

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Justina KAZOKAITĖ

**Žmogaus karboanhidrazių VI ir IX slopiklių
efektyvumo ir toksiškumo tyrimai**

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2018

Disertacija rengta 2014–2018 m. Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. **Daumantas Matulis** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

Disertacija ginama viešame disertacijos gynimo tarybos posėdyje.

Pirmininkė:

Prof. dr. **Sonata Jarmalaitė** (Nacionalinis vėžio institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

Nariai:

Prof. dr. **Saulius Serva** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P),

Dr. **Martti Tolvanen** (Turku universitetas, Suomija, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P),

Dr. **Aušra Sasnauskienė** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P),

Dr. **Arvydas Kanopka** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

Disertacija bus ginama viešame disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2018 m. rugsėjo 28 d. 13 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R402 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2018 m. rugpjūčio 28 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>.

VILNIUS UNIVERSITY

Justina KAZOKAITĖ

**Investigation of human carbonic anhydrase VI and
IX inhibitor efficacy and toxicity**

Summary of doctoral dissertation
Physical sciences, biochemistry (04 P)

Vilnius, 2018

Doctoral thesis work was performed from 2014 to 2018 at the Vilnius University, Lithuania.

Supervisor:

Prof. dr. **Daumantas Matulis** (Vilnius university, physical sciences, biochemistry – 04 P).

Dissertation will be defended at the public hearing before the defense committee.

Chairman:

Prof. dr. **Sonata Jarmalaitė** (National Cancer Institute, biomedical sciences, biology – 01 B).

Members:

Prof. dr. **Saulius Serva** (Vilnius university, physical sciences, biochemistry – 04 P),

Dr. **Martti Tolvanen** (University of Turku, Finland, physical sciences, biochemistry – 04 P),

Dr. **Aušra Sasnauskienė** (Vilnius university, physical sciences, biochemistry – 04 P),

Dr. **Arvydas Kanopka** (Vilnius university, physical sciences, biochemistry – 04 P).

The thesis defence will take place at the public defense hearing at Life Science Center, Vilnius University (auditorium R402, Saulėtekio 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania) at 1 p.m. on the 28th of September, 2018.

The summary of doctoral thesis was sent on the 28th of August, 2018.

The thesis is available at the Library of Vilnius University and on the website: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>.

Turinys

Įvadas	3
Disertacijos struktūra	6
Literatūros apžvalga	6
Metodai	6
Baltymų gamyba	6
Slopikliai	7
Baltymo-slopiklio sąveikos termodinaminė analizė	7
Stebimųjų ir tikrinių termodinaminių parametrų nustatymas	7
Slopiklių tyrimų danių embrionuose/lervose metodika	8
Slopiklių tyrimų <i>Xenopus</i> oocituose metodika	9
Slopiklių tyrimų žmogaus vėžinėse ląstelėse metodika	10
Rezultatai	12
Slopiklių jungimosi su CA VI termodinaminė analizė	12
Perspektyviausių CA IX slopiklių tyrimai modelinėse sistemose	15
Išvados	25
Mokslinių darbų sąrašas	26
Publikacijos, įtrauktos į disertaciją	26
Publikacijos, neįtrauktos į disertaciją	26
Konferencijų pranešimai	27
Padėka	29
Summary	30
Bibliografija	31

Įvadas

Šiuolaikinėje farmacijos rinkoje fermentai sudaro daugiau nei trečdalį įvairių vaistų taikinių [1]. Toks taikiniu pagrįstas vaistų kūrimas yra svarbus pradiniam etape, kai atrenkami tam tikri ligandai (slopikliai ar aktyvatoriai), sąveikaujantys su liga siejamu baltymu. Siekiama nustatyti tokių baltymų aktyvumo ar jų genų raiškos keitimo būdus, kurie būtų pritaikomi klinikiniuose tyrimuose.

Vieni iš tokių taikinių yra karboanhidrazės (CAs). Tai plačiai gamtoje paplitę fermentai, kurie yra žinomi daugiau nei 80 metų [2] ir įtraukti į įvairius tyrimus, pavyzdžiui, enzimologijos pagrindus ir klinikinę mediciną. Žmogaus organizme randama 12 kataliziškai aktyvių CA izoformų. Jų pagrindinė funkcija yra pH homeostazės palaikymas, katalizuojant grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją, kurios metu susidaro bikarbonato ir protono jonai. Ši reakcija yra esminė daugeliui fiziologinių procesų. Todėl kai kurie CA izoformų genų raiškos ar aktyvumo sutrikimai siejami su įvairiomis ligomis, pavyzdžiui, glaukoma, epilepsija, nutukimu ar navikų vystymusi. Šių ligų gydymui siekiama sukurti aukštu giminingumu ir atrankumu pasižyminčius slopiklius, sąveikaujančius tik su patologija susijusiomis CA izoformomis ir neturinčius reikšmingo poveikio kitoms, normaliai organizme funkcionuojančioms CA. Tačiau tai sudėtinga užduotis, nes žmogaus CA izoformų struktūros yra labai panašios tarpusavyje.

Sąveikos stiprumo tarp ligando ir žmogaus baltymo *in vitro* tyrimams paprastai naudojami rekombinantiniai baltymai. Todėl yra svarbu, kad rekombinantinis baltymas būtų tinkamas endogeninio natyvaus baltymo modelis. Tik šios sąlygos išpildymo atveju galima tikėtis terapinės naudos pacientams, jei vyks tolimesni junginio klinikiniai tyrimai. Įdomu tai, kad žmogaus CA VI izoforma gali būti išgryninta iš *Escherichia coli* bakterijų ir žmonių seilių. Todėl galima palyginti junginio giminingumą rekombinantinei CA VI ir endogeninei natyviai CA VI, išskirtai iš žmonių seilių (toliau tekste vadinama natyvia CA VI).

Šiuo metu žinomas platus spektras ligų, siejamų su CA izoformomis. Nustatyta, kad CA IX baltymo kiekis padidėja vystantis navikams esant hipoksijos sąlygoms, tačiau CA IX dažniausiai neaptinkama sveikuose audiniuose. Norint slopinti CA IX katalizinį aktyvumą, viena iš sėkmingiausių iki šiol žinomų strategijų yra paremta sulfonamidinių junginių panaudojimu. Nors daug sulfonamidinių CA IX slopiklių yra sukurta ir aprašyta literatūroje, tik keletas tokių junginių pasiekė klinikinius tyrimus, tačiau jų rezultatai yra neigiami arba kol kas nėra žinomi. Todėl skirtingų, efektyvesnių sulfonamidinių CA IX slopiklių kūrimas ir jų nauda pacientams išlieka aktualūs tyrimų aspektai.

Dažniausiai pritaikomas metodas CA katalizinio aktyvumo tyrimuose yra sustabdytos srovės CO₂ hidratacijos metodas. Deja jis turi keletą trūkumų, pavyzdžiui, nežinoma tiksli CO₂ koncentracija [3]. Todėl biofizikiniai metodai, tokie kaip fluorescencinis terminio poslinkio metodas ir izoterminė titravimo kalorimetrija, yra perspektyvios alternatyvos, siekiant nustatyti *stebimuosius* jungimosi termodinaminius parametrus ir pagal

juos apskaičiuoti *tikrines* sąveikos stiprumą apibūdinančias vertes. Tikriniai parametrai nepriklauso nuo eksperimentų sąlygų ir įvertina protonizacijos reakcijų, vykstančių slopikliui jungiantis su baltymu, įtaką. Todėl tik tikrines jungimosi parametrų vertės yra reikšmingos molekulių atpažinimo mechanizmų supratimui ir kuo aukštesniu giminingumu baltymui pasižyminčių junginių kūrimui.

Fermentinio slopinimo ir biozikiniais metodais gautų duomenų lyginimas su biologinių tyrimų rezultatais reikšmingai sustiprina išvadas apie junginio struktūros-aktyvumo sąryšį. Tai yra svarbu vaistų kūrimui ir vystymui. Pastaraisiais metais žuvis danijos (lot. *Danio rerio*) ir varlės *Xenopus laevis* kaip patogūs, stuburiniai, modeliniai organizmai žymiai prisidėjo prie junginių savybių charakterizavimo, taip užpildant spragą tarp tradicinių fermentinių, biofizikinių metodų ir ikiklinikinių *in vitro* tyrimų, naudojant žmogaus vėžines ląsteles. Vis dėlto dažna biomedicininė tyrimų praktika yra paremta žmogaus vėžinėmis ląstelėmis kaip modeline sistema priešvėžinių junginio savybių nustatymui. Apibendrinant, biofizikinių, biocheminių ir biologinių metodų pritaikymas yra būtinas išsamiam junginio savybių įvertinimui pradiniam vystymo etape.

Tikslas

Palyginti rekombinantinės bei natyvos CA VI tikrinius jungimosi su slopikliais parametrus ir įvertinti perspektyviausių CA IX slopiklių poveikius biologinėse sistemose kaip pradinį žingsnį priešvėžinių vaistų vystymo link.

Užduotys

- Išmatuoti tam tikrų sulfonamidinių slopiklių jungimosi su rekombinantine ir natyvia CA VI stebimuosius parametrus.
- Iš tam tikrų sulfonamidinių slopiklių grupės atrinkti aukščiausiu giminingumu rekombinantinei CA VI pasižymintį slopiklį, remiantis stebimaisiais ir tikriniais jungimosi parametrais.
- Nustatyti aktyviajame rekombinantinės ir natyvos CA VI centre prie cinko prisijungusios vandens molekulės protonizacijos konstantas ir protonizacijos entalpijas.
- Ištirti toksinį perspektyviausių CA IX slopiklių poveikį danijų embrionuose/lervose.
- Nustatyti perspektyviausių CA IX slopiklių įtaką pH pokyčiams heterologines CA izoformas turinčiuose *Xenopus laevis* oocituose.
- Panaudojant žmogaus gimdos kaklelio (HeLa), plaučių (H460, A549), krūties (MDA-MB-231) ir kasos (AsPC-1) vėžines ląsteles *in vitro*, įvertinti perspektyviausių CA IX slopiklių funkcinis aktyvumus ir įtaką gyvybingumui.

Mokslinis naujumas

Šiame darbe pirmą kartą buvo įvertinti tam tikrų sulfonamidinių junginių sąveikos su CA VI stebimieji ir tikriniai termodinaminiai parametrai. Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp slopiklių giminingumų natyviai CA VI, išgrynintai iš žmonių seilių, ir rekombinantinei CA VI, gautai panaudojus *Escherichia coli* bakterijas, nenustatyta. Todėl rekombinantinė CA VI yra tinkamas natyvios CA VI modelis biofizikiniuose tyrimuose. Be to, literatūroje dažniausiai pateikiami tik stebimieji slopiklių jungimosi su baltymais parametrai. Šiame darbe tirti stebimieji bei tikriniai jungimosi parametrai ir parodyta, kad stebimieji parametrai gali būti klaidinantys sąryšio tarp junginio struktūros bei jungimosi giminingumo nustatyme.

Pastaraisiais metais daug dėmesio buvo skiriama priešvėžinių CA IX slopiklių kūrimui. Šioje disertacijoje pateikti naujų CA IX slopiklių VD11-4-2, VD12-09 ir VR16-09 tyrimų rezultatai. Tai fluorinti benzensulfonamidai, kurie hidrofobiniais pakaitais *orto* ir *meta* pozicijose skiriasi nuo jau publikuotų junginių. Tokios hidrofobinės grupės užtikrina šių slopiklių aukštą atrankumą ir giminingumą CA IX, kaip parodyta fermentiniais ir biofizikiniais metodais bei patvirtinta rentgenostruktūrine analize.

Šiame darbe danijų embrionų/lervų, *Xenopus* oocitų ir žmogaus vėžinių ląstelių modelinės sistemos buvo panaudotos kartu su fermentiniais ir biofizikiniais metodais, siekiant įvertinti naujų CA IX slopiklių efektyvumą. *Xenopus* oocituose pirmą kartą parodytas VD11-4-2 junginio efektyvumas, atrankiai slopinant heterologinę CA IX biologinėje sistemoje ($IC_{50} = 15$ nM). Tyrimų žmogaus vėžinėse ląstelėse rezultatai pirmą kartą parodė nuo CA IX priklausomą slopiklių funkcinę aktyvumą, kai slopikliai buvo pritaikyti ląstelių mitybinės terpės rūgštinimo slopinimui hipoksijos sąlygomis. Be to, klonogeninės analizės eksperimentai atskleidė reikšmingą, nuo hipoksijos priklausomą junginių įtaką ląstelių gyvybingumui, kai buvo panaudotas erdvinis (3D) ląstelių modelis. Taigi šioje disertacijoje pateikiama nauja koncepcija, paremta biocheminių, biofizikinių ir ląstelės biologijos metodų derinimu. Pagal gautus duomenis galima charakterizuoti junginių efektyvumą, o ši informacija yra vertinga tolimesniam jų vystymui.

Ginamieji teiginiai

- Rekombinantinė CA VI yra tinkamas natyvios CA VI modelis sąveikos su sulfonamidiniais slopikliais tyrimams ir tik tikriniai jungimosi parametrai gali būti koreliuojami su junginio struktūromis tikslingai kuriant vaistus.
- Prieš pradėdant klinikinius tyrimus, fermentinių ir biofizikinių metodų derinimas su eksperimentais biologinėse modelinėse sistemose, pavyzdžiui, danijose, *Xenopus* oocituose bei žmogaus vėžinėse ląstelėse, suteikia reikšmingos informacijos apie junginio veikimo pobūdį ir efektyvumą.
- Fermentiniais ir biofizikiniais metodais parodytas bei danijų embrionuose/lervose, *Xenopus* oocituose ir žmogaus vėžinėse ląstelėse patvirtintas aukštas naujų CA IX slopiklių efektyvumas rodo, kad šie junginiai gali būti toliau vystomi kaip CA IX atrankūs vaistai priešvėžinėje terapijoje.

Disertacijos struktūra

Disertaciją sudaro septynios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, metodų dalis, rezultatai, diskusija, išvados ir literatūros sąrašas. Čia pateikiama disertacijos santrauka.

Literatūros apžvalga

Literatūros apžvalgoje aprašyta hipoksija kaip vienas iš svarbių naviko mikroaplinkos bruožų ir pateikti ląstelės prisitaikymo prie hipoksijos būdai. Apžvelgti ląstelės baltymai, palaikantys pH homeostazę, bei jų veikimo mechanizmai.

Vieni iš fermentų, reguliuojančių H^+ , CO_2 ir HCO_3^- jonų koncentracijas ląstelės viduje ir užląstelinėje erdvėje, yra karboanhidrazės (CA). Literatūros apžvalgoje aptartos dviejų žmogaus CA izoformų, CA VI ir CA IX, struktūros bei funkcijos. CA VI yra ypatinga tuo, kad yra vienintelė sekretuojama CA izoforma, randama seilėse, piene, ašarose [4–6]. CA IX yra svarbi daugelio navikų charakteristika [7, 8], kurios geno raiška dažniausiai padidėja hipoksijos sąlygomis [9]. Dažniausiai CA IX nerandama sveikuose audiniuose. Todėl CA IX baltymas yra pripažintas taikiny s priešvėžinių vaistų kūrimui [10]. Be to, šioje dalyje aprašytas ligų spektras, siejamas su kitomis CA izoformomis, pristatytos žinomos CA fermentinio aktyvumo keitimo strategijos ir danių bei *Xenopus* oocitų kaip modelinių sistemų pritaikymo galimybės CA tyrimų srityje.

Literatūros apžvalgoje pateikti pagrindiniai vaistų kūrimo ir vystymo etapai bei informacija apie svarbiausių cheminių junginių ir antikūnų, sąveikaujančių su pH reguliuojančiais baltymais, klinikinius tyrimus.

Metodai

Baltymų gamyba

Natūralios karboanhidrazės VI gavimas

Tyrimo dalyvavo 10 savanorių, kurie buvo 20–44 metų amžiaus. Dalyviai buvo supažindinti su eksperimento eiga ir surinkti jų pasirašyti sutikimai dalyvauti eksperimente. Tyrimo metodologija atitiko Helsinkio deklaracijos standartus ir ją patvirtinto Biotechnologijos Instituto etikos komitetas (protokolo numeris 2014/06/25, Nr. 63). Natūrali CA VI gryninta iš 0,5 L seilių pagal Parkkilos ir jo kolegų metodiką [11]. Gauta ~5 mg baltymo.

Rekombinantinės karboanhidrazės VI gavimas

Sukonstruota plazmidė su tiksliniu genu, koduojančiu UniProtKB duomenų bazėje paskelbtą žmogaus CA VI seką (P23280) nuo 21 iki 290 aminorūgšties. Geno klonavimas, raiška ir rekombinantinio baltymo gryninimas iš *Escherichia coli* (*E. coli*) atlikti pagal anksčiau publikuotą metodiką [12]. Rekombinantinės CA VI gryninimą iš žinduolių FreeStyle 293-F ląstelių atliko Jurgita Matulienė pagal [13].

Slopikliai

CA slopikliai etokzolidas (EZA) ir acetazolamidai (AZM) buvo pirkti (Sigma-Aldrich). Benzensulfonamidai (BSA) gauti iš prof. Peteris Trapencieris (Latvijos Organinės Sintezės Institutas, Ryga). Kitus CA slopiklius, naudotus tyrimuose, susintetino Virginija Dudutienė (Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyrius, Biotechnologijos institutas, Vilniaus universitetas). Jie buvo anksčiau publikuoti [14].

Baltymo-slopiklio sąveikos termodinaminė analizė

Fluorescencinis terminio poslinkio metodas (FTSA)

Tai biofizikinis metodas, leidžiantis vieno eksperimento metu nustatyti tiek silpnai, tiek stipriai besijungiančius slopiklius bei įvertinti terminį baltymo stabilumą. FTSA eksperimentai atlikti Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen Rotor-Gene Q) spektrofluorimetru (žadinimas 365 ± 20 nm, emisija 460 ± 15 nm). Baltymo tirpalas su skirtingomis junginio koncentracijomis buvo kaitinamas nuo 25°C iki 99°C , keliant temperatūrą 1°C min^{-1} greičiu. Naudojant solvatochrominį dažą natrio 8-anilino-1-naftaleno sulfonata (ANS), matuotas fluorescencijos signalas. Pagal gautus duomenis nustatyta baltymo lydymosi temperatūra (T_m). Esant tokiai temperatūrai, išsivyniojusio ir natyvaus baltymo koncentracijos yra lygios. Šio parametro pokytis pridėjus skirtingus junginius yra proporcingas sąveikos tarp baltymo ir junginio giminingumui. Tirpalus sudarė $5\ \mu\text{M}$ - $10\ \mu\text{M}$ baltymo, $0\ \mu\text{M}$ - $200\ \mu\text{M}$ junginio, $50\ \mu\text{M}$ ANS (Sigma-Aldrich), $50\ \text{mM}$ natrio fosfato buferinio tirpalo (pH 7,0), turinčio $100\ \text{mM}$ NaCl ir 2% DMSO. Bendras mėginio tūris buvo $20\ \mu\text{l}$. Siekiant nustatyti slopiklio jungimosi konstantos (K_b) priklausomybę nuo buferinio tirpalo pH, naudotas $50\ \text{mM}$ natrio fosfato, $50\ \text{mM}$ natrio acetato ir $25\ \text{mM}$ natrio borato buferinis tirpalas (pH 5,5-9,5). Norint sužinoti, kokiam buferiniame tirpale baltymas stabiliausias, įvertinta įvairių buferinių tirpalų ir jų pH įtaka baltymo T_m . Kuo aukštesnė T_m , tuo stabilesnis baltymas tiriamose sąlygose. Gauti duomenys analizuoti pagal publikuotą modelį [15].

Izoterminė titravimo kalorimetrija (ITC)

Tai biofizikinis metodas, kuriuo remiantis galima nustatyti baltymo-junginio sąveikos termodinaminius parametrus, tokius kaip stecheometrija, giminingumą, entalpijos bei entropijos pokyčius ir šiluminę talpą. ITC matavimai atlikti VP-ITC kalorimetru (Microcal, Inc.). Eksperimento pradžioje paruošti baltymo ir junginio tirpalai, turintys 1% DMSO. Kalorimetro celė, kurios tūris $1,4315\ \text{ml}$, užpildyta $4\ \mu\text{M}$ - $6\ \mu\text{M}$ baltymo tirpalu, o $300\ \mu\text{l}$ tūrio švirkštas – $40\ \mu\text{M}$ - $60\ \mu\text{M}$ junginio tirpalu. Baltymo tirpalas titruotas inekuojant 25 injekcijas po $10\ \mu\text{l}$ ligando tirpalo $200\ \text{s}$ - $240\ \text{s}$ intervalais. Siekiant nustatyti sąveikos entalpijos pokyčio priklausomybę nuo pH, eksperimentai atlikti 25°C arba 37°C temperatūrose, naudojant $50\ \text{mM}$ natrio fosfato arba $50\ \text{mM}$ Tris buferinius tirpalus (pH 5,5-9,5), turinčius $100\ \text{mM}$ NaCl bei 1% DMSO. Duomenys analizuoti MicroCal Origin programine įranga, remiantis publikuotu straipsniu [16].

Stebimųjų ir tikrinių termodinaminių parametrų nustatymas

Kai fermentiniais ar biofizikiniais metodais matuojama sąveika tarp cheminio junginio ir CA fermento, nustatomi *stebimieji* jungimosi parametrai. Tačiau jie neatspindi tikrojo junginio giminingumo baltymui, nes šie abu besijungiantys komponentai tirpale yra skirtingos protonizacijos būsenos nei komplekse. Sąveika vyksta, kai CA aktyviajame centre prie cinko jono yra prisijungusi vandens molekulė (protonizuotas hidroksido jonas), o junginio sulfonamidinė grupė yra deprotonizuota. Todėl protonizacijos-deprotonizacijos

reakcijos yra reikalingos, kad būtų inicijuotas slopiklio jungimasis su CA. Atėmus protonizacijos reakcijų indėlių stebimajai jungimosi energetikai, gaunami *tikriniai* jungimosi parametrai. Tikrinės vertės, skirtingai nuo stebimųjų parametru, nepriklauso nuo eksperimento sąlygų, pavyzdžiui, buferinio tirpalo ir jo pH. Todėl tikriniai parametrai yra reikšmingi giminingumo įvertinimui, molekulinį atpažinimo mechanizmų supratimui ir tolimesniam junginio vystymui.

Tikrinė jungimosi konstanta (K_{b_intr}) apskaičiuojama pagal lygtį:

$$K_{b_intr} = \frac{K_{b_obs}}{f_{CAZnH_2O} f_{RSO_2NH^-}} \quad (1)$$

f_{CAZnH_2O} ir $f_{RSO_2NH^-}$ yra atitinkamai CA baltymo, kai jo aktyviajame centre prie cinko jono prisijungusi vandens molekulė, ir deprotonuoto sulfonamidinio (SA) slopiklio frakcijos. Jos nustatomos pagal lygtis:

$$f_{CAZnH_2O} = \frac{10^{pK_{a,CA}-pH}}{1 + 10^{pK_{a,CA}-pH}} \quad (2)$$

$$f_{RSO_2NH^-} = \frac{10^{pH-pK_{a,SA}}}{1 + 10^{pH-pK_{a,SA}}} \quad (3)$$

Stebimasis ar tikrinis junginio giminingumas dažnai literatūroje nurodomas pateikiant disociacijos konstantą (K_d):

$$K_d = \frac{1}{K_b} \quad (4)$$

Pagal stebimąsias ar tikrines K_b ir K_d vertes galima apskaičiuoti stebimąją ar tikrinę jungimosi Gibso energiją ($\Delta_b G$):

$$\Delta_b G = -RT \ln K_b = -RT \ln \frac{1}{K_d} = \Delta_b H - T \Delta_b S \quad (5)$$

Tikrinė jungimosi entalpija (H_{b_intr}) apskaičiuojama pagal lygtį:

$$\Delta_b H_{intr} = \Delta_b H_{obs} - n_{SA} \Delta_p H_{SA} - n_{CA} \Delta_p H_{CA} + n_{buf} \Delta_p H_{buf} \quad (6)$$

kur $\Delta_b H_{obs}$ yra stebimoji jungimosi entalpija (išmatuojama eksperimentiškai), $\Delta_p H_{SA}$, $\Delta_p H_{CA}$ ir $\Delta_p H_{buf}$ yra atitinkamai junginio (SA grupės), CA baltymo (aktyviajame centre prie cinko jono prisijungusios vandens molekulės) ir buferinio tirpalo protonizacijos entalpijos. $n_{SA} = f_{RSO_2NH^-} - 1$ yra nuo slopiklio į buferinį tirpalą perneštų protonų skaičius, $n_{CA} = 1 - f_{CAZnH_2O}$ yra iš buferinio tirpalo prie CA aktyviajame centre esančio hidroksido jono prisijungusių protonų skaičius, $n = n_{CA} + n_{SA}$ yra iš buferinio tirpalo gautų ar buferiniam tirpalui atiduotų protonų skaičius.

Slopiklių tyrimų danijų embrionuose/lervose metodika

Eksperimentai atlikti Tamperės Universitete, Suomijoje, laikantis nustatytų standartų (protokolo nr. LSLH-2007-7254/Ym-23). Danijų embrionai auginti iki 6 dienų 28,5 °C temperatūroje, naudojant terpę, sudarytą iš 5,0 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄ ir 0,1 % metileno mėlio.

Fenotipo pokyčių tyrimai. Danijų embrionai inkubuoti terpėje esant $1\ \mu\text{M}$ - $1000\ \mu\text{M}$ VD11-4-2, VD12-09 arba EZA. Kontrolinėje grupėje naudoti laukinio tipo embrionai bei embrionai, inkubuoti terpėje esant $0,1\ \%$ - $1,0\ \%$ DMSO. Slopiklių įtaka danijų embrionų/lervų mirtingumui ir sukelti fenotipo pokyčiai buvo įvertinami šviesiniu mikroskopu (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) kas 24 val. 5 dienas iš eilės. Kreivės, parodančios nuo koncentracijos priklausomą junginių įtaką danijų lervų mirtingumui po 5 dienų poveikio, nubrėžtos Origin 7.0 (OriginLab) programa, remiantis Hilo modeliu, kai Hilo koeficientas lygus 4-8. Taikant Hilo modelį, nustatytos slopiklių koncentracijos, sukeliančios $50\ \%$ tirtų danijų lervų mirtingumą (LC_{50}).

Histologinė analizė. Danijų lervos po 5 dienų slopiklių poveikio buvo 3 val. inkubotos $4\ \%$ formalino fosfatiniame buferiniame tirpale kambario temperatūroje. Po to danijų lervos buvo laikomos $70\ \%$ etanolyje esant $4\ ^\circ\text{C}$ temperatūrai iki pjūvių mėginių ruošimo, kuriuos atliko Ashok Aspatwar (Tampėres Universitetas, Suomija) pagal publikuotą metodiką [17].

Slopiklių tyrimų *Xenopus* oocituose metodika

Eksperimentai atlikti Kaiserslauterno Universitete, Vokietijoje, laikantis nustatytų standartų (protokolo nr. 23 177-07/A07-2-003 §6). Oocitai paruošti eksperimentams pagal publikuotą metodiką [18]. Į oocitus įvesta $1\ \text{ng}$ - $6\ \text{ng}$ RNR, koduojančios žmogaus CA II, CA IV, CA IX arba CA XII.

pH matavimai. Heterologinių CA izoformų fermentinio aktyvumo nustatymui atlikti pH matavimai oocituose, naudojant buferinį tirpalą, sudarytą iš $82,5\ \text{mM}$ NaCl, $2,5\ \text{mM}$ KCl, $1\ \text{mM}$ CaCl₂, $1\ \text{mM}$ MgCl₂, $1\ \text{mM}$ Na₂HPO₄ ir $5\ \text{mM}$ Hepes (pH 7,8), bei analogišką tirpalą, kuriame buvo $5\ \%$ CO₂, o vietoj $25\ \text{mM}$ NaCl naudota $25\ \text{mM}$ NaHCO₃. Mikroelektrodai viduląstelinio ir užląstelinio pH matavimo eksperimentams oocituose paruošti pagal publikuotą metodiką [18]. Prieš kiekvieną eksperimentą elektrodai kalibruoti, naudojant du Hepes buferinius tirpalus, kurių pH 7,4 arba 6,8. Viduląstelinio pH matavimo eksperimentuose mikroelektrodas įvestas į oocitų vidų ir įtvirtintas pozicijoje, kad būtų kuo arčiau membranos iš vidinės ląstelės pusės. Užląstelinio pH matavimo eksperimentuose mikroelektrodas priglauostas kuo arčiau membranos išorinės pusės, užtikrinant, kad mikroelektrodas į ląstelės vidų nebūtų įvestas. Analizuojant duomenis, nustatyta elektrodo potencialo priklausomybė nuo pH prieš ir po oocito poveikio su slopikliu. Pritaikius tiesinės regresijos modelį, įvertintas viduląstelinio [H⁺] kitimo greitis ($\Delta[\text{H}^+]_i/\Delta t$). Išmatuotos užląstelinio [H⁺] ($\Delta[\text{H}^+]_s$) pokyčių amplitudės. Slopiklių koncentracijos, sumažinančios CA izoformos fermentinį aktyvumą $50\ \%$, nustatytos remiantis Hilo modeliu, kai Hilo koeficientas lygus 0.5.

Masių spektrometrija. Slopiklių poveikis heterologinių CA izoformų fermentiniam aktyvumui oocituose patvirtintas masių spektrometrijos (MS) metodu, naudojantis kvadrupoliniu masių spektrometru (OmniStar GSD 320, Pfeiffer Vacuum). Žymėto ¹³C¹⁸O₂ hidratacijos reakcijų metu gali susidaryti 3 junginiai, turintys skirtingą masės ir krūvio santykį (m/z): ¹³C¹⁸O¹⁸O (m/z = 49), ¹³C¹⁸O¹⁶O (m/z = 47) ir ¹³C¹⁶O¹⁶O (m/z = 45). Tyrimams naudoti 20 natyvių, neturinčių CA, arba 20 oocitų su tam tikra heterologine CA izoforma lizatai. Pirmu atveju hidratacijos reakcijos buvo lėtos, o antru atveju CA fermentai katalizavo hidratacijos reakcijas ir jos vyko greičiau. Įvertinant katalizuojamos reakcijos ¹⁸O kitimo greitį pagal 3 skirtingų izotopų kiekius ir jį palyginant su nekatalizuojamos reakcijos greičiu, galima nustatyti CA fermentinį aktyvumą [19] ir jo priklausomybę nuo tam tikro slopiklio koncentracijos. Vykdytų MS eksperimentų metu

įvertintas 1 nM ir 10 nM VD11-4-2 slopiklio poveikis heterologinės CA IX fermentiniam aktyvumui 25 °C temperatūroje. Nekatalizuojamos reakcijos metu vykstantis ^{18}O kitimas matuotas 5 min, po to į mėginio kiuvetę įpiltas oocitų lizatas ir toliau 5 min matuoti ^{18}O pokyčiai. Po to į tą pačią kiuvetę įpilta didėjančios koncentracijos slopiklio tirpalo, kiekvieną kartą oocitų lizatą su skirtingos slopiklio koncentracijos tirpalu inkubuojant po 5 min ir tuo pačiu metu nustatant ^{18}O pokyčius.

Slopiklių tyrimų žmogaus vėžinėse ląstelėse metodika

Ląstelių kultivavimas. Žmogaus gimdos kaklelio (HeLa), plaučių (H460, A549), krūties (MDA-MB-231) ir kasos (AsPC-1) vėžinės ląstelės kultivuotos Dulbecco modifikuotoje Eagle mitybinėje terpėje (DMEM, Lonza) su 10 % fetalinio veršelio serumo (FBS, Lonza) 37 °C temperatūroje, esant 21 % O_2 ir 5 % CO_2 . MS eksperimentuose naudotos skirtingos MDA-MB-231 ir HeLa ląstelių mitybinės terpės. Gyvybingumo nustatymo, MS ir užląstelinio rūgštinimo (pH) eksperimentuose dalis ląstelių buvo inkubuotos 0,2 % O_2 , 5 % CO_2 bei 94,8 % N_2 sąlygomis hipoksijos kameroje (MACS VA500, Don Whitley Scientific), esant 37 °C temperatūrai. Remiantis CRISPR-Cas9 technologija, HeLa ląsteles, neturinčias CA IX baltymo, paruošė Gabor Gondi (Helmholtz Centre, Vokietijoje) ir Raymon Niemans (Mastrichto Universitete, Olandijoje). Stažuotės Mastrichto Universitete metu prisidėjau prie ląstelių kultivavimo ir atrankos pagal imunoblotingo metodą, kai tikrintas CA IX baltymo kiekis.

Masių spektrometrija. Eksperimentus atliko Holger M. Becker (Hanoverio Veterinarinės Medicinos Universitete, Vokietijoje). Naudotos nelizuotos MDA-MB-231 ir HeLa vėžinės ląstelės. Kaip ir eksperimentuose su oocitais, metodas paremtas žymėto $^{13}\text{C}^{18}\text{O}_2$ kiekio kitimu, tačiau šiuo atveju hidratacijos reakciją katalizavo užląstelinės CA izoformos. MDA-MB-231 kultivuotos Gibco Leibovitz-L15 terpėje (Life Technologies) su 10 % FBS, 5 mM gliukozės ir 1 % penicilino/streptomicino. HeLa kultivuotos RPMI-1640 terpėje (Sigma Aldrich) su 10 % FBS ir 1 % penicilino/streptomicino. Prieš eksperimentą ląstelės augintos 72 val. hipoksijos sąlygomis (1 % O_2). MDA-MB-231 ląstelės 3 val. inkubuotos su slopikliais arba DMSO ir po to suspenduotos Hepes buferiniame tirpale (143 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 1 mM Na_2HPO_4 , 10 mM Hepes, pH 7,2). Nekatalizuojamos reakcijos metu vykstantis ^{18}O kitimas matuotas 6 min, po to į mėginio kiuvetę įpilta MDA-MB-231 ląstelių, paveiktų slopikliu arba DMSO, suspensija ir toliau 8 min matuoti ^{18}O pokyčiai. Pritaikius CRISPR-Cas9 sistemą, HeLa ląstelėse nuslopinta geno, koduojančio CA IX baltymą, raiška. MS eksperimento metu tokios ląstelės inkubuotos su slopikliu, kai slopiklio tirpalas buvo įpilamas į ląstelių suspensiją kiuvetėje.

Užląstelinio rūgštinimo (pH) eksperimentai. HeLa, H460, MDA-MB-231 ir AsPC-1 ląstelės kultivuotos DMEM terpėje su 10 % FBS. Mitybinė terpė A549 ląstelėms pagaminta laboratorijoje. Ši terpė analogiška DMEM terpei, tačiau joje sumažinta NaHCO_3 koncentracija iki 10 mM. Pirmą eksperimento dieną, likus 24 val. iki poveikio slopikliais, buvo užsėjamos ląstelės. Kiekvienai ląstelių linijai parinkti tokie tankiai, kad eksperimento pabaigoje būtų gautas didžiausias galimas ląstelių mitybinės terpės rūgštinimo rezultatas. Ląstelės inkubuotos DMEM terpėje su 5 μM -50 μM VR16-09, VD11-4-2, VD12-09 arba 0,05 % DMSO ir 72 val. augintos inkubatoriuje su 21 % O_2 arba perkeltos į hipoksijos kamerą (0,2 % O_2). Penktą eksperimento dieną matuoti pH pokyčiai pagal publikuotą metodiką [20].

Ląstelių gyvybingumo nustatymas. Naudojant alamarBlue[®] reagentą (Life Technologies), vertinta slopiklių įtaka ląstelių gyvybingumui. Ląstelės buvo užsėjamos 24 val. iki poveikio slopikliais. Tuomet jos 72 val. inkubuotos DMEM terpėje su 10 μM-150 μM VR16-09, VD11-4-2, VD12-09 arba 0,25 % DMSO, esant 21 % arba 0,2 % O₂. Po to nuo ląstelių slopiklio tirpalas nusiurbtas ir užpilta 10 % alamarBlue[®] reagento tirpalo. Inkubuota 2 val. 37 °C temperatūroje, esant 21 % O₂. Matuotas fluorescencijos signalas spektrofotometru (FLUOstar[®] Omega, BMG Labtech), sužadavimo bangos ilgis 540 nm, emisijos – 580 nm. Remiantis Hilo modeliu, įvertintos koncentracijos, lemiančios ląstelių gyvybingumo sumažėjimą 50 % (*EC*₅₀).

Klonogeninė analizė. Šiuose tyrimuose panaudotos monosluoksnio dvimatės (2D) HeLa ir 3D H460 ląstelių kultūros. HeLa ląstelės buvo užsėjamos tokiu tankiu, kaip pH eksperimentuose, likus 24 val. iki poveikio junginiais. Jos 72 val. inkubuotos DMEM terpėje su 10 μM-50 μM VR16-09, VD11-4-2, VD12-09 arba 0,05 % DMSO, esant 21 % arba 0,2 % O₂. Tuomet ląstelės išsėtos kolonijų formavimui, kuris vyko 14 dienų. H460 sferoidai auginti 4 arba 11 dienų, 24 val. inkubuoti DMEM terpėje su 5 μM-15 μM VR16-09 arba 0,05 % DMSO ir suspenduoti iki pavienių ląstelių. Jos išsėtos kolonijų formavimui, kuris vyko 14 dienų. Kolonijos dažytos ir fiksuotos 0,4 % metileno mėlio tirpalu, paruoštu 70 % etanolyje, suskaičiuotos ir įvertintas slopiklių poveikis gyvybingumui.

H460 sferoidų auginimas. Autoklavuotu 1,5 % agarozės (Sigma-Aldrich) tirpalu, paruoštu DMEM terpėje, padengti 60 vidinių šulinėlių 96 šulinėlių plokštelėje. Po 500 H460 ląstelių užsėta į kiekvieną šulinėlį su polimerizuota agaroze. DMEM mitybinė terpė keista kas 2 dienas. Po 7 arba 11 augimo dienų H460 sferoidai 2 val. inkubuoti su 20 μg/ml pimonidazolu (PIMO, Hypoxyprobe-1, HP-1000, BioConnect) 37 °C temperatūroje, surinkti ir užšaldyti imunofluorescencinei analizei. Kita dalis H460 sferoidų auginti 4 arba 11 dienų, 24 val. inkubuoti DMEM terpėje su 5 μM-15 μM VR16-09 arba 0,25 % DMSO ir surinkti klonogeninei analizei.

Imunoblotingo metodas. Baltymų tirpalų paruošimas ir detekcija atlikti pagal publikuotą metodiką [20]. Naudoti pirminiai antikūnai, atpažįstantys CA IX (M75, skiedimas 1:40, gauta iš prof. Silvia Pastorekova, Slovakijos Mokslų Akademija, Slovakija), CA XII (15A4, skiedimas 1:100, gauta iš prof. Aurelija Žvirblienė, Vilniaus Universitetas, Lietuva), MCT1 (skiedimas 1:100) ir MCT4 (skiedimas 1:400, gauta iš Holger M. Becker, Hannoverio Veterinarinės Medicinos Universitetas, Vokietija), lamina A (skiedimas 1:10 000, Sigma-Aldrich) ir aktiną (1:2 000 000, MP Biomedicals). Pirminių antikūnų nustatymui naudoti atitinkami antriniai antikūnai (skiedimas 1:2000, Cell Signaling).

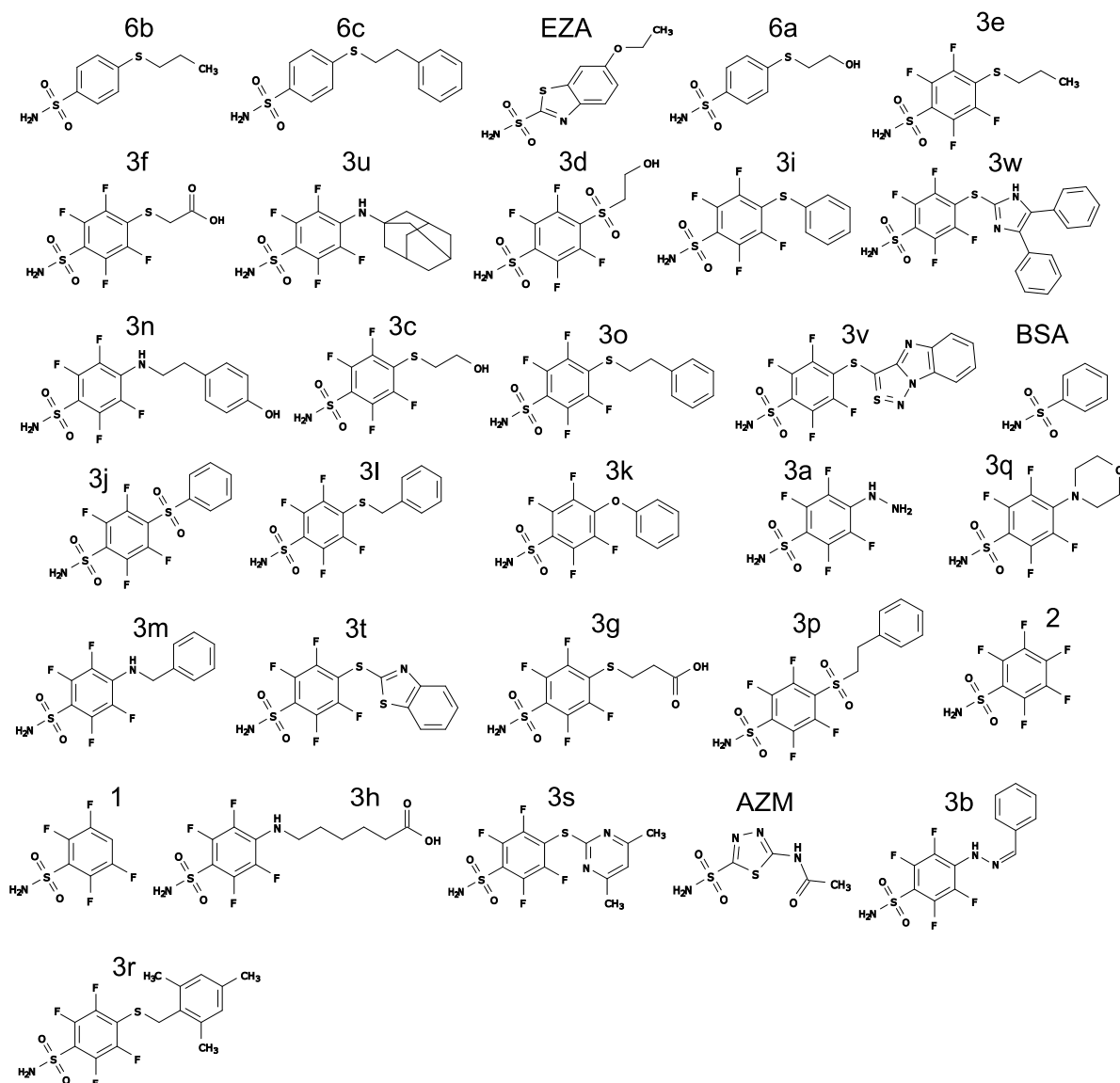
Imunofluorescencinė analizė. Paruošti 7 μm užšaldytų H460 sferoidų pjūviai. Mėginiai fiksuoti acetonu (4 °C, 10 min) ir toliau dirbta pagal publikuotą metodiką [20]. Naudoti pirminiai antikūnai, atpažįstantys PIMO ir CA IX, bei šiuos pirminius antikūnus atpažįstantys antriniai antikūnai, atitinkamai Alexa Fluor[®] 488 ir Alexa Fluor[®] 594 (abiejų skiedimas 1:500, Invitrogen). Branduolio vaizdinimui mėginiai inkubuoti su 5 μg/ml 2-(4-amidinofenil)-1*H*-indolo-6-karboksamidinu (DAPI, Life Technologies) 2 min kambario temperatūroje.

Statistinė analizė. Naudota GraphPad Prism (6.01) programa. Pagal duomenų pasiskirstymą, pritaikytas Stjudento *t* arba Mann–Whitney *U* testas. Skirtumai tarp grupių laikyti statistiškai reikšmingais, kai reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Rezultatai

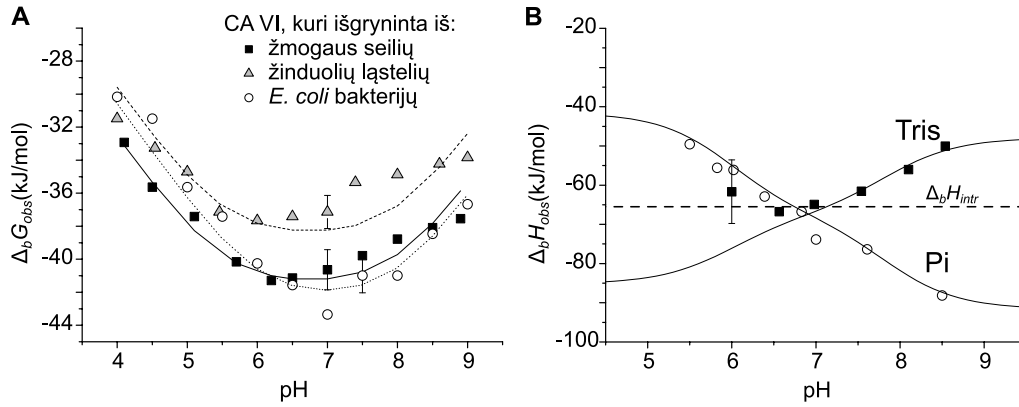
Slopiklių jungimosi su CA VI termodinaminė analizė

Šiame darbe siekta įvertinti tam tikrų slopiklių giminingumus natyviai CA VI, išgrynintai iš žmogaus seilių, ir rekombinantinei CA VI, gautai iš *E. coli* bei žinduolių FreeStyle 293-F ląstelių. Tokiu būdu norėta nustatyti rekombinantinės CA VI kaip natyvios CA VI modelio tinkamumą baltymo-junginio sąveikos tyrimuose. Buvo pasirinkti 25 turintys fluoro grupę (1-3w) bei 3 be fluoro (6a-6c) slopikliai, kurių struktūros parodytos 1 paveiksle.



1 pav. Slopiklių 1, 2, 3a–w, 6a–6c, AZM, BSA ir EZA struktūros. Slopikliai išdėstyti sąveikos su rekombinantine CA VI, išgryninta iš *E. coli*, K_{d_intr} didėjimo tvarka.

Ekperimentiškai buvo nustatyti baltymo sąveikos su slopikliais *stebimieji* jungimosi parametrai, priklausantys nuo buferinio tirpalo pH, bei apskaičiuoti *tikriniai*, nuo eksperimento sąlygų nepriklausantys jungimosi parametrai (2 pav.). Stebimosios vertės yra reikšmingos, kai siekiama įvertinti junginių giminingumą CA VI, esant vienodoms, arti-



3 pav. (A) EZA jungimosi su CA VI $\Delta_b G_{obs}$ priklausomybės nuo pH, išmatuotos FTSA (37 °C). Taškai žymi eksperimentinius duomenis, o linijos – modelius, atitinkančius 1 lygtį ir perskaičiuotus į $\Delta_b G_{obs}$. Eksperimentai atlikti naudojant 50 mM natrio fosfato, 50 mM natrio acetato ir 25 mM natrio borato buferinį tirpalą. (B) ITC išmatuota EZA jungimosi su CA VI iš *E. coli* $\Delta_b H_{obs}$ priklausomybė nuo pH, naudojant natrio fosfato (Pi) ir Tris buferinius tirpalus (37 °C). Linijos gautos pagal 6 modelį.

buvo 0,11 nM-0,39 nM). Slopikliai 3b ir 3r jungėsi su CA VI silpniausiai tiek pagal stebimuosius, tiek pagal tikrinius parametrus. Tik trijų junginių (1, 3j ir 3p) stebimasis ir tikrinis jungimosi giminingumas skyrėsi mažiau nei 100 kartų. Slopiklių cheminės struktūros ir tikrinių termodinaminių parametrų sąryšio analizė parodė, jog sąveikas su CA VI lėmė hidrofobiniai pakaitai, tuo tarpu fluorai sumažino jungimosi stiprumą.

FTSA ir ITC metodais nustatyti CA VI, išgrynintos iš 3 skirtingų šaltinių, aktyviajame centre cinko koordinuojamo hidrokso protonizacijos duomenys bei pK_a vertės (1 lentelė).

1 lentelė. CA VI protonizacijos duomenys ir pK_a vertės. ND – nenustatyta.

Baltymas	šaltinis	T (°C)	pK_a	$\Delta_p G$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_p H$ (kJ mol ⁻¹)	$T \Delta_p S$ (kJ mol ⁻¹)
CA VI	žmogaus seilės	37	5,5	-31,4	ND	ND
CA VI	žinduolių ląstelės	37	5,5	-31,4	ND	ND
CA VI	<i>E. coli</i>	25	6,2	-35,4	-32,0	3,4
CA VI	<i>E. coli</i>	37	6,0	-34,2	-29,0	5,2

Remiantis protonizacijos duomenimis, apskaičiuoti tikriniai EZA jungimosi su rekombinantine CA VI iš *E. coli* parametrai (2 lentelė).

2 lentelė. Tikriniai EZA jungimosi su rekombinantine CA VI iš *E. coli* parametrai.

Baltymas	T (°C)	$\Delta_b H_{intr}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_b G_{intr}$ (kJ mol ⁻¹)	$T \Delta_b S_{intr}$ (kJ mol ⁻¹)
CA VI	25	-58,0	-53,9	-4,1
CA VI	37	-65,5	-54,1	-11,4

Perspektyviausių CA IX slopiklių tyrimai modelinėse sistemose

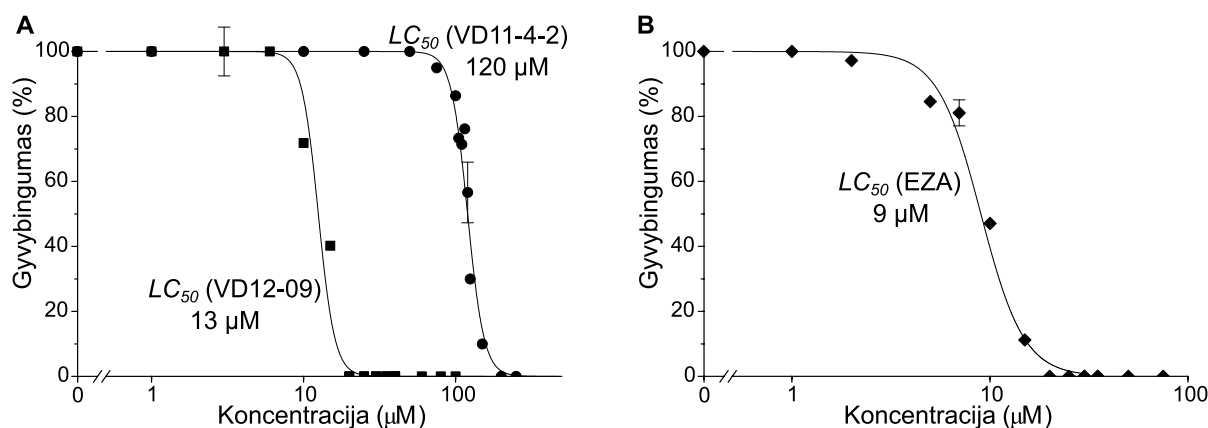
Kuriant CA IX, vėžinių ląstelių žymens, slopiklius kaip potencialius priešvėžinius vaistus, svarbu, kad jie stipriai ir atrankiai jungtųsi su CA IX, bet silpnai sąveikautų su kitomis CA izoformomis, pavyzdžiui, CA VI. Disertacijos autorė išmatavo ~200 slopiklių jungimąsi su CA VI FTSA metodu, iš kurių junginiai VD11-4-2 ir VD12-09 buvo atrinkti kaip perspektyvūs CA IX slopikliai (3 lentelė). Tolimesniam junginių vystymui buvo svarbu patvirtinti jų efektyvumą biologinėse modelinėse sistemose. Todėl buvo atlikti junginių tyrimai danijų embrionuose/lervose, *Xenopus* oocituose ir žmogaus vėžinėse ląstelėse.

3 lentelė. Perspektyviausių CA IX slopiklių struktūros ir jungimosi su rekombinantinėmis CA izoformomis $K_{d,obs}$ vertės, išmatuotos FTSA (37 °C, pH 7.0). VD11-4-2 ir VD12-09 sąveikų su CA duomenys buvo publikuoti [21].

CA izoforma	$K_{d,obs}$ (nM)		
	VD11-4-2	VD12-09	VR16-09
CA I	710	50 000	≥ 200 000
CA II	60	1300	≥ 200 000
CA III	40 000	≥ 200 000	≥ 200 000
CA IV	25	1700	≥ 200 000
CA VA	2500	3300	≥ 200 000
CA VB	5,6	210	45 000
CA VI	95	4300	≥ 200 000
CA VII	9,8	330	37 000
CA IX	0,05	1,1	0,16
CA XII	3,3	330	710
CA XIII	3,6	140	20
CA XIV	1,6	170	170

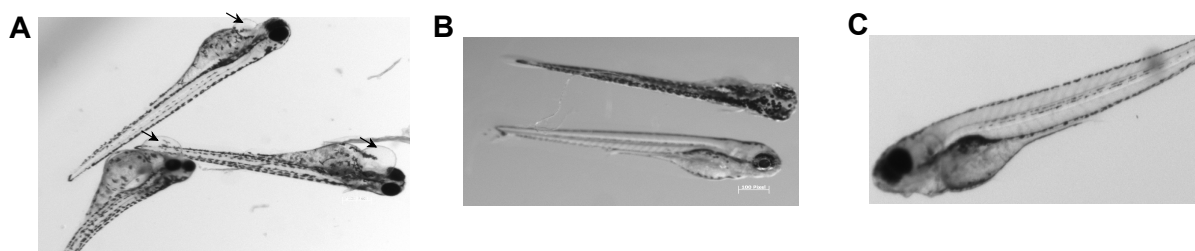
Slopiklių tyrimai danijų embrionuose/lervose

Mirtingumą lemiančių slopiklių koncentracijų įvertinimas. Siekiant ištirti nuo koncentracijos priklausomą VD11-4-2, VD12-09 ir EZA slopiklių poveikį danijų gyvybingumui, buvo panaudota virš 2300 danijų embrionų. Pagal apskaičiuotas LC_{50} vertes nustatyta, kad VD11-4-2 įtaka gyvybingumui buvo mažesnė už VD12-09 ir EZA poveikį (4 pav.), t.y. VD11-4-2 slopiklio LC_{50} lygi 120 μ M, o LC_{50} vertės VD12-09 ir EZA junginiams ~10 kartų mažesnės (atitinkamai 13 μ M ir 9 μ M).



4 pav. Danijų gyvybingumo priklausomybės nuo slopiklių koncentracijų: (A) VD11-4-2 (●), VD12-09 (■); (B) EZA. Danijų embrionai inkubuoti su slopikliais 120 val.. Taškai žymi eksperimentinius duomenis, o linijos – teorines kreives, nubrėžtas pagal Hilo modelį.

Fenotipo pokyčiai. Stipriausią įtaką danijų lervų fenotipui po 5 dienų poveikio turėjo EZA. Šis slopiklis lėmė perikardito (širdiplėvės uždegimo) susidarymą, kūno formos pokyčius ir neįsisavintą trynio maišelį, kuris yra vienas iš pagrindinių maisto medžiagų šaltinių danijų embrionų vystymosi metu (5 pav., A). Šie sutrikimai nebuvo nustatyti danijų lervose po poveikio VD junginiais (5 pav., B) arba DMSO (5 pav., C). Histologinės analizės rezultatai parodė, kad audiniams tirti slopikliai poveikio neturėjo.

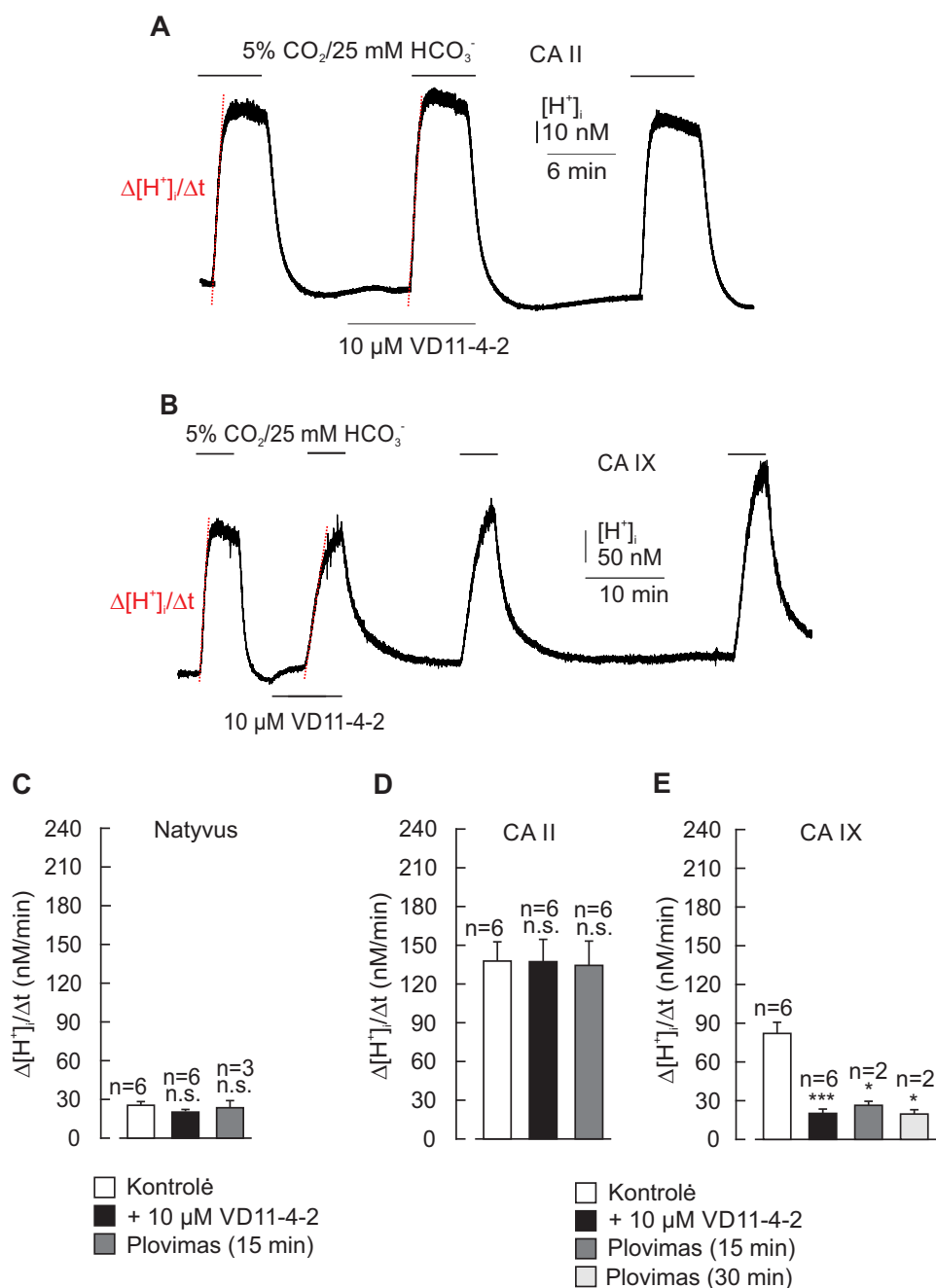


5 pav. Danijų lervų fenotipo pokyčiai po 5 dienų inkubavimo su 10 μM EZA (A), 100 μM VD11-4-2 (B) ir DMSO (C). Rodyklės A dalyje nurodo perikarditus.

Slopiklių tyrimai *Xenopus oocituose*

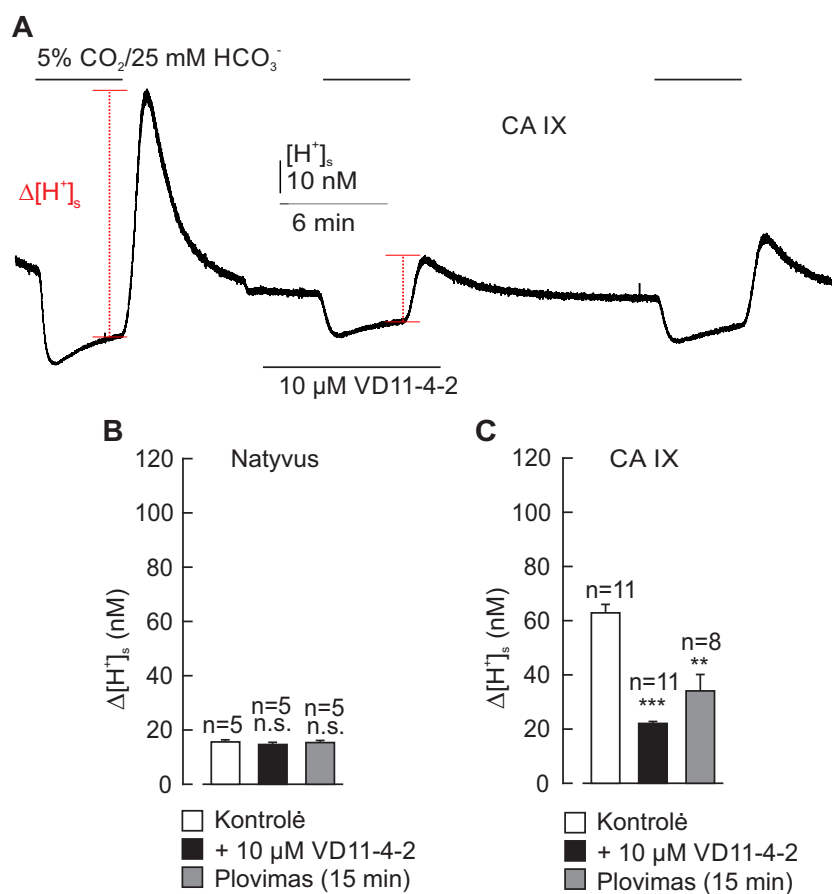
Vidulastelinės CA IX slopinimas. Klier su kolegomis parodė, kad ~80% heterologinės CA IX randama *Xenopus oocito* viduje [22]. Todėl buvo tirti VD11-4-2 ir VD12-09 poveikiai vidulastelinių CA IX ir CA II fermentiniams aktyvumams. Matuojant mikroelektrodais, nustatyta slopiklių įtaka oocitų rūgštinimo pokyčiams, kuriuos katalizavo tam tikra heterologinė CA izoforma. Šioje modelinėje sistemoje rūgštinimas sukeltas oocitus veikiant 5% CO₂/25 mM HCO₃⁻ buferiniu tirpalu. Lyginant su natyviais oocitais, vidulastelinio rūgštinimo greitis ($\Delta[H^+]_i/\Delta t$) padidėjo nuo $25,4 \pm 2,9 \text{ nM min}^{-1}$ (6 pav., C) iki $82,0 \pm 8,8 \text{ nM min}^{-1}$ arba $137,5 \pm 14,7 \text{ nM min}^{-1}$ oocituose atitinkamai su CA IX (6 pav., B, E) arba CA II (6 pav., A, D). Po inkubavimo su 10 μM VD11-4-2 oocituose su CA II $\Delta[H^+]_i/\Delta t$ nepasikeitė. Tačiau oocituose su CA IX po poveikio su 10 μM VD11-4-2 $\Delta[H^+]_i/\Delta t$ sumažėjo nuo $82,0 \pm 8,8 \text{ nM min}^{-1}$ iki $20,3 \pm 3,5 \text{ nM min}^{-1}$, o ši vertė atitiko $\Delta[H^+]_i/\Delta t$ natyviuose oocituose po inkubavimo su 10 μM VD11-4-2 ($20,2 \pm 1,4 \text{ nM min}^{-1}$). Be to, VD11-4-2 buvo nustatytas kaip nenuplaunamas po 15 min

arba 45 min CA IX slopiklis (6 pav., E). Slopiklis VD12-09 pasižymėjo atrankumu CA IX lyginant su CA II, tačiau jo įtaka $\Delta[H^+]_i/\Delta t$ oocituose su CA IX buvo mažesnė už VD11-4-2.



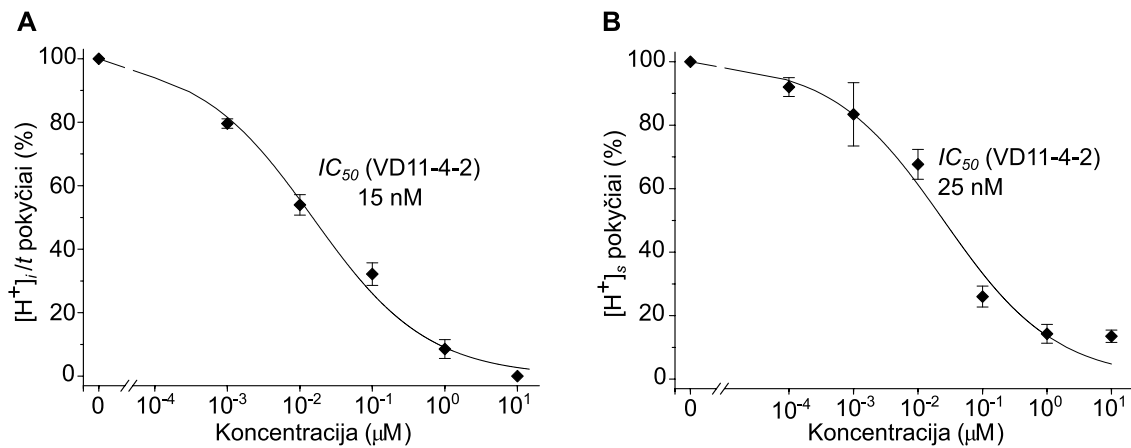
6 pav. Citozolinio $[H^+]$ kitimo greičio matavimas *Xenopus* oocituose su tam tikra heterologine CA izoforma (A, B, D, E) ir natyviuose *Xenopus* oocituose (C). Ląstelės buvo pakartotinai veikiamos CO₂/HCO₃⁻ buferiniu tirpalu prieš ir po inkubacijos su 10 μM VD11-4-2 ir po 15 min arba 45 min plovimo. Pagal raudonas tieses įvertinami nuokrypio kampai, naudoti $\Delta[H^+]_i/\Delta t$ nustatymui (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, n.s.: nėra statistiškai reikšmingo skirtumo).

Užląstelinės CA IX slopinimas. Retgenostruktūrinės analizės rezultatai parodė, kad CA IX yra transmembraninis baltymas, kurio katalizinis domenas yra ląstelės išorėje [23]. Tokios heterologinės CA IX formos *Xenopus* oocituose randama ~20% [22]. Nustatyta VD11-4-2 įtaka užląstelinio rūgštinimo amplitudžių pokyčiams ($\Delta[H^+]_s$). Natyviuose oocituose $\Delta[H^+]_s$ buvo $15,6 \pm 0,4 \text{ nM min}^{-1}$ (7 pav., B), o oocituose su CA IX – $63,0 \pm 3,1 \text{ nM min}^{-1}$ (7, A, C). Po $10 \mu\text{M}$ VD11-4-2 poveikio $\Delta[H^+]_s$ oocituose su CA IX sumažėjo iki $22,1 \pm 0,7 \text{ nM min}^{-1}$ (7, A, C). VD11-4-2 buvo nustatytas kaip nenuplaukiamas po 15 min CA IX slopiklis (7 pav., C). Slopiklis VD12-09 reikšmingos įtakos $[H^+]_s$ oocituose su CA IX neturėjo.



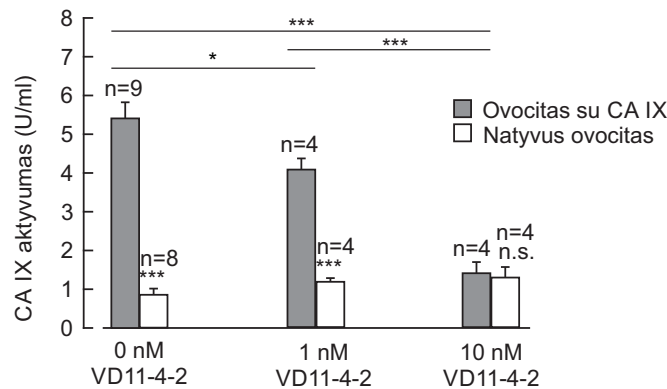
7 pav. Užląstelinio $[H^+]_s$ matavimai *Xenopus* oocituose su tam tikra heterologine CA izoforma (A ir C) ir natyviuose *Xenopus* oocituose (B). Ląstelės buvo pakartotinai veikiamos $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ buferiniu tirpalu prieš ir po inkubacijos su $10 \mu\text{M}$ VD11-4-2 ir po plovimo 15 min. Pagal raudonas tieses buvo įvertinamos amplitudės, naudotos $\Delta[H^+]_s$ nustatymui (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s.: nėra statistiškai reikšmingo skirtumo).

Nuo VD11-4-2 koncentracijos priklausomas CA IX slopinimas. Siekiant įvertinti CA IX slopinimo VD11-4-2 junginiu efektyvumą, išmatuota $0,1 \text{ nM}$ - $10 \mu\text{M}$ VD11-4-2 įtaka $\Delta[H^+]_i/\Delta t$ bei $[H^+]_s$ *Xenopus* oocituose su CA IX ir pagal Hilo modelį apskaičiuotos IC_{50} vertės. Vieno eksperimento metu oocitas inkubuotas su didėjančios koncentracijos VD11-4-2 slopikliu. Nustatytos viduląstelinės ir užląstelinės CA IX slopinimo IC_{50} vertės buvo atitinkamai 15 nM (8 pav., A) ir 25 nM (8 pav., B). Šie duomenys pirmą kartą parodė aukštą VD11-4-2 giminingumą CA IX baltymui biologinėje sistemoje.



8 pav. IC_{50} verčių nustatymas pagal $[H^+]_i/t$ (A) ir $[H^+]_s$ (B) pokyčių priklausomybes nuo VD11-4-2 koncentracijos. Taškai žymi eksperimentinius duomenis, o linijos – teorines kreives, nubrėžtas pagal Hilo modelį.

Masių spektrometrija. Naudojant *Xenopus* oocitų, turinčių heterologinę CA IX, lizatus, įvertinta VD11-4-2 įtaka bendram viduląstelinės ir užląstelinės CA IX fermentiniam aktyvumui MS metodu (9 pav.). Paveikus oocitų lizatus 1 nM VD11-4-2 tirpalu, fermentinis CA IX aktyvumas sumažėjo ~25%. Nebuvo rasta $^{13}C^{18}O_2$ kiekio kitimų skirtumo MS duomenyse, kai buvo naudoti natyvūs oocitai ir oocitai su CA IX po inkubavimo su 10 nM VD11-4-2. Šie rezultatai patvirtino aukštą VD11-4-2 efektyvumą, parodytą nanomolinės eilės IC_{50} vertėmis pH matavimo mikroelektrodais eksperimentuose.



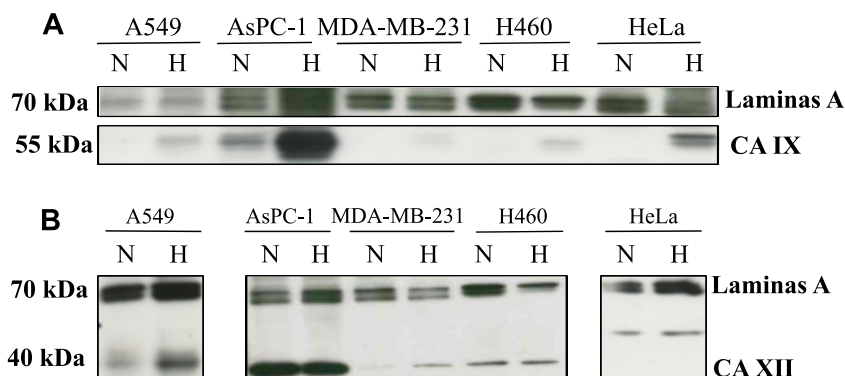
9 pav. Slopiklio VD11-4-2 įtakos CA IX fermentiniam aktyvumui *Xenopus* oocituose nustatymas MS metodu. 20 oocitų lizatas buvo inkubuojamas su didėjančiomis 1 nM bei 10 nM VD11-4-2 dozėmis (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, n.s.: nėra statistiškai reikšmingo skirtumo).

Slopiklių tyrimai žmogaus vėžinėse ląstelėse

Šioje modelinėje sistemoje tirti trys slopikliai: VD11-4-2, VD12-09 ir VR16-09. Naujas junginys VR16-09 buvo susintetintas, kuris pasižymėjo aukštu giminingumu ir didesniu už VD11-4-2 bei VD12-09 atrankumu rekombinantinei CA IX (3 lentelė). Todėl buvo svarbu nustatyti VR16-09 biologinį efektyvumą, ypač žmogaus vėžinėse ląstelėse.

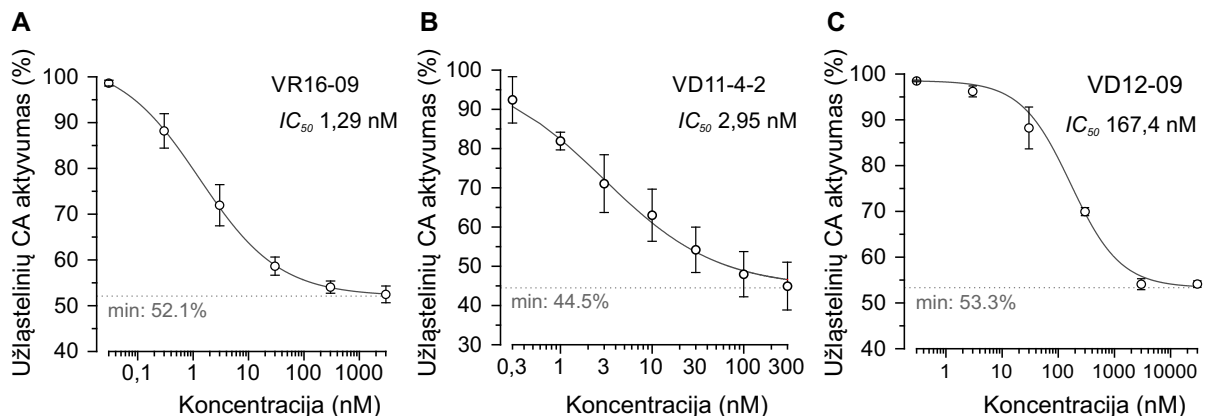
Nuo CA IX priklausomas slopiklių aktyvumas. Šiame darbe naudotos A549 ir H460 (plaučių), AsPC-1 (kasos), MDA-MB-231 (krūties) ir HeLa (gimdos kaklelio) žmo-

gaus vėžinės ląstelės. Esant hipoksijos sąlygoms (0,2% O₂), jose nustatytas padidėjęs CA IX kiekis, o CA XII kiekis normoksijos ir hipoksijos sąlygomis nepakito. HeLa ląstelių CA IX buvo didesnio molekulinio svorio nei kitose tirtose ląstelėse. Tai galėtų lemti skirtingos posttransliacinės modifikacijos.



10 pav. CA IX (A) ir CA XII (B) nustatymas imunoblotingo metodu A549, AsPC-1, MDA-MB-231, H460 ir HeLa ląstelėse po 72 val. kultivavimo, esant 21% O₂ (N) arba 0,2% O₂ (H). Laminas A buvo naudojamas kaip teigiama kontrolė.

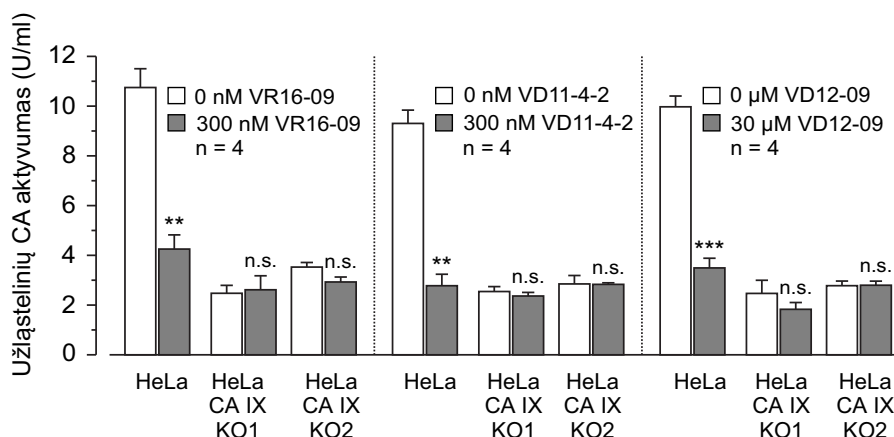
Slopiklių aktyvumas buvo tirtas MS metodu, naudojant žymėtą ¹³C¹⁸O₂. Į matavimo kiuvetę įpilta hipoksijos sąlygomis augintų MDA-MB-231 vėžinių ląstelių suspensija lėmė greitesnius ¹⁸O pokyčius, kuriuos katalizavo užląstelinės CA izoformos. Tokios ląstelių suspensijos prieš MS matavimus inkubuotos su VR16-09, VD11-4-2 ir VD12-09 slopikliais. Nustatytos užląstelinės CA baltymų slopinimo IC₅₀ vertės buvo 1,29 ± 0,11 nM, 2,95 ± 0,69 nM ir 167,4 ± 1,3 nM atitinkamai VR16-09, VD11-4-2 ir VD12-09 junginiams (11 pav.).



11 pav. MS metodu įvertinta MDA-MB-231 ląstelių, 72 val. kultivuočių 0,2% O₂ sąlygomis, užląstelinės CA aktyvumo priklausomybė nuo VR16-09 koncentracijos. Ląstelės buvo inkubuotos su slopikliu 3 val. iki MS eksperimento pradžios. Pateikti eksperimentų, pakartotų 4 kartus, rezultatų vidurkiai su standartiniais nuokrypiais.

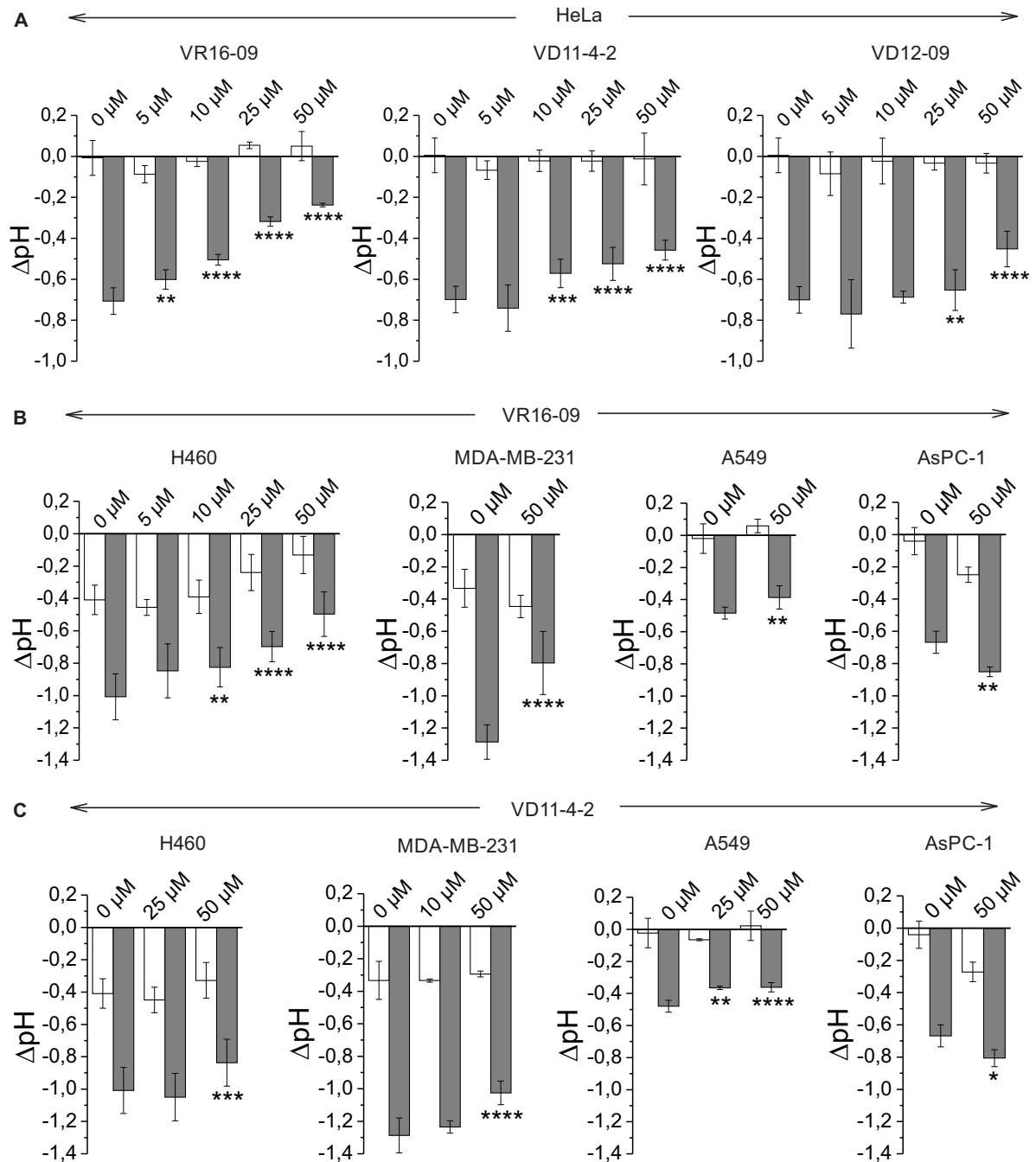
Naudojant CRISPR-Cas9 sistemą, HeLa ląstelėse buvo nuslopinta geno, koduojančio CA IX, raiška. Jos panaudotos nuo CA IX priklausomo slopiklių veikimo tyrimuose MS metodu. Naudotos didesnės už 100 kartų junginių koncentracijos nei nustatytos jų IC₅₀ vertės MDA-MB-231 ląstelėse. Tirti VR16-09, VD11-4-2 ir VD12-09 slopikliai

neturėjo įtakos hipoksijoje augintų HeLa ląstelių, neturinčių CA IX, užląstelių CA aktyvumui (12 pav.). Tam tikras kitų užląstelių CA izoformų aktyvumas išliko ir nebuvo veikiamas tirtais slopikliais. HeLa ląstelėse, kuriose nebuvo genetinių pakeitimų, slopikliais reikšmingai sumažintas užląstelių CA aktyvumas iki tokių verčių, kurios buvo išmatuotos HeLa ląstelėse be CA IX baltymo po poveikio slopikliais. Tokiu būdu parodytas tirtų slopiklių atrankus, nuo CA IX priklausomas veikimo mechanizmas.

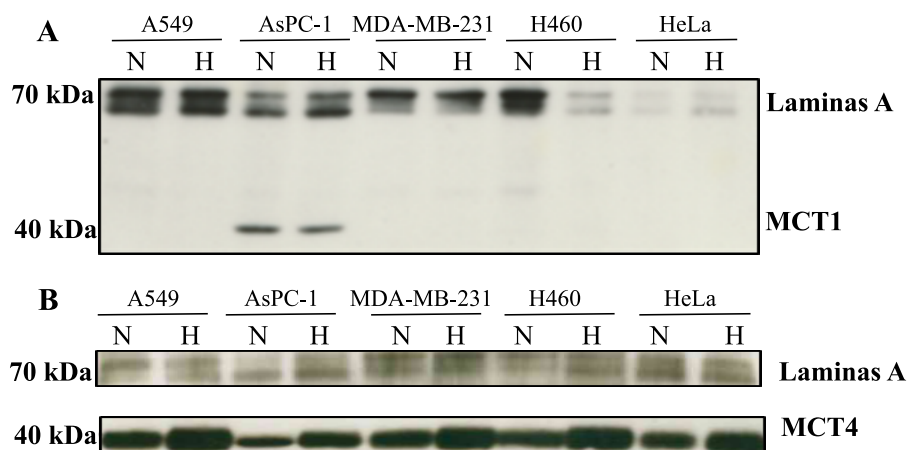


12 pav. MS metodu įvertintas nuo CA IX priklausomas VR16-09, VD11-4-2 ir VD12-09 slopiklių veikimas HeLa ląstelėse, 72 val. kultivuotose 0,2% O₂ sąlygomis. Buvo naudotos HeLa be genetinių pakeitimų ir HeLa su nuslopinta geno, koduojančio CA IX, raiška (HeLa CA IX KO1 ir HeLa CA IX KO2) ląstelės. Balti stulpeliai rodo užląstelių CA aktyvumą ląstelėse prieš inkubavimą su slopikliais, pilki stulpeliai – po slopiklių poveikio (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s.: nėra statistiškai reikšmingo skirtumo).

Slopiklių funkciniai aktyvumai patvirtinti pH matavimo eksperimentais, atliktais hipoksijos kameroje. Kontroliniai, identiški eksperimentai buvo atliekami normoksijos sąlygomis. VR16-09, VD11-4-2 ir VD12-09 reikšmingai sumažino HeLa ląstelių mitybinės terpės rūgštinimą hipoksijos sąlygomis nuo koncentracijos priklausomu būdu (13 pav., A). Slopiklių poveikis normoksijoje buvo nereikšmingas. VD12-09 funkcinis aktyvumas buvo silpniausias, lyginant su VR16-09 ir VD11-4-2. Parodyta, kad VD16-09 (13 pav., B) ir VD11-4-2 (13 pav., C) reikšmingai slopino kitų ląstelių (H460, MDA-MB-231, A549) mitybinės terpės rūgštinimą, esant hipoksijos sąlygoms. Įdomu tai, kad AsPC-1 ląstelių vykdomas terpės rūgštinimas hipoksijoje buvo padidintas tirtais slopikliais. Tai galėtų būti siejama su monokarboksirūgščių nešiklio (MCT) 1 izoformos geno raiška, kuri imunoblotingo metodu nustatyta tik AsPC-1 ląstelėse iš tirtų linijų (14 pav., A). MCT4 baltymas ir jo kiekio hipoksijoje padidėjimas nustatytas visose tirtose ląstelių linijose (14 pav., B), kaip pateikta literatūroje [24]. Kadangi anksčiau buvo publikuoti duomenys apie nekatalizinę CA IX funkciją, siejamą su MCT izoformomis [25], šiame darbe iškėlėme hipotezę, kad AsPC-1 ląstelėse tirti junginiai slopino katalizinę CA IX aktyvumą ir aktyvino nekatalizinę CA IX funkciją. Dėl šios priežasties MCT1 transportavo iš ląstelės daugiau laktato bei protono jonų ir tai lėmė mitybinės terpės rūgštinimo padidėjimą po inkubacijos su tirtais slopikliais.



13 pav. (A) VR16-09, VD11-4-2 ir VD12-09 itaka HeLa ląstelių vykdomam mitybinės terpės rūgštinimui, kai ląstelės 72 val. buvo inkubuotos su slopikliais. VR16-09 (B) ir VD11-4-2 (C) poveikis H460, MDA-MB-231, A549 ir AsPC-1 vykdomam mitybinės terpės rūgštinimui, kai ląstelės 72 val. buvo inkubuotos su slopikliais. Balti stulpeliai rodo rezultatus, kai paveiktos slopikliais ląstelės buvo kultivuotos esant 21% O₂, pilki stulpeliai – 0,2% O₂ (**p*<0.05; ***p*<0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001).



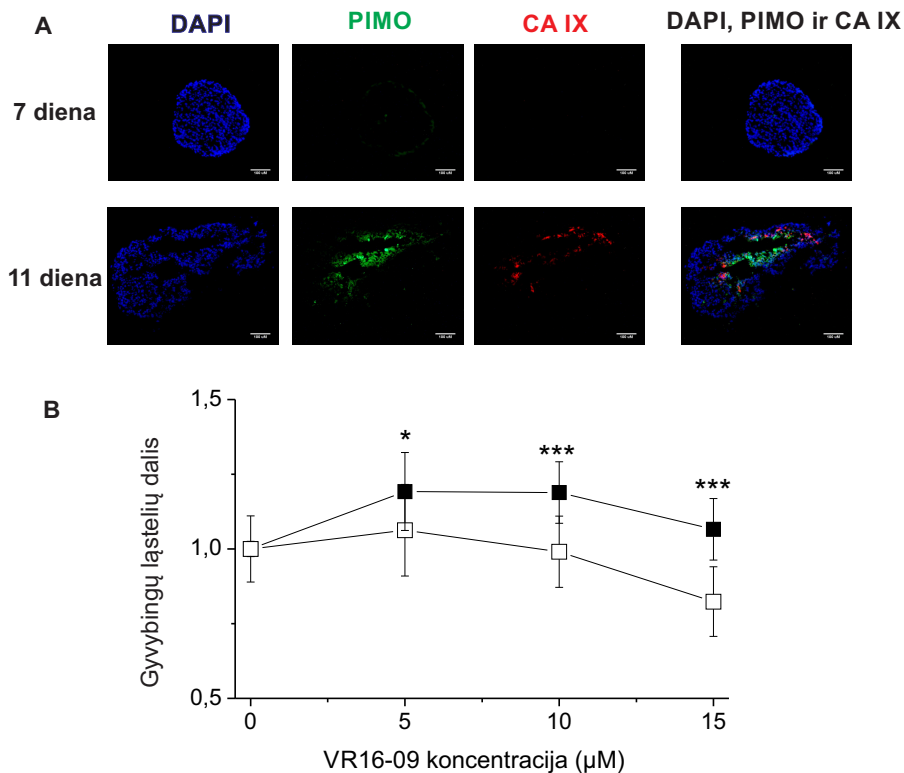
14 pav. MCT1 (A) ir MCT4 (B) nustatymas imunoblotingo metodu A549, AsPC-1, MDA-MB-231, H460 ir HeLa ląstelėse po 72 val. kultivavimo, esant 21 % O₂ (N) arba 0,2 % O₂ (H). Laminas A buvo naudojamas kaip teigiama kontrolė.

Slopiklių įtaka ląstelių gyvybingumui. Gyvybingumo tyrimams buvo panaudotas alamarBlue[®] reagentas. 2D ląstelių kultūros inkubuotos su slopikliais 48 val.-72 val.. Pagal Hilo modelį įvertintos junginių *EC*₅₀ vertės parodė, kad slopiklių poveikis tirtų ląstelių gyvybingumui buvo didesnis normoksijoje nei hipoksijoje (4 lentelė). Šis rezultatas buvo patvirtintas klonogeninės analizės metodu.

4 lentelė. *EC*₅₀ vertės, parodančios VR16-09, VD11-4-2 ir VD12-09 poveikį HeLa, H460, A549, MDA-MB-231 ir AsPC-1 ląstelių gyvybingumui. Ląstelės, veikiamos slopikliais, buvo augintos 21 % O₂ arba 0,2 % O₂ sąlygomis. Gyvybingumas įvertintas naudojant alamarBlue[®] reagentą. Lentelėje pateiktas kiekvieno eksperimento 3 pakartojimų vidurkis su standartiniu nuokrypiu.

O ₂	<i>EC</i> ₅₀ (μM)					
	VR16-09		VD11-4-2		VD12-09	
	21 %	0,2 %	21 %	0,2 %	21 %	0,2 %
HeLa	20,2 ± 4,3	40,8 ± 9,6	47,8 ± 9,6	92,2 ± 8,3	21,6 ± 4,1	46,9 ± 7,0
H460	19,3 ± 3,6	40,0 ± 9,6	21,4 ± 3,1	44,6 ± 6,4	17,8 ± 2,2	37,0 ± 7,6
A549	17,0 ± 1,0	76,7 ± 2,9	43,8 ± 2,5	105 ± 6	33,8 ± 2,5	98,8 ± 8,5
MDA-MB-231	74,2 ± 3,8	84,2 ± 4,9	52,8 ± 7,1	64,3 ± 11,5	55,4 ± 6,6	67,6 ± 7,1
AsPC-1	153 ± 23	160 ± 17	165 ± 6	145 ± 6	100 ± 20	83,3 ± 5,8

Panaudojus 3D H460 ląstelių kultūrą, gautas priešingas slopiklių įtakos gyvybingumui rezultatas nei 2D ląstelių kultūrose. Pagal imunofluorescencijos analizės rezultatus 7-tą H460 sferoidų augimo dieną nebuvo hipoksijos sričių bei CA IX geno raiškos, tačiau jie nustatyti 11-tą sferoidų dieną (15 pav., A). Todėl siekiant parodyti nuo hipoksijos priklausomą junginių veikimą, eksperimente naudoti 4 dienas auginti sferoidai, be hipoksijos ir CA IX, ir 11 dienų auginti sferoidai, su hipoksijos sritimis ir CA IX. Abiejų tipų sferoidai inkubuoti su VR16-09, efektyviausiu slopikliu remiantis pH matavimų vėžinėse ląstelėse duomenimis (11 pav. ir 13 pav.). Klonogeninės analizės eksperimentų rezultatai parodė nuo hipoksijos priklausomą VR16-09 įtaką H460 ląstelių gyvybingumui (15 pav., B). Tai pabrėžia 3D ląstelių kultūrų ir jų suformuotos mikroaplinkos svarbą junginių efektyvumo vertinimui.



15 pav. VR16-09 poveikis H460 ląstelių, suformavusių sferoidus, gyvybingumui. (A) DAPI (mėlyna), PIMO (žalia) ir CA IX (raudona) pasiskirstymai 7 ir 11 dienų augintuose H460 sferoiduose. Nustatyta imunofluorescencinės analizės metodu. Nuotraukų mastelis 100 µM. (B) Gyvybingų H460 ląstelių, suformavusių sferoidus, priklausomybė nuo VR16-09 koncentracijos. 4 (■) arba 11 (□) dienų auginti sferoidai buvo 24 val. inkubuoti su VR16-09 (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

Išvados

1. Nėra statistiškai reikšmingo skirtumo tarp slopiklių giminingumų natyviai ir rekombinantinei CA VI.
2. Pagal tikrinius termodinaminius parametrus slopiklis 6b stipriausiai jungiasi su CA VI, o fluorintas jo darinys 3e pasižymi aukštesniu stebimuoju, bet mažesniu tikriniu giminingumu CA VI. Tai lemia fluoro atomo elektroneigiamumas, kuris sumažina slopiklio sulfonamidinės grupės pK_a .
3. Iš *E. coli* RosettaTM 2 (DE3) bakterijų, žinduolių FreeStyle 293-F ląstelių ir žmogaus seilių išgrynintų CA VI baltymų aktyviuosiuose centruose prie cinko prisijungusių hidroksido jonų pK_a vertės yra atitinkamai 5,5, 6,0 ir 6,0 (37 °C). Iš *E. coli* išgrynintos CA VI aktyviajame centre cinko koordinuojamo hidroksido jono protonizacijos entalpija lygi $-29,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ (37 °C).
4. VD11-4-2 slopiklis, esant mažesnei koncentracijai už jo LC_{50} , nesukelia žalingo poveikio danių embrionų vystymuisi ir slopina heterologinės CA IX aktyvumą *Xenopus* oocituose ($IC_{50} = 15 \text{ nM}$).
5. VR16-09, VD11-4-2 ir VD12-09 junginiai reikšmingai mažina HeLa, H460, MDA-MB-231 ir A549 žmogaus vėžinių ląstelių mitybinės terpės rūgštinimą hipoksijos sąlygomis su IC_{50} verte, siekiančia 1,29 nM, ir jų veikimo mechanizmas paremtas CA IX slopinimu.
6. VR16-09 junginys mažina H460 ląstelių, suformavusių 3D kultūras, gyvybingumą nuo hipoksijos priklausomu būdu.

Mokslinių darbų sąrašas

Publikacijos, įtrauktos į disertaciją

1. **Kazokaitė J**, Niemans N, Dudutienė V, Becker H, Leitans J, Zubrienė A, Baranauskienė L, Gondi G, Zeidler R, Matulienė J, Tars K, Yaromina A, Lambin P, Dubois LJ, Matulis D. Novel fluorinated carbonic anhydrase IX inhibitors reduce hypoxia-induced acidification and clonogenic survival of cancer cells. *Oncotarget* 9 (2018) 26800-16.
2. **Kazokaitė J**, Aspatwar A, Parkkila S, Matulis D. An update on anticancer drug development and delivery targeting carbonic anhydrase IX. *PeerJ* 5 (2017) e4068.
3. **Kazokaitė J**, Aspatwar A, Kairys V, Parkkila S, Matulis D. Fluorinated benzenesulfonamide anticancer inhibitors of carbonic anhydrase IX exhibit lower toxic effects on zebrafish embryonic development than ethoxzolamide. *Drug Chem Toxicol* 40(3) (2017) 309-19.
4. **Kazokaitė J**, Ames S, Becker HM, Deitmer JW, Matulis D. Selective inhibition of human carbonic anhydrase IX in *Xenopus* oocytes and MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Enzyme Inhib Med Chem* 31(sup4) (2016) 38-44.
5. **Kazokaitė J**, Milinavičiūtė G, Smirnovienė J, Matulienė J, Matulis D. Intrinsic binding of 4-substituted-2,3,5,6-tetrafluorobenzenesulfonamides to native and recombinant human carbonic anhydrase VI. *FEBS J* 282(5) (2015) 972-83.
6. Dudutienė V, Matulienė J, Smirnov A, Timm DD, Zubrienė A, Baranauskienė L, Morkūnaitė V, Smirnovienė J, Michailovienė V, Juozapaitienė V, Mickevičiūtė A, **Kazokaitė J**, Bakšytė S, Kasiliauskaitė A, Jachno J, Revuckienė J, Kišonaitė M, Pilipuitytė V, Ivanauskaitė E, Milinavičiūtė G, Smirnovas V, Petrikaitė V, Kairys V, Petrauskas V, Norvaišas P, Lingė D, Gibieža P, Čapkauskaitė E, Zakšauskas A, Kazlauskas E, Manakova E, Gražulis S, Ladbury JE, Matulis D. Discovery and characterization of novel selective inhibitors of carbonic anhydrase IX. *J Med Chem* 57(22) (2014) 9435-46.

Publikacijos, neįtrauktos į disertaciją

1. Dudutienė V, Zubrienė A, Smirnov A, Timm DD, Smirnovienė J, **Kazokaitė J**, Michailovienė V, Zakšauskas A, Manakova E, Gražulis S, Matulis D. Functionalization of fluorinated benzenesulfonamides and their inhibitory properties toward carbonic anhydrases. *ChemMedChem* 10(4) (2015) 662-87.

2. Rutkauskas K, Zubrienė A, Tumosienė I, Kantminienė K, Kažemėkaitė M, Smirnov A, **Kazokaitė J**, Morkūnaitė V, Čapkauskaitė E, Manakova E, Gražulis S, Beresnevičius ZJ, Matulis D. 4-amino-substituted benzenesulfonamides as inhibitors of human carbonic anhydrases. *Molecules* 19(11) (2014) 17356-80.
3. Čapkauskaitė E, Zubrienė A, Smirnov A, Torresan J, Kišonaitė M, **Kazokaitė J**, Gylytė J, Michailovienė V, Jogaitė V, Manakova E, Gražulis S, Tumkevičius S, Matulis D. Benzenesulfonamides with pyrimidine moiety as inhibitors of human carbonic anhydrases I, II, VI, VII, XII, and XIII. *Bioorg Med Chem* 21(22) (2013) 6937-47.

Konferencijų pranešimai:

Žodiniai pranešimai

1. **Kazokaitė J**, Niemans R, Dudutienė V, Becker H, Leitans J, Zubrienė A, Barauskienė L, Gondi G, Zeidler R, Matulienė J, Tars K, Yaromina A, Lambin P, Dubois LJ, Matulis D. Novel benzenesulfonamides as selective carbonic anhydrase IX inhibitors exhibit functional effects to reduce hypoxia-induced acidification and clonogenicity in cancer cell lines. 18th FEBS Young Scientists' Forum. Praha, Čekija; liepos 4-7, 2018.

Stendiniai pranešimai

1. **Kazokaitė J**, Niemans R, Dudutienė V, Becker H, Leitans J, Zubrienė A, Barauskienė L, Gondi G, Zeidler R, Matulienė J, Tars K, Yaromina A, Lambin P, Dubois LJ, Matulis D. Novel benzenesulfonamides as selective carbonic anhydrase IX inhibitors exhibit functional effects to reduce hypoxia-induced acidification and clonogenicity in cancer cell lines. 43rd FEBS Congress. Praha, Čekija; liepos 7-12, 2018.
2. **Kazokaitė J**, Niemans R, Dudutienė V, Becker H, Leitans J, Zubrienė A, Barauskienė L, Gondi G, Zeidler R, Matulienė J, Tars K, Yaromina A, Lambin P, Dubois LJ, Matulis D. Novel benzenesulfonamides as selective carbonic anhydrase IX inhibitors exhibit functional effects to reduce hypoxia-induced acidification and clonogenicity in cancer cell lines. 11th International Conference on Carbonic Anhydrases. Bukareštas, Rumunija; birželio 27-30, 2018.
3. **Kazokaitė J**, Niemans R, Yaromina A, Aspatwar A, Parkkila S, Deitmer JW, Becker H, Lambin P, Matulienė J, Zubrienė A, Dudutienė V, Dubois LJ, Matulis D. Carbonic anhydrase IX-selective inhibitors diminish acidification in cancer cell cultures and *Xenopus* oocytes and exhibit low toxicity in zebrafish. European Radiation Research Society Meeting. Esenas, Vokietija; rugsėjo 17-21, 2017.
4. **Kazokaitė J**, Niemans R, Yaromina A, Aspatwar A, Parkkila S, Deitmer JW, Becker H, Lambin P, Matulienė J, Zubrienė A, Dudutienė V, Dubois LJ, Matulis D. Carbonic anhydrase IX-selective inhibitors diminish acidification in cancer cell cultures and *Xenopus* oocytes and exhibit low toxicity in zebrafish. 42nd FEBS Congress. Jeruzalė, Izraelis; rugsėjo 10-14, 2017.

5. **Kazokaitė J**, Aspatwar A, Kairys V, Parkkila S, Deitmer JW, Matulis D. Novel benzenesulfonamides exhibit low toxicity on zebrafish development and selectively inhibit human carbonic anhydrase IX with nanomolar affinity. Grow Science Day. Maastrichtas, Olandija; lapkričio 23, 2016.
6. **Kazokaitė J**, Aspatwar A, Kairys V, Parkkila S, Deitmer JW, Matulis D. Novel benzenesulfonamides exhibit low toxicity on zebrafish development and selectively inhibit human carbonic anhydrase IX with nanomolar affinity. 12th International Congress of Cell Biology. Praha, Čekija; liepos 21-25, 2016.
7. **Kazokaitė J**, Aspatwar A, Kairys V, Parkkila S, Matulis D. Fluorinated benzenesulfonamide anticancer inhibitors of carbonic anhydrase IX exhibit lower toxic effects on zebrafish embryonic development than ethoxzolamide. 11th COINS, Vilnius, Lietuva; vasario 29-kovo 3, 2016.
8. **Kazokaitė J**, Aspatwar A, Kairys V, Parkkila S, Matulis D. Fluorinated benzenesulfonamide anticancer inhibitors of carbonic anhydrase IX exhibit lower toxic effects on zebrafish embryonic development than ethoxzolamide. VitaScientia, Vilnius, Lietuva; sausio 4, 2016.
9. **Kazokaitė J**, Milinavičiūtė G, Smirnov A, Matulis D. Investigation of Inhibitor Binding Affinity to the Native and Recombinant Carbonic Anhydrase VI. 10th International Conference on Carbonic Anhydrase, Maastrichtas, Olandija; balandžio 20-22, 2015.
10. **Kazokaitė J**, Milinavičiūtė G, Gylytė J, Dudutienė V, Matulienė J, Matulis D. Differences in Stability Profiles and Thermodynamics of Inhibitor Binding to Target Protein Purified from E. coli, Mammalian Cells and Human Saliva. European Biotechnology Congress. Lečė; Italija; gegužės 15-18, 2014.

Padėka

Nuoširdus ačiū visiems, kurie man padėjo ir suteikė motyvacijos doktorantūros studijų metu.

Dėkoju darbo vadovui prof. Daumantui Matuliui už galimybę dirbti Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje, vertingas diskusijas ir patarimus ruošiant publikacijas ir disertaciją, skatinimą pastebėti teigiamas puses bei tobulėti.

Ačiū už pagalbą visam skyriaus kolektyvui, ypač Astai Zubienei ir Linai Baranauškienei už patarimus atliekant termodinaminius tyrimus ir ruošiant disertaciją, Vytautui Petrauskui už pagalbą dirbant L^AT_EX programa, Vaidai Juozapaitienei už nuoširdumą ir kritinio mąstymo genų inžinerijoje suformavimą, Jurgitai Matulienei už žinias vėžinių ląstelių tyrimuose, Vilmai Michailovienei už baltymo gryninimo igūdžius, Audriui Zakšauskui, Editai Čapkauskaitei ir Virginijai Dudutienei už susintetintus junginius, Alexey Smirnov už pagalbą sprendžiant rekombinantinės žmogaus CA VI kristalinę struktūrą, Joanai Smirnovienei už bendradarbiavimą matuojant katalizinius aktyvumus, Vytautui Smirnovui už baltymų masių spektrometrijos eksperimentus ir Visvaldui Kairiui už bioinformatinius tyrimus. Taip pat norėčiau padėkoti Vaidai Linkuvienei ir Gediminui Skvarnavičiui už draugiškumą ir išklausymą. Esu dėkinga bendradarbiams Justei Wesche, Aistei Kasiliauskaitei, Povilui Norvaišui, Miglei Kišonaitei, David Timm ir Agnei Janonienei už visokeriopą pagalbą.

Už priėmimą ir galimybę tobulinti savo igūdžius esu dėkinga prof. Seppo Parkkila ir Ashok Aspatwar (Tampere's Universitetas, Suomija), prof. Joachim W. Deitmer ir Holger M. Becker (Kaizerslauterno Universitetas, Vokietija) ir prof. Philippe Lambin, prof. Ludwig J. Dubois bei Ala Yaromina (Mastrichto Universitetas, Olandija). Ačiū šių grupių komandoms už draugišką atmosferą, efektyvų darbą ir bendradarbiavimą ruošiant publikacijas, ypač Rianne Biemans, Raymon Niemans, Natasja Lieuwes, Nandu Parvathaneni, Lydie Barbeau, Jolanda Piepers, Lorena Giuranno, Damiënne Marcus, Judith Hounjet, Arjan Groot, Marike van Gisbergen, Sina Ibne Noor, Zinnia Naoshin, Linda Forero, Hans-Peter Schneider, Harlan Barker, Reza Zolfaghari, Aulikki Lehmus ir Marianne Kuuslahti. Dėkoju prof. Sauliui Šumanui už patarimus danijų tyrimų srityje.

Esu dėkinga Lietuvos mokslų tarybai ir Vilniaus Universitetui už finansinę paramą.

Didžiausia mano padėka tėvams, broliui bei Arvydui už besąlygišką tikėjimą manimi ir begalinę kantrybę. Taip pat esu dėkinga savo draugams, ypač Armandui, Redui, Kristinai, Justinui, Godai, Egidijui, Vaidai ir Staselei, Karin bei Marc, 2E grupės nariams už jų entuziazmą ir palaikymą.

Summary

Among twelve catalytically active human carbonic anhydrase (CA) isoforms, only CA VI is found in human saliva, while CA IX as a cancer-associated protein has gained most interest. The aim of this work was to study recombinant CA VI as a model of native human CA VI for the intrinsic inhibitor binding reactions and to explore lead CA IX inhibitors in biological systems as an initial step of their development towards anti-cancer drugs.

Fluorescent thermal shift assay and isothermal titration calorimetry were applied in this study to determine observed and intrinsic binding parameters of a series of novel inhibitors to CA VI. The observed affinities of the inhibitors were essentially identical towards the native CA VI obtained from human saliva and recombinant CA VI purified from *Escherichia coli*. This result demonstrated the suitability of recombinant CA VI as a model of native CA VI for biophysical studies of inhibitor binding. Moreover, only the observed binding parameters between CAs and their inhibitors are usually provided in the literature. Here the observed and intrinsic binding parameters were evaluated, emphasizing that the observed values may be misleading for the understanding of the chemical structural basis for the binding affinity.

The design of anti-cancer drugs targeting CA IX has been investigated. In this study, the biological model systems, zebrafish, *Xenopus laevis* oocytes, and human cancer cells were used together with the enzymatic and biophysical methods to characterize newly designed CA IX inhibitors VD11-4-2, VD12-09, and VR16-09. The compounds are fluorinated benzenesulfonamides bearing bulky hydrophobic groups at *ortho* and *meta* positions. These groups ensure high selectivity and picomolar affinity towards CA IX as confirmed by the enzymatic inhibition and binding assays and crystallographic analysis. Studies using *Xenopus* oocytes for the first time revealed high selectivity and 15 nM inhibitory IC_{50} of compound VD11-4-2 against the heterologous CA IX in a biological model system. Experiments employing human cancer cells showed CA IX-dependent functional activities of three tested inhibitors to reduce the hypoxia-induced acidosis. Furthermore, the investigation of CA IX-targeting compounds in spheroids with clonogenic cell survival as endpoint was introduced as a promising strategy to determine hypoxia-dependent impact of compounds on cell proliferation. Thus, this thesis provides the novel concept to characterize compound efficacies, which is beneficial for further development.

Bibliografija

LITERATŪRA

- [1] Holdgate, G.A., Meek, T.D., Grimley, R.L.: Mechanistic enzymology in drug discovery: A fresh perspective. *Nature Reviews Drug Discovery* **17**(2), 115–132 (2018)
- [2] Meldrum, N., Roughton, F.: Some properties of carbonic anhydrase, the CO₂ enzyme present in blood. *J Physiol* **75**, 15–6 (1932)
- [3] Smirnovienė, J., Smirnovas, V., Matulis, D.: Picomolar inhibitors of carbonic anhydrase: Importance of inhibition and binding assays. *Anal. Biochem.* **522**, 61–72 (2017)
- [4] Karhumaa, P., Leinonen, J., Parkkila, S., Kaunisto, K., Tapanainen, J., Rajaniemi, H.: The identification of secreted carbonic anhydrase VI as a constitutive glycoprotein of human and rat milk. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20), 11604–11608 (2001)
- [5] Ogawa, Y., Matsumoto, K., Maeda, T., Tamai, R., Suzuki, T., Sasano, H., Fernley, R.T.: Characterization of lacrimal gland carbonic anhydrase VI. *J. Histochem. Cytochem.* **50**(6), 821–827 (2002)
- [6] Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H.: Circadian periodicity in salivary carbonic anhydrase VI concentration. *Acta Physiol. Scand.* **154**(2), 205–211 (1995)
- [7] Ivanov, S., Liao, S.Y., Ivanova, A., Danilkovitch-Miagkova, A., Tarasova, N., Weirich, G., Merrill, M.J., Proescholdt, M.A., Oldfield, E.H., Lee, J., Zavada, J., Waheed, A., Sly, W., Lerman, M.I., Stanbridge, E.J.: Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am. J. Pathol.* **158**(3), 905–919 (2001)
- [8] van Kuijk, S.J.A., Yaromina, A., Houben, R., Niemans, R., Lambin, P., Dubois, L.J.: Prognostic Significance of Carbonic Anhydrase IX Expression in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Front Oncol* **6** (2016)
- [9] Wykoff, C.C., Beasley, N.J.P., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Harris, A.L.: Hypoxia-inducible Expression of Tumor-associated Carbonic Anhydrases. *Cancer Res* **60**(24), 7075–7083 (2000)
- [10] Supuran, C.T.: Carbonic anhydrases—an overview. *Curr. Pharm. Des.* **14**(7), 603–614 (2008)
- [11] Parkkila, S., Kaunisto, K., Rajaniemi, L., Kumpulainen, T., Jokinen, K., Rajaniemi, H.: Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. *J. Histochem. Cytochem.* **38**(7), 941–947 (1990)
- [12] Čapkauskaitė, E., Zubrienė, A., Smirnov, A., Torresan, J., Kišonaitė, M., Kazokaitė, J., Gylytė, J., Michailovienė, V., Jogaitė, V., Manakova, E., Gražulis, S., Tumkevičius, S., Matulis, D.: Benzenesulfonamides with pyrimidine moiety as inhibitors of human carbonic anhydrases I, II, VI, VII, XII, and XIII. *Bioorg. Med. Chem.* **21**(22), 6937–6947 (2013)
- [13] Kazokaitė, J., Milinavičiūtė, G., Smirnovienė, J., Matulienė, J., Matulis, D.: Intrinsic binding of 4-substituted-2,3,5,6-tetrafluorobenzenesulfonamides to native and recombinant human carbonic anhydrase VI. *FEBS J.* **282**(5), 972–983 (2015)
- [14] Dudutienė, V., Zubrienė, A., Smirnov, A., Gylytė, J., Timm, D., Manakova, E., Gražulis, S., Matulis, D.: 4-Substituted-2,3,5,6-tetrafluorobenzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrases I, II, VII, XII, and XIII. *Bioorg. Med. Chem.* **21**(7), 2093–2106 (2013)
- [15] Matulis, D., Kranz, J.K., Salemme, F.R., Todd, M.J.: Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: Measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. *Biochemistry* **44**(13), 5258–5266 (2005)
- [16] Kazlauskas, E., Petrikaitė, V., Michailovienė, V., Revuckienė, J., Matulienė, J., Grinius, L., Matulis, D.: Thermodynamics of Aryl-Dihydroxyphenyl-Thiadiazole Binding to Human Hsp90. *PLOS ONE* **7**(5), 36899 (2012)

- [17] Aspatwar, A., Tolvanen, M.E.E., Jokitalo, E., Parikka, M., Ortutay, C., Harjula, S.-K.E., Rämetsä, M., Vihinen, M., Parkkila, S.: Abnormal cerebellar development and ataxia in CARP VIII morphant zebrafish. *Hum. Mol. Genet.* **22**(3), 417–432 (2013)
- [18] Becker, H.M.: Transport of Lactate: Characterization of the Transporters Involved in Transport at the Plasma Membrane by Heterologous Protein Expression in *Xenopus* Oocytes. In: Hirrlinger, J., Waagepetersen, H.S. (eds.) *Brain Energy Metabolism* vol. 90, 2nd edn., pp. 25–43. Springer, New York (2014)
- [19] Price, G.D., Badger, M.R.: Isolation and Characterization of High CO₂-Requiring-Mutants of the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 : Two Phenotypes that Accumulate Inorganic Carbon but Are Apparently Unable to Generate CO₂ within the Carboxysome. *Plant Physiol.* **91**(2), 514–525 (1989)
- [20] Dubois, L., Douma, K., Supuran, C.T., Chiu, R.K., van Zandvoort, M.A.M.J., Pastoreková, S., Scozzafava, A., Wouters, B.G., Lambin, P.: Imaging the hypoxia surrogate marker CA IX requires expression and catalytic activity for binding fluorescent sulfonamide inhibitors. *Radiother Oncol* **83**(3), 367–373 (2007)
- [21] Dudutienė, V., Matulienė, J., Smirnov, A., Timm, D.D., Zubrienė, A., Baranauskienė, L., Morkūnaite, V., Smirnovienė, J., Michailovienė, V., Juozapaitienė, V., Mickevičiūtė, A., Kazokaitė, J., Bakšytė, S., Kasiliauskaitė, A., Jachno, J., Revuckienė, J., Kišonaitė, M., Pilipuitytė, V., Ivanauskaitė, E., Milinavičiūtė, G., Smirnovas, V., Petrikaitė, V., Kairys, V., Petrauskas, V., Norvaišas, P., Lingė, D., Gibieža, P., Capkauskaitė, E., Zakšauskas, A., Kazlauskas, E., Manakova, E., Gražulis, S., Ladbury, J.E., Matulis, D.: Discovery and characterization of novel selective inhibitors of carbonic anhydrase IX. *J. Med. Chem.* **57**(22), 9435–9446 (2014)
- [22] Klier, M., Jamali, S., Ames, S., Schneider, H.-P., Becker, H.M., Deitmer, J.W.: Catalytic activity of human carbonic anhydrase isoform IX is displayed both extra- and intracellularly. *FEBS J* **283**(1), 191–200 (2016)
- [23] Alterio, V., Hilvo, M., Fiore, A.D., Supuran, C.T., Pan, P., Parkkila, S., Scaloni, A., Pastorek, J., Pastorekova, S., Pedone, C., Scozzafava, A., Monti, S.M., Simone, G.D.: Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *PNAS* **106**(38), 16233–16238 (2009)
- [24] Ullah, M.S., Davies, A.J., Halestrap, A.P.: The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **281**(14), 9030–9037 (2006)
- [25] Jamali, S., Klier, M., Ames, S., Barros, L.F., McKenna, R., Deitmer, J.W., Becker, H.M.: Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX facilitates lactate flux in human breast cancer cells by non-catalytic function. *Sci Rep* **5**, 13605 (2015)

Justina Kazokaite | Curriculum Vitae

Gimimo data: 1989 05 20

+370 624 90902 • ✉ kazokaite@ibt.lt, justinakazokaite@gmail.com

Adresas: Tauro g. 5-515, Vilnius LT-03106, Lietuva

Išsilavinimas

Vilniaus Universitetas

Doktorantūros studijos, biochemija

2014-2018

Vadovas: prof. Daumantas Matulis

Darbo tema: Žmogaus karboanhidrazių VI ir IX slopiklių efektyvumo ir toksiškumo tyrimai

Vilniaus Universitetas

Magistrantūros studijos, biochemija

2012-2014

Vadovas: prof. Daumantas Matulis

Darbo tema: Žmogaus karboanhidrazės VI jungimosi su sulfonamidiniais ligandais termodinaminė analizė

Vilniaus Universitetas

Bakalauro studijos, biochemija

2008-2012

Vadovas: prof. Daumantas Matulis

Darbo tema: Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI gavimas, stabilumo apibūdinimas ir jungimosi su slopikliais matavimas.

Darbo patirtis

Jaunesnioji mokslo darbuotoja

BVTS, Biotechnologijos institutas, Vilniaus Universitetas

Nuo 2014

Laborantė

BVTS, Biotechnologijos institutas, Vilniaus Universitetas

2010-2014

Projektai

Nuo 2017: S-MIP-17-87, "Karboanhidrazių-slopiklių atpažinimo mechanizmas – priešvėžinės terapijos link", vadovas Daumantas Matulis, LMT

Nuo 2017: SEN-04/2015, "Žmogaus karboanhidrazės IX, kaip vėžinių ląstelių žymens, taikymo onkologinių ligų diagnostikai, vaizdinimui bei prognozei, tyrimas", vadovė Jurgita Matulienė, LMT

2012-2015: VP1-3.1-ŠMM-07-K-009, Visuotinė dotacija "Atrankių karboanhidrazių slopiklių sintezė ir priešvėžinių savybių tyrimas", vadovas Daumantas Matulis

2012-2014: LIG-09/2012, "Karboanhidrazės hCA XII, kaip vėžinių ląstelių žymens, diagnostinio potencialo įvertinimas", vadovas Daumantas Matulis, LMT

Stažuotės

Mastrichto Universitetas, Olandija

Erasmus+ stipendija

Konsultantas: prof. Ludwig J. Dubois

8 mėn. (2016-2017)

Tema: junginių funkcinio aktyvumo tyrimai žmogaus vėžinėse ląstelėse

Kaizerslauterno Universitetas, Vokietija

Erasmus+ stipendija

Konsultantas: prof. Joachim Deitmer

2 mėn. (2015)

Tema: atrankus karboanhidrazių slopinimas *Xenopus* ovocituose

Tamperės Universitetas, Suomija

Erasmus+ stipendija

Konsultantas: prof. Seppo Parkkila

2 mėn. (2015)

Tema: junginių toksiškumo tyrimai danijose

Tarptautinės mokyklos

2018 vasario 6-9: “MOLECULE IN(ter)ACTION: from in vitro to zebrafish”, COST CA15126, Palermas, Italija

2015 rugsėjo 29 - spalio 2: 4-tieji danijų kultivavimo kursai, Bugudžatė, Italija

Apdovanojimai

2018 gegužė: VU Gyvybės mokslų centro vardinė stipendija

2018 balandis: gauta FEBS Jaunųjų mokslininkų forumo stipendija dalyvauti šiame forume ir 43-iame FEBS kongrese

2017 gruodis: gauta COST CA15126 stipendija dalyvauti tarptautinėje mokykloje “MOLECULE IN(ter)ACTION: from in vitro to zebrafish”

2017 balandis: skirta VU vienkartinė tikslinė stipendija už pasiekimus mokslinėje veikloje

2015 vasario 17: LMA Prezidiumo skirta mokslinių darbų premija už magistro mokslinį darbą

2014 rugsėjo 31: Magistro darbas LJMS įvertintas kaip geriausias biomedicinos srities darbas Lietuvoje