# VILNIAUS UNIVERSITETAS Biochemijos ir biofizikos katedra

Biochemijos studijų programos magistrantė

Lina MIŠTINAITĖ

Magistrinis darbas

Karboanhidrazių – sulfonamidinių slopiklių sąveikos termodinaminio mechanizmo tyrimas izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu

> Darbo vadovas: Dr. D. Matulis

Vilnius 2006

# Karboanhidrazių – sulfonamidinių slopiklių sąveikos termodinaminio mechanizmo tyrimas izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu

Darbas atliktas Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje

Lina MIŠTINAITĖ

Darbo vadovas:

Dr. Daumantas MATULIS

Santrumpos.		4
ĮVADAS		5
1. LITERA	ATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Ka	rboanhidrazės	7
1.1.1.	Bendra karboanhidrazių charakteristika	7
1.1.2.	α-karboanhidrazių šeima	8
1.1.3.	Su karboanhidrazių aktyvumu susijusios ligos	12
1.1.4.	Karboanhidrazių struktūra	13
1.1.5.	Karboanhidrazių sąveika su sulfonamidiniais slopikliais	17
1.2. Ba	tymų – ligandų jungimosi termodinaminis charakterizavimas	19
1.2.1.	Baltymų – ligandų jungimosi tyrimo metodai	19
1.2.2.	ITC taikymas baltymo – ligando sąveikos tyrimams	20
1.2.3.	Jungimosi laisvoji energija ir jungimosi entalpija	22
2. MEDZI	AGOS IR METODAI	24
2.1. Da	rbe naudotos medžiagos, tirpalai	24
2.2. Me	todai	26
2.2.1.	Plazmidinės DNR išskyrimas šarminės lizės metodu	26
2.2.2.	DNR elektroforezė agarozės gelyje	27
2.2.3.	Plazmidinės DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis	27
2.2.4.	5'-galinių fosfatų pašalinimas	27
2.2.5.	Lipnių DNR galų bukinimas	27
2.2.6.	DNR fragmentų gryninimas iš gelio	28
2.2.7.	DNR susiuvimas	28
2.2.8.	Bakterijų transformacija CaCl <sub>2</sub> metodu	28
2.2.9.	hCA XIV ekspresija <i>E. coli</i>	29
2.2.10.	hCA XIV gryninimas ir renatūracija	29
2.2.11.	Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje	30
2.2.12.	Fermentinio aktyvumo matavimas	30
2.2.13.	ITC matavimai	31
2.2.14.	Sulfonamidinių junginių potenciometrinis titravimas	32
2.2.15.	Matematinis duomenų apdorojimas	32
2.2.16.	Baltymo – ligando sąveikos struktūrų modeliavimas	32
2.2.17.	Sulfonamidinių junginių <i>pK<sub>a</sub></i> reikšmių apskaičiavimas	32
3. EKSPE	RIMENTŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	33
3.1. Ka	rboanhidrazės – sulfonamidinio ligando jungimosi metu vykstančios reakcijos	33
3.2. Sul	fonamidinių junginių protonizacijos termodinamikos tyrimas	36
3.3. bC	A II – TFMSA jungimosi reakcijos protonizacijos skaičiaus ir baltymo aktyviajame	
centre esar	ičio hidroksido jono protonizacijos pK <sub>a</sub> reikšmės nustatymas	40
3.4. hC	A XIV klonavimas, ekspresija, gryninimas	44
3.5. Tri	jų karboanhidrazės izofermentų sąveikos su sulfonamidiniais ligandais palyginimas	47
ISVADOS		53
Summary		54
LITERATŪF	ROS SĄRASAS	56

## TURINYS

# Santrumpos

APS	Amonio peroksodisulfatas				
AZM	Acetazolamidas (N-[5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamidas)				
bCA II	Jaučio karboanhidrazė II				
CA	Karboanhidrazė				
CARP	Į α-CA panašus baltymas (angl. carbonic anhydrase related protein)				
DMSO	Dimetilsulfoksidas				
EDTA	Etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska				
EZA	Etokzolamidas (6-etoksi-2-benzotiazolsulfonamidas)				
hCA I	Žmogaus karboanhidrazė I				
hCA XIV	Žmogaus karboanhidrazė XIV				
ITC	Izoterminio titravimo kalorimetrija				
mCA XIV	Pelės karboanhidrazė XIV				
NDS	Natrio dodecilsulfatas				
NDS-PAAG	Natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė				
PFS	pentafluorbenzensulfonamidas				
PMSF	fenilmetilsulfonilchloridas				
SAP	Krevečių šarminė fosfatazė				
TEMED	N,N,N'N'-tetrametiletilendiaminas				
TFMSA	Trifluorometansulfonamidas				
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis				
VD5, VD6, VD20	Biotechnologijos Institute susintetinti sulfonamidiniai karboanhidrazių slopikliai				

## ĮVADAS

Karboanhidrazės yra visose gyvosios gamtos karalystėse paplitę fermentai, katalizuojantys gyvybiškai svarbius virsmus tarp anglies dioksido ir bikarbonato. Šiuo metu žinduoliuose aptikta 16 karboanhidrazių izoformų, kurios tarpusavyje skiriasi aktyvumu, ląsteline lokalizacija, pasiskirstymu audiniuose ir spėjama ar nustatyta funkcija. Nustatyta, kad karboanhidrazių veikla susijusi su kai kuriomis ligomis, tokiomis kaip glaukoma, vėžys, nervų sistemos ligos ir kt. 1940 m., pastebėjus sulfonamidinių junginių slopiklinį poveikį karboanhidrazėms, pradėti kurti sulfonamidiniai vaistai su padidėjusiu karboanhidrazių aktyvumu susijusių ligų gydymui, tačiau nauji, efektyvesni, atrankesni vaistiniai junginiai, pasižymintys mažesniu pašaliniu poveikiu kuriami iki dabar.

Iki šiol dauguma potencialių vaistinių junginių atrasta atsitiktinės paieškos būdu, tikrinant didžiules įvairių junginių bibliotekas, nes šiuo metu racionalus vaistinių junginių kūrimas kompiuterinio modeliavimo metodais, t.y. aukšto giminingumo junginio sumodeliavimas pagal baltymo – taikinio aktyviojo centro struktūrą, praktiškai yra nepasiekiamas dėl trijų esminių priežasčių: 1) nėra pakankamų kompiuterinių resursų, 2) nėra pakankamos skiriamosios gebos stuktūrinių duomenų, 3) nežinoma, kaip vieni ar kiti ligando struktūriniai elementai įtakoja sąveikos termodinamiką. Būtent prie trečiosios problemos sprendimo ir siekiama prisidėti šiuo darbu, analizuojant karboanhidrazių – sulfonamidinių junginių sąveikos termodinamiką.

**Darbo tikslas:** įvertinti karboanhidrazės – sulfonamidinių ligandų jungimosi metu vykstančių susijusių reakcijų indėlį stebimąjai entalpijai ir palyginti skirtingų karboanhidrazės izofermentų – sulfonamidinių ligandų jungimosi termodinaminius parametrus.

#### Darbo uždaviniai:

- nustatyti tiriamų sulfonamidinių karboanhidrazės slopiklių sulfonamidinės grupės protonizacijos entalpijas ir *pK<sub>a</sub>* reikšmes;
- nustatyti hidroksido jono, esančio jaučio II karboanhidrazės aktyviajame centre, bei koordinuoto su  $Zn^{2+}$  jonu, protonizacijos  $pK_a$  bei entalpiją izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu;

- įvertinti karboanhidrazių sulfonamidinių ligandų jungimosi "tikrąją" entalpiją;
- klonuoti, ekspresuoti bakterijose ir išgryninti žmogaus XIV karboanhidrazės aktyviojo centro domeną atitinkantį baltymą;
- palyginti jaučio II, žmogaus I ir XIV karboanhidrazių jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais termodinamines charakteristikas.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

#### 1.1. Karboanhidrazės

#### 1.1.1. Bendra karboanhidrazių charakteristika

Karboanhidrazės (CA) (EC 4.2.1.1) yra cinko metalofermentai, katalizuojantys grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją:

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+ \tag{1}$$

 $CO_2$  hidratacijos reakcija yra esminė kvėpavimui ir  $CO_2$  pernašai tarp audinių ir išskyrimo vietų, elektrolitų sekrecijai daugelyje audinių ir organų, *pH* reguliacijai ir palaikymui,  $CO_2$ fiksacijai (dumbliuose ir žaliuosiuose augaluose), kai kuriuose metaboliniuose biosintetiniuose keliuose, tokiuose kaip gliukoneogenezė, lipogenezė, ureagenezė, kaulų rezorbcija, kalcifikacija, auglių formavimasis (žinduoliuose) ir kt. (Esbaugh and Tufts, 2006; Pastorekova et al., 2004; Supuran et al., 2003; Winum et al., 2006).

Karboanhidrazės yra koduojamos trijų nepriklausomai evoliucijos eigoje išsivysčiusių bei neturinčių ryškaus sekų panašumo karboanhidrazių genų šeimų ( $\alpha$ -CA,  $\beta$ -CA ir  $\gamma$ -CA) (Hewett-Emmett and Tashian, 1996). Iš jų tik  $\alpha$ -CA randamos gyvūnuose.  $\beta$ -CA ir  $\gamma$ -CA aptiktos prokariotuose, dumbliuose ir augaluose.  $\alpha$ -karboanhidrazių šeimos genai koduoja ir aktyvias karboanhidrazių izoformas, ir katalitinio aktyvumo neturinčias (Liljas and Laurberg, 2000; Pastorekova et al., 2004).

 $\alpha$ -karboanhidrazėms būdinga pasiskirstymo audiniuose įvairovė ir skirtinga spėjama ar nustatyta biologinė funkcija. Kai kurios karboanhidrazės ekspresuojamos beveik visuose audiniuose (pvz., CA II), kitų ekspresija labiau savita (pvz., CA VI ekspresuojama seilių liaukose). Nors  $\alpha$ -karboanhidrazės daugiausia aptinkamos gyvūnuose, bet taip pat rastos ir bakterijose bei dumbliuose (Merlin et al., 2003; Moroney et al., 2001; Pastorekova et al., 2004).

Be fiziologinės reakcijos – grįžtamos CO<sub>2</sub> hidratacijos reakcijos, karboanhidrazės katalizuoja daug kitų reakcijų, tokių kaip: cianato hidratacijos reakcija į karbamo rūgštį (2), arba cianamido – į karbamidą (3), aldehidų hidratacija į gem-diolius (4), karboksilinių (5) ar sulfanilinių (6) esterių hidrolizė, taip pat kiti mažiau ištirti hidrolitiniai procesai (7) – (9) (lentelė

1.1). Iki šiol neaišku, ar karboanhidrazės katalizuojamos reakcijos, išskyrus CO<sub>2</sub> hidratacijos reakciją, turi fiziologinę reikšmę (Supuran and Scozzafava, 2001).

$O = C = NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCOOH$	(2)
$HN = C = NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCONH_2$	(3)
$RCHO + H_2O \leftrightarrow RCH(OH)_2$	(4)
$RCOOAr + H_2O \leftrightarrow RCOOH + ArOH$	(5)
$RSO_3Ar + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + ArOH$	(6)
$ArF + H_2O \leftrightarrow HF + ArOH$ $Ar = 2,4 - dinitrofenil$	(7)
$PhCH_2OCOCl + H_2O \leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$	(8)
$RSO_2Cl + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + HCl$ $R = Me; Ph$	(9)

1.1 lentelė. α-karboanhidrazių katalizuojamos reakcijos (Supuran and Scozzafava, 2001).

#### 1.1.2. α-karboanhidrazių šeima

Žinduoliuose šiuo metu yra identifikuota 16 (žmoguje ir šimpanzėse 15)  $\alpha$ -CA arba į  $\alpha$ -CA panašių baltymų (CARP *(angl. carbonic anhydrase related proteins)*). Jie gali būti skirstomi į penkias grupes: citozoliniai CA (CA I, CA II, CA III, CA VII ir CA XIII), mitochondriniai CA (CA VA ir CA VB), sekretuojami CA (CA VII), su membrana susiję CA (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ir CA XV), ir į CA panašūs baltymai (CARP VIII, CARP X ir CARP XI) (pav. 1.1) (Esbaugh and Tufts, 2006; Supuran et al., 2003).



**1.1 pav.** Žmogaus karboanhidrazių sekų giminingumo filogenetinis medis, pagal (Fujikawa-Adachi et al., 1999). Medis sudarytas taikant globalių palyginių sudarymo programą ClustalW (<u>http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</u>). Skirtingos ląstelinės lokalizacijos baltymai pažymėti skirtingomis spalvomis: citozoliniai – žalia, membraniniai – raudona, mitochondriniai – mėlyna, sekretuojama – oranžine. Violetine spalva pažymėti CARP.

CA I yra gerai charakterizuotas citoplazminis izofermentas, kuriam būdingas žemas katalitinis aktyvumas. Tai vienas iš gausiausių karboanhidrazių izofermentų žinduolių eritrocituose. Įdomu tai, kad jis neekspresuojamas kai kuriose atrajojančių ar katinių rūšyse, tačiau nepastebėta jokių hematologinių sutrikimų dėl šios mutacijos, todėl CA I fiziologinis vaidmuo nevisiškai aiškus (Kivela et al., 2005).

**CA II** yra labiausiai paplitęs karboanhidrazių šeimos atstovas, aptinkamas praktiškai visuose žmogaus audiniuose ar organuose. Šis izofermentas yra citoplazminis, fiziologinėmis sąlygomis turi aukštą katalitinį aktyvumą  $(1.3-1.9 \times 10^6/s)$ , ir yra vienas iš efektyviausių žinomų fermentų (Carlsson and Jonsson, 2000; Thoms, 2002).

CA III yra hormonais reguliuojamas, itin žemą katalitinį aktyvumą (tik maždaug ~ 1 % CA II aktyvumo) turintis karboanhidrazės izofermentas. Turi žemą giminingumą sulfonamidiniams junginiams. Nustatyta, kad jis saugo ląstelę nuo vandenilio peroksido sukeliamos apoptozės ir skatina ląstelės proliferaciją, tuo tarpu CA II tokio veikimo nepastebėta. Manoma, kad CA III gali saugoti nuo oksidacinių pažaidų, o žemesnis laisvųjų radikalų lygis ląstelėse, ekspresuojančiose CA III, gali veikti augimo signalo perdavimo kelius (Eriksson and Liljas, 1993; Tu et al., 1998).

CA IV pirmas atrastas iš keturių žmogaus organizme nustatytų karboanhidrazės izofermentų, susijusių su membrana. CA IV turi glikozilfosfatidilinozitolinį inkarą, kuriuo yra pritvirtintas ląstelės plazminės membranos išorinėje pusėje (pav. 1.2) (Kivela et al., 2005).



**1.2 pav.** Membraninių karboanhidrazės izoformų topografija. CA – karboanhidrazės domenas, GP – glikozilfosfatidilinozitolinis inkaras, TM – transmembraninė dalis, CT – citoplazmoje esantis baltymo C-galas, PG – proteoglikaninis domenas. Pagal (Hilvo et al., 2005; Kivela et al., 2005)

CA VA ir CA VB yra žemą katalitinį aktyvumą turintys karboanhidrazės izofermentai, esantys mitochondrijų užpilde. CA VA ekspresuojamas kepenyse ir griaučių raumenyse, o CA VB – smegenyse, širdyje, kepenyse, plaučiuose, inkstuose, blužnyje, žarnyne, sėklidėse, skeleto raumenyse ir kasoje. CA VA dalyvauja ureagenezėje ir gliukoneogenezėje, o CA VB svarbus insulino sekrecijos reguliavimui kasoje (Franchi et al., 2003).

CA VI yra iki šiol vienintelė žinoma sekretuojama karboanhidrazių šeimos izoforma. Jos katalitinis domenas yra labiausiai homologiškas membraninėms karboanhidrazių izoformoms. Aptinkama seilių liaukose, ašarų liaukose, kasoje, pieno liaukose ir piene. CA VI būdinga tai, kad šio baltymo koncentracija kinta cirkadiniu ritmu – labai žema nakties metu, ir gerokai aukštesnė dieną, ypač ką tik pabudus (Kivela et al., 1999).

**CA VII** yra citoplazminis izofermentas, turintis aukštą katalitinį aktyvumą (~70 % CA II aktyvumo). Tai yra labiausiai konservatyvus žinduolių karboanhidrazių izofermentas – pvz., žmogaus ir pelės CA VII baltymų sekų panašumas siekia ~95 %. Šio izofermento paplitimas audiniuose dar silpnai ištirtas, bet jo mRNR aptikta seilių liaukose, žiurkių ir pelių plaučiuose, pelių smegenų neuronuose (Lakkis et al., 1997; Vullo et al., 2005).

CA IX pirmiausia aptikta kaip naujas auglių antigenas kai kuriose žmogaus karcinomose ir normalioje skrandžio gleivinėje. Subrendusi CA IX molekulė turi į proteoglikaną panašų domeną, CA domeną, transmembraninį segmentą ir trumpą viduląstelinę "uodegą" (pav. 1.2). CA IX siejama su onkogeneze, per didelė jos ekspresija pastebėta piktybinių auglių ląstelėse (Leppilampi et al., 2003; Zavadova and Zavada, 2005).

Kitas transmembraninis karboanhidrazių izofermentas yra **CA XII**. Turi 30-40% sekos identiškumą su kitomis CA. Aktyvusis centras, kaip ir kitų su membrana susijusių karboanhidrazių, yra ląstelės išorėje (pav. 1.2) (Ulmasov et al., 2000; Whittington et al., 2001).

CA XIII yra dar vienas citozolinis karboanhidrazių izofermentas. Jam būdingas žemas katalitinis aktyvumas. Aptinkamas kai kuriuose virškinamojo trakto organuose (Kummola et al., 2005; Lehtonen et al., 2004).

CA XIV yra paskutinis atrastas (1999 m.) žmogaus karboanhidrazių izofermentas. Turi N-galinę signalinę seką, CA domeną, transmembraninį domeną ir trumpą viduląstelinę "uodegą". Nustatyta, kad *CA14* genas yra žmogaus pirmosios chromosomos ilgajame petyje, 1q21 padėtyje (Fujikawa-Adachi et al., 1999; Mori et al., 1999). CA XIV ekspresija nustatyta žmogaus širdyje,

smegenyse, kepenyse ir skeleto raumenyse, taip pat žarnyne, inkstuose ir šlapimo pūslėje. Smegenyse ryškiausia ekspresija pastebėta neuronuose. Kepenyse CA XIV aptinkamas hepatocitų plazminėje membranoje. Įdomu tai, kad jis aptinkamas ir bazolateralinėje, ir apikalinėje membranoje, kai tuo tarpu kiti transmembraninį segmentą turintys izofermentai – tik bazolateralinėje (pav. 1.3) (Parkkila et al., 2002; Parkkila et al., 2001).



1.3 pav. Karboanhidrazės izoformų lokalizacija ląstelėje. Pagal (Kivela et al., 2005).

CA XV yra 2005 m. atrastas žemą katalitinį aktyvumą turintis karboanhidrazės izofermentas. Žmoguje rastos trys, o šimpanzėse dvi šio geno kopijos, tačiau dėl taškinių ir rėmelio poslinkio mutacijų visos jos yra pseudogenai ir baltymo mRNR neaptikta. Tačiau žinomos jau aštuonios rūšys, įskaitant pelę, žiurkę, šunį, zebražuvę ir vištą, kurios turi aktyvią CA XV (Hilvo et al., 2005).

CARP VIII, CARP X ir CARP XI yra katalitinio aktyvumo neturintys į karboanhidrazes panašūs baltymai. Jie neturi vieno iš trijų karboanhidrazių aktyviajam centrui būdingų histidinų (His 94) – jis pakeistas į argininą, todėl aktyviajame centre nekoordinuojamas Zn<sup>2+</sup> jonas. CARP VIII aptinkamas kai kuriuose vėžiniuose audiniuose, o visiškas šio baltymo geno išveiklinimas sukelia judėjimo sutrikimus (nors pastebimų anomalijų centrinėje ar periferinėje nervų sistemoje nepastebima). CARP X aptinkamas centrinėje nervų sistemoje. Įdomu, kad jo nerasta embriono smegenyse. CARP XI turi keletą potencialių fosforilinimo vietų, ir manoma, kad dalyvauja signalo perdavime. Tikslios visų CARP funkcijos nėra nustatytos, bet žmoguje jie yra labai konservatyvūs, visada aptinkami smegenyse, todėl manoma, kad yra svarbūs centrinei nervų sistemai (Pastorekova et al., 2004).

#### 1.1.3. Su karboanhidrazių aktyvumu susijusios ligos

Kaip minėta, karboanhidrazės dalyvauja daugelyje esminių fiziologinių procesų, todėl jų aktyvumo pokyčiai lemia patologijas. Nustatyta keletas ligų, kurioms būdingas anglies dioksido ir bikarbonato mainų proceso sutrikimas, lemiantis *pH* pokyčius, sutrikdantis jonų transportą, skysčių sekreciją ir kt. Klasikinis tokios ligos pavyzdys būtų glaukoma. Akies audinyje esančios karboanhidrazės prie šios ligos vystymosi prisideda per daug efektyviai gamindamos bikarbonato jonus ir tuo būdu skatindamos akies skysčio sekreciją. Dėl to padidėja akispūdis, kuris labai paveikia akies lęšiuką, sumažina kraujo tėkmę tinklainėje, pažeidžia šviesai jautrius stiebelius ir kūgelius, taip pat pažeidžia optinį nervą, o tai lemia apakimą, jei nepradedama gydyti anksčiau nei pokyčiai tampa negrįžtami. Ilgai manyta, kad pagrindinis vaidmuo šiame procese tenka CA II, tačiau neseniai kaip potencialūs taikiniai pasiūlyti ir CA III, CA IV bei CA XII. Ypač įdomu tai, kad glaukoma sergančių pacientų akyse pastebėtas CA XII ekspresijos padidėjimas net kelis kartus, lyginant su įprastu šio baltymo ekspresijos lygiu. Todėl dabar manoma, kad būtent CA XII kiekio ir aktyvumo padidėjimas yra svarbus veiksnys glaukomos progresavimui (Pastorekova et al., 2004).

Karboanhidrazės IX ir XII tiesiogiai siejamos su vėžio vystymusi. Normaliuose audiniuose CA IX ekspresija labai silpna, tačiau ji labai efektyviai indukuojama augliuose hipoksijos metu. Kadangi tai yra membraninis baltymas, kurio aktyvusis centras yra ląstelės išorėje, CA IX pripažintas kaip vienas patikimiausių hipoksijos žymenų audiniuose. CA IX slopinimas naudojant sintetinius slopiklius hipoksijos atveju lemia ląstelės žūtį (Potter and Harris, 2004). Šiais metais CA IX pripažintas inkstų žievės vėžio žymeniu (Gilbert et al., 2006). Tai pirmasis inkstų vėžio žymuo, kuris gali būti aptinkamas periferinio kraujo testo metu. CA IX yra susijusi su virškinamojo trakto ląstelių diferenciacija ir aptinkama labiau diferencijuotų skrandžio audinių augliuose, o CA XII – mažiau diferencijuotų. Krūties vėžio atveju – atvirkščiai – labiau diferencijuotų audinių augliuose aptinkamas CA XII. Taigi CA IX ir CA XII yra potencialūs terapeutiniai taikiniai (Leppilampi et al., 2003).

Nerviniuose audiniuose veikiančios karboanhidrazės – CA II, CA IV, CA V, CA VII ir CA XIV – siejamos su kai kuriomis nervų sistemos ligomis, pvz., epilepsija, migrena. Manoma, kad jos yra tokių nervų sistemos ligų gydymui naudojamų vaistų kaip acetazolamidas, zonisamidas, topiramatas potencialūs taikiniai.

#### Karboanhidrazių slopikliai kaip antibiotikai

Parodyta, kad prokariotuose karboanhidrazės yra svarbios kvėpavimui, anglies dioksido pernašai ir fotosintezei. Todėl iškelta idėja, kad karboanhidrazių slopikliai galėtų būti naudojami kaip antibiotikai, etokzolamidas netgi buvo naudojamas meningito gydymui. Taip pat nustatyta, kad maliariją sukeliantis pirmuonis *Plasmodium falciparum* turi dvi α-karboanhidrazes ir pastebėta, kad karboanhidrazių slopikliai pasižymi antimaliariniu efektu (Merlin et al., 2003; Pastorekova et al., 2004).

#### 1.1.4. Karboanhidrazių struktūra

 $\alpha$ -,  $\beta$ -, ir  $\gamma$ -CA labai skiriasi tarpusavyje tretinėmis ir ketvirtinėmis struktūromis, tačiau jų aktyvieji centrai turi struktūrinį panašumą ir visų karboanhidrazių formų aktyviajame centre yra cinko jonas (Hewett-Emmett and Tashian, 1996). Skirtumai tarp skirtingų šeimų karboanhidrazių parodyti pav. 1.4.



β-CA (augalų)

**1.4 pav.** Trijų karboanhidrazės formų erdvinės struktūros. Oligomerinės struktūros karboanhidrazėse vienas monomeras spalvotas, kiti – pilki (Liljas and Laurberg, 2000).

γ-CA būdinga primityvi β-spiralių struktūra (pav. 1.4 pažymėta geltonai), kurioje trumpi pasikartojančių aminorūgščių motyvai sudaro pagrindinį susisukimo motyvą. Tuo tarpu α-CA ir β-CA struktūros sudarytos skirtingai išsidėstant α-spiralėms ir β-klostėms. Ketvirtinės struktūros skirtumai egzistuoja netgi β-CA klasės viduje (pav. 1.4). Augalinė karboanhidrazė suformuoja oktamerinę struktūrą, kuriai būdinga ašinė simetrija, o dumblių baltymas turi vidumolekulinius pasikartojimus, kurie lemia kovalentiškai sujungto dimero susidarymą (pav. 1.4 vienas monomeras spalvotas, kitas – pilkas). α-karboanhidrazių aktyvusis centras yra monomero kišenėje, o β- ir γ-karboanhidrazėse jis suformuojamas tarp oligomero subvienetų (Liljas and Laurberg, 2000).

Nors  $\alpha$ -karboanhidrazės tarpusavyje neturi ryškaus sekų panašumo, visoms joms būdinga itin panaši erdvinė struktūra. Pagal SCOP (<u>S</u>tructural <u>C</u>lassification <u>of P</u>roteins) duomenų bazėje (<u>http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/</u>) pateikiamą baltymų struktūrų klasifikaciją, karboanhidrazių superšeimai priskiriami baltymai, turintys vieną  $\beta$ -lakštą, sudarytą iš dešimties  $\beta$ -klosčių. Ši struktūra sudaro baltymo "griaučius", o  $\alpha$ -spiralės išsidėsto baltymo išorinėje dalyje (pav. 1.5).



**1.5 pav.** Karboanhidrazėms būdinga struktūra. Žydra spalva parodytas  $\beta$ -lakštas, sudarantis baltymo struktūros "griaučius", raudonai –  $\alpha$ -spiralės, žaliai – linkiai, violetine – baltymo aktyviajame centre esantis cinko jonas (PDB ID 1AZM).

Karboanhidrazės struktūroje esantis cinko jonas yra būtinas fermentiniam aktyvumui. Pagal rentgenostruktūrinės analizės duomenis, cinko jonas yra maždaug 15Å gylio aktyvaus centro kišenės dugne, koordinuotas trijų histidino liekanų (His 94, His 96 ir His 119) ir vandens molekulės arba hidroksido jono.

Zn priklauso ketvirtojo periodo II B grupei, todėl skirtingai nei kiti šio periodo pereinamieji metalai, turi užpildytą d orbitalę ( $d^{10}$ ), ir nedalyvauja redokso reakcijose, tačiau veikia kaip Lewis'o rūgštis, priimdamas elektronų porą. Todėl jis yra tinkamas kofaktorius reakcijoms, kurioms reikalingas oksidacijos-redukcijos požiūriu stabilus jonas, galintis veikti kaip Lewis'o rūgšties tipo katalizatorius. Katalitiniuose cinko centruose dažniausiai sutinkamas ligandas yra histidinas, daug rečiau glutamo, asparto rūgštis ar cisteinas. Daugumoje iki šiol tirtų cinko baltymų (taip pat ir karboanhidrazėse) Zn<sup>2+</sup> jono koordinacijai su ligandais būdinga šiek tiek deformuoto tetraedro forma – trys arba keturi ligandai tetraedro kampuose, o jo centre – cinko jonas (pav. 1.6) (Coleman, 1992; Coleman, 1998; Kimura and Kikuta, 2000; McCall et al., 2000; Vallee and Auld, 1990)



**1.6 pav.** Karboanhidrazės aktyviajame centre esančio cinko jono koordinacijos geometrija. Cinko jono ligandai – trys aktyviojo centro histidinų azoto atomai ir aktyviajame centre esančio substrato – bikarbonato jono deguonies atomas – išsidėstę šiek tiek deformuoto tetraedro forma (PDB ID 1HCB).

Karboanhidrazės struktūroje cinko jonas surištas itin tvirtai – pvz., žmogaus CA II nustatyta cinko disociacijos konstanta  $K_d = 4$  pM, esant *pH* 7. Ši konstanta nustatyta

pusiausvyrinės dializės būdu, dializuojant apofermentą cinko – dipikolinato buferyje (Kiefer et al., 1993; Lindskog, 1997).

Prie karboanhidrazės aktyviajame centre esančio cinko jono prisijungusi vandens molekulė taip pat sudaro vandenilinius ryšius su Thr 199 hidroksilo grupe, kuri toliau jungiasi su Glu 106 karboksilo grupe (pav. 1.7). Šios sąveikos padidina prie cinko prisijungusios vandens molekulės nukleofiliškumą ir orientuoja substratą (CO<sub>2</sub>) palankia nukleofilinei atakai kryptimi (Supuran et al., 2003).



**1.7 pav.** Karboanhidrazės aktyviojo centro struktūra (PDB ID 1RJ5). Mėlynos spalvos skrituliu pažymėtas  $Zn^{2+}$  jonas, raudonos – vandens molekulė.

Šešios aminorūgštys Val 121, Leu 141, Val 143, Leu 198, Val 207, Trp 209 suformuoja aktyviojo centro kišenės hidrofobinį šoną (pav. 1.7 parodytos kaip baltymo paviršius), kurio paviršiumi substratas  $CO_2$  patenka prie  $Zn^{2+}$  jono. Membraninių karboanhidrazių struktūra papildomai sutvirtinama konservatyviu disulfidiniu tilteliu tarp Cys 23 ir Cys 203, kurio citoplazminės karboanhidrazės neturi (Esbaugh and Tufts, 2006).

Aktyvi fermento forma yra bazinė, t.y. kai aktyviajame centre su cinko jonu koordinuotas hidroksido jonas. Šis stiprus nukleofilas atakuoja atakuoja CO<sub>2</sub> molekulę, esančią hidrofobinėje kišenėje, susidarant su Zn<sup>2+</sup> koordinuotam bikarbonato jonui. Toliau bikarbonato joną aktyviajame centre pakeičia vandens molekulė, susidarant fermento rūgštinei formai (aktyviajame centre koordinuota vandens molekulė). Bazinė fermento forma atstatoma vykstant protono pernašai iš aktyviojo centro į aplinką. Šią pernašą gali palengvinti arba aktyviojo centro liekanos (tokios kaip His 64, kuri atlieka protonų šaudyklės vaidmenį), arba terpėje esantis buferis. Procesą galima schematiškai aprašyti dviem lygtimis:

$$E \cdot Zn^{2+} - OH^{-} + CO_2 \leftrightarrow E \cdot Zn^{2+} - HCO_3^{-} \xleftarrow{H_2O} E \cdot Zn^{2+} - OH_2 + HCO_3^{-}$$
(10)

$$E \cdot Zn^{2+} - OH_2 \leftrightarrow E \cdot Zn^{2+}HO^- + H^+ \tag{11}$$

Katalizės greitį limituojanti stadija yra (11), t.y. protono pernaša, kuri atstato aktyvią fermento formą su aktyviajame centre koordinuotu hidroksido jonu. Katalitiškai labai aktyviuose izofermentuose, tokiuose kaip CA II, CA IV, CA VII, CA IX, šį procesą palengvina ties įėjimu į aktyvųjį centrą esanti His 64 aminorūgštis (Winum et al., 2006).

#### 1.1.5. Karboanhidrazių sąveika su sulfonamidiniais slopikliais

Karboanhidrazės slopinimas sulfonamidais pirmą kartą buvo pastebėtas 1940 m. (Keilin and Mann, 1940). Šis atradimas pradėjo naują vaistų kūrimo etapą ir lėmė daugelio sulfonamidinių vaistų, skirtų glaukomos, hipoglikemijos gydymui, taip pat diuretikų ir kai kurių priešvėžinių vaistų sukūrimą.

Ilgą laiką kaip sisteminiai antiglaukominiai vaistai buvo naudojami keturi sulfonamidiniai junginiai: acetazolamidas, etokzolamidas, metazolamidas ir dichlorofenamidas (pav. 1.8) (Pastorekova et al., 2004). Sisteminiai slopikliai sumažina bikarbonato ir skysčių sekrecijos greitį ir todėl sumažina glaukomai būdingą padidėjusį akispūdį 25-30%, bet įvairių karboanhidrazių izofermentų, esančių kituose audiniuose ir organuose, slopinimas sukelia daug pašalinių poveikių. Tačiau minėti sulfonamidiniai vaistai neveiklūs lokaliai, todėl ieškota naujų kitokio tipo junginių. Pirmas toks lokaliai veikiantis sulfonamidinis vaistas, dorzolamidas, pradėtas naudoti 1995 m., antras (struktūriškai susijęs su dorzolamidu) – brinzolamidas – 1999 m. (pav. 1.7).



**1.8 pav.** Kliniškai naudojamų antiglaukominių vaistų struktūrinės formulės: 1 – acetazolamidas, 2 – metazolamidas, 3 – etokzolamidas, 4 – dichlorofenamidas, 5 – brinzolamidas, 6 – dorzolamidas.

Paskutiniais metais sukurta daug naujų karboanhidrazių slopiklių. Efektyvių sulfonamidinių karboanhidrazės slopiklių kūrimui taikyti du pagrindiniai metodai: "žiedo" metodas ir "uodegos" metodas. "Žiedo" metodas, naudotas dorzolamido ir brinzolamido sukūrimui, pagrįstas didelės įvairovės žiedų, prie kurių prijungta sulfonamidinė grupė (taip pat ir kitos grupės), tyrimo. "Žiedo" metodas buvo iš tikrųjų naudingas šios klasės junginių ir jų darinių kūrimui, tačiau kol kas juo buvo gauta mažai kliniškai naudingų junginių (neskaitant minėtų dviejų), nes dauguma gautų junginių buvo potencialūs alergenai. "Uodegos" metode prie gerai žinomų aromatinių/heterociklinių sulfonamidų, turinčių slopiklinį poveikį karboanhidrazėms, griaučių prijungiamos įvairios tirpumą gerinančios "uodegos". Šiuo metodu kol kas nėra gauta kliniškai naudojamų CA slopiklių (šis metodas taikomas dar visai neseniai), tačiau juo buvo sukurta daugiau efektyvių (palyginamų su dorzolamidu ir brinzolamidu) antiglaukominių sulfonamidinių junginių sulfonamidą. Būtina paminėti, kad abu šie metodai yra naudingi, ypač juos derinant (Coleman, 1975; Pastorekova et al., 2004; Supuran and Scozzafava, 2001; Supuran et al., 2003).

Naujas metodas, taikomas atrankiam membraninių izofermentų slopinimui *in vivo*, yra teigiamai įkrautų, per membranas nepraeinančių sulfonamidinių junginių kūrimas. Šis metodas remiasi tripakeistų piridinio pakaitų prijungimu prie klasikinių aromatinių/heterociklinių sulfonamidų, turinčių laisvas amino ir hidroksilo grupes. Šiuo būdu gauta junginių, slopinančių CA izofermentus nanomolinėse koncentracijose. Šio tipo slopikliai, skirtingai nei klasikiniai kliniškai naudojami junginiai (pvz., acetazolamidas, metazolamidas), nepraeina pro ląstelės

membraną, todėl slopina tik ląstelės išorėje esančius CA izofermentus (Supuran and Scozzafava, 2001; Supuran et al., 2003).

Kiekvienam sulfonamidiniam slopikliui fermento-slopiklio giminingumą pirmiausia lemia tai, kad slopiklio pirminės sulfonamidinės grupės deprotonizuotas azoto atomas koordinuojasi su baltymo aktyviojo centro cinko jonu, pakeisdamas hidroksido joną (išlaikoma tetraedrinė koordinacijos geometrija), be to, šis azotas yra vandenilinio ryšio donoras Thr199 hiroksilo grupei. Vienas sulfonamidinis deguonis kaip akceptorius sudaro vandenilinį ryšį su Thr199 pagrindinės grandinės NH grupe, o kitas deguonis tarpmolekulinėse sąveikose nedalyvauja (Boriack-Sjodin et al., 1998).

#### 1.2. Baltymų – ligandų jungimosi termodinaminis charakterizavimas

#### 1.2.1. Baltymų – ligandų jungimosi tyrimo metodai

Paprastas grįžtamas jungimasis tarp makromolekulės *M* ir ligando *L*,

$$M + L \leftrightarrow ML \tag{12}$$

charakterizuojamas jungimosi konstanta K<sub>b</sub>:

$$K_{b} = \frac{[ML]}{[M][L]} \tag{13}$$

Baltymų – ligandų jungimosi konstantos nustatymui naudojama daug metodų – pusiausvyrinė dializė, ultracentrifugavimas, analitinė gelfiltracija, paviršiaus plazmonų rezonansas, kapiliarinė elektroforezė, izoterminio titravimo kalorimetrija, diferencinio skanavimo kalorimetrija, įvairūs spektroskopiniai metodai ir kt. (Harding and Chowdhry, 2001a; Harding and Chowdhry, 2001b) Dauguma šių metodų galima netiesiogiai nustatyti makromolekulės – ligando jungimosi termodinaminius parametrus pagal teorines priklausomybes. Pvz., entalpijos pokytį galima nustatyti pagal jungimosi konstantos priklausomybę nuo temperatūros (Van't Hoff'o analizė), tačiau sudėtingesnėms reakcijoms toks entalpijos skaičiavimas nėra visai tikslus (Horn et al., 2001; Naghibi et al., 1995). Izoterminio titravimo kalorimetrija (ITC) yra vienintelis iki šiol žinomas metodas, kuriuo gali būti tiesiogiai išmatuojama beveik kiekvienos reakcijos metu išsiskirianti šiluma. Priklausomai nuo eksperimento sąlygų, gali būti nustatoma ir jungimosi konstanta bei reakcijos stechiometrija.

Jungimosi entalpijos pokytis atspindi baltymo-tirpiklio vandenilinių ryšių ir van der Waals'o sąveikų nutrūkimą, baltymo-ligando ryšių, van der Waalso sąveikų, druskų tiltelių susidarymą, taip pat tirpiklio persitvarkymą arti baltymo paviršiaus.

#### 1.2.2. ITC taikymas baltymo – ligando sąveikos tyrimams

Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu tiesiogiai matuojama komplekso susidarymo metu išskiriama ar sugeriama šiluma. Stebimas jungimosi reakcijos šiluminis efektas yra esminė visos tiriamos sistemos savybė, atspindinti bendrą šilumos pokytį kalorimetrinėje kiuvetėje pridėjus ligando. Viena vertus, į išmatuotą šilumos kiekį įeina ir nesaviti šiluminiai efektai, kita vertus, gali vykti susijusios su jungimusi protonizacijos reakcijos. Taigi svarbiausia yra nustatyti galimą pašalinių reakcijų indėlį į tikrąją jungimosi entalpiją ir ją ištaisyti.

ITC eksperimentuose stebimas šilumos pokytis, vykstantis į makromolekulės tirpalą pridedant ligando (arba atvirkščiai). Išskirta ar sugerta šiluma kiekvienos injekcijos metu yra tiesiogiai proporcinga bendram susidariusio komplekso kiekiui (Holdgate, 2001). Tai išreiškiama:

$$q = V_0 \Delta H \Delta [ML] \tag{14}$$

kur q yra šilumos kiekis, priklausomas nuo susidariusio komplekso koncentracijos  $\Delta[ML]$ ,  $\Delta H$  yra jungimosi molinė entalpija, o  $V_0$  – mėginio kiuvetės tūris.

Kalorimetriniame eksperimente kiekvienos naujos ligando porcijos pridėjimo metu stebimas šilumos pokytis, kurio dydis priklauso nuo reakcijos tūrio, reagentų koncentracijų, molinės jungimosi entalpijos, jungimosi konstantos, praskiedimo šilumos, jungimosi stechiometrijos ir prieš tai pridėto ligando kiekio. Kai nesurištų baltymo jungimosi centrų koncentracija pradeda mažėti, šiluminiai pokyčiai ligando pridėjimo metu irgi mažėja (Jelesarov and Bosshard, 1999). Bendras didėjantis šilumos kiekis *Q* po i-osios injekcijos bus

$$Q = V_0 \Delta H \sum \Delta [ML]_i = V_0 \Delta H [ML]_i$$
<sup>(15)</sup>

kur  $[ML]_i$  yra bendra komplekso koncentracija po i-osios injekcijos.

#### Vieno nepriklausomo jungimosi centro modelis

Paprasčiausiu jungimosi atveju kiekviena makromolekulė turi vieno tipo, identiškus, griežtai apibrėžto skaičiaus ir tarpusavyje nesąveikaujančius ligando surišimo centrus, kurie visi turi vienodą giminingumą ligandui. Karboanhidrazės – sulfonamidinio ligando sistemą kaip tik

galime priskirti prie šio tipo sistemų (kiekviena baltymo molekulė turi vieną ligando surišimo centrą). Tokios sistemos jungimosi konstanta  $K_b$  aprašoma:

$$K_b = \frac{\Theta}{(1 - \Theta)[L]} \tag{16}$$

kur  $\Theta$  yra frakcinis įsotinimas, nusakantis, kokia makromolekulių dalis yra susirišusi su ligandu, o [L] – laisvo ligando koncentracija. Ji susijusi su bendra ligando  $[L_T]$  ir makromolekulės  $[M_T]$  koncentracija:

$$[L] = [L_T] - n\Theta[M_T] \tag{17}$$

Čia *n* nusako makromolekulės – ligando jungimosi stechiometriją. Iš (16) ir (17) lygčių gauname:

$$\Theta^2 - \Theta \left( 1 + \frac{1}{nK_b [M_T]} + \frac{[L_T]}{n[M_T]} \right) + \frac{[L_T]}{n[M_T]} = 0$$
<sup>(18)</sup>

kurios vienintelis prasmingas sprendinys yra:

$$\Theta = \frac{1}{2} \left( 1 + \frac{1}{nK_b[M_T]} + \frac{[L_T]}{n[M_T]} - \sqrt{\left( 1 + \frac{1}{nK_b[M_T]} + \frac{[L_T]}{n[M_T]} \right)^2 - \frac{4[L_T]}{n[M_T]}} \right)$$
(19)

Reakcijos integralinis šilumos kiekis po i-osios reakcijos yra:

$$Q = n[M_T]V_0 \Delta H\Theta_i \tag{20}$$

kur  $V_0$  yra kiuvetės tūris,  $\Delta H$  – molinė ligando jungimosi entalpija.

Diferencialinis i-osios injekcijos šilumos kiekis aprašomas:

$$q_i = n [M_T] V_0 \Delta H (\Theta_i - \Theta_{i-1})$$
<sup>(21)</sup>

Hiperbolinės įsotinimo kreivės lygties parametrų netiesinis priderinimas pagal (20) lygtį integralinėje formoje (Q priklausomybė nuo  $[L_T]$ ) leidžia iš vieno eksperimento apskaičiuoti šiuos parametrus:  $K_b$ ,  $\Delta H$  ir jungimosi stechiometriją n. Pagal diferencialinę lygtį (21) titravimo duomenys gali būti priderinti prie sigmoidinės įsotinimo kreivės ( $q_i$  priklausomybė nuo  $[L_T]$  arba  $[L_T]/[M_T]$ ) – gaunami tie patys parametrai (Perozzo et al., 2004).

#### 1.2.3. Jungimosi laisvoji energija ir jungimosi entalpija

Jungimosi giminingumą lemia jungimosi reakcijos Gibso energijos pokytis,  $K_b = e^{-\Delta G/RT}$ (22), tačiau  $\Delta G$  yra dviejų skirtingų dėmenų suma:  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  (23), todėl daug skirtingų  $\Delta H$ ir  $\Delta S$  verčių gali lemti tokį patį jungimosi giminingumą (t.y. tokį patį  $\Delta G$  ir taip pat  $K_b$ ).

Šiuo metu dauguma vaistų kūrimo strategijų koncentruojasi ties jungimosi giminingumo optimizavimu, tačiau junginiai, kuriems būdingos skirtingos termodinaminės charakteristikos (t.y. skirtingi jungimosi entalpijos ir jungimosi entropijos įnašai į bendrą jungimosi giminingumą), nesielgia vienodai, net jei turi tą patį giminingumą pasirinktam taikiniui, nes jungimosi entalpijos ir entropijos pokyčių prigimtis yra skirtinga. Norint pasiekti aukštą jungimosi giminingumą, svarbu, kad abu – ir entalpijos, ir entropijos pokyčiai būtų palankūs ir neveiktų į priešingas puses (Murphy, 1999).

Vaisto – taikinio sąveikos tikrąją entalpiją sudaro dvi pagrindinės dedamosios: naudingas entalpijos pokytis, kurį lemia vandenilinių ryšių ir van der Waals'o kontaktų susidarymas, ir nepalankus entalpijos pokytis dėl polinių grupių desolvatacijos. Nepolinių grupių desolvatacijos entalpija yra kelis kartus mažesnė už polinių grupių desolvatacijos entalpiją. Taigi palanki jungimosi entalpijos vertė rodo gerą vaisto ir taikinio sąveiką ir tai, kad jungimosi metu susidarančios sąveikos yra pakankamai stiprios, kad kompensuotų nepalankios entalpijos, susijusios su desolvatacija, indėlį (Freire, 2004; Ladbury, 2001).

Jungimosi entropiją taip pat sudaro dvi pagrindinės dedamosios: solvatacijos entropijos pokytis ir konformacinis entropijos pokytis. Solvatacijos entropijos pokytis yra palankus ir susidaro dėl vandens molekulių išlaisvinimo, kai vaisto molekulė ir baltymo jungimosi ertmė yra visiškai arba dalinai desolvatuojama jungimosi metu. Palanki desolvatacijos entropija yra pagrindinė jėga, susijusi su hidrofobinių grupių jungimosi energija. Konformacinis entropijos pokytis beveik visada yra nepalankus, nes jungimosi proceso metu sumažėja tiek vaisto, tiek baltymo molekulės konformacinių laisvės laipsnių (pav. 1.9). Vaistų kūrimo metu galima sumažinti konformacinės entropijos indėlį įvedant į vaisto molekulę konformacinius apribojimus sukeliančias grupes, kad jungimosi metu būtų prarandama mažiau laisvės laipsnių (Freire, 2004).



**1.9 pav.** Mažos molekulės jungimosi prie taikinio (raudonas) giminingumą lemia pusiausvyra tarp sąveikų su baltymu ir sąveikų su tirpikliu vandeniu (mėlynas) dydžių.

Įmanoma tai pačiai baltymo ligando surišimo ertmei sukurti tiek entalpiškai, tiek entropiškai veikiančius ligandus. Entropiškai optimizuoti ligandai didžiąją jungimosi energijos dalį gauna iš hidrofobiškumo, kuris yra nesavita sąveika. Šiuo atveju atrankumą lemia formos atitiklumas, darant prielaidą, kad geometriškai panašaus jungimosi taikinio tikimybė yra labai maža. Kai kuriems taikiniams ši prielaida yra teisinga, tačiau tačiau daugelis taikinių, ypač priklausančių tai pačiai baltymų šeimai, turi gana panašias ligandų jungimosi sritis.

Entalpiškai optimizuoti junginiai didžiausią jungimosi energijos dalį gauna dėl stereosavitų vandenilinių ryšių susidarymo. Šie vandeniliniai ryšiai prisideda ne tik prie giminingumo, bet, jei derinami su formos atitiklumu, padidina atrankumą, ypač jei jie susidaro su unikaliomis donorinėmis ar akceptorinėmis sritimis taikinio molekulėje.

Entalpiškai optimizuoti ligandai gali ne tik būti atrankesni, bet taip pat ir turėti didesnį jungimosi giminingumą nei entropiškai optimizuoti dariniai. Kadangi entropinė optimizacija remiasi hidrofobiškumu, visuomet ją riboja junginio tirpumas. Entalpiškai optimizuojami junginiai nesiremia hidrofobiniu efektu, todėl jų lipofiliškumas gali būti reguliuojamas.

# 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

# 2.1. Darbe naudotos medžiagos, tirpalai

Darbe naudoti reagentai ir reagentų rinkiniai pateikti 2.1 lentelėje.

Gamintojas	Produktai			
Aldrich	Etokzolamidas			
Alfa Aesar	Trifluormetansulfonamidas			
BioRad	Glicinas, merkaptoetanolis, TEMED			
Biotechnologijos Institutas	Pentafluorbenzensulfonamidas, VD5, VD6, VD20			
Boehringer Mannheim	Ditiotreitolis			
Ferak Berlin	Tritonas-X			
Fermentas	Agarozė, IPTG,			
	molekulinių masių standartai: GeneRuler <sup>TM</sup> DNA Ladder Mix,			
	Protein Molecular Weight Marker #SM0431,			
	Fermentai klonavimui: GsuI, XmiI, SAP, Klenow			
Fluka	N,N'-metilen-bis-akrilamidas, etidžio bromidas, HCl, Coomasie			
	Brilliant Blue R-250, Coomasie Brilliant Blue G-250, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,			
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaOH			
Lachema	Karbamidas			
Matheson Coleman & Bell	Bromfenolio mėlynasis, fenolio raudonasis			
Roche	Agarose Gel DNA Extraction Kit, PMSF			
Roth	Akrilamidas, ampicilinas, agaras, amonio peroksodisulfatas,			
	dimetilsulfoksidas, mielių ekstraktas, RNazėA, triptonas			
SERVA	CH <sub>3</sub> COONa			
Sigma	Acetazolamidas, NaCl, bCA II, CaCl2, EDTA, hCA I, imidazolas,			
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , NDS, Tris			
Реахим	CH <sub>3</sub> COOH, NiCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O			

2.1 Lentelė. Darbe naudoti reagentai ir reagentų rinkiniai.

#### Genetiniai konstruktai:

CA XIV genas: *pCMV-Sport6-CA14* (RZPD) Ekspresijos vektorius: *pET15b* (Novagen)

#### Bakterijų kamienai:

Genetiniams konstravimams naudotas bakterijų kamienas *E. coli* XL1-Blue (Stratagene): F'::Tn10 (Tet<sup>r</sup>)  $proA^+B^+lacI^q \Delta(lacZ)M15 / recA1 endA1 gyrA96$  (Nal<sup>r</sup>) thi-1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>-</sup>) glnV44 relA lac.

Baltymo ekspresijai naudotas bakterijų kamienas *E.coli* BL21 (DE3), kuriame pašalinti lon ir ompT proteazių genai (Novagen): F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>*( $r_Bm_B^-$ ) gal dcm (DE3).

#### Bakterijų auginimo terpės:

<u>Agarizuota LB (Luria-Bertani) terpė:</u> 2 % agaro, 1 % peptono, 0.5 % mielių ekstrakto, 1 % NaCl, *pH* 7.0

LB terpė: 1 % peptono, 1 % NaCl, 0.5 % mielių ekstrakto, pH 7.0

<u>SOC terpė:</u> 2 % Triptono, 0.5 % mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 % gliukozės (koncentruoti magnio druskų tirpalai steriliai filtruojami ir pridedami į autoklavuotą terpę).

#### Tirpalai DNR išskyrimui šarminės lizės metodu:

<u>Šarminės lizės tirpalas I (P1):</u> 50 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, 100 μg/mL RNazėsA, *pH* 8 <u>Šarminės lizės tirpalas II (P2):</u> 200 mM NaOH, 1% NDS <u>Šarminės lizės tirpalas III (P3):</u> 3 M CH<sub>3</sub>COOH, *pH* 5.5

TE buferis: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0-8.5.

<u>50x TAE buferis:</u> 1 L: 242g Tris, 100 mL 0.5 M EDTA, 57.1 mL ledinės acto rūgšties. Prieš naudojimą buferis skiedžiamas iki 1x.

#### Tirpalai baltymų elektroforezei:

<u>Akrilamidas/BIS</u>	30 g akrilamido ir 0.8 g N,N'-metilen-bis-akrilamido tirpinama					
	dejonizuotame vandenyje ir skiedžiama iki 100 mL, tirpalas					
	filtruojamas, laikomas tamsiame inde 4°C temperatūroje iki 30					
	dienų					
<u>Tris</u>	1.5 M, <i>pH</i> 8.8					
<u>Tris</u>	0.5 M, <i>pH</i> 6.8					
NDS	10% (m/t)					
APS	10% (m/t), šviežiai paruoštas, naudojamas tą pačią dieną					
Elektroforezės buferis 10x	0.025 M Tris, pH 8.3 -8.6, (nekoreguojamas), 1.9 M glicino, 0.035					
	M NDS. Prieš naudojimą skiedžiamas iki 1x					
Bromfenolio mėlis	0.05 % (m/t)					
Pavyzdžio buferis 6x	350 μL 0.5 M Tris, pH 6.8, 50 mg NDS, 46 mg DTT, 150 μ					
	glicerolio					
Kumasi dažas	0.6 g Coomasie Brilliant Blue R-250, 113 mL 95% etanolio, 23 mL					
	ledinės acto rūgšties, 113 mL H <sub>2</sub> O					

### 2.2. Metodai

Metodikų sudarymui naudota (Ausubel et al., 1997; Coligan et al., 2000).

### 2.2.1. Plazmidinės DNR išskyrimas šarminės lizės metodu

Į 2 mL LB terpės su antibiotiku užsėjama viena transformuotų bakterijų (*E. coli* XL1-Blue) kolonija, inkubuojama 37°C temperatūroje per naktį purtant.

1.5 mL kultūros centrifuguojama stalinėje Eppendorf centrifūgoje 10000 aps./min
 30s 4°C temperatūroje. Supernatantas pašalinamas.

- 3) Bakterijų nuosėdos suspenduojamos 200 µL šalto P1 tirpalo.
- 4) Pridedama 200 µL P2 tirpalo, lengvai sumaišoma, laikoma ant ledo 2-5 min.
- 5) Pridedama 200 µL šalto P3 tirpalo, sumaišoma, laikoma ant ledo 3-5 min.

6) Centrifuguojama 13000 aps./min 5 min 4°C temperatūroje, 500 μL supernatanto nupilama į kitą mėgintuvėlį, DNR išsodinimui pridedama 1 mL 96% etanolio, sumaišoma, laikoma ant ledo 5 min.

7) Centrifuguojama 13000 aps./min 5 min, supernatantas pašalinamas.

8) Nuosėdos praplaunamos 70 % etanoliu, centrifuguojama, supernatantas pašalinamas.

- 9) DNR išdžiovinama, tirpinama 30 µL TE buferio.
- 10) DNR mėginys laikomas +4 arba -20°C temperatūroje.

#### 2.2.2. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė vykdoma 1 - 2 % agarozės geliuose, turinčiuose 0.1-0.2 µg/mL etidžio bromido, TAE buferyje, naudojant 10 V/cm įtampą. Geliai analizuojami ultravioletinėje šviesoje (transiliuminatoriuje "ULTRA-LÜM").

#### 2.2.3. Plazmidinės DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

1 μg DNR hidrolizei imama 1 – 10 restrikcijos endonukleazės aktyvumo vienetų. Buferiniai tirpalai bei inkubacijos temperatūra ir laikas parenkami pagal AB "Fermentas" rekomendacijas.

#### 2.2.4. 5'-galinių fosfatų pašalinimas

5'-galinių fosfatų pašalinimui naudojama krevečių šarminė fosfatazė. Reakcija vykdoma +37°C temperatūroje 30 min. (1 vnt. fermento/10 μg DNR) AB "Fermentas" rekomenduojamame buferyje. Fosfatazė inaktyvuojama inkubuojant reakcijos mišinį 15 min. 65°C temperatūroje.

#### 2.2.5. Lipnių DNR galų bukinimas

Lipnių DNR galų bukinimui naodojamas Klenow'o fragmentas. Reakcija vykdoma +37°C temperatūroje 30 min, esant 0.05 mM dNTP koncentracijai, AB "Fermentas" rekomenduojamame buferyje. Inaktyvuojama inkubuojant reakcijos mišinį 10 min. 70°C temperatūroje.

#### 2.2.6. DNR fragmentų gryninimas iš gelio

DNR fragmentų gryninimui iš gelio naudojamas "Roche" rinkinys "Agarose gel DNA extraction kit". Reikiamas DNR fragmentas išpjaunamas iš gelio ir DNR gryninimas atliekamas pagal gamintojo rekomenduojamą standartinį protokolą.

#### 2.2.7. DNR susiuvimas

DNR susiuvimo reakcijai naudojama T4 DNR ligazė. Reakcija vykdoma AB "Fermentas" rekomenduojamame T4 ligazės buferyje, 16 val. 16°C temperatūroje, naudojant 1 – 5 vnt. T4 DNR ligazės 1µg siuvamos DNR. Vektoriaus ir įterpiamo DNR fragmento molekulių galų kiekio santykis siuvimo mišinyje 1:3.

#### 2.2.8. Bakterijų transformacija CaCl<sub>2</sub> metodu

1) [ 2 mL LB terpės užsėjama atitinkamo *E. coli* kamieno ląstelių, kurios bus transformuojamos plazmidine DNR. Auginama 37°C temperatūroje ~4 val. purtant, kol bakterijų kultūros optinis tankis pasiekia 0.4-0.6 ( $\lambda = 550$  nm).

2) Bakterijų kultūra centrifuguojama 4000 aps./min 5 min, supernatantas pašalinamas.

3) Bakterijos suspenduojamos 500  $\mu$ L šalto NaCl tirpalo, centrifuguojama, centrifugatas pašalinamas.

 Bakterijos suspenduojamos 300 μL šalto CaCl<sub>2</sub> tirpalo, inkubuojama 30 min, ant ledo, centrifuguojama, supernatantas pašalinamas.

5) Bakterijos suspenduojamos 100  $\mu$ L šalto CaCl<sub>2</sub> tirpalo, pridedama 1  $\mu$ L plazmidinės DNR, inkubuojama 30 min ant ledo.

Mėgintuvėlis perkeliamas į 42°C termostatą ir inkubuojamas jame 1.5 min, po to
 2-4 min – ant ledo.

7) Pridedama 400 µL SOC terpės, inkubuojama 37°C temperatūroje 45 min.

Po inkubacijos reikiamas tūris transformuotų kompetentinių ląstelių užsėjamas į
 Petri lėkšteles su agarizuota LB terpe ir reikiamu antibiotiku, lėkštelės inkubuojamos termostate
 37°C temperatūroje 16 val.

#### 2.2.9. hCA XIV ekspresija E. coli

hCA XIV ekspresuojama *E. coli* kamiene BL21(DE3). Į skystą LB terpę su 50 µg/mL ampicilino iš šviežiai transformuotos lėkštelės užsėjama viena bakterijų kolonija ir auginama 16 valandų 37°C temperatūroje purtant. Po to "naktinė" kultūra persėjama į didesnį terpės tūrį (skiedžiama santykiu 1:30) ir auginama 37°C temperatūroje, kol optinis tankis ( $\lambda = 550$  nm) pasiekia ~0.6. Baltymo ekspresija indukuojama pridedant IPTG ir ZnSO<sub>4</sub> iki 0.5 mM koncentracijos, indukcija vykdoma 2 – 3 val. Bakterijų kultūra centrifuguojama 6000 aps./min. 30 min., centrifugatas pašalinamas, biomasė laikoma -20°C temperatūroje.

#### 2.2.10. hCA XIV gryninimas ir renatūracija

Biomasė suspenduojama ardymo buferyje (25 mM Tris, 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% tritono-X, 0.1 M merkaptoetanolio, 150  $\mu$ M PMSF, *pH* 8.5) ir maišoma ~1 val +4°C temperatūroje. Ardoma ultragarsu ledo vonelėje, centrifuguojama, tolesniam darbui naudojamos nuosėdos (nes tikslinis baltymas ekspresuojasi intarpinių kūnelių frakcijoje). Nuosėdos praplaunamos buferiu (25 mM Tris, 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1M karbamido) ir vėl centrifuguojama, centrifugatas pašalinamas. Nuosėdos tirpinamos buferyje (25 mM Tris, 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 mM merkaptoetanolio, 8 M karbamido, *pH* 8.0) ir inkubuojama +4°C temperatūroje per naktį, silpnai maišant.

Į denatūruotų baltymų preparatą pridedamas vienas tūris buferio be karbamido (iki galutinės karbamido koncentracijos 4 M) ir centrifuguojant 20000 aps./min. pašalinamos netirpios dalelės. Centrifugatas užnešamas ant nupusiausvyrintos chromatografinės imobilizuotų metalų jonų kolonėlės, įkrautos Ni<sup>2+</sup> jonais. Kolonėlėje vykdoma sorbuoto baltymo renatūracija neigiamu karbamido koncentracijos gradientu, t.y., karbamido koncentracija mažinama nuo 4 M iki 0 M per 10 kolonėlės tūrių (tekėjimo greitis 0.6 mL/min.), praleidžiami dar trys kolonėlės tūriai buferio be karbamido. Baltymo desorbcijai naudojamas linijinis imidazolo gradientas 0 – 0.5 M per 10 kolonėlės tūrių. Chromatografijos frakcijos tikrinamos atliekant NDS-PAAG, tikslinį baltymą turinčios frakcijos apjungiamos, dializuojamos prieš saugojimo buferį (25 mM Tris, 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, *pH* 7), steriliai filtruojamos ir laikomos +4°C temperatūroje. Baltymo renatūracija tikrinama matuojant fermentinį aktyvumą.

#### 2.2.11. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Baltymų elektroforezė atliekama pagal Laemmli metodiką (Laemmli, 1970). Darbe naudoti 12% frakcionuojantieji geliai su 4% koncentruojančiaisiais.

Baltymų elektroforezei denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAAG) geliai ruošiami sumaišant:

Apatinis frakcionuojantis 1	<u>2% gelis:</u>	Viršutinis koncentruojantis 4% gelis:		
Akrilamidas	4 mL	Akrilamidas	0.67 mL	
1.5 M Tris, <i>pH</i> 8.8	2.5 mL	0.5 M Tris <i>pH</i> 6.8	1.25 mL	
10% NDS	100 µL	10% NDS	50 μL	
H <sub>2</sub> O	3.17 mL	H <sub>2</sub> O	3 mL	
10% APS	50 µL	10% APS	25 μL	
TEMED	5 µL	TEMED	5 µL	

Pavyzdžiai elektroforezei paruošiami sumaišant 25  $\mu$ L tiriamojo baltymo ir 5  $\mu$ L 6x pavyzdžio buferio ir pakaitinant 5 min verdančiame vandenyje.

Frakcionuojantis gelis supilamas tarp elektroforezės plokštelių ir užsluoksniuojamas 100 μL vandens. Geliui sustingus, ant jo užpilamas koncentruojantis gelis ir įstatomos elektroforezės "šukos". Viršutiniam geliui sustingus, plokštelės su geliu įstatomos į elektroforezės aparatą, elektroforezės aparato blokas užpilamas 1x elektroforezės buferiu ir išimamos "šukos". Į susidariusius gelio takelius užnešami pavyzdžiai ir elektroforezė vykdoma, kol bromfenolio mėlio frontas pasiekia skiriamojo gelio apačią. (srovės stipris ~20mA). Gelis dažomas Kumasi dažu.

#### 2.2.12. Fermentinio aktyvumo matavimas

Išgrynintos karboanhidrazės fermentinis aktyvumas matuojamas dviem būdais pagal karboksilinio esterio (p-nitrofenilacetato) hidrolizės (24) greitį.



Reakcijos mišinys: 0.1-0.3  $\mu$ M CA, 1 mM p-nitrofenilacetato, 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM Tris, *pH* 7.6. Matuojamas sugerties kitimas ( $\lambda$  = 400 nm) 5 min. Pagal (Pocker and Stone, 1967; Rajaraman et al., 1996)

#### 2.2.13. ITC matavimai

Izoterminio titravimo kalorimetrijos matavimams ruošiami du mėginiai: titruojamasis tirpalas (pilamas į kiuvetę) ir titrantas (juo užpildomas švirkštas). Abiejų mėginių tūris po 1.5 mL.

Baltymo – ligando sąveikos matavimams ruošiamų tirpalų koncentracijų santykis yra:

[baltymo] : [ligando] = 1 : 10

Toks koncentracijų santykis rekomenduojamas tam, kad galėtume išmatuoti ir jungimosi, ir skiedimosi šilumas, t.y., kad visi baltymo aktyvieji centrai būtų įsotinti ligandu maždaug eksperimento viduryje.

Abiejuose tirpaluose turi būti vienodos pagalbinių medžiagų koncentracijos (buferio, druskų, organinių tirpiklių ir kt.) bei tas pats pH. Organinio tirpiklio (DMSO) koncentracija ne didesnė nei 2 %.

Prieš eksperimentą abu mėginiai nudujinami vakuuminiame inde.

Eksperimentas atliekamas izoterminio titravimo kalorimetru Nano-ITC III – CSC 5300. Paruoštais mėginiais užpildoma kiuvetė ir švirkštas, švirkštas įtvirtinamas biuretėje ir įmerkiamas į kiuvetę. Prieš pradedant eksperimentą palaukiama, kol nusistovės tiesi bazinė linija (apie 45 – 60 min.). Eksperimentuose taikytas maišymo greitis 150 aps./min, tarpas tarp injekcijų – 180 – 300 s, injekcijų skaičius – 25 – 50.

Tam, kad išmatuotume jungimosi konstantos vertę, eksperimentai planuojami taip, kad C vertė būtų 5 – 500. C vertė – bedimensinis dydis, naudojamas kalorimetrijoje:

$$C = K_b \cdot [M] \tag{23}$$

kur  $K_b$  – makromolekulės – ligando jungimosi konstanta, [M] – makromolekulės molinė koncentracija. Kai C < 5 arba C > 500, ITC eksperimento metu neišmatuojama jungimosi konstanta.

#### 2.2.14. Sulfonamidinių junginių potenciometrinis titravimas

Potenciometriniam titravimui naudojama pradinė sulfonamidinio junginio koncentracija 5 mM, į mėginį pridedami 2 ekvivalentai NaOH arba HCl ir titruojama atitinkamai HCl arba NaOH tirpalu (0.2 M arba 1 M). Pradinis reakcijos tūris 3 mL. *pH* reikšmė matuojama *pH*-metru su mikroelektrodu.

#### 2.2.15. Matematinis duomenų apdorojimas

ITC duomenų apdorojimui naudojama BindWorks 3.1.5 programa. Kitų duomenų apdorojimui ir teorinių modelių pritaikymui naudojama Microsoft<sup>®</sup> Office Excel 2003 programa.

#### 2.2.16. Baltymo – ligando sąveikos struktūrų modeliavimas

Baltymo – ligando sąveikos struktūrų modeliavimui ir vizualizavimui naudojama kompanijos Accelerys programa ViewerLite 5.0.

#### 2.2.17. Sulfonamidinių junginių pKa reikšmių apskaičiavimas

Sulfonamidinių junginių  $pK_a$  reikšmių apskaičiavimui naudotas kompanijos ChemAxon programos Marvin įrankis MarvinSketch.

### **3. EKSPERIMENTŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS**

# 3.1. Karboanhidrazės – sulfonamidinio ligando jungimosi metu vykstančios reakcijos

Iki šiol daugelis ligandų, besijungiančių prie baltymų, buvo atrasta atsitiktinės paieškos būdu, matuojant potencialią baltymo-taikinio sąveiką su didžiulėmis ligandų bibliotekomis (pvz. aukšto našumo baltymo stabilumo matavimo metodu ThermoFluor<sup>®</sup> (Matulis et al., 2005). Tačiau atsitiktinės paieškos metodais retai pavyksta rasti ligandus, pasižyminčius norimomis savybėmis. Todėl dažnai tokiu būdu aptikti silpnai besijungiantys ligandai yra toliau tobulinami, įvedant ar keičiant jų funkcines grupes. Tokiam tiksliniam ligandų kūrimui svarbu žinoti, kaip pasikeis ligando jungimosi charakteristikos, keičiant tam tikrus pasirinktus jo struktūros fragmentus.

Šiame darbe, kuris yra Biotechnologijos institute vykdomo projekto "Vaistinių medžiagų paieška struktūrinės termodinamikos metodais" dalis, tiriamas vieno iš terapeutinių taikinių – karboanhidrazės – sąveikos su sulfonamidiniais slopikliais termodinaminis mechanizmas izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu.

Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu, matuojant makromolekulės – ligando jungimosi reakcijos metu išsiskiriančią arba sugeriamą šilumą, išmatuojame visų jungimosi metu vykstančių susijusių reakcijų šiluminių efektų sumą. Todėl svarbu yra atskirti susijusių reakcijų indėlį ir nustatyti tikruosius jungimosi reakcijos parametrus – entalpiją, entropiją, laisvąją Gibso energiją, šiluminę talpą.

Manoma, kad sulfonamidiniam ligandui jungiantis prie karboanhidrazės, jo sulfonamidinė grupė turi būti įkrauta neigiamai (deprotonizuota), o fermento aktyviajame centre turi būti ne hidroksido jonas, bet vandens molekulė (Matulis and Todd, 2004). Jungimosi metu turėtų vykti mažiausiai trys protonizacijos-deprotonizacijos reakcijos (**R2**, **R3**, **R4**):

$$CA-Zn-OH + H^+ \leftrightarrow CA-Zn-H_2O$$

$$R2$$

$$PSO NH \leftrightarrow PSO NH + H^+$$

$$R3$$

$$RSO_2NH_2 \leftrightarrow RSO_2NH + H^+$$
 R3

$$Buferis + H^+ \leftrightarrow Buferis H^+$$
 R4

 $RSO_{2}NH_{2}/RSO_{2}NH + CA-Zn-H_{2}O/CA-Zn-OH- + BuferisH^{+}/Buferis \leftrightarrow CA-Zn-NH-SO_{2}R + H_{2}O + Buferis/BuferisH^{+}$  R5

R2 yra karboanhidrazės aktyviajame centre esančio, cinko joną koordinuojančio hidroksido jono protonizacijos reakcija (šios reakcijos termodinamika iki šiol nėra aprašyta literatūroje). R3 aprašo slopiklio deprotonizaciją, o R4 – buferio protonizaciją arba deprotonizaciją.

**R1** yra tikroji jungimosi reakcija, nepriklausoma nuo protonizacijos – deprotonizacijos įtakos (t. y. atspindi vandens molekulės pakeitimą deprotonizuota slopiklio molekule).

Sulfonamidinio ligando jungimasis prie karboanhidrazės stipriausias tame pH intervale, kuriame ligandas yra deprotonizuotas, o prie cinko prisijungęs hidroksido jonas – protonizuotas (t.y. cinko joną koordinuoja vandens molekulė). Taigi optimalus jungimuisi yra pH regionas tarp atitinkamų  $pK_a$  reikšmių, kai  $pK_{a-sulfonamido} < pK_{a-Zn-vandens}$ . Kai pH yra žemesnis už  $pK_{a-sulfonamido}$ arba aukštesnis už  $pK_{a-Zn-vandens}$ , jungimasis yra žymiai silpnesnis. Stebimoji jungimosi konstanta  $K_{b-steb}$  yra tikrosios jungimosi konstantos ir deprotonizuoto slopiklio bei cinko joną koordinuojančią vandens molekulę turinčio baltymo frakcijų sandauga:

$$K_{b-steb} = K_b f_{SO,NH^-} f_{CAZnH_2O}$$
<sup>(25)</sup>

savo ruožtu laisvoji Gibso energija yra:

$$\Delta_{b-steb}G = -RT\ln\left(K_b f_{RSO_2NH^-} f_{CAZnH_2O}\right)$$
<sup>(26)</sup>

Kur R yra universalioji dujų konstanta, o T – absoliuti temperatūra. Jungimosi konstanta ir laisvoji Gibso energija nepriklauso nuo buferio cheminės prigimties, nes buferis nedalyvauja jungimosi reakcijoje.

Deprotonizuoto sulfonamidinio slopiklio frakciją galime apskaičiuoti, kai žinome jo protonizacijos  $pK_a$ :

$$f_{RSO_2NH^-} = \frac{10^{pH - pK_{a-sulfonamido}}}{1 + 10^{pH - pK_{a-sulfonamido}}}$$
(27)

Nuo sulfonamidinės grupės  $pK_a$  reišmės priklauso, kokia junginio dalis bus deprotonizuota, esant atitinkamam pH. Kuo žemesnė sulfonamidinės grupės protonizacijos  $pK_a$  reikšmė, tuo daugiau bus deprotonizuoto junginio (pav. 3.1).



**3.1 pav.** Deprotonizuoto sulfonamidinio junginio frakcijos priklausomybė nuo pH ir sulfonamidinės grupės  $pK_a$  reikšmės (modeliavimo rezultatas). Rodyklėmis pažymėtos atitinkamos  $pK_a$  reikšmės.

Panašiai, karboanhidrazės molekulių su prie cinko prisijungusiu vandeniu frakcija gali būti apskaičiuota, jei žinoma atitinkama  $pK_a$ :

$$f_{CAZnH_2O} = 1 - \frac{10^{pH - pK_{a-Zn-vandens}}}{1 + 10^{pH - pK_{a-Zn-vandens}}}$$
(28)

Protonizuoto hidroksido jono, koordinuojančio baltymo aktyviajame centre esantį  $Zn^{2+}$  joną, dalis didėja, didėjant  $pK_{a-Zn-vandens}$  reikšmei (pav. 3.2).



**3.2 pav.** Karboanhidrazės molekulių, kurių aktyviajame centre su  $Zn^{2+}$  jonu koordinuota vandens molekulė, frakcijos priklausomybė nuo *pH* ir *pK*<sub>*a*-Zn-vandens</sub> reikšmės (modeliavimo rezultatas). Rodyklėmis pažymėtos atitinkamos *pK*<sub>*a*</sub> reikšmės.

Abi šias  $pK_a$  reikšmes –  $pK_{a-sulfonamido}$  ir  $pK_{a-Zn-vandens}$  galima nustatyti eksperimentiškai.

#### 3.2. Sulfonamidinių junginių protonizacijos termodinamikos tyrimas

Sulfonamido protonizacijos  $pK_a$  vertę galima nustatyti potenciometriškai titruojant šio junginio tirpalą žinomos koncentracijos rūgštimi ar šarmu.

Tokio titravimo pavyzdžiu galima pateikti pentafluorbenzensulfonamido (PFS) titravimą rūgštimi (į sulfonamidinio junginio tirpalą pridėti du ekvivalentai natrio šarmo) (pav. 3.3). Iš pradžių nutitruojame šarmo perteklių (pH 9-12), po to titruojame sulfonamidinę grupę.

Pagal eksperimentinius duomenis parenkame teorinės lygties (29) (Butler, 1998) parametrus:

$$\frac{CV}{V+V_0} = \frac{C_0 V_0}{V+V_0} \frac{K_a}{[H^+]+K_a} + \frac{K_w}{[H^+]} - [H^+]$$
(29)

Čia C – titranto (šio atveju rūgšties) koncentracija, V – titranto tūris,  $C_0$  – pradinė sulfonamidinio junginio koncentracija,  $V_0$  – pradinis titruojamo tirpalo tūris,  $K_w$  – vandens jonizacijos pusiausvyros konstanta,  $K_a$  – titruojamo sulfonamidinio junginio protonizacijos pusiausvyros konstanta.

Tuo būdu gauname išmatuotąją junginio  $pK_a$  vertę 8.1



**3.3 pav.** Sulfonamidinių junginių titravimo kreivės. A – pentafluorbenzensulfonamido potenciometrinio titravimo kreivė. Titruojama druskos rūgštimi, pradiniame tirpale yra du ekvivalentai natrio šarmo. Taškai atitinka eksperimentinius duomenis, kreivė – (29) lygtimi aprašytą teorinį modelį, pagal kurį apskaičiuojama titruojamo junginio  $pK_a$  reikšmė. B – palyginimui pateiktos junginių su skirtingomis  $pK_a$  reikšmėmis titravimo kreivės (modeliavimo rezultatas). Kuo žemesnė junginio protonizacijos  $pK_a$  vertė, tuo ryškesnis pirmasis kreivės linkis ir mažesnis antrasis.

Junginio  $pK_a$  reikšmės teoriniam apskaičiavimui yra sukurta įvairių kompiuterinių programų. Pavyzdžiui, naudojantis kompanijos ChemAxon programos Marvin įrankiu MarvinSketch, suskaičiuota PFS sulfonamidinės grupės  $pK_a$  reikšmė yra 8.0 (pav. 3.4). Ši programa cheminių junginių  $pK_a$  reikšmes skaičiuoja pagal dalinių krūvių pasiskirstymą molekulėje.



**3.4 pav.** Teorinė pentafluorbenzensulfonamido protonizacijos mikroformų pasiskirstymo priklausomybė nuo pH (programos Marvin rezultatas). Rūgštinėje terpėje dominuoja junginio su protonizuota sulfonamidine grupe mikroforma, o šarminėje – su deprotonizuota. Perėjimas iš vienos formos į kitą vyksta beveik neutralioje terpėje, abiejų formų yra po lygiai ties pH 8.0, tai ir yra šio junginio  $pK_a$  reikšmė.

Taigi teoriškai apskaičiuota ir eksperimentiškai išmatuota pentafluorbenzensulfonamido sulfonamidinės grupės  $pK_a$  reikšmės yra artimos.

PFS titravimą rūgštimi stebint ITC metodu (pav. 3.5), išmatuojame sulfonamidinės grupės protonizacijos entalpiją.



**3.5 pav.** PFS titravimo druskos rūgštimi (į sulfonamidinio junginio tirpalą pridėta 2 ekvivalentai NaOH): A – pradiniai ITC duomenys, B – ITC metodu titravimo metu išmatuoti galios pokyčiai perskaičiuoti į šilumos kiekio pokyčius. Taškai atitinka eksperimentinius duomenis, kreivė – teorinį modelį (programa BindWorks 3.1.5).  $[L_t]/[M_t]$  – ligando / makromolekulės molinis santykis.

~ -45 kJ/mol stebime šarmo neutralizacijos reakciją (į sulfonamidinio junginio tirpalą pridėta 2 ekvivalentai NaOH), o ~ -10 kJ/mol – titruojasi sulfonamidinė grupė (pav. 3.5). Pritaikius teorinį modelį (programa BindWorks 3.1.5) nustatyta sulfonamidinės grupės protonizacijos entalpija yra -7.7 kJ/mol.

3.1 lentelėje pateikiamos visų darbe naudotų sulfonamidinių karboanhidrazės slopiklių (pav. 3.6) teoriškai apskaičiuotos, eksperimentiškai išmatuotos ir literatūroje pateikiamos sulfonamidinės grupės  $pK_a$  reikšmės bei kalorimetriškai išmatuotos sulfonamidinės grupės protonizacijos entalpijos vertės.

B

**3.1 lentelė.** Darbe naudotų sulfonamidinių karboanhidrazės slopiklių sulfonamidinės grupės  $pK_a$  reikšmės ir protonizacijos entalpijos vertės. Matavimo paklaida  $pK_a$  reikšmės nustatymui ~0.2, entalpijos nustatymui ~6 kJ/mol.

Junginys	Eksperimentiškai	Apskaičiuota	Literatūroje	Kalorimetriškai
	išmatuota	sulfonamidinės	pateikiamos	išmatuota
	sulfonamidinės	grupės <i>pK<sub>a</sub></i> reikšmė	sulfonamidinės	sulfonamidinės grupės
	grupės <i>pK</i> a	(programa Marvin)	grupės <i>pK<sub>a</sub></i>	protonizacijos entalpija
	reikšmė		reikšmės	(25°C), kJ/mol
TFMSA		5.89	$5.9^a, 6.1^b, 6.3^c$	-21
EZA		7.77	$8.0^d$	-8.1
AZM		7.32	$7.2^{\rm e}, 7.4^{\rm d}$	-23
VD5	9.9	9.55		-7.9
VD6	9.9 <sup>g</sup>	9.55		-6.7
VD20	9.9 <sup>g</sup>	9.55		-7.6
PFS	8.1	8.0	$8.05^{f}$	-7.7

<sup>*a*</sup> – (Maren & Conroy, 1993), <sup>*b*</sup> – (Matulis & Todd, 2004), <sup>*c*</sup> – (Trepka et al., 1974), <sup>*d*</sup> – (Remko & von der Lieth, 2004), <sup>*e*</sup> – (Coleman, 1975), <sup>*f*</sup> – (Olander et al., 1973). <sup>*g*</sup> – pagal VD5 eksperimentinius ir programos Marvin teorinius rezultatus.



**3.6 pav.** Darbe naudotų sulfonamidinių karboanhidrazės slopiklių struktūrinės formulės. Junginiai VD5, VD6 ir VD20 skiriasi pakaitu R. Šie junginiai pirmą kartą susintetinti Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje (junginius sintetino Dr. V. Dudutienė).

# 3.3. bCA II – TFMSA jungimosi reakcijos protonizacijos skaičiaus ir baltymo aktyviajame centre esančio hidroksido jono protonizacijos $pK_a$ reikšmės nustatymas

Detaliam karboanhidrazės jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais supratimui, svarbu nustatyti karboanhidrazės aktyviajame centre esančio,  $Zn^{2+}$  koordinuojančio hidroksido jono protonizacijos  $pK_a$ . Tačiau šią  $pK_a$  vertę būtų sudėtinga išmatuoti pvz., titruojant baltymą rūgštimi ar šarmu (kaip tai daroma sulfonamidinių junginių atveju). Ją nustatyti galima ITC metodu, išmatuojant jungimosi termodinamiką skirtingą protonizacijos entalpiją turinčiuose buferiuose, plačiame *pH* intervale (Matulis and Todd, 2004). Susijusių protonizacijos reakcijų įtakos jungimosi reakcijai įvertinimo metodą aprašė Baker ir Murphy (Baker and Murphy, 1996).

Šiame darbe matuotas jaučio karboanhidrazės II (bCA II) jungimasis su karboanhidrazės ligandu – trifluormetansulfonamidu (TFMSA), kurio protonizacijos termodinamika yra ištirta (Matulis and Todd, 2004). Šis baltymas dažnai naudojamas kaip modelinis naujų potencialių ligandų jungimosi matavimams, todėl yra svarbu žinoti tikslias šio jungimosi termodinamines charakteristikas. bCA II – TFMSA jungimasis tirtas dviejuose skirtingą protonizacijos entalpiją turinčiuose buferiuose – Tris ir fosfatiniame – *pH* intervale nuo 5 iki 10, 25°C temperatūroje.

Šios matavimų serijos metu nustatome bendrą susijusiose reakcijose išskirtų ar sunaudotų protonų skaičių *n*. Protonizacijos skaičių taip pat galime teoriškai apskaičiuoti žinodami ligando sulfonamidinės grupės protonizacijos ir  $Zn^{2+}$  koordinuojančio hidroksido jono protonizacijos  $pK_a$  vertes:

$$n_{teor} = \frac{K_{a-sulfonamido}K_{a-Zn-vandens} - [H^+]^2}{[H^+]^2 + K_{a-sulfonamido}[H^+] + K_{a-sulfonamido}K_{a-Zn-vandens}} = \frac{10^{-pK_{a-sulfonamido}}10^{-pK_{a-sulfonamido}} - (10^{-pH})^2}{(10^{-pH})^2 + 10^{-pK_{a-sulfonamido}}10^{-pH} + 10^{-pH_{sulfonamido}}10^{-pK_{a-Zn-vandens}}}$$
(30)

Kadangi TFMSA sulfonamidinės grupės protonizacijos  $pK_a$  reikšmė yra žema (6.1), šiuo atveju priimame, kad  $pK_{a-sulfonamido} < pK_{a-Zn-vandens}$ . Priklausomai nuo pH, protonų skaičius gali kisti nuo -1 iki 1. Kai  $pH < pK_{a-sulfonamido} < pK_{a-Zn-vandens}$ , n artės prie -1, t.y. ligando jungimosi metu vienas protonas bus išlaisvintas ir jį suriš buferis. Šis protonas susidaro sulfonamidinės grupės deprotonizacijos metu. Aukštuose pH, kai  $pH > pK_{a-Zn-vandens} > pK_{a-sulfonamido}$ , n artės prie 1 – vieną protoną suriš hidroksido anijonas, kompleksuotas su karboanhidrazės aktyviojo centro cinko jonu. Panašiai galime apskaičiuoti atskirai surištų ar išlaisvintų protonų skaičių abiejuose procesuose – CA aktyviojo centro hidroksido protonizacijos:

$$n_{Zn-vandens} = \frac{10^{-pK_{a-sulfonamido}} 10^{-pK_{a-Zn-vandens}}}{(10^{-pH})^2 + 10^{-pK_{a-sulfonamido}} 10^{-pH} + 10^{-pK_{a-sulfonamido}} 10^{-pK_{a-Zn-vandens}}}$$
(31)

ir sulfonamidinės grupės deprotonizacijos:

$$n_{sulfonamido} = \frac{-(10^{-pH})^2}{(10^{-pH})^2 + 10^{-pK_{a-sulfonamido}} 10^{-pH} + 10^{-pK_{a-sulfonamido}} 10^{-pK_{a-zn-vandens}}}$$
(32)

Bendras karboanhidrazės – sulfonamidinio ligando jungimosi reakcijos protonizacijos skaičius (pav. 3.7):

$$n = n_{sulfonamido} + n_{Zn-vandens} \tag{33}$$

3.7 pav. raudona kreivė žymi karboanhidrazės aktyviojo centro būvį: žemame  $pH \text{ Zn}^{2+}$ koordinuoja vandens molekulė ir **R2** reakcija nevyksta, o aukštame pH OH<sup>-</sup> protonizacijai sunaudojamas vienas H<sup>+</sup> jonas. Mėlyna kreivė rodo ligando sulfonamidinės grupės deprotonizacijos metu (reakcija **R3**) išlaisvinamų protonų skaičių – žemame pH šios reakcijos metu išskiriamas vienas protonas. Violetinė kreivė – suminio abiejose protonizacijos/deprotonizacijos reakcijose (**R2** ir **R3**) išskirtų/sunaudotų protonų skaičiaus kitimas pH intervale 5-10.



**3.7 pav.** bCA II – TFMSA jungimosi reakcijos protonizacijos skaičiaus priklausomybė nuo *pH*. Taškai atitinka eksperimentinius duomenis, kreivės – (31) - (33) lygtimis aprašytą teorinį modelį.

(0.0)

Bendrojo teorinių kreivių parametrų taikymo pagal eksperimentinius duomenis būdu apskaičiuojame bCA II aktyviojo centro hidroksido protonizacijos  $pK_a$  reikšmę – 7.3.

Kai žinome ligando sulfonamidinės grupės bei karboanhidrazės aktyviajame centre su cinko jonu koordinuotos vandens molekulės protonizacijos/deprotonizacijos entalpijas bei abiejų reakcijų protonizacijos skaičius, galime apskaičiuoti stebimąją entalpiją bet kuriame pH (pav. 3.8):

$$\Delta_{steb}H = \Delta H_0 + n_{sulfonamido}\Delta H_{sulfonamido} + n_{Zn-vandens}\Delta H_{Zn-vandens} - n_{buferio}\Delta H_{buferio}$$
(34)

čia  $H_0$  yra "tikroji" jungimosi reakcijos **R1** entalpija,  $\Delta H_{sulfonamido}$  yra sulfonamidinio ligando protonizacijos entalpija.  $\Delta H_{buferio}$  yra buferio protonizacijos entalpija. Pvz., 25°C temperatūroje Tris protonizacijos entalpija yra -47,45 kJ/mol, o fosfato – -5,10 kJ/mol (Matulis and Todd, 2004). Daugiklis  $n_{buferio}$  prieš buferio protonizacijos entalpiją yra ligando sulfonamidinės grupės ir cinko vandens molekulės protonizacijos skaičių suma su priešingu ženklu, nes baltymo išlaisvinamus protonus sujungia buferis, ir atvirkščiai.



**3.8 pav.** Stebimosios bCA II – TFMSA jungimosi reakcijos entalpijos  $\Delta H_{steb}$  priklausomybės nuo *pH* dviejuose skirtingą protonizacijos entalpiją turinčiuose buferiuose – tris ir fosfatiniame, eksperimentinių duomenų palyginimas su (34) lygtimi aprašyto modelio kreivėmis. Taškai atitinka eksperimentiškai išmatuotas vertes, kreivės – (34) lygtimi aprašytą modelį.

Žemame *pH* vyksta ligando sulfonamidinės grupės deprotonizacija ir atitinkamai – buferio protonizacija. Skirtumas tarp tris ir fosfato protonizacijos entalpijų  $\Delta(\Delta H_{buferio}) = \Delta H_{tris}$ - $\Delta H_{fosf}$ =-42.35 kJ/mol. Aukštame *pH* – priešingai – vyksta buferio protonizacija ir  $\Delta(\Delta H_{buferio}) =$ 42.35 kJ/mol. Jei TFMSA – bCA II jungimosi reakcija vyktų buferyje, kurio protonizacijos entalpija lygi nuliui, stebimoji eksperimentinė entalpija būtų tokia, kaip pavaizduota 3.9 pav. Horizontali linija todo tikrąją jungimosi reakcijos (atitinkančio **R1** lygtį) entalpiją (-45 kJ/mol). Žemame *pH* jungimosi entalpija yra mažiau egzoterminė, nes vyksta sulfonamidinio slopiklio deprotonizacija (endoterminis procesas, kurio entalpija 21 kJ/mol), o aukštame *pH* stebimoji entalpija yra labiau egzoterminė, nes vyksta karboanhidrazės aktyviojo centro cinko joną koordinuojančio hidroksido jono protonizacija (egzoterminis procesas, kurio entalpija -42 kJ/mol).



**3.9 pav.** TFMSA – bCA II jungimosi metu vykstančių reakcijų entalpijų atskyrimas. Taškai žymi eksperimentinius duomenis, raudona tiesė – tikrąją jungimosi reakcijos entalpiją, nepriklausomą nuo pH, mėlyna kreivė – teorinį stebimosios entalpijos modelį, aprašytą (35) lygtimi.

Stebimosios entalpijos priklausomybės nuo pH teorinė kreivė aprašoma lygtimi:

$$\Delta H_{teor.} = \Delta H_0 + n_{sulfonamido} \Delta H_{sulfonamido} + n_{Zn-vandens} \Delta H_{Zn-vandens}$$
(35)

Pagal šį modelį, didėjant cinką koordinuojančios vandens molekulės  $pK_a$  reikšmei, stebimosios entalpijos priklausomybės nuo pH kreivėse vis labiau ryškėja du linkiai – pirmasis maždaug ties sulfonamidinės grupės protonizacijos  $pK_a$  reikšme, antrasis – ties Zn-vandens protonizacijos  $pK_a$  reikšme (pav. 3.10).



**3.10 pav.** Sulfonamidinio junginio – karboanhidrazės jungimosi reakcijos stebimosios entalpijos priklausomybė nuo *pH*, kai buferio protonizacijos entalpija lygi nuliui (modeliavimo rezultatas). Skirtingų spalvų kreivės žymi entalpijos kitimą, esant skirtingoms aktyviojo centro Zn-vandens  $pK_a$  reikšmėms. Skaičiavimuose naudota sulfonamidinės grupės  $pK_a = 6.1$  (TFMSA sulfonamidinės grupės  $pK_a$ ).

#### 3.4. hCA XIV klonavimas, ekspresija, gryninimas

Jungimosi termodinamikos tyrimams sukonstruotas N-gale heksahistidininį inkarą turintis žmogaus karboanhidrazės XIV konstruktas (16 – 285 aminorūgštys), atitinkantis pilno žmogaus baltymo užląstelinę dalį, kurioje yra fermento aktyvusis centras (pav. 3.11)



3.11 pav. CA XIV konstruktas.

*hCA14* geno dalis, koduojanti užląstelinę baltymo dalį, įkelta į bakterijų ekspresinį vektorių pET15b, turintį IPTG indukuojamą promotorių (pav. 3.12)



**3.12 pav.** *hCA14* klonavimo schema. Vektorius pCMV-Sport6 su *CA14* genu (iš kompanijos RZPD) hidrolizuotas restrikcijos endonukleazėmis GsuI ir XmiI, atlikus preparatyvinę DNR elektroforezę agaroziniame gelyje, reikiamas 810 bp fragmentas išgrynintas iš gelio ir bukais galais įsiūtas į BamHI restrikcijos endonukleaze hidrolizuotą bakterijų ekspresinį vektorių pET15b.

hCA XIV ekspresuotas *Escherichia coli* kamiene BL21(DE3). Tikslinis baltymas ekspresuojasi intarpinių kūnelių pavidalu (pav. 3.13) (keičiant ekspresijos sąlygas – žeminant auginimo temperatūrą, mažinant induktoriaus koncentraciją ir kt. tirpaus baltymo gauti nepavyko).



**3.13 pav.** hCA XIV ekspresija (NDS-PAAG). Takeliuose: 1 – prieš indukciją (bendras lizatas); 2, 3 ir 4 – po indukcijos (0.5 mM IPTG, 0.5 mM ZnSO<sub>4</sub> 2 val., 37°C): 2 – bendras lizatas, 3 – netirpi frakcija, 4 – tirpi frakcija.

Baltymas turi heksahistidininį inkarą, todėl buvo grynintas imobilizuotų metalų jonų chromatografijos metodu su papildoma renatūracijos stadija (neigiamas karbamido koncentracijos gradientas nuo 4 M iki 0 M) (pav. 3.14). Gautas baltyminis preparatas turėjo ~2.5 nmol/(min×µg) fermentinį aktyvumą.



**3.14 pav.** hCA XIV gryninimo imobilizuotų metalų jonų chromatografijos metodu rezultatai (NDS-PAAG). Takeliuose: 1 – intarpinių kūnelių frakcija, 2 – chromatografijos metu nesisorbavusių baltymų frakcija, 3 – 9 – chromatografijos frakcijos su tiksliniu baltymu.

# 3.5. Trijų karboanhidrazės izofermentų sąveikos su sulfonamidiniais ligandais palyginimas

Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu buvo išmatuotas trijų karboanhidrazės formų – jaučio II (bCA II), žmogaus I (hCA II) ir žmogaus karboanhidrazės XIV aktyviojo centro domeno (hCA XIV) (3.4. skyrius) jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais TFMSA, AZM, EZA, VD5, VD6, VD20, PFS (formulės pateiktos pav. 3.6) metu išskiriama šiluma. Jungimasis tirtas tris buferyje, *pH* 7.0.

Kaip minėta, karboanhidrazės – sulfonamidinio ligando jungimosi stiprumą įtakoja ligando sulfonamidinės grupės ir baltymo aktyviajame centre esančio hidroksido jono, koordinuojančio  $Zn^{2+}$ , protonizacijos  $pK_a$  reikšmės (kuo žemesnė  $pK_{a-sulfonamido}$  ir aukštesnė  $pK_{a-zn-vandens}$ , tuo jungimasis stipresnis dėl cinko jono – sulfonamidinės grupės azoto sąveikos). Tačiau ši sąveika nėra vienintelė, lemianti jungimosi stiprumą, todėl 3.2 lentelėje pateiktos trijų karboanhidrazės izofermentų – sulfonamidinių slopiklių jungimosi konstantos neišsidėsto tiesiogiai pagal sulfonamidinės grupės  $pK_a$  reikšmes, nors bendra tendencija išlieka.

**3.2 lentelė.** Skirtingų karboanhidrazės izofermentų – sulfonamidinių ligandų porų stebimosios jungimosi konstantos,  $M^{-1}$  (tris, *pH* 7, 25°C). Matavimo paklaida jungimosi konstantos nustatymui ~10%.

		bCA II		hCA I	
Ligandas $pK_{a-sulfonam}$		$(pK_{a-Zn-vandens} 7.3)$		$(pK_{a-Zn-vandens} 8.5)$	hCA XIV
		ITC	Fluoresc.		
TFMSA	6.1	5.3E+06	5.0E+06 <sup><i>a</i></sup>	1.3E+07	1.7E+06
AZM	7.3	5.0E+06	4.5E+06 <sup>a</sup>	3.1E+06	
EZA	8.0	1.0E+07		9.2E+06	1.2E+06
VD5	9.9	9.9E+05	$5.0E+05^{b}$	2.2E+06	2.2E+06
VD6	9.9	4.7E+06	8.0E+05 <sup>b</sup>	2.3E+06	6.4E+05
VD20	9.9	5.9E+05	$7.0E+05^{b}$	1.8E+06	2.5E+06
PFS	8.1	1.9E+06	$2.5E+06^{b}$	2.9E+06	

<sup>*a*</sup> - (Matulis et al., 2005), <sup>*b*</sup> – Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijos nepublikuoti rezultatai (Z. Toleikis)

Palyginimui 3.2 lentelėje pateiktos jaučio karboanhidrazės II – sulfonamidinių slopiklių jungimosi konstantos, nustatytos fluorescenciniu baltymo stabilumo tyrimo metodu pagal

baltymo ir baltymo-ligando komplekso lydymosi temperatūrų skirtumą, naudojant fluorescencinę žymę 1-anilino-8-naftaleno sulfonatą (Matulis et al., 2005).



**3.15 pav**. Jungimosi reakcijų, kurioms su skirtinga jungimosi konstanta, būdingi rezultatai.  $K_b(A) > K_b(B) > K_b(C)$ . A – bCA II – EZA jungimasis, B – bCA II – PFS, C – bCA II – VD6. Kairėje pusėje pateikiami pirminiai duomenys, dešinėje – integruotos kreivės.

Tačiau stebimosios jungimosi konstantos vertė nesuteikia informacijos apie baltymo – ligando sąveikos termodinaminį mechanizmą. Reikia apskaičiuoti "tikruosius" jungimosi reakcijos parametrus, atitinkančius **R1** lygtį. Todėl pagal gautus rezultatus, taikant (34) lygtį, apskaičiuota tikroji karboanhidrazės – ligando jungimosi reakcijos entalpija (3.3 lentelė). Ši entalpija nepriklauso nuo protonizacijos – deprotonizacijos reakcijų šiluminių efektų ir atitinka vandens molekulės pakeitimo deprotonizuota slopiklio molekule metu išsiskiriančią šilumą. Tik šią "tikrąją" jungimosi entalpiją galima koreliuoti su sąveikos struktūriniais parametrais, tokiais kaip sąveikaujančio paviršiaus plotas ir pan.

**3.3 lentelė.** Trijų karboanhidrazės izofermentų – bCA II, hCA I ir hCA XIV jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais entalpijos skaičiavimas. hCA I aktyviojo centro vandens molekulės, koordinuotos su  $Zn^{2+}$ , hidratacijos termodinaminiai duomenys iš (D. Matulis, nepublikuoti duomenys). Matavimo paklaida jungimosi entalpijos nustatymui, ~6 kJ/mol.

		TFMSA	AZM	EZA	VD5	VD6	VD20	PFS
	$\Delta H_{sulfonamido}$	-21	-23	-8.1	-7.9	-6.7	-7.8	-7.7
	$n_{sulfonamido}$	-0.08	-0.51	-0.87	-0.99	-0.99	-0.99	-0.89
	$\Delta H_{buferio}$	47.4	47.4	47.4	47.4	47.4	47.4	47.4
	<i>n<sub>buferio</sub></i>	-0.23	-0.23	-0.23	-0.23	-0.23	-0.23	-0.23
	$\Delta H_{steb.}$	-40	-111	-120	-50	-63	-12	-52
bCA II	$\Delta H_{Zn-vandens}$	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42
	<i>n</i> <sub>Zn-vandens</sub>	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
	$\Delta H_{ heta}$	-40	-120	-124	-56	-68	-18	-59
	$\Delta H_{steb.}$	-68	-52	-71	-75	-117	-54	-116
hCA I	$\Delta H_{Zn-vandens}$	-33	-33	-33	-33	-33	-33	-33
	n <sub>Zn-vandens</sub>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
	$\Delta H_0$	-66	-60	-74	-80	-120	-58	-120
hCA XIV	$\Delta H_{steb.}$	-49		-35	-22	-18	-36	

Palankiausios apskaičiuotos karboanhidrazės – ligando jungimosi "tikrosios" entalpijos gautos jaučio II karboanhidrazei jungiantis su AZM ir EZA, o žmogaus I karboanhidrazei – su VD6 ir PFS. hCA XIV "tikrųjų" jungimosi su sulfonamidiniais ligandais entalpijų suskaičiuoti negalime, nes nėra nustatyta šio baltymo aktyviajame centre esančio hidroksido jono protonizacijos pK<sub>a</sub> reikšmė ir protonozacijos entalpijos vertė.

Žinant "tikrają" karboanhidrazės – sulfonamidinio ligando jungimosi entalpiją, taip pat pagal (25) formulę apskaičiavus "tikrają" jungimosi konstantą ir iš jos pagal (22) formulę –

"tikrają" jungimosi proceso laisvąją Gibso energiją, galima įvertinti entalpijos ir entropijos indėlį jungimosi stiprumui. Kaip parodyta 3.16 pav., beveik visose tirtose karboanhidrazės – sulfonamidinio ligando jungimosi reakcijose dominuoja entalpijos indėlis jungimosi laisvajai energijai, o entropinis komponentas daugeliu atvejų yra netgi nepalankus. Šie rezultatai rodo, kad tirti ligandai savitai atpažįsta karboanhidrazės aktyvųjį centrą. Ypač tai pasakytina apie Biotechnologijos institute susintetintus VD5/6/20 junginius, kurių "tikroji" jungimosi su hCA I konstanta yra net 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> eilės (3.4 lentelė). Šių junginių sulfonamididinės grupės protonizacijos  $pK_a$  reikšmė yra gana aukšta (9.9), lyginant su pvz., TFMSA  $pK_a$  (6.1); tai atspindi ir stebimosios jungimosi konstantos vertės – TFMSA jungiasi su karboanhidrazėmis šiek tiek stipriau nei VD5/6/20 junginiai (3.2 lentelė). Tačiau įvertinus "tikrąsias" jungimosi konstantos vertės pastebime, kad VD5/6/20 junginiai karboanhidrazių aktyvųjį centrą atpažįsta savičiau nei TFMSA (3.4 lentelė). Taigi VD5/6/20 galėtų būti geri pradiniai junginiai tam tikrių karboanhidrazių izofermentų sulfonamidinių slopiklių kūrimui – jie jungiasi prie karboanhidrazių pakankamai stipriai ( $K_{b-steb} \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) ir savitai atpažįsta baltymo aktyviojo centro kišenę ("tikroji"  $K_b \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ ).

	bCA II	hCA I
TFMSA	9.0E+6	2.2E+7
AZM	2.3E+7	1.4E+7
EZA	1.7E+8	1.5E+8
VD5	1.2E+9	2.6E+9
VD6	5.7E+9	2.8E+9
VD20	7.0E+8	2.2E+9
PFS	3.8E+7	5.9E+7

**3.4 lentelė.** "Tikrosios" bCA II ir hCA I – sulfonamidinių slopiklių jungimosi konstantos, M<sup>-1</sup>, apskaičiuotos pagal (25) lygtį.

Pav. 3.16 pateikti rezultatai patvirtina teiginį, kad vien reakcijos laisvosios energijos nustatymas suteikia mažai informacijos apie jungimosi procesą: dėl entalpijos – entropijos kompensacijos visų reakcijų  $\Delta G$  vertės yra gana artimos, kinta ~15 kJ/mol ribose. Tuo tarpu  $\Delta H$  ir  $T\Delta S$  verčių variacija yra žymiai didesnė. Ypač didelis bCA II – EZA, bCA II – AZM, hCA I – VD6 ir hCA I – PFS entalpijos indėlis jungimosi reakcijos laisvajai energijai.



**3.16 pav.** "Tikrosios" karboanhidrazės – sulfonamidinio ligando jungimosi reakcijos entalpinio ir entropinio komponentų indėlis laisvajai energijai: A – sulfonamidinių slopiklių jungimasis su bCA II, B – su hCA I.

Daugeliu atvejų pagal stebimosios jungimosi kontantos vertę hCA I su sulfonamidiniais ligandais jungiasi stipriau nei bCA II ir tai galima paaiškinti tuo, kad skiriasi šių baltymų aktyviajame centre esančio hidroksido jono protonizacijos  $pK_a$  reikšmės (hCA I > bCA II) (3.2 lentelė). hCA XIV su tirtais sulfonamidiniais ligandais jungiasi silpniau nei bCA II ir hCA I. Tai galėtų lemti pvz., žemesnė šio baltymo aktyviajame centre esančio hidroksido jono protonizacijos  $pK_a$  reikšmė, tačiau ji eksperimentiškai nėra nustatyta. Taip pat silpnesnį jungimąsi galėtų įtakoti baltymo aktyviojo centro struktūros ypatumai. Kaip parodyta pav. 3.17, CA XIV (paveikslėlyje pateikta pelės homologo struktūra, nes žmogaus CA XIV struktūra neišspręsta) aktyviojo centro kišenė viena kryptimi yra panašaus dydžio kaip ir bCA II bei hCA I, o kita kryptimi – žymiai ilgesnė. Galbūt erdviškai mažesnių ligandų jungimosi su hCA XIV metu susidaro mažiau tiesioginių baltymo – ligando sąveikų.







**bCA II** (PDB ID 1V9E) **bCA I** (PDB ID 1AZM) **mCA XIV** (PDB ID 1RJ6)

3.17 pav. bCA II, hCA I ir mCA XIV aktyviųjų centrų paviršių palyginimas.

Detalesniam tirtų karboanhidrazių izofermentų – sulfonamidinių slopiklių jungimosi įvertinimui ir atskirų aminorūgščių – ligando molekulės sąveikų identifikavimui šiuo metu nepakanka kristalografinių duomenų.

# IŠVADOS

- Pagal izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu išmatuotas stebimųjų jungimosi entalpijų vertes, su sulfonamidiniais junginiais stipriausiai jungiasi hCA I, silpniau bCA II, dar silpniau hCA XIV.
- 2. Karboanhidrazės sulfonamidinių slopiklių stebimosios jungimosi konstantos neišsidėsto tiesiogiai pagal  $pK_a$  reikšmes, tačiau bendra tendencija išlieka: kuo žemesnė  $pK_{a-sulfonamido}$  ir aukštesnė  $pK_{a-Zn-vandens}$ , tuo stebimas jungimasis stipresnis dėl cinko jono sulfonamidinės grupės azoto sąveikos. Stebimųjų jungimosi konstantų eilės:

hCA I:TFMSA > EZA > AZM > PFS > VD6 > VD5 > VD20bCA II:EZA > TFMSA > AZM > VD6 > PFS > VD5 > VD20

- Karboanhidrazės sulfonamidinio ligando jungimosi metu vyksta mažiausiai keturios susijusios reakcijos: 1) karboanhidrazės aktyviajame centre koordinuotos vandens molekulės pakeitimas deprotonizuota sulfonamidinio ligando molekule, 2) karboanhidrazės aktyviajame centre koordinuoto hidroksido jono protonizacija, 3) ligando sulfonamidinės grupės deprotonizacija, 4) buferio protonizacija/deprotonizacija. Kiekviena iš šių reakcijų prisideda prie bendrų stebimųjų reakcijos termodinaminių parametrų: Δ*H*, Δ*G*, Δ*S*.
- 4. Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu nustatyta jaučio II karboanhidrazės aktyviajame centre esančio hidroksido jono, koordinuoto su  $Zn^{2+}$  jonu, protonizacijos entalpija -42 kJ/mol, *pK*<sub>a</sub> reikšmė lygi 7.3.
- Daugumos tirtų karboanhidrazės izofermentų sulfonamidinių slopiklių jungimosi reakcijų laisvąją Gibso energiją labiausiai lemia palankus jungimosi entalpijos pokytis, ir silpnesnis nepalankus entropijos pokytis.
- Pagal "tikrąsias" karboanhidrazių sulfonamidinių ligandų jungimosi konstantas, efektyviausiai su karboanhidrazėmis jungiasi nauji Biotechnologijos institute susintetinti VD5/6/20 junginiai (7x10<sup>8</sup> 5.7×10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>). Tirtų sulfonamidinių karboanhidrazės slopiklių savitumas baltymo aktyviajam centrui išsidėsto tokia eile:

hCA I/bCA II VD6 > VD5 > VD20 > EZA > PFS > AZM > TFMSA.

#### Summary

# Thermodynamic Mechanism of Carbonic Anhydrase – Sulfonamide Inhibitor Interaction by Isothermal Titration Calorimetry

Carbonic anhydrases are widely-spread enzymes, present in mammals in at least 16 different isoforms. Inhibition of these enzymes may be exploited clinically in the treatment or prevention of a variety of disorders, such as glaucoma and cancer.

In the present study the thermodynamics of interaction between three carbonic anhydrase isoenzymes, namely – bovine carbonic anhydrase II, human carbonic anhydrases I and XIV, and seven sulfonamide derivatives was studied by isothermal titration calorimetry. The contribution of four linked reactions, (1) displacement of water molecule in the protein active site by a deprotonated sulfonamide group of the ligand, 2) protonation of the hydroxide bound to active site zinc ion, 3) deprotonation of sulfonamide group of the ligand, 4) protonation or deprotonation of the buffer) to the observed thermodynamic parameters –  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  and  $\Delta S$  – was evaluated and the "intrinsic" binding parameters, independent of *pH* and buffer, were calculated. It was estimated that new compounds, synthesized at the Institute of Biotechnology, recognize the active site cleft of carbonic anhydrases more specifically when compared to some classic carbonic anhydrase inhibitors.

### PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju magistrinio darbo vadovui dr. D. Matuliui už suteiktas žinias, naudingus patarimus bei pastabas; Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijos darbuotojoms – V. Michailovienei už pagalbą atliekant baltymų gryninimo ir renatūracijos eksperimentus bei dr. J. Matulienei už pagalbą ir patarimus mokantis klonavimo metodų. Taip pat dėkoju visiems Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijos darbuotojams už naudingus patarimus draugišką atmosferą ir palaikymą.

# LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, 1997. Short protocols in molecular biology. In, 3rd ed. New York: John Wiley & Sons.

2. Baker BM, Murphy KP, 1996. Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. Biophys J 71:2049-55.

3. Boriack-Sjodin PA, Zeitlin S, Chen HH, Crenshaw L, Gross S, Dantanarayana A, Delgado P, May JA, Dean T, Christianson DW, 1998. Structural analysis of inhibitor binding to human carbonic anhydrase II. Protein Sci 7:2483-9.

Butler JN, 1998. Ionic equilibrium: solubility and pH calculations. New York: John Wiley & Sons.

5. Carlsson U, Jonsson BH, 2000. Folding and stability of human carbonic anhydrase II. Exs:241-59.

6. Coleman JE, 1975. Chemical reactions of sulfonamides with carbonic anhydrase. Annu Rev Pharmacol 15:221-42.

7. Coleman JE, 1992. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. Annu Rev Biochem 61:897-946.

8. Coleman JE, 1998. Zinc enzymes. Curr Opin Chem Biol 2:222-34.

9. Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, 2000. Current protocols in protein science. In. New York: John Wiley & Sons.

10. Eriksson AE, Liljas A, 1993. Refined structure of bovine carbonic anhydrase III at 2.0 A resolution. Proteins 16:29-42.

11. Esbaugh AJ, Tufts BL, 2006. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. Respir Physiol Neurobiol.

12. Franchi M, Vullo D, Gallori E, Antel J, Wurl M, Scozzafava A, Supuran CT, 2003. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of human and murine mitochondrial isozymes V with anions. Bioorg Med Chem Lett 13:2857-61.

13. Freire E, 2004. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. Drug Discovery Today: Technologies 1:295-299.

14. Fujikawa-Adachi K, Nishimori I, Taguchi T, Onishi S, 1999. Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1. Genomics 61:74-81.

15. Gilbert SM, Whitson JM, Mansukhani M, Buttyan R, Benson MC, Olsson CA, Sawczuk IS, McKiernan JM, 2006. Detection of carbonic anhydrase-9 gene expression in peripheral blood cells predicts risk of disease recurrence in patients with renal cortical tumors. Urology 67:942-5.

16. Harding SE, Chowdhry B, 2001a. Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry. In. Oxford: Oxford University Press; 330.

17. Harding SE, Chowdhry B, 2001b. Protein-ligand interactions: structure and spectroscopy.In. Oxford: Oxford University Press; 436.

18. Hewett-Emmett D, Tashian RE, 1996. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. Mol Phylogenet Evol 5:50-77.

19. Hilvo M, Tolvanen M, Clark A, Shen B, Shah GN, Waheed A, Halmi P, Hanninen M, Hamalainen JM, Vihinen M, Sly WS, Parkkila S, 2005. Characterization of CA XV, a new GPIanchored form of carbonic anhydrase. Biochem J 392:83-92.

20. Holdgate GA, 2001. Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. Biotechniques 31:164-6, 168, 170 passim.

21. Horn JR, Russell D, Lewis EA, Murphy KP, 2001. Van't Hoff and calorimetric enthalpies from isothermal titration calorimetry: are there significant discrepancies? Biochemistry 40:1774-8.

22. Jelesarov I, Bosshard HR, 1999. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. J Mol Recognit 12:3-18.

23. Keilin D, Mann T, 1940. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. Biochem J 34:1163-1179.

24. Kiefer LL, Krebs JF, Paterno SA, Fierke CA, 1993. Engineering a cysteine ligand into the zinc binding site of human carbonic anhydrase II. Biochemistry 32:9896-900.

25. Kimura E, Kikuta E, 2000. Why zinc in zinc enzymes? From biological roles to DNA base-selective recognition. J Biol Inorg Chem 5:139-55.

26. Kivela AJ, Kivela J, Saarnio J, Parkkila S, 2005. Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours. World J Gastroenterol 11:155-63.

27. Kivela J, Parkkila S, Parkkila AK, Leinonen J, Rajaniemi H, 1999. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. J Physiol 520 Pt 2:315-20.

28. Kummola L, Hamalainen JM, Kivela J, Kivela AJ, Saarnio J, Karttunen T, Parkkila S, 2005. Expression of a novel carbonic anhydrase, CA XIII, in normal and neoplastic colorectal mucosa. BMC Cancer 5:41.

29. Ladbury JE, 2001. Isothermal titration calorimetry: application to structure-based drug design. Thermochim Acta 380:209-215.

30. Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-5.

31. Lakkis MM, O'Shea KS, Tashian RE, 1997. Differential expression of the carbonic anhydrase genes for CA VII (Car7) and CA-RP VIII (Car8) in mouse brain. J Histochem Cytochem 45:657-62.

32. Lehtonen J, Shen B, Vihinen M, Casini A, Scozzafava A, Supuran CT, Parkkila AK, Saarnio J, Kivela AJ, Waheed A, Sly WS, Parkkila S, 2004. Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. J Biol Chem 279:2719-27.

33. Leppilampi M, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivela J, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Parkkila S, 2003. Carbonic anhydrase isozymes IX and XII in gastric tumors. World J Gastroenterol 9:1398-403.

34. Liljas A, Laurberg M, 2000. A wheel invented three times. The molecular structures of the three carbonic anhydrases. EMBO Rep 1:16-7.

35. Lindskog S, 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. Pharmacol Ther 74:1-20.

36. Matulis D, Kranz JK, Salemme FR, Todd MJ, 2005. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. Biochemistry 44:5258-66.

37. Matulis D, Todd MJ, 2004. Thermodynamics - structure correlations of sulfonamide binding to carbonic anhydrase. In: Biocalorimetry 2 (Ladbury JE, Doyle ML, eds). Chichester: John Wiley & Sons; 107-132.

38. McCall KA, Huang C, Fierke CA, 2000. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. J Nutr 130:14378-46S.

39. Merlin C, Masters M, McAteer S, Coulson A, 2003. Why is carbonic anhydrase essential to Escherichia coli? J Bacteriol 185:6415-24.

40. Mori K, Ogawa Y, Ebihara K, Tamura N, Tashiro K, Kuwahara T, Mukoyama M, Sugawara A, Ozaki S, Tanaka I, Nakao K, 1999. Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney. J Biol Chem 274:15701-5.

41. Moroney JV, Bartlett SG, Samuelsson G, 2001. Carbonic anhydrases in plants and algae. Plant Cell Env 24:141-153.

42. Murphy KP, 1999. Predicting binding energetics from structure: looking beyond DeltaG degrees. Med Res Rev 19:333-9.

43. Naghibi H, Tamura A, Sturtevant JM, 1995. Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. Proc Natl Acad Sci U S A 92:5597-9.

44. Parkkila S, Kivela AJ, Kaunisto K, Parkkila AK, Hakkola J, Rajaniemi H, Waheed A, Sly WS, 2002. The plasma membrane carbonic anhydrase in murine hepatocytes identified as isozyme XIV. BMC Gastroenterol 2:13.

45. Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H, Shah GN, Grubb JH, Waheed A, Sly WS, 2001. Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. Proc Natl Acad Sci U S A 98:1918-23.

46. Pastorekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran CT, 2004. Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. J Enzyme Inhib Med Chem 19:199-229.

47. Perozzo R, Folkers G, Scapozza L, 2004. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. J Recept Signal Transduct Res 24:1-52.

48. Pocker Y, Stone JT, 1967. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. 3.Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. Biochemistry 6:668-78.

49. Potter C, Harris AL, 2004. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. Cell Cycle 3:164-7.

50. Rajaraman K, Raman B, Rao CM, 1996. Molten-globule state of carbonic anhydrase binds to the chaperone-like alpha-crystallin. J Biol Chem 271:27595-600.

51. Supuran CT, Scozzafava A, 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. Curr. Med. Chem. – Imm., Endoc. & Metab. Agents 1:61-97.

52. Supuran CT, Scozzafava A, Casini A, 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. Med Res Rev 23:146-89.

53. Thoms S, 2002. Hydrogen bonds and the catalytic mechanism of human carbonic anhydrase II. J Theor Biol 215:399-404.

54. Tu C, Qian M, Earnhardt JN, Laipis PJ, Silverman DN, 1998. Properties of intramolecular proton transfer in carbonic anhydrase III. Biophys J 74:3182-9.

55. Ulmasov B, Waheed A, Shah GN, Grubb JH, Sly WS, Tu C, Silverman DN, 2000. Purification and kinetic analysis of recombinant CA XII, a membrane carbonic anhydrase overexpressed in certain cancers. Proc Natl Acad Sci U S A 97:14212-7.

56. Vallee BL, Auld DS, 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. Biochemistry 29:5647-59.

57. Vullo D, Voipio J, Innocenti A, Rivera C, Ranki H, Scozzafava A, Kaila K, Supuran CT, 2005. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the human cytosolic isozyme VII with aromatic and heterocyclic sulfonamides. Bioorg Med Chem Lett 15:971-6.

58. Whittington DA, Waheed A, Ulmasov B, Shah GN, Grubb JH, Sly WS, Christianson DW, 2001. 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 98:9545-50.

59. Winum JY, Scozzafava A, Montero JL, Supuran CT, 2006. Therapeutic potential of sulfamides as enzyme inhibitors. Med Res Rev.

60. Zavadova Z, Zavada J, 2005. Carbonic anhydrase IX (CA IX) mediates tumor cell interactions with microenvironment. Oncol Rep 13:977-82.