

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Lina Baranauskienė

**REKOMBINANTINIŲ ŽMOGAUS
KARBOANHIDRAZIŲ I, II, VII, IX, XIII
SĄVEIKOS SU LIGANDAIS TYRIMAS**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2013

Disertacija rengta 2006–2012 m. Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute.

Mokslinis vadovas:

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

Padėka

Ši disertacija ir joje aprašyti darbai buvo atliekami keletą metų, dirbant šaunioje komandoje, todėl norėčiau padėkoti daugybei žmonių.

Pirmiausia, esu dėkinga savo darbo vadovui dr. D. Matuliui už galimybę dirbti jo suburtoje grupėje, už mokslines idėjas, diskusijas, galimybę rinktis / ieškoti / atrasti ir, labiausiai, – už neišsenkančias optimizmo atsargas.

Už tirtų baltymų klonavimą esu dėkinga dr. J. Matulienei, J. Torresan, ir J. Jachno, už didžiulius išgrynintų baltymų kiekius – V. Michailovienei, už baltymų masių spektroskopinę analizę – R. Chaleckiui. Dėkoju chemikams, sintetinusiems naujus karboanhidrazių ligandus, – dr. V. Dudutienei, dr. E. Čapkauskaitei ir dr. J. Sūdžiui. Ačiū dr. P. Cimmperman už matematinį terminio poslinkio analizės papildomų modelių išvedimą.

Dėkoju VU Biotechnologijos instituto Baltymų–nukleorūgščių sąveikos tyrimo skyriaus darbuotojams ir studentams: dr. S. Gražuliui, dr. E. Manakovai, dr. G. Tamulaitienei, dr. D. Golovenko, dr. R. Sukackaitei, K. Temčinaitei, R. Žalytei už karboanhidrazių kompleksų su ligandais kristalinimą, duomenų rinkimą ir kristalinių struktūrų sprendimą. Taip pat EMBL/DESY (Hamburgas) už galimybę kristalų difrakciją matuoti sinchrotrone.

Dėkoju visiems kolegoms iš bendradarbiaujančių laboratorijų – už efektyvų darbą planuojant ir atliekant eksperimentus, analizuojant duomenis bei ruošiant publikacijas.

Esu ypač dėkinga dr. V. Petrauskui už supažindinimą su L^AT_EX ir kitomis atvirojo kodo programomis, patarimus, pagalbą rasti techninius sprendimus disertacijos rašymo ir, ypač, jos taisymo metu.

Esu labai dėkinga dr. I. Matijošytei, dr. V. Petrikaitei, dr. V. Smirnovui, dr. V. Petrauskui, dr. A. Zubrienei, dr. V. Dudutienei, dr. E. Čapkauskai-
tei, M. Kazlauskienei už mano disertacijos skaitymą, kritiką ir vertingas
pastabas. A. Baranauskaitei dėkoju už kalbos redagavimą.

Dėkoju visiems esamiems ir buvusiems Biotermodinamikos ir vaistų
tyrimo skyriaus kolegoms – rašydama disertaciją įvertinau, kaip šaunu
dirbti „margame“ kolektyve, kai šalia ne tik biochemijos, bet ir organinės
chemijos, fizikos, biologijos, farmacijos sričių specialistai. Ačiū už visus
Jūsų patarimus ir draugišką skyriaus atmosferą.

Taip pat esu labai dėkinga savo šeimai, ypač Aurimui, už kantrybę,
supratimą ir palaikymą.

Lina

Vilnius, 2013

Turinys

Sutrumpinimų sąrašas	1
Įvadas	3
Literatūros apžvalga	7
1.1. Karboanhidrazių paplitimas, klasės / tipai	7
1.2. α -Karboanhidrazių izoformos	8
1.2.1. Citoplazminės izoformos (CA I, II, III, VII, XIII)	10
1.2.2. CA IV	13
1.2.3. CA VA ir CA VB	13
1.2.4. CA VI	14
1.2.5. CA IX	15
1.2.6. CA VIII, CA X, CA XI	16
1.2.7. CA XII, XIV	17
1.3. α -Karboanhidrazių struktūra	17
1.4. α -Karboanhidrazių fermentinis veikimo mechanizmas	20
1.5. Karboanhidrazių slopinimo mechanizmas, slopiklių tipai	22
1.6. Karboanhidrazių aktyvinimas	24
1.7. Karboanhidrazė kaip terapinis taikinyss	25
1.7.1. Glaukoma	26
1.7.2. Nervų sistemos ligos ir nutukimas	28
1.7.3. Vėžys	28
1.7.4. Diuretikai ir kiti CA slopikliai	29
1.8. Karboanhidrazė kaip modelinis baltymas	29
1.8.1. CA kaip modelinio baltymo privalumai ir trūkumai	30
1.8.2. CA ir mažamolekulinių junginių sąveikos tyrimo metodai	30
1.9. Susijusios reakcijos	35
Medžiagos ir tyrimo metodai	37
2.1. Medžiagos	37
2.1.1. Reagentai	37
2.1.2. Baltymai	37
2.1.3. Karboanhidrazių ligandai	38
2.1.4. Universalus plataus pH intervalo eksperimentų buferis	39
2.2. Metodai	39
2.2.1. Izoterminio titravimo kalorimetrija	39
2.2.2. Terminio poslinkio analizė	41
2.2.3. Diferencinio skenavimo kalorimetrija	44

2.2.4.	Gelfiltracinė analizė	44
2.2.5.	NDS elektroforezė	45
2.2.6.	Baltymų dializė, koncentracijos nustatymas	45
2.2.7.	Baltymų-ligandų kompleksų struktūrų vizualizacija	46
Rezultatai ir jų aptarimas		47
3.1.	Karboanhidrazių tyrimai	47
3.1.1.	CA stabilumo įvertinimas	47
3.1.2.	CA IX biocheminis charakterizavimas	52
3.2.	Karboanhidrazių panaudojimas, tobulinant TSA modelį	57
3.2.1.	CA II-EZA sąveika – modelinė sistema labai stiprioms sąveikoms matuoti	57
3.2.2.	Ligandų įtaka baltymo stabilumui: stabilizavimas ir destabilizavimas	61
3.3.	Naujų ligandų tyrimas	63
3.3.1.	4-[N-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidai	63
3.3.2.	Į indapamidą panašūs benzensulfonamidai	70
3.3.3.	[1,2- <i>c</i>][1,2,3]-tiadiazol-7-sulfonamidai	74
3.4.	CA XIII sąveikos su sulfonamidiniais slopikliais termodinaminė analizė	76
3.4.1.	Susijusios reakcijos	77
3.4.2.	Tikrosios jungimosi konstantos nustatymas	78
3.4.3.	Stebimosios entalpijos išskaidymas	80
3.4.4.	Tikrieji tirtų reakcijų termodinaminiai parametrai	83
Išvados		87
Mokslinių darbų sąrašas		89
Literatūra		95

Sutrumpinimų sąrašas

AR	aminorūgštis
AZM	acetazolamidas
BMR	branduolių magnetinis rezonansas
CA	karboanhidrazė (angl. <i>carbonic anhydrase</i>)
CAZnH ₂ O	prie karboanhidrazės aktyviojo centro Zn ²⁺ koordinuota vandens molekulė
CARP	į karboanhidrazę panašus baltymas (angl. <i>carbonic anhydrase related protein</i>)
DMSO	dimetilsulfoksidas
DNS	dansilamidas
DTT	ditiotreitolis
EZA	etokzolamidas
GPI	glikozilfosfatidilinozitolio inkaras
IR	infraraudonieji spinduliai
ITC	izoterminio titravimo kalorimetrija (angl. <i>isothermal titration calorimetry</i>)
MTZ	metolazonas
MW	molekulinis svoris (angl. <i>molecular weight</i>)
ND	nėra duomenų
NDS	natrio dodecilsulfatas
PG	proteoglikaninis domenas
sCA IX	rekombinantinė CA IX trumpesnė forma
s.v.	santykiniai vienetai
TFMSA	trifluormetansulfonamidas

TSA terminio poslinkio analizė (angl. *thermal-shift assay*)

Įvadas

Tiriant ligų mechanizmus vis daugiau atrandama tokių baltymų-taikinių, kurių tiesioginio aktyvumo ar sąveikos su kitais baltymais moduliavimas gali būti taikomas gydyti tam tikrą ligą ar stabdyti jos progresavimą. Šiuo metu plačiausiai tam naudojama nekovalentinė sąveika su mažamolekuliniiais junginiais. Dalis vaistinių junginių sukurti konkrečiam baltymui-taikiniui, kitų taikiniai ne visada yra tiksliai identifikuojami, tačiau patvirtintas jų klinikinis veiksmingumas.

Pradinis naujų vaistinių junginių kūrimo etapas yra su baltymu-taikiniu sąveikaujančių ir jo aktyvumą didinančių / mažinančių junginių suradimas, optimizavimas ir sąveikos parametrų tyrimas. Disertacijoje aprašomi tyrimai priklauso šiam pradiniam etapui.

Naujų vaistinių junginių kūrimas vykdomas dviem pagrindinėmis kryptimis: 1) atliekant atsitiktinę paiešką didžiulėse gamtinių ar sintetinių junginių bibliotekose, kai pasirinkto taikinio aktyvumas tikrinamas tiriant pastarojo sąveiką su kiekvienu bibliotekoje esančiu junginiu; ir 2) kompiuteriniais metodais tikslingai modeliuojant naujus junginius, kai žinoma baltymo-taikinio struktūra, po to atrinktus junginius sintetinant ir tikrinant jų aktyvumą. Šio darbo rezultatai iš dalies prisideda prie abiejų minėtų krypčių efektyvumo didinimo.

Biofizikiniai tyrimo metodai baltymų-taikinių sąveikai su mažamolekuliniiais junginiais tirti, greta savitų kiekvieno metodo privalumų, bendru požiūriu yra naudingi savo universalumu. Fermentinio aktyvumo matavimo metodas atskirai pritaikomas kiekvienam tiriamam fermentui, tam naudojama daug skirtingų detekcijos būdų, o matuoti fermentinio aktyvu-

mo neturinčių baltymų biologinį aktyvumą naudojamos dar sudėtingesnės ir individualiai parinktos sistemos. Tuo tarpu, kiekvienos reakcijos metu išsiskirianti ar sugeriamą šilumą yra universalus signalas, kurį galima išmatuoti kalorimetriniais metodais. Taip pat beveik universalus signalas yra fluorescencija, kurios intensyvumo pokyčiu pagrįstas baltymo lydymosi temperatūros nustatymas terminio poslinkio analizės metodu. Šis metodas tinka daugumai skirtingų baltymų ir juo galima nesunkiai atrinkti tikslinius junginius, kurie, prisijungę prie baltymo, pakeičia jo lydymosi temperatūrą.

Terminio poslinkio analizė – vienas iš universaliausių bei didžiausio našumo metodų, taikomas atliekant didelio masto paieškas cheminių junginių bibliotekose. Šio metodo vystymas naudingas ir didinant naujų junginių paieškos efektyvumą, ir gilinant stebimų procesų suvokimą. Eksperimentinių duomenų analizei taikomų matematinių modelių patikslinimas leidžia šį metodą naudoti ne tik kokybinei baltymo–ligando sąveikos detekcijai, bet ir kiekybiniam jos stiprumui įvertinti.

Vienas iš tikslų kuriant naujus junginius kompiuteriniais metodais yra kiekybinis struktūros ir aktyvumo susiejimas, kuris galimas tik nustačius tiriamo baltymo erdvinę struktūrą bei išmatavus baltymo ir ligando sąveikos stiprumą. Vystantis kristalinių struktūrų nustatymo metodams (naudojant kristalinimo robotus, kristalų difrakciją matuojant sinchrotronuose, optimizuojant struktūrų sprendimo metodus), jau gaunamos net atominės skiriamosios gebos tikslumo struktūros, o jungimosi konstantų nustatymo tikslumas mokslinėje literatūroje dar stipriai atsilieka.

Dažniausiai literatūroje pateikiamos stebimosios baltymų–ligandų jungimosi parametrų vertės, kurios priklauso nuo eksperimento sąlygų (pH, temperatūros, naudojamos buferinės medžiagos). Be abejo, šios stebimosios vertės yra naudingos lyginant skirtingus junginius. Tuo labiau, dažniausiai eksperimento sąlygos parenkamos taip, kad būtų artimos fiziologinėms, tad gana patikimai atspindi tikėtiną junginio veikimą ir *in vivo*

sąlygomis. Tačiau tiksliniam naujų junginių kūrimui taikant kompiuterinius modeliavimo metodus, tokia informacija yra nepakankama, todėl šiame darbe siekiama iš stebimųjų baltymo ir ligando sąveikos parametrų išskirti tikruosius, nepriklausančius nuo eksperimento sąlygų bei susijusių (angl. *linked*) kartu vykstančių reakcijų ir aprašančius tik tiriamo baltymo ir junginio sąveiką.

Šio darbo objektas – žmogaus karboanhidrazės (CA) – fermentai, katalizuojantys virsmus tarp anglies dioksido ir bikarbonato. Karboanhidrazių slopinimas gali būti taikomas gydyti tokias skirtingas ligas kaip glaukoma, vėžys, nutukimas, epilepsija, osteoporozė ir kt. Šiuo metu yra beveik 30 mažamolekulinių junginių, kurie naudojami kaip vaistai, su padidėjusiu karboanhidrazių aktyvumu susijusioms ligoms gydyti. Daug dėmesio skiriama siekiant sukurti savitus skirtingų karboanhidrazių izoformų slopiklius, kurie veiktų tik pasirinktą taikinį, tuo būdu tikintis sumažinti nepageidaujamus šalutinius poveikius. Turint omeny didelį karboanhidrazių izoformų skaičių, jų struktūrinį panašumą bei gana platų daugelio izoformų paplitimą įvairiuose audiniuose, tokių junginių sukūrimas yra itin sudėtingas.

Šio darbo tikslas:

ištirti rekombinantinių žmogaus karboanhidrazių CA I, II, VII, IX ir XIII sąveiką su sulfonamidiniais ligandais.

Šiam tikslui įgyvendinti iškelti uždaviniai:

1) įvertinti pasirinktų rekombinantinių žmogaus karboanhidrazių stabilumą skirtingomis eksperimentinėmis sąlygomis bei charakterizuoti CA IX baltymą;

2) praplėsti terminio poslinkio analizės metodo taikymo ribas stipriems ir baltymą destabilizuojantiems ligandams tirti, modeliniais baltymais naudojant karboanhidrazes;

3) įvertinti naujų susintetintų junginių sąveikos su žmogaus karboanhidrazėmis stiprumą lyginant su klasikiais vaistiniais karboanhidrazių

slopikliais;

4) ištirti CA XIII ir sulfonamidinių ligandų sąveikos termodinaminį mechanizmą, nustatant tikruosius jungimosi termodinaminius parametrus.

Mokslinis naujumas ir praktinė vertė:

šiam darbe pirmą kartą:

- ištirta priešvėžinio taikinio CA IX oligomerinė struktūra ir nustatyta, kad tai yra dimerinis baltymas;

- praplėstos fluorescencinės terminio poslinkio analizės metodo ribos, analizuojant baltymo lydymosi temperatūrą mažinančių ligandų jungimąsi bei detalizuojant labai stiprių sąveikų tyrimą šiuo metodu;

- nustatyti 40-ties naujų junginių jungimosi su žmogaus karboanhidrazėmis termodinaminiai parametrai. Daliai naujų junginių gautas Europos patentas;

- detaliai ištirta žmogaus CA XIII ir sulfonamidinių slopiklių sąveikos termodinamika, atskiriant tikruosius, nuo eksperimento sąlygų bei susijusių reakcijų nepriklausančius, jungimosi parametrus.

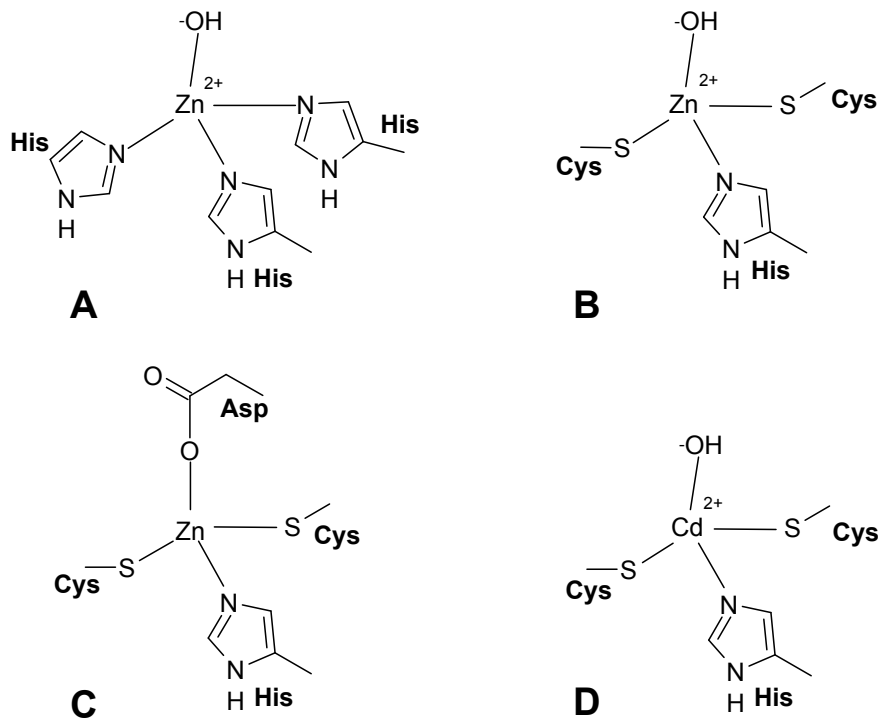
Literatūros apžvalga

Karboanhidrazės yra liazių (EC 4.2.1.1) klasės metalofermentai, būdingi tiek prokariotiniams, tiek eukariotiniams organizmams [1, 2]. Pirmą kartą karboanhidrazės aptiktos 1932 metais žinduolių eritrocituose [3]. Jų fermentiniam aktyvumui baltymo aktyviajame centre būtinas cinko ar, daug rečiau, kito divalenčio metalo jonas. Karboanhidrazės yra vieni greičiausių žinomų fermentų (žmogaus CA II $k_{kat} \sim 1,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) [4, 5].

1.1. Karboanhidrazių paplitimas, klasės / tipai

Karboanhidrazės yra koduojamos kelių nepriklausomai evoliucijos metu išsivysčiusių bei neturinčių ryškaus sekų panašumo genų šeimų [6, 7]. Šiuo metu žinomos penkios nepriklausomos karboanhidrazių šeimos, žymimos graikų abėcėlės raidėmis α , β , γ , δ , ζ . α -CA aptinkamos stuburiniuose, pirmuonyse, dumbliuose, žaliųjų augalų citoplazmoje bei kai kuriose bakterijose. β -CA dažniausiai aptinkamos bakterijose, dumbliuose, vienskilčių ir dviskilčių augalų chloroplastuose, taip pat daugelyje grybų bei kai kuriose archėjose. γ -CA nustatytos archėjose, kai kuriose bakterijose, o δ -CA ir ζ -CA iki šiol aptiktos tik jūriniuose titnagdumbliuose. Visos šiuo metu žinomos karboanhidrazės yra metalofermentai [8]. α -, β - ir δ -CA aktyviajame centre turi Zn^{2+} joną. γ -CA dažniausiai randamos su Fe^{2+} , tačiau išlaiko aktyvumą ir pakeitus metalo joną į Zn^{2+} ar Co^{2+} . ζ -CA naudoja Cd^{2+} arba Zn^{2+} . Skirtingų šeimų karboanhidrazės vienos nuo kitų labai skiriasi ir oligomeriniu būviu: α -CA paprastai yra monomerai ir retkarčiais dimerai, β -CA būna dimerai, tetramerai, oktamerai, γ -CA –

trimerai. δ - ir ζ -CA greičiausiai yra monomerai [8]. Skirtingų CA klasių aktyviųjų centrų schematinis palyginimas parodytas 1.1 pav.

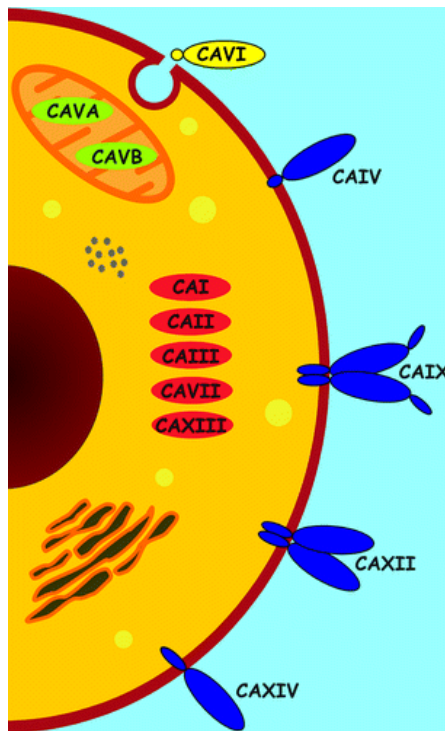


1.1 pav. Metalo jono koordinacija skirtingų klasių karboanhidrazėse: **A** – α -, γ - ir δ -CA (γ klasės CA metalas taip pat gali būti Co(II) arba Fe(II)); **B** ir **C** – β -CA aktyvūs centrai; **D** – ζ -CA (Cd(II) gali būti pakeičiamas Zn(II), neprarandant aktyvumo). [9]

1.2. α -Karboanhidrazių izoformos

Žinduolių organizmuose aptikta 16 α -karboanhidrazių izoformų (žymimos romėniškais skaitmenimis). Genų duomenų bazių paieškos rezultatai rodo, kad daugiau jų neturėtų būti atrasta [10]. Žmoguje ir kituose aukštesniuosiuose primatuose jų yra 15, nes CA XV baltymo raiška nevyksta dėl gene esančios rėmelio poslinkio mutacijos. Tokia gausybė izoformų tarpusavyje skiriasi oligomerine būsena, kataliziniu aktyvumu, lokalizacija ląstelėje, pasiskirstymu audiniuose ir organuose bei nustatyta ar spėjama funkcija [1, 5]. Pagal pasiskirstymą ląstelėje karboanhidrazių izoformas galima suskirstyti į citoplazmines, mitochondrines, sekretuojamas ir susijusias su membrana (1.2 pav.). Trys karboanhidrazių izoformos – CA VI-II, X ir XI – nėra kataliziškai aktyvios (jos dar vadinamos CARP (angl.

carbonic anhydrase related protein)). Taip yra todėl, kad jose yra įvykusios aktyviojo centro aminorūgščių, kurios koordinuoja katalizei būtiną cinko joną, mutacijos. Šiuo metu yra tiriama galima jų funkcija ir jos siejamos su nervų sistemos veikla [1, 11].

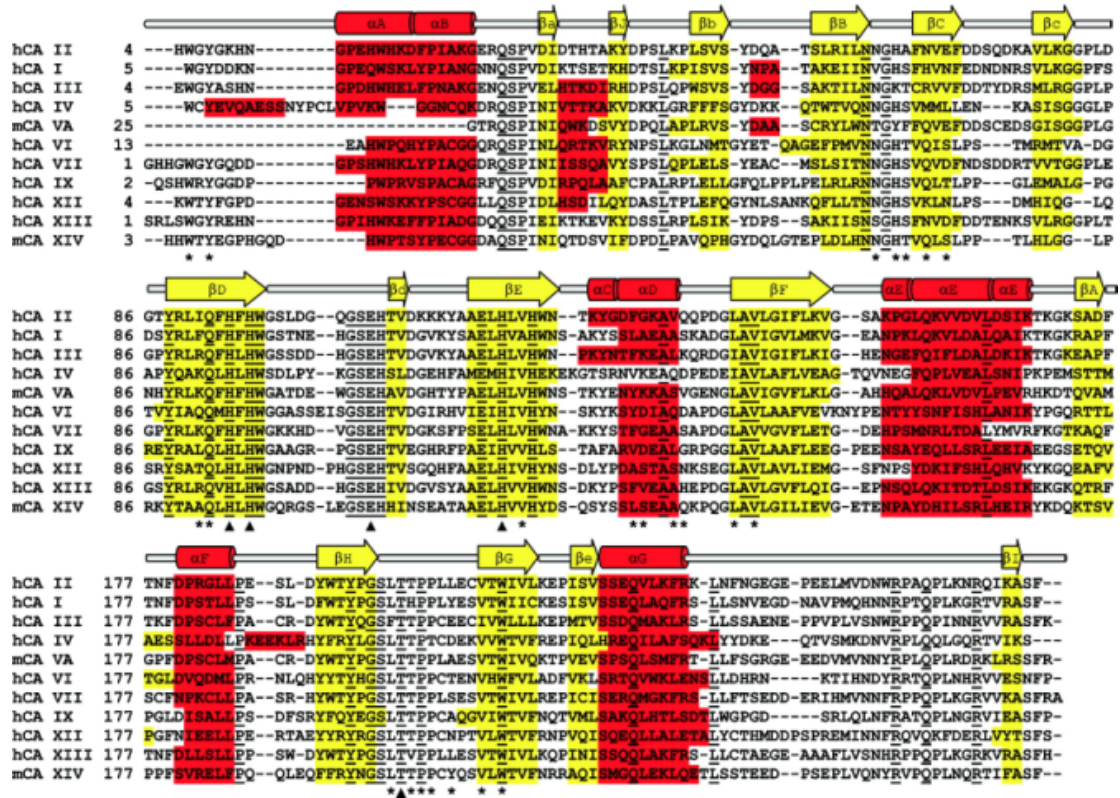


1.2 pav. Kataliziškai aktyvių žmogaus karboanhidrazių izoformų lokalizacija ląstelėje. CA I, II, III, VII ir XIII yra citozolinės, CA VA ir VB randamos mitochondrijose, CA VI sekretuojama už ląstelės ribų, CA IV randama ląstelės išorėje, prie membranos laikosi per GPI inkarą, CA IX, XII ir XIV turi vieną kartą membraną perveriančius membraninius domenus, o jų aktyvieji centrai yra ląstelės išorėje [12].

Nepaisant skirtingų izoformų ląstelinės lokalizacijos, jos yra labai homologiškos ir jų struktūros itin panašios (1.3 pav.).

Daugelyje audinių kelios karboanhidrazių izoformos veikia kartu. Pavyzdžiui, žinduolių inkstuose gaminamos mažiausiai trys izoformos – CA II, IV ir XII (graužikuose – net penkios: be jau minėtų, dar CA XIV ir CA XV) – jos sutartinai veikia rūgščių – bazių pernašoje, kuri yra būtina inkstų atliekamai rūgščių – bazių reguliacijos funkcijai [14, 15].

1.1 lentelėje pateiktas išsamus žmogaus karboanhidrazių izoformų palyginimas pagal jų pasiskirstymą audiniuose / organuose, lokalizaciją ląstelėje, katalizinį aktyvumą bei kartu nurodyta su kokiomis ligomis siejama



1.3 pav. Visų α -CA, kurių žinomos struktūros, sekų palyginys. CA II antrinės struktūros elementai pavaizduoti schematiškai: α -spiralės raudonais cilindrais, o β -klostės – geltonomis rodyklėmis. Pabrauktos konservatyvios aminorūgštys. Juodi trikampiai žymi katalizė svarbias aminorūgštis – Zn^{2+} koordinuojančius histidinus bei Thr199 ir Glu106, o žvaigždutėmis pažymėtos kitos aktyviojo centro kišenės aminorūgštys [13].

pasirinkta CA izoforma.

1.2.1. Citoplazminės izoformos (CA I, II, III, VII, XIII)

Penkios žmogaus α -karboanhidrazių izoformos (CA I, II, III, VII ir XI-II) yra citoplazminiai baltymai. **CA I** yra vienas iš gausiausių karboanhidrazių izofermentų žinduolių eritrocituose (jo yra apie 5-6 kartus daugiau nei CA II). Šiam baltymui būdingas mažas katalizinis aktyvumas [17].

CA II yra labiausiai paplitusi karboanhidrazių izoforma, aptinkama praktiškai visuose žmogaus audiniuose ir organuose. Fiziologinėmis sąlygomis kataliziškai labai aktyvi ($k_{kat} = 1,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) ir yra vienas greičiausių žinomų fermentų. Pagrindinė CA II funkcija – rūgščių – bazių pusiausvyros palaikymas. Dėl jos vyksta CO_2 mainai plaučiuose, eritrocituose, inkstuose. Parodyta, kad CA II, CA IV ir CA IX dalyvauja CO_2/HCO_3^-

1.1 lentelė. Žmogaus CA izoformų palyginimas.

Izoforma	Pasiskirstymas audiniuose / organuose	Ląstelinė lokalizacija	k_{cat}/K_M , $M^{-1}s^{-1}$	Su kokiomis ligomis siejama
CA I	Eritrocitai, virškinimo traktas, akys	Citozolyje	$5,0 \times 10^7$	Inkstų / smegenų edema
CA II	Eritrocitai, akys, virškinamasis kanalas, kaulų osteoklastai, inkstai, plaučiai, sėklidės, smegenys	Citozolyje	$1,5 \times 10^8$	Glaukoma, edema, epilepsija, aukštumų liga
CA III	Skeleto raumenys, adipocitai	Citozolyje	$2,5 \times 10^5$	Oksidacinis stresas, nutukimas
CA IV	Inkstai, plaučiai, kasa, smegenys, gaubtinė žarna, širdies raumuo, akys, liežuvis	Surišta su membrana per GPI inkarą	$5,1 \times 10^7$	Glaukoma, pigmentinis retinitas, insultas
CA VA	Kepenys	Mitochondrijose	$2,9 \times 10^7$	Nutukimas
CA VB	Širdies ir skeleto raumenys, kasa, inkstai, stuburo smegenys, virškinamasis kanalas	Mitochondrijose	$9,8 \times 10^7$	Nutukimas
CA VI	Seilių ir pieno liaukos	Sekretuojama	$4,9 \times 10^7$	Ėduonis
CA VII	Centrinė nervų sistema	Citozolyje	$8,3 \times 10^7$	Epilepsija
CA VIII	Centrinė nervų sistema	Citozolyje	neaktyvi	Neurodegeneracinės ligos, vėžys
CA IX	Navikai, virškinamojo kanalo gleivinė	Transmembraninė	$1,5 \times 10^8$	Vėžys
CA X	Centrinė nervų sistema	Citozolyje	neaktyvi	Nežinoma
CA XI	Centrinė nervų sistema	Citozolyje/sekretuojama	neaktyvi	Nežinoma
CA XII	Inkstų, žarnyno, dauginimosi organų epitelis, akys, navikai	Transmembraninė	$3,5 \times 10^7$	Vėžys, glaukoma
CA XIII	Inkstai, smegenys, dauginimosi organai, plaučiai, žarnynas	Citozolyje	$1,1 \times 10^7$	Nevaisingumas
CA XIV	Inkstai, smegenys, kepenys, akys	Transmembraninė	$3,9 \times 10^7$	Epilepsija, retinopatija

Sudaryta pagal [13, 16]

pernašoje per ląstelės membraną, susidarant transporto metabolonui su SLC4 šeimos HCO_3^-/Cl keitikliais, pvz., AE1 [1, 18, 19].

CA III savo struktūra panaši į CA II (šių izoformų sekų identiškumas – 62 %). Pirmą kartą CA III išskirta iš žmogaus skeleto raumenų ir charakterizuota 1979 metais. CA III yra hormonais reguliuojamas, itin mažo katalizinio aktyvumo CA izofermentas – tik apie 0,3 % CA II aktyvumo [5, 20]. Mažą fermentinį aktyvumą labiausiai lemia dviejų aminorūgščių skirtumai aktyviajame centre: Lys64, vietoje His64, neatlieka histidinui būdingo protonų šaudyklės vaidmens, o Phe198, vietoje formuojant hidrofobinę kišenę dalyvaujančio Leu198, sukuria erdvinius trukdžius aktyviajame centre [21]. CA III daugiausia yra skeleto raumenyse, kur ji sudaro ~8 % visų tirpių baltymų [21]. Ši izoforma, greta karboanhidrazinio, turi ir fosfatazinį aktyvumą [22]. Raumenims dirbant, kaupiasi laktatas ir fosfatas, terpė rūgštėja. Terpės pH reguliavimas yra viena iš CA III funkcijų. Nors, lyginant su kitomis izoformomis, CA III veikia labai lėtai, tačiau jos slopinimas pagreitina raumenų nuovargį. Be to, raumenims susitraukiant, padidėja aktyvių deguonies formų gamyba. CA III saugo ląstelę nuo oksidacinio streso. Iš penkių jos struktūroje esančių cisteinų du gali grįžtamai sąveikauti su glutationu per disulfidinį ryšį. Taip pat CA III labai gausiai gaminama adipocituose – čia ji sudaro iki 24 % tirpių baltymų. Adipocituose ji turi dvi pagrindines funkcijas – saugo ląsteles nuo oksidacinio streso pažeidimų ir dalyvauja reguliuojant genų raišką adipogenezės metu [23].

CA VII – labai homologiška kitoms citoplazminėms izoformoms, tačiau yra skirtingai pasiskirsčiusi audiniuose. CA VII daugiausiai randama smegenų audiniuose, dalyvauja sužadinant neuronus, perduodant signalą [24]. Neseniai nustatyta, kad ji yra potencialus taikynys neuropatinio skausmo (tai skausmas, atsirandantis dėl nervų sistemos pažeidimo arba jos funkcijų sutrikdymo) atveju, kurį gydyti metodų šiuo metu yra labai mažai [24]. CA VII yra didelio katalizinio aktyvumo (ji yra aktyvesnė už

CA I ir CA XIII, bet nesiekia CA II lygio). Struktūrą stabilizuoja vidumolekulinis disulfidinis ryšys Cys56-Cys180. Taip pat organizme aptikta ir trumpesnė bei gerokai mažiau stabili CA VII forma – baltymas, neturintis pirmų 56 aminorūgščių [25].

CA XIII – dar vienas citozolinis karboanhidrazių izofermentas. Baltymo raiška aptinkama užkrūčio liaukoje, inkstuose, pažandinėje seilių liaukoje, plonosiose žarnose bei dauginimosi organuose. CA XIII yra vidutinio katalizinio aktyvumo fermentas (aktyvumas panašus kaip CA I), tačiau ji labai jautri sulfonamidinę grupę turintiems slopikliams (panašiai kaip CA II) [10, 26, 27].

1.2.2. CA IV

CA IV izoforma iš kitų išsiskiria tuo, kad ji yra susijusi su ląstelės membrana per glikozilfosfatidilinozitolinį (GPI) inkarą. Į ją panašiausia (taip pat turinti GPI inkarą) yra CA XV, kurios raiška žmogaus organizme nevyksta. Šios karboanhidrazės aktyvusis centras yra ląstelės išorėje, didelis katalizinis aktyvumas. Jos struktūrai papildomo stabilumo suteikia du vidumolekuliniai disulfidiniai tilteliai [28]. CA IV organizme sutinkama daug kur – kepenyse, inkstuose, kasoje, smegenyse, žarnyne, širdies raumenyje, akyse ir kt. Viena iš pagrindinių jos funkcijų – rūgščių–bazių pusiausvyros reguliavimas inkstuose [29, 30]. Būtent CA IV, esanti liežuvyje, yra atsakinga už išsiskiriančio anglies dioksido pojūtį, geriant gazuotus gaiviuosius gėrimus. Galima šio reiškinių biologinė prasmė – galimybė gyvūnams pajusti maiste vykstančius rūgimo procesus [29, 31].

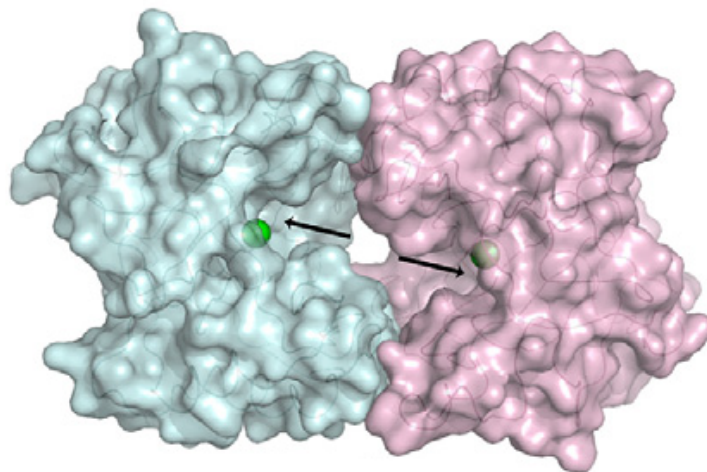
1.2.3. CA VA ir CA VB

CA VA ir **CA VB** – dvi karboanhidrazių izoformas, kurios nuo kitų α -CA skiriasi tuo, kad jos randamos mitochondrijose. Šios izoformas yra labai panašios (sekų identiškumas – 64 %), tačiau viena nuo kitos skiriasi pasiskirstymu audiniuose: žmogaus CA VA aptikta tik kepenyse, o CA VB

randama ir skeleto raumenyse, kasoje, inkstuose, seilių liaukose bei nugaros smegenyse [32,33]. Šios CA dalyvauja gliukoneogenezėje, ureagenezėje, lipogenezėje – užtikrina pradinio substrato HCO_3^- tiekimą biosintetiniams procesams. Dėl šios ypatybės jos yra galimi naujos kartos vaistų nuo nutukimo taikiniai [34–36].

1.2.4. CA VI

CA VI yra vienintelė sekretuojama žmogaus CA izoforma. CA VI pirmą kartą buvo aptikta seilėse, bet vėliau rasta ir ašarose, piene, nosies sekrete, kvėpavimo takų ir virškinamojo kanalo epitelyje ir kt. [37, 38]. Taip pat aptikta ir stresinėmis sąlygomis gaminama viduląstelinė šios izoformos variacija. CA VI, kaip ir su membrana susijusios CA IV, XII ir XIV, turi disulfidinį ryšį tarp Cys42 ir Cys224, kuris stabilizuoja aktyviojo centro kilpą, apimančią Pro222-Pro223 cis-ryšį, taip pat katalizinę aminorūgštį Thr199, kuri orientuoja su Zn^{2+} susirišantį hidroksidą katalizei. Kaip jau minėta, CA VI yra viena iš nedaugelio α -karboanhidrazių, kurios suformuoja dimerus. Dimerizacijos pobūdis skiriasi nuo CA IX ir CA XII dimerizacijos. CA VI dimere monomerai yra susijungę mažiausiai 11 vandenilinių ryšių. Monomerų aktyvieji centrai dimere yra nukreipti vienas į kitą (1.4 pav.). CA VI yra vidutinio aktyvumo izoforma, katalizinėmis savybėmis panaši į CA I [38].



1.4 pav. CA VI dimerizacija: monomerų aktyvieji centrai (pažymėti rodyklėmis) yra nukreipti vienas į kitą. [38]

1.2.5. CA IX

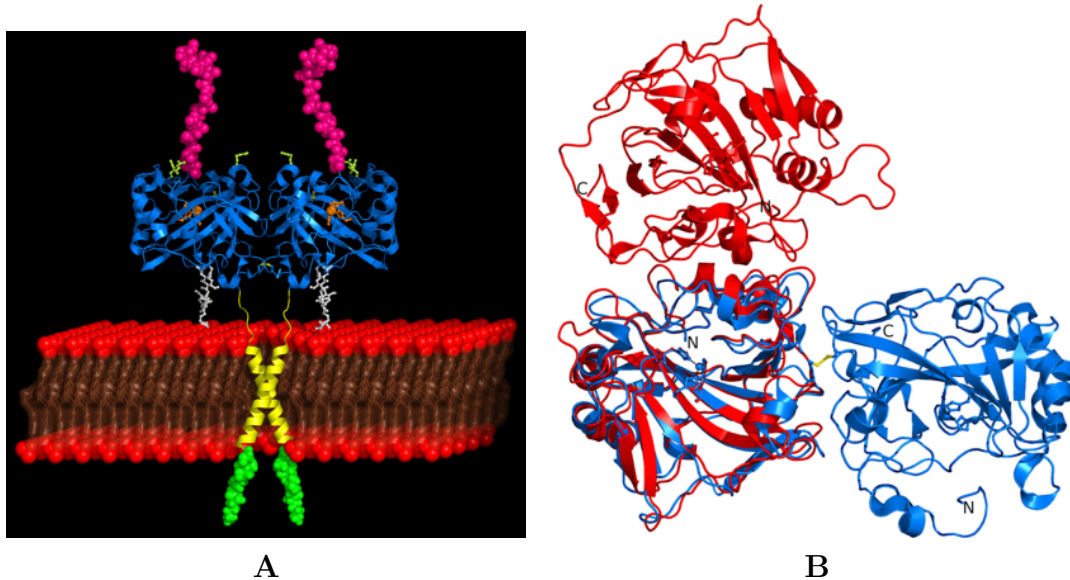
CA IX atrasta palyginti neseniai – 1992 metais HeLa ląstelių lini-
joje [39]. Tai didžiausia žmogaus karboanhidrazė (genas koduoja 459
aminorūgštis), sudaryta iš kelių domenų: N-galinis užląstelinis domenas
(414 AR), vieną kartą membraną perveriantis tarpmembraninis regionas
(20 AR) ir trumpa viduląstelinė sritis (25 AR). Ląstelės išorėje esančią bal-
tymo dalį sudaro signalinė seka (37 AR), proteoglikaninis domenas (59 AR)
ir 257 AR ilgio katalizinis CA domenas, labai homologiškas kitoms žmo-
gaus karboanhidrazėms [40, 41].

CA IX iš kitų CA šeimos baltymų išsiskiria tuo, kad jos raiška norma-
liuose audiniuose yra labai ribota, tuo tarpu kietųjų navikų atveju ląstelių
paviršiuje šio baltymo būna labai daug. Jos raiška visada susijusi su hipok-
sija – tai transkripcijos faktoriaus HIF-1 (angl. *hypoxia inducible factor*)
valdomas baltymas [42]. Pastebėta, kad CA IX raiška tiesiogiai susijusi
su sudėtingu vėžio gydymu – šį baltymą gaminantys navikai nepasiduoda
klasikinei radio- ir chemoterapijai [43, 44].

Greta auglio viduląstelinio pH reguliavimo, labai svarbi CA IX funkcija
ir tokiems vėžinių ląstelių procesams kaip adhezija ir migracija, nes jie
tiesiogiai susiję su metastazių atsiradimu [43].

Proteoglikaninis (PG) domenas yra išskirtinė šios izoformos savybė. Nustatyta, kad PG domeno funkcija šiuo atveju yra buferinė – jis lemia tai, kad CA IX pH optimumas yra 6,5 – tai būdinga kietų hipoksinių auglių tarpląstelinės terpės pH reikšmė. CA IX yra viena iš greičiausių žinomų karboanhidrazių ($k_{kat} = 1,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) – jos aktyvumas artimas CA II izoformai [40].

CA IX struktūros šerdį sudaro klasikinis dešimties β -klosčių lakštas. Struktūrą sutvirtina vidumolekulinis disulfidinis ryšys, būdingas ir kitoms membraninėms karboanhidrazėms (Cys23–Cys203). Dar vienas disulfidinis ryšys susidaro tarp dviejų karboanhidrazinių domenų formuojantis dimerui (Cys41–Cys41) 1.5 pav. [41].



1.5 pav. CA IX struktūra: **A** – siūlomas pilno ilgio baltymo modelis (kristalografiškai nustatyta tik katalizinio domeno struktūra), **B** – CA IX (mėlyna) dimerizacijos palyginimas su CA XII (raudona) [41].

1.2.6. CA VIII, CA X, CA XI

CA VIII, CA X ir CA XI yra katalizinio aktyvumo neturinčios karboanhidrazių izoformos, dar vadinamos CARP (angl. *carbonic anhydrase related proteins*). Kataliziškai jos neaktyvios dėl mutacijų aktyviajame centre – vienas ar du histidiniai, koordinuojantys cinko joną, šiuose baltymuose yra pakeisti kitomis aminorūgštimis [45]. Šių baltymų funkcijos

ištirtos dar gana neišsamiai, bet kuo toliau, tuo labiau daugėja įrodymų, kad CARP dalyvauja centrinės nervų sistemos vystymesi ir veikloje. CARP raiška aptinkama ir kituose audiniuose, kur jų funkcija dar nenustatyta. Nepaisant to, kad šie baltymai nėra kataliziškai aktyvūs, jie yra konservatyvūs daugelyje rūšių – nuo amfibijų iki žmogaus [46, 47].

CA VIII ir CA X yra ląsteliniai baltymai, o CA XI – sekretuojama izoforma [19].

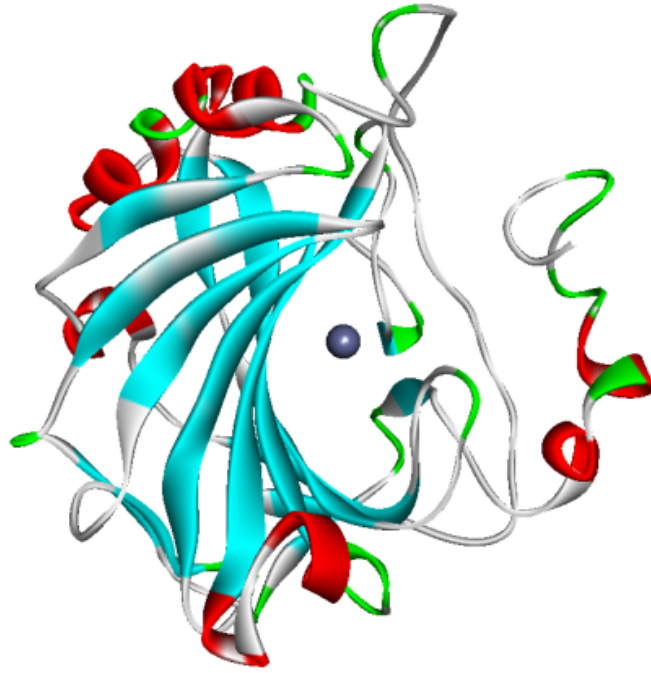
1.2.7. CA XII, XIV

CA XII yra dar viena membraninė karboanhidrazių izoforma. Jos aktyvusis centras yra ląstelės išorėje, baltymas formuoja dimerus [48]. CA XII raiška aptinkama inkstuose, žarnyne, pieno liaukose, dauginimosi organuose. Šio baltymo raiškos padidėjimas pastebėtas kai kurių vėžio formų atveju, todėl CA XII yra vienas iš priešvėžinių vaistų taikinių [49, 50].

CA XIV yra paskutinis atrastas žmogaus karboanhidrazių izofermentas [51]. Kaip ir CA XII bei CA IX, tai membraninį segmentą turintis baltymas, kurio aktyvusis centras yra ląstelės išorėje. Skirtingai nuo pastarųjų izoformų, ši CA yra monomeras [52]. CA XIV raiška nustatyta inkstuose, širdyje, smegenyse, skeleto raumenyse, kepenyse, plaučiuose. Savo struktūroje turi vieną vidumolekulinį disulfidinį tiltelį. Iš kitų CA izoformų išsiskiria neįprastu atsparumu druskoms [53].

1.3. α -Karboanhidrazių struktūra

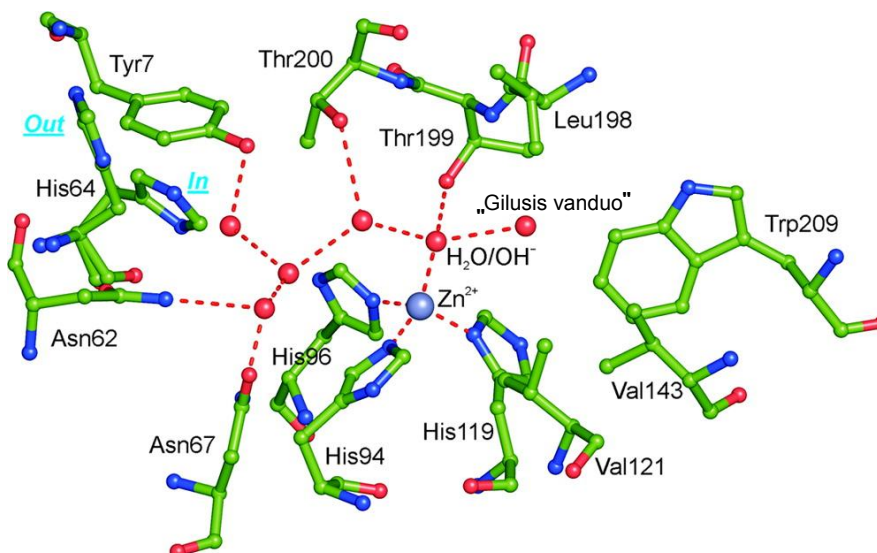
Karboanhidrazė yra penkioliktas baltymas, kurio erdvinė struktūra nustatyta kristalografiniais metodais 1971 metais [54]. Nepriklausomai nuo skirtingų izoformų ląstelinės lokalizacijos, karboanhidrazių struktūros yra labai panašios, ko ir reikia tikėtis, atsižvelgiant į didelę sekų homologiją. α -Karboanhidrazių struktūros pagrindą sudaro išlenktas antiparalelinis β -lakštas, apsuptas α -spiralių ir papildomų β -klosčių (1.6 pav.). Struktūra yra gana stabili ir praktiškai nekinta, prisijungiant substratui ar slopikliui.



1.6 pav. Bendra α -CA struktūra. Aktyviajame centre rutuliuku pažymėtas Zn^{2+} jonas. Skirtingomis spalvomis pavaizduoti antrinės struktūros elementai: raudona – α -spiralės, žydra – β -klostės, žalia – linkiai.

Aktyvusis centras yra didelėje kūgio formos ertmėje (maždaug 12 Å pločio ir 13 Å gylio), kuri tęsiasi nuo baltymo paviršiaus iki molekulos centro. Šios ertmės dugne yra aktyviojo centro cinko jonas, kurį α -karboanhidrazėse laiko trys konservatyvūs histidiniai – His94, His96 ir His119. Kai kuriose kitų klasių karboanhidrazėse dalis histidinių yra pakeisti cisteiniais [5]. Cinko jonui būdinga tetraedrinė koordinacija, kur trys ligandai yra baltymo histidinių azotai, o ketvirtasis – vandens molekulė arba hidroksido jonas. Šios vandens molekulės / hidroksido jono nukleofiliskumą padidina vandenilinių ryšių tinklas. $\text{H}_2\text{O} / \text{OH}^-$ sudaro vandenilinių ryšių su konservatyvia Thr199 aminorūgštimi bei dviem molekulėmis, esančiomis priešingose pusėse – viena, vadinama „giliuoju vandeniu“, esančia hidrofobinėje ertmėje, ribojamoje konservatyvių aminorūgščių pozicijose 121, 143, 198, ir 209; antra – hidrofilinėje aplinkoje, link įėjimo į aktyvųjį centrą (1.7 pav.) [12].

Visose CA izoformose baltymo aktyviojo centro ertmę galima sąlygiškai padalinti į dvi labai skirtingas sritis: viena yra sudaryta iš hidrofobinių

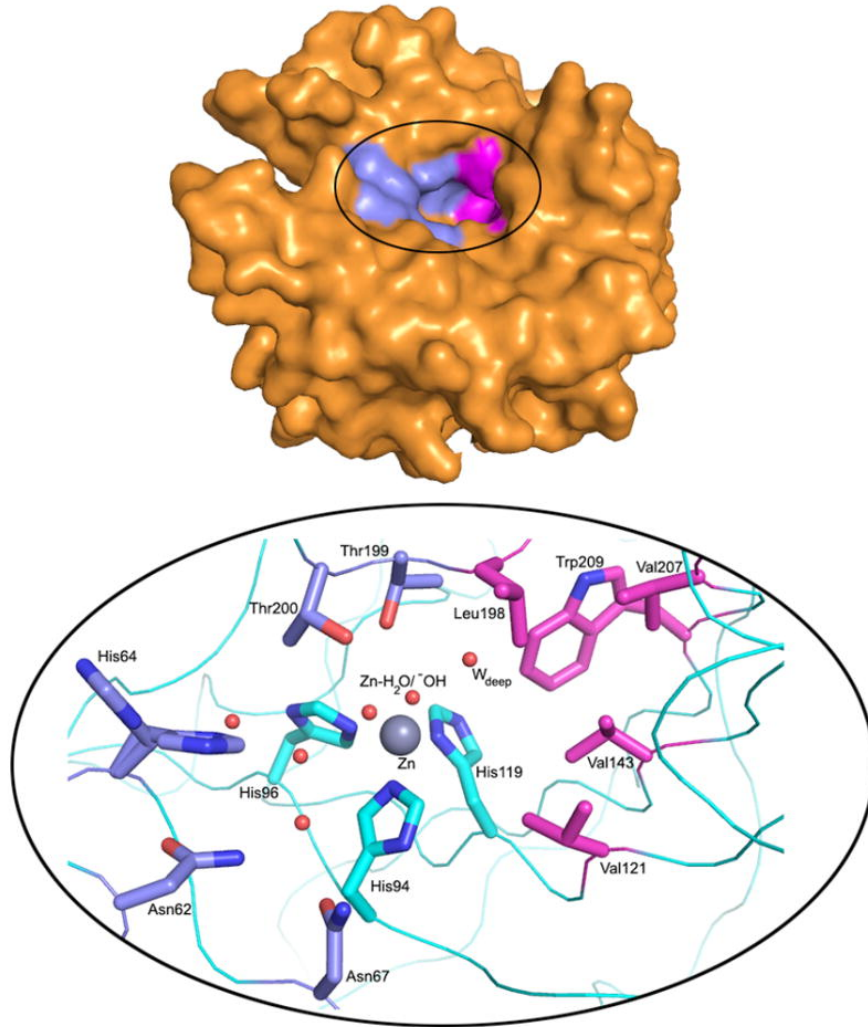


1.7 pav. α -CA pavyzdys – hCA II aktyvusis centras. Zn^{2+} tetraedriškai koordinuotas su trimis aktyviojo centro histidiniais ir vandens molekule arba hidroksido jonu, kuris toliau dalyvauja vandenilinių ryšių tinkle, formuojamame tarp aktyviojo centro aminorūgščių ir vandens molekulių. Parodytos abi His64 konformacijos: *in* ir *out* [12].

aminorūgščių klasterio, kita – hidrofilinė (1.8 pav.) [55, 56].

Ši dviejų skirtingų aplinkų sistema aktyviajame centre užtikrina efektyvų CO_2 pavertimą bikarbonatu. Hidrofobinis regionas yra būtinas pagauti CO_2 ir jo anglies atomą orientuoti patogia kryptimi prie cinko jono koordinuoto hidroksido jono nukleofilinei atakai, o hidrofilinis regionas sukuria tvarkingą vandenilinių ryšių tinklą, kuris užtikrina greitą protono pernašą nuo su cinko jonu susijungusios vandens molekulės į tirpiklį [57]. Viena iš svarbiausių šio proceso aminorūgščių yra His64 [58]. Ši aminorūgštis konservatyvi daugumoje aktyvių CA izoformų (CA I, II, IV, VI, VII, IX, XII, XIV). CA III His64 pakeistas Lys, o tai yra viena iš jos ypač mažo aktyvumo priežasčių. CA VA ir CA VB šioje pozicijoje turi Tyr.

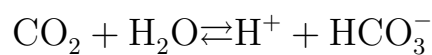
Visos žmogaus α -CA yra monomerai, išskyrus tris: dvi membranines – CA IX ir CA XII – bei sekretuojamą CA VI. Šios trys izoformos yra dimerai. Įdomu tai, kad dimerinės struktūros kiekvienu atveju yra skirtingos: dimerizuojasi skirtingais paviršiais, dimerizacija nedaro įtakos fermento kataliziniam aktyvumui.



1.8 pav. Žmogaus CA II aktyviojo centro kišenė. Hidrofobinė kišenės sritis (pažymėta rožine spalva) atsakinga už CO₂ (kristalinėse struktūrose paprastai ši pozicija būna užimta vandens molekulės (pažymėta W_{deep})) pagavimą. Hidrofilinė aktyviojo centro kišenės dalis (pažymėta violetine spalva) orientuoja CO₂ ir sudaro protonų pernašos tinklą (raudoni apskritimai), kuriame dalyvauja ir tirpiklio molekulės. Zn²⁺ joną koordinuoja trys histidiniai ir vandens molekulė arba hidroksido jonas [57].

1.4. α -Karboanhidrazių fermentinis veikimo mechanizmas

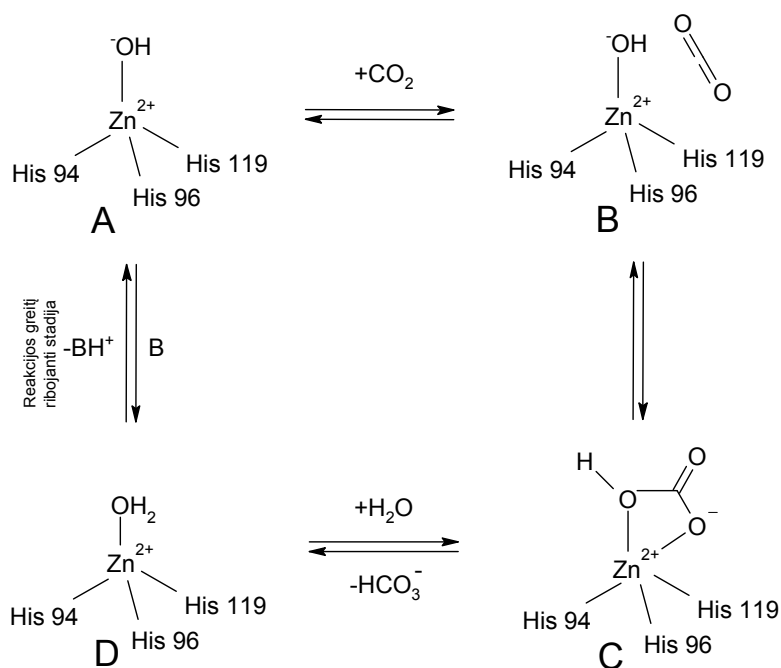
Karboanhidrazės katalizuoja grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją, susidarant bikarbonato jonui ir protonui:



Katalizė vyksta dviejų stadijų „ping-pong“ mechanizmu [59, 60]. Pir-

mosios stadijos metu vyksta nukleofilinė ataka – prie Zn^{2+} jono prisijungęs hidroksido jonas atakuoja CO_2 molekulę (1.9 **B** pav.), susidaro bikarbonato jonas, kuris lieka prisijungęs prie metalo jono (1.9 **C** pav.). Toliau vyksta bikarbonato jono pakeitimas vandens molekule (1.9 **D** pav.).

Antrosios stadijos, kuri riboja viso proceso greitį, metu prie Zn^{2+} jono prisijungusi vandens molekulė atiduoda protoną, kuris patenka į buferį (pažymėtą B raide), ir tuo būdu atstatoma aktyvi fermento forma (1.9 **A** pav.) su hidroksido jonu aktyviajame centre [59]. Šiam procesui svarbi aminorūgštis His64, kuri veikia kaip protonų šaudyklė [61]: kai His64 šoninė grandinė nukreipta į Zn^{2+} pusę (*in* konformacija), ji paima protoną iš su Zn^{2+} susijungusios vandens molekulės, tada šoninės grandinės konformacija pasikeičia į *out*, t. y. ji nukreipiama į buferio pusę ir atiduodamas protonas [62].



1.9 pav. α -CA katalizės mechanizmas. Proceso $\mathbf{A} \rightleftharpoons \mathbf{B}$ metu į fermento aktyvųjį centrą patenka substrato (CO_2) molekulė; $\mathbf{B} \rightleftharpoons \mathbf{C}$ – prie Zn^{2+} jono prisijungęs hidroksido jonas atakuoja CO_2 , susidaro bikarbonato jonas; $\mathbf{C} \rightleftharpoons \mathbf{D}$ – išlaisvinamas bikarbonato jonas, jį aktyviajame centre pakeičia vandens molekulė; $\mathbf{D} \rightleftharpoons \mathbf{A}$ yra proceso greitį ribojanti stadija, kurios metu fermentas grįžta į aktyvią formą, t. y. protonas nuo aktyviajame centre koordinuotos vandens molekulės pernešamas į buferį ir prie Zn^{2+} lieka prisijungęs hidroksido jonas.

1.5. Karboanhidrazių slopinimo mechanizmas, slopiklių tipai

Karboanhidrazių slopiklius pagal sąveikos su baltymu pobūdį galima skirstyti į dvi grupes: a) tuos, kurie sudaro tiesioginį ryšį su aktyviojo centro cinko jonu, ir b) tuos, kurie tiesiogiai su Zn^{2+} nesąveikauja. Šiuo metu žinomi keturi pagrindiniai α -karboanhidrazių slopinimo mechanizmai, patvirtinti kristalografiniais metodais [9, 63]:

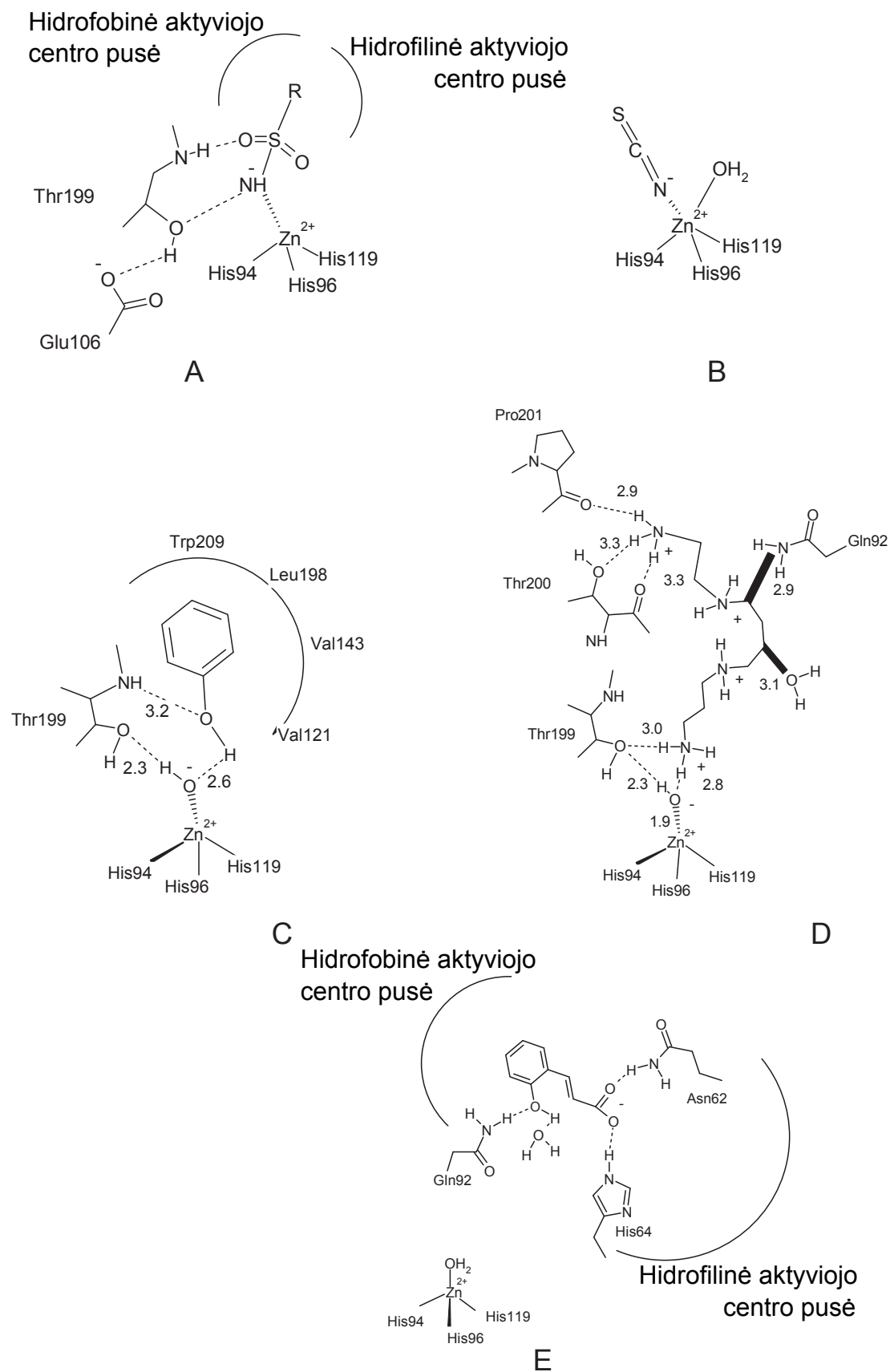
1) slopiklis prisijungia prie cinko jono, pakeisdamas ten buvusią vandens molekulę ar hidroksido joną, išlaikant tetraedrinę cinko jono koordinacijos geometriją (pvz., sulfonamidai, metalus kompleksuojantys anijonai 1.10 **A** pav.);

2) slopiklis patenka į metalo jono koordinacijos sritį, susidarant trikampės bipiramidės formos aduktui (anijonai, pvz., tiocianatas, 1.10 **B** pav.);

3) slopiklis prisijungia prie su Zn^{2+} sąveikaujančios vandens molekulės arba hidroksido jono (fenolis ir jo dariniai, 1.10 **C** pav., arba poliaminai, pvz., sperminas, spermidinas, 1.10 **D** pav.);

4) slopiklis užkemša įėjimą į aktyviojo centro ertmę, prisijungdamas aktyvatoriaus susirišimo srityje ir visiškai nesąveikaudamas su Zn^{2+} (pvz., kumarinai (hidrolizuojami *in situ* iki 2-hidroksicinamono rūgšties), lakosamidai ir fulerenai, 1.10 **E** pav.).

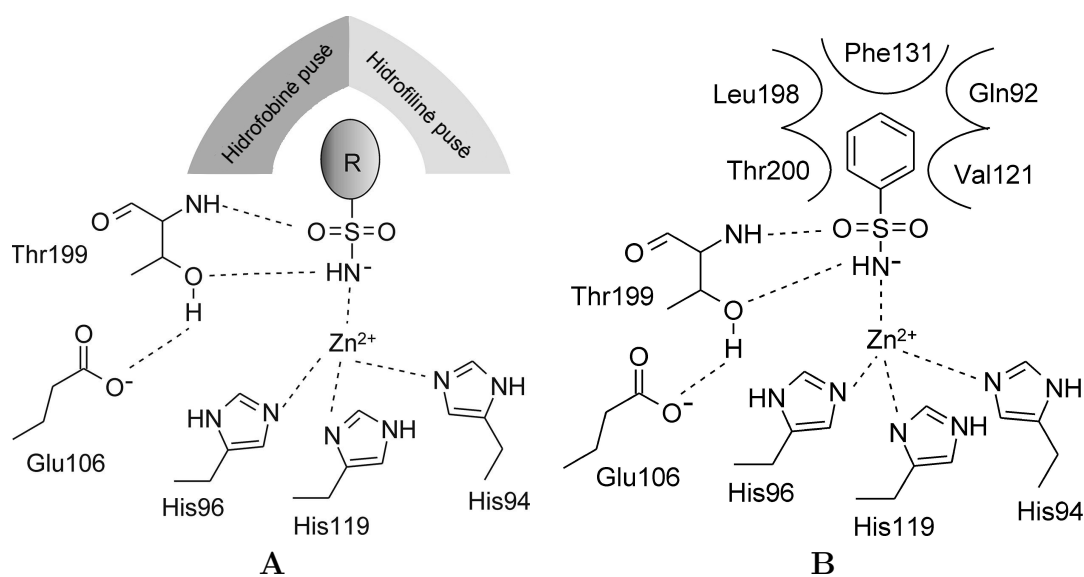
Klasikiniai CA slopikliai yra pirminiai sulfonamidai, RSO_2NH_2 , kurie medicinoje naudojami jau daugiau nei 50 metų kaip diuretikai ir sisteminiai priešglaukominiai vaistai [64, 65]. Sulfonamidinė ligando grupė su karboanhidraze tiesiogiai sudaro tris ryšius: azoto atomas sudaro joninį ryšį su Zn^{2+} ir vandenilinį ryšį su Thr199 deguonies atomu, o su šios aminorūgšties amino grupe vandenilinį ryšį sudaro vienas iš sulfonamidinės grupės deguonies atomų (1.11 pav.). Likusi ligando dalis, priklausomai nuo savo struktūros, gali sudaryti ryšius su baltymo aktyviojo centro kišenės hidrofiline ir (ar) hidrofobine sritimi. Benzensulfonamidai su kar-



1.10 pav. Kristalografiškai patvirtinti α -CA slopinimo mechanizmai [63].

boanhidrazėmis dažniausiai jungiasi labai panašiai – sulfonamidinė grupė sudaro įprastus ryšius su Zn^{2+} ir Thr199, o fenilo žiedas sudaro keletą van der Valso (van der Waals) kontaktų su Gln92, Val121, Phe131, Leu198 ir Thr200 aminorūgštimis (1.11 pav.) [56].

Beveik 30 cheminių junginių, priklausančių sulfonamidų ar sulfamatų klasėms ir pasižyminčių karboanhidrazės slopinančiu aktyvumu, yra naudojami kaip vaistiniai junginiai [66].



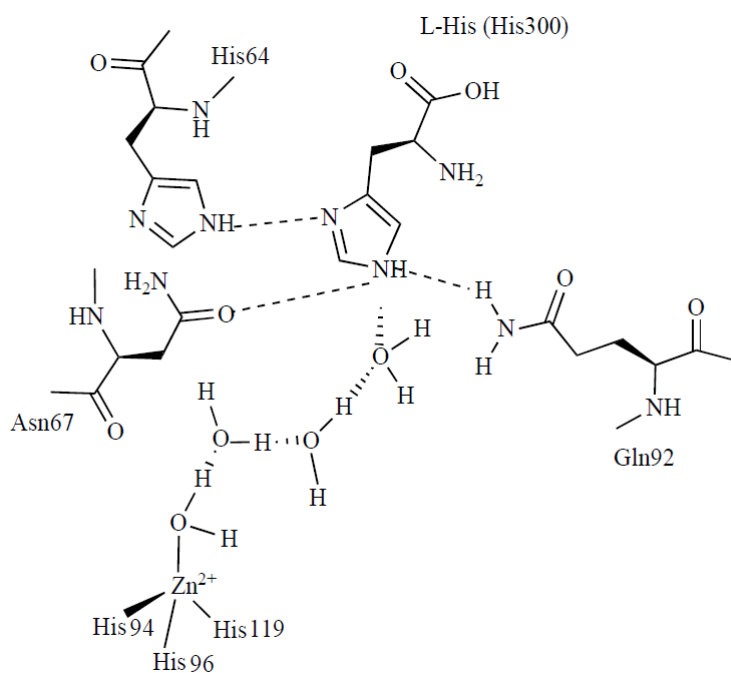
1.11 pav. Sulfonamidinę grupę turinčio ligando su baltymu sudaromi ryšiai: **A** – bendra schema, **B** – benzensulfonamido atvejis.

1.6. Karboanhidrazių aktyvinimas

Kadangi karboanhidrazės yra vieni greičiausių žinomų fermentų, jų aktyvinimas, skirtingai nei slopinimas, ištirtas gerokai mažiau. Aktyvatoriai dalyvauja katalizinio ciklo greitį ribojančioje stadijoje – protonų pernešime tarp aktyviojo centro ir reakcijos terpės. Daugumoje CA izoformų šią funkciją atlieka His64 aminorūgštis, dar vadinama protonų šaudykle. Esant aktyvatoriui, atsiranda alternatyvus protonų pernašos kelias, kuriame dalyvauja aktyviajame centre prisijungusio aktyvatoriaus protonizuojama grupė, todėl bendras katalizinis efektyvumas padidėja [11, 67].

Efektyviausi žinomi aktyvatoriai – L-histidinas, L-prolinas, kai kurios

kitos aminorūgštys ir į jas panašūs junginiai – histaminas, adrenalinas ir kt., turintys protonizuojamas grupes, kurių pK_a 6,5–8,0. Jie jungiasi prie įėjimo į aktyviojo centro kišenę, netoli His64, sudarydami vandenilinių ryšių tinklą su aktyviojo centro aminorūgštimis ir prie Zn^{2+} jono prisijungusiu hidroksido jonu / vandens molekule (1.12 pav.) [68].



1.12 pav. Aktyvatorius L-histidinas (pažymėtas kaip His300) hCA II aktyviajame centre. Punktyrinėmis linijomis pažymėti vandeniliniai ryšiai tarp aktyvatoriaus molekulės ir aktyviojo centro aminorūgščių His64, Asn67 ir Gln92. Skaičiai rodo atstumus Å [67].

Aktyvatoriaus prisijungimas karboanhidrazės aktyviajame centre prie protono pernašos pagreitinimo gali iš esmės prisidėti dviem būdais: 1) aktyvatoriaus molekulė gali veikti kaip alternatyvi protonų šaudyklė (tam tinka tiek karboksilo, tiek amino grupes turintys junginiai) arba 2) aktyvatoriaus molekulė gali padidinti His64 protonų šaudyklės efektyvumą [67].

1.7. Karboanhidrazė kaip terapinis taikiny

Karboanhidrazių katalizuojama reakcija svarbi daugelyje fiziologinių procesų, tokių kaip: kvėpavimas ir CO_2 pernaša tarp plaučių ir metabolizuojančių audinių, pH palaikymas, elektrolitų sekrecija, biosintetinės

reakcijos (gliukoneogenezė, lipogenezė, ureagenezė), kaulų rezorbcija, navikų vystymasis. Daugelis šiuose procesuose dalyvaujančių karboanhidrazių yra svarbūs vaistų-slopiklių taikiniai – jų slopinimas gali būti naudojamas gydant glaukomą, edemą, epilepsiją ir kitus nervinės sistemos sutrikimus, nutukimą, osteoporozę ir kai kurias vėžio rūšis. Įvairių mikroorganizmų (*Plasmodium falciparum*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Malassezia globosa*) karboanhidrazių slopinimas gali būti taikomas, kuriant kovos metodus su jų sukeliamomis ligomis [69–71].

Sulfonamidinę grupę turintys junginiai yra plačiai paplitę tarp vaistinių junginių. Dalis jų naudojami kaip karboanhidrazių slopikliai, nemaža dalis turi kitus baltymus-taikinius, tačiau neretai papildomas teigiamas ar pašalinis poveikis yra ir kai kurių karboanhidrazių izoformų slopinimas [72]. Tokio junginio pavyzdys – dar prieš keletą metų kaip karboanhidrazių slopiklis aktyviai tirtas indisulamas (E7070), kuris šiuo metu yra antroje klinikinių tyrimų fazėje, tačiau dabar jo aktyvumas jau nebesiejamas su karboanhidrazių slopinimu [73], manoma, kad jis stabdo ląstelės ciklą G1 stadijoje.

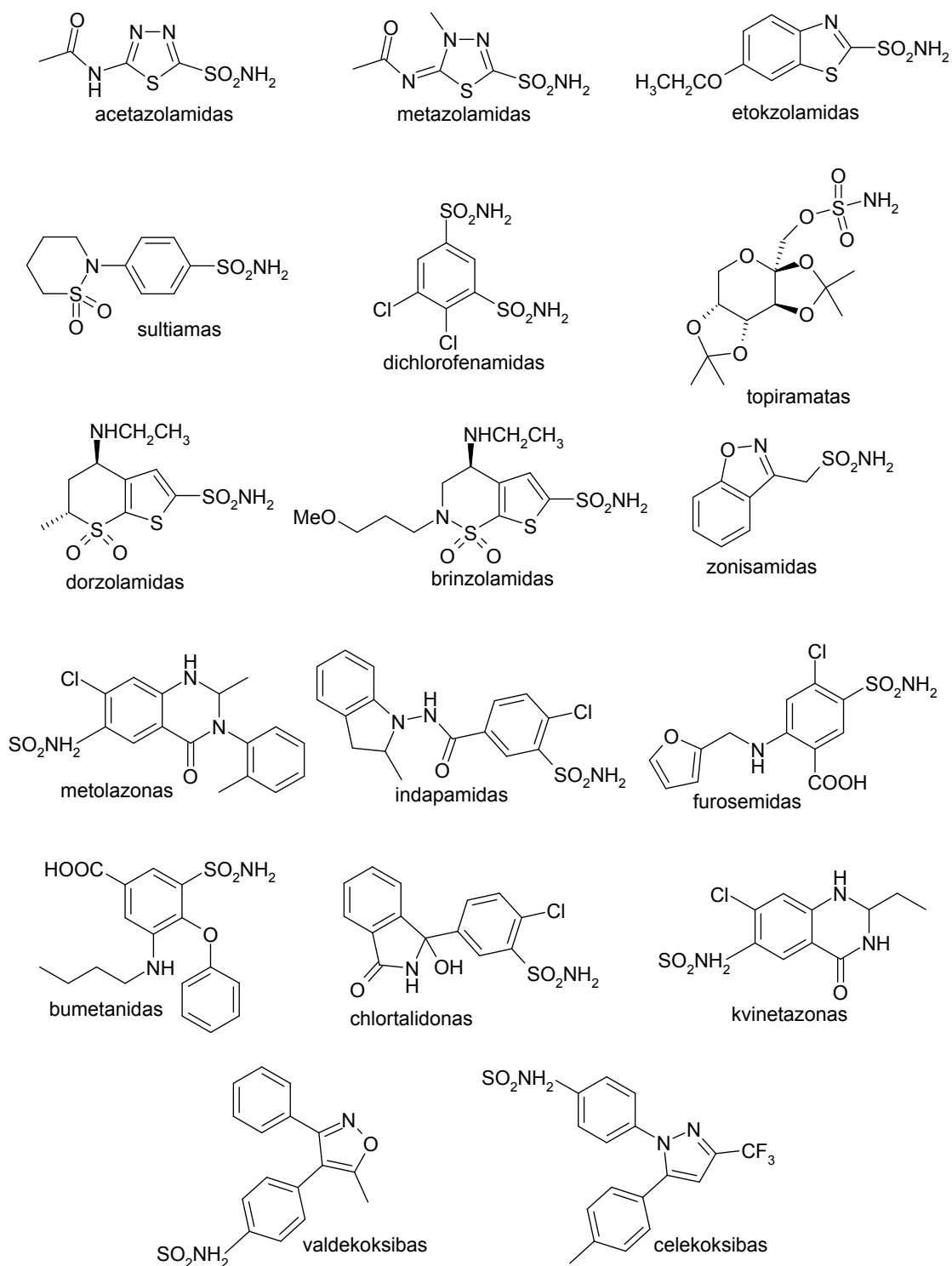
1.7.1. Glaukoma

Glaukoma yra degeneracinė akių liga, sukeliama padidėjusio akispūdzio, kuris sąlygoja palaipsnių regėjimo silpnėjimą ir, ilgainiui, apakimą. Akyje lokalizuotų CA slopinimas sumažina HCO_3^- (pagrindinio akies skysčio komponento) gamybą, taigi ir akies skysčio sekreciją. Sistemiskai veikiantys karboanhidrazių slopikliai, tokie kaip acetazolamidas, metazolamidas, etokzolamidas ir dichlorofenamidas (1.13 pav.), akispūdį sumažina maždaug 25–30 %. Tačiau dėl viso organizmo CA slopinimo pasireiškia slopiklių nepageidaujamas pašalinis poveikis [74, 75].

Vėliau atrasti lokaliai veikiantys, nesisteminiai antiglaukominiai junginiai – dorzolamidas ir brinzolamidas. Dėl gero tirpumo vandenyje jie naudojami akių lašų pavidalu, todėl turi gerokai mažiau pašalinių povei-

1.7. Karboanhidrazė kaip terapinis taikynys

kių [74, 76].



1.13 pav. Aptariamų vaistinių junginių, kurių tiesioginis ar pašalinis veikimo mechanizmas yra karboanhidrazių slopinimas, struktūrinės formulės.

1.7.2. Nervų sistemos ligos ir nutukimas

Sultiamas, zonisamidas naudojami kaip antiepileptiniai vaistai, sulpiridas – kaip dopamino receptorių antagonistas (1.13 pav.). Topiramatas naudojamas epilepsijai, migrenai gydyti [77]. Neseniai pastebėtas pašalinis zonisamido ir topiramato poveikis – svorio kritimas – išnaudojamas bandant pritaikyti šiuos junginius kaip vaistus nuo nutukimo. Šis poveikis tiesiogiai siejamas su mitochondrinių karboanhidrazių izoformų slopinimu [11, 35, 36].

1.7.3. Vėžys

Gana nauja sritis – karboanhidrazių slopiklių kaip potencialių priešvėžinių junginių ar kaip vėžio vaizdinimo priemonių panaudojimas [43]. Šiuo atveju remiamasi CA IX ir CA XII (kartais ir CA II) padidėjusia raiška kai kurių vėžio formų atveju. Tam reikalingi atrankūs šių CA izoformų slopikliai. Dalinis atrankumas pasiekiamas ir naudojant per ląstelės membraną nepraeinančius CA slopiklius [44, 78].

Daugeliui navikų būdinga struktūriškai ir funkciškai pakitusi deguonies mikrocirkuliacija, kuri sukelia nepakankamą aprūpinimą deguonimi (hipoksiją) [76, 79]. Šią aplinkybę bandoma išnaudoti, kuriant junginius, kurie aktyvinami hipoksinėje aplinkoje (pvz., aktyvus junginys susidaro redukuojant disulfidinius ryšius) [80, 81].

Greta to, kad CA IX slopikliai tiesiogiai sumažina šio baltymo fermentinį aktyvumą ir tuo būdu sumažina vėžinės ląstelės gebėjimą išgyventi hipoksinėmis sąlygomis, išnaudojama ir CA IX kaip vėžio žymens ypatybė. Tam naudojami CA IX slopikliai arba CA IX atpažįstantys antikūnai, konjuguoti su citotoksinais agentais ar radionuklidais, – taip šie aktyvieji agentai atvedami prie tikslinio taikinio – vėžinės ląstelės. Taip pat šiam tikslui naudojamas nuo antikūnų priklausomas ląstelinis toksiškumas – mechanizmas, kai CA IX atpažįstantis antikūnas indukuoja NK (angl. *natural killer*) ir kitų efektorinių ląstelių atsaką paciento imuninėje siste-

moje tam, kad būtų sunaikintos vėžinės ląstelės. Šiuo metodu veikiantis chimerinis monokloninis antikūnas girentuksimabas (RENCAREX[®], „Wilex AG“) šiuo metu yra trečiojoje klinikinių tyrimų fazėje inkstų vėžiui gydyti [43, 78].

CA IX vaizdinimas naudojamas aptikti inkstų vėžį ir metastazes. Tuo tikslu yra naudojamas tas pats antikūnas girentuksimabas, tik žymėtas ¹²⁴I (REDECTANE[®], „Wilex AG“). Šios priemonės naudojimas taip pat yra III klinikinių tyrimų fazėje. CA IX vaizdinimas būtų labai naudingas įvertinti auglio piktybiškumą prieš atliekant chirurgines intervencijas. Dabar inkstų auglio piktybinis ar gerybinis pobūdis nustatomas tik histopatologiniais metodais [78, 82].

1.7.4. Diuretikai ir kiti CA slopikliai

Celekoksibas ir valdekoksibas yra ciklooksigenazės 2 slopikliai. Tačiau neseniai pastebėta, kad taip pat jie yra ir efektyviai besijungiantys karboanhidrazių ligandai [76]. Įvairūs tiazidai, kartu su kvinetazonu, metolazonu, chlortalidonu, indapamidu, furosemidu, bumetanidu (1.13 pav.), naudojami kaip diuretikai [83]. Diuretikai chlortalidonas, indapamidas, furosemidas atrasti apie 1960–1970 metus, kai dar mažai buvo žinoma apie skirtingas karboanhidrazių izoformas ir jų gausą organizme, ir manyta, kad su karboanhidrazėmis jie nesąveikauja, tačiau dabar žinoma, kad šie junginiai yra gana efektyvūs kai kurių izoformų slopikliai, pvz., furosemidas – CA I ir XIV arba chlortalidonas – CA VB, VII, IX ir XIII [64].

1.8. Karboanhidrazė kaip modelinis baltymas

Karboanhidrazės, greta visų jų terapinio taikymo privalumų, yra ir patogūs modeliniai baltymai, naudojami tiriant baltymų stabilumą, baltymų–ligandų sąveiką bei kitus procesus [84]. Karboanhidrazės šiam tikslui naudojamos gana dažnai greta tokių baltymų kaip ribonukleazė A, citochromas C, lizocimas, ubikvitinas ir kt. [85, 86].

1.8.1. CA kaip modelinio baltymo privalumai ir trūkumai

Kaip modeliniai baltymai tradiciškai naudojami žmogaus CA I, CA II bei jaučio CA II. Platų jų taikymą lemia baltymo struktūros paprastumas: tai monomeriniai, viengrandiniai, stabilūs, vidutinio molekulinio svorio baltymai, neturintys disulfidinių tiltelių. Jie santykinai nebrangūs, prieinami komerciškai, taip pat ir nesudėtingai pagaminami, naudojant bakterines baltymų raiškos sistemas. Šios karboanhidrazės gerai charakterizuotos biocheminiais ir biofizikiniais metodais [84]. CA katalizuojama reakcija nėra sudėtinga, yra nemažai metodų jos fermentiniam aktyvumui matuoti. Dar viena naudinga ypatybė yra ta, kad jungiantis ligandui prie šio baltymo, jo struktūroje nevyksta didelių persitvarkymų ir pokyčių. Žinoma nemažai su CA sąveikaujančių ligandų, jie nesudėtingai sintetunami [1, 84].

Karboanhidrazės sąveika su sulfonamidinę grupę turinčiais junginiais dažnai laikoma modeline baltymų–ligandų jungimosi sistema [87]. CA struktūra su prisijungusia sulfonamidine grupe primena struktūrą, kurią sudaro CA aktyviajame centre prisijungusi CO_2 ar HCO_3^- molekulė [12].

Visgi ši modelinė sistema turi ir tam tikrų trūkumų – vienas iš jų yra metalo jonas kaip būtinas kofaktorius. Nemažą ligando ir baltymo sąveikos energijos dalį sudaro būtent sąveika su metalo jonu, todėl būtina ją teisingai išmatuoti ir įvertinti.

1.8.2. CA ir mažamolekulinių junginių sąveikos tyrimo metodai

Tiriant mažų molekulių jungimąsi prie makromolekulinio taikinio *in vitro* metodais, dažniausiai sąveikos efektyvumas (stiprumas) aprašomas, lyginant pusiausvyrinę disociacijos konstantą K_d (ar, atitinkamai, jungimosi konstantą $K_b = 1/K_d$) arba slopinimo konstantą K_i . Metodui, kuriuo nustatomi šie parametrai, pasirinkti yra keliami du pagrindiniai reikalavimai: 1) jungimosi konstanta turi būti pasirinkto metodo dinaminiame intervale ir 2) stebimas signalas turi turėti statistiškai patikimą

pokytį, vykstant jungimuisi.

Karboanhidrazių sąveika su ligandais tiriama įvairiais, tiek kinetiniais, tiek termodinaminiais, metodais. Šiame skyrelyje bus apžvelgti dažniausiai naudojami metodai.

Fermentinio aktyvumo matavimas

Fermentinio karboanhidrazių aktyvumo matavimo metodai matuoja arba karboanhidrazinį CA aktyvumą – kai stebimas protonų išsiskyrimas ar CO₂ sunaudojimas, arba karboanhidrazės esterazinį aktyvumą pagal 4-nitrofenilacetato hidrolizę (karboanhidrazės greta CO₂ hidratacijos reakcijos *in vitro* katalizuoja ir kai kurių kitų organinių junginių hidrolizę [88]). Kadangi CO₂ hidratacijos reakcija yra labai greita, tai karboanhidraziniam aktyvumui matuoti dažniausiai naudojama sustabdytos tėkmės spektrofotometrijos įranga [89].

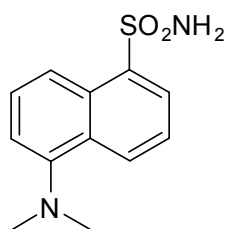
Protonų išsiskyrimas CA fermentinės reakcijos metu gali būti stebimas, matuojant tirpalo pH su pH-elektrodu arba spektrofotometriškai matuojant pH-jautraus indikatorinio dažo spalvos pokytį. pH-elektrodo naudojimas apsaugo nuo galimybės, kad indikatorius galėtų inhibuoti tiriamą baltymą. Kita vertus, indikatoriaus spalvos pokyčio matavimas yra paprastesnis, o ir eksperimentiškai yra parinkti dažai, kurie nereaguoja su CA. Dažniausiai tam naudojami dažai yra fenolio raudonasis ($pK_a = 7,4$), kurio spalva keičiasi iš raudonos į geltoną, kai pH nukrenta žemiau ~ 7 ; taip pat bromtimolio mėlynasis ($pK_a = 7,3$), kuris yra mėlynas, kai tirpalo pH $> 7,6$, ir geltonas, kai pH < 6 . Kitas būdas matuoti CO₂ sunaudojimą yra ¹⁸O mainai tarp žymėto CO₂ ir vandens (analizė atliekama masių spektroskopijos metodu) arba ¹³C mainai tarp CO₂ ir bikarbonato (analizei naudojamas BMR) [90].

Karboanhidrazės katalizuojamos esterazinės reakcijos greitis matuojamas spektrofotometriškai, substratu naudojant 4-nitrofenilacetatą. 4-nitrofenoliato susidarymas matuojamas 410 nm bangos ilgyje. Ši reakcija

yra lėtesnė, ją matuoti galima įprastais spektrofotometriniais metodais, tačiau rezultatai yra mažiau patikimi, sistema jautresnė buferio sudėčiai [89].

Fluorescenciniai ligando jungimosi matavimai esant pastoviai temperatūrai

Fluorescenciją matuojančių metodų privalumai – didelis jautrumas ir platus linijinis dinaminis intervalas (iki 12 eilių), o pagrindinis trūkumas – reikalinga reporterinė molekulė, kuri turėtų didelę kvantinę išeigą ir kurios fluorescencijos intensyvumas keistųsi prisijungiant ligandui. Vidinė karboanhidrazės baltymo triptofanų fluorescencija stebėti jungimąsi su ligandais taikoma retai. Daug dažniau naudojami išoriniai fluoroforai. Vienas iš dažniausiai naudojamų – dansilamidas (DNS)(1.14 pav.) [91].



1.14 pav. Dansilamido struktūra.

Dansilamidui jungiantis su karboanhidraze 1) gesinama baltymo triptofanų fluorescencija, 2) DNS kvantinė išeiga padidėja nuo 0,055 iki 0,84, 3) įvyksta DNS emisijos mėlynasis poslinkis nuo 580 iki 468 nm. Fluorescencijos intensyvumo pokytis, dansilamidui susijungus su karboanhidraze, sudaro plačiai naudojamo konkurencinio jungimosi metodo pagrindą. CA-DNS kompleksas yra titruojamas tiksliniu junginiu ir stebimas DNS pakeitimas (fluorescencijos sumažėjimas) [92]. Pagrindiniai šio metodo privalumai, neskaitant bendrų, būdingų visiems fluorescenciniams metodams, yra: 1) nereikia cheminio CA ar ligando žymėjimo, 2) šiuo metodu galima pamatuoti net labai mažas disociacijos konstantas (pM eilės). Kai sužadinti naudojama 280–290 nm šviesa, praktiškai negaunama foninės fluorescencijos [91].

Fluorescencinė terminio poslinkio analizė

Šis metodas, kaip ir diferencinio skenavimo kalorimetrija (1.8.2 skyrelis), pagrįstas tuo, kad ligando prisijungimas prie baltymo keičia jo stabilumą, t. y. baltymo–ligando kompleksas išsivynioja aukštesnėje arba žemesnėje temperatūroje nei baltymas be ligando. Matuojamas signalas – fluorescencijos intensyvumo pokytis [93–95].

Dažniausiai fluorescencijos signalas sukuriamas pridėdant solvatochrominio dažo, pavyzdžiui, ANS, dapoksilo, „Sypro Orange“ ir kt., kuris baltymo išsivyniojimo metu patenka į hidrofobinę aplinką ir jo fluorescencija padidėja [96,97]. Taip pat šį reiškinį galima stebėti ir naudojantis baltymo triptofanų fluorescencija, tačiau tokios analizės jautrumas gerokai mažesnis. Tiriant fluorescuojančių CA ligandų jungimąsi, nepridėjus papildomo dažo, gaunamos atvirkštinės tranzicijos – natyvaus baltymo–ligando komplekso fluorescencija yra didelė, nes jis yra atrankiai surištas hidrofobiniame baltymo aktyviajame centre, o baltymo denatūracijos metu aktyvusis centras suyra, fluorescencija sumažėja [98].

Giminingumo kapiliarinė elektroforezė

Šis metodas matuoja baltymo elektroforetinio judrio vertės priklausomybę nuo ligando koncentracijos. Šis metodas CA tyrimams patogus tuo, kad CA adsorbcija ant kapiliaro sienelių nežymi, o daugelis CA ligandų, besijungiančių K_b intervale 10^5 – 10^9 M⁻¹, gali būti susintetinti ir su krūvį turinčiomis grupėmis. Visgi dažnai šio metodo taikymą riboja tai, kad 1) tiriami junginiai krūvio neturi, 2) jungiantis mažamolekuliniams junginiams su karboanhidrazėmis, nepasikeičia molekulės hidrodinaminis pasipriešinimas. Esant tokioms eksperimentinėms sąlygoms, jungimosi šiuo metodu nustatyti neįmanoma [99].

Izoterminio titravimo kalorimetrija

Izoterminio titravimo kalorimetrija (ITC) yra vienintelis metodas, kuriuo galima tiesiogiai išmatuoti jungimosi entalpiją. Eksperimentas atliekamas esant pastoviai temperatūrai. Kartu to paties eksperimento metu nustatoma ir jungimosi konstanta bei stochiometrija. Makromolekulė dažniausiai pilama į mėginio kiuvetę, o su ja sąveikaujantis mažamolekulinis junginys – į švirkštą, kuris eksperimento metu sukdamasis maišo tirpalą ir injekuoja ligandą pasirinkto dydžio injekcijomis bei intervalais. Injekcijos metu dėl baltymo tirpalo skiedimosi, ligando tirpalo skiedimosi ir baltymo–ligando sąveikos yra išskiriama arba sugerama šiluma. Viso eksperimento metu mėginio ir palyginamoji kiuvetės yra veikiamos tokia elektrine galia, kad jų temperatūra būtų visiškai vienoda. Reakcijos metu išsiskiriant šilumai prietaisas fiksuoja, kad temperatūrai palaikyti galios sunaudojama mažiau, ir pirminių duomenų grafike brėžiama smailė. Suintegravus visų smailių plotus, atsižvelgiant į kiuvetėje ir švirkšte esančių medžiagų koncentracijas, apskaičiuojama jungimosi reakcijos entalpija ir jungimosi konstanta.

Diferencinio skenavimo kalorimetrija

Diferencinio skenavimo kalorimetrija (DSC) yra metodas, tiesiogiai išmatuojantis baltymo entalpijos pokytį, susijusį su temperatūros indukuojamais makromolekulės konformaciniais pokyčiais. DSC eksperimento metu nuolat matuojama sistemos šiluminės talpos priklausomybė nuo temperatūros. Tolygiai keliant temperatūrą, pasiekiamas taškas, kai baltymas pradeda išsivynioti. Baltymo išsivyniojimo metu šiluminės talpos priklausomybės nuo temperatūros kreivėje stebima smailė, kuri atitinka baltymo lydymosi temperatūrą T_m , o šios smailės plotas yra lygus išsivyniojimo entalpijai.

Kadangi baltymo ir baltymo–ligando komplekso stabilumai skiriasi, tai šį reiškinį, kaip ir TSA atveju, galima išnaudoti jungimosi konstantai nu-

statyti. Tam reikia išmatuoti baltymo mėginių su skirtingomis ligando koncentracijomis serijos lydymosi temperatūras ir pagal gautą T_m priklausomybę nuo ligando koncentracijos, galima apskaičiuoti jungimosi konstantą K_b .

Paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija

Paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija matuoja molekulių susijungimo k_{on} ir disociacijos k_{off} greičius ant metalinės plokštelės paviršiaus ir disociacijos konstantą K_d . Atliekant matavimus, esant kelioms skirtingoms temperatūroms, galima apskaičiuoti ir van't Hoffo entalpiją. Nuo kitų metodų paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija labiausiai skiriasi tuo, kad analizė atliekama ne tirpale, o ant auksu padengtos plokštelės paviršiaus [84, 100].

Įdomus CA II jungimosi su keturiais sulfonamidiniais ligandais rezultatų palyginimas aprašytas 2007 metais [101] – pateikti tų pačių eksperimentų rezultatai, gauti 22 projekto dalyvių. Iš jų tik 8 rezultatų rinkiniai buvo pilni, be artefaktų, pakankamos analizei kokybės. Šių atrinktų duomenų rinkinių analizė parodė, kad gautos disociacijos konstantos ir van't Hoffo būdu nustatytos entalpijos yra labai artimos tirpale ITC metodu gautiems parametrams.

1.9. Susijusios reakcijos

Susijusias (angl. *linked*) reakcijas taip pavadino ir pirmą kartą aprašė J. Jr. Wyman 1948 m. [102]. Tirdamas hemoglobina, jis pastebėjo, kad hemoglobinui jungiantis su deguonimi, išlaisvinami protonai, o hemoglobino jungimosi su fluoridu stiprumas priklauso nuo pH. Detaliau susijusių reakcijų modelis buvo išplėtotas ir aprašytas 1968 m. [103]. Paprastai, ligandui L jungiantis su receptoriumi R , jungimosi konstanta K_b yra:

$$K_b = \frac{[RL]}{[L][R]} \quad (1.1)$$

Jungimosi konstanta gali būti nustatoma matuojant vienos iš nurodytų dalelių koncentraciją ir apskaičiuojant kitas vertes pagal žinomą pradinę bendrą receptoriaus ar ligando koncentraciją. Taip atsižvelgiama tik į $R + L \rightleftharpoons RL$ pusiausvyrą, tačiau kartu su jungimusi gali vykti ir kitos susijusios reakcijos, todėl eksperimentiškai išmatuojama K_b turėtų būti laikoma stebimąja jungimosi konstanta [104, 105].

Dar 1971 m. L. Beres ir J. M. Sturtevant kalorimetriškai išmatavo chiotripsinogeno A aktyvacijos reakciją keturiuose skirtingose protonizacijos entalpijos buferiuose ir parodė, kad šio proceso stebimoji entalpija tiesiškai priklauso nuo buferio protonizacijos entalpijos [106].

Baltymų–ligandų jungimosi atveju dažniausiai stebimos susijusios protonizacijos reakcijos. Protonų, dalyvaujančių susijusiose protonizacijos reakcijose, skaičių tiksliausiai galima nustatyti izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu. ITC taikymą susijusioms protonizacijos reakcijoms tirti 1996 m. aprašė B. M. Baker ir K. P. Murphy [107]. Vienas iš susijusių protonizacijos reakcijų buvimo požymių yra stebimosios jungimosi konstantos priklausomybė nuo pH. Be to, ITC leidžia tiesiogiai išmatuoti stebimąją entalpiją, kurios priklausomybė nuo naudojamo buferio protonizacijos entalpijos yra dar vienas susijusių protonizacijos reakcijų buvimo įrodymas.

Literatūroje dažniausiai pateikiamos stebimosios jungimosi parametrų vertės, tačiau vis daugėja ir gilesnės termodinaminės analizės pavyzdžių, kai įvertinamas susijusių protonizacijos reakcijų indėlis (šiuo metu yra paskelbta daugiau nei 100 publikacijų, kuriose analizuojamas susijusių protonizacijos reakcijų efektas ITC metodu) [108]. Protonizacijos reakcijų indėlis ištirtas įvairioms baltymų–ligandų sistemoms, pvz., aspartato proteazės endotiapepsino jungimasis su pepstatinu A [109], trombino sąveika su bis(fenil)metano slopikliais [110], gliukokortikoidų receptoriaus DNR surišančio domeno sąveika su DNR [111] ir kt.

Medžiagos ir tyrimo metodai

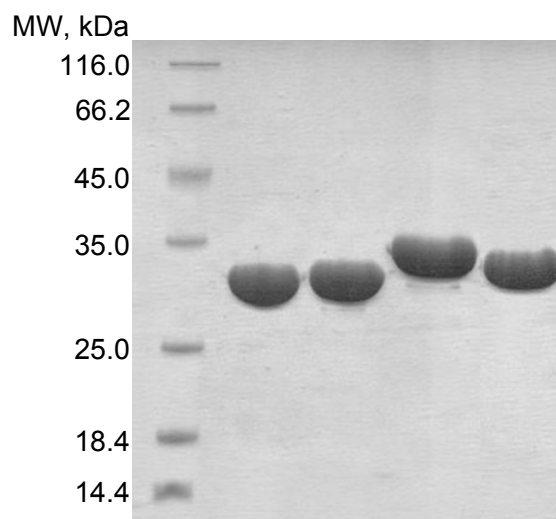
2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

TFMSA ir gliukozė pirkti iš „Alfa Aesar“; TEMED, glicinas ir molekulinų svorių standartai gelfiltracijai – iš „BioRad“; NaOH – iš „Delta Chem“; Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, HCl, bisakrilamidas, HNO₃ – iš „Fluka“; dapoksilas iš „Molecular Probes“; DMSO, akrilamidas, HEPES, NDS, amonio persulfatas – iš „Roth“; CH₃COONa iš „Serva“; ANS, etokzolamidas, CH₃COOH, H₃PO₄, imidazolas, KCl, metazolamidas, MES, metolazonas, natrio citratas, natrio formiatas, natrio sukcinatas, Na₂SO₄, NDS, TRIS, PIPES, Na₂CO₃, Na₂B₄O₇, dansilamidas – iš „Sigma Aldrich“; elektroforezės baltymų dydžio standartai, PageBlueTM, DTT – iš „Thermo Fisher Scientific“.

2.1.2. Baltymai

Dirbant naudotos rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės (skliausteliuose nurodytos viso ilgio baltymo aminorūgštys) – CA I (2–260), CA II (1–259), CA VII (3–264) ir CA XIII (1–262), pagamintos VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje. Šių baltymų raiška atlikta naudojant *Escherichia coli* bakterijas, baltymai išgryninti chromatografiniais metodais iki >90 % grynumo (2.1 pav.). Molekuliniai svoriai – CA I – 28,8 kDa, CA II – 29,1 kDa, CA VII – 32,0 kDa, CA XIII – 29,6 kDa – patvirtinti elektroforetinės analizės ir masių spektroskopijos metodais (2.1 lentelė).



2.1 pav. Iš kairės: molekulinė svorių standartai – CA I, CA II, CA VII, CA XIII. Į gelį įnešta po 10 µg baltymo (pagal Bradford'ą).

2.1 lentelė. Masių spektroskopijos rezultatai.

Baltymas	Apskaičiuotas MW (Da)	Nustatytas MW (Da)
CA I	28799,1	28799,54
CA II	29114,8	29115,24
CA VII	32043,9	32042,75
CA XIII	29574,3	29574,21

Rekombinantiniai CA IX baltymai – CA IX (GS-38–414) ir sCA IX (138–391-RGSH₈) – gauti iš prof. S. Parkkila laboratorijos (Tampere universitetas, Suomija), kur buvo pagaminti vabzdžių (*Spodoptera frugiperda*) ląstelių linijoje, naudojant bakulovirusų baltymų raiškos sistemą „Bac-to-Bac[®]“, ir išgryninti chromatografiškai.

2.1.3. Karboanhidrazių ligandai

Dirbant naudoti klasikiniai CA ligandai, gauti iš „Sigma-Aldrich“, „Alfa Aesar“. Naujų ligandų paieškai naudoti junginiai sintetinti VU Biotechnologijos instituto Biotermodynamikos ir vaistų tyrimo skyriuje (dr. V. Dudutienė, dr. E. Čapkauskaitė) bei VU Chemijos fakulteto Organinės chemijos katedroje (dr. J. Sūdžius). Šių junginių struktūros ir grynumas patvirtinti BMR, IR spektroskopijos ir masių spektrometrijos metodais. Visi tiriami junginiai tirpinti DMSO, 10–50 mM tirpalai laikyti kambario tem-

peratūroje, tamsoje, stiklinėje taroje.

2.1.4. Universalus plataus pH intervalo eksperimentų buferis

Šis buferis naudotas TSA ir DSC eksperimentams. Mėginio buferio sudėtis: 50 mM fosfato, 50 mM acetato, 25 mM borato, 50 mM NaCl. Ruošiami darbiniai pasirinktų pH verčių 2× tirpalai iš atitinkamų buferinių mišinių:

100 mM H_3PO_4 , 100 mM CH_3COOH , 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 100 mM NaCl (pH ~4,1);

100 mM H_3PO_4 , 100 mM CH_3COONa , 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 100 mM NaCl (pH ~5,9);

100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM CH_3COONa , 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 100 mM NaCl (pH ~7,9);

100 mM Na_2HPO_4 , 100 mM CH_3COONa , 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 100 mM NaCl (pH ~9,2);

100 mM Na_3PO_4 , 100 mM CH_3COONa , 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 100 mM NaCl (pH ~10,4).

2.2. Metodai

2.2.1. Izoterminio titravimo kalorimetrija

Izoterminio titravimo kalorimetrijos (ITC) eksperimentai atlikti VP-ITC kalorimetru („Microcal, Inc.“).

Baltymų–ligandų jungimasis

Tiriant baltymų–ligandų jungimąsi, baltymo tirpalu (5–10 μM) užpildoma kalorimetro kiuvetė (~1,4 mL), o ligando tirpalu (50–100 μM) – titravimo švirkštas (300 μL). Titravimas atliekamas, esant pasirinktai temperatūrai, injekuojant 25–30 ligando tirpalo injekcijų į kiuvetėje esantį baltymo tirpalą. Tarpai tarp injekcijų – 3–4 minutės, maišymo greitis – 260

aps./min. Baltymo ir ligando tirpalai paruošiami visiškai vienodame buferyje, išlaikant tą pačią DMSO koncentraciją (dažniausiai – 1 % (v/v)). Eksperimentai kartojami 2–3 kartus.

Ligandų protonizacijos entalpijos nustatymas

Tiriant ligando protonizaciją, į kiuvetę pilamas ligando (0,25 mM), o į švirkštą – rūgštis (2,5 mM HNO₃) tirpalas. Tam, kad būtų gautas visiškai deprotonizuotas sulfonamidas, pridedama 1,5 ekvivalento NaOH, tada titruojama HNO₃ tirpalu (60 injekcijų po 5 µL). Matuojama deprotonizuotų ligandų protonizacija, nes protonizacijos reakcija yra egzoterminė ir jos entalpija išmatuojama tiksliau nei deprotonizacijos su NaOH. Eksperimentai kartojami 2–3 kartus.

Baltymo išsivyniojimo entalpijos nustatymas, titruojant rūgštimi

Prieš atliekant baltymo denatūracijos rūgštimi tyrimus, karboanhidrazės pervedamos į 10 mM NaCl tirpalą – nudruskinimas atliekamas gelfiltracijos per savaiminės tėkmės PD10 kolonėles („GE Healthcare“) metodu. Į kalorimetro kiuvetę pilamas 15 µM CA tirpalas, kuriame joninę jėgą palaiko 100 mM NaCl. Titruojama esant pasirinktai temperatūrai 5 mM HNO₃ tirpalu, kuriame yra 95 mM NaCl. Rūgštis skiedimosi kontrolė atliekama, vietoje baltymo į kiuvetę pilant tik 100 mM NaCl tirpalą ir titruojant tomis pačiomis sąlygomis.

Mėginių paruošimas CA XIII Zn²⁺-H₂O pK_a ir ΔH nustatyti

Atliekant ITC matavimus, esant toms pH vertėms, kai naudojamos buferinės medžiagos buferinė talpa yra per maža kad užtikrintų reikiamą pH vertę, į kiuvetę ir švirkštą pilamų mėginių pH patikslinama naudojant pH-metrą su mikroelektrodu. Ruošiant mėginius (po 2 mL), iš pradžių visos reikalingos medžiagos sudedamos į 1,9 mL tirpalo, tada, naudojant minimalius tūrius NaOH ar HCl, nustatoma reikiama pH vertė ir po to

pripilama vandens iki galutinio 2 mL tūrio. Paruošti reikiamos pH vertės baltymo ir ligando tirpalai atitinkamai iš karto supilami į kalorimetro kiuvetę ir švirkštą.

Duomenų apdorojimas

Gauti eksperimentiniai ITC rezultatai apdorojami programos „MicroCal Origin 5.0“ ITC moduliu, nustatančiu tiriamos reakcijos jungimosi konstantą K_b , jungimosi entalpiją ΔH ir koncentracijos korekcijos faktorių n . n nustatymo paklaida – $\pm 5\%$ [112], ΔH ir K_b – $\sim 10\%$.

2.2.2. Terminio poslinkio analizė

Metodo principas, eksperimento planavimas

Terminio poslinkio analizės metodas yra pagrįstas paties baltymo arba pridėto solvatochrominio dažo (kuris labai padidina metodo jautrumą) fluorescencijos intensyvumo matavimu. Jis leidžia stebėti temperatūros lemiamą pusiausvyrinį baltymo natyvaus būvio N virsmą į denatūruotą, arba išsivyniojusį, būvį U (2.1 lygtis) bei papildomą tiriamo baltymo stabilizavimą / destabilizavimą, lemiamą pridėto ligando L [113].



Procesą aprašo dvi konstantos: išsivyniojimo konstanta K_U ir jungimosi konstanta K_b :

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = e^{-(\Delta G_U/RT)}, \quad (2.2)$$

$$K_b = \frac{[NL_b]}{[N][L_f]} = e^{-(\Delta G_b/RT)}, \quad (2.3)$$

kur ΔG_U ir ΔG_b , atitinkamai, yra denatūracijos ir jungimosi procesų laisvosios Gibso (Gibbs) energijos. L_f yra laisvo, o L_b – surišto su baltymu ligando koncentracija, T – temperatūra Kelvino laipsniais, o R –

universalioji dujų konstanta. Baltymo denatūracijos metu solvatochrominis dažas sąveikauja su atsiveriančiomis baltymo hidrofobinėmis sritimis ir fluorescencijos intensyvumas padidėja. Baltymo stabilumą nurodantis parametras yra jo lydymosi temperatūra T_m , kuriai esant pusė baltymo molekulių yra natyvos, kita pusė – išsivyniojusios.

Eksperimento sąlygos

Terminio poslinkio analizė šio darbo metu buvo atliekama, naudojant tris skirtingus prietaisus:

1) PGR analizei skirtą realaus laiko detekcijos sistemą „iCycler iQ“ („Bio-Rad“), naudojant „Chroma Technology Corp.“ filtrus. Analizė atliekama 96 šulinėlių plokštelėse. Sužadینimas – 405 ± 30 nm, emisija – 520 ± 40 nm;

2) „PC1“ spektrofluorimetra („ISS“) su termostatuojama vandens vonele ir „TFN520“ termometru („Ebro Electronic GmbH & Co“). Analizė atliekama 3 mL kiuvetėje. Sužadینimas – 380 ± 5 nm, emisija – 510 ± 5 nm;

3) realaus laiko detekcijos sistemą „Rotor-Gene 6000“ („QIAGEN Rotor-Gene Q“), skirtą PGR analizei. Analizė atliekama 100 μ L arba 200 μ L mėgintuvėliuose, kuriuose mėginio tūris – 10–20 μ L. Sužadینimas – 365 ± 20 nm, emisija – 460 ± 15 nm.

Visais atvejais taikomas 1 °C/min. temperatūros kėlimo greitis.

Dirbant naudoti du solvatochrominiai dažai – dapoksilas (4-[5-[4-(dimetilamino)-fenil]-2-oksazolil]-benzensulfoninės rūgšties natrio druska) (eksperimentams, atliekamiems „iCycler iQ“ prietaisu) ir ANS (8-anilino-1-naftaleno sulfoninės rūgšties amonio druska) (eksperimentams, atliekamiems „PC1“ ir „Rotor-Gene 6000“ prietaisais).

Dažniausiai naudojama mėginio sudėtis: 10 μ M baltymo, 50 μ M ANS, 0–200 μ M ligando, 2 % DMSO (v/v), 50 mM fosfatinio buferio, pH 7,0, 50 mM NaCl. Visi eksperimentai kartoti po tris kartus.

Lydimosi temperatūros nustatymas

Baltymo–dažo komplekso fluorescencijos priklausomybę nuo temperatūros aprašo lygtis [113, 114]:

$$y(T) = y_N + \frac{y_U - y_N}{1 + e^{\Delta_U G/RT}} = y_U + \frac{y_N - y_U}{1 + e^{-\Delta_U G/RT}} \quad (2.4)$$

Šioje lygtyje parametrai y_N ir y_U yra, atitinkamai, natyvaus ir išsivyniojusio baltymo fluorescencijos intensyvumai, kurie priklauso nuo temperatūros (2.5 ir 2.6 lygtys):

$$y_N(T) = y_{N,T_m} + m_N(T - T_m), \quad (2.5)$$

$$y_U(T) = y_{U,T_m} + m_U(T - T_m), \quad (2.6)$$

čia m_N ir m_U yra, atitinkamai, natyvaus ir išsivyniojusio baltymo fluorescencijos tiesių pokrypio kampai. O išsivyniojimo laisvąją Gibso energiją galima išreikšti entalpijos ir entropijos parametrais:

$$\Delta_U G = \Delta_U H - T \Delta_U S, \quad (2.7)$$

kur $\Delta_U H$ yra baltymo išsivyniojimo entalpija (nustatoma DSC metodu), o $\Delta_U S$ – išsivyniojimo entropija. Kai $T = T_m$, tai $\Delta_U G = 0$ ir $\Delta_U H = T \Delta_U S$. Eksperimentiškai gautos fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros kreivė mažiausių kvadratų metodu derinama pagal 2.4 lygtį, įstačius lygtimis 2.5, 2.6, 2.7 aprašytus parametrus, ir taip nustatoma lydimosi temperatūra T_m .

Lydimosi temperatūros nustatymo paklaida šiuo metodu yra $\pm 0,2$ K.

Jungimosi konstantos nustatymas

Jungimosi konstantai nustatyti naudojama serija T_m verčių, kurios gaunamos tiriant baltymo išsivyniojimą, esant skirtingai ligando koncentracijai [115]. Eksperimentas planuojamas taip, kad, ruošiant skirtingų baltymo–ligando proporcijų mėginius (baltymo koncentracija išlaikoma pastovi),

maždaug trečdalis analizuojamo baltymo–ligando mėginių ligando koncentracija būtų mažesnė už baltymo, likusių – didesnė.

Kai ligandas jungiasi prie natyvios baltymo formos (didžioji dalis šiuo darbu tiriamų junginių), T_m priklausomybė nuo pridėtos ligando koncentracijos aprašoma lygtimi:

$$L_t = (K_U - 1) \left(\frac{P_t}{2K_U} + \frac{1}{K_b} \right), \quad (2.8)$$

kur P_t – bendra baltymo koncentracija, o K_U ir K_b – konstantos, atitinkamai aprašytos 2.2 ir 2.3 lygtimis (T_m atsiranda lygtyje, kai konstantos K_U ir K_b išskleidžiamos pagal laisvosios Gibso energijos lygtį $\Delta G = -RT \ln K$).

Keičiant 2.8 lygties parametrus, modeliuojama T_m priklausomybė nuo L_t – taip nustatoma jungimosi konstanta K_b .

2.2.3. Diferencinio skenavimo kalorimetrija

Diferencinio skenavimo kalorimetrijos (DSC) eksperimentai atlikti „MC-2“ skenavimo kalorimetru („MicroCal, Inc.“), taikant 1 °C/min. temperatūros kėlimo greitį. Gauti rezultatai apdoroti, naudojant programos „MicroCal Origin 5.0“ DSC modulį.

DSC tyrimų metu naudota mėginio baltymo koncentracija – 50–100 μM. Į palyginamąją kiuvetę pilamas analogiškas tiriamajam tirpalas, tik be baltymo. Kiekvienam tiksliniam eksperimentui atliekamas kontrolinis – jo metu abi kiuvetės užpildomos tiriamu tirpalu be baltymo.

2.2.4. Gelfiltracinė analizė

Gelfiltracinė analizė atlikta chromatografinė sistema „Äkta Explorer“, naudojant gelfiltracinę kolonėlę TSK G2000SW 10 mM Na fosfatiniame buferyje, turinčiame 0,3 M NaCl, pH 7,0. Ant kolonėlės baltymas užnešamas 1 mL/min. greičiu, eliuojamas izokratiniu režimu. Tomis pačiomis sąlygomis atliekamas kalibravimas – vietoje tiriamo baltymo tirpalo ant

kolonėlės užnešamas molekulių svorių standartų rinkinys („Bio-Rad“) (tiroglobulinas, gama-globulinas, ovalbuminas, mioglobinas, vitaminas B₁₂ – jų molekuliniai svoriai (atitinkamai): 670, 158, 44, 17, 1,35 kDa). Braižomas molekulių svorių standartų dešimtainio logaritmo priklausomybės nuo jų sulaikymo gelfiltracinėje kolonėlėje laiko grafikas. Pagal jį apskaičiuojamas tiriamo baltymo molekulinis svoris.

2.2.5. NDS elektroforezė

NDS elektroforezė buvo atliekama klasikiniu metodu [116] vertikaliame baltymų elektroforezės aparate, naudojant 9,5–15 % poliakrilamido gelius. Geliai dažyti PageBlueTM („Fermentas“) dažu pagal gamintojo rekomendacijas.

CA IX oligomerinės struktūros tyrimo metu baltymas prieš elektroforezę inkubuotas 2 h 25 °C temperatūroje, naudojant skirtingus reduktoriaus DTT kiekius (0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 1,0 ir 10,0 mM DTT). Analizė atlikta 9,5 % poliakrilamido gelyje.

Baltymo grynumas ir (ar) oligomerinių formų procentinė sudėtis takelyje įvertinti, elektroforegramas analizuojant „TotalLab“ programa.

2.2.6. Baltymų dializė, koncentracijos nustatymas

Baltymų dializė visais atvejais buvo atliekama +4 °C temperatūroje, naudojant dializės žarnas „SERVA Visking“ (MW riba – 14 kDa). Baltymų koncentracijos nustatomos pagal sugertį 280 nm bangos ilgyje (ϵ (CA I) yra 44920 M⁻¹ cm⁻¹, ϵ (CA II) – 50420 M⁻¹ cm⁻¹, ϵ (CA VII) – 46535 M⁻¹ cm⁻¹, ϵ (CA XIII) – 50420 M⁻¹ cm⁻¹, ϵ (CA IX) – 35075 M⁻¹ cm⁻¹, ϵ (sCA IX) – 35015 M⁻¹ cm⁻¹, ϵ (bCA II) – 50420 M⁻¹ cm⁻¹). Eks tinkcijos koeficientai suskaičiuoti teoriškai pagal baltymų sekas, naudojant „ExpASy“ įrankį „ProtParam“ [117].

2.2.7. Baltymų-ligandų kompleksų struktūrų vizualizacija

Baltymų-ligandų kompleksų struktūroms vizualizuoti naudota programa „Discovery Studio Visualizer 3.5“ („Accelrys“). Paveikslėliuose naudojamas spalvinis kodas: pilka spalva žymi C, raudona – O, geltona – S, mėlyna – N, žalia – Cl.

Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Karboanhidrazių tyrimai

3.1.1. CA stabilumo įvertinimas

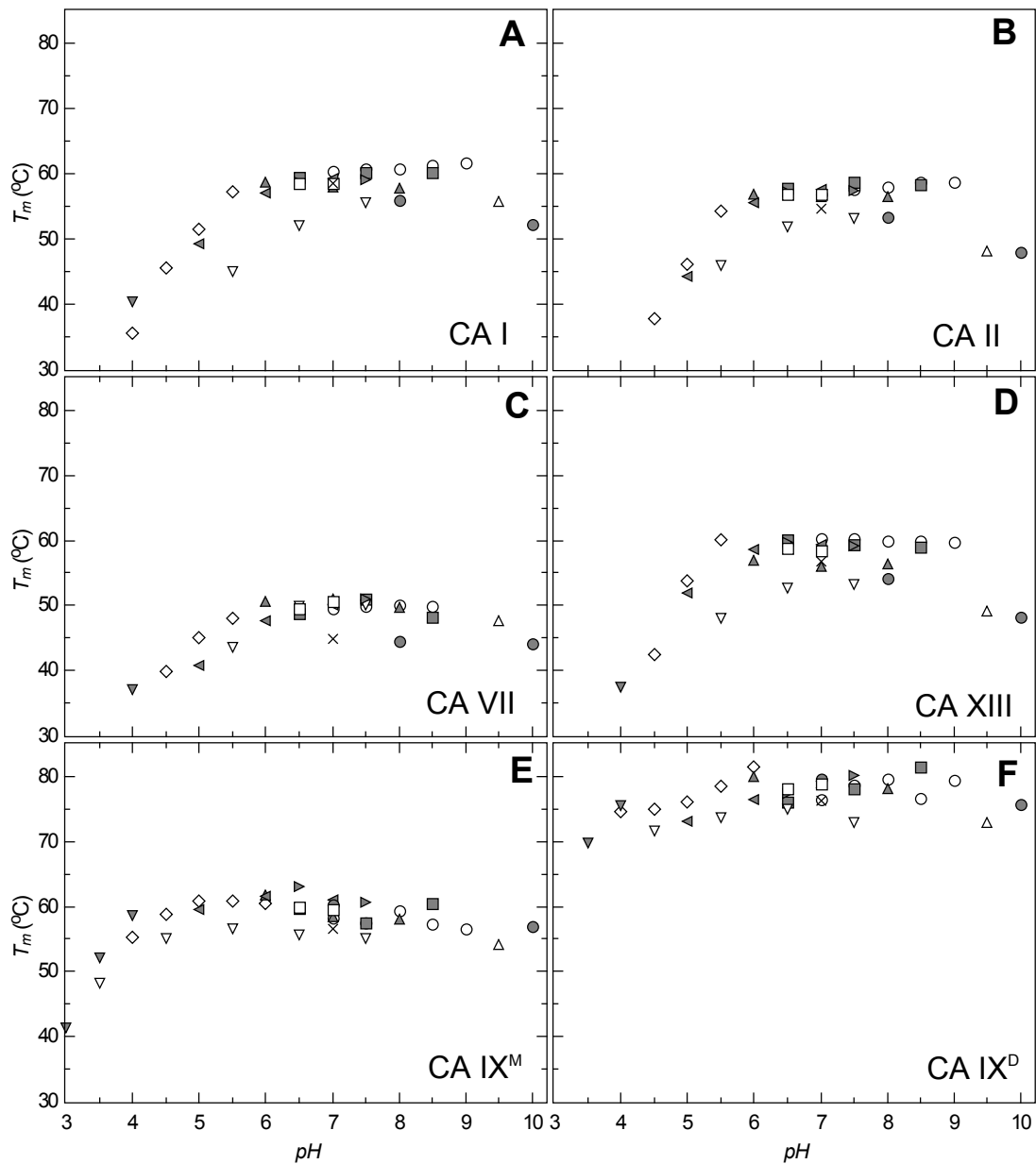
Atliekant baltymų–ligandų jungimosi tyrimus, svarbu parinkti tokias eksperimentines sąlygas, kad tiriamas baltymas būtų stabilus. Todėl terminio poslinkio metodu atliktas pradinis visų tirtų baltymų charakterizavimas – nustatytos baltymų lydymosi temperatūros. Baltymų išsivyniojimo entalpijos ir išsivyniojimo šiluminės talpos nustatytos diferencinio skenavimo kalorimetrijos ir rūgštinės denatūracijos izoterminio titravimo kalorimetrijos metodais.

TSA tyrimai – pH, druskų įtaka

Visų tirtų baltymų (rekombinantinių žmogaus CA I, II, VII, IX ir XIII) stabilumo priklausomybė nuo pH buvo ištirta TSA metodu, keičiant pH vertes nuo 3 iki 10. Taip pat įvertinta ir skirtingų buferinių medžiagų įtaka (3.1 pav.). Bendrai tirtų CA izoformų pH stabilumo intervalas gana platus (T_m artima maksimumui nuo pH 6 iki 9–10), o CA IX, skirtingai nuo kitų tirtų CA izoformų, stabili ir rūgštinėje terpėje, o tai neprieštarauja jos fiziologinei funkcijai organizme – veikti hipoksinėmis sąlygomis, kai tarpląstelinė terpė parūgštėja.

Nors visos CA izoformos tarpusavyje labai homologiškos ir jų struktūros panašios, vis dėlto, esant toms pačioms sąlygoms, jų stabilumai gana skirtingi. Pavyzdžiui, CA VII lydymosi temperatūra yra apie dešimt laipsnių žemesnė nei kitų tirtų CA izoformų, o CA IX dimerinė forma stabilesnė

už monomerą net apie 15 °C (detaliau apie CA IX oligomerines formas – 3.1.2 skyrelyje).

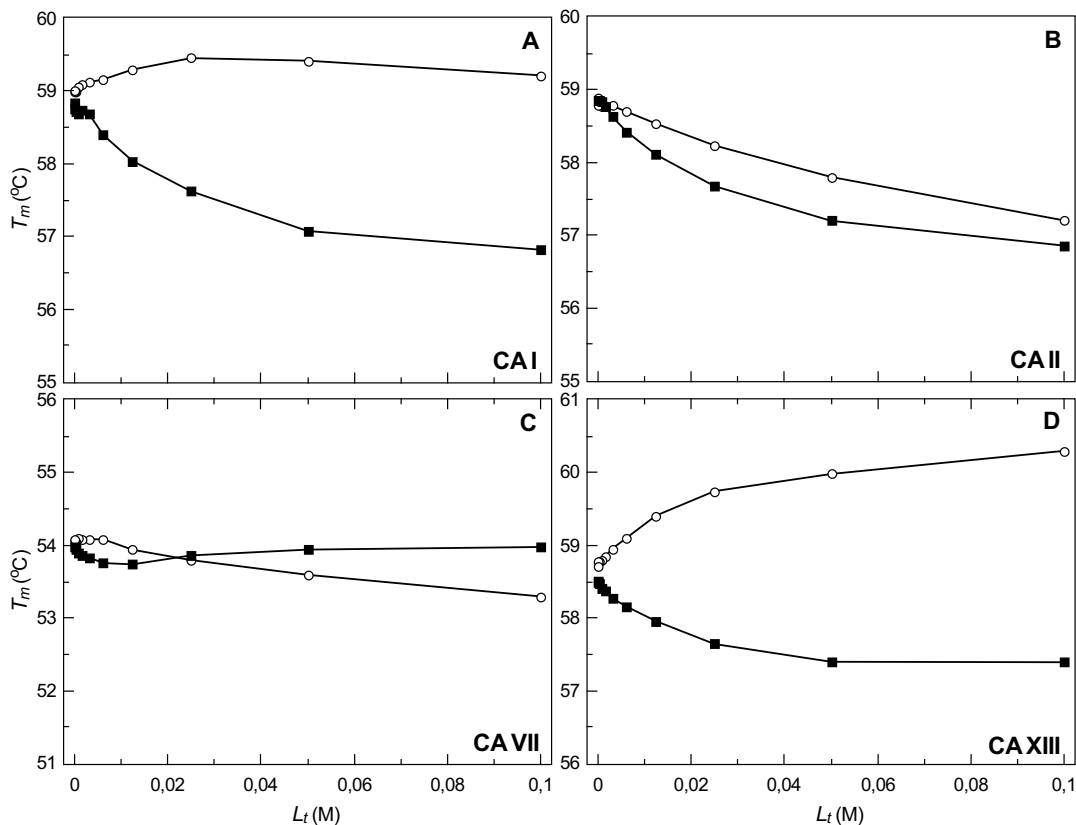


3.1 pav. Žmogaus karboanhidrazių izoformų CA I (A), CA II (B), CA VII (C), CA XIII (D), CA IX monomero (E) ir CA IX dimero (F) stabilumą, esant skirtingam pH ir buferiui, palyginimas (terminio poslinkio analizės duomenys). Atitinkamais simboliais pažymėti buferiai (100 mM): (○) – tris, (■) – HEPES, (◇) – acetatinis, (▲) – fosfatinis, (▽) – citratinis, (△) – glicininis, (◄) – MES, (►) – PIPES, (●) – karbonatinis, (□) – sukcinatinis, (×) – imidazolinis, (▼) – formatinis.

Tirtų baltymų T_m mažai priklauso nuo buferio sudėties (esant tam pačiam pH), išskyrus citratinį buferį (3.1 pav.). Citratas sumažina tirtų CA stabilumą keliais laipsniais (galima savitoji sąveika), todėl jo nevertėtų

naudoti kaip buferinės medžiagos, atliekant eksperimentus su karboanhidrazėmis.

Druskų (chlorido ir sulfato) įtaka citoplazminių CA izoformų stabilumui parodyta 3.2 pav. Sulfatas CA I ir CA XIII destabilizuoja, o chloridas jų stabilumą padidina. CA II stabilumą mažina abi minėtos druskos, o CA VII stabilumą jos veikia silpnai.

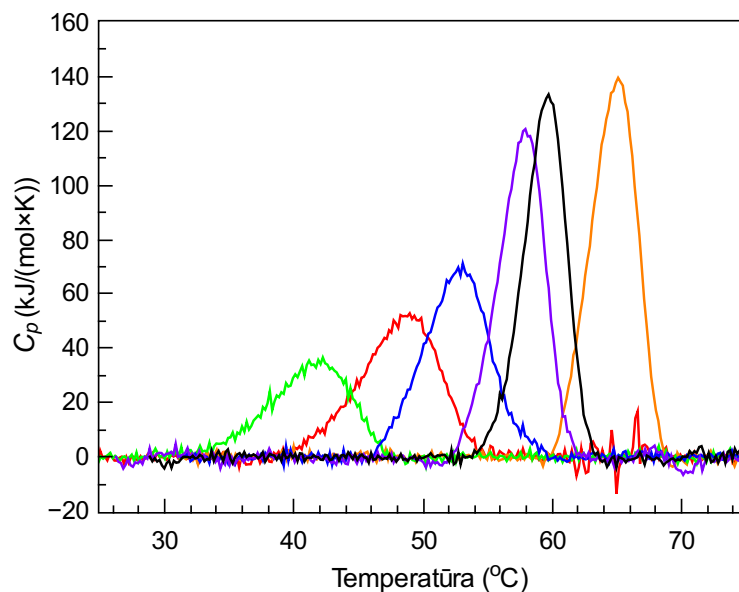


3.2 pav. Žmogaus karboanhidrazių izoformų CA I (A), CA II (B), CA VII (C) ir CA XIII (D) stabilumai, kai tirpale yra: (○) – NaCl, (■) – Na₂SO₄. Kitos sąlygos – fosfatinis buferis 50 mM, pH 7,0.

Gauti baltymo stabilumo skirtingomis sąlygomis (esant skirtingam pH, buferiams, druskoms) duomenys naudingi ne tik tarpusavyje lyginant analizuotas CA izoformas, bet ir pasirenkant tolimesnių eksperimentų sąlygas (atliekant standartinius matavimus visoms karboanhidrazėms parinktas 50 mM fosfatinis buferis, turintis 50 mM NaCl). Tai ypač svarbu, atliekant CA XIII jungimosi su ligandais plataus pH intervalo tyrimus – kai pH 5,5–9, ši izoforma yra stabili, todėl šiame intervale gauti duomenys gali būti naudojami detaliam termodinaminei analizei.

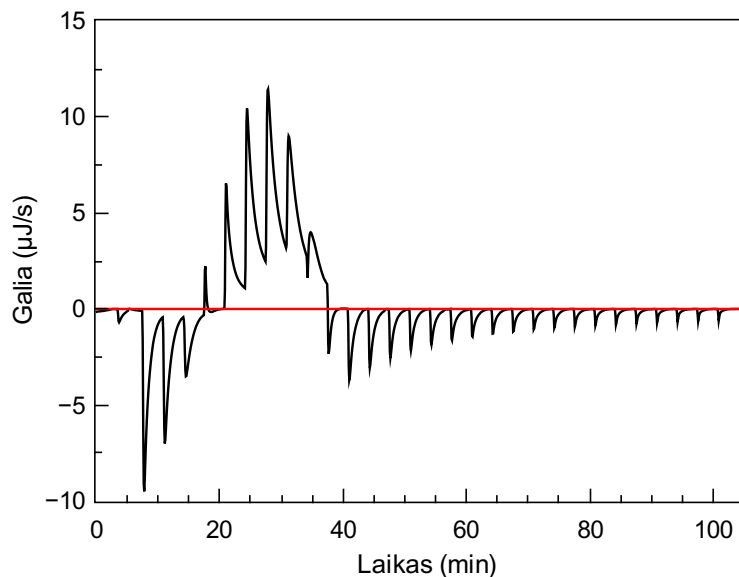
Išsivyniojimo entalpijos nustatymas (DSC, ITC)

Baltymo stabilumą parodo ne tik jo lydymosi temperatūra, bet ir išsivyniojimo entalpija ΔH . Kuo ši entalpija yra didesnė, tuo baltymas eksperimento sąlygomis yra stabilesnis. Be to, šį parametą naudoja terminio poslinkio analizės metodas, todėl jį nustčius galima gauti tikslesnius TSA rezultatus. Šiuo atveju karboanhidrazių išsivyniojimo entalpija buvo nustatyta dviem metodais: diferencinio skenavimo kalorimetrijos metodu (kuris laikomas standartiniu baltymų stabilumo tyrimo metodu) [118] įvairiomis sąlygomis (3.3 pav.) bei izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu, taikant rūgštinę denatūraciją (šis metodas dar vystomas, naudojamas gerokai rečiau) [7*,119] (3.4 pav.). DSC metodu nustatoma baltymo lydymosi temperatūra T_m ir išsivyniojimo entalpija ΔH (esant T_m temperatūrai), o titruojant rūgštimi – išsivyniojimo entalpija, esant pasirinktai atliekamo eksperimento temperatūrai.



3.3 pav. CA XIII diferencinio skenavimo kalorimetrijos duomenys. Baltymo koncentracija – 50 μM ; kitos sąlygos: žalia kreivė – pH 4,5, raudona – 4,75, mėlyna – 5,0, violetinė – 5,5, juoda – 6,5 (buferinis mišinys: 50 mM fosfatinis, 50 mM acetatinis, 25 mM boratinis, 50 mM NaCl), oranžinė kreivė – 50 μM CA XIII su 500 μM 4-karboksibenzensulfonamido, 50 mM fosfatinis buferis su 50 mM NaCl, pH 7,0.

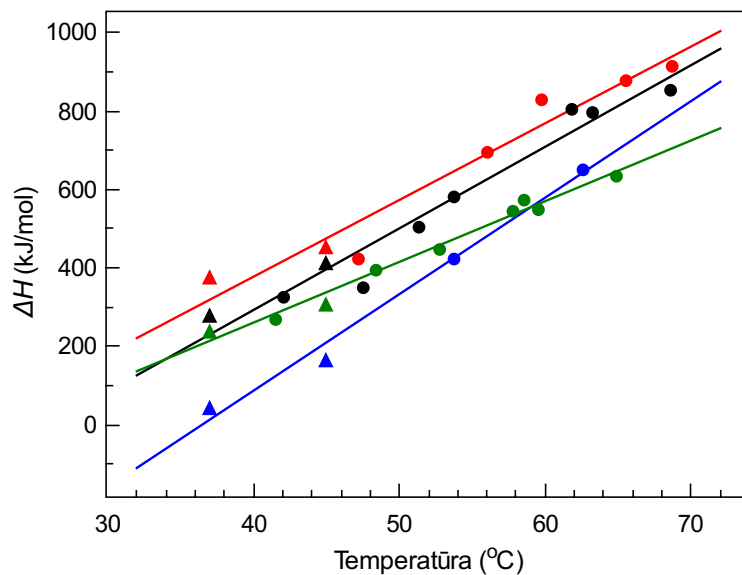
Kadangi abiem metodais – ir DSC, ir rūgštine denatūracija – nustatytas baltymų išsivyniojimo entalpijos vertes pagal priklausomybę nuo lydymosi



3.4 pav. CA XIII denatūracijos rūgštimi ITC eksperimentas 45 °C temperatūroje. Pirmųjų keturių injekcijų egzoterminės smailės atitinka rūgšties jungimąsi prie baltymo, 5–10 injekcijų endoterminės smailės – baltymo denatūracija (šių injekcijų metu sugerama šiluma atitinka baltymo išsivyniojimo entalpiją), 11 ir vėlesnių injekcijų (egzoterminės smailės) metu vyksta rūgšties skiedimasis.

temperatūros atidedant grafike gaunama tiesė (3.5 pav.), tai tikėtina, kad abiem skirtingais būdais (karboanhidrazes denatūruojant temperatūra ar rūgštimi) pasiekama ta pati arba lygiavertė denatūruoto baltymo būseną.

Apibendrinti CA I, II, VII ir XIII išsivyniojimo entalpijos tyrimo duomenys pateikti 3.5 paveikslėlyje. Pagal tiesių pokrypio kampus nustatytos išsivyniojimo šiluminės talpos (ΔC_p): CA I – 20,8, CA II – 19,6, CA VII – 24,6, CA XIII – 15,5 kJ/(K×mol). Šios vertės yra artimos literatūroje [120] nurodomam statistiniam šiluminių talpų pasiskirstymui pagal baltymo aminorūgščių skaičių (nurodoma tikėtina vidutinė maždaug 260 aminorūgščių baltymo ΔC_p vertė – apie 16 kJ/(K×mol)). Rūgštinės denatūracijos ITC metodu panaudojimas baltymų išsivyniojimo entalpijai nustatyti praplėtė temperatūrų intervalą, kurio ribose šias entalpijas galima išmatuoti eksperimentiškai. Esant skirtingoms temperatūroms nustatyti karboanhidrazių izoformų išsivyniojimo termodinaminiai parametrai yra tiesiogiai naudojami taikant terminio poslinkio analizės metodą, apskaičiuojant baltymų–ligandų jungimosi konstantas.



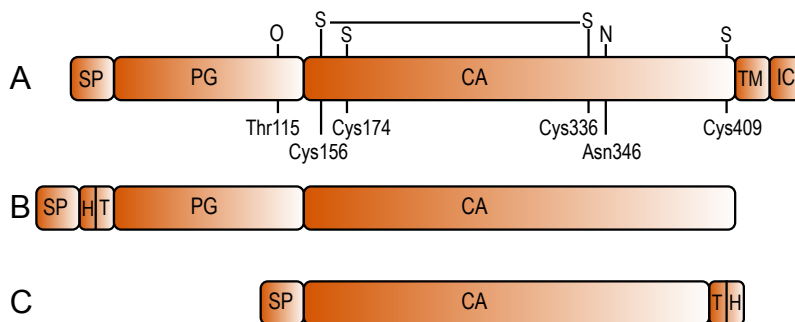
3.5 pav. Karboanhidrazių išsivyniojimo entalpijos priklausomybė nuo temperatūros. Juodai pažymėti CA I rezultatai, raudonai – CA II, mėlynai – CA VII, žaliai – CA XIII. Apskritimai – DSC duomenys, trikampiai – rūgštinės denatūracijos, atliktos ITC metodu, rezultatai. Tiesės išvestos mažiausių kvadratų metodu, jų pokrypio kampai rodo baltymų išsivyniojimo šilumines talpas.

3.1.2. CA IX biocheminis charakterizavimas

Dar 1996 metais buvo charakterizuotas CA IX genas ir buvo nustatyta, kad CA IX yra išskirtinė žmogaus karboanhidrazių izoforma – ir savo struktūra, ir atliekama funkcija organizme. Ypatingas jos bruožas – labai padidėjanti raiška daugelio piktybinių auglių atvejais [121], dėl šios savybės CA IX yra geras priešvėžinių vaistų taikinytis ir vėžinių ląstelių žymuo. Tačiau slopiklių ar detekcijos metodų kūrimas galimas, tik detaliam ištyrus patį baltymą-taikinį, todėl vienas iš šio darbo tikslų buvo biochemiškai charakterizuoti karboanhidrazę IX. CA IX baltymo tyrimai buvo atliekami bendradarbiaujant su Suomijos, Italijos ir Slovakijos mokslininkais [5*].

Rekombinantinė CA IX buvo pagaminta vabzdžių ląstelių kultūroje, naudojant bakulovirusų baltymų raiškos sistemą, S. Parkkila laboratorijoje. Kaip minėta skyrelyje 1.2.5, CA IX baltymas sudarytas iš kelių domenų (3.6 A pav.): N-gale yra signalinė seka (SP), nukreipianti baltymą į ląstelės išorę, už jos – proteoglikaninis domenas (PG), toliau – karboanhidrazės katalizinis domenas (CA), tada – viena transmembraninė spirale (TM) ir

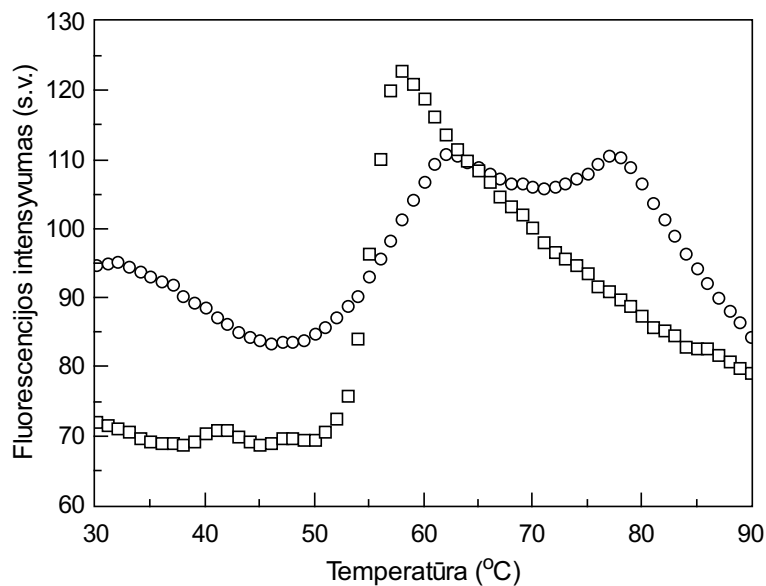
trumpa viduląstelinė seka (IC). Dirbant tirti du šio baltymo konstruktai: CA IX (3.6 B pav.) – baltymas, turintis proteoglikaninį (PG) domeną ir katalizinį (CA) domeną, bei trumpesnis baltymas (3.6 C pav.) sCA IX, kuris turi tik katalizinį domeną. Signalinis peptidas nukerpamas baltymo sekrecijos iš ląstelės metu.



3.6 pav. CA IX baltymo domeninė struktūra. A – viso ilgio baltymas, B ir C – šiuo darbu tirti baltymo konstruktai, SP – signalinis peptidas, PG – proteoglikaninis domenas, CA – katalizinis domenas, TM – transmembraninis domenas, IC – viduląstelinė seka, H – polihistidininis inkaras, T – trombino kirpimo taikinyus. Viso ilgio baltymo schemeje pažymėti sekoje esantys cisteinai. Du iš jų sudaro vidumolekulinį disulfidinį tiltelį. Taip pat pažymėtos N- ir O- glikozilinimo pozicijos.

Tiriant CA IX mėginių stabilumą TSA metodu, pastebėtas nebūdingas kitoms CA izoformoms baltymo išsivyniojimo profilis (3.7 pav.). Tai galėtų reikšti, kad arba tiriamo baltymo išsivyniojimas yra dviejų stadijų procesas, arba analizuojamame mėginyje yra dvi skirtingo stabilumo baltymo formos.

Kadangi literatūroje buvo duomenų, kad ši izoforma ląstelėje galėtų sudaryti kovalentiškai sujungtus trimerus, tai iškelta hipotezė, kad dvi TSA eksperimento tranzicijos galėtų atitinkamai atspindėti monomerinės ir oligomerinės formų išsivyniojimą (tikėtina, kad kovalentiškai sutvirtinto oligomerinio baltymo stabilumas būtų didesnis). Siekiant patikrinti šią hipotezę, buvo atlikta baltymo mėginių, 2 val. inkubuotų su skirtingomis reduktoriaus DTT koncentracijomis, NDS elektroforezė (pav. 3.8). Šis eksperimentas parodė, kad pradiniai mėginiai, ir sCA IX, ir CA IX, buvo monomerinės ir oligomerinės formų mišiniai. Pagal densitometrinės



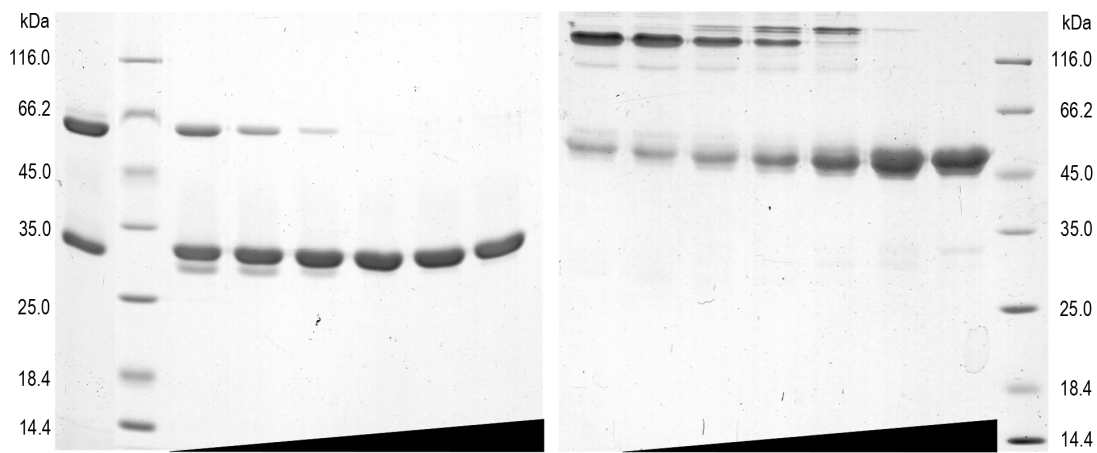
3.7 pav. CA IX išsivyniojimo priklausomybė nuo temperatūros (○), palyginti pateikta CA II išsivyniojimo kreivė (□).

analizės rezultatus CA IX buvo sudaryta iš ~ 60 % oligomerinės ir 34 % monomerinės formų, o sCA IX mėginys – iš 54 % oligomerinės ir 46 % monomerinės formų. Didinant reduktoriaus koncentraciją, suiro disulfidiniai ryšiai ir monomero mėginyje daugėjo, o oligomerinės formos – mažėjo. sCA IX baltymo atveju pagal molekulinį svorių standartus aiškiai matoma, kad oligomerinė forma atitinka dimerą (monomero teorinis MW 29598,4), o CA IX atveju monomero stebimasis molekulinis svoris yra didesnis nei teorinis (~ 50 kDa ir 41,1 kDa, atitinkamai), o oligomerinė forma galėtų būti trimeras (stebimasis MW > 120 kDa).

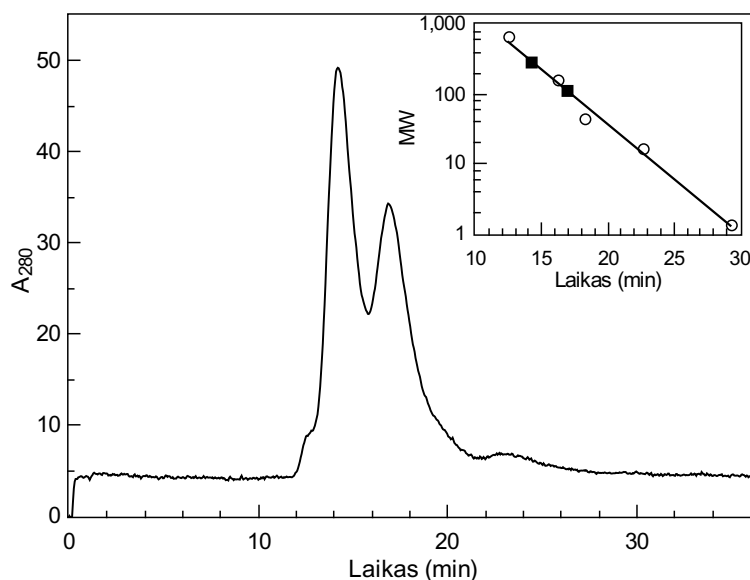
Toliau tiriant CA IX oligomerinę būseną, atlikta gelfiltracinė analizė (3.9 pav.), kuri patvirtino, kad mėginyje vienu metu yra skirtingo dydžio dalelių. Visgi jų dydžiai gana netikėti – atitinkamai, pirmoji smailė 297 kDa ir antroji 115 kDa (3.9 pav.). Lyginant su kolegų italų gautais monomero masės spektrometrijos rezultatais (43 kDa), šios vertės yra gerokai per didelės – tai tikriausiai lemia PG domeno neglobulinė struktūra. Antrosios smailės mėginio masės spektrometrinė analizė parodė, kad tikrasis baltymo dydis yra 86 kDa, o tai atitinka dimerinę formą.

Monomero ir dimero atskyrimą gelfiltracijos būdu patvirtino ir elekt-

3.1. Karboanhidrazių tyrimai



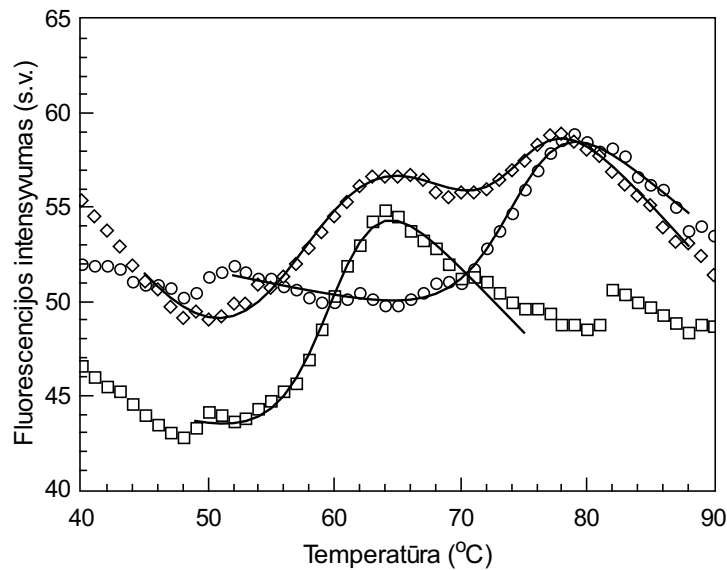
3.8 pav. DTT įtaka sCA IX (kairėje) ir CA IX (dešinėje) baltymo judrumui, atliekant NDS elektroforezę. DTT koncentracijos didėjimas parodytas trikampaiais gelio apačioje. Didėjant reduktoriaus koncentracijai, suardomi disulfidiniai tilteliai, todėl mažėja kovalentiškai sujungto dimero kiekis ir, atitinkamai, daugėja monomero.



3.9 pav. Monomerinės ir dimerinės CA IX formų atskyrimas gelfiltracijos metodu. Gelfiltracijos metodu nustatyti stebimieji molekuliniai svoriai yra gerokai didesni nei nustatyti masių spektrometrijos būdu.

roforezės redukuojančiomis ir neredukuojančiomis sąlygomis palyginimas (duomenys neparodyti). Abiejų smailių pozicijas atitinkantys baltymo mėginiai taip pat buvo ištirti TSA metodu, kurio rezultatai patvirtino tyrimo pradžioje iškeltą hipotezę, kad pirmoji tranzicija atitinka baltymo monomerinės, o antroji – oligomerinės (patikslinta – dimerinės) formos išsivyniojimą (3.10 pav.). Kadangi šių baltymo formų stabilumai labai skirtingi

($\Delta T_m \sim 15^\circ\text{C}$), tai TSA metodas leidžia vienu metu tirti pasirinktų sąlygų ar junginių įtaką abiejų formų stabilumui, t. y. galima nustatyti abiejų formų jungimosi su ligandais konstantas, jų neatskiriant. Ši TSA metodo savybė buvo panaudota tiriant [1,2-*c*][1,2,3]-tiadiazol-7-sulfonamidų jungimąsi su CA (3.3.3 skyrelis).



3.10 pav. TSA rezultatai: (◇) – mėginys prieš gelfiltraciją, (○) – pirmosios gelfiltracijos smailės mėginys (atitinka dimerą), (□) – antrosios smailės mėginys (atitinka monomerą).

Šio CA IX biocheminio charakterizavimo metu taip pat nustatyta, kad CA IX yra vienas iš greičiausių CA izofermentų ($k_{kat} = 1,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$), PG domenas fermentinį aktyvumą padidina apie 10 kartų. Taip pat identifiкуotos N- ir O-glikozilinimo pozicijos (3.6 pav.) bei glikozilinimo pobūdis.

2009 metais buvo nustatyta žmogaus CA IX katalizinio domeno kristalinė struktūra, kuri patvirtino, kad CA IX formuoja kovalentiškai (Cys174–Cys174) sujungtą dimerą (arba Cys41–Cys41 pagal visoms CA taikomą CA II aminorūgščių numeraciją) [41].

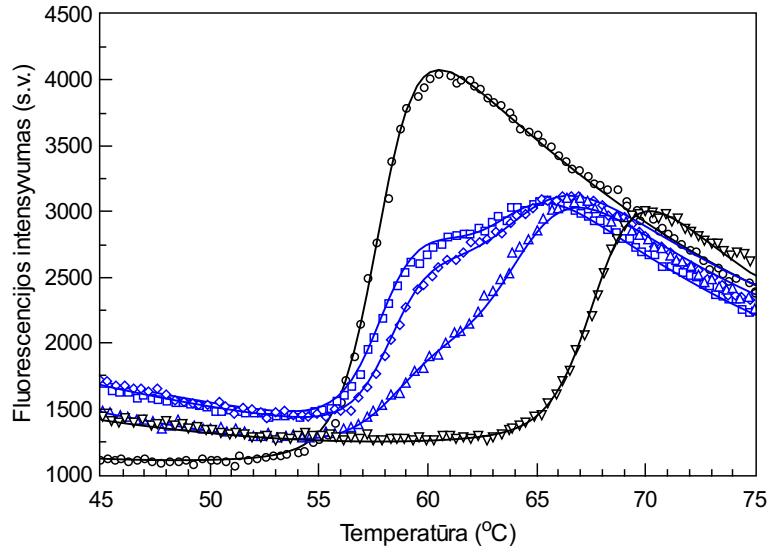
3.2. Karboanhidrazių panaudojimas, tobulinant TSA modelį

Tiriant baltymų–ligandų jungimąsi terminio poslinkio metodu, buvo pastebėta, kad egzistuojantis modelis neaprašo, ar nepakankamai tiksliai aprašo kai kurių stebimų procesų (baltymo destabilizavimo ligandu, baltymo ir baltymo–ligando komplekso frakcijų atsiskyrimo lydimosi kreivėje). Todėl gautų eksperimentinių duomenų analizei TSA modelis buvo papildytas. Modelius iliustruojantys eksperimentiniai rezultatai pateikiami kaip modelinį baltymą naudojant žmogaus CA II.

3.2.1. CA II-EZA sąveika – modelinė sistema labai stiprioms sąveikoms matuoti

Labai stiprioms sąveikoms ($K_b > 10^9 \text{ M}^{-1}$) matuoti ITC metodu negalima taikyti įprasto tiesioginio titravimo metodo, nes titravimo kreivės pasvirimo kampas, pagal kurį nustatoma K_b , yra per status. Todėl tokiu atveju naudojamas konkurencinės ITC metodas: analizuojamu junginiu titruojamas baltymo–silpniau besijungiančio ligando (1:1) kompleksas [122]. Tai ne visada yra patogiu ar apskritai įmanoma, nes reikia turėti tokį ligandą, kuris jungtųsi toje pačioje baltymo-taikinio vietoje, bet gero kai silpniau, ir reikia tiksliai žinoti jo jungimosi konstantą [123]. Dar 1990 m. parodyta, kad baltymo stabilizavimo, kai prisijungia ligandas, reiškinį galima išnaudoti jungimosi konstantoms apskaičiuoti [124]. Tam anksčiau buvo naudojamas DSC metodas. Tuo pačiu stabilizavimo reiškinium pagrįstas ir TSA metodas, tik juo matuojamas ne šiluminės talpos pokytis, o fluorescencijos signalo kitimas. Tiesa, klasikinė TSA yra labiau ribojama vandens virimo temperatūros (DSC eksperimentas atliekamas, esant didesniam slėgiui, todėl galima pasiekti iki 120–130 °C). Visgi dauguma atvejų viršutinė galimos temperatūros riba netrukdo, o pagrindiniai šio metodo privalumai – didelis našumas, analizės greitis bei universalumas – lemia vis platesnį jo taikymą [94, 96, 125].

Jungiantis etokzolidui (EZA) su CA II, didinant EZA koncentraciją, tačiau jai dar neviršijus baltymo koncentracijos, TSA eksperimento metu stebimos netipiškos formos baltymo išsivyniojimo kreivės (3.11 pav. pažymėtos mėlyna spalva).



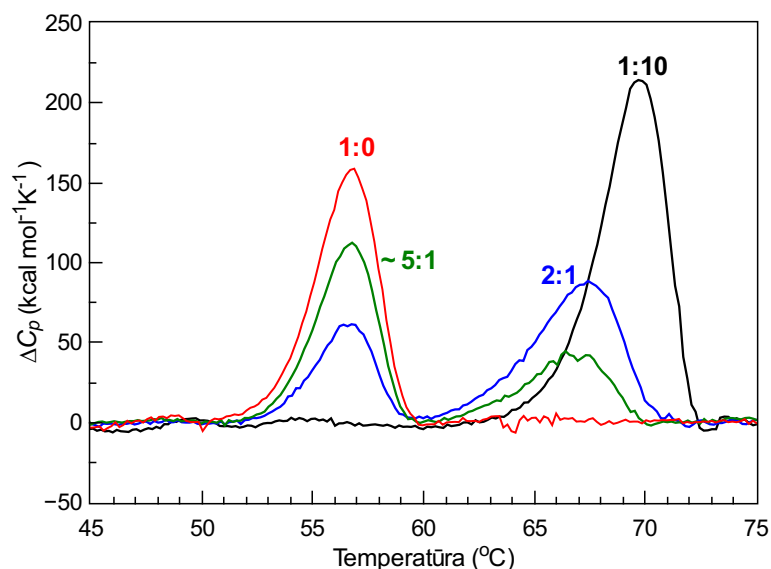
3.11 pav. TSA kreivės – CA II junginasis su EZA 50 mM fosfatiniame buferyje su 50 mM NaCl, pH 7,0. Baltymo koncentracija – 5 μ M, ligando koncentracija: (○) – 0 μ M, (□) – 1,5 μ M, (◇) – 2 μ M, (△) – 3 μ M, (▽) – 50 μ M. Simboliai žymi eksperimentinius duomenis, o linijos – 3.4 formule aprašytą modelį.

Tiriant šią sąveiką DSC metodu, kai baltymo koncentracija viršija ligando koncentraciją, stebimos dvi baltymo išsivyniojimo smailės: pirmoji atitinka baltymo be ligando išsivyniojimą, o antroji parodo ligandu stabilizuoto baltymo išsivyniojimą. Kintant baltymo–ligando santykiui, proporcingai keičiasi ir abiejų DSC smailių dydžiai (3.12 pav.).

Baltymo ir baltymo–ligando komplekso smailių atsiskyrimą aprašė J. F. Brandts ir L.-N. Lin [124]. Pagal DSC duomenų analogiją, TSA kreivės dviguba tranzicija priskirta dviejų baltymo frakcijų (baltymo be ligando ir baltymo, stabilizuoto ligandu) išsivyniojimui. Jai aprašyti išvesta 3.4 formulė [4*].

Tikimybė, kad baltymas bus išsivyniojęs, apskaičiuojama pagal lygtį:

$$P_U = \frac{1}{1 + e^{\Delta G_U/RT}}, \quad (3.1)$$



3.12 pav. CA II ir CA II-EZA komplekso DSC analizė. Baltymo koncentracija – 100 μM , raudona kreivė – CA II be ligando, žalia – su 22 μM EZA, mėlyna – su 50 μM EZA, juoda – su 1 mM EZA. Skaičiai šalia kreivių rodo baltymo–ligando molinį santykį.

kai ΔG_U yra baltymo išsivyniojimo laisvoji Gibso energija, R – universaliųjų dujų konstanta, o T – temperatūra, K.

Baltymo–dažo kompleksų fluorescencijos intensyvumas denatūracijos kreivėje aprašomas lygtimi:

$$y(T) = y_U P_U + y_N (1 - P_U), \quad (3.2)$$

kai y_N ir y_U yra nuo temperatūros priklausantys, atitinkamai, natyvaus ir išsivyniojusio baltymo intensyvumai, o $1 - P_U$ yra tikimybė, kad baltymas bus natyvus.

Kai laisvo baltymo ir baltymo su ligandu frakcijos denatūruoja nepriklausomai, fluorescencijos intensyvumas denatūracijos kreivėje aprašomas 3.3 lygtimi:

$$y(T) = n(y_U^L P_U^L + y_N^L (1 - P_U^L)) + (1 - n)(y_U P_U + y_N (1 - P_U)) \quad (3.3)$$

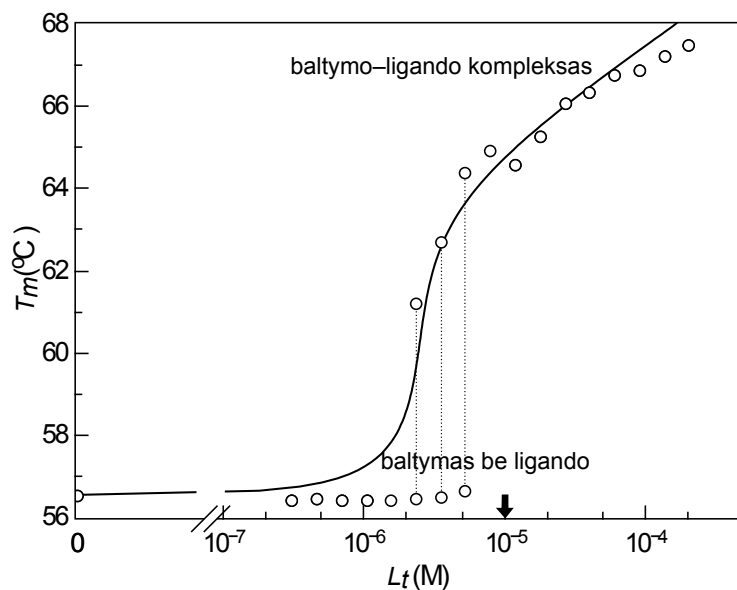
Čia indeksais L pažymėti su ligandu susijungusio baltymo parametrai, o laisvo baltymo – be indekso. Parametras n rodo su ligandu susijungusio

baltymo frakciją ir kinta intervale nuo 0 iki 1.

Kadangi baltymo su ligandu ir be jo, ir natyvos, $y_N = y_N^L$, ir išsivyniojusios, $y_U = y_U^L$, baltymo formų fluorescencijos intensyvumai vienodi, tai 3.3 lygtis supaprastėja:

$$y(T) = y_N + (y_U - y_N)((1 - n)P_U + nP_U^L) \quad (3.4)$$

Jungimosi konstantai nustatyti naudojamame grafike atidėjus lydymosi temperatūros priklausomybę nuo pridėto ligando koncentracijos, kai ligando yra mažiau nei baltymo, aiškiai atsiskiria dvi skirtingo stabilumo frakcijos: baltymo ir baltymo–ligando komplekso (3.13 pav.). Modeliuojant T_m priklausomybės nuo ligando koncentracijos kreivę, gauta CA II–EZA $K_d \sim 2$ nM (literatūroje pateikiama sustabdytos tėkmės metodu išmatuota slopinimo konstanta $K_i = 8$ nM [126]).



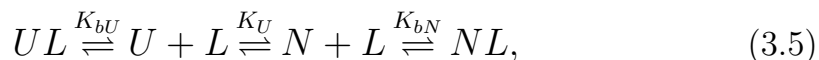
3.13 pav. CA II–EZA TSA rezultatai – jungimosi konstantos nustatymas. Taškinėmis linijomis sujungti taškai gauti, esant tai pačiai ligando koncentracijai, kai lydymosi kreivėje atsiskiria baltymo be ligando ir baltymo–ligando komplekso frakcijos. Rodyklė ant x ašies žymi eksperimente naudotą baltymo koncentraciją. Kai ligando daugiau nei baltymo, stebima tik baltymo–ligando komplekso denatūracija.

Dviejų tranzicijų modelio taikymas leidžia tiksliau nustatyti jungimosi konstantą, jungimosi stechiometriją, patikslinti aktyvaus baltymo koncent-

raciją.

3.2.2. Ligandų įtaka baltymo stabilumui: stabilizavimas ir destabilizavimas

Nors dauguma ligandų, sąveikaudami su baltymais, juos stabilizuoja, t. y. padidina jų lydymosi temperatūrą, vis dėlto yra ir tokių, kurie veikia priešingai – prisijungdami baltymą destabilizuoja. Klasikinis TSA modelis, naudojamas jungimosi konstantai nustatyti [115], neįvertina baltymo destabilizavimo ligandu galimybes. Todėl, šį destabilizavimo reiškinį aprašius kaip ligando jungimąsi prie išsivyniojusio baltymo, buvo papildytas terminio poslinkio analizės modelis: ligandas (L) gali jungtis ir prie natyvaus (N), ir prie išsivyniojusio (U) baltymo:



čia K_U yra baltymo be ligando išsivyniojimo pusiausvyros konstanta (2.2 lygtis), o K_{bU} ir K_{bN} , atitinkamai, ligando jungimosi prie išsivyniojusio ir prie natyvaus baltymo konstantos:

$$K_{bU} = \frac{[UL]}{[U][L]}, \quad (3.6)$$

$$K_{bN} = \frac{[NL]}{[N][L]}, \quad (3.7)$$

čia NL žymi natyvaus, o UL – išsivyniojusio baltymo–ligando kompleksą.

Bendros baltymo ir ligando koncentracijos yra atitinkamos visų sistemoje esančių baltymo / ligando formų sumos:

$$P_t = [N] + [U] + [NL] + [UL] \quad (3.8)$$

$$L_t = [L] + [NL] + [UL] \quad (3.9)$$

Kai $T = T_m$, t. y. pusė baltymo yra natyvaus ir pusė išsivyniojusio,

taikant 2.2 ir 3.6–3.9 lygtis, ryšį tarp minėtų pusiausvyros konstantų ir bendros ligando koncentracijos galima aprašyti lygtimi [6*]:

$$L_t = (1 - K_U) \left(\frac{P_t}{2} \frac{K_{bN} + K_{bU}K_U}{K_U(K_{bU} - K_{bN})} + \frac{1}{K_U K_{bU} - K_{bN}} \right) \quad (3.10)$$

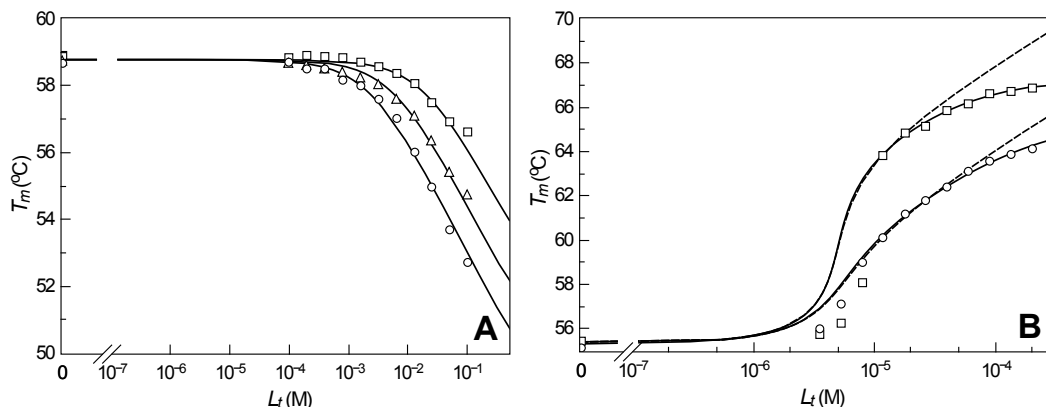
3.10 lygtyje pusiausvyros konstantoms pritaikius laisvosios Gibso energijos išraiškas $\Delta G = -RT \ln K$ ir $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$, ir laikant, kad ir baltymo išsivyniojimo, ir baltymo–ligando jungimosi šiluminės talpos nepriklauso nuo temperatūros, gaunamas papildytas modelis, aprašantis ryšius tarp baltymo išsivyniojimo bei jungimosi su ligandais termodinamiinių parametrų ir bendrų baltymo bei ligando koncentracijų. Šis modelis tinka tik kai baltymo–ligando jungimosi stochiometrija yra 1:1.

Jeigu ligandas labiau jungiasi prie išsivyniojusio baltymo, tai stebime destabilizavimą, jeigu prie natyvaus – stabilizavimą. Stabilizavimo atveju, jeigu ligandas jungiasi tik prie natyvaus baltymo ($K_{bU} \rightarrow 0$), 3.10 lygtį galima supaprastinti iki 2.2.2 skyrelyje pateiktos 2.8 lygties, o jeigu ligandas jungiasi tik prie išsivyniojusio baltymo ($K_{bN} \rightarrow 0$), tai gauname lygtį:

$$L_t = (1 - K_U) \left(\frac{P_t}{2} + \frac{1}{K_{bU}K_U} \right) \quad (3.11)$$

Šią lygtį galima taikyti, pvz., malato, izocitrato, citrato įtakai CA stabilumui įvertinti (3.14 **A** pav.).

Papildytas (stabilizavimo-destabilizavimo) TSA modelis gali būti taikomas paaiškinti įsotrinimo reiškinį, kuris neretai stebimas, kai didinant ligando koncentraciją, T_m padidėja mažiau, nei numato dalinis modelis (3.14 **B** pav. punktyrinė linija), kuris įvertina tik jungimąsi prie natyvaus baltymo. Naudojant papildytą modelį, gaunama 3.14 **B** pav. ištisine linija pažymėta kreivė. Palyginimas: dalinio modelio jungimosi konstantos K_{bN} (kai $K_{bU} \rightarrow 0$) EZA ir TFMSA jungimuisi prie CA II atitinkamai gaunamos $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ir $8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, o kai naudojamas papildytas



3.14 pav. TSA eksperimentai: **A** – CA II destabilizuojantys ligandai: (□) – malatas ($K_d \sim 7,7$ mM), (△) – izocitratas ($K_d \sim 2,3$ mM), (○) – citratas ($K_d \sim 0,9$ mM), **B** – CA II stabilizuojantys ligandai: (□) – EZA ($K_d \sim 2$ nM), (○) – TFMSA ($K_d \sim 1,2$ μ M).

modelis ir K_{bU} leidžiama varijuoti, tai CA II – EZA jungimosi gaunama $K_{bN} = 1,3 \times 10^8$, $K_{bU} = 1,2 \times 10^5$, o CA II–TFMSA $K_{bN} = 9,2 \times 10^6$, $K_{bU} = 2,8 \times 10^4$. Taigi, standartiškai naudojant supaprastintą modelį baltymą stabilizuojančių junginių konstantoms nustatyti, kartais jos gali būti gaunamos mažesnės, bet niekada didesnės, nei nustatomos kitais metodais.

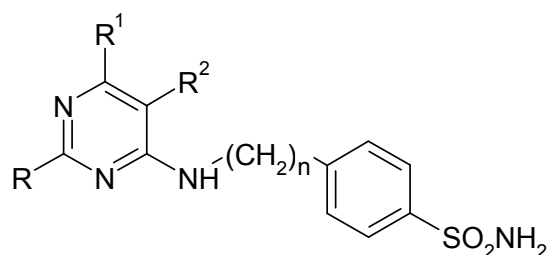
3.3. Naujų ligandų tyrimas

Nauji CA ligandai / slopikliai kuriami, siekiant atrasti efektyvesnius, atrankesnius vienai ar kitai izoformai junginius, kurie ateityje galėtų būti naudojami kaip vaistiniai junginiai. Šiuo darbu tirta 40-ties naujų, sulfonamidinę grupę turinčių junginių, susintetintų Vilniaus universitete, sąveika su rekombinantinėmis žmogaus CA I, II, VII, IX, XIII.

3.3.1. 4-[N-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidai

Buvo išmatuota 16-kos šios klasės junginių, susintetintų Vilniaus universiteto Chemijos fakultete (dr. J. Sūdžius), sąveika su keturiomis citoplazminėmis CA izoformomis [2*]. Visi šios serijos junginiai turi sulfonamidinę grupę, kuri tiesiogiai sąveikauja su CA molekulėje esančiu Zn^{2+}

jonu. Ši sulfonamidinė grupė yra prijungta prie benzeno žiedo, o jo *para-*padėtyje, skirtingo ilgio jungtuku, prijungtas pirimidino žiedas su įvairiais pakaitais (3.15 pav.). Tam, kad būtų sustiprinta sąveika su karboanhidrazės aktyviojo centro hidrofiline dalimi, į pirimidino žiedą įvestos papildomos elektronus ištraukiančios grupės.



3.15 pav. Bendra 4-[*N*-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidų struktūra.

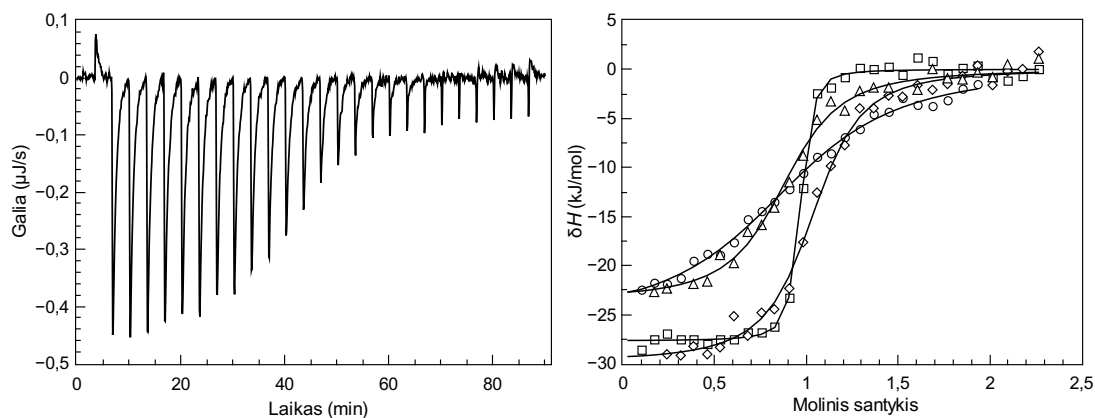
Tirtų junginių struktūros pateikiamos 3.1 lentelėje, nurodyti pirimidino žiede esantys pakaitai, 3.15 pav. pažymėti simboliais R, R¹, R², ir jungtuko tarp benzeno ir pirimidino žiedo ilgiai pagal juose esančių CH₂ grupių skaičių n.

3.1 lentelė. Dirbant tirtų 4-[*N*-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidų, kurių bendra struktūrinė formulė pateikta 3.15 pav., pakaitai.

Nr.	Jungtuko ilgis n	R	R ¹	R ²
1	0	SMe	Cl	CHO
2	1	SMe	Cl	CHO
3	2	SMe	Cl	CHO
4	0	SMe	Cl	CN
5	1	SMe	Cl	CN
6	2	SMe	Cl	CN
7	0	SMe	NHCH ₂ Ph	CN
8	0	H	NHCH ₂ Ph	NO ₂
9	1	H	NHCH ₂ Ph	NO ₂
10	2	H	NHCH ₂ Ph	NO ₂
11	0	H	Cl	NO ₂
12	1	H	Cl	NO ₂
13	2	H	Cl	NO ₂
14	1	H	O	NO ₂
15	1	H	OMe	NO ₂
16	2	H	OMe	NO ₂

4-[*N*-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidų jungimosi su keturiomis

citoplazminėmis žmogaus karboanhidrazių izoformomis (CA I, II, VII ir XIII) tyrimo rezultatai pateikti 3.2 lentelėje. Šioje lentelėje pateiktos tirtų baltymų–ligandų disociacijos konstantos, gautos izoterminio titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio analizės metodais. ITC metodu (3.16 pav.) dalis junginių netirti dėl tokių priežasčių, kaip nepakankamas junginio tirpumas ar per silpna sąveika, kad ją galima būtų išmatuoti šiuo metodu.



3.16 pav. Tipiniai ITC analizės duomenys: A – junginio **16** jungimosi su CA VII ITC pirminiai duomenys, B – junginio **11** junginasis su CA I (Δ), CA II (\diamond), CA VII (\circ), CA XIII (\square) – integruoti ITC duomenys.

Junginiai **12** ir **13** su tirtomis karboanhidrazėmis jungėsi stipriau už daugelį kitų šios klasės junginių, tačiau buvo pastebėta, kad jų aktyvumas per tam tikrą laiką kinta. Nustatyta, kad DMSO tirpale vyksta Cl pakaito nukleofilinis pakeitimas deguonimi. Pvz., iš junginio **12** susidaro **14**. Po hidrolizės susidaręs **14** yra mažiau aktyvus, tačiau yra iš dalies atrankus CA XIII izoformai.

Dr. S. Gražulio grupė (VU Biotechnologijos institutas, Baltymų–nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius, vedėjas – prof. dr. V. Šikšnys) atliko šios grupės junginių kompleksų su CA II struktūrų kristalografinius tyrimus. Nustatytos trys baltymų–ligandų kompleksų struktūros, kuriose matomi junginiai, turintys trumpą, tik NH grupės, jungtuką tarp aromatinių žiedų, penkios struktūros, kurių junginiai turi ilgesnį jungtuką NHCH_2 , ir dvi struktūros su ilgiausiu $\text{NH}(\text{CH}_2)_2$ jungtuku (3.17 pav.).

3.2 lentelė. Karboanhidrazių jungimosi su 4-[N-(pirimidin-4-il)]aminobenzosulfonamidais disociacijos konstantos (μM), nustatytos ITC ir TSA metodais (fosfatiniame buferyje pH 7,0, 50 mM NaCl, 37 °C).

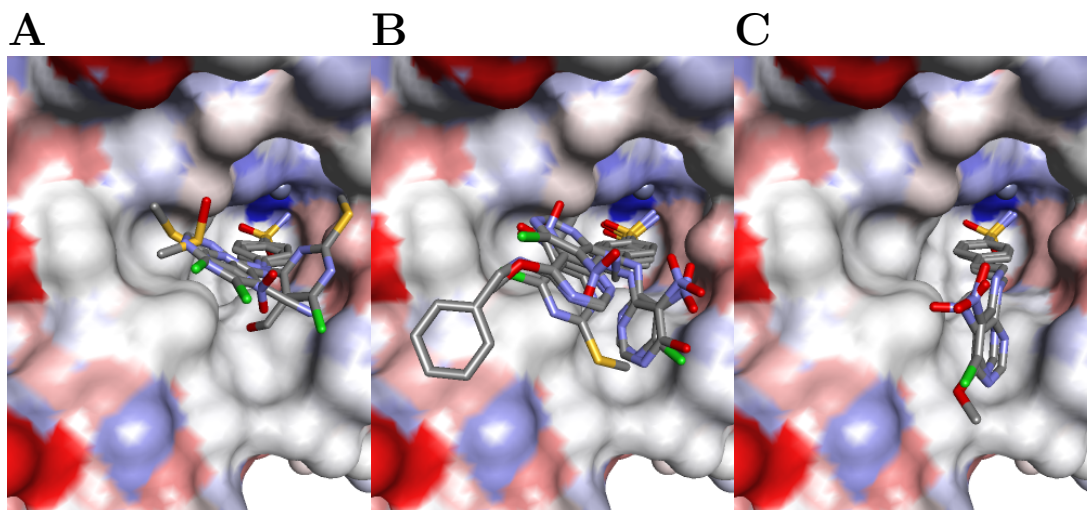
Junginys	CA I		CA II		CA VII		CA XIII	
	K_d^{TSA}	K_d^{ITC}	K_d^{TSA}	K_d^{ITC}	K_d^{TSA}	K_d^{ITC}	K_d^{TSA}	K_d^{ITC}
1	1,0	2,8	0,17	0,32	4,0	ND	ND	ND
2	0,0071	0,083	0,024	0,043	0,10	0,10	0,028	0,13
3	0,11	0,48	0,11	0,35	1,0	0,77	0,33	0,19
4	1,4	20	0,071	0,22	0,83	1,7	0,095	0,12
5	0,10	ND	0,17	ND	0,10	ND	0,14	ND
6	0,33	ND	0,42	ND	0,10	ND	0,10	ND
7	100	ND	100	ND	3300	ND	100	ND
8	0,071	ND	0,17	ND	10	ND	0,50	ND
9	0,025	ND	0,10	ND	4,2	ND	0,33	ND
10	0,63	ND	0,016	ND	1,4	ND	0,50	ND
11	0,13	0,26	0,091	0,17	0,13	0,78	0,002	0,014
12*	0,013	0,099	0,0002	0,043	0,005	0,40	0,0001	0,01
13*	0,063	0,39	0,17	0,22	0,0017	0,41	0,0002	0,39
14	0,17	ND	0,20	ND	0,25	ND	0,020	ND
15	0,014	0,11	0,050	0,056	0,83	0,83	0,067	0,24
16	0,067	0,28	0,071	0,15	0,13	0,44	0,13	0,23
AZM	1,4	0,78	0,017	0,018	0,053	0,082	0,020	0,027

* pažymėti junginiai nestabilūs dimetilsulfokside

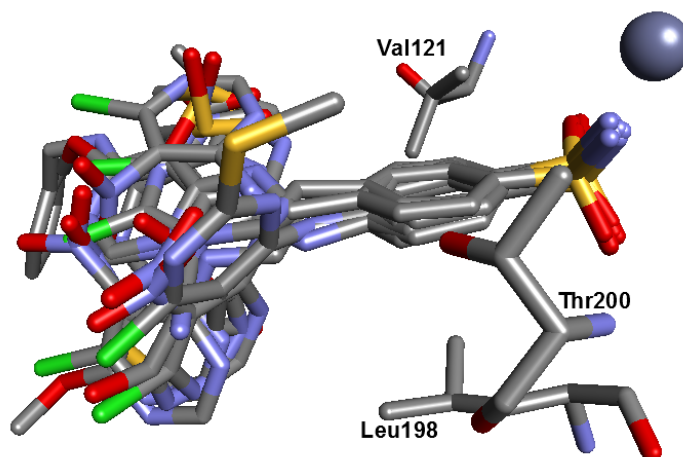
Visų tirtų junginių sulfonamidinę grupę turintis žiedas baltymo aktyviojo centro kišenėje orientuotas panašiai (benzeno žiedo padėtį fiksuoja Val121, Thr200 bei Leu198 aminorūgštys), o toliau esančių žiedų išsidėstymas – labai įvairus (3.18 pav.).

Junginiai **1**, **4** ir **11** turi trumpiausią jungtuką tarp aromatinių žiedų. Nors šių visų trijų junginių benzeno žiedo padėtis praktiškai identiška, pirimidino žiedo padėtis skiriasi (3.19 pav.). Junginio **1** pirimidino žiedo azoto atomas per vandens molekulę sąveikauja su Trp5 ir Pro201, žiedo poziciją padeda orientuoti Pro202, o **11** junginio pirimidino žiedas sąveikauja su Phe131 benzeno žiedu bei tiesiogiai sudaro vandenilinį ryšį su Gln92 amino grupe (3.20 pav. **A**). **4** junginys šio vandenilinio ryšio nesudaro, nes dėl R padėtyje esančios SCH₃ grupės visas pirimidino žiedas pasislenka $\sim 1,3$ Å. Pastarasis vandenilinis ryšys gali būti vienas iš paaiškinimų, kodėl junginys **11** su tirtomis CA jungiasi geriau, nei junginys **1**.

Jungtuką CH₂NH tarp aromatinių žiedų turinčių junginių pirimidino

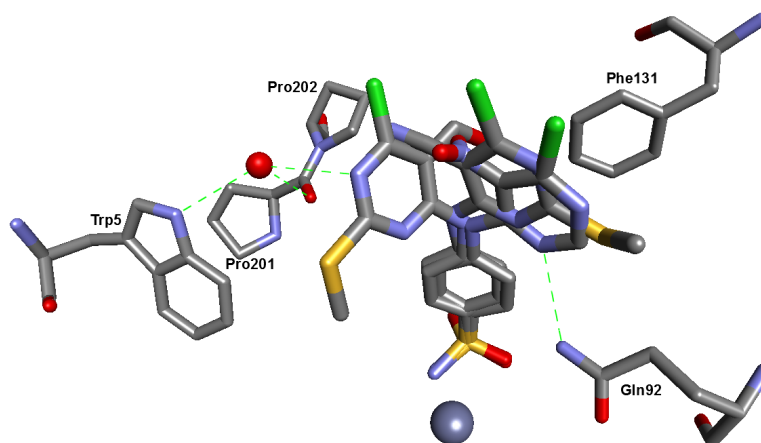


3.17 pav. 4-[*N*-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidų padėties CA II aktyviojo centro kišenėje palyginimas: **A** – trumpiausią ($n = 0$) jungtuką tarp aromatinių žiedų turintys junginiai **1** (PDB ID 3MHO), **4** ir **11** (3M40); **B** – vidutinio ilgio jungtuką ($n = 1$) turintys junginiai **2** (3M5E), **12**, **14** (3MHI), **15** (3MHL) ir **9** (3MHM); **C** – ilgiausią jungtuką ($n = 2$) turintys junginiai **13** ir **16** (3M3X).



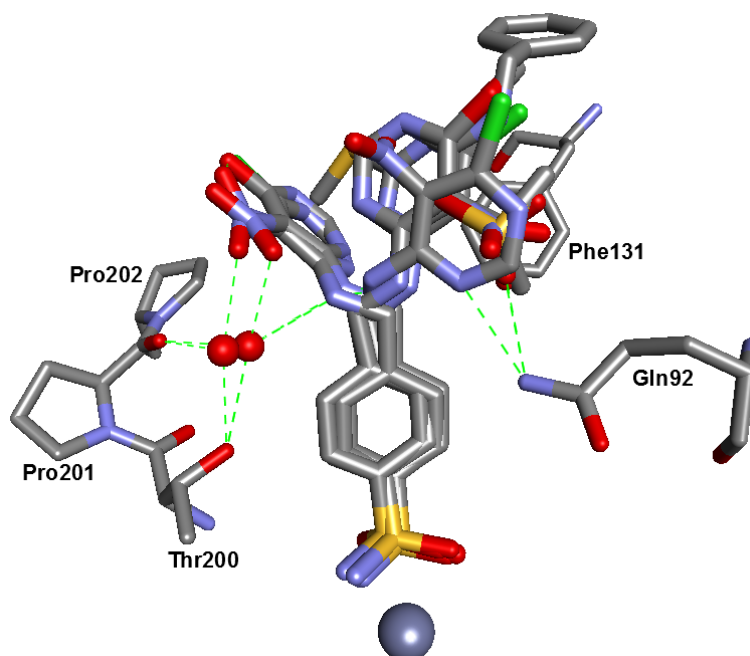
3.18 pav. 4-[*N*-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidų klasės junginių padėties CA II aktyviajame centre palyginimas (rentgenostruktūrinės analizės duomenys). Violetine sfera pažymėtas aktyviajame centre esantis Zn^{2+} jonas.

žiedo padėtis CA II aktyviojo centro kišenėje taip pat nepastovi (3.20 pav.). Junginių **9** ir **15** nitro grupė bei junginio **2** aldehido grupė (R^2 pakaitai) sudaro vandenilinį ryšį su Gln92. Šių trijų junginių pirimidino žiedo padėtį fiksuoja Phe131 aminorūgštis. Junginio **9** R^1 padėtyje esanti $NHCH_2Ph$ grupė yra baltymo išorėje, už aktyviojo centro kišenės, ir neturi pastovios pozicijos. Junginio **12** komplekso su CA II struktūroje matomos dvi alternatyvios šio junginio konformacijos. Nepastovi pirimidino žiedo



3.19 pav. 4-[*N*-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidų, turinčių trumpiausią jungtuką (NH) tarp benzeno ir pirimidino žiedų, išsidėstymo CA II aktyviajame centre palyginimas (junginiai **1** (PDB ID 3MHO), **4** ir **11** (3M40)).

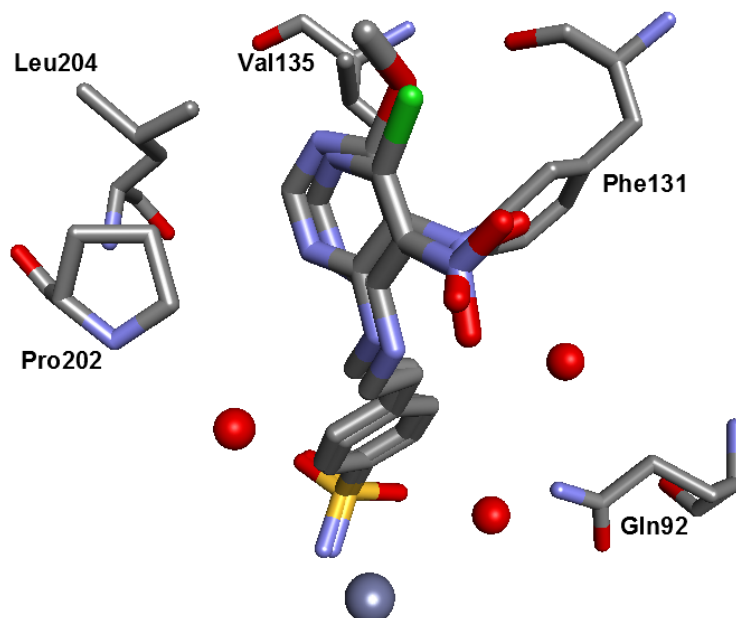
padėtis rodo, kad nė vieno iš minėtų junginių struktūra nėra optimali tiriamo baltymo aktyviajam centrui. Be to, junginio padėties stabilizavimas, susidarant naujiems baltymo–ligando ryšiams, padidintų entalpinį indėlį bendrai Gibso energijai, o entalpiškai efektyvesni junginiai yra geresni kandidatai į vaistinius junginius [127].



3.20 pav. 4-[*N*-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidų, turinčių vidutinio ilgio jungtuką (CH_2NH) tarp benzeno ir pirimidino žiedų, išsidėstymo CA II aktyviajame centre palyginimas (junginiai **2** (3M5E), **9** (3MHM), **12**, **14** (3MHI), **15** (3MHL)).

Jungtuką $(\text{CH}_2)_2\text{NH}$ turinčių junginių **13** ir **16** pirimidino žiedas tie-

sioginių kontaktų su baltymu nesudaro, visos galimos sąveikos yra per tirpiklio molekules (3.21 pav.).



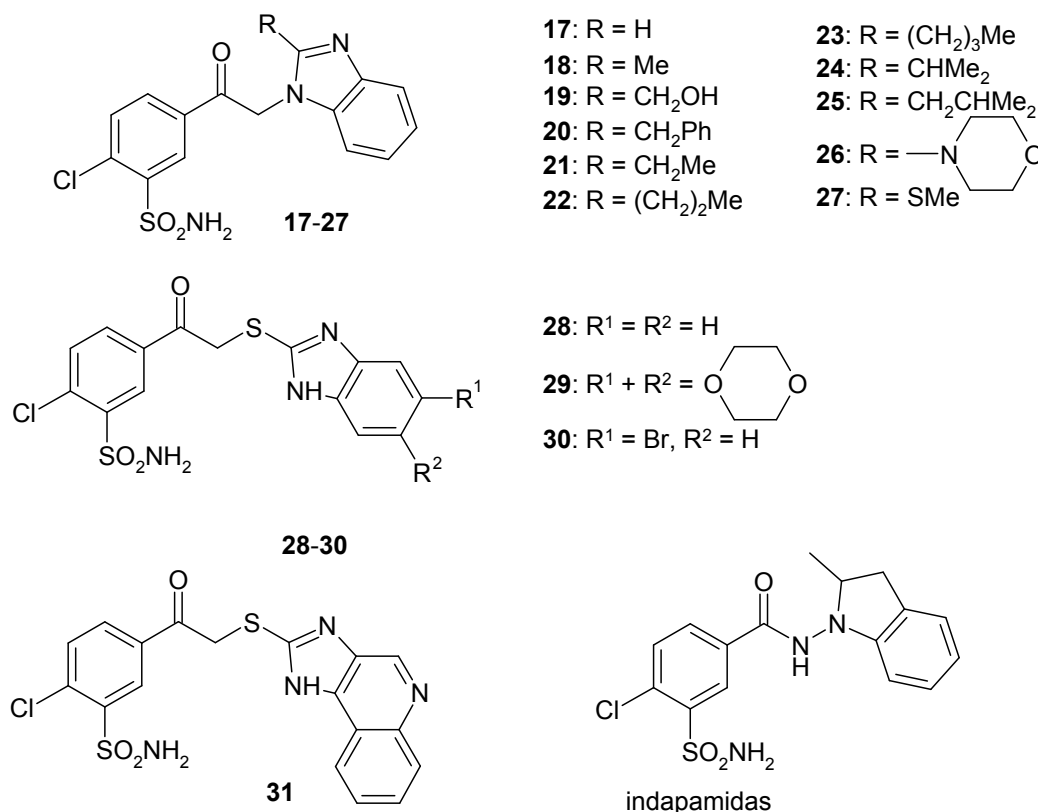
3.21 pav. 4-[*N*-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidų, turinčių ilgiausią jungtuką ((CH₂)₂NH) tarp benzeno ir pirimidino žiedų, išsidėstymo CA II aktyviajame centre palyginimas (junginiai **13** ir **16** (3M3X)).

Grupės NHCH₂Ph įvedimas labai sumažina junginių tirpumą vandenyje (**7–10** junginiai, tirpumas 2 % DMSO <50 μM), todėl net ir gerai besijungiantys junginiai **8** ir **9** turi nedidelę perspektyvą būti taikomi toliau. Junginiai **8** ir **9** įdomūs tuo, kad jie stipriau jungiasi su CA I nei su CA II ar kitomis izoformomis. Tipiški neatrankūs CA slopikliai su CA II ir CA VII sąveikauja stipriau nei su CA I. Tačiau CA I nėra terapinis taikynys.

Lyginant su klasikiniu karboanhidrazių slopikliu acetazolamidu (AZM), nauji susintetinti junginiai su tirtomis CA izoformomis jungėsi panašiai arba geriau, išskyrus **7** junginį, kuris yra silpnas visų tirtų CA izoformų ligandas. Efektyviausi ligandai – junginiai **12** ir **13**. Deja, jie nėra stabilūs.

3.3.2. Į indapamidą panašūs benzensulfonamidai

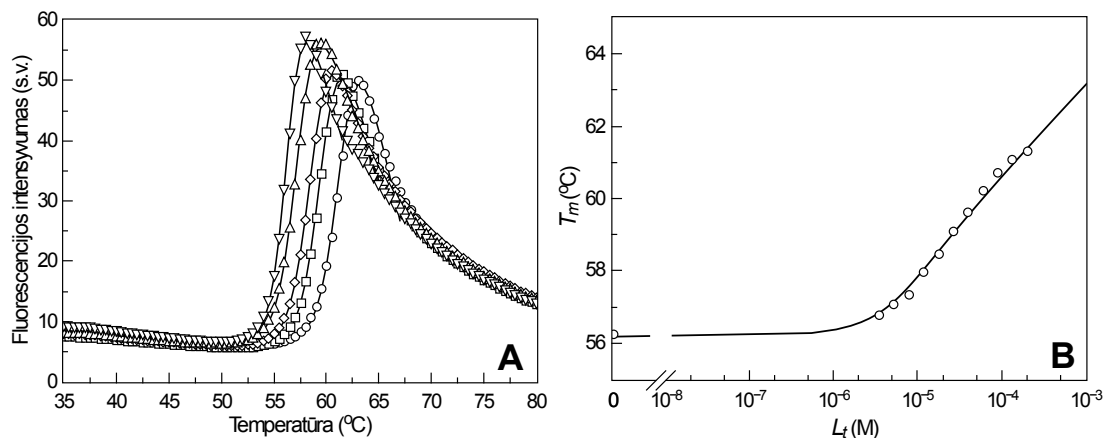
Pastebėta, kad 2-, 2,4- ir 3,4-pakeisti benzensulfonamidai su karboanhidrazėmis jungiasi prasčiau nei 4-pakeisti dariniai [13]. Tačiau būtent ši savybė galėtų padėti, kuriant vienai ar kitai izoformai atrankius junginius. Literatūros duomenimis [128, 129], indapamidas (3.22 pav.) yra atrankus CA VII izoformai, taigi ir į jį panašūs junginiai galėtų turėti analogišką ypatybę. 2- padėtyje esantis elektronų akceptorinėmis savybėmis pasižymintis Cl pakaitas sumažina sulfonamidinės grupės pK_a , t. y. padidina slopiklio gebėjimą jungtis prie CA. Pvz., indapamido atveju, programos „Marvin“ („ChemAxon“) duomenimis, Cl atomas sulfonamidinės grupės pK_a sumažina daugiau nei vienu pH vienetu (nuo 9,92 iki 8,85).



3.22 pav. Į indapamidą panašių CA ligandų struktūrinės formulės.

Terminio poslinkio metodu išmatuota 15-os naujų CA ligandų (3.22 pav.), susintetintų VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir

vaistų tyrimo skyriuje (dr. E. Čapkauskaitė), jungimasis prie CA I, II, VII ir XIII. Dalies junginių jungimosi stiprumas patikrintas ITC metodu [1*]. 3.23 pav. pateikti būdingi TSA rezultatai – junginio **22** sąveika su CA II. 3.24 pav. – tipišku ITC rezultatų pavyzdys: čia parodyta CA II sąveika su **28** junginiu.



3.23 pav. CA II sąveikos su **22** junginiu TSA duomenys: **A** – baltymo lydymosi kreivės, kai ligando koncentracija: 0 μM (▽), 7 μM (△), 17 μM (◇), 39 μM (□), 200 μM (○); **B** – lydymosi temperatūros priklausomybės nuo bendros ligando koncentracijos kreivė: taškai rodo eksperimentinius duomenis, linija – TSA modelį. Eksperimentai atlikti 50 mM fosfatiniame buferyje su 50 mM NaCl, pH 7,0, kai baltymo koncentracija – 10 μM.

Visi jungimosi rezultatai pateikti 3.3 lentelėje. *S*-alkilinti imidazolidariniai **28–31** jungėsi stipriau (disociacijos konstantos – 0,02–3,1 μM) už *N*-alkilintus benzimidazolus **17–27** (atitinkamai, K_d – 0,3–40 μM).

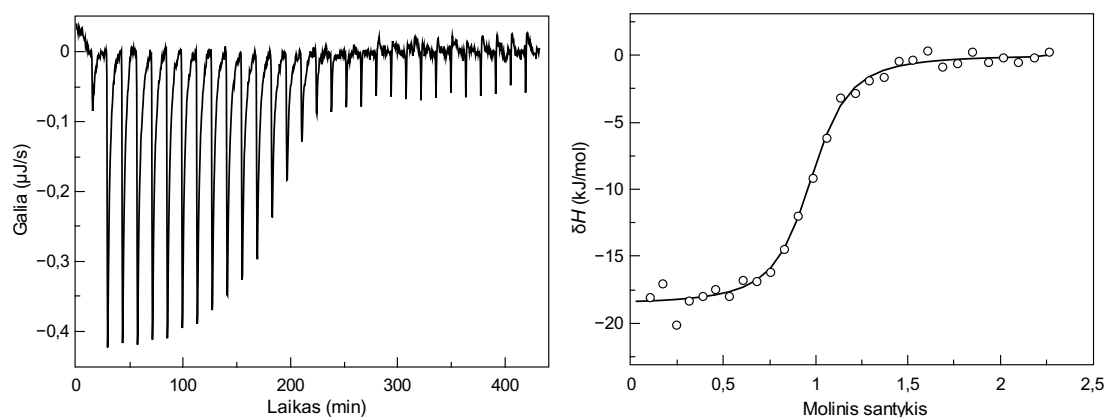
Stipriausiai su CA VII sąveikavo **28** junginys, o **29–31** efektyviau jungėsi su CA II. Indapamidas, skirtingai nuo literatūroje pateiktų fermentinio aktyvumo slopinimo rezultatų (K_i CA I, II, VII ir XIII, atitinkamai: 51,9, 2,52, 0,00023 ir 0,013 μM [128]), tiriant biofizikiniais metodais, nerodė jokio atrankumo CA VII izoformai (3.3 lentelė). K_d CA VII, nustatyta ir TSA, ir ITC metodais, apie 1000 kartų didesnė nei literatūroje nurodoma K_i .

Nepaisant to, kad paprastai ITC, TSA ir fermentinio aktyvumo matavimo metodais gaunami panašūs rezultatai, kartais jų skirtumai yra neįprastai dideli, o tai gali būti paaškinama skirtinga matavimų technika ir

3.3 lentelė. Disociacijos konstantos μM , nustatytos TSA metodu ir kai kurių junginių patikrintos ITC metodu (vertės pateiktos skliausteliuose), esant $37\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrai, 50 mM fosfatiniame buferyje, $\text{pH } 7,0$, esant 50 mM NaCl .

Junginys	CA I	CA II	CA VII	CA XIII
17	11	1,6	1,0	0,7
18	10	2,0	2,5	0,4
19	7,1	1,0	0,4	0,3
20	8,3	1,6	3,3	1,0
21	7,1	0,6	1,7	0,4
22	10	0,8	2,5	1,4
23	10	0,5	3,3	0,4
24	4,5	0,7	2,0	0,4
25	3,3	0,4	1,0	2,9
26	40	4,2	10	12,5
27	5,0	1,0	1,7	1,1
28	1,0 (1,3)	0,1 (0,1)	0,03 (0,1)	0,2 (0,1)
29	3,1 (2,2)	0,02 (0,18)	0,1 (1,1)	0,1 (0,3)
30	1,3 (1,4)	0,06	0,1	0,1 (0,2)
31	1,3	0,03	0,1	0,1
Indapamidas	10	0,3 (0,2)	0,3 (1,8)	0,1 (0,2)

nevienodu laboratorijose naudojamų baltymų paruošimu, todėl, tiriant net nesudėtingas baltymų–ligandų sistemas, verta neapsiriboti vienu metodu.

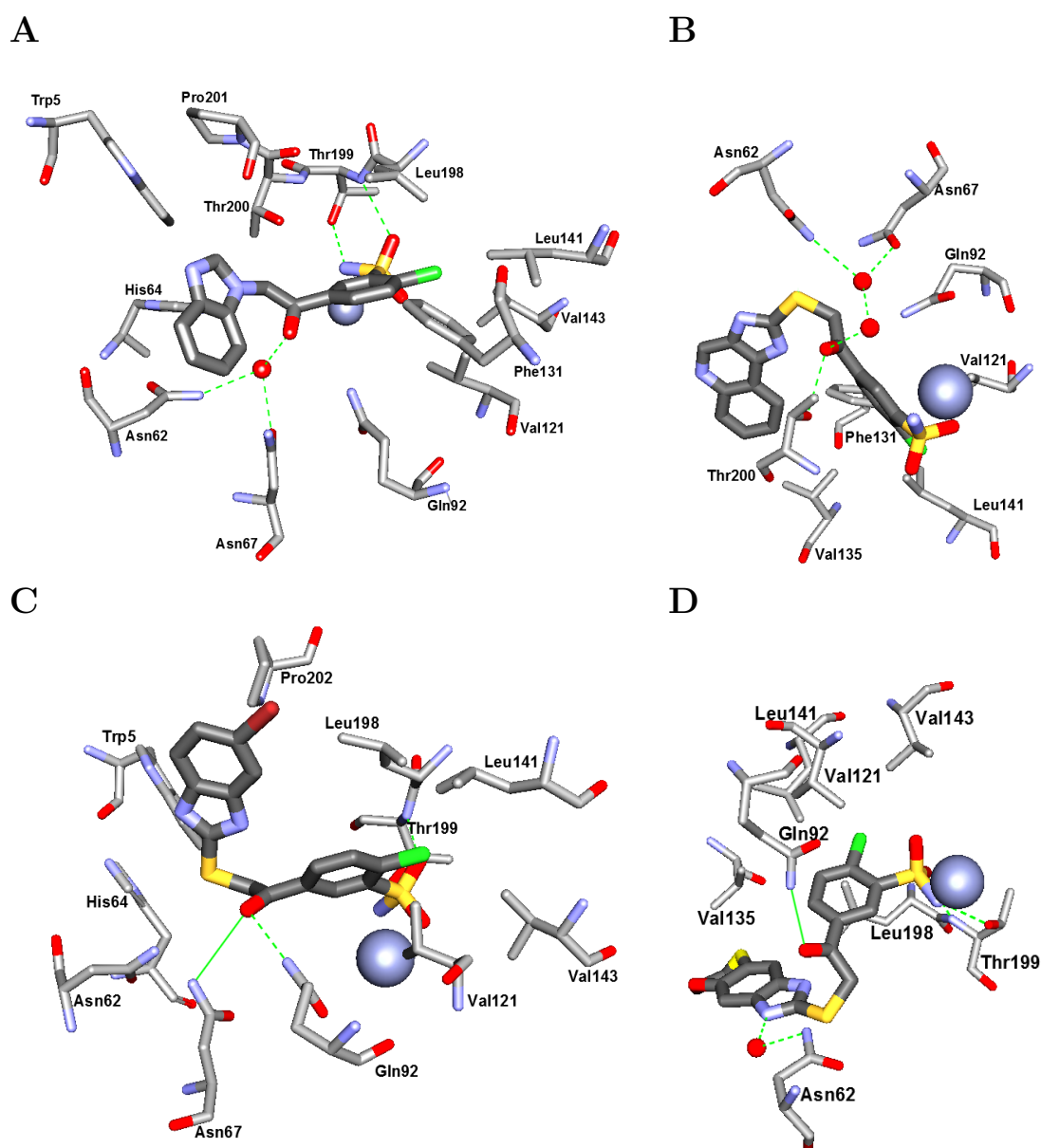


3.24 pav. CA II jungimosi su **28** junginiu ITC rezultatai: **A** – pirminiai duomenys, **B** – integruota kreivė.

Kelių CA II kompleksų su aptariamos klasės junginiais struktūros nustatytos kristalografiniais metodais (dr. S. Gražulio grupė, VU Biotechnologijos institutas, Baltymų–nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius). Kompleksuose matomų junginių benzeno žiedas, turintis sulfonamidinę grupę,

3.3. Naujų ligandų tyrimas

yra fiksuotos padėties, sulfonamidinė grupė sudaro klasikinius ryšius su Zn^{2+} ir Thr199, o chloro atomą apsupa hidrofobinių aminorūgščių kišenė, sudaryta iš Val121, Val143, Val207, Leu141 ir Leu198 (pav. 3.25). Junginių **17** ir **29–31** jungtuko tarp aromatinių žiedų karbonilo grupės deguonies atomas tiesiogiai arba per vandens molekulę sudaro vandenilinius ryšius su Asn67, Thr200, Gln92; heterociklinio žiedo padėtį fiksuoja His64 *in* konformacija; junginio **31** jungtuko sieros atomas sudaro van der Valso kontaktą su Asn62 (3.25 pav.).

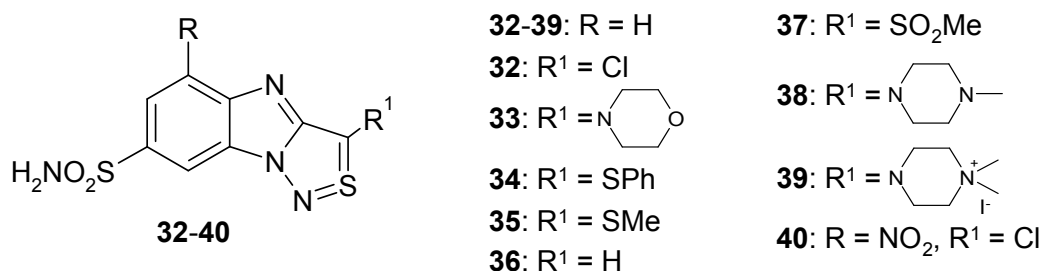


3.25 pav. Į indapamidą panašių junginių kompleksų su CA II kristalografinė analizė: **A** – junginys **17** (PDB ID 3M98), **B** – **31** (3MYQ), **C** – **29** (3M67), **D** – **30** (3M96).

Heterociklinį žiedą turinčios molekulės dalies padėtis visuose junginiuose, išskyrus **17**, yra labai panaši. Šis fragmentas dalyvauja van der Valso sąveikoje su šoninėmis baltymo aminorūgščių grandinėmis, kurios formuoja hidrofobinę ertmę (Phe131, Val135, Pro202, Leu198 ir Thr200). Junginio **17** benzimidazolo žiedas yra apsuptas Asn67, Asn62, His64, Trp5 ir Pro201 aminorūgščių šoninių grandinių. Junginys **17** nėra efektyvus CA II ligandas ($K_d = 1,6 \mu\text{M}$), o junginiai **29–31** su CA II jungiasi stipriau (K_d nuo 20 iki 60 nM).

3.3.3. [1,2-*c*][1,2,3]-tiadiazol-7-sulfonamidai

Junginiai, priklausantys [1,2-*c*][1,2,3]-tiadiazol-7-sulfonamidų klasei, buvo susintetinti VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje (dr. V. Dudutienė) [8*]. Šios junginių klasės esminis bruožas – nelanksti trijų žiedų sistema (3.26 pav.). Su Zn^{2+} jonu sąveikaujanti sulfonamidinė grupė yra prijungta prie benzeno žiedo, kuris sujungtas su dviejų heterociklinių žiedų sistema. Variabilus pakaitas R^1 , esantis trečiajame (tiadiazolo) žiede, dėl visos sistemos nejudrumo galėtų sudaryti sąveikas su gana fiksuota baltymo kišenės sritimi, o pakaitas R galėtų daryti įtaką bendrai heterociklinės sistemos orientacijai aktyviajame centre (3.26 pav.).



3.26 pav. Bendra [1,2-*c*][1,2,3]-tiadiazol-7-sulfonamidų struktūra.

Šių junginių sąveikos su žmogaus karboanhidrazėmis CA I, CA II ir CA IX disociacijos konstantų bei slopinimo konstantų palyginimas pateiktas 3.4 lentelėje. Disociacijos konstantos nustatytos dviem biofizikiniiais

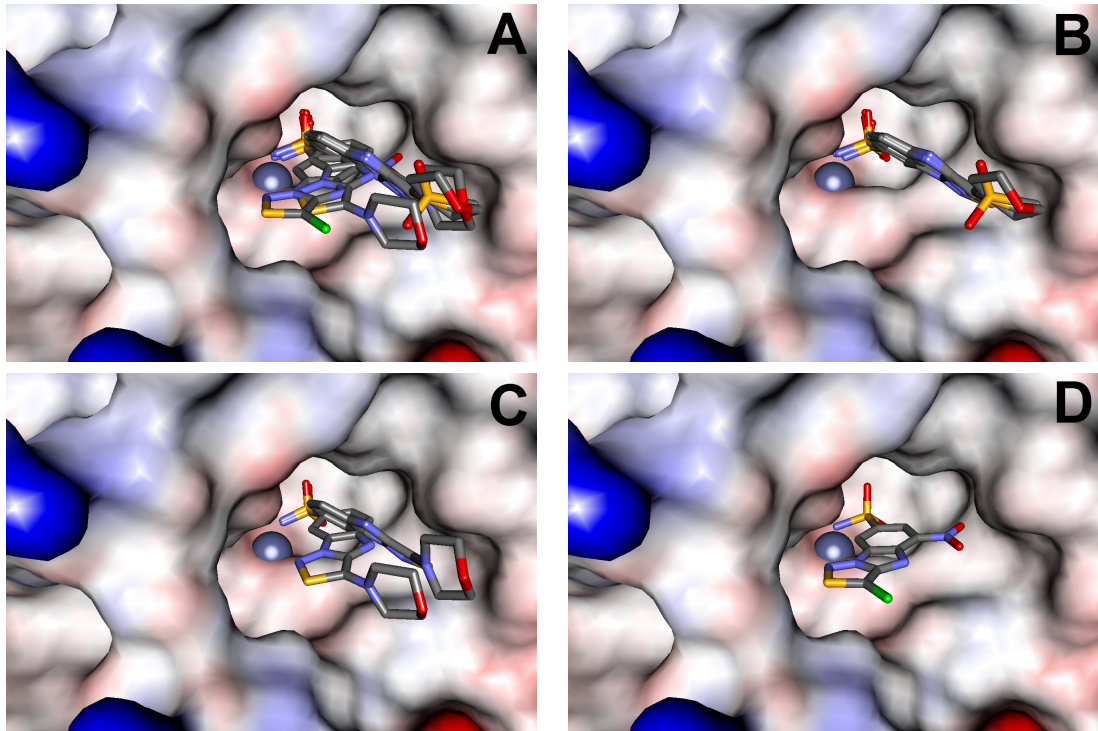
3.4 lentelė. Ligandų jungimosi prie CA I, CA II ir CA IX monomerinės (CA IX^M) bei dimerinės (CA IX^D) formų disociacijos ir inhibicijos konstantos (μM). Disociacijos konstantos nustatytos ITC ir TSA metodais, o inhibicijos konstanta – sustabdytos tėkmės CO₂ hidratacijos metodu.

Junginys	CA I			CA II			CA IX ^M	CA IX ^D	CA IX	
	K_d^{TSA}	K_d^{ITC}	K_i	K_d^{TSA}	K_d^{ITC}	K_i	K_d^{TSA}	K_d^{TSA}	K_d^{ITC}	K_i
32	0,82	0,84	0,66	0,19	0,41	0,033	0,85	0,22	0,22	1,00
33	0,17	0,39	0,21	0,07	0,18	0,009	3,0	0,27	0,59	0,21
34	0,02	ND	ND	0,038	ND	ND	0,89	0,044	ND	ND
35	0,13	0,40	0,15	0,05	0,054	0,057	1,5	0,17	0,63	0,51
36	2,0	2,6	2,1	0,20	0,22	0,46	1,4	0,35	0,26	0,72
37	0,13	0,27	ND	0,25	0,59	ND	1,5	0,64	0,12	ND
38	0,12	0,18	ND	0,33	0,09	ND	2,4	0,33	ND	ND
39	17	ND	ND	7,9	ND	ND	12	16	ND	ND
40	2,1	ND	ND	0,06	0,56	ND	1,7	0,33	ND	ND
AZM	1,4	0,78	0,25	0,017	0,018	0,012	0,12	0,11	ND	0,025

metodais – izoterminio titravimo kalorimetrija ir terminio poslinkio analizės metodu, o slopinimo konstantas išmatavo bendradarbiaujanti Italijos mokslininkų grupė CO₂ hidratacijos metodu, naudodama sustabdytos tėkmės metodiką [3*].

Dauguma tiriamos klasės junginių stipriausiai jungėsi su CA II (K_d 0,04–7,9 μM). Terminio poslinkio metodu nustatyta, kad dimerinė CA IX forma su ligandais jungėsi stipriau nei monomerinė. ITC ir fermentinio aktyvumo matavimai atlikti, neatskyrus skirtingų oligomerinių formų.

Tirtų junginių kompleksų su CA II struktūros parodė, kad, greta klasikinės sulfonamidinės grupės sąveikos su CA, likusi ligando molekulės dalis su baltymu daugiausiai sudaro van der Valso kontaktus arba sąveikauja per vandens molekules. Junginio **40**, kuris turi NO₂ grupę benzeno žiede, padėtis baltymo aktyviajame centre, kaip ir tikėtasi, skiriasi nuo dominuojančios junginių, kurių struktūroje R = H (3.26 pav.), pozicijos (3.27 pav.). **40** junginys su CA II sudaro vieną papildomą vandenilinį ryšį tarp tiadiazolo žiede arčiau S esančio N atomo ir Thr200 OH grupės. **33** junginio komplekso su CA II struktūroje matomos dvi junginio alternatyvios konformacijos (3.27 pav.).

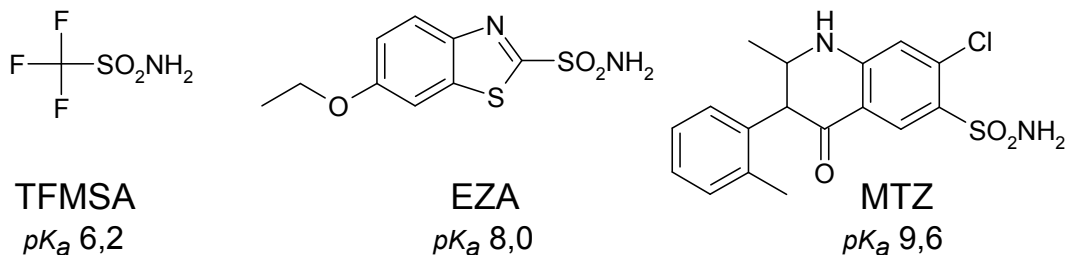


3.27 pav. [1,2-*c*][1,2,3]-tiadiazol-7-sulfonamidų klasės junginių orientacija CA II aktyviajame centre: **A** – junginių **33**, **35** (PDB ID 3HLJ), **37** ir **40** padėties aktyviajame centre palyginimas, **B** – dominuojanti heterociklinės sistemos padėtis, **C** – du alternatyvūs **33** jungimosi būdai, **D** – junginys **40**, greičiausiai dėl NO₂ grupės benzeno žiede, aktyviajame centre orientuotas kitaip nei šio pakaito neturintys junginiai.

3.4. CA XIII sąveikos su sulfonamidiniais slopikliais termodinaminė analizė

Tam, kad tiriamo junginio sąveikos su baltymu stiprumą galima būtų kiekybiškai susieti su jo struktūra, turi būti įvertinti būtent šią sąveiką aprašantys parametrai, t. y. nepriklausantys nuo, pvz., buferio sudėties, pH, kuriame atliekamas eksperimentas, ir kitų stebimiesiems parametrų įtaką darančių faktorių.

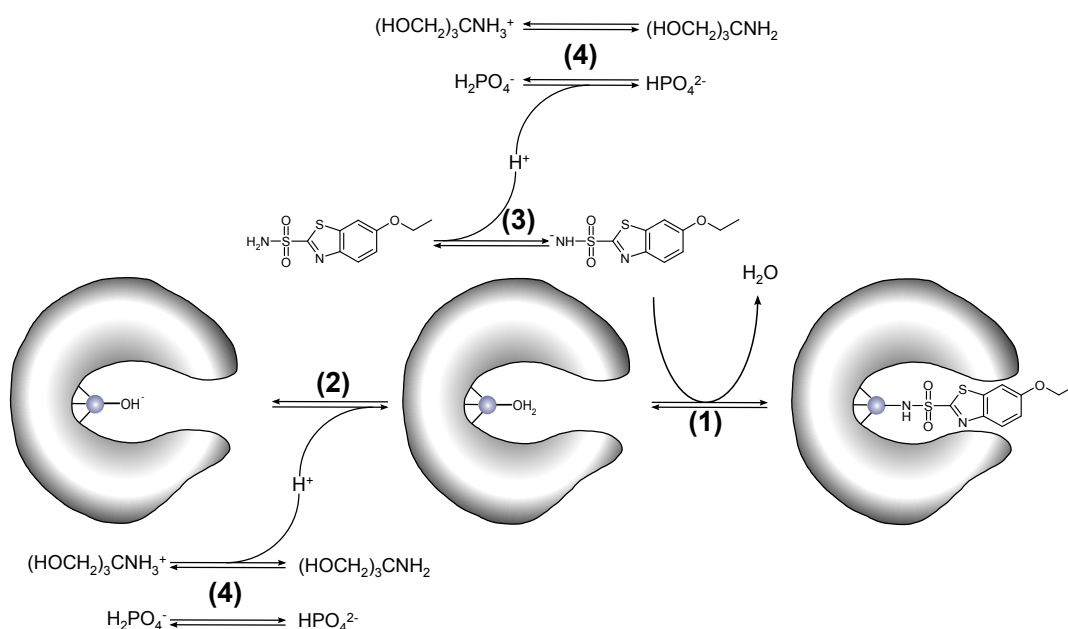
CA XIII sąveikos su sulfonamido grupę turinčiais slopikliais tyrimui atlikti [9*] pasirinkti trys ligandai: trifluormetansulfonamidas (TFMSA), etokzolamidas (EZA) ir metolazonas (MTZ), kurių sulfonamidinės grupės pK_a vertės labai skirtingos, atitinkamai: 5,9–6,3 [130, 131], 8,0–8,1 [132, 133] ir 9,6 [134] (3.28 pav.).



3.28 pav. CA XIII sąveikos su RSO_2NH_2 termodinamai tirti naudoti ligandai.

3.4.1. Susijusios reakcijos

Kai sulfonamidinis ligandas jungiasi su karboanhidraze, gali vykti mažiausiai keturios reakcijos (3.29 pav.):



3.29 pav. Karboanhidrazei jungiantis su sulfonamidinę grupę turinčiu ligandu (paveikslėlyje parodytas etokzolamido pavyzdys) vykstančios reakcijos. Skaičiais pažymėtos reakcijos išvardintos tekste.

- 1) tiesioginė deprotonuoto sulfonamido jungimosi su karboanhidraze reakcija, kai aktyviajame centre esantis Zn^{2+} jonas susijungęs su vandens molekule;
- 2) prie CA aktyviojo centro Zn^{2+} koordinuoto hidroksido jono protonizacija;
- 3) ligando sulfonamidinės grupės deprotonizacija;
- 4) buferio protonizacija ar deprotonizacija.

Tirdami šią reakciją ir ITC, ir TSA ar kitais biofizikiniais metodais, išmatuojame visų čia išvardintų procesų suminius termodinaminius parametrus (K_{b-steb} , ΔH_{steb}), tačiau struktūros ir aktyvumo sąryšiui nustatyti reikalingi, kaip jau minėta, tikrieji parametrai (K_b , ΔH_b).

3.4.2. Tikrosios jungimosi konstantos nustatymas

Tikroji jungimosi konstanta yra lygi stebimosios jungimosi konstantos ir aktyvių sąveikaujančių baltymo ir junginio formų frakcijų sandaugos santykiui:

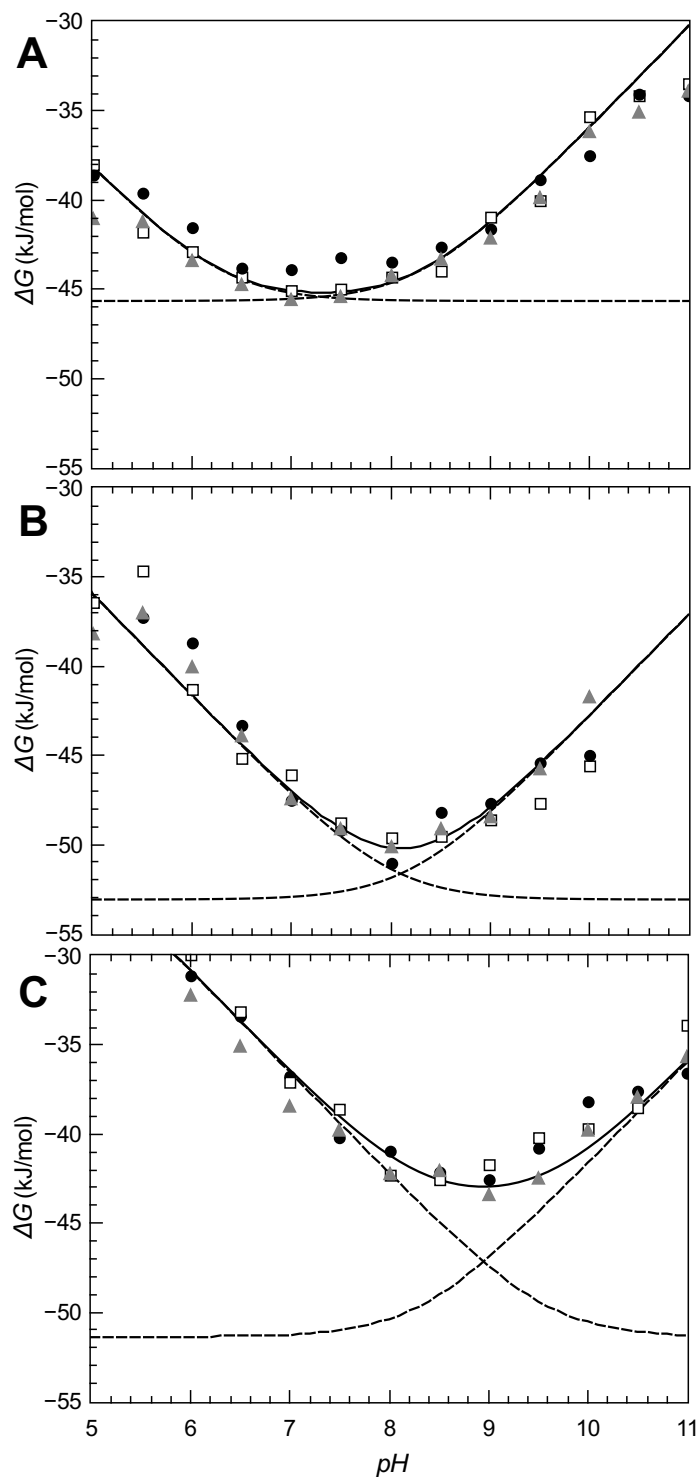
$$K_b = \frac{K_{b-steb}}{f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-} f_{\text{CAZnH}_2\text{O}}} \quad (3.12)$$

Deprotonizuoto sulfonamido ir protonizuotos CA frakcijos išreiškiamos:

$$f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-} = \frac{10^{pH-pK_a-\text{RSO}_2\text{NH}_2}}{1 + 10^{pH-pK_a-\text{RSO}_2\text{NH}_2}} \quad (3.13)$$

$$f_{\text{CAZnH}_2\text{O}} = 1 - \frac{10^{pH-pK_a-\text{CAZnH}_2\text{O}}}{1 + 10^{pH-pK_a-\text{CAZnH}_2\text{O}}} \quad (3.14)$$

Taigi stebimoji jungimosi konstanta priklauso nuo to, kokiam pH esant, atliekamas eksperimentas, kokia tiriamo junginio sulfonamidinės grupės pK_a ir kokia prie baltymo aktyviajame centre esančio Zn^{2+} koordinuotos vandens molekulės (CAZnH_2O) pK_a . Kai ligando sulfonamidinės grupės pK_a vertė maža (pvz., TFMSA atveju), tai $K_{b-steb} \approx K_b$. Kai ši vertė didesnė (pvz., EZA ar MTZ atveju), tai $K_{b-steb} < K_b$ (3.30 pav.).



3.30 pav. Stebimosios laisvosios Gibso energijos priklausomybė nuo pH, nustatyta ITC metodu TRIS buferyje (●), ITC metodu fosfatiniame buferyje (□), TSA metodu (▲). **A** – CA XIII ir TFMSA sąveika, **B** – CA XIII ir EZA, **C** – CA XIII ir MTZ.

3.4.3. Stebimosios entalpijos išskaidymas

Stebimoji jungimosi entalpija ΔH_{steb} (t. y. ta, kurią išmatuojame ITC metodu, tirdami karboanhidrazės sąveiką su sulfonamidiniu ligandu) yra visų (3.29 pav.) aprašytų procesų suma:

$$\Delta H_{steb} = \Delta H_b + n_{sulf} \Delta H_{\text{RSO}_2\text{NH}_2} + n_{CA} \Delta H_{\text{CAZnH}_2\text{O}} + n_{buf} \Delta H_{buf}, \quad (3.15)$$

čia:

ΔH_b – tikroji jungimosi entalpija;

$\Delta H_{\text{RSO}_2\text{NH}_2}$ – ligando sulfonamidinės grupės protonizacijos entalpija;

$n_{sulf} = f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-} - 1$ – reakcijos metu deprotonizuojant slopiklio sulfonamidinę grupę išlaisvinamų protonų skaičius;

$\Delta H_{\text{CAZnH}_2\text{O}}$ – su karboanhidrazės aktyviajame centre esančiu cinko jonu susijungusio hidroksido jono protonizacijos entalpija;

$n_{CA} = 1 - f_{\text{CAZnH}_2\text{O}}$ – reakcijos metu protonizuojamų CA aktyviajame centre su Zn^{2+} koordinuotų OH^- jonų skaičius;

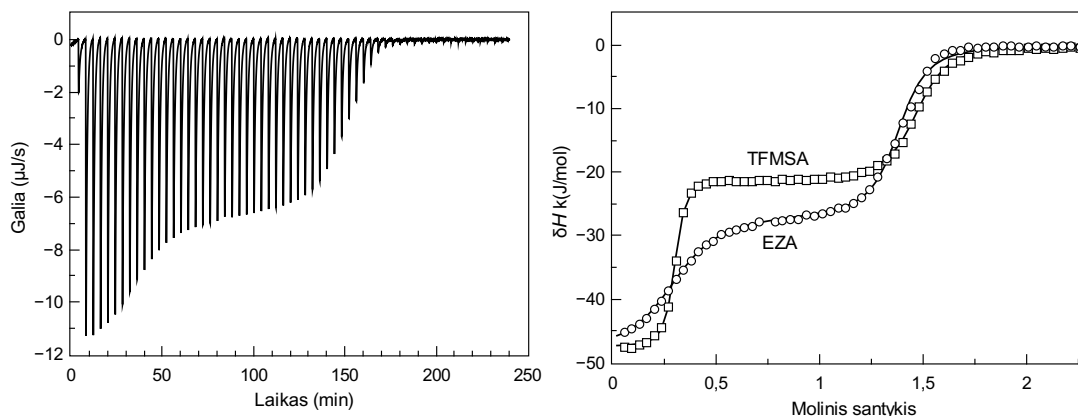
ΔH_{buf} – buferio protonizacijos entalpija;

$n_{buf} = -(f_{\text{RSO}_2\text{NH}_2} + f_{\text{CAZnH}_2\text{O}})$ – reakcijos metu buferio surišamų ar išskiriamų protonų skaičius.

Ligando pK_a ir ΔH nustatymas

Tiriamo ligando sulfonamidinės grupės pK_a vertė nustatoma potencio-metrinio titravimo rūgštimi ar šarmu metu. Šios grupės protonizacijos entalpija išmatuojama tą patį eksperimentą atliekant ITC metodu (3.31 pav.).

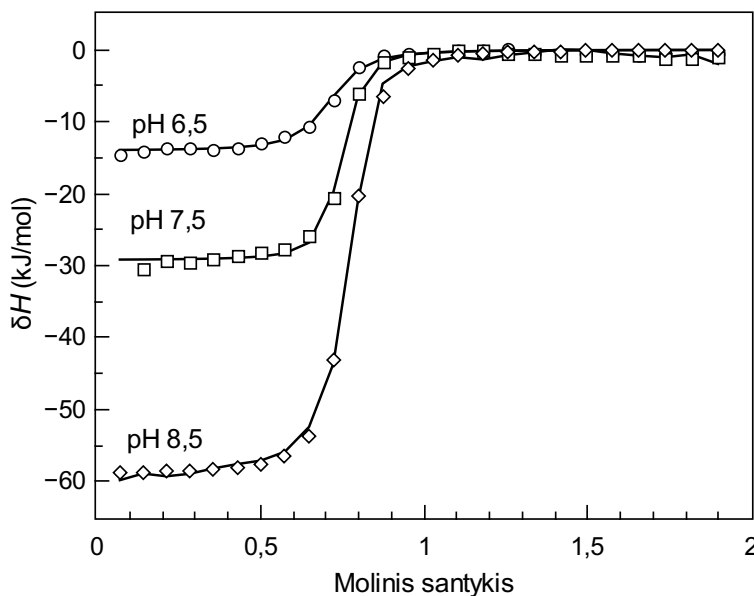
Etokzolamido pK_a vertė yra 8,0–8,1, nustatyta $\Delta H_{\text{CAZnH}_2\text{O}}$ yra -28,8 kJ/mol, trifluormetansulfonamido, atitinkamai – 5,9–6,3 ir -22,4 kJ/mol, metolazono – 9,6 ir -11,0 kJ/mol.



3.31 pav. Ligando sulfonamidinės grupės protonizacijos entalpijos nustatymas ITC metodu: **A** – EZA titravimas HNO_3 , esant 1,5 ekv. NaOH , pirminiai duomenys, **B** – EZA (\circ) ir TFMSA (\square) titravimas HNO_3 , esant 1,5 ekv. NaOH , integruoti duomenys. Iš pradžių (iki molinio santykio 0,5) vyksta $\text{NaOH} - \text{HNO}_3$ titravimas, po to titruojamas 1 ekv. junginio – ši, antroji, tranzicija atitinka sulfonamidinės grupės protonizacijos procesą.

pH įtaka stebimajai entalpijai

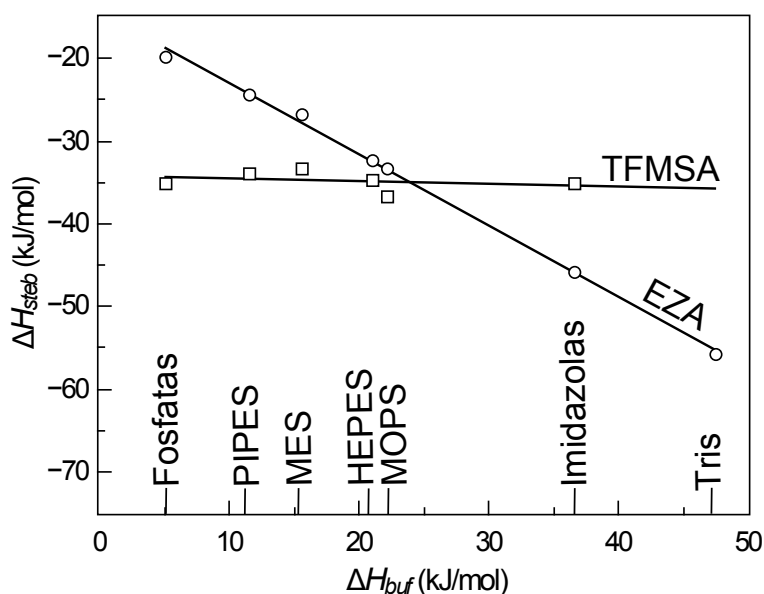
Kai kartu su jungimosi reakcija vyksta susijusios protonizacijos reakcijos, sistemos pH pakeitus vos vienu vienetu, stebimoji entalpija keičiasi labai stipriai. Pavyzdžiui, matuojant CA XIII jungimąsi su EZA fosfatiniame buferyje, esant pH 6,5, stebimoji entalpija yra ~ -14 kJ/mol, o kai pH pakeliame iki 8,5, – net ~ -60 kJ/mol (3.32 pav.).



3.32 pav. Integruotos ITC kreivės – CA XIII jungimasis su EZA fosfatiniame buferyje, esant 25°C temperatūrai ir skirtingiems pH: (\circ) – 6,5, (\square) – 7,5, (\diamond) – 8,5.

Buferio įtaka stebimajai entalpijai

Kai jungimosi metu vyksta susijusios protonizacijos reakcijos, stebimoji entalpija labai priklauso nuo to, kokiame buferyje atliekamas eksperimentas. Pavyzdžiui, vieno iš dažniausiai naudojamų buferių – tris – protonizacijos entalpija lygi $-47,4$ kJ/mol, esant 25 °C temperatūrai, o fosfatinio buferio – tik $-5,1$ kJ/mol. Buferio efektą iliustruoja 3.33 pav.: ITC metodu matuojant tos pačios reakcijos – CA XIII jungimosi su EZA arba TFMSA – stebimąją entalpiją, gaunamos labai skirtingos reikšmės, priklausančios nuo to, kokia medžiaga naudojama kaip buferis.



3.33 pav. Stebimosios jungimosi entalpijos priklausomybė nuo buferio deprotonacijos entalpijos. (□) – CA II jungimasis su TFMSA, (○) – jungimasis su EZA. Visais atvejais buferio koncentracija 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0, 25 °C. Neigiamas tiesės pokrypio kampas rodo, kad reakcijos metu protonai yra išskiriami į buferį.

Stebimosios entalpijos priklausomybė nuo buferio protonizacijos entalpijos yra tiesinė. Šios tiesės lygties ($y = ax + b$) a parametras atitinka 3.15 lygties parametrą n_{buf} tame pH, kuriame atliekamas eksperimentas (šiuo atveju – 7,0), o b parametras – nuo buferio nepriklausanti proceso entalpija šiame pH.

Nuo buferio nepriklausanti jungimosi entalpija, t. y. jeigu eksperimentas būtų atliekamas teoriniame buferyje, kurio protonizacijos entalpija ly-

gi nuliui, vis tiek priklausytų nuo pH dėl jau anksčiau minėtų priežasčių: kai $\text{pH} < pK_{a-\text{RSO}_2\text{NH}_2}$, tai vyksta ligando sulfonamidinės grupės deprotonizacija, o kai $\text{pH} > pK_{a-\text{CAZnH}_2\text{O}}$ – prie aktyviojo centro Zn^{2+} jono prisijungusio hidroksido jono protonizacija.

CAZnH₂O pK_a ir ΔH nustatymas

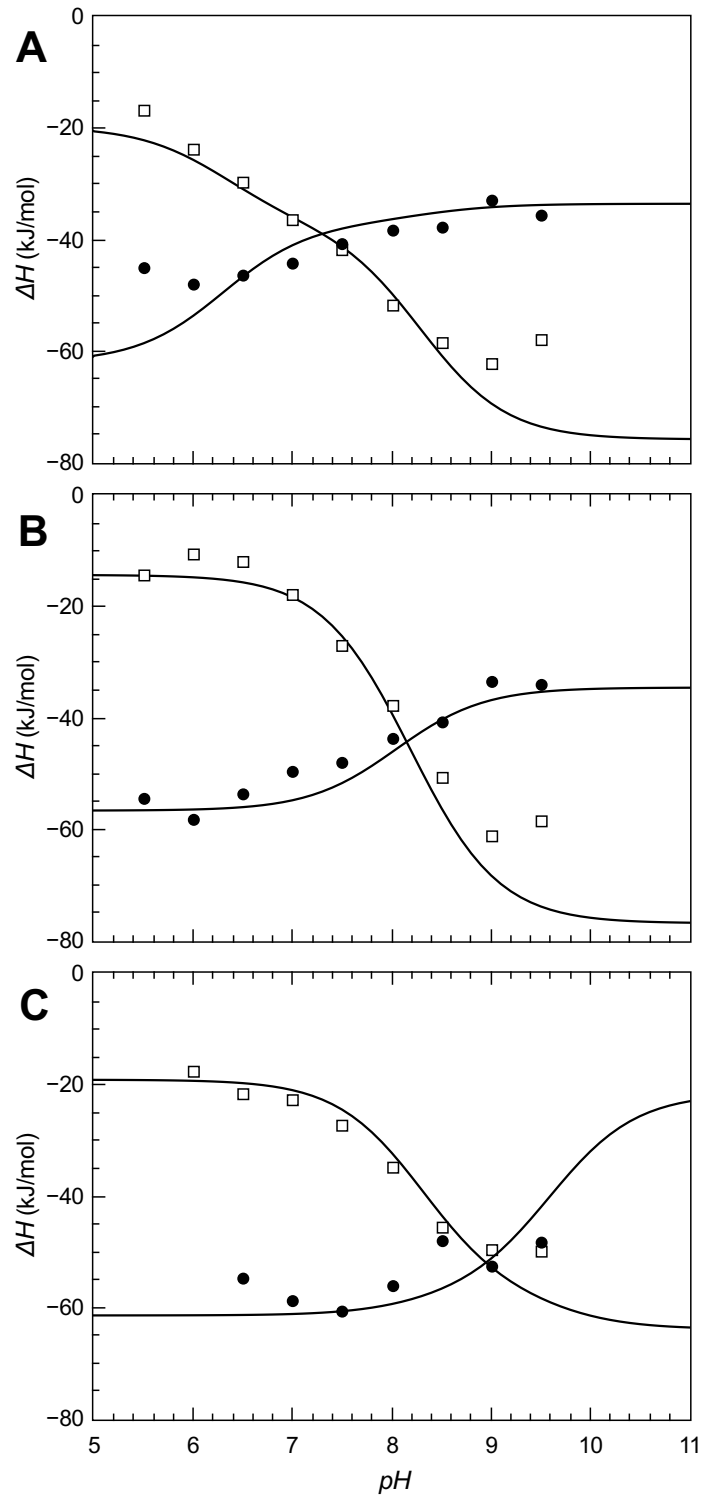
Skirtingai nuo ligando, CAZnH₂O pK_a vertės tiesiogiai nustatyti neįmanoma. Tam taikomas Baker ir Murphy [107] aprašytas būdas – ta pati reakcija ITC metodu matuojama plačiame pH intervale dviejuose, skirtingą buferio protonizacijos entalpiją turinčiuose, buferiuose (3.30, 3.34 pav.). Pagal gautą biotermodinaminių parametrų priklausomybę nuo pH, taikant 3.12 ir 3.15 lygtis, globalaus parametrų derinimo būdu apskaičiuojami trūkstami parametrai – CAZnH₂O pK_a ir ΔH vertės.

Gautos CA XIII baltymo vertės: CAZnH₂O $pK_a = 8,3$ ir protonizacijos $\Delta H = -44$ kJ/mol. Šiems baltymo parametrams nustatyti teko atlikti daug eksperimentų, tačiau vieną kartą juos nustatčius, toliau kitų ligandų jungimosi tikriesiems parametrams išskirti pakanka žinoti tiriamo junginio sulfonamidinės grupės pK_a , jo protonizacijos ΔH ir tai, kokiame buferyje (buferinė medžiaga, pH) atliekamas eksperimentas.

3.4.4. Tikrieji tirtų reakcijų termodinaminiai parametrai

Apibendrinant, šiame skyriuje tirtų trijų reakcijų – CA XIII jungimosi su TFMSA, EZA ir MTZ – gauti tikrieji parametrai pateikti 3.5 lentelėje. Pagal stebimąsias jungimosi konstantas EZA su CA XIII jungiasi stipriausiai (pvz., esant pH 7,0, $K_b = 7,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$), o MTZ – silpniausiai (esant pH 7,0, $K_b = 3,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), skirtumas tarp stebimųjų jungimosi konstantų yra apie 2000 kartų, o tikrosios jungimosi konstantos skiriasi tik 1,4 karto – tai labiausiai lemia skirtinga junginio sulfonamidinės grupės pK_a vertė.

Nustatyti tikrieji jungimosi parametrai (K_b ir ΔH) turėtų tiksliau ko-



3.34 pav. CA XIII sąveikos su sulfonamidiniu ligandu stebimoji entalpija: **A** – TFMSA, **B** – EZA, **C** – MTZ. (\square) žymi fosfatiniame buferyje atliekamą reakciją, (\bullet) – tris.

3.4. CA XIII sąveikos su sulfonamidiniais slopikliais termodinaminė analizė

3.5 lentelė. CA XIII jungimosi su TFMSA, EZA ir MTZ termodinaminiai parametrai bei pK_a vertės. Entalpija išreikšta kJ/mol, jungimosi konstantos – M.

	Junginio parametrai		Baltymo parametrai		Tikrieji jungimosi parametrai	
	pK_a	$\Delta H_{\text{RSO}_2\text{NH}_2}$	pK_a	$\Delta H_{\text{CAZnH}_2\text{O}}$	K_b	ΔH_b
TFMSA	6,2	-22,4			1×10^8	-37
EZA	8,0	-28,8	8,3	-44	$1,4 \times 10^9$	-38
MTZ	9,6	-11,0			1×10^9	-25

reliuoti su struktūriniais duomenimis (deja, šiuo metu baltymų struktūrų duomenų bazėje PDB nėra nė vieno iš tirtų ligandų kompleksų su CA XIII struktūros).

Išvados

1. Tirtos rekombinantinės žmogaus karboanhidrazių izoformos yra stabilios pH intervale 5–9, jų išsivyniojimo termodinaminių parametrų (ΔH , ΔC_p) vertės artimos literatūroje nurodomoms panašaus dydžio baltymų vertėms.
2. Rekombinantinė žmogaus CA IX tirpale egzistuoja kaip disulfidiniais ryšiais sutvirtintas dimeras.
3. Baltymo–ligando jungimąsi terminio poslinkio analizės metodu galima modeliuoti ne tik stebint baltymo stabilizaciją, bet ir destabilizaciją; destabilizaciją galima aprašyti kaip ligando jungimąsi prie išsivyniojusio baltymo.
4. Terminio poslinkio analizės eksperimento metu stebimą baltymo išsivyniojimo tranzicijų dvigubėjimą, kai baltymo yra daugiau negu ligando, galima aprašyti modeliu, kurio tranzicijos priklauso nuo baltymo įsotinimo ligandu proporcijos.
5. 4-[*N*-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamido dariniai, [1,2-*c*][1,2,3]-tiadiazol-7-sulfonamido dariniai, 2-chlor-5-{{(pakeisti 2-imidazolil)-sulfanil}acetil}benzensulfonamidai bei 2-chlor-5-[(2-pakeisti 1-benzimidazolil)acetil]benzensulfonamidai su žmogaus CA I, II, VII, IX ir XIII jungiasi panašiu arba geresniu giminingumu kaip vaistiniai karboanhidrazių slopikliai.
6. Pagal termodinaminio adityvumo principą nustatyti prie CA XIII aktyviajame centre esančio cinko jono koordinuoto hidroksido jono

parametrai (pK_a ir protonizacijos entalpija), kurie gali būti naudojami apskaičiuojant sąveikos su sulfonamidiniais ligandais tikruosius termodinaminius parametrus, kai žinomi stebimieji jungimosi parametrai.

Mokslinių darbų sąrašas

Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose ISI sąrašo žurnalų moksliniuose straipsniuose:

- [1*] E. Čapkauskaitė, **L. Baranauskienė**, D. Golovenko, E. Manakova, S. Gražulis, S. Tumkevičius, D. Matulis. (2010) Indapamide-like benzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrases I, II, VII, and XIII. *Bioorg Med Chem* 18:7357-64.
- [2*] J. Sūdžius, **L. Baranauskienė**, D. Golovenko, J. Matulienė, V. Michailovienė, J. Torresan, J. Jachno, R. Sukackaitė, E. Manakova, S. Gražulis, S. Tumkevičius, D. Matulis. (2010) 4-[N-(substituted 4-pyrimidinyl)amino]-benzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrase isozymes I, II, VII, and XIII. *Bioorg Med Chem* 18:7413-21.
- [3*] **L. Baranauskienė**, M. Hilvo, J. Matulienė, D. Golovenko, E. Manakova, V. Dudutienė, V. Michailovienė, J. Torresan, J. Jachno, S. Parkkila, A. Maresca, C.T. Supuran, S. Gražulis, D. Matulis. (2010) Inhibition and binding studies of carbonic anhydrase isozymes I, II and IX with benzimidazo[1,2-c][1,2,3]thiadiazole-7-sulphonamides. *J Enzyme Inhib Med Chem* 25:863-70.
- [4*] A. Zubriene, J. Matulienė, **L. Baranauskiene**, J. Jachno, J. Torresan, V. Michailoviene, P. Cimperman, D. Matulis. (2009) Measurement of nanomolar dissociation constants by titration calorimetry and thermal shift assay – radicicol binding to Hsp90 and ethoxzolamide binding to CAII. *Int J Mol Sci* 10:2662-80.
- [5*] M. Hilvo, **L. Baranauskiene**, A.M. Salzano, A. Scaloni, D. Matulis, A. Innocenti, A. Scozzafava, S.M. Monti, A. Di Fiore, G. De Simone, M. Lindfors, J. Jänis, J. Valjakka, S. Pastoreková, J. Pastorek, M.S. Kulomaa, H.R. Nordlund, C.T. Supuran, S. Parkkila. (2008) Biochemical characterization of CA IX: one of the most active carbonic anhydrase isozymes *J Biol Chem* 283: 27799-27809.
- [6*] P. Cimperman, **L. Baranauskienė**, S. Jachimovičiūtė, J. Jachno, J. Torresan, V. Michailovienė, J. Matulienė, J. Sereikaitė, V. Bumelis, D. Matulis. (2008) A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. *Biophys J* 95: 3222-3231.

- [7*] **L. Baranauskienė**, J. Matulienė, D. Matulis. (2008) Determination of the thermodynamics of carbonic anhydrase acid-unfolding by titration calorimetry. *J Biochem Biophys Methods* 70: 1043-1047.
- [8*] V. Dudutienė, **L. Baranauskienė**, D. Matulis. (2007) Benzimidazo[1,2-c][1,2,3]thiadiazole-7-sulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrase. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 3335-3338.

Ne ISI sąrašo žurnalų moksliniame straipsnyje:

- [9*] **L. Baranauskienė**, D. Matulis. (2012) Intrinsic thermodynamics of ethoxzolamide inhibitor binding to human carbonic anhydrase XIII. *BMC Biophysics* 5: 12.

Tarptautiniame patente:

- [1] D. Matulis, V. Dudutienė, J. Matulienė, **L. Mištinaitė**. Benzimidazo[1,2-c][1,2,3]thiadiazol-7-sulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrase and the intermediates for production thereof. EP2054420 ir WO/2008/016288.

Kitos publikacijos:

- [1] E. Čapkauskaitė, A. Zubrienė, **L. Baranauskienė**, G. Tamulaitienė, E. Manakova, V. Kairys, S. Gražulis, S. Tumkevičius, D. Matulis. (2012) Design of [(2-pyrimidinylthio)acetyl]benzenesulfonamides as inhibitors of human carbonic anhydrases. *Eur J Med Chem* 51, 259-270.
- [2] A. Zubriene, E. Kazlauskas, **L. Baranauskiene**, V. Petrauskas, D. Matulis. (2011) Isothermal titration calorimetry and thermal shift assay in drug design. *Eur Pharm Rev* 16:56-59.
- [3] **L. Baranauskiene**, V. Petrikaite, J. Matulienė, D. Matulis. (2009) Titration calorimetry standards and the precision of isothermal titration calorimetry data. *Int J Mol Sci* 10:2752-62.
- [4] M. Plečkaitytė, **L. Mištinaitė**, E. Mištinienė, G. Dienys, G. Žvirblis. (2005) Biochemical properties of Hsp70 chaperone system from *Meiothermus ruber*. *Biocatalysis and Biotransformation* 23: 191-200.

Tarptautinių konferencijų pranešimai¹:

- [1] 2012 birželio 26-29, Amsterdamas, Nyderlandai. The 13th Tetrahedron symposium. Synthesis of S-alkylated Benzimidazole and Imidazole Derivatives as Inhibitors of Carbonic Anhydrases. E. Čapkauskaitė, J. Gylytė, A. Zubrienė, **L. Baranauskienė**, A. Smirnov, D. Golovenko, E. Manakova, S. Gražulis, S. Tumkevičius, D. Matulis.
- [2] 2012 balandžio 11-15, Antalija, Turkija. The 9th International Conference on Carbonic Anhydrases. Design of [(2-Pyrimidinylthio)acetyl]benzenesulfonamides as inhibitors of human carbonic anhydrases. E. Čapkauskaitė, A. Zubrienė, **L. Baranauskienė**, E. Manakova, G. Tamulaitienė, J. Kazokaitė, V. Kairys, S. Gražulis, S. Tumkevičius, D. Matulis.
- [3] 2011 rugsėjo 7–10. Krajova, Rumunija. The 1st Central and Eastern European Conference on Thermal Analysis and Calorimetry. Drug Binding Energetics by Titration Calorimetry, Thermal and Pressure Shift Assay. A. Zubrienė, **L. Baranauskienė**, E. Kazlauskas, Z. Toleikis, D. Matulis.
- [4] 2011 liepos 31-rugpjūčio 4, Glasgas, Škotija. 23rd International Congress on Heterocyclic Chemistry. Synthesis of Pyrimidine Derivatives as Inhibitors of Carbonic Anhydrase. E. Čapkauskaitė, A. Zubrienė, **L. Baranauskienė**, G. Tamulaitienė, E. Manakova, S. Gražulis, S. Tumkevičius, D. Matulis.
- [5] 2011 birželio 22-24, Montecatini, Italija. FEBS satellite CA meeting. Inhibitor binding thermodynamics and stability characterization of human carbonic anhydrases. V. Jogaitė, A. Zubrienė, **L. Baranauskienė**, V. Dudutienė, E. Čapkauskaitė, V. Michailovienė, J. Gylytė, H. Šebėka, D. Matulis.
- [6] 2011 birželio 16-19, Tavira, Portugalija. 19th Biennial Meeting of the International Society for Molecular Recognition. Intrinsic Binding Parameters as a Necessity to Correlate Energetics with Structure. V. Petrauskas, A. Zubrienė, E. Kazlauskas, **L. Baranauskienė**, D. Matulis.
- [7] 2011 birželio 12-17 Oahu, JAV. The 66th Calorimetry Conference. Thermodynamics-structure correlations of drug lead binding to target proteins. A. Zubrienė, **L. Baranauskienė**, E. Kazlauskas, E. Čapkauskaitė, V. Dudutienė, Z. Toleikis, V. Jogaitė, R. Chaleckis, V. Michailovienė, J. Šližytė, J. Torresan, V. Petrikaitė, V. Petrauskas, J. Matulienė, D. Matulis.
- [8] 2011 balandžio 29-30, Splitas, Kroatija. COST TD0905. Towards the intrinsic lead binding thermodynamics. A. Zubrienė, E. Kazlauskas, **L. Baranauskienė**, V. Petrauskas, D. Matulis.
- [9] 2010 birželio 27 Ryga, Latvija. International Conference on Organic Synthesis. Synthesis of benzimidazole derivatives as inhibitors of carbonic anhydrases. E. Čapkauskaitė, **L. Baranauskienė**, D. Golovenko, E. Manakova, S. Gražulis, S. Tumkevičius, D. Matulis.

¹Pabraukta pavardė žymi konferencijas, kuriose dalyvavau pati.

- [10] 2010 lapkričio 22-25, Brno, Čekija. COST Action TD0905 Epigenetics – Bench to Bedside. Drug Binding Energetics by Titration Calorimetry, Thermal and Pressure Shift Assay. A. Zubrienė, **L. Baranauskienė**, E. Kazlauskas, Z. Toleikis, R. Chaleckis, V. Michailovienė, V. Petrikaitė, E. Čapkauskaitė, V. Dudutienė, J. Matulienė, D. Matulis.
- [11] 2010 birželio 27, Bergenas, Norvegija. International Conference on Organic Synthesis. Synthesis of Benzimidazole Derivatives as Inhibitors of Carbonic Anhydrases. E. Čapkauskaitė, **L. Baranauskienė**, D. Golovenko, E. Manakova, S. Gražulis, S. Tumkevičius, D. Matulis.
- [12] 2009 rugsėjo 16-19 d., Florencija, Italija. The 8th International Conference on the Carbonic Anhydrases. Carbonic anhydrase ligand binding by thermal shift assay and titration calorimetry. **L. Baranauskienė**, J. Sūdžius, V. Michailovienė, J. Matulienė, S. Tumkevičius, D. Matulis.
- [13] 2009 liepos 11-15 Genuja, Italija. European Biophysics Congress. Determination of protein-ligand binding thermodynamics by thermal shift assay. P. Cimpmperman, A. Zubrienė, **L. Baranauskienė**, E. Kazlauskas, J. Matulienė, D. Matulis.
- [14] 2009 kovo 29-31, Budapeštas, Vengrija. INSTRUCT meeting. Carbonic anhydrase and Hsp90 inhibitor binding measurements by thermal shift assay, titration calorimetry, and x-ray crystallography. **L. Baranauskienė**, E. Kazlauskas, I. Cikotienė, J. Matulienė, A. Zubrienė, J. Jachno, J. Torresan, V. Michailovienė, P. Cimpmperman, S. Gražulis, D. Matulis.
- [15] 2008 Rugsėjo 24-26, Vilnius, Lietuva. 7th ScanBalt Forum & Biomaterial Days. Novel thiadiazoles inhibitors of human carbonic anhydrases. S. Gražulis, **L. Baranauskienė**, E. Manakova, R. Sukackaitė, D. Golovenko, G. Tamulaitienė, D. Matulis.
- [16] 2008 Rugsėjo 24-26, Vilnius, Lietuva. 7th ScanBalt Forum & Biomaterial Days. Chaperone Hsp90 and carbonic anhydrase IX inhibitors as anticancer agents. D. Matulis, E. Kazlauskas, **L. Baranauskienė**, I. Čikotienė, V. Dudutienė, J. Matulienė, A. Zubrienė, J. Jachno, J. Torresan, V. Michailovienė, P. Cimpmperman, D. Lingè, M. Zaveckas, V. Petrikaitė, H. Šebėka, L. Grinius.
- [17] 2008 Rugpjūčio 23-31, Osaka, Japonija. XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography. Novel thiadiazoles inhibitors of human carbonic anhydrases. S. Gražulis, **L. Baranauskienė**, E. Manakova, R. Sukackaitė, D. Golovenko, G. Tamulaitienė, D. Matulis.
- [18] 2008 Vasario 21-22, Frankfurtas prie Maino, Vokietija 2nd International Symposium on Biothermodynamics. A general model to describe protein thermal stabilization and destabilization by ligands. P. Cimpmperman, **L. Baranauskienė**, J. Matulienė, D. Matulis.

-
- [19] 2007 kovo 3-7 d., Baltimore, JAV. Biophysical Society 51st Annual Meeting. Thermodynamics of Carbonic Anhydrase Acid Unfolding by Titration Calorimetry – Heat Capacity Dependence on Temperature. **L. Baranauskienė**, J. Matulienė, D. Matulis
- [20] 2006 m. Spalio 26-29 d., St. Augustine, JAV. The 7th international conference on the carbonic anhydrases: CA research in the postgenomic era. **L. Mištinaitė**, V. Dudutienė, J. Vanagel, J. Matulienė, D. Matulis: Benziimidazo [1,2-*c*] [1,2,3] thiadiazole sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors.

Finansinė parama

Disertacijoje aprašyti darbai buvo iš dalies finansuoti šių projektų lėšomis:

EEE–Norvegijos grantas: „Priešvėžinių junginių kūrimas struktūrinės biotermodinamikos metodais“ (2008–2010 m.);

LVMSF grantas: „Junginių, specifiskai slopinančių žmogaus karboanhidrazes, paieška biotechnologiniais metodais“ (2005–2009 m.);

FP6 Marie Curie grantas: „Vaistų kūrimas struktūrinės biotermodinamikos metodais“ (2004–2006 m.).

Literatūra

- [1] Supuran, C.T. Carbonic anhydrases—an overview. *Curr Pharm Des*, vol. 14, (2008), pp. 603–14.
- [2] Gilmour, K.M. Perspectives on carbonic anhydrase. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, vol. 157, (2010), pp. 193–197.
- [3] Brinkman, R. The occurrence of carbonic anhydrase in lower marine animals. *J Physiol*, vol. 80, (1933), pp. 171–173.
- [4] Ho, C. and Sturtevant, J.M. The kinetics of the hydration of carbon dioxide at 25 degrees. *J Biol Chem*, vol. 238, (1963), pp. 3499–3501.
- [5] Hassan, M.I.; Shajee, B.; Waheed, A.; Ahmad, F.; and Sly, W.S. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg Med Chem*.
- [6] Tripp, B.C.; Smith, K.; and Ferry, J.G. Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *J Biol Chem*, vol. 276, (2001), pp. 48615–8.
- [7] Liljas, A. and Laurberg, M. A wheel invented three times. The molecular structures of the three carbonic anhydrases. *EMBO Rep.*, vol. 1, (2000), pp. 16–7.
- [8] Zimmerman, S.A. and Ferry, J.G. The beta and gamma classes of carbonic anhydrase. *Curr Pharm Des*, vol. 14, (2008), pp. 716–21.
- [9] Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms. *Mol Divers*, vol. 15, (2011), pp. 305–316.
- [10] Hilvo, M.; Innocenti, A.; Monti, S.M.; De Simone, G.; Supuran, C.T.; and Parkkila, S. Recent advances in research on the most novel carbonic anhydrases, CA XIII and XV. *Curr Pharm Des*, vol. 14, (2008), pp. 672–8.
- [11] Supuran, C.T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov*, vol. 7, (2008), pp. 168–181.
- [12] Alterio, V.; Fiore, A.D.; D’Ambrosio, K.; Supuran, C.T.; and Simone, G.D. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem Rev*, vol. 112, (2012), pp. 4421–4468.

- [13] Alterio, V.; Langella, E.; Viparelli, F.; Vullo, D.; Ascione, G.; Dathan, N.A.; Morel, F.M.M.; Supuran, C.T.; De Simone, G.; and Monti, S.M. Structural and inhibition insights into carbonic anhydrase CDCA1 from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Biochimie*, vol. 94, (2012), pp. 1232–1241.
- [14] Purkerson, J.M. and Schwartz, G.J. The role of carbonic anhydrases in renal physiology. *Kidney Int*, vol. 71, (2007), pp. 103–15.
- [15] Breton, S. The cellular physiology of carbonic anhydrases. *Jop*, vol. 2, (2001), pp. 159–64.
- [16] Hilvo, M.; Baranauskiene, L.; Salzano, A.M.; Scaloni, A.; Matulis, D.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Monti, S.M.; Di Fiore, A.; De Simone, G.; Lindfors, M.; Janis, J.; Valjakka, J.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Kulomaa, M.S.; Nordlund, H.R.; Supuran, C.T.; and Parkkila, S. Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J Biol Chem*, vol. 283, (2008), pp. 27799–809.
- [17] Sly, W.S. and Hu, P.Y. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem*, vol. 64, (1995), pp. 375–401.
- [18] Boron, W.F. Evaluating the role of carbonic anhydrases in the transport of HCO₃-related species. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1804, (2010), pp. 410–421.
- [19] McDevitt, M.E. and Lambert, L.A. Molecular evolution and selection pressure in alpha-class carbonic anhydrase family members. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1814, (2011), pp. 1854–1861.
- [20] Nishimori, I.; Minakuchi, T.; Onishi, S.; Vullo, D.; Cecchi, A.; Scozzafava, A.; and Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: cloning, characterization, and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with sulfonamides. *Bioorg Med Chem*, vol. 15, (2007), pp. 7229–36.
- [21] Harju, A.K.; Bootorabi, F.; Kuuslahti, M.; Supuran, C.T.; and Parkkila, S. Carbonic anhydrase III: A neglected isozyme is stepping into the limelight. *J Enzyme Inhib Med Chem*.
- [22] Koester, M.K.; Pullan, L.M.; and Noltmann, E.A. The p-nitrophenyl phosphatase activity of muscle carbonic anhydrase. *Arch Biochem Biophys*, vol. 211, (1981), pp. 632–642.
- [23] Mitterberger, M.C.; Kim, G.; Rostek, U.; Levine, R.L.; and Zwerschke, W. Carbonic anhydrase III regulates peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2. *Exp Cell Res*, vol. 318, (2012), pp. 877–886.
- [24] Di Fiore, A.; Truppo, E.; Supuran, C.T.; Alterio, V.; Dathan, N.; Bootorabi, F.; Parkkila, S.; Monti, S.M.; and De Simone, G. Crystal structure of the C183S/C217S mutant of human CA VII in complex with acetazolamide. *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 20, (2010), pp. 5023–5026.

- [25] Bootorabi, F.; Jänis, J.; Smith, E.; Waheed, A.; Kukkurainen, S.; Hytönen, V.; Valjakka, J.; Supuran, C.T.; Vullo, D.; Sly, W.S.; and Parkkila, S. Analysis of a shortened form of human carbonic anhydrase VII expressed in vitro compared to the full-length enzyme. *Biochimie*, vol. 92, (2010), pp. 1072–1080.
- [26] Lehtonen, J.; Shen, B.; Vihinen, M.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T.; Parkkila, A.K.; Saarnio, J.; Kivela, A.J.; Waheed, A.; Sly, W.S.; and Parkkila, S. Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *J Biol Chem*, vol. 279, (2004), pp. 2719–27.
- [27] Lehtonen, J.M.; Parkkila, S.; Vullo, D.; Casini, A.; Scozzafava, A.; and Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isozyme XIII with aromatic and heterocyclic sulfonamides: a novel target for the drug design. *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 14, (2004), pp. 3757–62.
- [28] Waheed, A.; Okuyama, T.; Heyduk, T.; and Sly, W.S. Carbonic anhydrase IV: purification of a secretory form of the recombinant human enzyme and identification of the positions and importance of its disulfide bonds. *Arch Biochem Biophys*, vol. 333, (1996), pp. 432–8.
- [29] Sterling, D.; Alvarez, B.V.; and Casey, J.R. The extracellular component of a transport metabolon. Extracellular loop 4 of the human AE1 Cl⁻/HCO₃⁻-exchanger binds carbonic anhydrase IV. *J Biol Chem*, vol. 277, (2002), pp. 25239–25246.
- [30] Baird, T. T., J.; Waheed, A.; Okuyama, T.; Sly, W.S.; and Fierke, C.A. Catalysis and inhibition of human carbonic anhydrase IV. *Biochemistry*, vol. 36, (1997), pp. 2669–78.
- [31] Chandrashekar, J.; Yarmolinsky, D.; von Buchholtz, L.; Oka, Y.; Sly, W.; Ryba, N.J.P.; and Zuker, C.S. The taste of carbonation. *Science*, vol. 326, (2009), pp. 443–445.
- [32] Shah, G.N.; Hewett-Emmett, D.; Grubb, J.H.; Migas, M.C.; Fleming, R.E.; Waheed, A.; and Sly, W.S. Mitochondrial carbonic anhydrase CA VB: differences in tissue distribution and pattern of evolution from those of CA VA suggest distinct physiological roles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, (2000), pp. 1677–1682.
- [33] Nishimori, I.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; and Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: the inhibition profiles of the human mitochondrial isoforms VA and VB with anions are very different. *Bioorg Med Chem*, vol. 15, (2007), pp. 6742–6747.
- [34] De Simone, G.; Di Fiore, A.; and Supuran, C.T. Are carbonic anhydrase inhibitors suitable for obtaining antiobesity drugs? *Curr Pharm Des*, vol. 14, (2008), pp. 655–60.
- [35] Supuran, C.T.; Di Fiore, A.; and De Simone, G. Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity. *Expert Opin Emerg Drugs*, vol. 13, (2008), pp. 383–392.

- [36] Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity. *Expert Opin Emerg Drugs*, vol. 17, (2012), pp. 11–15.
- [37] Lakkis, M.M.; Bergenheim, N.C.; and Tashian, R.E. Expression of mouse carbonic anhydrase VII in *E. coli* and demonstration of its CO₂ hydrase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 226, (1996), pp. 268–72.
- [38] Pilka, E.S.; Kochan, G.; Oppermann, U.; and Yue, W.W. Crystal structure of the secretory isozyme of mammalian carbonic anhydrases CA VI: implications for biological assembly and inhibitor development. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 419, (2012), pp. 485–489.
- [39] Pastoreková, S.; Zavadová, Z.; Kostál, M.; Babusíková, O.; and Závada, J. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology*, vol. 187, (1992), pp. 620–626.
- [40] De Simone, G. and Supuran, C.T. Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1804, (2010), pp. 404–409.
- [41] Alterio, V.; Hilvo, M.; Di Fiore, A.; Supuran, C.T.; Pan, P.; Parkkila, S.; Scaloni, A.; Pastorek, J.; Pastorekova, S.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Monti, S.M.; and De Simone, G. Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, (2009), pp. 16233–8.
- [42] Kaluz, S.; Kaluzova, M.; Liao, S.Y.; Lerman, M.; and Stanbridge, E.J. Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim Biophys Acta*, vol. 1795, (2009), pp. 162–72.
- [43] McDonald, P.C.; Winum, J.Y.; Supuran, C.T.; and Dedhar, S. Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. *Oncotarget*, vol. 3, (2012), pp. 84–97.
- [44] Supuran, C.T. Inhibition of carbonic anhydrase IX as a novel anticancer mechanism. *World J Clin Oncol*, vol. 3, (2012), pp. 98–103.
- [45] Picaud, S.S.; Muniz, J.R.; Kramm, A.; Pilka, E.S.; Kochan, G.; Oppermann, U.; and Yue, W.W. Crystal structure of human carbonic anhydrase-related protein VIII reveals the basis for catalytic silencing. *Proteins*, vol. 76, (2009), pp. 507–511.
- [46] Aspatwar, A.; Tolvanen, M.E.E.; Ortutay, C.; and Parkkila, S. Carbonic Anhydrase Related Protein VIII and its Role in Neurodegeneration and Cancer. *Curr Pharm Des*, vol. 16, (2010), pp. 3264–3276.
- [47] Taniuchi, K.; Nishimori, I.; Takeuchi, T.; Ohtsuki, Y.; and Onishi, S. cDNA cloning and developmental expression of murine carbonic anhydrase-related proteins VIII, X, and XI. *Brain Res Mol Brain Res*, vol. 109, (2002), pp. 207–215.

- [48] Whittington, D.A.; Waheed, A.; Ulmasov, B.; Shah, G.N.; Grubb, J.H.; Sly, W.S.; and Christianson, D.W. Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, (2001), pp. 9545–50.
- [49] Hynninen, P.; Parkkila, S.; Huhtala, H.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Waheed, A.; Sly, W.S.; and Tomas, E. Carbonic anhydrase isozymes II, IX, and XII in uterine tumors. *APMIS*, vol. 120, (2012), pp. 117–129.
- [50] Pastorekova, S.; Zatovicova, M.; and Pastorek, J. Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition. *Curr Pharm Des*, vol. 14, (2008), pp. 685–98.
- [51] Fujikawa-Adachi, K.; Nishimori, I.; Taguchi, T.; and Onishi, S. Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1. *Genomics*, vol. 61, (1999), pp. 74–81.
- [52] Whittington, D.A.; Grubb, J.H.; Waheed, A.; Shah, G.N.; Sly, W.S.; and Christianson, D.W. Expression, assay, and structure of the extracellular domain of murine carbonic anhydrase XIV: implications for selective inhibition of membrane-associated isozymes. *J Biol Chem*, vol. 279, (2004), pp. 7223–8.
- [53] Hilvo, M.; Supuran, C.T.; and Parkkila, S. Characterization and inhibition of the recently discovered carbonic anhydrase isoforms CA XIII, XIV and XV. *Curr Top Med Chem*, vol. 7, (2007), pp. 893–9.
- [54] Liljas, A.; Kannan, K.K.; Bergstén, P.C.; Waara, I.; Fridborg, K.; Strandberg, B.; Carlbom, U.; Järup, L.; Lövgren, S.; and Petef, M. Crystal structure of human carbonic anhydrase C. *Nat New Biol*, vol. 235, (1972), pp. 131–137.
- [55] Behnke, C.A.; Trong, I.L.; Godden, J.W.; Merritt, E.A.; Teller, D.C.; Bajorath, J.; and Stenkamp, R.E. Atomic resolution studies of carbonic anhydrase II. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. 66, (2010), pp. 616–627.
- [56] Snyder, P.W.; Mecinovic, J.; Moustakas, D.T.; Thomas, 3rd, S.W.; Harder, M.; Mack, E.T.; Lockett, M.R.; Héroux, A.; Sherman, W.; and Whitesides, G.M. Mechanism of the hydrophobic effect in the biomolecular recognition of arylsulfonamides by carbonic anhydrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, (2011), pp. 17889–17894.
- [57] Domsic, J.F. and McKenna, R. Sequestration of carbon dioxide by the hydrophobic pocket of the carbonic anhydrases. *Biochim Biophys Acta*.
- [58] Mikulski, R.L. and Silverman, D.N. Proton transfer in catalysis and the role of proton shuttles in carbonic anhydrase. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1804, (2010), pp. 422–426.

- [59] Silverman, D.N. and Lindskog, S. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase: implications of a rate-limiting proteolysis of water. *Acc Chem Res*, vol. 21, (1988), pp. 30–36.
- [60] Lindskog, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther*, vol. 74, (1997), pp. 1–20.
- [61] Becker, H.M.; Klier, M.; Schüler, C.; McKenna, R.; and Deitmer, J.W. Intramolecular proton shuttle supports not only catalytic but also noncatalytic function of carbonic anhydrase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, (2011), pp. 3071–3076.
- [62] Maupin, C.M. and Voth, G.A. Preferred orientations of His64 in human carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, vol. 46, (2007), pp. 2938–2947.
- [63] Durdagi, S.; Şentürk, M.; Ekinçi, D.; Balaydın, H.T.; Göksu, S.; Küfrevioğlu, .r.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; and Supuran, C.T. Kinetic and docking studies of phenol-based inhibitors of carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII evidence a new binding mode within the enzyme active site. *Bioorg Med Chem*, vol. 19, (2011), pp. 1381–1389.
- [64] Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 20, (2010), pp. 3467–3474.
- [65] Husain, A. and Madhesia, D. Heterocyclic compounds as carbonic anhydrase inhibitor. *J Enzyme Inhib Med Chem*.
- [66] Winum, J.Y.; Scozzafava, A.; Montero, J.L.; and Supuran, C.T. Therapeutic potential of sulfamides as enzyme inhibitors. *Med Res Rev*, vol. 26, (2006), pp. 767–92.
- [67] Temperini, C.; Scozzafava, A.; and Supuran, C.T. Carbonic anhydrase activation and the drug design. *Curr Pharm Des*, vol. 14, (2008), pp. 708–15.
- [68] Abdo, M.R.; Vullo, D.; Saada, M.C.; Montero, J.L.; Scozzafava, A.; Winum, J.Y.; and Supuran, C.T. Carbonic anhydrase activators: activation of human isozymes I, II and IX with phenylsulfonylhydrazido l-histidine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 19, (2009), pp. 2440–3.
- [69] Nishimori, I.; Onishi, S.; Takeuchi, H.; and Supuran, C.T. The alpha and beta classes carbonic anhydrases from *Helicobacter pylori* as novel drug targets. *Curr Pharm Des*, vol. 14, (2008), pp. 622–30.
- [70] Krungkrai, J. and Supuran, C.T. The alpha-carbonic anhydrase from the malaria parasite and its inhibition. *Curr Pharm Des*, vol. 14, (2008), pp. 631–40.
- [71] Innocenti, A.; Mühlischlegel, F.A.; Hall, R.A.; Steegborn, C.; Scozzafava, A.; and Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the beta-class enzymes from the fungal pathogens *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with simple anions. *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 18, (2008), pp. 5066–5070.

- [72] Carta, F.; Scozzafava, A.; and Supuran, C.T. Sulfonamides: a patent review (2008 - 2012). *Expert Opin Ther Pat*, vol. 22, (2012), pp. 747–758.
- [73] Ozawa, Y.; Kusano, K.; Owa, T.; Yokoi, A.; Asada, M.; and Yoshimatsu, K. Therapeutic potential and molecular mechanism of a novel sulfonamide anticancer drug, indisulam (E7070) in combination with CPT-11 for cancer treatment. *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 69, (2012), pp. 1353–1362.
- [74] Carta, F.; Supuran, C.T.; and Scozzafava, A. Novel therapies for glaucoma: a patent review 2007 - 2011. *Expert Opin Ther Pat*, vol. 22, (2012), pp. 79–88.
- [75] Iester, M. Brinzolamide. *Expert Opin Pharmacother*, vol. 9, (2008), pp. 653–62.
- [76] Aggarwal, M. and McKenna, R. Update on carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008 - 2011). *Expert Opin Ther Pat*.
- [77] Shank, R.P.; Smith-Swintosky, V.L.; and Maryanoff, B.E. Carbonic anhydrase inhibition. Insight into the characteristics of zonisamide, topiramate, and the sulfamide cognate of topiramate. *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 23, (2008), pp. 271–276.
- [78] Stillebroer, A.B.; Mulders, P.F.A.; Boerman, O.C.; Oyen, W.J.G.; and Oosterwijk, E. Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: implications for prognosis, diagnosis, and therapy. *Eur Urol*, vol. 58, (2010), pp. 75–83.
- [79] Gatenby, R.A. and Gillies, R.J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, vol. 4, (2004), pp. 891–899.
- [80] De Simone, G.; Vitale, R.M.; Di Fiore, A.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Montero, J.L.; Winum, J.Y.; and Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: Hypoxia-activatable sulfonamides incorporating disulfide bonds that target the tumor-associated isoform IX. *J. Med. Chem.*, vol. 49, (2006), pp. 5544–51.
- [81] D’Ambrosio, K.; Vitale, R.M.; Dognani, J.M.; Masereel, B.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Simone, G.D.; and Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: bioreductive nitro-containing sulfonamides with selectivity for targeting the tumor associated isoforms IX and XII. *J Med Chem*, vol. 51, (2008), pp. 3230–3237.
- [82] Graham, M.M. Clinical molecular imaging with radiotracers: current status. *Med Princ Pract*, vol. 21, (2012), pp. 197–208.
- [83] Supuran, C.T. Diuretics: from classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides. *Curr Pharm Des*, vol. 14, (2008), pp. 641–8.
- [84] Krishnamurthy, V.M.; Kaufman, G.K.; Urbach, A.R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K.L.; Weibel, D.B.; and Whitesides, G.M. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chem Rev*, vol. 108, (2008), pp. 946–1051.

- [85] West, G.M.; Tang, L.; and Fitzgerald, M.C. Thermodynamic analysis of protein stability and ligand binding using a chemical modification- and mass spectrometry-based strategy. *Anal Chem*, vol. 80, (2008), pp. 4175–4185.
- [86] Tran, D.T.; Banerjee, S.; Alayash, A.I.; Crumbliss, A.L.; and Fitzgerald, M.C. Slow histidine h/d exchange protocol for thermodynamic analysis of protein folding and stability using mass spectrometry. *Anal Chem*, vol. 84, (2012), pp. 1653–1660.
- [87] Whitesides, G.M. and Krishnamurthy, V.M. Designing ligands to bind proteins. *Q Rev Biophys*, vol. 38, (2005), pp. 385–95.
- [88] Pastorekova, S.; Parkkila, S.; Pastorek, J.; and Supuran, C.T. Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 19, (2004), pp. 199–229.
- [89] Shank, R.P.; McComsey, D.F.; Smith-Swintosky, V.L.; and Maryanoff, B.E. Examination of two independent kinetic assays for determining the inhibition of carbonic anhydrases I and II: structure-activity comparison of sulfamates and sulfamides. *Chem Biol Drug Des*, vol. 68, (2006), pp. 113–119.
- [90] Silverman, D.N. Carbonic anhydrase: oxygen-18 exchange catalyzed by an enzyme with rate-contributing proton-transfer steps. *Methods Enzymol*, vol. 87, (1982), pp. 732–752.
- [91] Banerjee, A.L.; Tobwala, S.; Ganguly, B.; Mallik, S.; and Srivastava, D.K. Molecular basis for the origin of differential spectral and binding profiles of dansylamide with human carbonic anhydrase I and II. *Biochemistry*, vol. 44, (2005), pp. 3673–3682.
- [92] Wang, S.C. and Zamble, D.B. Fluorescence analysis of sulfonamide binding to carbonic anhydrase. *Biochem Mol Biol Educ*, vol. 34, (2006), pp. 364–368.
- [93] Kranz, J.K. and Schalk-Hihi, C. Protein thermal shifts to identify low molecular weight fragments. *Methods Enzymol*, vol. 493, (2011), pp. 277–298.
- [94] DeSantis, K.; Reed, A.; Rahhal, R.; and Reinking, J. Use of differential scanning fluorimetry as a high-throughput assay to identify nuclear receptor ligands. *Nucl Recept Signal*, vol. 10, (2012), p. e002.
- [95] Cummings, M.D.; Farnum, M.A.; and Nelen, M.I. Universal screening methods and applications of ThermoFluor. *J. Biomol. Screen.*, vol. 11, (2006), pp. 854–863.
- [96] Layton, C.J. and Hellinga, H.W. Thermodynamic analysis of ligand-induced changes in protein thermal unfolding applied to high-throughput determination of ligand affinities with extrinsic fluorescent dyes. *Biochemistry*, vol. 49, (2010), pp. 10831–10841.

- [97] Nettleship, J.E.; Brown, J.; Groves, M.R.; and Geerloff, A. Methods for protein characterization by mass spectrometry, thermal shift (ThermoFluor) assay, and multiangle or static light scattering. *Methods Mol Biol*, vol. 426, (2008), pp. 299–318.
- [98] Cimmperman, P. and Matulis, D. *Protein thermal denaturation measurements via a fluorescent dye*, chap. 8, pp. 247–274. RSC Publishing, 2011.
- [99] Chu, Y.H.; Avila, L.Z.; Gao, J.; and Whitesides, G.M. Affinity Capillary Electrophoresis. *Accounts of Chemical Research*, vol. 28, (1995), pp. 461–468.
- [100] Papalia, G.A.; Leavitt, S.; Bynum, M.A.; Katsamba, P.S.; Wilton, R.; Qiu, H.; Steukers, M.; Wang, S.; Bindu, L.; Phogat, S.; Giannetti, A.M.; Ryan, T.E.; Pudlak, V.A.; Matusiewicz, K.; Michelson, K.M.; Nowakowski, A.; Pham-Baginski, A.; Brooks, J.; Tieman, B.C.; Bruce, B.D.; Vaughn, M.; Baksh, M.; Cho, Y.H.; Wit, M.D.; Smets, A.; Vandersmissen, J.; Michiels, L.; and Myszka, D.G. Comparative analysis of 10 small molecules binding to carbonic anhydrase II by different investigators using Biacore technology. *Anal Biochem*, vol. 359, (2006), pp. 94–105.
- [101] Navratilova, I.; Papalia, G.A.; Rich, R.L.; Bedinger, D.; Brophy, S.; Condon, B.; Deng, T.; Emerick, A.W.; Guan, H.W.; Hayden, T.; Heutmekers, T.; Hoorelbeke, B.; McCroskey, M.C.; Murphy, M.M.; Nakagawa, T.; Parmeggiani, F.; Qin, X.; Rebe, S.; Tomasevic, N.; Tsang, T.; Waddell, M.B.; Zhang, F.F.; Leavitt, S.; and Myszka, D.G. Thermodynamic benchmark study using Biacore technology. *Anal Biochem*, vol. 364, (2007), pp. 67–77.
- [102] Wyman, Jr, J. Heme proteins. *Adv Protein Chem*, vol. 4, (1948), pp. 407–531.
- [103] Wyman, Jr, J. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. *Adv Protein Chem*, vol. 19, (1964), pp. 223–286.
- [104] Eftink, M.R.; Anusiem, A.C.; and Biltonen, R.L. Enthalpy-entropy compensation and heat capacity changes for protein-ligand interactions: general thermodynamic models and data for the binding of nucleotides to ribonuclease A. *Biochemistry*, vol. 22, (1983), pp. 3884–96.
- [105] Weber, G. Ligand binding and internal equilibria in proteins. *Biochemistry*, vol. 11, (1972), pp. 864–878.
- [106] Beres, L. and Sturtevant, J.M. Calorimetric studies of the activation of chymotrypsinogen A. *Biochemistry*, vol. 10, (1971), pp. 2120–2126.
- [107] Baker, B.M. and Murphy, K.P. Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. *Biophysical Journal*, vol. 71(4), (1996), pp. 2049–55.
- [108] Coussens, N.P.; Schuck, P.; and Zhao, H. Strategies for assessing proton linkage to bimolecular interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data. *J Chem Thermodyn*, vol. 52, (2012), pp. 95–107.

- [109] Gomez, J. and Freire, E. Thermodynamic mapping of the inhibitor site of the aspartic protease endothiapepsin. *J Mol Biol*, vol. 252, (1995), pp. 337–50.
- [110] Baum, B.; Muley, L.; Heine, A.; Smolinski, M.; Hangauer, D.; and Klebe, G. Think twice: understanding the high potency of bis(phenyl)methane inhibitors of thrombin. *J Mol Biol*, vol. 391, (2009), pp. 552–564.
- [111] Lundbäck, T.; van Den Berg, S.; and Härd, T. Sequence-specific DNA binding by the glucocorticoid receptor DNA-binding domain is linked to a salt-dependent histidine protonation. *Biochemistry*, vol. 39, (2000), pp. 8909–8916.
- [112] Tellinghuisen, J. A study of statistical error in isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem*, vol. 321, (2003), pp. 79–88.
- [113] Pantoliano, M.W.; Petrella, E.C.; Kwasnoski, J.D.; Lobanov, V.S.; Myslik, J.; Graf, E.; Carver, T.; Asel, E.; Springer, B.A.; Lane, P.; and Salemme, F.R. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J. Biomol. Screen.*, vol. 6, (2001), pp. 429–440.
- [114] Lo, M.C.; Aulabaugh, A.; Jin, G.; Cowling, R.; Bard, J.; Malamas, M.; and Ellestad, G. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Anal. Biochem.*, vol. 332, (2004), pp. 153–9.
- [115] Matulis, D.; Kranz, J.K.; Salemme, F.R.; and Todd, M.J. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. *Biochemistry*, vol. 44, (2005), pp. 5258–5266.
- [116] Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; and Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, USA, 1989.
- [117] Wilkins, M.R.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Sanchez, J.C.; Williams, K.L.; Appel, R.D.; and Hochstrasser, D.F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, vol. 112, (1999), pp. 531–552.
- [118] Bruylants, G.; Wouters, J.; and Michaux, C. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. *Curr Med Chem*, vol. 12, (2005), pp. 2011–20.
- [119] Nakamura, S. and Kidokoro, S. Isothermal acid-titration calorimetry for evaluating the pH dependence of protein stability. *Biophys Chem*, vol. 109, (2004), pp. 229–49.
- [120] Robertson, A.D. and Murphy, K.P. Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chem Rev*, vol. 97, (1997), pp. 1251–1268.

- [121] Opavsky, R.; Pastorekova, S.; Zelnik, V.; Gibadulinova, A.; Stanbridge, E.J.; Zavada, J.; Kettmann, R.; and Pastorek, J. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics*, vol. 33, (1996), pp. 480–7.
- [122] Sigurskjold, B.W. Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem*, vol. 277, (2000), pp. 260–266.
- [123] Sigurskjold, B.W. Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Analytical Biochemistry*, vol. 277, (2000), pp. 260–266.
- [124] Brandts, J.F. and Lin, L.N. Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochemistry*, vol. 29, (1990), pp. 6927–40.
- [125] Lavinder, J.J.; Hari, S.B.; Sullivan, B.J.; and Magliery, T.J. High-throughput thermal scanning: a general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering. *J Am Chem Soc*, vol. 131, (2009), pp. 3794–5.
- [126] Casini, A.; Antel, J.; Abbate, F.; Scozzafava, A.; David, S.; Waldeck, H.; Schäfer, S.; and Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II and IV. *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 13, (2003), pp. 841–845.
- [127] Ladbury, J.E.; Klebe, G.; and Freire, E. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. *Nat Rev Drug Discov*, vol. 9, (2010), pp. 23–27.
- [128] Temperini, C.; Cecchi, A.; Scozzafava, A.; and Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors. Interaction of indapamide and related diuretics with 12 mammalian isozymes and X-ray crystallographic studies for the indapamide-isozyme II adduct. *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 18, (2008), pp. 2567–73.
- [129] Temperini, C.; Cecchi, A.; Scozzafava, A.; and Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors. Comparison of chlorthalidone and indapamide X-ray crystal structures in adducts with isozyyme II: when three water molecules and the keto-enol tautomerism make the difference. *J Med Chem*, vol. 52, (2009), pp. 322–328.
- [130] Maren, T.H. and Conroy, C.W. A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J Biol Chem*, vol. 268, (1993), pp. 26233–9.
- [131] Matulis, D. and Todd, M.J. *Thermodynamics - Structure Correlations of Sulfonamide Inhibitor Binding to Carbonic Anhydrase*, pp. 107–132. Wiley, 2004.

- [132] Conroy, C.W. and Maren, T.H. The effect of temperature on the binding of sulfonamides to carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and IV. *Mol Pharmacol*, vol. 48, (1995), pp. 486–91.
- [133] Remko, M. and von der Lieth, C.W. Theoretical study of gas-phase acidity, pKa, lipophilicity, and solubility of some biologically active sulfonamides. *Bioorg Med Chem*, vol. 12, (2004), pp. 5395–403.
- [134] American Society of Health-System Pharmacists. *AHFS Drug Information 2008*. American Society of Health-System Pharmacists, 2008. ISBN 9781585282067.