsoon, Sajjad Ahrari, Farhad Panahi, Younes Ghasemi, and Reza Yousefi. 2021. "Binding Analysis of the Curcumin-Based Synthetic Alpha-Glucosidase Inhibitors to Beta-Lactoglobulin as Potential Vehicle Carrier for Antidiabetic Drugs." *Journal of the Iranian Chemical Society*. <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02323-8>.
- Yuan, Shuguang, H. C. Stephen Chan, and Zhenquan Hu. 2017. "Using PyMOL as a Platform for Computational Drug Design." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 7 (2): 1–10.
<https://doi.org/10.1002/wcms.1298>.
- Zhan, Fuchao, Shuang Ding, Wenya Xie, Xiao Zhu, Jiangnan Hu, Jun Gao, Bin Li, and Yijie Chen. 2020. "Towards Understanding the Interaction of β -Lactoglobulin with Capsaicin: Multi-Spectroscopic, Thermodynamic, Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Approaches." *Food Hydrocolloids* 105 (September 2019): 105767. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105767>.
- Zhang, Jie, Xiaoming Liu, Muriel Subirade, Peng Zhou, and Li Liang. 2014. "A Study of Multi-Ligand Beta-Lactoglobulin Complex Formation." *Food Chemistry* 165 (May): 256–61.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.109>.
- Zhao, Yuguang, Jingshan Ren, Elizabeth E Fry, Julia Xiao, Alain R Townsend, and David I Stuart. 2018. "Structures of Ebola Virus Glycoprotein Complexes with Tricyclic Antidepressant and Antipsychotic Drugs." Research-article. *Journal of Medicinal Chemistry* 61 (C): 4938–45.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00350>.
- Zlatic, Courtney O., Yu Mao, Timothy M. Ryan, Yee Foong Mok, Blaine R. Roberts, Geoffrey J. Howlett, and Michael D.W. Griffin. 2015. "Fluphenazine·HCl and Epigallocatechin Gallate Modulate the Rate of Formation and Structural Properties of Apolipoprotein C-II Amyloid Fibrils." *Biochemistry* 54 (24): 3831–38. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00399>.
- Zsila, Ferenc, Zsolt Bikádi, Ilona Fitos, and Miklos Simonyi. 2005. "Probing Protein Binding Sites by Circular Dichroism Spectroscopy." *Current Drug Discovery Technologies* 1 (2): 133–53.
<https://doi.org/10.2174/1570163043335135>.
- Zsila, Ferenc, Zsolt Bikádi, and Miklós Simonyi. 2002. "Retinoic Acid Binding Properties of the Lipocalin Member β -Lactoglobulin Studied by Circular Dichroism, Electronic Absorption Spectroscopy and Molecular Modeling Methods." *Biochemical Pharmacology* 64 (11): 1651–60.
[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01350-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01350-3).
- Zsila, Ferenc, Péter Molnár, József Deli, and Samuel F. Lockwood. 2005. "Circular Dichroism and Absorption Spectroscopic Data Reveal Binding of the Natural Cis-Carotenoid Bixin to Human A1-Acid Glycoprotein." *Bioorganic Chemistry* 33 (4): 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2005.03.003>.

9. Suplement do pracy

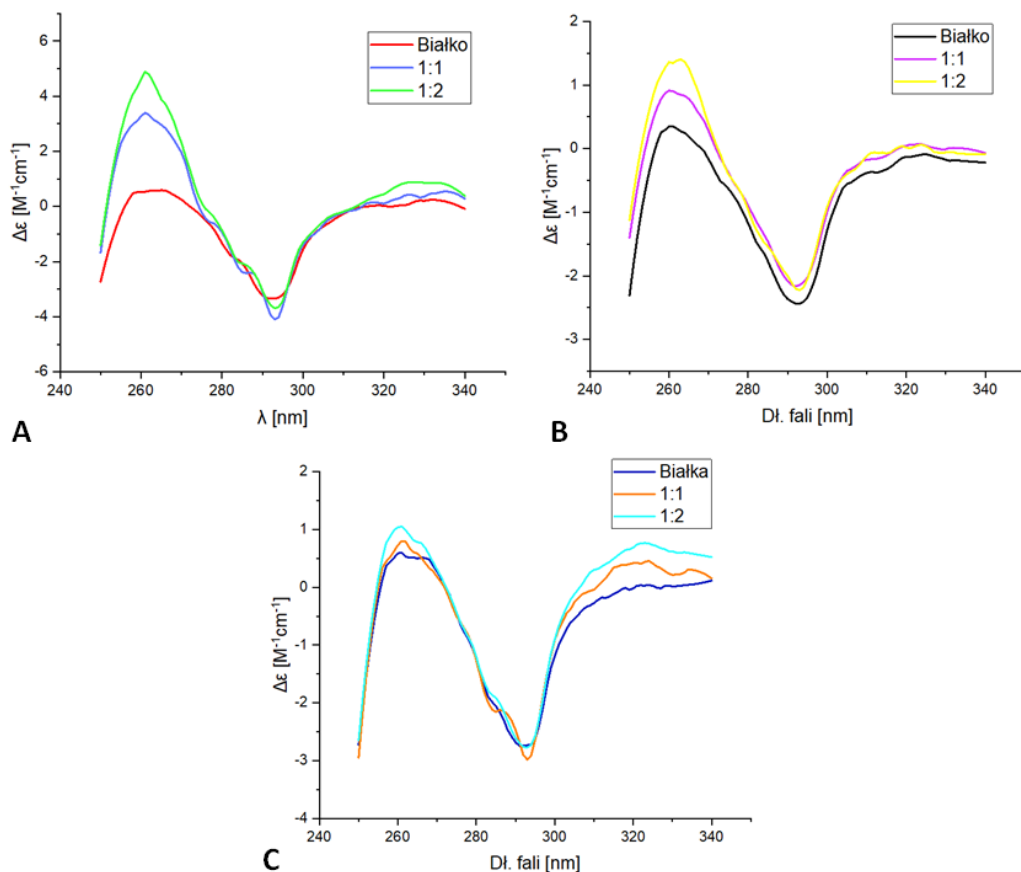
Rysunki S1-S4 w suplemencie przedstawiają widma CD dla kompleksów białko-ligand, dla których we wstępnych badaniach (dodatek liganda do białka w stosunku 1:1 oraz 1:2) zauważono zmiany sygnału CD. Natomiast Tabele S1-S3 zawierają statystyki przetwarzania danych z pomiarów dla struktur, dla których mapy gęstości nie wykazały, że ligand nie związał się do białka, dlatego też nie podejmowano dalszych prób ich udokładniania.



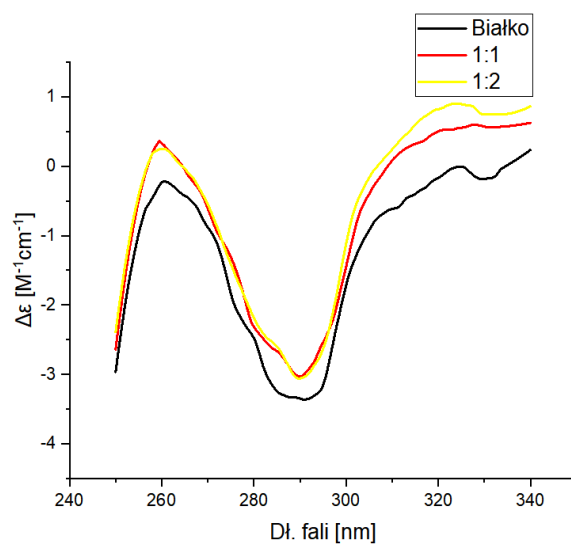
Rysunek S1. Widma CD po dodatku (A) flufenazyny oraz (B) chlorpromazyny do roztworu wariantu LAW w stosunku 1:1 oraz 1:2.



Rysunek S2. Zmiany w widmach CD wywołane dodatkiem (A) flufenazyny, (B) chlorpromazyny oraz (C) kłomipraminy do roztworu wariantu FAW w stosunku 1:1 oraz 1:2.



Rysunek S3. Wyniki zmian sygnału CD po dodatku (A) flufenazyny, (B) chloropromazyny oraz (C) amoksapiny w stosunku 1:1 oraz 1:2 do roztworu wariantu FA71W.



Rysunek S4. Wyniki zmian sygnału CD po dodatku amoksapiny w stosunku 1:1 oraz 1:2 do roztworu wariantu 58F/92Y.

Tabela SI. Statystyka przetwarzania danych dyfrakcyjnych dla kompleksów nowych wariantów BLG ko-krystalizowanych z lekami.

Wariant	LAW							
Ligand	AMT	CLO	DOX	KET	AMX	CET	PAL	MYR
Obecność liganda	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak
Statystyka przetwarzania danych								
Źródło promieniowania	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S
Grupa przestrzenna	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$
Parametry komórki elementarnej [Å]	a=b=52.05, c=112.05	a=b=53.01, c=110.70	a=b=52.62, c=111.26	a=b=53.41, c=109.43	a=b=52.85, c=111.70	a=b=53.35, c=109.48	a=b=52.90, c=112.14	a=b=52.78, c=111.72
Zakres rozdzielczości	21.26-2.00 (2.05-2.00)	19.94-2.00 (2.05-2.00)	19.99- 1.94 (1.99-1.94)	19.78- 1.37 (1.39- 1.37)	20.08-2.00 (2.05-2.00)	21.28-1.54 (1.57-1.54)	20.14-2.00 (2.05-2.00)	20.07-1.60 (1.63-1.60)
Całkowita liczba refleksów	119985	52400	65961	331898	12715	112227	128970	94208
Kompletność [%]	99.9 (100.0)	98.7 (98.9)	99.6 (99.9)	99.9 (100.0)	99.3 (98.1)	99.6 (98.8)	99.7 (99.9)	99.0 (97.2)
$I/\sigma(I)$	20.6 (3.3)	13.8 (4.0)	11.9 (2.1)	21.1 (2.4)	7.9 (2.6)	18.8 (2.3)	7.7 (3.8)	15.7 (2.2)
CC(1/2)	1.000 (0.897)	0.998 (0.898)	0.998 (0.799)	1.000 (0.792)	0.942 (0.860)	0.999 (0.772)	0.990 (0.835)	0.999 (0.817)
Redundancja	9.3 (9.7)	4.2 (4.4)	4.8 (3.7)	8.6 (6.4)	7.4 (7.3)	4.1 (2.8)	10.1 (9.9)	3.9 (2.8)
R_{merge}	0.082 (0.701)	0.061 (0.352)	0.077 (0.556)	0.047 (0.787)	0.052 (0.546)	0.037 (0.474)	0.059 (0.410)	0.038 (0.454)
R_{meas}	0.87 (0.741)	0.070 (0.401)	0.087 (0.645)	0.049 (0.856)	0.062 (0.657)	0.042 (0.579)	0.065 (0.527)	0.043 (0.557)

Tabela S2. Statystyka przetwarzania danych dyfrakcyjnych dla kompleksów nowych wariantów BLG ko-krystalizowanych z lekami.

Wariant	FAW				FA71W			
Ligand	AMX	CET	PAL	MYR	AMT	CLO	PAL	MYR
Obecność liganda	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak
Statystyka przetwarzania danych								
Źródło promieniowania	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S
Grupa przestrzenna	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$
Parametry komórki elementarnej [Å]	a=b=53.38, c=111.25	a=b=52.54, c=111.02	a=b=53.11, c=110.80	a=b=52.81, c=111.27	a=b=52.69, c=111.21	a=b=52.93, c=110.34	a=b=52.30, c=111.69	a=b=53.49, c=110.32
Zakres rozdzielczości	21.34-1.90 (1.94-1.90)	19.86-2.20 (2.27-2.20)	19.94-2.00 (2.05-2.00)	21.15-2.00 (2.05-2.00)	19.99-1.70 (1.73-1.70)	27.58-2.00 (2.05-2.00)	17.59-2.20 (2.27-2.20)	26.85-2.00 (2.05-2.00)
Całkowita liczba refleksów	131138	40386	58634	62844	79444	98581	76519	87369
Kompletność [%]	99.9 (99.8)	99.6 (100.0)	99.7 (99.9)	99.8 (100.0)	99.2 (97.8)	99.8 (100.0)	99.0 (96.1)	100.0 (100.0)
$I/\sigma(I)$	18.4 (2.5)	14.5 (3.1)	12.8 (2.8)	23.6 (2.7)	19.3 (2.2)	20.4 (4.1)	12.7 (2.9)	16.4 (1.9)
CC(1/2)	0.999 (0.669)	0.999 (0.723)	0.988 (0.768)	0.999 (0.769)	0.999 (0.727)	0.999 (0.865)	0.996 (0.848)	0.998 (0.625)
Redundancja	8.7 (6.6)	4.5 (4.2)	3.8 (3.4)	5.1 (5.0)	3.9 (2.7)	4.1 (2.8)	7.5 (7.1)	3.7 (2.5)
R_{merge}	0.072(0.817)	0.062 (0.411)	0.053 (0.728)	0.042 (0.592)	0.035 (0.475)	0.049 (0.451)	0.104 (0.658)	0.029 (0.806)
R_{meas}	0.077 (0.892)	0.072 (0.453)	0.068 (0.769)	0.047 (0.613)	0.040 (0.591)	0.052 (0.478)	0.119 (0.746)	0.041 (1.095)

Tabela S3. Statystyka przetwarzania danych dyfrakcyjnych dla kompleksów nowych wariantów BLG ko-krystalizowanych z lekami.

Wariant	58F/92Y					
Ligand	DOX	KET	FLU	CPZ	PAL	MYR
Obecność liganda	brak	brak	brak	brak	brak	brak
Statystyka przetwarzania danych						
Źródło promieniowania	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S	Synergy-S
Grupa przestrzenna	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$
Parametry komórki elementarnej [Å]	a=b=52.54, c=110.99	a=b=53.03, c=112.00	a=b=52.42, c=109.43	a=b=53.09, c=110.95	a=b=53.11, c=113.36	a=b=53.14, c=111.79
Zakres rozdzielczości	21.05-1.80 (1.84-1.80)	20.13- 1.80 (1.84-1.80)	21.28-2.20 (2.27-2.20)	19.94-2.20 (2.27-2.20)	18.78-2.20 (2.27-2.20)*	20.11-2.30 (2.38-2.30)
Całkowita liczba refleksów	167480	67912	58597	56728	78563	73309
Kompletność [%]	99.9 (100.0)	99.9 (99.8)	99.7 (100.0)	99.3 (98.4)	99.0 (99.1)	99.8 (100.0)
$I/\sigma(I)$	17.1 (1.7)	14.6 (2.5)	14.5 (2.8)	4.5 (1.5)	10.7 (2.2)	5.8 (1.5)
CC(1/2)	0.999 (0.608)	0.999 (0.788)	0.951 (0.846)	0.984 (0.496)	0.998 (0.846)	0.989 (0.662)
Redundancja	9.8 (6.1)	3.9 (3.0)	6.3 (6.0)	6.0 (5.4)	7.4 (7.1)	8.5 (8.0)
R_{merge}	0.080 (1.000)	0.047 (0.456)	0.068 (0.410)	0.082 (0.976)	0.068 (0.658)	0.064 (0.597)
R_{meas}	0.085 (1.094)	0.054 (0.554)	0.075 (0.444)	0.088 (0.987)	0.074 (0.692)	0.082 (0.764)

