

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Vaida LINKUVIENĖ

**Sulfonamidinių junginių sąveikos su
karboanhidrazėmis stebimųjų bei tikrinių
termodinaminių ir kinetinių parametrų nustatymas**

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, biofizika (02 B)

Vilnius, 2017

Disertacija rengta 2013–2017 m. Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. **Daumantas Matulis** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02 B).

Disertacija ginama viešame disertacijos gynimo tarybos posėdyje.

Pirmininkas:

Prof. dr. **Gintaras Valinčius** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

Nariai:

Prof. dr. **Sandro Keller** (Kaiserslautern universitetas, Vokietija, biomedicinos mokslai, biofizika – 02 B),

Prof. dr. **Saulius Šatkauskas** (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02 B),

Dr. **Rima Budvytytė** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02 B),

Dr. **Giedrius Sasnauskas** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

Disertacija bus ginama viešame disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2017 m. lapkričio 24 d. 13 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R402 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2017 m. spalio 23 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje.

VILNIUS UNIVERSITY

Vaida LINKUVIENĖ

**Observed and intrinsic thermodynamic and kinetic
parameters of sulfonamide derivative binding to
carbonic anhydrases**

Summary of doctoral dissertation
Biomedical sciences, biophysics (02 B)

Vilnius, 2017

Doctoral thesis was performed from 2013 to 2017 at the Vilnius University, Lithuania.

Supervisor:

Prof. dr. **Daumantas Matulis** (Vilnius university, biomedical sciences, biophysics – 02 B).

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

Chairman:

Prof. dr. **Gintaras Valinčius** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P).

Members:

Prof. dr. **Sandro Keller** (Kaiserslautern University, Germany, biomedical sciences, biophysics – 02 B),

Prof. dr. **Saulius Šatkauskas** (Vytautas Magnus University, biomedical sciences, biophysics – 02 B),

Dr. **Rima Budvytė** (Vilnius University, biomedical sciences, biophysics – 02 B),

Dr. **Giedrius Sasnauskas** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P).

The thesis defence will take place at the public defense hearing at Life Science Center, Vilnius University (auditorium R402, Saulėtekio 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania) at 1 p.m. on the 24th of November, 2017.

The summary of doctoral thesis was sent on the 23rd of October, 2017.

The thesis is available at the Library of Vilnius University.

Turinys

Įvadas	3
Disertacijos struktūra	6
Literatūros apžvalga	6
Medžiagos ir metodai	7
Medžiagos	7
Metodai	8
Rezultatai	12
Protonizacijos reakcijų įtakos karboanhidrazėms I, IX ir XII cha- rakterizavimas	12
<i>meta-</i> ir <i>para-</i> pakeistų benzensulfonamidų jungimosi su CA išma- tuotieji ir tikriniai termodinaminiai parametrai	14
Įvadas į baltymo-ligando sąveikos tikrinę kinetiką ir reikšmė vaistų kūrimui	24
Išvados	28
Publikacijų sąrašas	29
Publikacijos, įtrauktos į disertaciją	29
Publikacijos, neįtrauktos į disertaciją	29
Summary	ii
Bibliografija	iii

Įvadas

Dauguma patvirtintų vaistų jungiasi prie fermentų ir aktyvuoja arba slopina jų katalizinį aktyvumą. Manoma, kad žmogaus organizme yra apie 600-1500 su ligomis susijusių taikinių, kurių aktyvumas gali būti įtakojamas mažos molekulinės masės junginiais [1]. Žmogaus organizmo sutrikimų patologijos ir mechanizmo supratimas leidžia identifikuoti priežastį, kurios pasekoje išsivystė liga, todėl biologinio efekto ir taikinio struktūros sąveikos supratimas leidžia sukurti junginius su aktyvacijos ar slopinimo savybėmis ir palankiomis farmakologinėmis charakteristikomis.

Vienas tokių taikinių yra fermentas karboanhidrazė (angl. carbonic anhydrase, CA). Tai yra labai paplitęs baltymas, katalizuojantis gyvybiškai svarbią reakciją, dėl to randamas visose gyvosiose sistemose. Dvylika kataliziškai aktyvių žmogaus CA izoformų turi farmakologinį pritaikymą epilepsijos, glaukomos, vėžio ir kitų ligų gydymui. Karboanhidrazių ekspresijos pokyčiai pirmą kartą susieti su liga buvo 1936 metais [2], o sulfidų slopinamosios savybės pastebėtos dar 1933-aisiais [3]. Vėliau sulfonamidiniai junginiai tapo labiausiai ištirta ir svarbiausia CA slopiklių klase [4–6]. Šie slopikliai jungiasi baltymo aktyviajame centre ir nebeleidžia vykti katalizinei reakcijai. Toks slopinimas prisideda prie ligų, susijusių su padidėjusia CA ekspresija, gydymo. Deja, dažniausiai junginiai sąveikauja ne tik su taikinio izoforma, bet ir su kitomis. Dėl šios priežasties selektyvių CA slopiklių kūrimas yra pagrindinis tikslas, kurį pasiekti galima supratus struktūros-termodinamikos ir struktūros-kinetikos sąryšį.

Baltymo-ligando jungimosi termodinamika suteikia vertingos informacijos apie komplekso formavimosi energijas. Jungimosi konstanta yra parametras, kurį tyrėjai nori nustatyti pirmiausia, siekiant įvertinti junginio giminingumą tiriamam baltymui. Entalpija ir entropija yra Gibso energijos komponentės ir junginio modifikacijos gali pakeisti jų indėlį jungimosi stiprumui.

Junginio ir baltymo sąveikos kinetika, arba paprasčiau - asociacijos ir disociacijos greičių konstantos yra svarbūs parametrai, vertinant ir optimizuojant ligandus. Vis dar egzistuoja nuomonė, kad panašūs junginiai turi vienodus asociacijos greičius, tačiau net maži junginių struktūros pokyčiai gali turėti labai didelę įtaką sąveikos kinetikai.

Maži struktūriniai funkcinių grupių pokyčiai ligando molekulėje ir dėka jų atsirandantys jungimosi stiprumo skirtumai suteikia svarbios informacijos apie molekulės elgseną ir savybes. Tačiau šie skirtumai gali likti nepastebėti, jei papildomos reakcijos, vykstančios komplekso formavimosi metu, nėra įvertinamos. Protonizacijos reakcijos labiausiai įtakoja eksperimentiškai nustatytas molekulių sąveikos termodinamines ir kinetines parametrų vertes.

Dėl baltymo ir ligando jonizacijos konstantų bei buferinio tirpalo pH, jungimosi komponentų frakcijos skiriasi. To pasekoje skiriasi ir termodinaminiai

parametrai, jei ta pati reakcija buvo atlikta skirtinguose buferiniuose tirpaluose ar pH. Asociacijos greičio konstantos, nustatytos tą patį eksperimentą atliekant skirtinguose pH, skiriasi taip pat. Dėl to vertės, gautos skirtingose sąlygose gali būti lyginamos tarpusavyje tik tada, kai protonizacijos įtaka yra atimama ir apskaičiuojami tikriniai parametrai. Kitu atveju gali būti priimti neteisingi sprendimai tolimesniam vaistų kūrimui.

Selektyvių junginių kūrimui labai pasitarnauja biofizikiniai metodai, kurie suteikia informacijos apie komplekso dinamiką bei sąveikos energijas. Paviršiaus plasmono rezonanso (angl. surface plasmon resonance, SPR) metodas kartu su fluorescenciniu terminio poslinkio bei izoterminės titravimo kalorimetrijos metodais yra labai svarbūs efektyvių vaistinių junginių kūrimui ir vystymui.

Tikslas

Nustatyti protonizacijos įtaką termodinaminiam ir kinetiniams ligando jungimosi su karboanhidrazėmis parametrams ir ištirti junginio struktūros-termodinamikos ir junginio struktūros-kinetikos sąryšį sulfonamidiniams junginiams sąveikaujant su CA izoformomis.

Užduotys

- termodinaminiais metodais nustatyti aktyviajame CA I, CA IX ir CA XII izoformų centre prie Zn(II) prisijungusio hidroksido jono/vandens molekulės jonizacijos konstantas bei protonizacijos entalpijas.
- nustatyti junginių sulfonamidinės grupės pK_a bei protonizacijos entalpijas.
- išmatuoti ligandų jungimosi su CA izoformomis termodinaminis ir kinetinius parametrus.
- apskaičiuoti ligandų jungimosi su CA izoformomis tikrinius termodinaminis ir kinetinius parametrus.
- nustatyti sąryšį tarp junginių struktūrų ir jungimosi termodinamikos bei junginių struktūrų ir jungimosi kinetikos.

Mokslinis naujumas

Šiame darbe buvo išmatuoti naujų junginių sąveikos su karboanhidrazėmis termodinaminiai parametrai ir apskaičiuotos tikrinės parametrų vertės, nustatyta, kad tiriami junginiai labai stipriai ir selektyviai jungiasi prie kai kurių CA izoformų. Buvo atliktas detalus junginio struktūros-termodinamikos ir junginio struktūros-kinetikos sąryšio charakterizavimas. Be to, pirmą kartą paviršiaus plazmono rezonanso metodas buvo panaudotas įvertinti protonizacijos įtaką jungimosi kinetikai. Naudojantis izoterminės titravimo kalorimetrijos ir fluorescencinio poslinkio metodais buvo nustatytos trijų CA izoformų jonizacijos konstantos. Nustačius

baltymų ir junginių pK_a vertes, buvo įvertinta protonizacijos įtaka ir apskaičiuoti tikriniai termodinaminiai bei tikriniai kinetiniai baltymo-ligando sąveikos parametrai.

Šiame darbe parodyta, jog sulfonamidų jungimasis yra labai greitas procesas ir gali pasiekti difuzijos limituojamą asociacijos greitį.

Ginamieji teiginiai

- Sulfonamidiniai EA junginiai stipriai ir selektyviai sąveikauja su CA izoformomis ir gali būti toliau vystomi kaip vaistai.
- Svarbu nustatyti tikrinius jungimosi termodinaminius parametrus ir juos naudoti naujai susintetintų junginių sąveikos su baltymais taikiniai struktūros-termodinamikos analizei.
- Sulfonamidinių slopiklių jungimosi su CA asociacija pasiekia difuzijos limituojamą greitį.

Disertacijos struktūra

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

Literatūros apžvalga

Literatūros apžvalgoje aprašomi pagrindiniai baltymo-ligando sąveikos termodinamikos ir kinetikos principai. Aprašomas entalpijos-entropijos kompensavimas bei papildomos jungimosi metu vykstančios reakcijos, iš kurių labiausiai įtakojanti eksperimentinius duomenis yra protonizacija.

Jungimosi termodinamikai nustatyti naudojami fluorescencinis terminio poslinkio metodas (FTSA) bei izoterminė titravimo kalorimetrija (ITC). Jungimosi kinetika nustatoma paviršiaus plazmono rezonanso (SPR) metodu. Literatūros apžvalgoje aprašytas kiekvieno iš jų veikimo principas.

Geresnei jungimosi sąveikai pasiekti junginiai yra optimizuojami keičiant jų lipofiliškumą, stabilumą, poliškumą ir t.t. Papildomos polinės grupės gali sudaryti vandenilines jungtis su baltymu taip sustiprindamos sąveiką ir padidindamos entalpijos indėlį jungimosi energijai [7,8]. Nėpolinės junginio grupės gali užpildyti hidrofobines baltymo sritis, pakeisdamos tvarkingai išsidėsčiusias vandens molekules ir taip junginio lipofiliškumas padidintų jungimosi giminingumą dėka entropijos indėlio [7,9]. Deja, jungimosi kinetiką įtakojantys faktoriai vis dar yra mažai suprasti.

Literatūros apžvalgoje aprašomas darbe tiriamas baltymas žmogaus karboanhidrazė, katalizinis mechanizmas, dėl ekspresijos pokyčių atsirandančios ligos bei slopinimas sulfonamidiniais junginiais.

Karboanhidrazei sąveikaujant su sulfonamidais, vyksta protonizacijos reakcijos (baltymo aktyviajame centre prie Zn(II) jono prisijungusio OH⁻ protonizacija ir junginio SO₂NH₂ grupės deprotonizacija). Dėl to, priklausomai nuo baltymo ir junginio p*K*_a bei buferinio tirpalo, kuriame atliekami eksperimentai, pH, sąveikaujančių molekulių frakcijos skiriasi. To pasekoje išmatuojamos mažesnės jungimosi bei asociacijos greičio konstantos nei yra iš tikrųjų. Buferiniai tirpalai įtakoja ir jungimosi entalpijas. Taigi, dėl jungimosi metu vykstančios protonizacijos reakcijos gali būti padarytos klaidingos išvados ir priimti neteisingi sprendimai tolimesniam vaistų kūrimui. Kad to būtų išvengta, turėtų būti apskaičiuojami tikriniai jungimosi parametrai.

Medžiagos ir metodai

Medžiagos

Komerciniai junginiai buvo pirkti iš “Sigma Chemical Co” (**EZA**, **AZM**, 4-metilbensulfonamidas).

Visi kiti CA slopikliai, naudojami šiuose tyrimuose, buvo susintetinti Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje, Biotechnologijos institute, Vilniaus universitete. Struktūros ir junginių grynumas buvo patvirtinti BMR, IR spektroskopijos ir MS metodais.

Baltymai. Visos rekombinantinės žmogaus CA izoformos naudotos šiuose tyrimuose – CA I (3-261 aminorūgštys), CA II (1-260 aminorūgštys), CA III (4-260 aminorūgštys), CA IV (19-284 aminorūgštys), CA VA (35-305 aminorūgštys), CA VB (40-317 aminorūgštys), CA VI (21-290 aminorūgštys), CA VII (1-264 aminorūgštys), CA IX (138-390 aminorūgštys), CA XII (30-291 aminorūgštys), CA XIII (1-262 aminorūgštys), CA XIV (16-280 aminorūgštys) – buvo ekspresuojamos ir gryninamos Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje, Biotechnologijos institute, Vilniaus universitete. CA izoformos buvo ekspresuojamos *E. coli*, išskyrus CA IX, kuri buvo ekspresuojama žinduolių ląstelėse. Visos CA buvo gryninamos chromatografijos metodais (grynumas \pm 90%). Baltymo koncentracija buvo nustatoma spektrofotometriškai.

Reagentai. ANS (Aldrich Chemicals, \geq 97 %), CH₃COONa (Fluka Chemie, \geq 99 %), DMSO (Roth, \geq 99.5 %), H₃PO₄ (Sigma Aldrich, 85 % tirpalas), HCl (Alfa Aesar, 36.5–38 % tirpalas), Na₂B₄O₇·10H₂O (Spectrum Chemical MFG corp., \geq 99.5 %), Na₂HPO₄ (Fluka Chemie, \geq 99 %), Na₃PO₄ · 12H₂O (Roth, \geq 98 %), NaCl (Roth, \geq 99.5 %), NaH₂PO₄ · H₂O (Fisher Scientific, 99.4 %), NaOH (Alfa Aesar, \geq 98 %), Tris-OH (Sigma, \geq 99.9 %), Tris-HCl (Sigma, \geq 99 %), NHS (*N*-hidroksisukcinimidas) (Sigma Aldrich, 98 %), EDC (*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimido hidrochloridas) (Sigma Aldrich, 98 %), etanolamino hidrochloridas (Sigma Aldrich, \geq 99 %).

Buferiniai tirpalai. Fosfatinis: 50 mM arba 100 mM Na₂HPO₄ tirpalas, turintis 100 mM NaCl ir 50 mM arba 100 mM NaH₂PO₄ tirpalas, turintis 100 mM NaCl buvo sumaišomi atitinkamu santykiu, kad būtų gautas reikiamas pH.

TRIS: 50 mM Tris-OH tirpalas, turintis 100 mM NaCl ir 50 mM Tris-HCl tirpalas, turintis 100 mM NaCl buvo sumaišomi atitinkamu santykiu, kad būtų gautas reikiamas pH.

Universalus: 50 mM CH₃COOH, 25 mM Na₂B₄O₇, 100 mM NaCl buvo sumaišomi ir atitinkamas vieno iš tirpalų H₃PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, ir Na₃PO₄ kiekis buvo pridedamas, kad būtų gautas reikiamas pH.

Metodai

Fluorescencinis terminio poslinkio metodas

Eksperimento procedūra. Fluorescencinis terminio poslinkio metodas buvo atliekamas Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen Rotor-Gene Q) spektrofluorimetru (žadinimas $\lambda=365\pm 20$ nm, emisija $\lambda=460\pm 15$ nm). Baltymo tirpalas su skirtingomis junginio koncentracijomis buvo kaitinamas nuo 25°C iki 99°C , stebima fluorescencija ir nustatoma baltymo lydymosi temperatūra, esant skirtingoms junginio koncentracijoms. Tirpalus sudarė $10\ \mu\text{M}$ baltymo, $0\text{-}200\ \mu\text{M}$ junginio, $50\ \mu\text{M}$ solvatochrominio dažo ANS, $50\ \text{mM}$ natrio fosfato buferinio tirpalo (pH 7.0), turinčio $100\ \text{mM}$ NaCl, ir DMSO (galutinė koncentracija 2%). Mėginio temperatūra buvo keliama 1°C per minutę greičiu.

Lydymosi temperatūros nustatymas. Baltymo lydymosi temperatūra (T_m) buvo nustatyta eksperimentines kreives modeliuojant pagal lygtį, aprašančią baltymo-dažo komplekso fluorescenciją:

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

kur R yra idealiųjų dujų konstanta, T – absoliuti temperatūra, $\Delta_U G$ yra išsivyniojimo Gibso energija, y_N ir y_U yra atitinkamai natyvaus ir išsivyniojusio baltymo fluorescencija.

Parametras $\Delta_U G$ gali būti aprašomas kaip baltymo išsivyniojimo entalpijos $\Delta_U H$ ir išsivyniojimo entropijos $\Delta_U S$ skirtumas:

$$\Delta_U G = \Delta_U H - T\Delta_U S, \quad (2)$$

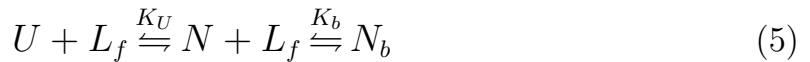
y_N ir y_U priklauso nuo temperatūros:

$$y_N(T) = y_{N,T_m} + m_N(T - T_m), \quad (3)$$

$$y_U(T) = y_{U,T_m} + m_U(T - T_m), \quad (4)$$

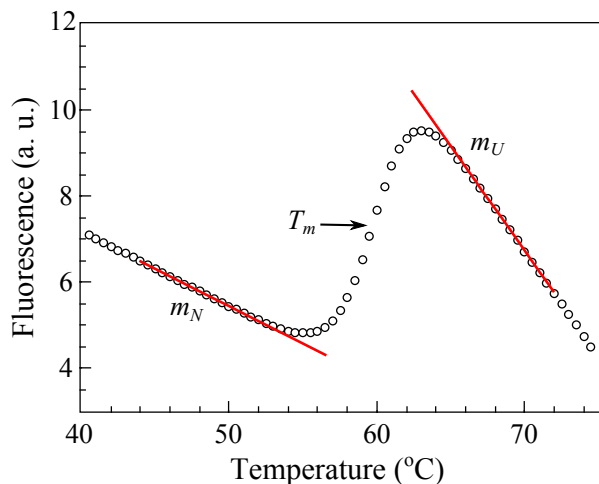
kur m_N ir m_U yra atitinkamai natyvaus ir išsivyniojusio baltymo fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros pokrypio kampai.

Jungimosi konstantos nustatymas. Temperatūros inicijuotas baltymo perėjimas iš natyvios (N) į išsivyniojusią (U) būseną gali būti įtakojamas ligando (L), kuris prisijungęs stabilizuoja arba destabilizuoja baltymą:



kur L_f yra laisvas ligandas, N_b yra natyvus baltymas, prisijungęs ligandą. K_U ir K_b yra atitinkamai baltymo išsivyniojimo ir jungimosi konstantos, kurios gali būti aprašomos lygtimis:

$$K_U = \frac{[U]}{[N_f]} = e^{-(\Delta G_U/RT)} \quad (6)$$



1 pav.. Fluorescencijos intensyvumo pokyčiai kintant baltymo stabilumui. Raudonos linijos rodo natyvaus (m_N) ir išsivyniojusio (m_U) baltymo fluorescencijos intensyvumą. T_m yra lydymosi temperatūra, kur pusė baltymo molekulių yra natyvioje ir pusė – išsivyniojusioje formoje.

$$K_b = \frac{[N_b]}{[N_f][L_f]} = e^{-(\Delta G_b/RT)} \quad (7)$$

kur ΔG_U ir ΔG_b yra atitinkamai išsivyniojimo ir jungimosi Gibso energijos.

Jungimosi konstantos nustatymas, naudojant baltymo lydymosi temperatūras, esant skirtingoms junginio koncentracijoms, aprašomas:

$$L_t = (K_U - 1) \left(\frac{P_t}{2K_U} + \frac{1}{K_b} \right) \quad (8)$$

P_t yra baltymo koncentracija, t.y. išsivyniojusio U , natyvaus N_f ir ligandą prisijungusio natyvaus N_b baltymų suma:

$$P_t = [U] + [N_f] + [N_b] \quad (9)$$

Izoterminė titravimo kalorimetrija (ITC)

Baltymo-ligando jungimasis. ITC eksperimentai buvo atliekami naudojant VP-ITC prietaisą (Microcal, Inc., Malvern, Northampton, JAV). Kalorimetro celė buvo užpildoma 4-10 μ M baltymo tirpalu, turinčiu 2% DMSO, 50-100 mM fosfatinio buferinio tirpalo (pH 7.0) ir 100 mM natrio chlorido. Švirkštas užpildomas tirpalu, sudarytu iš 40-100 μ M junginio, 2% DMSO, 50-100 mM fosfatinio buferinio tirpalo (pH 7.0) ir 100 mM natrio chlorido. Baltymo tirpalas buvo titruojamas injekuojant 25 injekcijas po 10 μ L ligando tirpalo apie 200 s intervalais 25°C arba 37°C temperatūrose.

ITC duomenys buvo analizuojami naudojant MicroCal Origin programinę įrangą. Pirma injekcija nebuvo naudojama analizuojant duomenis. Jungimosi konstantos, entalpijos ir entropijos buvo nustatomos naudojant vienos jungimosi vietos modelį.

Eksperimentai skirtinguose pH. Komercinio slopiklio **EZA** jungimosi su CA eksperimentai, esant skirtingiems pH, buvo atliekami celę pripildant tirpalo, sudaryto iš 4-6 μM baltymo, 2% DMSO, 50-100 mM natrio fosfato arba TRIS buferio ir 100 mM natrio chlorido. Švirškstas pripildomas 40-60 μM **EZA**, 2% DMSO, 50-100 mM fosfatinio arba TRIS buferinio tirpalo, 100 mM natrio chlorido. Baltymo ir ligando tirpalai buvo paruošiami vienodame buferyje, pH vertės buvo patikrinamos prieš ir po eksperimento. Eksperimentai buvo sudaryti iš 25 injekcijų, titruojamų kas 3-4 min. Pirmos injekcijos tūris buvo 5 μL , kitų – 10 μL . Eksperimentai buvo atliekami 25°C.

Junginio protonizacijos entalpija. Junginio protonizacijos entalpija buvo nustatoma celėje esantį junginio tirpalą (0.25 mM junginio ir 1.5 ekvivalento NaOH) titruojant 5 mM HNO_3 tirpalu. Eksperimentas buvo sudarytas iš 56 injekcijų (kiekvienos iš jų tūris 5 μL), injekuojamų kas 200 sekundžių. DMSO koncentracijos švirškšte ir celėje esančiuose tirpaluose buvo vienodos (2.5%). Eksperimentai buvo atliekami 37°C.

Paviršiaus plazmono rezonansas (SPR)

Baltymo-ligando sąveikos kinetika buvo atliekama naudojant Biacore S51, Biacore T200 bei Biacore 2000 paviršiaus plazmono rezonanso prietaisus (GE Healthcare, Upsala, Švedija). Visi eksperimentai buvo atliekami 25°C temperatūroje.

Jutiklio paviršiaus paruošimas. Baltymai buvo imobilizuojami ant CM5 ir Series S CM5 jutiklio (GE Healthcare, Upsala, Švedija), naudojant standartinę amino grupių prijungimo procedūrą. Jutiklio karboksimetildekstrano matrica buvo aktyvuojama 7 minutes naudojant 0.1 M NHS ir 0.4 M EDC (tėkmės greitis 10-20 $\mu\text{L min}^{-1}$).

Baltymo imobilizavimas. Baltymų tirpalai buvo paruošti 10 mM natrio acetato buferyje. Naudotos baltymų koncentracijos ir pH: 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CA I, pH 5.0; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CA II, pH 5.0; 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CA VII, pH 5.0; 100-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CA IX, pH 4.5; 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CA XII, pH 5.0; 75-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CA XIII, pH 5.0. Nesureagavusios karboksimetildekstrano grupės buvo 10 min deaktyvuojamos 1 M etanolamino hidrokloridu (pH 8.5). Imobilizavimo metu kaip tėkmės buferis buvo naudojamas 10 mM fosfatinis buferis, turintis 150 mM NaCl, pH 7.0 arba pH 7.4.

Kinetiniai sąveikos eksperimentai. Eksperimentai buvo atliekami naudojant 50 mM natrio fosfato (pH intervalas nuo 6.0 iki 8.0), TRIS (pH 8.5 ir pH 9.0) arba natrio acetato (pH 5.5) buferinius tirpalus, turinčius 100 mM NaCl ir 2% DMSO kaip tėkmės buferius. 10 mM junginių tirpalai, ištirpinti DMSO buvo praskiedžiami tėkmės buferiu. Asociacija buvo stebima 30-60 sekundžių, esant 30 $\mu\text{L min}^{-1}$ arba 90 $\mu\text{L min}^{-1}$ tėkmės greičiui. Disociacijos laikas buvo skirtin gas, priklausomai nuo sąveikos stiprumo.

Teorinės kiekvieno ligando jungimosi konstantos skirtinguose pH buvo apskaičiuotos naudojant 11 lygtį. Dešimt kartų didesnė koncentracija nei apskaičiuota K_D vertė buvo naudojama kaip didžiausia koncentracija ir skiedžiama du kartus.

Ši du kartus mažesnė koncentracija skiedžiama dar du kartus ir t.t. Kiekvienas eksperimentas buvo sudarytas iš 6 po du kartus besiskiriančių koncentracijų ir dviejų kontrolinių koncentracijų, kurias sudarė tik tėkmės buferis.

SPR duomenų analizė. Gautos sensogramos buvo analizuojamos naudojant BIAcore T100 v.2.0, BIAcore T200 v.1.0 ir BIAevaluation v.3.0 programinę įrangą (GE Healthcare, Upsala, Švedija). Kreivės buvo analizuojamos naudojant standartinį 1:1 sąveikos modelį.

Spektrofotometriniai matavimai.

Junginių pK_a nustatymui buvo naudojamas "Aligent 89090A" spektrofotometras. Junginio tirpalas (galutinė koncentracija 30-50 μM , 1% DMSO) buvo paruošiamas buferiniame tirpale (100 mM, pH intervale nuo 5.5 iki 12.5, kas 0.5 pH vieneto) ir UV-VIS spektrai buvo registruojami 25°C arba 37°C temperatūroje.

Tikrinių parametrų skaičiavimas.

Tikrinės jungimosi Gibso energijos buvo apskaičiuojamos naudojant lygtį:

$$\Delta_b G_{intr} = -RT \ln(K_{b_intr}) \quad (10)$$

kur K_{b_intr} yra tikrinė jungimosi konstanta:

$$K_{b_intr} = \frac{K_{b_obs}}{f_{\text{CAZnH}_2\text{O}} f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-}} \quad (11)$$

$f_{\text{CAZnH}_2\text{O}}$ ir $f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-}$ atitinkamai yra protonizuoto baltymo, kuomet prie cinko jono prisijungusi vandens molekulė, ir deprotonizuoto sulfonamido frakcijos:

$$f_{\text{CAZnH}_2\text{O}} = \frac{10^{\text{p}K_{a_ \text{CAZnH}_2\text{O}} - \text{pH}}}{1 + 10^{\text{p}K_{a_ \text{CAZnH}_2\text{O}} - \text{pH}}} \quad (12)$$

$$f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-} = \frac{10^{\text{pH} - \text{p}K_{a_ \text{RSO}_2\text{NH}^-}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a_ \text{RSO}_2\text{NH}^-}}} \quad (13)$$

Šios frakcijos gali būti apskaičiuotos, kai sulfonamido ir vandens molekulės, prisijungusios prie cinko jono aktyviajame baltymo centre pK_a vertės yra žinomos (lygtyse pažymėtos atitinkamai $pK_{a_ \text{RSO}_2\text{NH}^-}$ ir $pK_{a_ \text{CAZnH}_2\text{O}}$). Tikrinė jungimosi entalpija apskaičiuojama pagal lygtį:

$$\Delta_b H_{intr} = \Delta_b H_{obs} - n_{\text{RSO}_2\text{NH}_2} \Delta_p H_{\text{RSO}_2\text{NH}_2} - n_{\text{CA}} \Delta_p H_{\text{CA}} + n_{\text{buf}} \Delta_p H_{\text{buf}} \quad (14)$$

kur $\Delta_b H_{obs}$ yra išmatuota jungimosi entalpija, $\Delta_p H_{\text{RSO}_2\text{NH}_2}$ yra junginio, $\Delta_p H_{\text{CA}}$ – karboanhidrazės ir $\Delta_p H_{\text{buf}}$ – buferio protonizacijos entalpijos. $n_{\text{RSO}_2\text{NH}_2} = f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-} - 1$ yra skaičius protonų, prisijungiančių prie junginio, $n_{\text{CA}} = 1 - f_{\text{CAZnH}_2\text{O}}$ – skaičius protonų, prisijungiančių prie Zn-OH^- , ir $n = -(n_{\text{CA}} + n_{\text{RSO}_2\text{NH}_2})$ yra iš buferio paimtų ar buferiui atiduotų protonų skaičius.

Tikrinei asociacijos greičio konstantai apskaičiuoti naudojama lygtis:

$$k_{a_intr} = \frac{k_{a_obs}}{f_{\text{CAZnH}_2\text{O}} f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-}} \quad (15)$$

Sąveikaujančių molekulių frakcijos apskaičiuojamos pagal lygtis 13 ir 12.

1 lentelė. Termodinaminiai CA protonizacijos duomenys bei pK_a vertės. Protonizacijos Gibso energijos ($\Delta_p G$), entalpijos ($\Delta_p H$), entropijos ($-T\Delta_p S$) bei pK_a buvo nustatytos 25°C temperatūroje ir perskaičiuoti į 37°C.

CA	pK_a		$\Delta_p G$ (kJ mol ⁻¹)		$\Delta_p H$ (kJ mol ⁻¹)		$T\Delta_p S$ (kJ mol ⁻¹)	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
CA I	8.4	8.1	-47.9	-48.2	-41.0	-38.5	6.9	9.7
CA IX	6.8	6.6	-38.8	-39.4	-24.0	-21.5	14.8	17.9
CA XII	7.0	6.8	-40.0	-40.4	-28.0	-25.5	12.0	14.9

Rezultatai

Rezultatų dalis sudaryta iš trijų skyrių: 1) protonizacijos reakcijų įtakos karboanhidrazėms I, IX ir XII charakterizavimas, 2) išmatuota ir tikrinė *meta-* ir *para-*pakeistų sulfonamidų jungimosi su CA termodinamika, 3) įvadas į tikrinę baltymo-ligando sąveikos kinetiką ir jos reikšmė vaistų kūrimui.

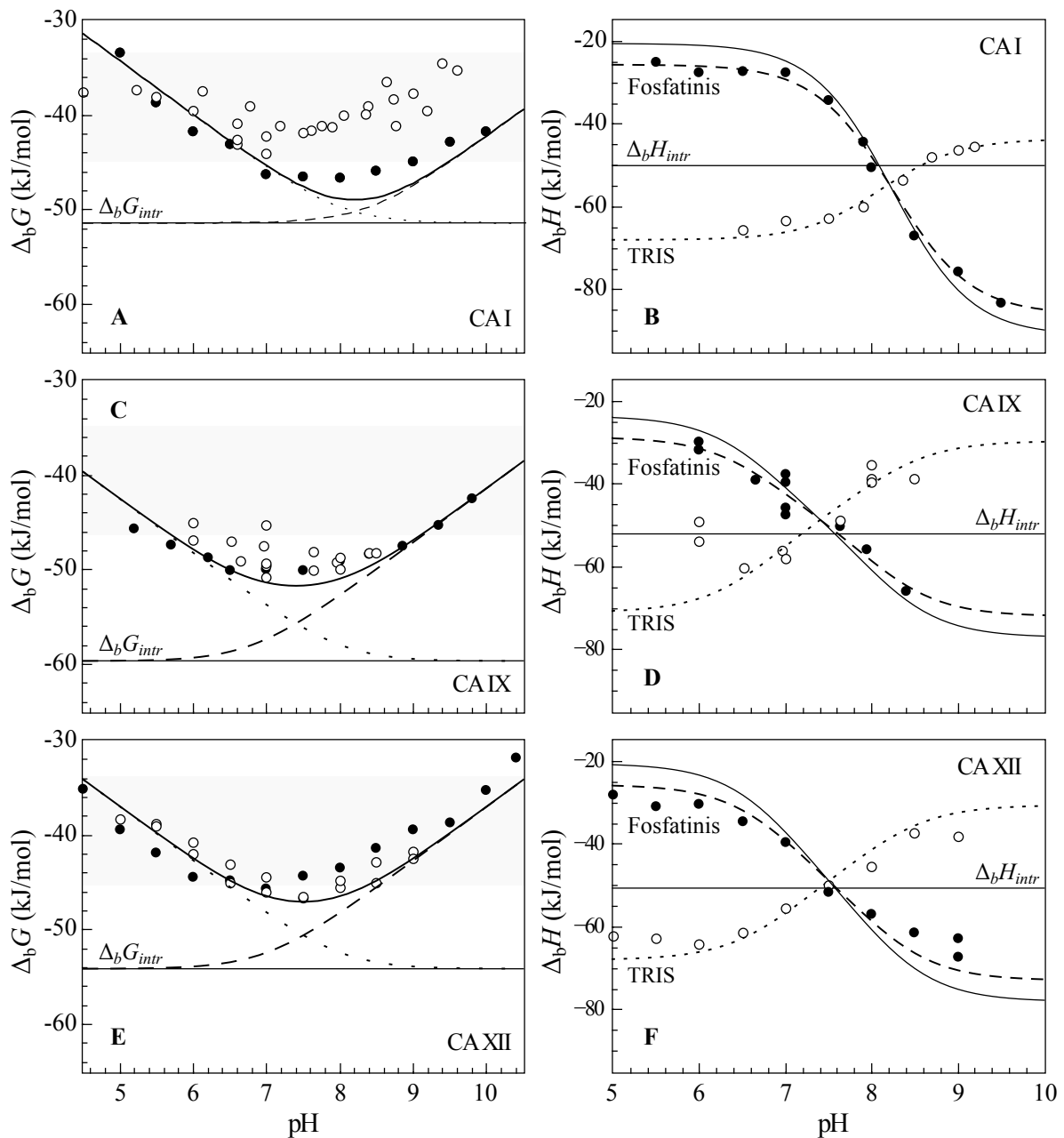
Protonizacijos reakcijų įtakos karboanhidrazėms I, IX ir XII charakterizavimas

Visos kataliziškai aktyvios CA izoformos aktyviajame centre turi cinko joną, koordinuojamą trijų histidinių ir hidroksido jono/vandens molekulės. Aplink aktyvųjį centrą išsidėsčiusios aminorūgštys skiriasi, todėl katalizinis aktyvumas ir prie cinko prisijungusio OH⁻/H₂O pK_a vertės nėra vienodos. Dėl to kiekvienos CA izoformos protonizacijos įtaka jungimosi energijoms turi būti apibrėžta.

CA I, CA IX ir CA XII izoformų pK_a vertės buvo nustatytos FTSA ir ITC metodais 25°C temperatūroje. Jungimosi eksperimentams atlikti buvo pasirinktas komercinis CA slopiklis **EZA**. Termodinaminių jungimosi parametrų priklausomybė nuo pH parodyta 2 paveiksle. Jungimosi Gibso energijų vertės, gautos atlikus eksperimentus skirtinguose pH, sudaro U-formą (Pav. 2A, C ir E). Apskritimai žymi eksperimentinius duomenis, U-formos kreivė yra modelis, o tiesė žymi tikrinę **EZA** jungimosi su CA Gibso energiją. Iš šių duomenų buvo nustatytos tiriamų CA izoformų pK_a vertės (1 lentelė).

Prie cinko prisijungusių hidroksido jonų aktyviuosiuose tiriamų CA centruose protonizacijos entalpijų nustatymui buvo atlikti ITC eksperimentai. Eksperimentai buvo atliekami buferiuose (TRIS ir natrio fosfato) bei įvairiuose pH (Pav. 2B, D ir F). Stebimųjų jungimosi entalpijų priklausomybė nuo pH yra X-formos. Juoda kreivė žymi teorinę išmatuotą jungimosi entalpijos priklausomybę nuo pH, jei buferio protonizacijos entalpija būtų lygi 0, t.y., jungimąsi įtakotų tik baltymo ir junginio protonizacijos. Juoda tiesė yra tikrinė jungimosi entalpija ($\Delta_b H_{intr}$), kuri nepriklauso nuo pH. Punktyrinė ir taškinė linijos žymi eksperimentinių duomenų modelį atitinkamai fosfatiname ir TRIS buferiuose. Tiek ITC, tiek FTSA metodu gautiems duomenims taikant 11 lygtį gaunamos vienodos pK_a vertės.

Naudojant šias pK_a vertes galima apskaičiuoti tikrinius jungimosi parametrus, jei ligandų pK_a yra žinomos.



2 pav.. **EZA** jungimosi su CA I, IX, ir XII priklausomybė nuo pH. A, C, ir E paveikslai rodo Gibso energijas skirtinguose pH. Juodi apskritimai yra duomenys, išmatuoti FTSA, o balti apskritimai – ITC metodu. Juoda kreivė yra teorinis jungimosi modelis, atitinkantis 10 lygtį. Taškinė ir brūkšninė linijos atitinkamai žymi deprotonizuotos **EZA** ir protonizuotos CA frakcijų įtaką jungimuisi. Tiesė yra tikrinė jungimosi Gibso energija. Pilkas fonas rodo c faktoriaus 5 – 500 ribas. B, D ir F grafikai rodo jungimosi entalpijų priklausomybę nuo pH, gautą ITC metodu. Juodi ir balti apskritimai yra duomenys gauti atlikus eksperimentus atitinkamai fosfatiniame ir TRIS buferiuose. Brūkšninė ir taškinė kreivės žymi teorinius modelius, juoda kreivė – teorinį $\Delta_b H_{obs}$ modelį, neįtakojamą buferio protonizacijos entalpijos. Juoda tiesi linija yra tikrinė jungimosi entalpija.

***meta-* ir *para*-pakeistų benzonsulfonamidų jungimosi su CA išmatuotieji ir tikriniai termodinaminiai parametrai**

Benzonsulfonamidinių junginių modifikacijos įtakoja jų jungimąsi su karboanhidrazėmis. Keičiant funkcines grupes junginio molekulėje galima moduluoti sąveikas su CA izoformomis ir padidinti arba sumažinti junginio giminingumą. Viena CA aktyviojo centro pusė yra hidrofilinė, o kita hidrofobinė, todėl buvo susintetinti dviuodegiai junginiai, turintys vieną uodegą hidrofobiškesnę nei kitą.

Išmatuoti jungimosi termodinaminiai parametrai. Eksperimentiškai FTSA metodu buvo nustatytos 25 struktūriškai panašių benzonsulfonamidų jungimosi su 12 CA izoformų disociacijos konstantos (arba Gibso energijos). Junginių struktūros ir jungimosi Gibso energijos pavaizduotos 3 ir 4 paveiksluose.

Išmatuoti jungimosi duomenys neturėtų koreliuoti su junginio struktūromis dėl papildomos protonizacijos reakcijos. Išmatuotos vertės gali būti lyginamos tarpusavy tik kai eksperimentai atlikti identiškomis sąlygomis. Šiame darbe mes nusprendėme įtraukti tiek išmatuotus, tiek tikrinius termodinaminis parametrus tam, kad būtų matomi skirtumai.

Kaip minėta anksčiau, maži struktūriniai pokyčiai gali stipriai pakeisti jungimosi giminingumą. Tą aiškiai parodo junginių **EA3-1** ir **EA4-1**, besiskiriančių viena metileno grupe, jungimasis su CA IV. Šių sąveikų stiprumas skiriasi apie 100 kartų.

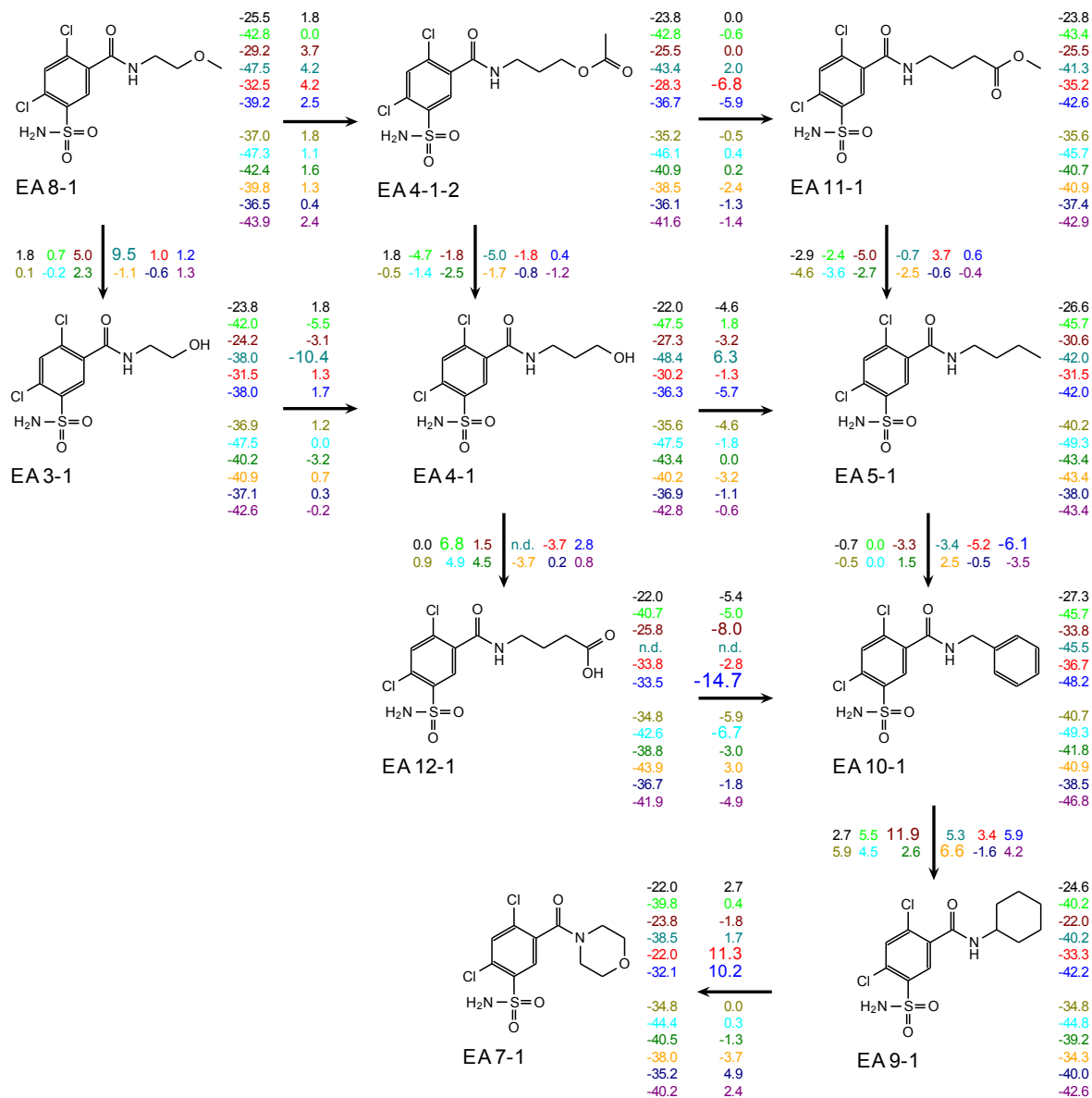
Lyginant benzonsulfonamidų uodegas, esančios *para* padėtyje, modifikacijos įtaką jungimosi parametrams buvo pastebėta, jog S-pakeisti junginiai stipriau jungiasi su visomis CA izoformomis nei N-pakeisti. Vienintelė išimtis – **EA3-8** ir **EA3-4** junginių pora, kur CA IX jungiasi stipriau su N-pakeistu dviuodegiu benzonsulfonamidu nei S-pakeistas analogas. To priežastis gali būti ilgesnė *para* padėty esanti uodega. Todėl buvo palygintos poros **EA3-2o** ir **EA3-4o** (SO₂ pakeista uodega) bei **EA3-2** ir **EA3-4** (S-pakeista uodega), kur viena *para* funkcinė grupė yra ilgesnė nei kita. Pirmoje poroje su visomis CA stipriau jungėsi trumpesnę fenilo grupę turintis junginys **EA3-2o** lyginant su **EA3-4o**, o antroje poroje fenilo grupę turintis junginys **EA3-2** stipriau jungėsi tik su CA IV ir CA IX.

Palyginus *para* padėty S- ir SO₂-pakeistus dviuodegius junginius, pastebėta, jog S-pakeistas benzilo grupę turintis **EA3-4** jungiasi stipriau su visomis CA nei SO₂-pakeistas analogas **EA3-4o**. Tuo tarpu, lyginant fenilo grupes turinčius junginius **EA3-2** ir **EA3-2o**, stipriau su visomis CA jungėsi SO₂-pakeistas junginys.

Jungimosi entalpijos ir entropijos, skirtingai nei Gibso energijos, priklauso nuo buferinio tirpalo, todėl išmatuotos šių parametru vertės neturi prasmės (5 paveikslas).

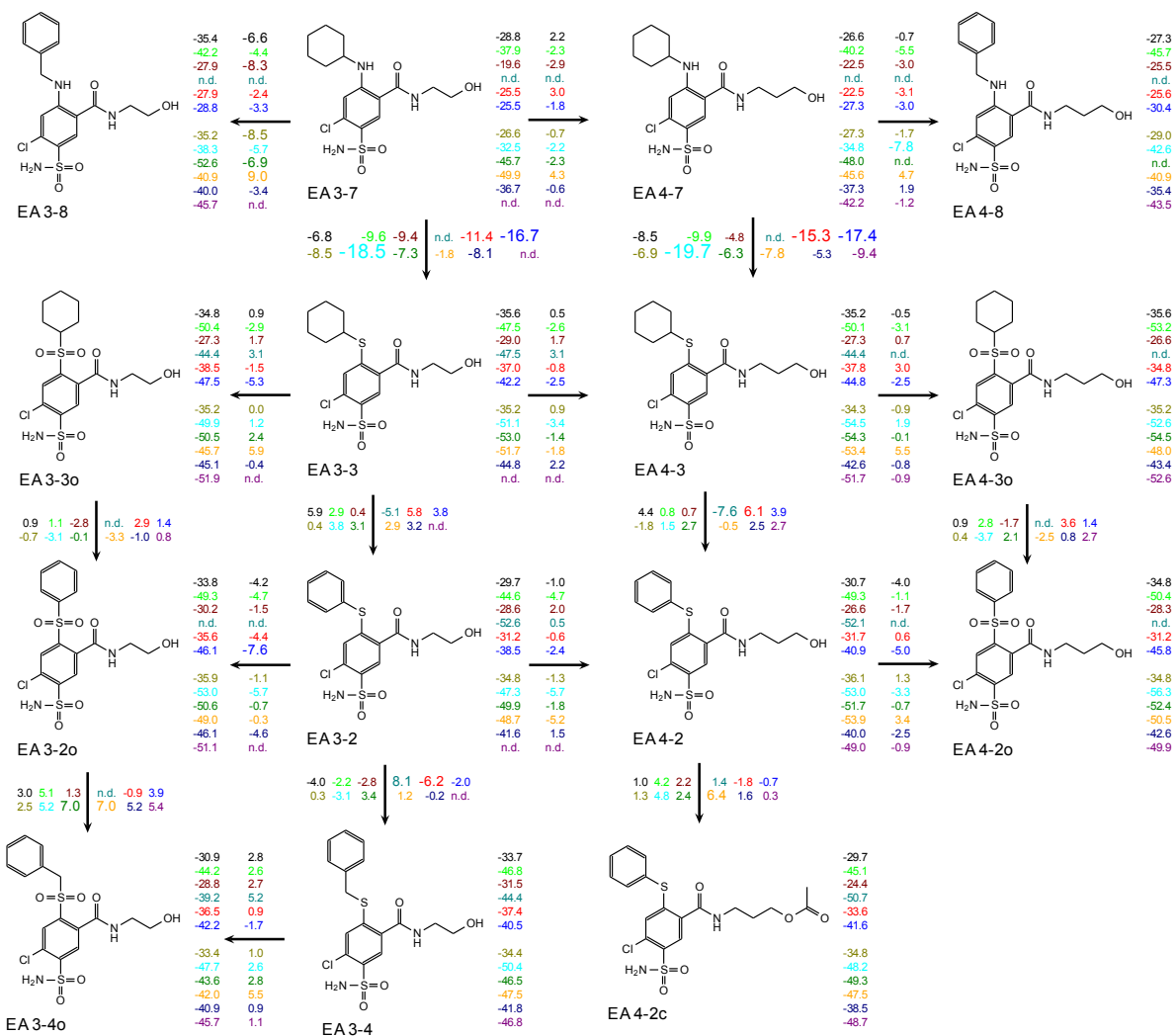
Junginių protonizacija. Tam, kad būtų galima apskaičiuoti tikrinius termodinaminis parametrus, sąveikaujančių molekulių pK_a vertės turi būti žinomos. Sulfonamidinės junginio grupės jonizacijos konstanta buvo nustatoma spektro-

CA I, CA II, CA III, CA IV, CA VA, CA VB, CA VI, CA VII, CA IX, CA XII, CA XIII, CA XIV.

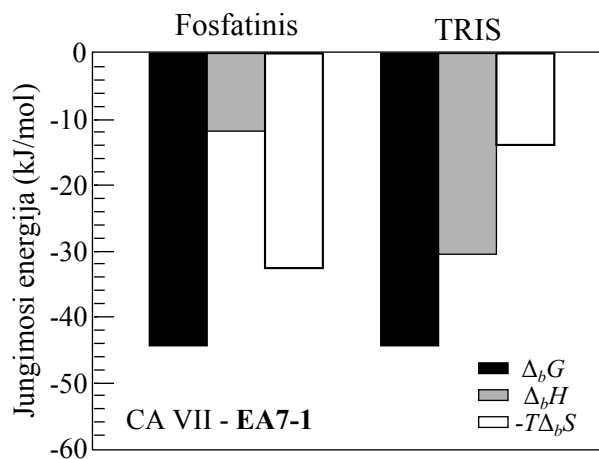


3 pav.. Išmatuotų jungimosi Gibso energijų-junginio struktūrų sąryšio schema. Išmatuotos $\Delta_b G_{obs}$ vertės yra pateiktos šalia cheminių struktūrų. Dviejų struktūriškai panašių junginių jungimosi su CA Gibso energijų skirtumai $\Delta\Delta_b G_{obs}$ yra šalia rodyklių. Spalvos nurodo skirtingas CA izoformas.

CA I, CA II, CA III, CA IV, CA VA, CA VB, CA VI, CA VII, CA IX, CA XII, CA XIII, CA XIV.



4 pav.. Išmatuotų jungimosi Gibso energijų-junginio struktūrų sąryšio schema. Išmatuotos $\Delta_b G_{obs}$ vertės yra pateiktos šalia cheminių struktūrų. Dviejų struktūriškai panašių junginių jungimosi su CA Gibso energijų skirtumai $\Delta \Delta_b G_{obs}$ yra šalia rodyklių. Spalvos nurodo skirtingas CA izoformas.



5 pav.. Junginio **EA7-1** sąveikos su CA VII termodinaminiai parametrai. Paveiksle parodytos Gibso energijos (juoda), entalpijos (pilka) ir entropijos (balta) vertės, gautos atlikus tą patį eksperimentą fosfatiniam ir TRIS buferiuose (pH 7.0, 37°C).

fotometriškai. Vienauodegių junginių pK_a vertės yra panašios, o dviuodegių - priklauso nuo *para* padėtyje esančių pakaitų: SO₂-pakeisti junginiai turi mažiausią pK_a (8.2 – 8.3), S-pakeistų pK_a vertės kinta nuo 8.9 iki 9.2, o N-pakeisti junginiai turi didžiausias pK_a vertes (9.7 – 10.2).

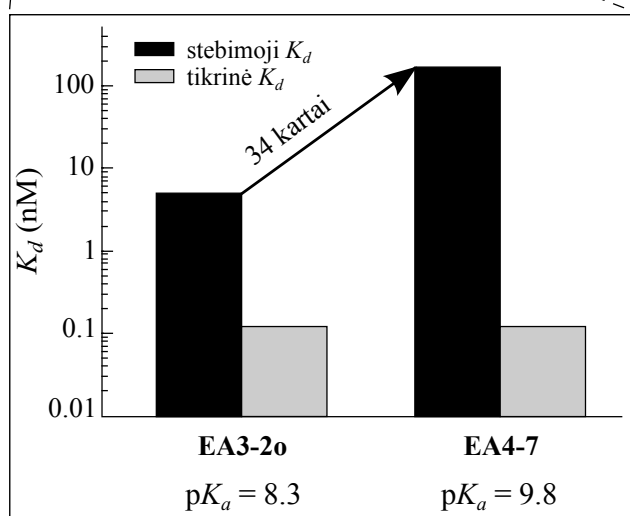
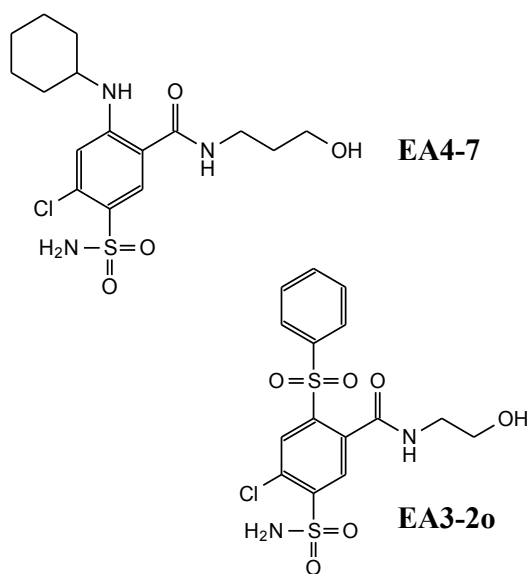
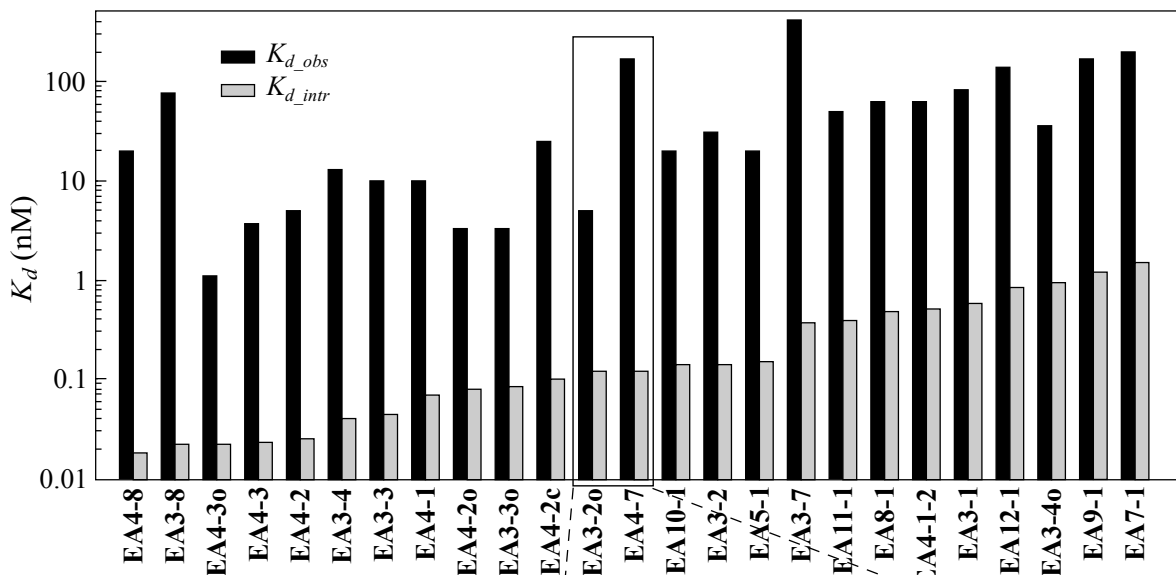
Junginių protonizacijos entalpijos buvo nustatytos ITC metodu titruojant šarminį junginio tirpalą azoto rūgštimi, kaip aprašyta metodų dalyje. Labiausiai egzotermine protonizacijos entalpija buvo nustatyta N-pakeistiems junginiams (nuo $-36.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ iki $-39.7 \text{ kJ mol}^{-1}$). Mažiausiai egzotermine protonizacijos entalpija buvo gautos SO₂ pakeistiems junginiams ($-24.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ – $-26.8 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Tikriniai termodinaminiai jungimosi parametrai. Visos tikrinės disociacijos konstantos K_{d_intr} yra neigiamesnės (didesnis afiniškumas) lyginant su išmatuotomis K_{d_obs} . Tą galima aiškiai matyti 6 paveiksle, kur junginių sąveikos su CA II K_{d_intr} išdėstytos didėjančia tvarka, tuo tarpu K_{d_obs} vertės tos tvarkos neatitinka dėl skirtingų sąveikaujančių molekulių frakcijų. Kaip parodyta pridėtiniame paveiksle, tikrinės junginių **EA3-2o** ir **EA4-7** disociacijos konstantos yra vienodos ($K_{d_intr}=0.12 \text{ nM}$), o išmatuotos vertės skiriasi 34 kartus.

Tiriami junginiai 7 ir 8 paveiksluose išdėlioti pagal funkcinių grupių skirtumus. Šalia struktūrų pateiktos jungimosi Gibso energijos, o ant rodyklių – struktūriškai panašių junginių jungimosi su CA Gibso energijų skirtumai.

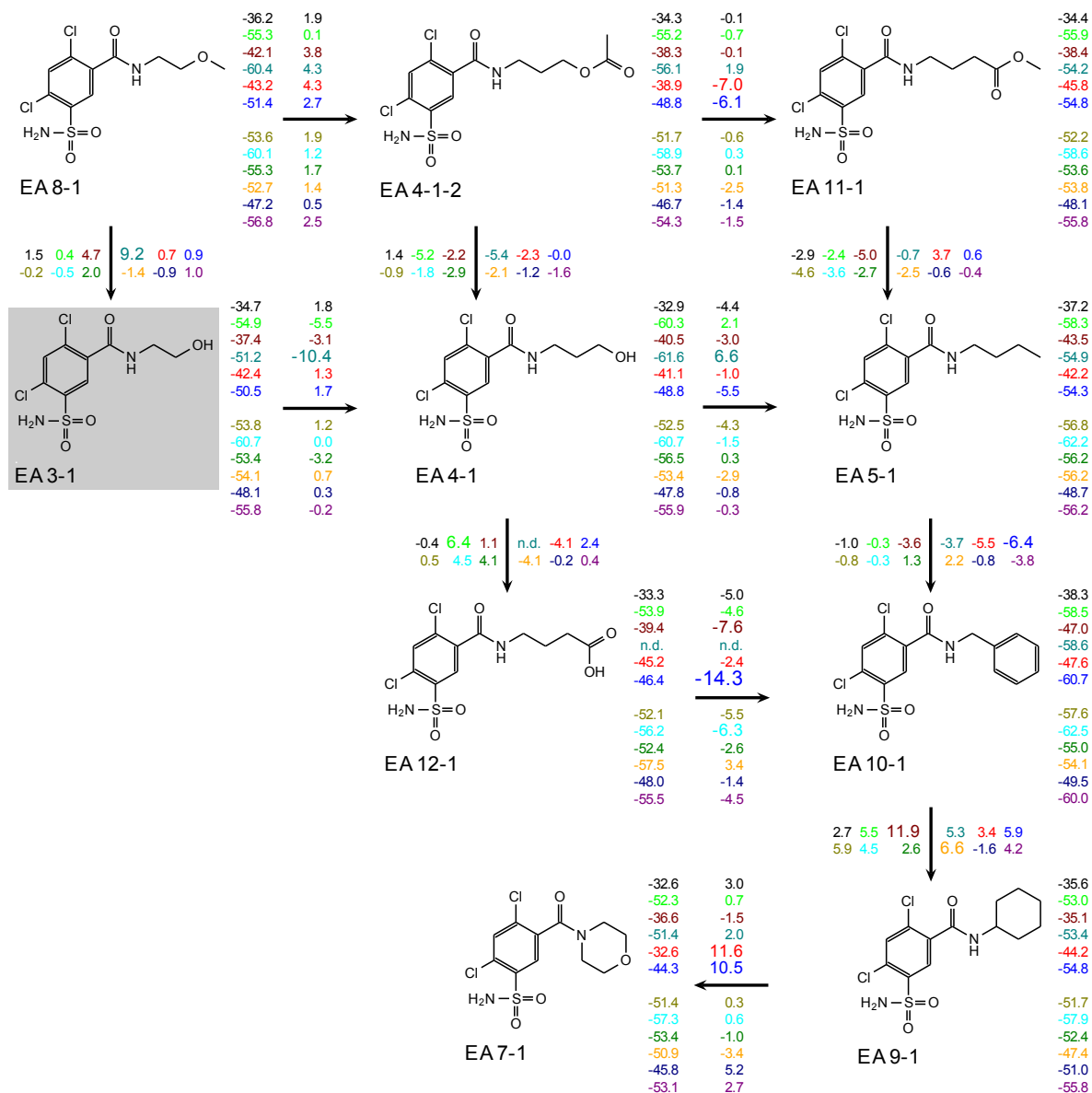
Vienauodegis startinis junginys yra **EA3-1** buvo modifikuotas tam, kad suprastumėme kaip junginio pokyčiai *meta* padėtyje įtakoja jungimosi energijas. Rezultatai parodė, kad jungimasis priklauso nuo uodegos ilgio ir hidrofobiškumo. Ilgesnę uodegą turintis junginys (**EA4-1**) yra stipriausias CA IV slopiklis, tačiau hidroksigrupės pridėjimas (junginys **EA5-1**) sumažina šią sąveiką.

Dviuodegis startinis junginys **EA3-3** buvo sukurtas *para* padėtyje prijungus S-pakeistą cikloheksilo grupę prie **EA3-1** junginio. Ši modifikacija padidino jungimosi afiniškumą su visomis CA, tik su CA IV Gibso energija liko tokia



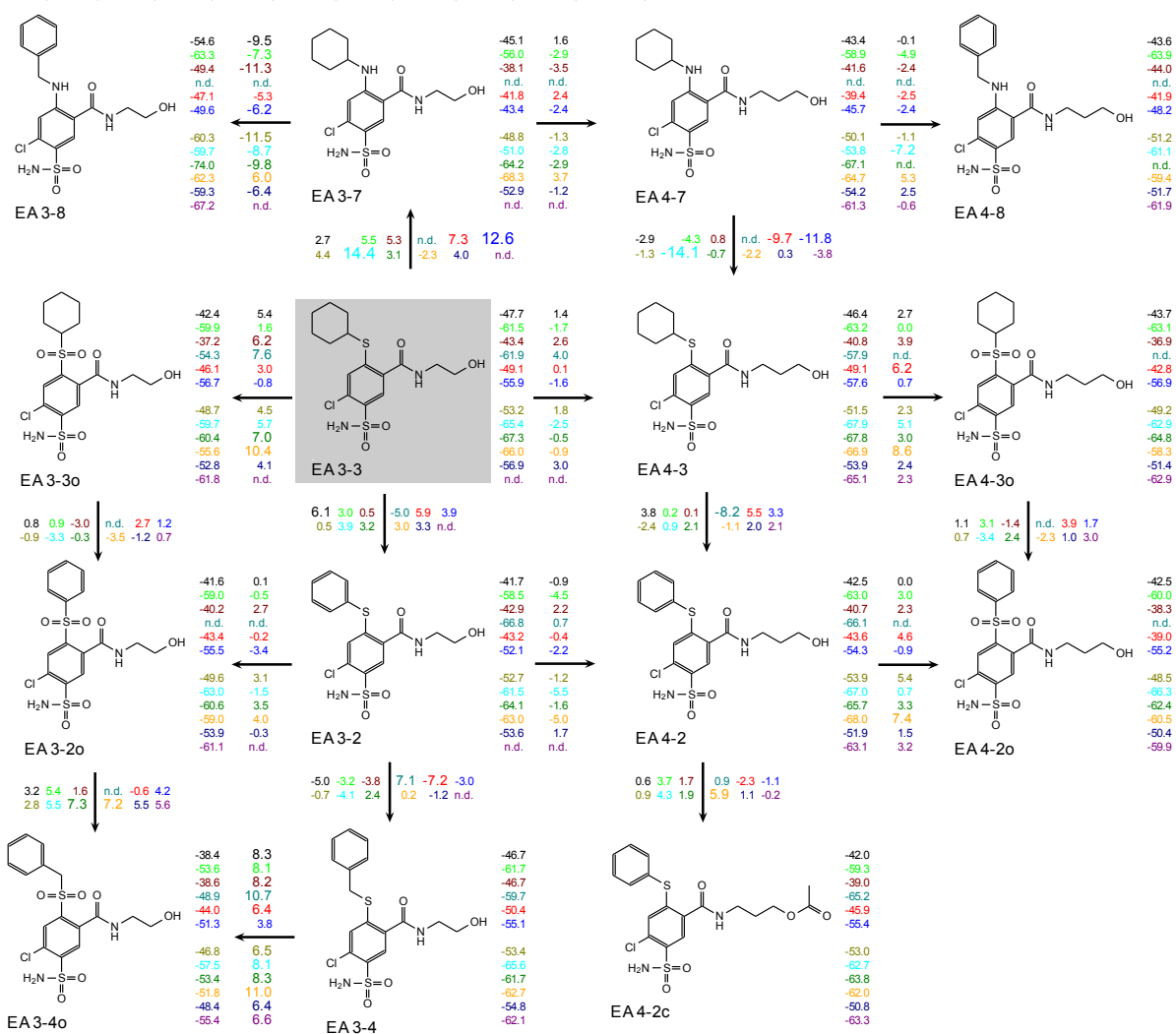
6 pav.. Karboanhidrazės II sąveikos su tiriamaisiais junginiais išmatuotų K_{d_obs} (juoda spalva) ir tikrinių K_{d_intr} (pilka spalva) jungimosi konstantų palyginimas. K_{d_obs} vertės buvo nustatytos FTSA metodu natrio fosfato buferyje, pH 7.0 (37°C). Tikrinės jungimosi konstantos yra išdėstytos didėjančia tvarka. Pridėtiniame grafike palyginamos junginių **EA4-7** ir **EA3-20** (struktūros parodytos šalia) sąveikos su CA II. K_{d_intr} vertės yra vienodos, o K_{d_obs} skiriasi, nes skiriasi junginių pK_a .

CA I, CA II, CA III, CA IV, CA VA, CA VI, CA VII, CA IX, CA XII, CA XIII, CA XIV.



7 pav.. Tikrinių jungimosi Gibso energijų-junginio struktūrų sąryšio schema. Tikrinės $\Delta_b G_{intr}$ vertės yra pateiktos šalia cheminių struktūrų. Dviejų struktūriškai panašių junginių jungimosi su CA Gibso energijų skirtumai $\Delta\Delta_b G_{intr}$ yra šalia rodyklių. Spalvos nurodo skirtingas CA izoformas.

CA I, CA II, CA III, CA IV, CA VA, CA VB, CA VI, CA VII, CA IX, CA XII, CA XIII, CA XIV.



8 pav.. Tikrinių jungimosi Gibso energijų-junginio struktūrų sąryšio schema. Tikrinės $\Delta_b G_{intr}$ vertės yra pateiktos šalia cheminių struktūrų. Dviejų struktūriškai panašių junginių jungimosi su CA Gibso energijų skirtumai $\Delta\Delta_b G_{intr}$ yra šalia rodyklių. Spalvos nurodo skirtingas CA izoformas.

pati.

Šią S-cikloheksilo grupę pakeitus N-cikloheksilo grupe (**EA3-7**), jungimosi afiniškumas sumažėjo, tačiau S-cikloheksilo grupę pakeitus į S-fenilo grupę (**3-3**→**3-2**) jungimasis tapo stipresnis su CA IV, tačiau silpnesnis su kitomis CA izoformomis.

Įdomiausios jungimosi savybės pastebėtos palyginus silpnai besijungiantį **EA3-7**, turintį N-pakeistą cikloheksilo grupę, ir struktūriškai panašų **EA3-8**, turintį N-pakeistą benzilo grupę. **EA3-8** yra stipriausiai besijungiantis junginys su CA I, CA III, CA VI, CA IX, CA XIII ir CA XIV, lyginant su kitais dviuodegiais benzensulfonamidais. N-pakeista cikloheksilo grupė (junginys **EA3-7**) ir S-pakeista benzilo grupė (**EA3-4**) sumažina jungimosi afiniškumą lyginant su startiniu **EA3-3** junginiu, bet N-pakeista benzilo grupė padidina. Tačiau toks pat junginys kaip **EA4-8**, tik turintis viena metileno grupę ilgesnę uodegą *meta* padėty, sumažina jungimosi afiniškumą visoms CA, išskyrus CA II ir CA VII (su šiomis izoformomis jungimosi afiniškumas išlieka toks pat) lyginant su **EA3-8**.

Tam, kad geriau suprastumėme baltymo-ligando sąveikas, buvo nagrinėjamas jungimosi entalpijos ir entropijos indėlis Gibso energijai. $\Delta_b G_{intr}$ (pastorintas šriftas), $\Delta_b H_{intr}$ (įprastinis šriftas), $-T\Delta_b S_{intr}$ (pasviręs šriftas) vertės yra pateiktos 9 ir 10 paveiksluose šalia struktūrų, o verčių skirtumai – šalia rodyklių.

Ligandų jungimosi su CA XII (yra kelios išimtys) ir CA XIII afiniškumą lemia entalpija, o sąveikas su CA II ir CA VII – ir entalpija, ir entropija. Įvertinus junginio struktūros-jungimosi afiniškumo sąryšį nerasta aiškios koreliacijos, tačiau keletą tendencijų galima įvardinti.

Sąveika su CA II. Vienauodegių junginių funkcinės grupės, esančios *meta* padėty, modifikavimas padidina entalpijos įtaką ligandų jungimosi su CA II konstantai, išskyrus junginį **EA4-1-2**, kur entalpijos ir entropijos indėlis yra vienodas.

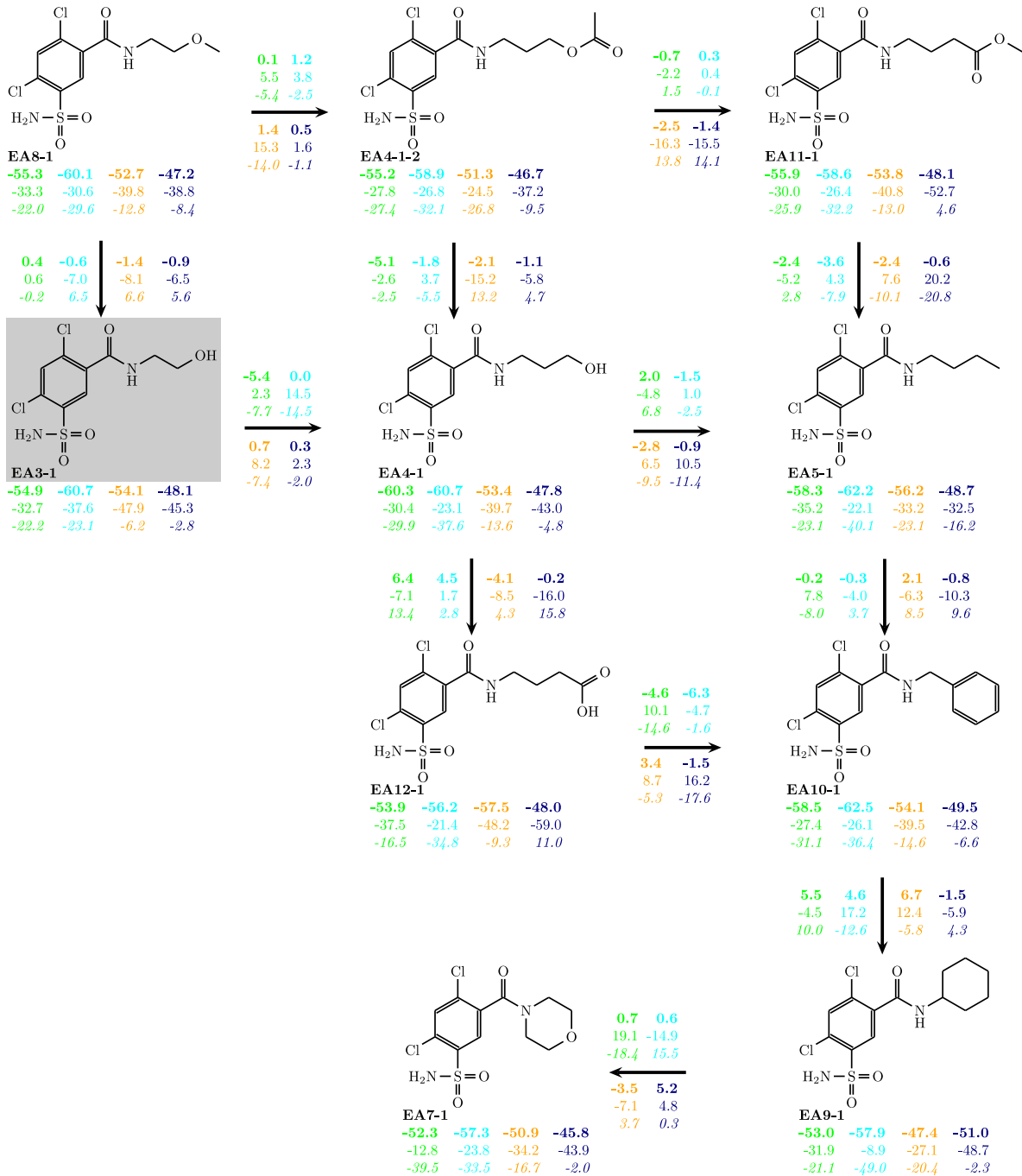
Uodegos *para* padėtyje pridėjimas prie startinio vienauodegio **EA3-1** junginio parodė, kad tik dviejų junginių entropijos ir entalpijos įtaka Gibso energijai padidėjo (**EA3-3o**, turinčio SO₂- ir **EA3-7**, turinčio N-pakeistą cikloheksilo grupę). Pakeitus cikloheksilo grupę fenilo grupe padidėjo entalpijos ir sumažėjo entropijos indėlis. Ta pati tendencija buvo pastebėta pakeitus fenilo grupę į benzilo. Tačiau *para* uodegos modifikavimas, pakeičiant S-pakaitą į SO₂, sumažino jungimosi giminingumą CA II.

Dviuodegių junginių *meta* padėties modifikavimas irgi įtakoja termodinamiškus jungimosi parametrus – vienos metileno grupės pridėjimas padidino entropijos indėlį jungimosi giminingumui (išskyrus junginiui **EA4-8**).

Sąveika su CA VII. Visų tirtų vienauodegių benzensulfonamidų sąveika su CA VII yra įtakojama entropijos, išskyrus **EA8-1**, kur tiek entropijos, tiek entalpijos įtaka Gibso energijai yra vienoda, ir **EA3-1**, kur entalpijos įtaka didesnė nei entropijos. Tačiau entalpijos indėlis Gibso energijai tampa mažesnis pridėjus antrą uodegą *para* padėty (vienintelė išimtis – junginys **EA3-3o**).

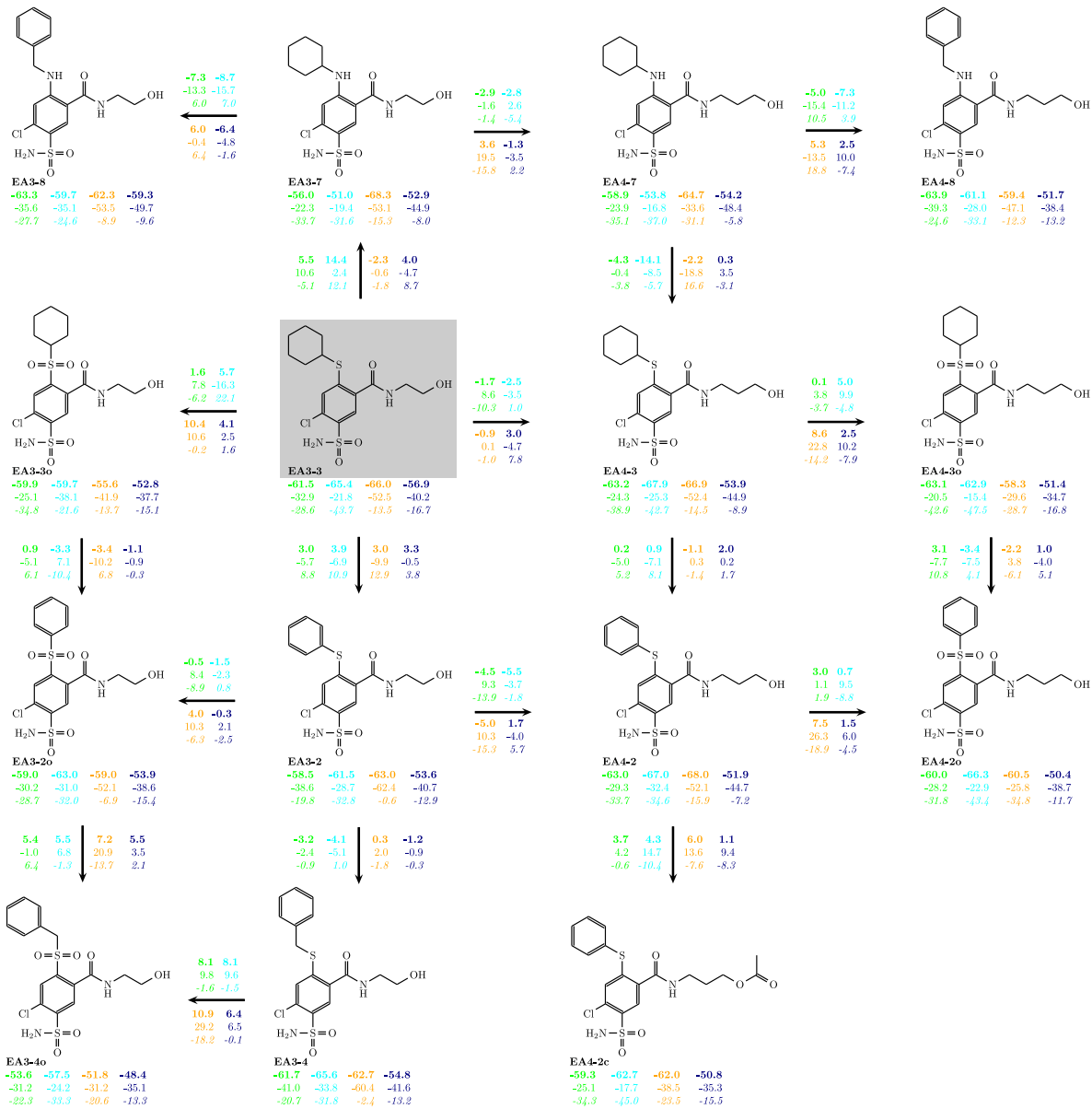
Uodega, esanti *meta* padėty, turi didelę įtaką jungimosi su CA VII entalpijai ir

CA II, CA VII, CA XII, CA XIII.



9 pav.. Tikrinių jungimosi termodinaminių parametrų-junginio struktūrų sąryšio schema. Tikrinės $\Delta_b G_{intr}$ (pastorintas šriftas), $\Delta_b H_{intr}$ (įprastinis šriftas) ir $-T\Delta_b S_{intr}$ (pasviręs šriftas) vertės yra pateiktos šalia cheminių struktūrų. Dviejų struktūriškai panašių junginių jungimosi su CA termodinaminių parametrų skirtumai yra šalia rodyklių. Spalvos nurodo skirtingas CA izoformas.

CA II, CA VII, CA XII, CA XIII.



10 pav.. Tikrinių jungimosi termodinaminių parametų-junginio struktūrų sąryšio schema. Tikrinės $\Delta_b G_{intr}$ (pastorintas šriftas), $\Delta_b H_{intr}$ (įprastinis šriftas) ir $-T\Delta_b S_{intr}$ (pasviręs šriftas) vertės yra pateiktos šalia cheminių struktūrų. Dviejų struktūriškai panašių junginių jungimosi su CA termodinaminių parametų skirtumai yra šalia rodyklių. Spalvos nurodo skirtingas CA izoformas.

entropijai: vienu anglies atomu ilgesnė uodega padidina entropijos įtaką. Išimtis pastebėta tik lyginant **EA3-3** ir **EA4-3** bei **EA3-2** ir **EA4-2** junginių poras, kur entropijos įtaka sąveikai su CA VII buvo vienoda.

Sąveika su CA XII. Vienauodegių junginių sąveika su CA XII yra įtakojama entalpijos, išskyrus **EA4-1-2**, kur entalpijos ir entropijos indėlis Gibso energijai yra vienodas. Junginių **EA3-1**, **EA11-1** ir **EA12-1** jungimasis yra labiausiai entalpijos įtakojamas lyginant su kitais vienauodegiais benzonsulfonamidais. Antros uodegos *para* padėtyje pridėjimas prie **EA3-1** padidina jungimosi afiniškumą visoms CA, išskyrus junginį **EA3-4o**.

Startinio dviuodegio junginio **EA3-3** S-cikloheksilo grupę pakeitus į fenilo (junginys **EA3-2**) arba benzilo (junginys **EA3-4**), entropijos įtaka stipriai sumažėja, tuo tarpu SO₂ pakeisti junginiai, turintys ilgesnes uodegas *meta* padėtyje (**EA4-3o** ir **EA4-2o**), taip pat ir N-pakeistas junginys **EA4-7**, padidina entropijos ir sumažina entalpijos įtaką jungimosi afiniškumui.

Sąveika su CA XIII. Karboanhidrazės XIII jungimasis su tirtais vienauodegiais junginiais yra įtakojamas entalpijos ir turi labai nedidelę entropijos įtaką, o junginių **EA11-1** ir **EA12-1** sąveika su šia izoforma yra entropiškai nepalanki.

Pakaito pridėjimas *para* padėtyje padidina entropijos įtaką jungimuisi. Cikloheksilo grupės pakeitimas į S-fenilo ar benzilo grupes neįtakoja jungimosi entalpijos, tačiau N-cikloheksilo grupė padidina entalpijos įtaką.

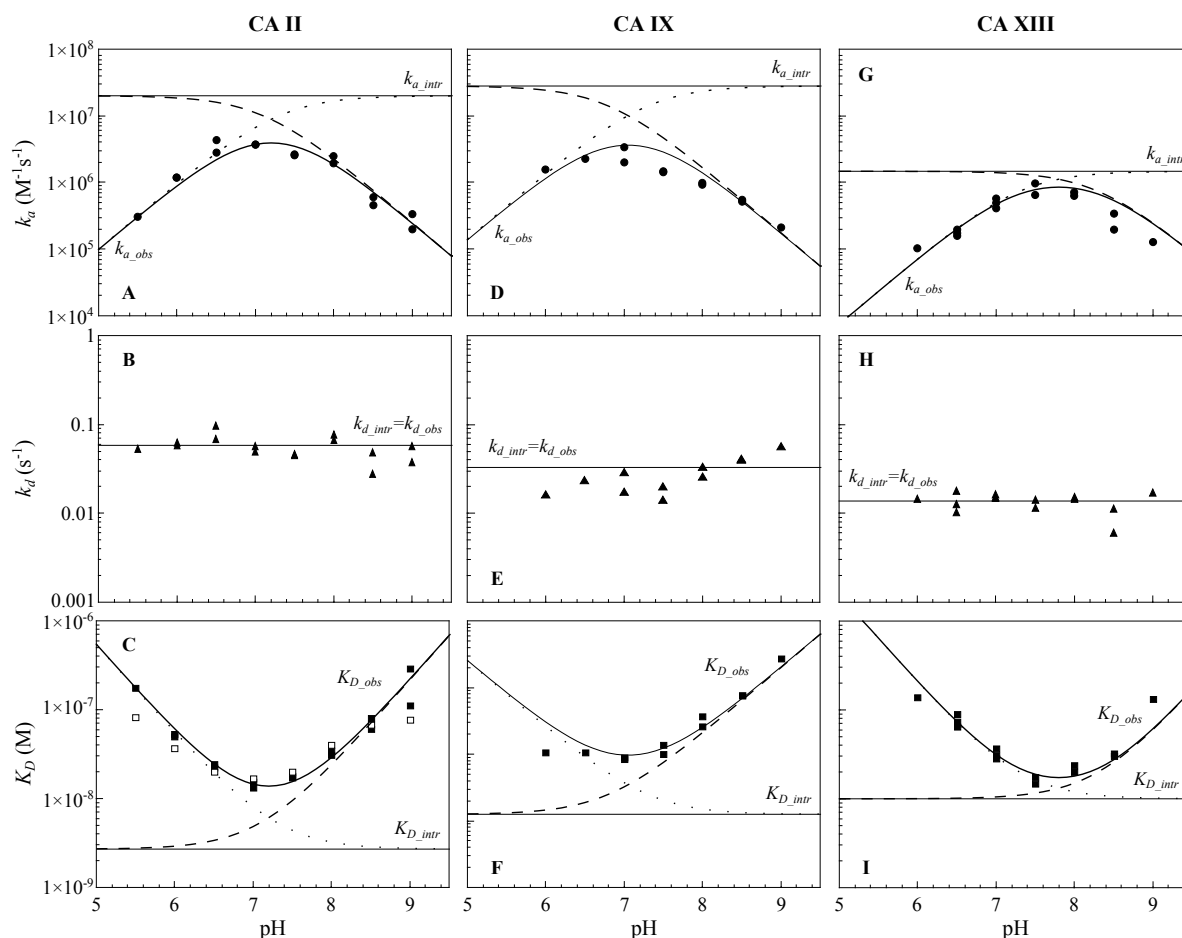
Junginys **EA3-8** yra stipriausias CA XIII slopiklis lyginant su visais tirtais benzonsulfonamidais ir turi didžiausią entalpijos įtaką lyginant su dviuodegiais junginiais.

Įvadas į baltymo-ligando sąveikos tikrinę kinetiką ir jos reikšmė vaistų kūrimui

Išmatuoti baltymo-ligando sąveikos asociacijos ir disociacijos greičiai suteikia svarbios informacijos apie komplekso formavimosi mechanizmus ir junginio savybes. Tai padeda kurti, modifikuoti bei optimizuoti junginius. Publikuotos abejonės dėl CA-sulfonamidinių slopiklių jungimosi mechanizmo paskatino mus atlikti sąveikos priklausomybės nuo pH kinetinius matavimus naudojant SPR metodą.

Eksperimentai buvo atlikti su trimis CA izoformomis. Pav. 11 rodo **AZM** sąveikos su CA II, CA IX ir CA XIII priklausomybę nuo pH: išmatuoti asociacijos greičiai k_{a_obs} kinta keičiantis pH; išmatuoti disociacijos greičiai k_{d_obs} nuo pH nepriklauso; pusiausvyros konstantų K_{D_obs} priklausomybė nuo pH atitinka termodinaminiais metodais gautą jungimosi afiniškumo priklausomybę.

Išmatuotiems ir tikriniais greičio konstantų skirtumams bei kinetinių parametrų priklausomybei nuo pH paaiškinti buvo įvestas mechanistinis modelis (Pav. 12). Visos molekulės, dalyvaujančios ir įtakojančios išmatuojamus parametrus yra atvaizduotos modelio A dalyje, tuo tarpu dalyvaujančios tik tikrinėje sąveikoje (kur baltymas ir junginys sąveikauja aktyviose formose) yra parodytos dalyje B, pilkoje srityje. Šis modelis rodo, kad sąveikaudami su cinko jonu aktyviajame CA centre sulfonamidai yra deprotonizuoti, o vandens molekulė,



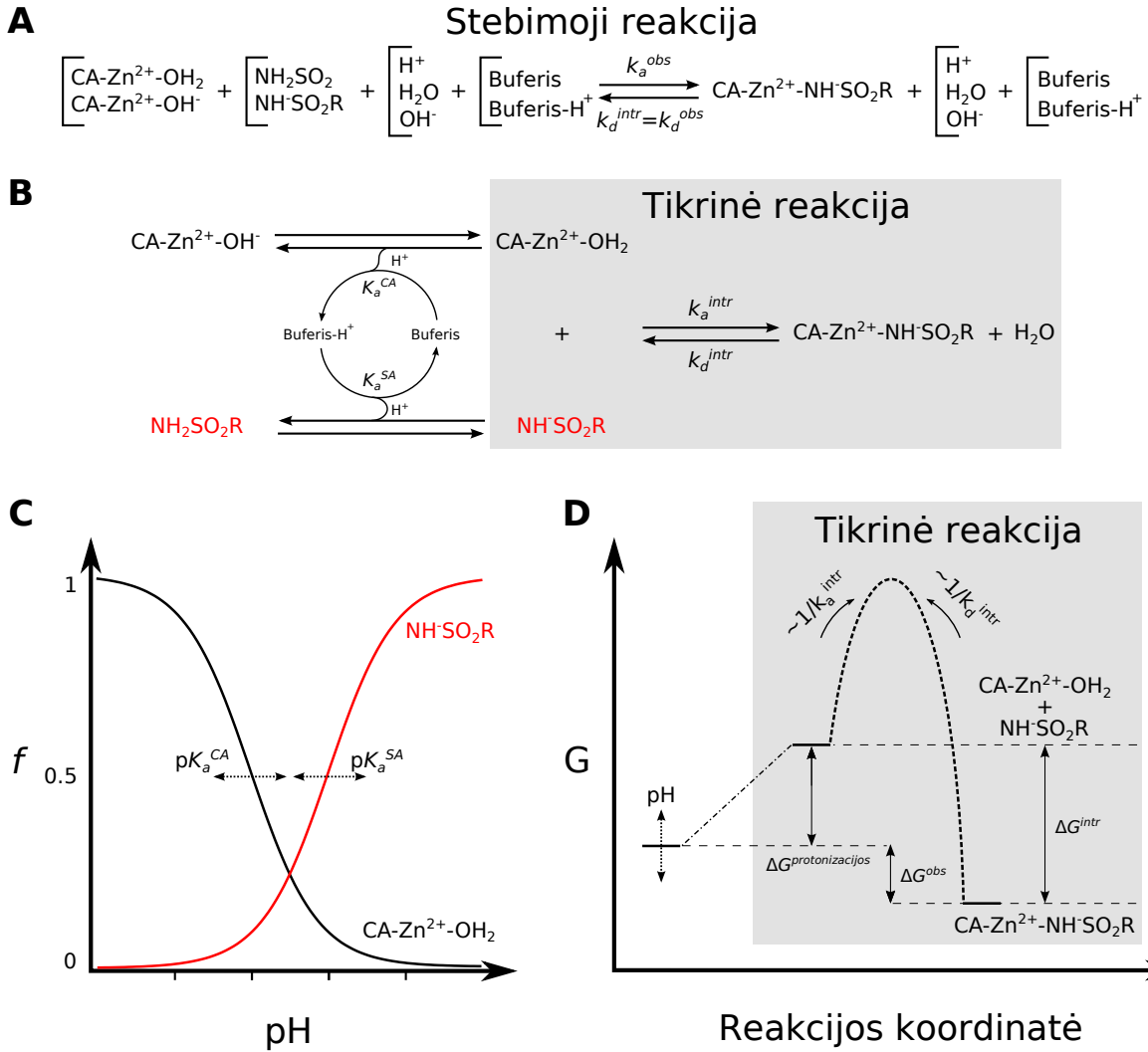
11 pav.. Išmatuotų kintinių ir termodinaminių parametų priklausomybė nuo pH ir tikrinės vertės, nepriklausančios nuo pH. Kinetinė **AZM** sąveika su CA II, CA IX ir CA XIII buvo išmatuota SPR metodu (juodi simboliai). CA II–**AZM** jungimosi K_D vertės, gautos FTSA metodu skirtinguose pH yra parodyti kaip juodi kvadratai apatiniame kairiajame grafike. Juods kreivės yra sąveikos teorinis modelis, aprašomas 15 lygtimi, takinė ir punktyrinė linijos rodo deprotonizuoto **AZM** ir protonizuotos CA frakcijų priklausomybę nuo pH.

prisijungusi prie Zn(II) yra protonizuotoje, elektrostatiškai neutralioje formoje tam, kad būtų pakeista deprotonizuoto sulfonamido. Priklausomai nuo pH, dvi reakcijos turi įvykti prieš tai, kai ligandas prisijungia prie Zn(II): 1) prie Zn(II) prisijungusio hidroksido protonizacija (12 paveikslo B dalies viršuje, užrašyta juodai), ir 2) sulfonamido deprotonizacija (12 paveikslo B dalies apačioje, užrašyta raudonai).

Deprotonizuoto sulfonamido ir protonizuoto hidroksido jono aktyviajame baltymo centre frakcijos ($f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-}$ ir $f_{\text{CAZnH}_2\text{O}}$) apskaičiuojamos pagal aukščiau aprašytas 13 ir 12 lygtis. Pasinaudojant šiomis lygtimis buvo nubrėžtas grafikas 12 paveikslo C dalyje, parodantis kaip frakcijos priklauso nuo pH.

Pagal duomenis, gautus atlikus eksperimentus skirtinguose pH, galime daryti išvadą, kad išmatuoti ir tikriniai disociacijos greičiai yra lygūs, nes neįtakojami protonizacijos reakcijos:

$$k_{d_obs} = k_{d_intr} \quad (16)$$



12 pav.. Sulfonamidinio junginio sąveikos su karboanhidraze modelis. A) Schema rodo molekules, kurios dalyvauja komplekso formavime ir įtakoja išmatuotas vertes. B) Jungimosi proceso ir intrinšinės reakcijos (pilkame fone) schema. C) Protonizuotos CA (juoda) ir deprotonizuoto sulfonamido (raudona) frakcijų priklausomybė nuo pH (12 ir 13 lygtys). D) Išmatuotų ir tikrinių reakcijų Gibso energijos schema.

Tuo tarpu asociacijos greičiai aprašomi lygtimi:

$$k_{a_intr} = \frac{k_{a_obs}}{f_{\text{CAZnH}_2\text{O}} f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-}} \quad (17)$$

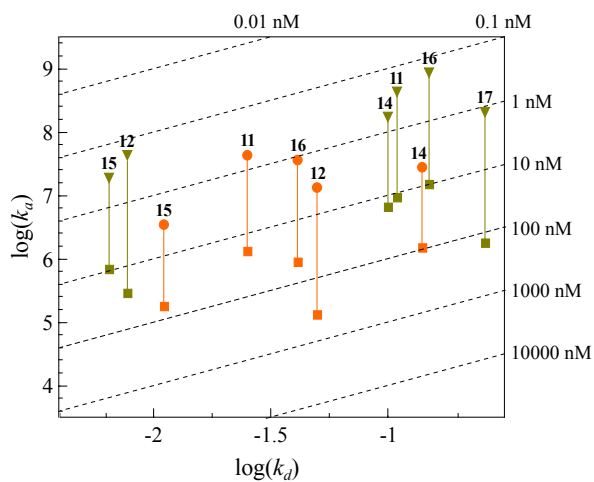
Tikrinė pusiausvyros disociacijos konstanta K_{D_intr} yra lygi tikrinių asociacijos ir disociacijos greičių santykiui:

$$K_{D_intr} = \frac{k_{d_intr}}{k_{a_intr}} \quad (18)$$

Šis sąryšis parodytas 12D paveiksle.

Įdomu tai, kad sulfonamidai apibūdinami kaip “lėti” ligandai, kurių asociacija yra dviejų stadijų procesas. Šį reiškinį įtakoja jungimuisi tinkamų, aktyviose

formose sąveikaujančių molekulių koncentracijos. Palyginus išmatuotus kinetinius parametrus su tikriniais, buvo gauta, jog kai kurių junginių sąveikos su CA izoformomis tikrinės asociacijos greičio konstantos pasiekia difuzijos greitį (13 pav.), tuo tarpu stebimosios k_{a_obs} yra ganėtinai lėtos. Taigi, eksperimentiškai išmatuotos asociacijos greičio konstantos neturėtų būti naudojamos struktūros-aktyvumo sąveikai vertinti.



13 pav.. Kelių sulfonamidinių junginių sąveikos su CA IX (žali simboliai) ir CA XII (oranžiniai simboliai) išmatuotų (apatiniai kvadratai) ir tikrinių (viršutiniai simboliai) kinetinių parametru palyginimas. Tos pačios reakcijos išmatuotos ir tikrinės vertės yra sujungtos linijomis. Eksperimentiniai duomenys gauti SPR metodu fosfatiniame buferyje, pH 7.4 (25°C).

Išvados

1. Aktyviajame baltymo centre prie Zn(II) prisijungusio hidroksido anijono pK_a vertės yra 8.4, 6.8 ir 7.0 atitinkamai CA I, CA IX ir CA XII izoformoms (25°C, nustatyta FTSA ir ITC metodais). Aktyviajame CA I, CA IX ir CA XII centre prie Zn(II) prisijungusio hidroksido anijono protonizacijos entalpijos yra atitinkamai lygios $-41.0 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-24.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ir $-28.0 \text{ kJ mol}^{-1}$.
2. Naudojant sulfonamidų jungimosi su CA metu vykstančių susijusių protonizacijos reakcijų modelį bei įvertinus buferio ir pH įtaką gautos tikrinės jungimosi entalpijos ir Gibso energijos.
3. Apskaičiavus tikslų sąveikaujančių medžiagų frakcijų skaičių kai kurių tirtų junginių asociacijos greitis pasiekia difuzijos limituojamą greitį.

Publikacijų sąrašas

Publikacijos, įtrauktos į disertaciją

1. Jogaitė, V., Zubrienė, A., Michailovienė, V., Gylytė, J., **Morkūnaitė, V.**, Matulis, D. Characterization of human carbonic anhydrases XII stability and inhibitor binding. *Bioorg. Med. Chem.* 21(6) (2013) 1431-1436.
2. **Morkūnaitė, V.**, Gylytė, J., Zubrienė, A., Baranauskienė, L., Kišonaitė, M., Michailovienė, V., Juozapaitienė, V., Todd, M. J., Matulis, D. Intrinsic thermodynamics of sulfonamide inhibitor binding to human carbonic anhydrases I and II. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 30(2) (2015) 204-211.
3. **Linkuvienė, V.**, Matulienė, J., Juozapaitienė, V., Michailovienė, V., Jachno, J., Matulis, D. Intrinsic thermodynamics of inhibitor binding to human carbonic anhydrase IX. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1860 (2016) 708-718.
4. Talibov, V. O., **Linkuvienė, V.**, Matulis, D., Danielson U. H. Kinetically Selective Inhibitors of Human Carbonic Anhydrase Isozymes I, II, VII, IX, XII, and XIII. *J. Med. Chem.* 59 (2016) 2083-2093.
5. **Linkuvienė, V.**, Talibov., V. O., Danielson, U. H., Matulis, D. Introduction of intrinsic kinetics of protein-ligand interactions and their implications for drug design. *Submitted.*

Publikacijos, neįtrauktos į disertaciją

1. Pirrie, L., McCarthy, A. R., Major, L. L., **Morkūnaitė, V.**, Zubrienė, A., Matulis, D., Lain, S., Lebl, T., Westwood, N. Discovery and Validation of SIRT2 Inhibitors Based on Tenovin-6: Use of a 1H-NMR Method to Assess Deacetylase Activity. *Molecules* 17 (2012) 12206-12224.
2. **Morkūnaitė, V.**, Baranauskienė, L., Kairys, V., Ivanova, J., Trapencieris, P., Matulis, D. Saccharin sulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrases I, II, VII, XII, and XIII. *Biomed. Res. Int.* (2014) doi: 10.1155/2014/638902.
3. Rutkauskas, K., Zubrienė, A., Tumosiene, I., Kantminienė, K., Kažemėkaitė, M., Smirnov, A., Kazokaitė, J., **Morkūnaitė, V.**, Čapkauskaitė, E., Manakova, E., Gražulis, S., Beresnevičius, Z. J., Matulis, D. 4-amino-substituted benzenesulfonamides as inhibitors of human carbonic anhydrases. *Molecules*, 19(11) (2014) 17356-17380.
4. Dudutienė, V., Matulienė, J., Smirnov, A., Timm, D. D., Zubrienė, A., Baranauskienė, L., **Morkūnaitė, V.**, Smirnovienė, J., Michailovienė, V., Juozapaitienė, V., Mickevičiūtė, A., Kazokaitė, J., Bakšytė, S., Kasiliauskaitė, A., Jachno, J., Revuckienė, J., Kišonaitė, M., Pilipuitytė, V., Ivanauskaitė, E., Milinavičiūtė, G.,

- Smirnovas, V., Petrikaitė, V., Kairys, V., Petrauskas, V., Norvaišas, P., Lingė, D., Gibieža, P., Čapkauskaitė, E., Zakšauskas, A., Kazlauskas, E., Manakova, E., Gražulis, S., Ladbury, J. E., Matulis, D. Discovery and characterization of novel selective inhibitors of carbonic anhydrase IX. *J. Med. Chem.* 57(22) (2014) 9435-9446.
5. Redhead, M., Satchell, R., **Morkūnaitė, V.**, Swift, D., Petrauskas, V., Golding, E., Onions, S., Matulis, D., Unitt, J. A combinatorial biophysical approach; FTSA and SPR for identifying small molecule ligands and PAINS. *Anal. Biochem.* 479 (2015) 63-73.
 6. Zubrienė, A., Smirnovienė, J., Smirnov, A., **Morkūnaitė, V.**, Michailovienė, V., Jachno, J., Juozapaitienė, V., Norvaišas, P., Manakova, E., Gražulis, S., Matulis, D. Intrinsic thermodynamics of 4-substituted-2,3,5,6-tetrafluoro benzenesulfonamide binding to carbonic anhydrases by isothermal titration calorimetry. *Biophys. Chem.* 205 (2015) 51-65.
 7. **Linkuvienė, V.**, Krainer, G., Chen, W.-Y., Matulis, D. Isothermal titration calorimetry for drug design: Precision of the enthalpy and binding constant measurements and comparison of the instruments. *Anal. Biochemistry.* 515 (2016) 61-64.
 8. Čapkauskaitė, E., **Linkuvienė, V.**, Smirnov, A., Milinavičiūtė, G., Timm, D., Kasiliauskaitė, A., Manakova, E., Gražulis, S., Matulis, D. Combinatorial design of isoform-selective *N*-alkylated benzimidazole-based inhibitors of carbonic anhydrases. *ChemistrySelect* 2 (2017) 5360-5371.

Patentinė paraiška:

1. Selected inhibitors of Carbonic Anhydrase. PCT/IB2015/056626. 2015-09-01. Čapkauskaitė, E., Zakšauskas, A., Linkuvienė, V., Matulis, D.

Konferencijų pranešimai:

Žodiniai pranešimai

1. **Linkuvienė, V.**, Talibov, V. O., Danielson, H., Matulis, D. Intrinsic vs. observed thermodynamic and kinetic parameters of carbonic anhydrase-ligand interaction. 19th IUPAB/11th EBSA/BBS/IoP Congress, Edinburgas, Škotija, 2017.
2. **Linkuvienė, V.**, Matulis, D. Intrinsic thermodynamic parameters of *o*-, *m*-substituted benzenesulfonamide inhibitors binding to carbonic anhydrase. XIV International Conference of the Lithuanian Biochemical Society, Druskininkai, Lietuva, 2016.
3. **Linkuvienė, V.**, Matulis, D. Thermodynamics of carbonic anhydrase - inhibitor binding for drug design. XIX ISBC Conference, Bazelis, Šveicarija, 2016.

Trumpi žodiniai pranešimai (Flash presentations)

1. **Linkuvienė, V.**, Matulis, D. Comparison of titration calorimeters: High affinity and enthalpy precision. 2nd Annual European MicroCal Meeting, Paryžius, Prancūzija, 2016.

Stendiniai pranešimai

1. **Linkuvienė, V.**, Zubrienė, A., Paketurytė, V., Smirnov, A., Petrauskas, V., Matulis, D. Database of CA Protein-Ligand Binding Gibbs Energies, Enthalpies, Entropies, Volumes, and Crystal Structures. Biophysical Society 61st Annual Meeting, Naujasis Orleansas, Luiziana, JAV, 2017.
2. **Linkuvienė, V.**, Matulis, D. Comparison of titration calorimeters: High affinity and enthalpy precision. 2nd Annual European MicroCal Meeting, Paryžius, Prancūzija, 2016.
3. **Morkūnaitė, V.**, Čapkauskaitė, E., Matulis, D. Intrinsic thermodynamics-structure correlations of sulfonamides binding to carbonic anhydrase IX. 10th EBSA European Biophysics Congress, Drezdenas, Vokietija, 2015.
4. **V. Morkūnaitė**, J. Matulienė, A. Zubrienė, M. Kišonaitė, L. Baranauskienė, J. Jachno, V. Michailovienė, and D. Matulis. "Recombinant production and calorimetric characterization of human carbonic anhydrase IX". "XVIII ISBC International Society for Biological Calorimetry Conference". Lundas, Švedija. 2014 06 01-04.
5. **V. Morkūnaitė**, L. Baranauskienė, A. Zubrienė, A. Smirnov, R. Žalubovskis, P. Trapencieris, Matulis, D. "Intrinsic Thermodynamic Parameters of Thiophene Sulfonamide Binding to Carbonic Anhydrases I, II and XII". "COST Epigenetics: Bench to Bedside". Vilnius, Lietuva. 2013 10 30-31.

Norėčiau padėkoti moksliniam vadovui prof. D. Matuliui už galimybę gilinti žinias ir dirbti jo vadovaujamoje laboratorijoje.

Ačiū visam Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriaus kolektyvui už draugišką atmosferą ir naudingus patarimus visus šiuos metus.

Esu dėkinga molekulinės biologijos grupei už rekombinantinius baltymus ir chemikams už susintetintus junginius. Reiškiu nuoširdų dėkingumą Astai, Linai ir Egidijui už suteiktą pagalbą, kai būdavau pasiklydusi molekulinio pasaulio ir biofizikinių metodų labirintuose. Ypatingai dėkoju Vytautui už L^AT_EX, racionalų protą ir visus patarimus bei atsakymus. Agnei ir Justinai ačiū už kavos bei išklausymo pertraukėles.

Dėkoju Lietuvos mokslų tarybai už finansinę paramą.

Už priėmimą, pagalbą, bendradarbiavimą bei kartu parašytas mokslines publikacijas esu dėkinga Vladimir O. Talibov ir prof. U. Helena Danielson.

Jaučiuosi skolinga savo šeimai, vyrui Vytautui už šilumą ir palaikymą, draugams, ypač Editai Vernickaitei ir Justinai Šarkanei – už tikėjimą ir manymą, jog esu geresnė, nei yra iš tikrųjų, ir ypatingai savo broliui Mariui – už buvimą autoritetu.

Summary

This work is focused on the intrinsic thermodynamics and kinetics of carbonic anhydrase protein interaction with sulfonamide compounds. It is of great interest scientifically and it is poorly understood how small changes in compound chemical structure can so substantially increase or decrease the binding affinity and kinetics, thus the structure-thermodynamics and structure-kinetics relationships have been analyzed with implications for drug design.

Experiments provide information about the summed energy of all linked reactions that occur during the formation of a ligand–protein complex. Linked protonation effect can influence the observed results where the same reaction, performed in various buffers and pHs yields different thermodynamic and kinetic values. Therefore, it is important to dissect the protonation influence and obtain the intrinsic energies and association-dissociation rates of binding that do not depend on such conditions as buffer or pH. To calculate the intrinsic parameters, pK_a s of interacting species must be known.

The ionization constants of three CA isoforms and 25 structurally related dual-tailed benzenesulfonamides were determined. Thermodynamic parameters of CA-compound binding were obtained and the intrinsic parameters were calculated. Analysis of compound structure–intrinsic thermodynamics has been performed.

The protonation reactions influence not only parameters of binding thermodynamics, but interaction kinetics as well. SPR experiments of CA-sulfonamide binding were performed at different pHs and showed that the association rate constant depends on pH, while the dissociation rate constant does not. Interaction of eighteen different compounds with CAs were obtained and the intrinsic parameters calculated. The strongest binders showed the longest residence times. Moreover, association rates of several compounds with CAs reached the diffusion-limited rates.

The aim of this dissertation was to determine the influence of linked protonation effects to the thermodynamic and kinetic parameters of ligand binding to several recombinant human carbonic anhydrases and to explore the compound structure-thermodynamics and compound structure-kinetics relationship for sulfonamide inhibitor binding to CA isoforms.

Bibliografija

LITERATŪRA

- [1] Hopkins, A.L., Groom, C.R.: The druggable genome. *Nature Reviews Drug Discovery* **1**(9), 727–730 (2002). doi:10.1038/nrd892
- [2] Hodgson, T.H.: The Carbonic Anhydrase Content of Blood in Pathological States in Man. *British Journal of Experimental Pathology* **17**(1), 75–80 (1936)
- [3] Meldrum, N.U., Roughton, F.J.W.: Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *The Journal of Physiology* **80**(2), 113–142 (1933)
- [4] Alterio, V., Di Fiore, A., D’Ambrosio, K., Supuran, C.T., De Simone, G.: Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? *Chemical Reviews* **112**(8), 4421–4468 (2012). doi:10.1021/cr200176r
- [5] Supuran, C.T., Fiore, A.D., Simone, G.D.: Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity. *Expert Opinion on Emerging Drugs* **13**(2), 383–392 (2008). doi:10.1517/14728214.13.2.383
- [6] Supuran, C.T.: How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **31**(3), 345–360 (2016). doi:10.3109/14756366.2015.1122001
- [7] Klebe, G.: Applying thermodynamic profiling in lead finding and optimization. *Nature Reviews Drug Discovery* **14**(2), 95–110 (2015). doi:10.1038/nrd4486
- [8] Kawasaki, Y., Freire, E.: Finding a better path to drug selectivity. *Drug Discovery Today* **16**(21–22), 985–990 (2011). doi:10.1016/j.drudis.2011.07.010
- [9] Biela, A., Sielaff, F., Terwesten, F., Heine, A., Steinmetzer, T., Klebe, G.: Ligand Binding Stepwise Disrupts Water Network in Thrombin: Enthalpic and Entropic Changes Reveal Classical Hydrophobic Effect. *Journal of Medicinal Chemistry* **55**(13), 6094–6110 (2012). doi:10.1021/jm300337q

VAIDA LINKUVIENĖ

Curriculum Vitae

Asmeninė informacija

Gimimo data: 1988 08 27

Gimimo vieta: Panevėžys, Lietuva

Elektroninis paštas: morkunaite@ibt.lt

Mob. nr.: +370 689 87303

Darbovietė

Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyrius

Biotechnologijos institutas, Vilniaus universitetas

Gyvybės mokslų centras, Saulėtekio 7

LT-10257, Vilnius, Lietuva

IŠSILAVINIMAS

Doktorantūros studijos, biofizika, Vilniaus universitetas

2013 - 2017

- Vadovas: Prof. Daumantas Matulis
- Darbo tema: Sulfonamidinių junginių sąveikos su karboanhidrazėmis išmatuoti ir tikriniai termodinaminiai bei kinetiniai parametrai

Magistrantūros studijos, biofizika, Vilniaus universitetas

2011 - 2013

- Vadovas: Prof. Daumantas Matulis
- Darbo tema: Karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII slopiklių paieška bei tikrųjų termodinaminių parametrų nustatymas

Bakalauro studijos, biofizika, Vilniaus universitetas

2007 - 2011

- Vadovas: Prof. Osvaldas Rukšėnas
- Darbo tema: Kvapų skyrimo palyginimas tarp lyčių

DARBO PATIRTIS

Biotechnologijos institutas, Vilniaus universitetas

2014 spalio - dabar

- Pareigos: Jaunesnioji mokslo darbuotoja
- Skyrius: Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo

Biotechnologijos institutas, Vilniaus universitetas

2011 spalio - 2014 spalio

- Pareigos: Bioinžinierė
- Skyrius: Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo

PRAKTIKOS

Upsalos universitetas, Švedija

2016 spalio - 2016 lapkritis

Erasmus praktika

- Konsultantas: prof. U. Helena Danielson
- Karboanhidrazių-ligandų sąveikos kinetika

"Jožef Stefan" institutas, Slovėnija

2016 vasaris - 2016 kovas

Erasmus praktika

- Konsultantas: prof. Janez Štrancar
- Karboanhidrazių slopinimo vėžinėse ląstelėse fluorescencinis vaizdinimas

Sygnature Discovery, Anglija

2015 sausis - 2015 vasaris

Praktika

- Konsultantas: Dr. Martin Redhead
- Baltymo-ligando sąveikos kinetinė analizė paviršiaus plazmono rezonanso (PPR) metodu

Nicos chemijos institutas, Prancūzija

2012 birželis - 2012 rugsėjis

Erasmus praktika

- Konsultantas: Dr. Nadine Martinet
- Junginių analizė fluorescencijos metodais

"TA Instruments", Solentuna, Švedija

2011 lapkritis

Praktika

- Konsultantas: Peter Vikegard
- Baltymo-ligando jungimosi matavimai TAM III kalorimetru

Linkoping universitetas, Linkoping, Švedija

2011 lapkritis

Praktika

- Konsultantas: Prof. Per Hammarstrom
- Baltymo-ligando jungimosi matavimai Wilburn-Anderson metodu

NARYSTĖS

Amerikos biofizikų draugija

2013, 2017

www.biophysics.org

Lietuvos biofizikų draugija

nuo 2014

www.lbfd.lt

Lietuvos biochemikų draugija

2016

www.biochemistry.lt

APDOVANOJIMAI

Europos biofizikų draugijų asociacijos (EBSA) stipendija

2015, 2017

Stipendija skirta dalyvauti Europos biofizikų konferencijoje

PROJEKTAI

TAP LLT-1/2015 Lietuvos – Latvijos – Kinijos (Taivano) programos projektas: „Priešvėžinių farmacinių junginių kūrimas naudojant lyderinio junginio - taikinio sąveikos struktūrą bei energetiką“, vadovas Daumantas Matulis. Vykdyto terminas 2016 - 2018 m.

VP1-3.1-ŠMM-07-K-009 Visuotinė dotacija „Atrankių karboanhidrazių slopiklių sintezė ir priešvėžinių savybių tyrimas“, vadovas Daumantas Matulis. Vykdyto terminas 2012 09 02 – 2015 10 01.

PATENTINĖ PARAIŠKA

Selected inhibitors of Carbonic Anhydrase. PCT/IB2015/056626. 2015-09-01. Čapkauskaitė, E., Zakšauskas, A., Linkuvienė, V., Matulis, D.