VILNIAUS UNIVERSITETAS Chemijos fakultetas Biofizikos ir Biochemijos katedra

Biochemijos studijų programos studentė

Lina MALINAUSKAITĖ

Bakalaurinis darbas

Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės III gavimas ir jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais tyrimas

> Darbo vadovai Dr. J. Matulienė Dr. D. Matulis

Vilnius 2008

Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės III gavimas ir jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais tyrimas

Darbas atliktas Biotechnologijos institute Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijoje.

Lina MALINAUSKAITĖ

Darbo vadovai:

Dr. Jurgita MATULIENĖ

Dr. Daumantas MATULIS

TURINYS

ĮVADAS	5
1. LITERATŪRINĖ APŽVALGA	7
1.1. Karboanhidrazių apžvalga	7
1.1.1. Karboanhidrazių klasės	7
<u>1.1.2. α karboanhidrazių katalizuojamos reakcijos</u>	8
<u>1.1.3. Žinduolių ir žmogaus karboanhidrazių funkcijos</u>	11
<u>1.1.4. Žmogaus karboanhidrazių sutrikusios veiklos lemiamos ligos</u>	13
1.2. Karboanhidrazės III apžvalga	13
1.3. Karboanhidrazių slopikliai	14
1.4. Ligando jungimosi su baltymu termodinamika ir tyrimo metodai	16
1.4.1. Terminio poslinkio metodo apžvalga	18
1.4.2 Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodo apžvalga	22
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	25
2.1. Reagentai ir tirpalai	25
2.1.1. Naudoti reagentai ir rinkiniai	25
2.1.2. Tirpalai metodams	26
2.2. Metodai	27
2.2.1. Plazmidinės DNR restrikcija	27
2.2.2. DNR 5' galo fosfato pašalinimas	27
2.2.3. DNR lipnių galų bukinimas	28
2.2.4. DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio	28
2.2.5. DNR susiuvimas	28
2.2.6. Kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija Inoue metodu	28
2.2.7. Plazmidinės DNR išskyrimas šarminės lizės būdu	29
2.2.8. DNR elektroforezė agarozės gelyje	30
2.2.9. Baltymų ekspresija E. coli BL21 kamiene	30
2.2.10. Biomasės denatūravimas ir hCAIII gryninimas	31
2.2.11. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje	31
2.2.12. Cinko nustatymas atominės absorbcinės spektrometrijos metodu	32
2.2.13. Baltymų stabilumo įvertinimas, esant įvairiems reagentams	33
2.2.14. Ligandų jungimosi su baltymu matavimas terminio poslinkio metodu	34
2.2.15. Slopiklių jungimosi matavimas izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu	35
2.2.16. Duomenų apdorojimas.	35
2.2.17. Baltymų struktūros vaizdavimas ir modeliavimas	36
3. DARBO REZULTATAI	37
3.1. hCA III klonavimas ir ekspresija.	37
3.2. Žmogaus karboanhidrazės III gryninimas	39
3.3. Žmogaus karboanhidrazės III stabilumo įvertinimas	40
3.4. Žmogaus karboanhidrazės III jungimasis su sulfonamidiniais slopikliais	45
3.5. Žmogaus karboanhidrazių I, II ir III jungimosi su slopikliais palyginimas	48
3.6. hCA III jungimosi su TFMSA matavimas izoterminio titravimo kalorimetrijos meto	<u>odu</u>
ir palyginimas su hCA I ir II	50
3.7. hCA III struktūrų palyginimas su hCA I bei II ir slopiklių modeliavimas hCA III	
aktyviajame centre	53
3.8. Atliktų darbų trumpa apžvalga.	58
IŠVADOS	<u>6</u> 0
Summary	61
LITERATŪROS SĄRAŠAS	63

SANTRUMPOS

APS	Amonio persulfatas
aps./min.	Apsisukimai per minutę
AZM	Acetazolamidas (N-[5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamidas)
CA	Karboanhidrazė (angl. carbonic anhydrase)
CARBS	4-karboksibenzensulfonamidas
CARP	Į α-CA panašus baltymas (angl. CA related protein)
DMSO	Dimetilsulfoksidas
DTT	Ditiotreitolis
EDTA	Etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska
EZA	Etokzolamidas (6-etoksi-2-benzotiazolsulfonamidas)
GuaCl	Guanidino vandenilio chloridas
hCA	Žmogaus karboanhidrazė
ITK	Izoterminio titravimo kalorimetrija
IPTG	Izopropil-β-D-tiogalactopiranozidas
MZM	Metazolamidas (N-[3-metil-5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamidas)
NaAc	Natrio acetatas
NaPi	Natrio fosfatinis buferis
NDS	Natrio dodecilsulfatas
PEG	Polietilenglikolis
PMSF	Fenilmetilsulfonilchloridas
SAA	Sulfanilamidas
SAP	Krevečių šarminė fosfatazė (angl. shrimp alkaline phosphatase)
TEMED	N,N,N'N'-tetrametiletilendiaminas
TFMSA	Trifluormetansulfonamidas
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
VD	Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijoje dr.V. Dudutienės
	susintetinti benzimidazo[1,2,-c]thiadiazol-7-sulfonamidai

ĮVADAS

Karboanhidrazės tai Zn metalofermentai, paplitę visose gyvosios gamtos karalystėse. Jos katalizuoja esminę fiziologiniams procesams reakciją – grįžtamąją anglies dioksido hidrataciją. Žmogaus organizme nustatytos 15 šio fermento izoformų, jos yra išsidėsčiusios skirtinguose ląstelės kompartmentuose, nevienodai pasiskirsčiusios organuose ir audiniuose. hCA III yra citozolinė karboanhidrazė, nustatyta lėtuosiuose skeleto raumenyse, kepenyse ir riebaliniame audinyje.

Karboanhidrazių sutrikusi veikla gali lemti tam tikrus sutrikimus, charakterizuojamus kaip nesubalansuotos anglies dvideginio hidratacijos pasekmė, dėl ko sutrinka jonų transportas, pakinta pH ir skysčių sekrecija. Jos yra susijusios su tokias sutrikimais, kaip glaukoma, vėžio progresavimas, nutukimas, epilepsija.

1940 m. buvo nustatyta nauja karboanhidrazių slopiklių junginių grupė – sulfonamidai. Daugelis jų buvo pritaikyti gydimui, tačiau dauguma tų vaistų slopina nespecifiškai didelę dalį karboanhidrazės izofermentų. Manoma, kad tikslinga yra ieškoti kiekvienam karboanhidrazės izofermentui specifiškų slopiklių, kadangi jos dalyvauja skirtinguose fiziologiniuose procesuose. Todėl gydant tam tikrą sutrikimą nebus pažeidžiami kiti svarbūs procesai.

Pirminiam slopiklio su baltymo sąveikos supratimui svarbu nustatyti jungimosi pusiausvyros konstantą ir laisvosios energijos pokytį. Baltymo sąveikos su daug slopiklių tyrimui patogus yra terminio poslinkio metodas. Tačiau gilesniam supratimui svarbu nustatyti ir kitus termodinaminius parametrus: entropijos ir entalpijos pokyčius bei jungimosi stoichiometriją. Tiesiogiai išsiskyrusios šilumos kiekį, jungimosi pusiausvyros konstantą ir stoichiometriją galima nustatyti izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu.

Darbo tikslas: Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės III gavimas ir jungimosi su komerciniais ir Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijoje susintetintais sulfonamidiniais slopikliais termodinaminių parametrų nustatymas.

Darbo uždaviniai:

- 1. Žmogaus karboanhidrazės III klonavimas ir gryninimas;
- 2. hCA III stabilumo įvertinimas, esant įvairiems reagentams;

- 3. hCA III jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais matavimas terminio poslinkio metodu ir termodinaminių parametrų palyginimas su hCA I ir II;
- 4. hCA III jungimosi su TFMSA matavimas izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu ir nustatytų termodinaminių parametrų palyginimas su hCA I ir II;
- 5. TFMSA ir VD65 slopiklių modeliavimas hCA III aktyviajame centre.

1. LITERATŪRINĖ APŽVALGA

1.1. Karboanhidrazių apžvalga

Karboanhidrazės (EC 4.2.1.1), yra grupė metalofermentų turinčių Zn. Visos CA išskiriamos į 4 klases (α , β , γ ir δ). Jos katalizuoja esminę fiziologinę reakciją – grįžtamąją anglies dioksido hidrataciją (Hewett-Emmett ir Tashian, 1996; Lane ir Morel, 2000).

Karboanhidrazės užima svarbią vietą tarp visų intensyviai tiriamų metalofermentų dėl kelių priežasčių: 1) jos yra paplitusios visuose organizmuose, pradedant archėjomis, bakterijomis, dumbliais ir augalais baigiant gyvūnais tarp jų ir stuburiniais; 2) jų fiziologinė funkcija yra esminė visiems organizmams, kadangi karboanhidrazės katalizuoja labai svarbią fiziologinę reakciją: grįžtamąją anglies dioksido hidrataciją. Ši reakcija yra svarbi kvėpavimui ir CO₂ transportui tarp metabolizuojančių audinių ir pašalinimo sričių, elektrolitų sekrecijai įvairiuose audiniuose ir organuose, pH reguliacijai ir homeostazei, CO₂ fiksacijai (dumbliams ir augalams), keletui fiziologinių reakcijų, tokioms kaip gliukoneogenezei, lipogenezei ir ureagenezei, kaulų rezorbcijai, kalcifikacijai; 3) šių fermentų slopinimas ar aktyvinimas gali būti pritaikytas įvairių sutrikimų gydymui (Pastorekova *et al.*, 2004; Esbaugh ir Tufts, 2006; Supuran ir Scozzafava, 2007).

1.1.1. Karboanhidrazių klasės

CA yra plačiai paplitę Zn metalofermentai. Jie nustatyti ir prokariotuose ir eukariotuose. Išskiriamos keturios CA klasės, kurios neturi amino rūgščių sekos ir erdvinės struktūros panašumų, kas rodo jų nepriklausomą kilmę (Liljas ir Laurberg, 2000): α -CA (sutinkama stuburiniuose, bakterijose, dumbliuose ir augalų citoplazmoje), β -CA (daugiausia randamos bakterijose, dumbliuose ir augaluose), γ -CA (daugiausia archėjose bei keliose bakterijose) ir δ -CA (jūriniuose diatomiuose dumbliuose) (Liljas ir Laurberg, 2000; Pastorekova *et al.*, 2004; Supuran ir Scozzafava, 2007).

Šių keturių klasių CA tretinės ir ketvirtinės struktūros taip pat nepanašios, tačiau visos jos aktyviajame centre turi Zn²⁺ joną ir labai panašias katalitinias savybes (Kisker *et al.*, 1996; Lindskog, 1997; Mitsuhashi *et al.*, 2000). Kinetiniai tyrimai parodė, kad katalizuojamai CO₂

hidratacijos reakcijai visoms CA klasėms būdingas dviejų stadijų mechanizmas (Supuran ir Scozzafava, 2007).

Pirmoji CA buvo išskirta iš žinduolių eritrocitų 1933 m. ir priskirta α klasei. Nustatyta, kad ji savo sudėtyje turi Zn (Keilin ir Mann, 1940). Stuburinių gyvūnų organizme nustatyta tik α klasės CA. Taip pat jos nustatytos ir prokariotuose (Hewett-Emmett ir Tashian, 1996; Smith *et al.*, 1999; Chirica *et al.*, 2001). α CA yra monomerinis baltymas. Zn yra išsidėstęs 15 Å plyšyje ir koordinuojamas 3 konservatyvių His liekanų (Liljas *et al.*, 1994; Supuran *et al.*, 2003; Hilvo *et al.*, 2005).

Charakterizavus CA išskirtą iš augalų ir tam tikrų bakterijų ir nustačius jos seką, pasirodė, kad tai oligomerinis baltymas ir neturi jokio sekos panašumo su α CA (Hewett-Emmett ir Tashian, 1996). Ši forma buvo priskirta β CA klasei. Toliau buvo išskirta CA iš archėjų ir priskirta γ CA klasei ir vėlgi amino rūgščių seka nebuvo panaši į anksčiau tyrinėtas CA (Alber ir Ferry, 1994). β klasė labai skiriasi nuo α ir γ , kadangi α klasės CA dauguma yra monomerai, γ – trimerai, o β klasės CA yra dimerai, tetrametrai, heksamerai ir oktamerai, kas rodo, kad pagrindinis struktūros elementas yra dimeras (Kimber ir Pai, 2000). Be to, γ CA Zn(II) yra koordinuojamas dviejų konservatyvių Cys ir vienos konservatyvios His liekanos (Mitsuhashi *et al.*, 2000). β klasės CA yra kur kas įvairesnės nei α ir γ klasės (Smith *et al.*, 1999). α CA Zn(II) yra aktyviajame centre monomero griovyje, o β -CA ir γ -CA Zn(II) išsidėstęs tarp monomerų oligomeruose (Supuran ir Scozzafava, 2007).

 γ klasės CA daugiausia nustatyta archėjose (Tripp *et al.*, 2001). Tai homotrimeras, kuriam būdinga β -spiralių struktūra (Kisker *et al.*, 1996). Kitaip negu α klasės fermentai γ klasės CA nepasižymi esteraziniu aktyvumu ir slopinimu sulfonamidiniais slopikliais. Metalas koordinuojamas 3 His liekanų tetraedrine geometrija, kaip monomerinėje α CA, tačiau γ CA dvi His liekanos iš vieno monomero, o vieno His – iš gretimo (Iverson *et al.*, 2000).

δ CA nustatyta jūriniuose diatomiuose dumbliuose, ji kaip ir α-CA yra monomerinis baltymas ir Zn(II) koordinuojamas trijų His liekanų ir vandens molekulės kaip ir α klasės karboanhidrazių. Be to, aktyvaus centro geometrija yra panaši į α klasės fermentų (Cox *et al.*, 2000).

1.1.2. α karboanhidrazių katalizuojamos reakcijos

Karboanhidrazės katalizuoja grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją. Visoms CA klasėms būdinga dviejų stadijų reakcija: CO₂ nukleofilinė ataka ir baltymo aktyvios formos regeneravimas. Geriausiai ištirtas žinduolių karboanhidrazių katalizuojamos reakcijos mechanizmas. Jis būdingas ir kitoms klasėms. Be to, α CA būdingos ir kitos reakcijos.

Pagrindiniai CA katalizuojamai reakcijai esminis yra Zn²⁺ jonas. Rentgeno spindulių difrakcijos kristalografiniais duomenimis nustatyta, kad α CA Zn(II) jonas yra išsidėstęs 15Å gylio aktyviajame centre, koordinuojamas trijų histidino liekanų (His94, His96 ir His119) ir vandens arba hidroksilo jono. Vandens molekulė, prisijungusi prie Zn(II), vandeniliniais ryšiais sąveikauja su Trn199 γ -O, kuris savo ruožtu vandeniliniais ryšiais sąveikauja su Glu106 karboksilo grupe. Šios sąveikos padidina prie Zn(II) prisijungusio vandens nukleofiliškumą bei tinkamai orientuoja nukleofilinei atakai substratą (CO₂). (1.1 pav.) (Liljas *et al.*, 1994; Hilvo *et al.*, 2005; Supuran ir Scozzafava, 2007).



1.1 pav. Hidroksilo jono sąveika su karboanhidrazės aktyvaus centro amino rūgščių lieknomis (Supuran ir Scozzafava, 2007).

Kai prie Zn(II) yra prisijungęs hidroksilo jonas, fermentas yra aktyvios formos (1.2 pav. A). Stiprus nukleofilas atakuoja CO₂, esantį hidrofobinėje kišenėje (hCA II atveju – Leu198, Val131, Val143) (1.2 pav. B) ir galiausiai susidaro bikarbonatas, koordinuojamas Zn(II) (1.2 pav. C). Tada bikarbonatas pakeičiamas vandeniu ir išlaisvinamas į terpę, o ši rūgštinė fermento forma yra neaktyvi (1.2 pav. D). Zn(II) jonas elgiasi kaip Levis rūgštis ir sumažina vandens pK_a nuo 14 iki 7. Toliau baltymas regeneruojamas pernešant protoną nuo vandens amino rūgšties liekanos (hCA I, II, IV His64) arba buferio, esančio aktyviajame centre (Supuran *et al.*, 2003; Elder *et al.*, 2007; Supuran ir Scozzafava, 2007):

$$EZn^{2+} - OH^{-} + CO_{2} \Leftrightarrow EZn^{2+} - HCO_{3}^{-}$$
$$Zn^{2+} - HCO_{3}^{-} + H_{2}O \Leftrightarrow EZn^{2+} - OH_{2} + HCO_{3}^{-}$$
$$EZn^{2+} - OH_{2} \Leftrightarrow EZn^{2+} - OH^{-} + H^{+}$$

Reakcijos greitį limituojanti stadija yra protono pernešimas. Katalitiškai labai aktyviuose fermentuose (CA II, IV, VII, IX) procesą pagreitina histidino liekana, esanti šalia aktyvaus centro įėjimo (His64) ar histidinų klasteris, kuris tiesiogiai perduoda protoną nuo vandens, prisijungusio prie Zn(II) į išorę. Tokiu būdu labai efektyviai regeneruojama aktyvi fermento forma (Fisher *et al.*, 2005).



1.2~pav. Schematiškas
 $\alpha\text{-CA}$ katalizuojamos CO_2 hidratacijos mechanizmas (Supuran ir Scozzafava, 2007).

Taip pat nustatyta, kad CA katalizuoja ne tik grįžtamąją CO₂ hidrataciją (1 lentelė, 1 reakcija), bet ir cianido hidratacijos reakciją iki karbamido rūgšties (2 reakcija), cianamido – iki karbamido (3), aldehidų hidrataciją iki gem-diolių (4), karboksilinių (5) ar sulfonilinių (6) esterių hidrolizę, bei kitas mažai tirtas hidrolitines reakcijas (7 – 9). Tačiau iki šiol nėra aišku, ar kitos CA atliekamos reakcijos išskyrus CO₂ hidrataciją turi fiziologinę reikšmę (Pastorekova *et al.*, 2004).

1.1 lentelė. α karboanhidrazių katalizuojamos reakcijos (Supuran ir Scozzafava, 2007).

$O = C = NH + H_2O \Leftrightarrow H_2NCOOH$ $HN = C = NH + H_2O \Leftrightarrow H_2NCONH_2$ $RCHO + H_2O \Leftrightarrow RCH(OH)_2$ $HRCOOAr + H_2O \Leftrightarrow RCOOH + ArOH$ $RSO_3Ar + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + ArOH$ $(ArF + H_2O \Leftrightarrow HF + ArOH$ $(Ar = 2,4 - dinitrofenil)$ $PhCH_2OCOCl + H_2O \Leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$ $(R = Me; Ph)$ (2) (2) (3) (3) (3) (3) (4) (4) (4) (4) (5) (5) (4) (5) (6) (6) (7) (7) (8) (9) (8)	$O = C = O + H_2O \Leftrightarrow HCO_3^- + H^+$	(1)
$HN = C = NH + H_2O \Leftrightarrow H_2NCONH_2 $ (3) $RCHO + H_2O \Leftrightarrow RCH(OH)_2 $ (4) $HRCOOAr + H_2O \Leftrightarrow RCOOH + ArOH $ (5) $RSO_3Ar + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + ArOH $ (6) $ArF + H_2O \Leftrightarrow HF + ArOH $ (7) (Ar = 2, 4 - dinitrofenil) (7) $PhCH_2OCOCl + H_2O \Leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl $ (8) $RSO_2Cl + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + HCl $ (9) (R = Me; Ph) (9)	$O = C = NH + H_2O \Leftrightarrow H_2NCOOH$	(2)
$\begin{array}{ll} RCHO + H_2O \Leftrightarrow RCH(OH)_2 & (4) \\ HRCOOAr + H_2O \Leftrightarrow RCOOH + ArOH & (5) \\ RSO_3Ar + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + ArOH & (6) \\ ArF + H_2O \Leftrightarrow HF + ArOH & (7) \\ (Ar = 2,4 - dinitrofenil) \\ PhCH_2OCOCl + H_2O \Leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl & (8) \\ RSO_2Cl + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + HCl & (9) \\ (R = Me; Ph) & (9) \end{array}$	$HN = C = NH + H_2O \Leftrightarrow H_2NCONH_2$	(3)
$\begin{aligned} HRCOOAr + H_2O &\Leftrightarrow RCOOH + ArOH \end{aligned} (5) \\ RSO_3Ar + H_2O &\Leftrightarrow RSO_3H + ArOH \\ ArF + H_2O &\Leftrightarrow HF + ArOH \end{aligned} (7) \\ (Ar = 2,4 - dinitrofenil) \\ PhCH_2OCOCl + H_2O &\Leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl \\ RSO_2Cl + H_2O &\Leftrightarrow RSO_3H + HCl \\ (R = Me; Ph) \end{aligned} (9)$	$RCHO + H_2O \Leftrightarrow RCH(OH)_2$	(4)
$RSO_{3}Ar + H_{2}O \Leftrightarrow RSO_{3}H + ArOH$ $ArF + H_{2}O \Leftrightarrow HF + ArOH$ $(Ar = 2,4 - dinitrofenil)$ $PhCH_{2}OCOCl + H_{2}O \Leftrightarrow PhCH_{2}OH + CO_{2} + HCl$ $(R = Me; Ph)$ (6) (7) (7) (7) (9)	$HRCOOAr + H_2O \Leftrightarrow RCOOH + ArOH$	(5)
$ArF + H_2O \Leftrightarrow HF + ArOH$ $(Ar = 2,4 - dinitrofenil)$ $PhCH_2OCOCl + H_2O \Leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$ $(R = Me; Ph)$ (7) (8) (9) (9)	$RSO_3Ar + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + ArOH$	(6)
$(Ar = 2,4 - dinitrofenil)$ $PhCH_2OCOCl + H_2O \Leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$ $RSO_2Cl + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + HCl$ $(R = Me; Ph)$ (8) (9)	$ArF + H_2O \Leftrightarrow HF + ArOH$	(7)
$\begin{array}{c} PhCH_2OCOCl + H_2O \Leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl \\ RSO_2Cl + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + HCl \\ (R = Me; Ph) \end{array} \tag{8}$	(Ar = 2, 4 - dinitrofenil)	
$RSO_{2}Cl + H_{2}O \Leftrightarrow RSO_{3}H + HCl $ $(R = Me; Ph) $ (9)	$PhCH_2OCOCl + H_2O \Leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$	(8)
(R = Me; Ph)	$RSO_2Cl + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + HCl$	(9)
	(R = Me; Ph)	

1.1.3. Žinduolių ir žmogaus karboanhidrazių funkcijos

Žinduolių tarpe nustatyta 16 α-CA izofermentų arba su CA susijusių fermentų (žmogaus organizme nustatyta – 15, nenustatyta CA XV), skirtingai pasiskirsčiusių audiniuose ir ląstelėje. Yra kelios citozolinės formos (CA I-III, CA VII ir XIII), 5 prie membranos prisijungę izofermentai (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ir CA XV) dvi mitochondrinės (CA VA ir VB) ir sekretuojama – CA VI (1.3 pav.). Be to žinduolių karboanhidrazės pasižymi skirtingu katalitiniu aktyvumu ir afiniškumu sulfonamidiniams slopikliams (1.2 lentelė) (Supuran ir Scozzafava, 2007).

Izofermentas	CO ₂ hidratacijos katalitinis aktyvumas	Afiniškumas sulfonamidiniams slopikliams	Lokalizacija ląstelėje
CAI	Vidutiniškas	Vidutiniškas	Citozolis
CA II	Didelis	Labai didelis	Citozolis
CA III	Labai mažas	Labai mažas	Citozolis
CA IV	Didelis	Didelis	Prisijungęs prie membranos
CA VA	Mažas (pH 7,4) – vidutiniškas	Didelis	Mitochondrija
	(pH 8,1)		
CA VB	Didelis	Didelis	Mitochondrija
CA VI	Vidutiniškas	Didelis	Sekretuojamas į seiles/pieną
CA VII	Didelis	Labai didelis	Citozolis
CARP VIII	Nekatalizuoja	Neturi Zn(II)	Citozolis
CA XI	Vidutiniškas – didelis	Didelis	Transmembraninis
CARP X	Nekatalizuoja	Neturi Zn(II)	Sekretuojamas
CARP XI	Nekatalizuoja	Neturi Zn(II)	Sekretuojamas
CA XII	Mažas	Labai didelis	Transmembraninis
CA XIII	Vidutiniškas	Vidutiniškas - didelis	Citozolis
CA XIV	Vidutiniškas	Didelis	Transmembraninis
CA XV	Mažas	Nežinoma	Prisijungęs prie membranos

1.2 lentelė. Žinduolių karboanhidrazių katalitinis aktyvumas, afiniškumas sulfonamidiniams slopikliams ir pasiskirstymas ląstelėje (Supuran ir Scozzafava, 2007).

Šie fermentai yra susiję su esminiais fiziologiniais procesais: CO₂/bikarbonato transportu tarp metabolizuojančių audinių ir plaučių, pH ir CO₂ homeostaze, elektrolitų sekrecija įvairiuose audiniuose/organuose, biosintetinėmis reakcijomis (gliukoneogeneze, lipogeneze ir ureageneze), kaulų rezorbcija, kalcifikacija ir kt. (Pastorekova *et al.*, 2004; Esbaugh ir Tufts, 2006; Krishnamurthy *et al.*, 2008).

Anglies dvideginio hidratacijos reakcija yra svarbi daugeliui biologinių procesų: 1) kvėpavimo ir dujų apykaitos reguliavimas; 2) rūgščių-bazių pusiausvyros reguliavimui; 3) regėjimui; 4) kaulų vystymuisi ir funkcionavimui; 5) kalcifikacijai; 6) metabolizmui; 7) atminčiai ir signalo perdavimui; 8) skonio jutimui; 9) seilių produkcijai; 10) kasos sulčių produkcijai; 11) jonų transportui žarnyne; 12) raumenų ir nervų sistemos funkcionavimui; 13) ląstelės adaptacijai streso metu; 14) užląstelinės terpės rūgštėjimui augliuose hipoksijos

atveju; 15) keliems biosintetiniams procesams (Svastova *et al.*, 2004; Kivela *et al.*, 2005; Krishnamurthy *et al.*, 2008).



1.3 pav. Fiziologiškai aktyvių karboanhidrazės izofermentų lokalizacija ląstelėje (Kivela *et al.*, 2005).

Žinduolių visų CA izofermentų funkcijos iki šiol nėra visiškai aiškios. Karboanhidrazės I, II ir IV susijusios su kvėpavimu ir rūgščių-bazių homeostaze. Šie procesai susiję su CO₂/bikarbonato transportu tarp metabolizuojančių audinių ir išskyrimo srities (plaučių, inkstų) ir pan. Kadangi izofermentai CA I, CA II, CA IV ir CA XII dalyvauja bikarbonato gausių skysčių sekrecijoje akyse, jos yra susijusios ir su regėjimo procesu, ir jų sutrikęs veikimas veda prie akispūdžio padidėjimo ir glaukomos. CA II taip pat svarbi kaulų formavimuisi ir funkcionavimui, tokiems procesams, kaip osteoklastų diferenciacija arba kaulų resorbcija osteoklastuose (Pastorekova *et al.*, 2004; Supuran ir Scozzafava, 2007).

Karboanhidrazės susijusios su elektrolitų sekrecija įvairiuose kituose organuose ir audiniuose, pavyzdžiui: smegenų skysčio formavimusi, gaminant bikarbonatą ir reguliuojant pH smegenų kraujagysliniame rezginyje; seilių produkcija; skrandžio sulčių išskyrimu iš skrandžio parietalinių ląstelių; tulžies, kasos sulčių susidarymu, jonų transportu žarnyno ląstelėse. Be to, jos dar svarbios virškinimo trakto apsaugojimui nuo didelių pH pokyčių, gemalo skysčio pH ir bikarbonato koncentracijos reguliacijai, raumenų funkcionavimui bei ląstelės adaptacijai streso metu. Kai kurios izoformos susijusios su molekulinio signalo perdavimu, kaip pavyzdžiui CA VB atveju – kasos β ląstelėse insulino sekrecijos signalui. II ir IV izoformos svarbios metabolizmo procesuose, kadangi jos produkuoja bikarbonatą, reikalingą gliukoneogenezei, riebalų rūgščių arba pirimidinų bazių sintezei (Pastorekova *et al.*, 2004; Supuran ir Scozzafava, 2007). Galiausiai kai kurių CA izofermentų (CA XI, CA XII, CA VIII) gausu vėžinėse ląstelėse ir, manoma, kad jos susijusios su onkogeneze ir vėžio progresavimu (Pastorekova *et al.*, 2004; Thiry *et al.*, 2006). Tačiau vis dėlto kai kurių CA funkcija dar iki šiol nėra iki galo išaiškinta: CA I, III, VI, XIV ir su CA susijusių baltymų.

Keturi CA izofermentai (hCA IV, IX, XII ir XIV) yra susijungę su membrana ir aktyvus centras yra nukreiptas į ląstelės išorę. Keli jų svarbūs fiziologiniuose procesuose (CA IV atlieką svarbų fiziologinį vaidmenį akyse, plaučiuose ir inkstuose, CA IX – skrandžio gleivinėje ir daugelyje vėžinių ląstelių, CA XII – vėžinėse ir normaliose epitelinėse ląstelėse) [3. 1,42] (Thiry *et al.*, 2006; Supuran ir Scozzafava, 2007).

1.1.4. Žmogaus karboanhidrazių sutrikusios veiklos lemiamos ligos

Kadangi CA dalyvauja įvairiuose svarbiuose fiziologiniuose procesuose, jų nenormalus veikimas, reguliacija arba per didelė ekspresija gali lemti tam tikras patologijas. Yra nustatyta nemažai sutrikimų, kurie charakterizuojami kaip nesubalansuotos CO₂ hidratacijos pasekmė, dėl ko sutrinka jonų transportas, pakinta pH, skysčių sekrecija ir t.t. (Supuran *et al.*, 2003; Pastorekova *et al.*, 2004). Manoma, kad preparatams keičiantiems šių fermentų aktyvumą, galimas terapeutinis pritaikymas.

Jau yra nustatyta, kad kai kurių CA izoformų pakitusi ekspresija lemia tam tikrus sutrikimus. Pavyzdžiui, CA IX ir CA XII padidėjusi ekspresija yra pastebėta vėžinėse ląstelėse, be to, CA XII padidėjusi ekspresija akyse yra nustatyta glaukomos atveju. Glaukomos atveju yra padidėjęs akispūdis, kadangi padidėjęs bikarbonato kiekis stimuliuoja skysčių sekreciją. Padidėjęs akispūdis sumažina kraujo patekimą į tinklainę, pažeidžiami šviesai jautrios lazdelės ir kolbelės netgi akies nervas, o tai lemia apakimą. Laiku pradėjus gydyti galima išvengti šių pasekmių. Žinoma, kad pagrindiniai veikėjas šiame procese – CA II, bet yra numanomas ir CA III, CA IV ir CA XII vaidmuo. Būtent CA XII ekspresija akyse padidėja kelis kartus žmonių sergančių glaukoma. Todėl manoma, kad tai svarbus faktorius glaukomos progresavimui (Pastorekova *et al.*, 2004).

Manoma, kad kai kurios CA (II, CA IV, ir CA VII) yra svarbios smegenų skysčio susidarymui (kurio svarbus komponentas yra bikarbonatas), intrakranialiniui spaudimui ir galvos smegenų kraujotakai. O CA XIV nustatyta aksonų ir neuronų membranose specifinėse smegenų vietose, kur gali paveikti nervinius signalus (Parkkila *et al.*, 2001).

1.2. Karboanhidrazės III apžvalga

Karboanhidrazė III yra prasčiausias anglies dvideginio hidratacijos reakcijos katalizatorius lyginant su kitomis citozolinėmis, prie membranos prisijungusiomis ar mitochondrinėmis karboanhidrazėmis (Elder *et al.*, 2007). Kaip CA I ir II ji yra citozolinė CA, bet jos katalizinis aktyvumas siekia tik 0,3 – 1% CA II aktyvumo (priklausomai iš kokio organizmo išskirta). Kitaip negu CA I ir CA II, kurios yra paplitusios visame organizme, CA III yra nustatyta tik skeleto lėtuosiuose raumenyse (sudaro 10% citozolinių baltymų), adipocituose (sudaro 24% visų tirpių baltymų) ir kepenyse (8% tirpių baltymų), bet jos pagrindinė funkcija dar iki šiol nėra išaiškinta (Wistrand, 2002; Nishimori *et al.*, 2007b). Manoma, kad ji yra svarbi riebalų rūgščių metabolizme, kuris gyvybiškai svarbus raumenų veikimui, kadangi yra ekspresuojama skeleto raumenų miozinų citoplazmoje (Pastorekova *et al.*, 2004). Taip pat, kad ji gali būti susijusi su ATP sinteze (Liu *et al.*, 2007). Be to buvo parodytas jos vaidmuo cistinėje kepenų fibrozėje (Li ir Falany, 2007). Manoma, kad ji dalyvauja oksidacinio streso atsake kepenyse (Yamamoto *et al.*, 2006) ir skeleto raumenyse (Zimmerman *et al.*, 2004), kaip aktyvių deguonies formų gaudyklė, ir apsaugo ląstelę nuo pažeidimų (Raisanen *et al.*, 1999).

Manoma, kad CA III gali būti susijusi su nutukimo vystymusi. Buvo parodyta, kad CA III ekspresiją padidina insulinas, o sumažina leptinas (taip pat su nutukimo vystymusi susijęs baltymas) (Alver *et al.*, 2004). Pagrindiniai numanomi taikiniai gydant nutukimą yra mitochondrinės CA – VA ir VB, bet norima išaiškinti nutukimo vystymosi biocheminius/fiziologinius procesus, susijusius su įvairiom CA, tarp jų ir CA III (Nishimori *et al.*, 2007b).

Šios fiziologinės/patologinės CA III funkcijos nėra iki šiol iki galo išaiškintos, išskyrus antioksidantinį poveikį ląstelėje, kuris buvo parodytas, kad vyksta prisijungiant glutationui prie dviejų cistejinų liekanų (Cys181 ir Cys186), kurios išsidėsčiusios baltymo paviršiuje. Todėl gali būti, kad pagrindinė CA III in vivo funkcija yra apsaugoti ląstelę nuo negrįžtamos oksidacijos ir ląstelės pažeidimų (Kim ir Levine, 2005; Supuran ir Scozzafava, 2007).

1.3. Karboanhidrazių slopikliai

Kaip minėta, karboanhidrazės dalyvauja įvairiose fiziologiniuose procesuose ir jų sutrikusi veikla lemia patologijas. Taip pat jos yra paplitusios visuose organizmuose ir

katalizuoja gyvybiškai svarbią reakciją. Todėl yra svarbu rasti tokius jų slopiklius, kurie būtų specifiški tam tikrai karboanhidrazių klasei ir izoformai.

Dvi pagrindinės CA slopiklių klasės yra: metalus kompleksuojantys anijonai ir nepakeičiamieji sulfonamidai. Jie gali prisijungti prie Zn(II) jono arba pakeičiant nebaltyminį Zn(II) ligandą, susidarant tetraedrinei geometrijai (1.4 pav. A), arba jungiasi papildomu ryšiu, susidarant trigonalinės bipiramidės geometrijai (1.4 pav. B) (Liljas ir Laurberg, 2000; Supuran *et al.*, 2003; Pastorekova *et al.*, 2004).

 $E-Zn^{2+}-OH_2 + I \Leftrightarrow E-Zn^{2+}-I + H_2O$ (pakeitimas)

Tetraedrinis aduktas

E-Zn²⁺-OH₂ + I \Leftrightarrow E-Zn²⁺-OH₂(I) (prisijungimas)

Trigonalinės bipiramidės aduktas



1.4 pav. α-CA slopinimo mechanizmas sulfonamidiniais (A) ir anijoniniais (B) slopikliais (Supuran ir Scozzafava, 2007).

Sulfonamidai jungiasi prie Zn(II) jono deprotonizuotoje formoje, sudarydami tetraedrinę geometriją, kartu vandeniliniais ryšiais susijungia su Thr199 ir Glu106. O aromatine/heterocikline dalimi (R) slopiklis sąveikauja su hidrofilinėmis ir hidrofobinėmis amino rūgščių liekanomis aktyviajame centre. Anijonai gali jungtis prie jono sudarydami arba tetraedrinę arba trigonalinės bipiramidės geometriją (Supuran ir Scozzafava, 2007).

Sulfonamidinių junginių slopinantis poveikis karboanhidrazėms buvo nustatytas jau 1940 m. Mann ir Keilin (Keilin ir Mann, 1940) ir nuo tada jie plačiai naudojami medicinoje įvairių sutrikimų gydymui. Jau nuo 1954 m., kaip diuretikas naudojamas acetozolamidas. Šiuo metu CA slopikliai naudojami gydyti glaukomai, kaip diuretikai, priešepilepsiniai preparatai, skrandžio ir dvylikapirštės žarnos opos, neurologiniams sutrikimams ir osteoporozės gydymui (Supuran *et al.*, 2003; Supuran ir Scozzafava, 2007).

Kadangi CA izofermentai nevienodai pasiskirstę organizme ir turi nevienodą indelį įvairioms patologijoms, svarbu ieškoti specifiškų atskiram izofermentui slopiklių. Todėl labai daug tyrimų šioje srityje atliekama ieškant farmakologinių preparatų: 1) antigliaukomos vaistų, taikiniai – CA II ir CA XII (Supuran ir Scozzafava, 2007); 2) priešvėžiniai preparatai, taikiniai – CA IX ir/arba CA XII (Pastorekova *et al.*, 2004; Thiry *et al.*, 2006); 3) preparatai nutukimo gydymui, numanomi taikiniai – CA VA ir/arba CA VB (Casini *et al.*, 2003; Simone *et al.*, 2005); 4) antikonvulsiniai vaistai, galimi taikiniai – CA II, VII, XII ir XIV; 5) antibakteriniai priešgrybeliniai, taikiniai – patologinių mikroorganizmų CA (Nishimori *et al.*, 2007a).

Tokiose didelėse fermentų šeimose kaip CA svarbu gerai ištirti baltymų aktyvaus centro struktūrą ir sąveiką su slopikliais, kad būtų galima sukurti vaistus, kurie slopintų tik tam tikrus CA izofermentus, bet neslopintų tam tikros formos, kuri yra paplitusi visame organizme ir jos užslopinimas sukeltų žalingus šalutinius poveikius. Kita vertus, labai patogu būtų rasti tokius slopiklius kurie būtų ypač specifiški tik tam tikriems audiniams/organams specifiškiems CA izofermentams (pvz. CA VA, VII ar XIII) ar tam tikrai patologijai specifiškiems CA izofermentams (pvz. CA VA, VII ar XIII) ar tam tikrai patologijai specifiškiems CA izofermentams (CA IX ir XII – vėžio progresavime, CA VA ir VB – nutukime (Scozzafava *et al.*, 2006), tokiu būdu visiškai sumažinant šalutinį poveikį. Tarp 16 žinduolių CA izofermentų plačiausiai organizme paplitusi CA II ir labai stipriai slopinama daugelio sulfonamidų. Taip pat svarbu, kad nebūtų slopinama ir CA I, nors jos fiziologinė funkcija dar iki galo nėra išaiškinta, bet ji yra plačiai paplitusi visame organizme (Supuran *et al.*, 2003; Supuran ir Scozzafava, 2007).

1.4. Ligando jungimosi su baltymu termodinamika ir tyrimo metodai

Tipišką ligando jungimosi reakciją su baltymu galima užrašyti taip:

 $M + L \Leftrightarrow ML$

Ligandas galėtų būti substratas, slopiklis, vaistas, kofaktorius, kofermentas, prostetinė grupė, metalo jonas, polipeptidas, baltymas, oligonukleotidas, nukleorūgštis, kuri nekovalentiškai jungtųsi su specifiniu centru tiriamoje molekulėje (baltyme arba nukleorūgštyje). Fundamentalus supratimas apie ligando ir makromolekulės sąveiką reikalauja supratimo apie jungimosi proceso pusiausvyros konstantą (K) ir jungimosi stoichiometriją n, kiek ligandų yra prisijungę prie molekulės, kai pasiekiamas įsotinimas. Jungimosi konstanta lygi:

$$K_b = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

kur [M] – makromolekulės, [L] – ligando, [ML] – komplekso pusiausvyrinės koncentracijos.

O laisvosios energijos pokytis tam tikrai temperatūrai gali būti apskaičiuotas iš lygties:

$$\Delta G = -RT \ln K_b$$

kur T – temperatūra (kelvinais), o R – universalioji dujų konstanta (Freyer ir Lewis, 2008). Jungimosi konstanta yra atvirkščiai proporcinga slopiklio disociacijos pusiausvyros konstantai:

$$K_d = \frac{1}{K_b}$$

Jungimosi sąveikos pusiausvyros konstanta gali būti nustatyta įvairiais metodais, kurių dauguma susiję su matavimu susijungusio ir laisvo ligando koncentracijos (Ladbury *et al.*, 2004). Tačiau yra daug metodų, kurie leidžia nustatyti šią konstantą, be substrato ir produkto pusiausvyrinių koncentracijų nustatymo. Pavyzdžiui terminio poslinkio metodas ar izoteriminio titravimo kalorimetrija.

Detalesniam tyrimui būtina įvertinti sąveikos laisvosios energijos pokyčio priklausomybę nuo temperatūros, kuri atsispindi entalpijos pokytyje (ΔH). Išmatavus entalpiją ir nustačius jungimosi konstantą, o iš jos laisvosios energijos pokytį, galima įvertinti entalpinį ir entropinį indelį:

 $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$

Tai yra labai svarbu, kadangi junginiai su tuo pačiu afiniškumu gali turėti skirtingus entalpinius ir entropinius komponentus. Tokiu būdu galima susieti jungimąsi su struktūra ir kitais faktoriais, pvz. hidratacija.

Žinant indelį entalpijos ir entropijos laisvosios energijos pokyčiui, galima įvertinti jos sąveikos šaltinį. 1.5 paveiksle pavaizduota skirtingų sąveikų jungimasis, kai laisvosios energijos pokyčiai yra vienodi, tik skiriasi entalpijos ir entropijos indeliai. A schemoje pavaizduota jungimasis, kuriame dominuoja neigiama entalpija, tai rodo, kad sąveikos metu susidaro didelis skaičius vandenilinių ryšių arba van der Valso sąveika tarp baltymo ir ligando. Nepalanki entropija rodo, kad vyksta konformacijos pokyčiai abiejose molekulėse.

Didelis neigiamas entropinis indelis B schemoje rodo, kad šioje reakcijoje dominuoja hidrofobinė sąveika ir tirpiklio molekulių persirikiavimas. C schemoje pavaizduota reakcija, kurioje susidaro nedidelis vandenilinių jungčių kiekis ir nedidelė hidrofobinė sąveika ar tirpiklio molekulių persirikiavimas (Ladbury *et al.*, 2004).



1.5 pav. Schematinė diagrama skirtingų tipų molekulinių sąveikų, kai laisvosios energijos pokyčiai yra vienodi, tik skiriasi entalpijos ir entropijos indėliai (Ladbury *et al.*, 2004).

Tiesiogiai išmatuoti išsiskyrusios šilumos kiekį jungimosi metu, nustatyti jungimosi pusiausvyros konstantą ir stoichiometriją galima izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu. Nustačius termodinaminius parametrus, t.y. entalpijos ir entropijos indėlį jungimosi laisvosios energijos pokyčiui, galima įvertinti dominuojančią jėgą jungimesi. (Ladbury *et al.*, 2004).

1.4.1. Terminio poslinkio metodo apžvalga

Šis metodas yra labai patogus, nes vienu metu galima tirti 96 mėginius, galima nustatyti ligandų jungimosi konstantas bei nustatyti optimalias baltymo laikymo ir eksperimentų sąlygas. Terminio poslinkio metodu netiesiogiai matuojamas baltymo terminis stabilumas.

Kartu su baltymu įdedamas fluorescencinis dažas-reporteris (dapoksilo sulfonatas), kurio fluorescencija kinta baltymui išsivyniojant (1.6 pav.) (Matulis *et al.*, 2005). Dapoksilo sulfonato fluorescencija yra kur kas stipresnė hidrofobinėje aplinkoje nei hidrofilinėje. Todėl kai baltymas yra natyvios konformacijos fluorescencija yra minimali, o baltymui išsivyniojus atsiveria hidrofobinės sritys, kuriose prisijungia dapoksilas ir fluorescuoja žymiai stipriau. Taip pat fluorescencija priklauso nuo temperatūros: keliant temperatūrą fluorescencija mažėja (Diwu *et al.*, 1997).



1.6 pav. Dažo reporterio fluorescencijos priklausomybė nuo temperatūros, tirpale esant baltymo (O) ir baltymo su ligandu (●) (Matulis *et al.*, 2005).

Fluorescencijos priklausomybė nuo temperatūros aprašoma lygtimi:

$$y = y_{\rm N} + \frac{y_{\rm U} - y_{\rm N}}{1 + e^{\frac{\Delta_u G}{RT}}} = y_{\rm U} + \frac{y_{\rm N} - y_{\rm U}}{1 + e^{\frac{\Delta_u G}{RT}}}$$
(1)

kur y_N – natyvaus, y_U – denatūravusio baltymo-dažo komplekso fluorescencija.

Abiejų fluorescencijų priklausomybė nuo temperatūros aprašoma lygtimis:

$$y_{\rm N} = y_{{\rm N},T_{\rm m}} + m_{\rm N} \left(T - T_{\rm m} \right) \tag{2}$$

$$y_{\rm U} = y_{{\rm U},T_{\rm m}} + m_{\rm U} \left(T - T_{\rm m} \right) \tag{3}$$

kur m_N – natyvaus, m_U – denatūravusio baltymo fluorescencijos tiesių (bazinių linijų) nuokrypio kampai.

[statome (2) ir (3) i (1) lygti ir gauname:

$$y = y_{N,T_m} + m_N \left(T - T_m \right) + \frac{y_{U,T_m} - y_{N,T_m} + \left(m_U - m_N \right) \left(T - T_m \right)}{1 + e^{\frac{\Delta_u G}{RT}}}$$
(4)

Laisvoji Gibso energija, kaip funkcija nuo temperatūros ($\Delta_U G_{(T)}$), gali būti išreikšta per baltymo išsivyniojimo entalpiją ($\Delta_U H_{Tr}$) ir entropiją ($\Delta_U S_{Tr}$), kurios priklauso nuo temperatūros ir išreiškiamos per priklausomybę nuo šiluminės talpos ($\Delta_U C_p$), kuri laikoma nuo temperatūros nepriklausoma:

$$\Delta_U G_{(T)} = \Delta_U H_{(T)} - T \Delta_U S_{(T)} = \Delta_u H_{T_r} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T \left(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln \left(\frac{T}{T_r} \right) \right)$$
(5)

kur T_r yra temperatūra, kurioje termodinaminiai parametrai (entropija ir entalpija) yra žinomos. Pagal baltymo dviejų fazių denatūracijos modelį, kai temperatūra lygi T_m (baltymo denatūracijos temperatūrai), $\Delta_U G_{Tr} = 0$, tai:

$$\Delta_u H_{T_m} = T \Delta_u S_{T_r} \tag{6}$$

Perrašius 1 – 4 lygtis gauname:

$$y = y_{N,T_{m}} + m_{N} \left(T - T_{m} \right) + \frac{y_{U,T_{m}} - y_{N,T_{m}} + \left(m_{U} - m_{N} \right) \left(T - T_{m} \right)}{1 + e^{\frac{\Delta_{u} H_{T_{m}} + \Delta_{u} C_{p} \left(T - T_{m} \right) - T \left(\Delta_{u} S_{T_{m}} + \Delta_{u} C_{p} \left(\ln \frac{T}{T_{m}} \right) \right)}{RT}}$$
(7)

Priimamas supaprastintas ligando jungimosi su baltymu modelis: ligandas jungiasi prie baltymo natyvios konformacijos ir jį stabilizuoja, pusiausvyra tarp natyvios būsenos ir neteisingai susisukusio baltymo pasislenka link natyvios:

$$U + L_f \xleftarrow{K_U} N + L_f \xleftarrow{K_B} NL_b$$

kur U – neteisingai susisukęs baltymas, N – teisingai susisukęs, L_f – laisvas ligandas, NL_b – kompleksas tarp natyvaus baltymo ir prisijungusio ligando. Tuomet baltymo laisvosios Gibso energijos pokytis lygi sumai energijos, kai nėra ligando, ($\Delta_U G_{(T)}$) ir papildomai stabilizuojančiai energijai dėl ligando prisijungimo ($\Delta_b G_{(T)}$), kuri proporcinga ligando koncentracijai.

$$\Delta G_{(T)} = \Delta_U G_{(T)} + \Delta_b G_{(T)} = \Delta_U G_{(T)} + RT \ln(1 + K_b [L_f])$$
(8)

Tuomet, kai temperatūra lygi T_m , $\Delta G_{(T)} = RT \ln(1 + K_b[L_f])$.

Baltymo stabilumo ir ligando prisijungimo pusiausvyros konstantos susijusios su prisijungimo ir denatūracijos laisvąja energija

$$K_{U} = \frac{[U]}{[N]} = e^{-\Delta_{U}G_{(T)}/RT} = e^{-(\Delta_{U}H_{(T)} - T\Delta_{U}S_{(T)})/RT} = e^{-(\Delta_{U}H_{T_{r}} + \Delta_{U}C_{p}(T - T_{r}) - T(\Delta_{U}S_{T_{r}} + \Delta_{U}C_{p}\ln(T/T_{r})))/RT}$$
(9)

$$K_{b} = \frac{[NL_{b}]}{[N][L_{f}]} = e^{-\Delta_{b}G_{(T)}/RT} = e^{-(\Delta_{B}H_{T} - T\Delta_{b}S_{T})/RT} = e^{-(\Delta_{b}H_{T_{o}} + \Delta_{b}C_{p}(T - T_{o}) - T(\Delta_{b}S_{T_{o}} + \Delta_{b}C_{p}\ln(T/T_{o})))/RT}$$
(10)

kur $\Delta_U G_{(T)}$, $\Delta_U H_{(T)}$, $\Delta_U S_{(T)}$ ir $\Delta_U C_p$ yra laisvoji Gibso energija, entalpija, entropija, šiluminė talpa baltymo stabilumo ir nuo temperatūros priklausomos funkcijos. O $\Delta_b G_{(T)}$, $\Delta_b H_{(T)}$, $\Delta_b S_{(T)}$, $\Delta_b C_p$ yra laisvoji Gibso energija, entalpija, entropija, šiluminė talpa jungimosi su ligandu ir nuo temperatūros priklausomos funkcijos. Baltymo (P_t) ir ligando (L_t) bendrą kiekį galima išreikšti taip:

$$P_t = [N] + [U] + [NL_b]$$
(11)

$$L_t = [L_f] + [NL_b] \tag{12}$$

Šias dvi lygtis galima pertvarkyti ir įstatyti į 8 lygtį, gauname:

$$L_{t} = (1 - K_{U}) \left(\frac{P_{t}}{2} + \frac{1}{K_{U}K_{b}} \right)$$
(13)

9 ir 10 lygtis įstačius į 13 gauname visą ligando koncentraciją, reikalingą pakelti baltymo T_m iki duotos vertės:

$$L_{t} = (1 - K_{U}) \frac{1}{K_{U}K_{b}} = (1 - e^{-(\Delta_{U}H_{T_{r}} + \Delta_{U}C_{p}(T - T_{r}) - T(\Delta_{U}S_{T_{r}} + \Delta_{U}C_{p}\ln(T/T_{r})))/RT}) \cdot \left(\frac{P_{t}}{2} + 1/e^{-(\Delta_{U}H_{T_{r}} + \Delta_{U}C_{p}(T - T_{r}) - T(\Delta_{U}S_{T_{r}} + \Delta_{U}C_{p}\ln(T/T_{r})))/RT}}e^{-(\Delta_{b}H_{T_{o}} + \Delta_{b}C_{p}(T - T_{o}) - T(\Delta_{b}S_{T_{o}} + \Delta_{b}C_{p}\ln(T/T_{o})))/RT}}\right) (14)$$

Silpnai besijungiantiems ligandams $P_t < K_d = K_b^{-1}$. tuomet 14 lygtį galima supaprastinti:

$$L_{t} = \frac{1 - K_{U}}{K_{U}K_{b}} = \left(1 - e^{-(\Delta_{U}H_{T_{r}} + \Delta_{U}C_{p}(T - T_{r}) - T(\Delta_{U}S_{T_{r}} + \Delta_{U}C_{p}\ln(T/T_{r})))/RT}\right) \cdot \left(1 / e^{-(\Delta_{U}H_{T_{r}} + \Delta_{U}C_{p}(T - T_{r}) - T(\Delta_{U}S_{T_{r}} + \Delta_{U}C_{p}\ln(T/T_{r})))/RT} e^{-(\Delta_{b}H_{T_{o}} + \Delta_{b}C_{p}(T - T_{o}) - T(\Delta_{b}S_{T_{o}} + \Delta_{b}C_{p}\ln(T/T_{o})))/RT}\right)$$
(15)

14 ir 15 lygtys yra abstrakčios ir jos negali būti tiksliai išsprendžiamos per T_m kaip L_t funkcija. Vietoj to kreivės simuliuojamos skaičiuojant bendrą ligando koncentraciją, kurios reikia pasiekti eksperimentiškai stebimą T_m (Matulis *et al.*, 2005).



1.7 pav. T_m priklausomybė nuo ligando koncentracijos, esant skirtingoms išsisukimo entalpijoms (A) ir skirtingoms jungimosi konstantoms (B) (Matulis *et al.*, 2005).

Norint nustatyti tikslią jungimosi konstantą pagal T_m pokyčius, reikia žinoti baltymo išsisukimo entalpijos pokytį ($\Delta_U H$). Baltymų su mažesne išsisukimo entalpija bus didesnis pokytis T_m esant tam tikrai ligando koncentracijai, negu tų baltymų, kurių ji yra didelė (1.7 pav. A). Be to, išsisukimo entalpija nepriklauso nuo tiriamo slopiklio. Baltymo, kuris yra pusiausvyroje tarp natyvios ir nenatyvios būsenos, $\Delta_U H$ nustatyta iš 1.6 pav. kreivių yra van't Hofo išsisukimo entalpija, kuri gali būti apskaičiuojama iš 7 lygties. Tačiau dauguma baltymų išsisuka negrįžtamai, todėl šiuo metodu nustatoma išsisukimo entalpija nėra patikima (Matulis *et al.*, 2005).

1.7 B paveiksle pavaizduotos baltymo T_m priklausomybė nuo ligando koncentracijos esant skirtingoms disociacijos konstantų ($K_d = 1/K_b$) reikšmėms. Stipriai besijungiantys ligandai labiau pakelia denatūravimo temperatūrą nei silpnai besijungiantys, kai kiti parametrai išlieką vienodi (pagal 8 lygtį). Tam tikram baltymui visi ligandai duoda tą patį denatūravimo temperatūros pokytį esant koncentracijai didesnei negu disociacijos konstanta, kai baltymas nėra prisotintas ligando (Matulis *et al.*, 2005).

1.4.2 Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodo apžvalga

Pilnam mažos ligando molekulės biologinės molekulės molekulinio atpažinimo proceso supratimui reikalingas pilnas charakterizavimas jungimosi energetikos ir struktūros. Vienintelis metodas, leidžiantis išmatuoti šilumos pokytį formuojantis kompleksui tam tikroje temperatūroje yra izoterminio titravimo kalorimetrija (ITK) (Perozzo *et al.*, 2004).

Kalorimetrai – tai prietaisai, leidžiantys nustatyti šiluminius efektus. ITK matuoja išsiskyrusią šilumą jungimosi metu. Ligandas yra titruojamas į kiuvetę, kurioje yra makromolekulė ir matuojamas išsiskyrusios šilumos kiekis proceso metu. Tai leidžia vienu metu nustatyti jungimosi pusiausvyros konstantą (K_b), (iš jos apskaičiuoti laisvosios Gibso energijos pokytį – ΔG), entalpijos pokytį (ΔH), entropijos pokytį (ΔS) ir reakcijos stoichiometriją (n) (Perozzo *et al.*, 2004).

ITK yra patogus metodas matuoti slopiklių jungimąsi su baltymu. Baltymo koncentracija kiuvetėje turi būti parinkta pagal slopiklio jungimosi konstantą. Kreivės forma priklauso nuo jungimosi konstantos ir nuo baltymo koncentracijos:

$$C = K_B[M_T]$$

Kreivės forma, kuri priklauso nuo bemačio parametro *C*, yra labai svarbi jungimosi konstantos nustatymui. Labai didelėm *C* vertėms (*C*>500) kreivė mažai keičiasi, ir tampa mažai jautri K_b pokyčiams. Iš eksperimentinių duomenų nustatyta, kad sąlygos turi būti parenkamos tokios, kad *C* vertė būtų tarp 10 ir 100 tiksliam K_b nustatymui. Todėl norint atlikti matavimus šiose ribose, didelėms jungimosi konstantom (10⁷-10⁸ M⁻¹) baltymo koncentracija turi būti labai maža. O mažoms K_b vertėms *C*<10 duoda beveik horizontalią kreivę ir taip pat mažai informacijos apie jungimąsi. Iš paveikslo 1.8 matome, kad net ir esant mažai ligando koncentracija tik maža dalis jo prisijungia prie baltymo ir todėl tampa sunku tiksliai nustatyti

išsiskyrusios šilumos kiekį. Todėl mažiausia jungimosi konstanta, kurią galima nustatyti šiuo metodu -10^4 M⁻¹ (baltymo koncentracija turi būti mažiausiai 1mM) (Perozzo *et al.*, 2004; Freyer ir Lewis, 2008).



1.8 pav. Simuliuotos titravimo kalorimetrijos kreivės, esant skirtingoms C faktoriaus vertėms (Perozzo *et al.*, 2004).

ITK yra tiesioginis metodas išmatuoti šilumos pokyčius formuojantis kompleksui. Paprasta grįžtama sąveika tarp makromolekulės *M* ir ligando *L*:

$$M + L \leftrightarrow ML$$

charakterizuojama jungimosi konstanta – K_b.

$$K_b = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

Kiekvienos injekcijos metu išmatuojamas šilumos pokytis, kuris yra tiesiogiai proporcingas susiformavusio *ML* komplekso kiekiui. Tą šilumos kiekį galima išreikšti:

 $q = V_0 \Delta H \Delta [ML]$

kur q yra šilumos kiekis, susijęs su komplekso koncentracijos pokyčiu, $\Delta[ML]$, ΔH – jungimosi entalpija, V_0 – reakcijos tūris kiuvetėje.

Kalorimetriniuose eksperimentuose kiekvienas ligando pridėjimas duoda šilumos pokytį, kuris priklauso nuo reakcijos tūrio, koncentracijų, moliarinės entalpijos, jungimosi konstantos, praskiedimo šilumos, stechiometrijos, ir nuo prieš tai pridėto ligando kiekio. Kadangi palaipsniui pridedant ligando sumažėja neužimtų prisijungimo centrų, šilumos pokytis mažėja ir galiausiai atitinka tik praskiedimo šilumą. Visas šilumos kiekis po i-tosios injekcijos:

$$Q = V_0 \Delta H \sum \Delta [ML]_i = V_0 \Delta H [ML]_i$$

kur [*ML*]_{*i*} yra visa komplekso koncentracija po i-tosios injekcijos.

Bendros ligando ir makromolekulės koncentracijos išreiškiamos:

 $[M_T] = [ML] + [M]$ $[L_T] = [ML] + [L]$

kur $[M_T]$ ir $[L_T]$ yra bendros makromolekulės ir ligando koncentracijos, [M] ir [L] yra laisvos makromolekulės ir laisvo ligando koncentracijos, o [ML] – susiformavusio komplekso koncentracija.

Pačiu paprasčiausiu atveju ligandas jungiasi prie molekulių, kurios turi tam tikrą skaičių identiškų nesąveikaujančių tarpusavyje prisijungimo vietų. Ligandas prie jų jungiasi vienodu afiniškumu. Tokiai sistemai jungimosi konstanta:

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

kur Θ yra įsotinimo frakcija, o [L] – laisvo ligando koncentracija. Ji yra susijusi su visa ligando koncentracija $[L_T]$ ir makromolekulės koncentracija $[M_T]$. Pagal masės tvermės dėsnį:

$$[L] = [L_T] - n\Theta[M_T]$$
⁽²⁾

Įstačius 1 į 2 lygtis, gauname lygtį:

$$\Theta^{2} - \Theta \left(1 + \frac{1}{nK_{B}[M_{T}]} + \frac{[L_{T}]}{n[M_{T}]} \right) + \frac{[L_{T}]}{n[M_{T}]} = 0$$
(3)

kurios vienintelis prasmingas sprendinys:

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

Reakcijos integralinis šilumos kiekis Q po i-tosios injekcijos:

$$Q = n[M_T]V_0 \Delta H\Theta_i \tag{5}$$

kur V_0 yra kiuvetės tūris, ΔH – moliarinė ligando jungimosi šiluma. O diferencialinis šilumos kiekis i-tosios injekcijos:

$$q = n[M_T]V_0 \Delta H(\Theta_i - \Theta_{i-1}) \tag{6}$$

Netiesinis priderinimas 5 lyties hiperbolinei įsotinimo kreivei integralinėje formoje (Q priklausomybė nuo $[L_T]$) leidžia nustatyti parametrus: K_b , ΔH ir n iš vieno eksperimento rezultatų. Taip pat tuos pačius parametrus galima nustatyti pagal 6 lygtį titravimo duomenys gali būti priderinti prie sigmoidinės įsotinimo kreivės diferencijuotoje šilumos formoje (q_i priklausomybė nuo $[L_T]$ arba $[L_T]/[M_T]$) (Perozzo *et al.*, 2004; Freyer ir Lewis, 2008).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Reagentai ir tirpalai

2.1.1. Naudoti reagentai ir rinkiniai

Darbe naudoti reagentai pagal gamintojus:

- Alfa Aesar: trifluormetansulfonamidas;
- Aldrich: etokzolamidas;
- Allied Chemical Corporation: MnCl₂·2H₂O;
- BioRad: glicinas, merkaptoetanolis, TEMED;
- Biotechnologijos institutas: VD5, VD6, VD9, VD20, VD65, VD70, VD78, VD80, VD81, VD90, VD94;
- Fermentas:
 - o agarozė, IPTG, PEG₄₀₀₀,
 - o molekulinių masių standartai: GeneRuler[™] DNA Ladder, Protein Molecular Weight Marker #SM0431,
 - fermentai klonavimui: Eco91I, NotI, Van91I, Klenow, SAP, T4 DNR ligazė.
- Fluka: HCl, Na₂PO₄, NaH₂PO₄, NaOH, ZnCl₂, NiCl₂·6H₂O natrio dodecilsulfatas (NDS), Coomsie Briliant Blue, etidžio bromidas, N,N⁴-metilen-bis-akrilamidas, PEG₆₀₀₀;
- GE Heathcare: Chelating Sepharose[™] Fast Flow;
- Matheson Coleman & Bell: bromfenolio mėlynasis;
- Pharmacia Fine Chemicals: CM-Sepharose Fast Flow;
- Roche: Agarose Gel DNA Extraction Kit, PMSF;
- Roth: akrilamidas, ampicilinas, agaras, amonio peroksidsulfatas (APS), dimetilsulfoksidas (DMSO), mielių ekstraktas, triptonas, RNazė A, MgCl₂·6H₂O;
- SERVA: CH₃COONa;
- Sigma: NaCl, CaCl₂, Na₂SO₄, MgSO₄, EDTA, imidazolas, Tris, acetazolamidas, 4karboksibenzensulfonamidas, metazolamidas, ir sulfanilamidas.

Genetiniai konstruktai:

Žmogaus karboanhidrazės III plazmidė: pOTB7-hCAIII. Vektorius: pET-15b (Novagen).

Bakterijų kamienai:

Genetiniam konstravimui naudotas *E. coli* XL1-blue kamienas (Stratagene), F'::Tn10 (Tet^r) $proAB^+$ lacI^q $\Delta(lacZ)M15$ / recA1 endA1 gyrA96 (Nal^R) thi-1 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) glnV44 relA1 lac.

Baltymų ekspresavimui naudotas *E. coli* BL21 (DE3) kamienas (Novagen), su pašalintais lon ir ompT proteazių genais, F^- ompT lon $hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ gal dcm.

Bakterijų auginimo terpės:

<u>Agarizuota LB</u> (Luria-Bertani) terpė: 2% agaro, 1% peptono, 0,5% mielių ekstrakto, 1% NaCl, pH 7,0.

LB terpė: 1% peptono, 0,5% mielių ekstrakto, 1% NaCl, pH 7,0.

<u>SOC terpė</u>: 2% triptono, 0,5% mielių ekstrakto, 10mM NaCl, 3,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, magnio druskų koncentruoti tirpalai steriliai filtruojami, pridedami į autoklavuotą terpę ir įdedama gliukozės (galutinė koncentracija 2%).

2.1.2. Tirpalai metodams

Inoue transformacijos buferis: MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, PIPES 10 mM, pH 6,7.Pagaminus buferį jis steriliai filtruojamas ir laikomas -20°C temperatūroje.

DNR išskyrimui šarminės lizės metodu:

- P1 (I šarminės lizės tirpalas): 50 mM Tris-HCl, 10 µg/ml RNazės A, pH 8,0;
- P2 (II šarminės lizės tirpalas): 200 mM NaOH, 1% NDS;
- P3 (III šarminės lizės tirpalas): 3 M CH₃COOH, pH 5,5;
- TE buferis: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 8,5.

DNR elektroforezei 50x TAE buferis. 1 litrui: 242 g Tris, 100 ml 0,5 M EDTA, 57,1 ml ledinės CH₃COOH. Prieš naudojimą skiedžiama 50 kartų iki 1x.

Baltymų elektroforezei tirpalai:

- Akrilamidas/BIS: 30 g akrilamido ir 0,8 g N,N'-metilen-bis-akrilamido tirpinama dejonizuotame vandenyje, skiedžiama iki 100 ml, tirpalas filtruojamas, laikomas 4°C temperatūroje tamsiame inde iki 30 dienų;
- Tris 1,5 M pH 8,8 ir 0,5 M pH 6,8;
- NDS 10% (masė tūryje m/t);
- APS 10% (m/t);
- 10x elektroforezės buferis: 25 mM Tris, 1,9 M glicino, 35 mM NDS, pH 8,3 8,6 (nekoreguojamas). Prieš naudojimą skiedžiama 10 kartų;
- Bromfenolio mėlis 0,05% (m/t);
- 6x pavyzdžio buferis 350 μl: 0,5 M Tris, pH 6,8, NDS 50 mg, DTT 46 mg, glicerolio 150 μl;
- Kumasi dažas: Coomasie Briliant Blue 0,6 g, 95% etanolio 113 ml, ledinės CH₃COOH 23 ml, H₂O 113 ml.

Tirpalai cinko analizei atominės spektrometrijos metodu:

- Etaloninis 1mg/ml cinko tirpalas: 1,2447 g ZnO ištirpinama 10 ml praskiestame HCl (1:1), tirpalas skiedžiamas bidistiliuotu H₂O matavimo kolboje iki 1000 ml.
- Etaloninis darbinis 10 μg/ml cinko tirpalas: 1 ml etaloninio cinko tirpalo skiedžiamas matavimo kolbutėje bidistiliuotu H₂O iki 100ml.

2.2. Metodai

Metodikos sudarytos pagal Coligan et al., 2000, Ausubel et al., 1997.

2.2.1. Plazmidinės DNR restrikcija

1 μg DNR imamas 1 – 10 u (aktyvumo vienetų) restrikcijos endonukleazės (AB "Fermento"). Reakcijos buferis, inkubacijos ir inaktyvacijos laikas bei temperatūra parenkami pagal AB "Fermento" rekomendacijas.

2.2.2. DNR 5' galo fosfato pašalinimas

DNR 5[°] galo fosfato pašalinimui naudojama AB "Fermento" SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase). Reakcijai naudojami gamintojo rekomenduojamas buferis. Ji vykdoma esant 37°C 30 min., o fermentas inaktyvuojamas 65°C 15 min.

2.2.3. DNR lipnių galų bukinimas

Lipnių DNR galų bukinimui naudojama AB "Fermento" Klenow'o fragmentas. Jis pasižymi 3' \rightarrow 5' polimeraziniu ir 5' \rightarrow 3' egzonukleaziniu aktyvumu. Reakcija vykdoma pagal AB "Fermento" rekomendacijas: 30 min. 37°C, esant 0,05 mM dNTP koncentracijai. Fermentas inaktyvuojamas 70°C pakaitinus 10 min.

2.2.4. DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio

Norimas DNR fragmentas išpjaunamas iš agarozės gelio ir gryninama DNR su "Roche" rinkiniu "Agarose Gel DNA Extraction Kit". Gryninimas atliekamas pagal standartinį gamintojo protokolą.

2.2.5. DNR susiuvimas

DNR fragmentų susiuvimui naudojama T4 DNR ligazė ("Fermento"). 1 µg DNR susiuvimui imama 1 – 5 fermento aktyvumo vienetų. Reakcija vykdoma 16 val. 16°C arba 4 val. 22°C. Naudojamas AB "Fermento" specialus T4 DNR ligazės buferis. Bukų galų ligacijai naudojama PEG₄₀₀₀ (galutinė koncentracija 5%). PEG₄₀₀₀ labai pagerina DNR bukų galų susiuvimą. Imamas vektoriaus ir įterpiamo DNR fragmento molinis santykis 1:3.

2.2.6. Kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija Inoue metodu

Metodika sudaryta pagal Sambrook et al., 2006.

 Užsėjama viena *E. coli* bakterijų kolonija (2-3 mm diametro) iš lėkštelės į SOB terpę, inkubuojama 16-20 val. 37°C temperatūroje.

- Į 1 litro kolbą su 250 ml SOB terpės perkeliama 2 ml pradinės kultūros. Inkubuojama 37°C temperatūroje vidutiniškai kratant. Tikrinama OD₆₀₀ kas 45 min., auginama, kol pasiekia 0,55.
- 3. Perkeliama į ledo vonią ir inkubuojama 10 min.
- 4. Nucentrifuguojama 3900 aps./min. 10 min. 4°C temperatūroje.
- Nupilama terpė ir sustatomos kolbos ant popierinio rankšluosčio ir laikoma 2 min., kad nubėgtų buferis. Nusiurbiama likę buferio lašai.
- 6. Atsargiai resuspenduojamos ląstelės 80 ml šaltame transformacijos buferyje.
- 7. Pakartojami 4 ir 5 etapai.
- 8. Atsargiai resuspenduojamos ląstelės 20 ml šaltame transformacijos buferyje.
- Pridedama 1,5 ml DMSO. Pavartoma, kad susimaišytų ir laikoma 10 min. 4°C temperatūroje.
- Greitai išpilstomos kompetentinės ląstelės po 200 μl į atšaldytus ependorfinius mėgintuvėlius ir užšaldomos skystame azote. Laikomos -80°C temperatūroje.
- 11. Transformacijai atšildomi mėgintuvėliai su kompetentinėm ląstelėm palaikius rankose, kol šiek tiek atšyla ir laikomos ledo vonioje 10 min.
- 12. Atšaldytu antgaliu perkeliama po 100 μl bakterijų į atšaldytus sterilius ependorfinius mėgintuvėlius.
- Pridedama plazmidinės DNR (iki 50 ng), tūris neturi viršyti 5% kompetentinių ląstelių tūrio, ir 1 μl PEG₆₀₀₀ 40% (labai pagerina transformaciją). Laikomi mėgintuvėliai ant ledo 30 min.
- 14. Perkeliamas mėgintuvėlis į 42°C termostatą ir inkubuojama 90 s, o po to 1 2 min. ant ledo.
- Ipilama 400 μl pašildytos SOC terpės, inkubuojama 37°C temperatūroje 45min, 200 aps./min. purtyklėje.
- 16. Reikiamas transformuotų kompetentinių ląstelių tūris užsėjamas ant Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe ir reikiamu antibiotiku. Lėkštelė inkubuojama termostate 37°C temperatūroje 16 val.

2.2.7. Plazmidinės DNR išskyrimas šarminės lizės būdu

Į 2 ml LB terpės su antibiotikais (priklausomai nuo to kokiam antibiotikui atsparumo genas transformuojamoje plazmidėje) užsėjama viena *E. coli* XL1 blue kamieno bakterijų kolonija po transformacijos. Per naktį auginama 37°C purtant 270 aps./min.

- 1,5 ml bakterijų nucentrifuguojamos Ependorf stalinėje centrifugoje 10000 aps./min. greičiu, 4°C, 30 s. Supernatantas nusiurbiamas.
- 2. Nuosėdos suspenduojamos 200 µl P1 šaltame tirpale.
- Idedama 200 µl P2 tirpalo, kelis kartus paverčiamas mėgintuvėlis, kol tirpalas tampa skaidrus.
- 4. Įpilama 200 μl P3 šalto tirpalo ir 10 kartų paverčiama, tirpalas susidrumsčia.
 Paliekama pastovėti ant ledo 5 min.
- 5. Centrifuguojama 13000 aps./min. 4°C 5 min. Ependorf centrifugoje.
- 6. Perkeliama apie 500 μl supernatanto į naujai paruoštus ependorfinius mėgintuvėlius.
- 7. Pripilama 1ml 96% etanolio.
- 8. Laikoma -20°C 1 valanda.
- 9. Nucentrifuguojama 13000 aps./min. 4°C temperatūroje 5 min. Nusiurbiamas supernatantas.
- 10. Pripilama 1ml 70% etanolio tirpalo nuosėdų praplovimui.
- 11. Centrifuguojama 13000 aps./min. 1min. 4°C temperatūroje. Nusiurbiamas supernatantas.
- 12. Nuosėdos paliekamos džiūti kambario temperatūroje.
- 13. Išdžiuvusi DNR tampa skaidri. Ištirpinama 20 30 μl TE buferio.
- 14. Mėginiai laikomi 4°C arba -20°C temperatūroje.

2.2.8. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė vykdoma 1 - 2% agarozės gelyje, turinčiame 0,1 - 0,2 µg/ml etidžio bromido, TAE buferyje, naudojant 10 mV/cm įtampą. Geliai analizuojami ultravioletinėje šviesoje transiliuminatoriuje (ULTRA – LÜM).

2.2.9. Baltymų ekspresija E. coli BL21 kamiene

Baltymai ekspresuojami *E. coli* BL21 (DE3) kamiene. Į LB terpę su ampicilinu (50 μ g/ml) ir 1 mM ZnCl₂ užsėjama viena kolonija iš transformuotos lėkštelės ir auginama 16 val. 37°C temperatūroje purtant. Tuomet bakterijų kultūra skiedžiama 1:30 ką tik paruošta LB terpe su ampicilinu ir 1 mM ZnCl₂ iki 60 μ M. Auginama kol optinis tankis pasiekia 0,6 – 0,8 (λ = 550nm). Toliau indukuojama baltymo ekspresija pridedant IPTG iki 0,2 mM, toliau auginama arba 37°C 2 val., arba 30°C 4val.. Bakterijų kultūra centrifuguojama 6000 aps./min. 30 min. 4°C temperatūroje. Pašalinamas centrifugatas. Biomasė laikoma -20°C.

2.2.10. Biomasės denatūravimas ir hCAIII gryninimas

Biomasės denatūravimas ir gryninimas atliktas padedant jaun. m. d. V. Michailovienei.

Biomasė suspenduojama ardymo buferyje (25 mM Tris, 0,1 M Na₂SO₄, 1 mM PMSF, 2 mM merkaptoetanolio, pH 7,7) ir maišoma +4°C temperatūroje 1 val. Ardoma ultragarsu ledo vonelėje 5 ciklus: 60 s ardoma, 60 s stovi ant ledo (kad neįšiltų tirpalas), kol tirpalas tampa skaidresnis. Centrifuguojama 20000 aps./min. 25 min. Centrifugatas užnešamas ant nupusiausvirintos imobilizuotų metalo jonų kolonėlės, įkrautos Ni²⁺jonais, prie kurių kabinasi heksahistidino uodegėlė. Baltymas desorbuojamas leidžiant imidazolo gradientą nuo 0,8 M iki 0 M, tekėjimo greitis – 80 ml/h. Saviraščiu registruojama frakcijų absorbcija esant 280 nm bangos ilgiui. Gryninimo metu baltymai išeina dviem pikais, hCA III išeina su antruoju piku. Šios frakcijos tiriamos atliekant NDS-PAAG, ir kuriose yra tikslinis baltymas apjungiamos ir vykdoma jų dializė per naktį +4°C buferyje: 20 mM Mes, 2 mM DTT, pH 6. Tada leidžiama per antrą kolonėlę: vykdoma jonų mainų chromatografija pH gradiente. Vėlgi frakcijos tiriamos atliekant NDS-PAAG ir apjungiamos tos, kuriose yra išgrynintas tikslinis baltymas. Vykdoma dializė per naktį +4°C laikymo buferyje: 20 mM Mes, 50 mM Na₂SO₄, 2 mM DTT, pH 6,5. Tada išpilstoma po 0,5 ml, užšaldoma skystame azote ir laikoma -80°C temperatūroje.

2.2.11. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Nutrūkstama baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje atliekama pagal Laemmli metodiką (Laemmli, 1970). Darbe naudoti geliai sudaryti iš: 12% apatinio frakcionuojančio gelio ir 4% viršutinio koncentruojančio gelio. Baltymų elektroforezei denatūruojančiom sąlygom (NDS-PAAG) dviems geliams sumaišoma:

Apatiniam frakcionuojančiam geliui (12%):

Akrilamidas/BIS akrilamido tirpalas	4 ml
1,5M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
10% NDS	100 µl
H_2O	3,17 ml
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl
Viršutiniam koncentruojančiam geliui (4%):	·
Akrilamidas/BIS akrilamido tirpalas	0,67 ml
0,5M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
10% NDS	50 µl
H_2O	3 ml
10% APS	25 µl
TEMED	5 ul

Baltyminiai pavyzdžiai paruošiami sumaišant 10 μ l tiriamojo baltymo su 2,5 μ l 6x pavyzdžio buferio ir pakaitiname 5 min. verdančio vandens vonelėje.

Elektroforezės plokštelės švariai nuvalomos, tvirtai suspaudžiamos. Frakcionuojantis gelis pilamas tarp plokštelių ir ant jo užsluoksniuojama 100 µl vandens. Kai apatinis gelis sustingsta, sumaišomi komponentai viršutiniam geliui, nusausinamas vanduo, užpilamas viršutinis gelis ir įstatomos elektroforezės "šukos". Sustingus geliui ištraukiamos "šukos" ir užnešami pavyzdžiai. Gelis įstatomas į baltymų elektroforezės aparatą, užpilamas baltymų elektroforezės buferis ir įjungiama srovė. Koncentruojančiajam geliui srovė ~20 mV, o frakcionuojančiajam – dvigubai didesnė. Elektroforezė sustabdoma, kai bromfenolio mėlio frontas pasiekia apatinio gelio apačią. Gelis dažomas Kumasi mėlio dažu.

2.2.12. Cinko nustatymas atominės absorbcinės spektrometrijos metodu

Metodika pagal Steponeniene et al., 2003. Analize atlikta VU ChF prof. S. Tautkaus.

Eksperimentas atliekamas Hitachi 170-50 atominės absorbcijos spektrometru esant šioms optimalioms nustatymo sąlygom: atomizavimas liepsna, Zn analizės linija – 213,8 nm, dujos – acetilenas ir oras, srovės stipris – 10 mA, acetileno dujų slėgis – $0,98 \cdot 10^4$ Pa, oro slėgis - $0,98 \cdot 10^5$ Pa.

Kalibracinei kreivei gauti imama 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ml etaloninio darbinio 10 μ g/ml cinko tirpalo ir skiedžiama bidistiliuotu H₂O iki 100 ml. Gaunama serija tirpalų, kuriame Zn koncentracija nuo 0,05 iki 0,4 μ g/ml.

Atliekant hCA III Zn kiekio analizę imamas atitinkamas tūris baltymo tirpalo, skiedžiama bidistiliuotu vandeniu iki 10 ml matavimo kolbutėje iki žymės. Matuojama Zn atominė absorbcija ir iš kalibracinės kreivės nustatomas Zn kiekis.

2.1	i rentere. Reagentų isdestymas ir koncentracijos galutinėje baltymų charakterizavimo leksterėje.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5 mM NaCl	15 mM NaCl	50 mM NaCl	150 mM NaCl	500 mM NaCl	1 M NaCl	100 mM Tris 7,0	100 mM Tris 7,5	100 mM Tris 8,0	100 mM Tris 8,5	100 mM Tris 9,0	100 mM Gly 9,5
в	5 mM MgCl ₂	5 mM CaCl ₂	5 mM SrCl ₂	5 mM BaCl ₂	100 mM KCl	100 mM LiCl	100 mM Hepes 6,5	100 mM Hepes 7,.5	100 mM Hepes 8,5	100 mM NaPi 6,0	100 mM NaPi 7,0	100 mM NaPi 8,0
С	50 μM Fe ₂ (SO ₄) ₃	50 μM CoCl ₂	50 μM NiCl ₂	50 μM CuCl ₂	50 μM ZnCl ₂	50 mM NH₄Cl	100 mM NaCi- tratas 3,5	100 mM NaCi- tratas 4,5	100 mM NaCi- tratas 5,5	100 mM NaCitr atas 6,5	100 mM NaCi- tratas 7,5	100 mM NaHCO3 8,0
D	10 μM Fe ₂ (SO ₄) ₃	10 μM CoCl ₂	10 μM NiCl ₂	10 μM CuCl ₂	10 μM ZnCl ₂	100 mM NaSCN	100 mM Mes 5,0	100 mM Mes 6,0	100 mM Mes 7,0	100 mM Pipes 6,5	100 mM Pipes 7,5	100 mM Na ₂ CO ₃ 10,0
Е	100 mM NaF	100 mM NaCl	100 mM NaBr	100 mM NaI	100 mM Na ₂ SO ₄	100 mM NaNO3	100 mM Imida- zolas 7,0	200 mM Imida- zolas 7,0	300 mM Imida- zolas 7,0	100 mM NaSuk- cinatas 6,5	100 mM NaSuk- cinatas 7,0	100 mM NaFor- miatas 4,0
F	50µM EuCl₃	50 μm CeCl ₃	50 μM TbCl3	50 μM RuCl ₃	50 μM YCl ₃	5 mM EDTA	100 mM NaAc 4,0	100 mM NaAc 4,5	100 mM NaAc 5,0	100 mM NaAc 5,5	100 mM NaFor- miatas 3,0	100 mM NaFor- miatas 3,5
G	2% DMSO	5% DMSO	10% DMSO	100 mM TMAO	250 mM Urėja	500 mM Urėja	1000 mM Urėja	2000 mM Urėja	250 mM GuaCl	500 mM GuaCl	1000 mM GuaCl	2000 mM GuaCl
Н	2% Glice- rolis	5% Glice- rolis	10% Glice- rolis	100 mM Gliuko- z4	0,05 mM Dapo- ksilo sulfo- natas, 0.5% DMSO	0,1 mM Dapo- ksilo sulfo- natas, 0.5% DMSO	0,15 mM Dapo- ksilo sulfo- natas, 0.5% DMSO	H ₂ O	H ₂ O	50 μM KMnO₄	5 mM Cys	5 mM DTT

2.2.13. Baltymų stabilumo įvertinimas, esant įvairiems reagentams

Į tiriamo baltymo tirpalą (baltymo koncentracija 0,2 – 0,4 mg/ml, nedidelė druskų koncentracija) pridedama dapoksilo (iki galutinės 0,1 mM koncentracijos) ir išdozuojama elektroniniu pipetmanu-dozatorium po 5 µl į 96 šulinėlius PGR lėkštelės. Į tuos pačius šulinėlius išdozuojama 5 µl reagentų tirpalus, kurių įtaką norima ištirti tiriamajam baltymui. Ant viršaus išdozuojama 2,5 µl silikoninės alyvos, kad kaitinant tirpalas neišgaruotų. 2.1 lentelėje pavaizduotos galutinės reagentų tirpalų šulinėliuose išdėstymo tvarka ir galutinės koncentracijos. Pirma paruošiama pirminė lėkštelė, kurioje reagentų koncentracijos yra dvigubai didesnės, o išdozavus į galutinę lėkštelę jie praskiedžiami 2 kartus. Šulinėliai

užklijuojami specialia plėvele. Lėkštelės nucentrifuguojamo 1000 aps./min. 1 min., kad susimaišytų tirpalai ir neliktų lašelių ant sienelių. Toliau ji patalpinama į tikro-laiko PGR aparatą (Bio-Rad iCycler iQ[™] Real-Time PCR Detection System), kuris kaitina plokštelę maždaug 1°C per minutę greičiu ir nuolatos matuoja fluorescenciją visuose šulinėliuose.

2.2.14. Ligandų jungimosi su baltymu matavimas terminio poslinkio metodu

Ligandas pirmiausia ištirpinamas DMSO, tuomet skiedžiamas iki norimos koncentracijos, tačiau DMSO galutiniame tirpale (galutinėje plokštelėje, išpilsčius su baltymu) neturi būti didesnė nei 2%. Ligandų tirpalus taip pat patogu pirma pasiruošti pradinėje lėkštelėje, kur jų koncentracija yra dvigubai didesnė nei norima pamatuoti, be to DMSO koncentracija jame gali būti iki 4%.

Išpilstomas baltymo tirpalas, kuriame baltymo koncentracija 20 μ M, dapoksilo sulfoninės rūgšties koncentracija 0,1 mM, atitinkamas pH buferis, atitinkamos druskos į PGR lėkštelę. Į kiekvieną šulinėlį įpilama 5 μ l baltymo ir 5 μ l tam tikros koncentracijos tiriamo ligando tirpalo.

Išpilstomas baltymo tirpalas, kuriame baltymo koncentracija 20 μ M, dapoksilo sulfoninės rūgšties koncentracija 0,1 mM, atitinkamas pH buferis, atitinkamos druskos į PGR lėkštelę. Į kiekvieną šulinėlį įpilama 5 μ l baltymo ir 5 μ l tam tikros koncentracijos tiriamo ligando tirpalo.

Matavimas atliekamas su tikro-laiko PCR aparatu (Bio-Rad iCycler iQ[™] Real-Time PCR Detection System), temperatūra keliama 1°C per minutę.

ICK	ieksteleje.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200,00 μM A, 10 μM CA	133,33 μM G, 10 μM CA	88,89 μΜ Α, 10 μΜ CA	59,26 μΜ Α, 10 μΜ CA	39,51 μΜ Α, 10 μΜ CA	26,34 μΜ Α, 10 μΜ CA	17,56 μΜ Α, 10 μΜ CA	11,71 μΜ Α, 10 μΜ CA	7,80 μΜ Α, 10 μΜ CA	5,20 μΜ Α, 10 μΜ CA	3,47 μM A, 10 μM CA	0 μM A, 10 μM CA
в	200,00 μM B, 10 μM CA	133,33 μM B, 10 μM CA	88,89 μM B, 10 μM CA	59,26 μM B, 10 μM CA	39,51 μΜ Β, 10 μΜ CA	26,34 μM B, 10 μM CA	17,56 μM B, 10 μM CA	11,71 μM B, 10 μM CA	7,80 μM B, 10 μM CA	5,20 μM B, 10 μM CA	3,47 μM B, 10 μM CA	0 μM B, 10 μM CA

2.2 lentelė. Ligandų išdėstymas ir koncentracijos galutinėje ligandų (A-H) jungimosi su baltymu matavimo lėkštelėje.

С	200,00 μM C, 10 μM CA	133,33 μM C, 10 μM CA	88,89 μM C, 10 μM CA	59,26 μΜ C, 10 μΜ CA	39,51 μM C, 10 μM CA	26,34 μM C, 10 μM CA	17,56 μM C, 10 μM CA	11,71 μM C, 10 μM CA	7,80 μM C, 10 μM CA	5,20 μM C, 10 μM CA	3,47 μM C, 10 μM CA	0 μM C, 10 μM CA
D	200,00 μM D, 10 μM CA	133,33 μM D, 10 μM CA	88,89 μM D, 10 μM CA	59,26 μM D, 10 μM CA	39,51 μM D, 10 μM CA	26,34 μM D, 10 μM CA	17,56 μM D, 10 μM CA	11,71 μM D, 10 μM CA	7,80 μM D, 10 μM CA	5,20 μM D, 10 μM CA	3,47 μM D, 10 μM CA	0 μM D, 10 μM CA
Е	200,00 μM E, 10 μM CA	133,33 μΜ Ε, 10 μΜ CA	88,89 μΜ Ε, 10 μΜ CA	59,26 μΜ Ε, 10 μΜ CA	39,51 μΜ Ε, 10 μΜ CA	26,34 μΜ Ε, 10 μΜ CA	17,56 μΜ Ε, 10 μΜ CA	11,71 μΜ Ε, 10 μΜ CA	7,80 μΜ Ε, 10 μΜ CA	5,20 μM E, 10 μM CA	3,47 μΜ Ε, 10 μΜ CA	0 μM Ε, 10 μM CA
F	200,00 μM F, 10 μM CA	133,33 μM F, 10 μM CA	88,89 μM F, 10 μM CA	59,26 μM F, 10 μM CA	39,51 μM F, 10 μM CA	26,34 μM F, 10 μM CA	17,56 μM F, 10 μM CA	11,71 μM F, 10 μM CA	7,80 μM F, 10 μM CA	5,20 μM F, 10 μM CA	3,47 μM F, 10 μM CA	0 μM F, 10 μM CA
G	200,00 μM G, 10 μM CA	133,33 μM G, 10 μM CA	88,89 μM G, 10 μM CA	59,26 μM G, 10 μM CA	39,51 μM G, 10 μM CA	26,34 μM G, 10 μM CA	17,56 μM G, 10 μM CA	11,71 μM G, 10 μM CA	7,80 μM G, 10 μM CA	5,20 μM G, 10 μM CA	3,47 μM G, 10 μM CA	0 μM G, 10 μM CA
н	200,00 μM H, 10 μM CA	133,33 μM H, 10 μM CA	88,89 μΜ Η, 10 μΜ CA	59,26 μΜ Η, 10 μΜ CA	39,51 μΜ Η, 10 μΜ CA	26,34 μΜ Η, 10 μΜ CA	17,56 μΜ Η, 10 μΜ CA	11,71 μM H, 10 μM CA	7,80 μΜ Η, 10 μΜ CA	5,20 μM H, 10 μM CA	3,47 μM H, 10 μM CA	0 μM H, 10 μM CA

2.2.15. Slopiklių jungimosi matavimas izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu

Izoterminio titravimo kalorimetrijos matavimui ruošiami du mėginiai: baltymo tirpalas (pilamas į kiuvetę) ir slopiklio tirpalas (juo užpildomas švirkštas). Abiejų mėginių tūris po 2 ml.

Baltymo ir ligando koncentracijų santykis parenkamas toks, kad baltymo aktyvieji centrai būtų įsotinti eksperimento viduryje, tam kad galėtume išmatuoti jungimosi ir skiedimosi šilumą. O baltymo koncentracija, tokia, kad C faktorius būtų tarp 10 ir 100.

Prieš eksperimentą baltymo tirpalas dializuojamas pasirinktame buferyje. Slopiklis tirpinamas dializės buferyje.

Eksperimentas atliekamas Microcal VP-ITC kalorimetru. Paruoštais mėginiais užpildoma kiuvetė ir švirkštas. Prieš pradedant eksperimentą palaukiama, kol nusistovės tiesi bazinė linija. Maišymo greitis parenkamas mažiausias galimas (260 aps./min.)., viso 25 injekcijos, vienos injekcijos tūris 10 μ l, tarpas iki pirmos injekcijos – 600 s, o tarpas tarp injekcijų 200 s.

2.2.16. Duomenų apdorojimas

Duomenų, gautų terminio poslinkio metodu, apdorojimui naudojama ThermoFluor++ 1.4.2 programa bei Microsoft Office Excel programa.

Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu gauti rezultatai apdorojami MicrocalTMOriginTM v5,0 programa.

2.2.17. Baltymų struktūros vaizdavimas ir modeliavimas

Baltymų struktūros vaizdavimui naudojama PyMol v1.0 programa. Slopiklių modeliavimas aktyviajame centre atliekamas Accelrys DS Visualizer v 1.7.

3. DARBO REZULTATAI



3.1. hCA III klonavimas ir ekspresija

3.1 pav. Principinė hCA III klonavimo schema.

hCA III genas iškerpamas be pradžios kodono, už stop kodono ir klonuojamas į pasirinktą vektorių pET-15b. Vektoriuje baltymo genas suliejamas su heksahistidino uodegėle per trombino kirpimo sritį. Taip pat vektoriuje yra ampicilinui atsparumo genas. Restriktazės parenkamos tokios, kad atsistatytų baltymo skaitymo rėmelis, nes geno promotorius ir pradžios kodonas yra pET-15b vektoriuje prieš heksahistidino žymens seką. Iš konstrukto pOTB7-hCAIII AB "Fermento" restriktazėmis Eco911 ir Van911 iškerpamas 903 bazių porų fragmentas lipniais galais. Tuomet bukinami lipnūs galai AB "Fermento" Klenow fragmentu. Tokiu būdu prarandamos dvi pirmos amino rūgštys, o trečios amino rūgšties kodonas

atsistato. Todėl rekombinantinis baltymas gaunamas nuo trečios amino rūgšties. Manoma, kad tai neturės įtakos tolimesniems tyrimams.

Analogiškai veikiamas vektorius pET-15b: AB "Fermento" restriktaze NotI kerpama multikloninė vektoriaus sritis, bukinami lipnūs galai. Kirptas vektorius ir hCA III genas gryninami iš agarozės gelio. Pašalinami vektoriaus 5[°] fosfatai, kad vykdant ligaciją vektorius nebūtų susiūtas pats su savimi.

Vektorius su klonuojamu genu susiuvami T4 DNR ligaze ir transformuojami į *E. coli* XL1-Blue kamieną. Gautos kolonijos užsėjamos į atskirus mėgintuvėlius. Išskiriama DNR šarminės lizės būdu ir tikrinama restriktaziniu metodu, ieškoma teisingų konstruktų. Nustačius teisingą konstruktą, galutinai seka patvirtinama sekvenavimu.

Išgryninta DNR transformuojama į *E. coli* BL21 kamieną ir ekspresuojamas baltymas. Auginimo sąlygos parenkamos tokios, kad baltymas būtų tirpus, jo kiekis būtų kuo didesnis ir baltymas būtų kuo stabilesnis. Todėl buvo parinkta auginti iki indukcijos IPTG 37°C, o pasiekus 0,6 – 0,8 (λ = 550 nm) optinį tankį pridedama IPTG iki 0,2 mM ir auginama 4 val. 30°C.

Darbo metu susidurta su problema: ištyrus išgrynintą hCA III baltymą atlikus Zn analizę, pasirodė, kad tik ketvirtadalis baltymo turi savo sudėtyje Zn(II) joną. Bandant padidinti baltymo kiekį su Zn(II) aktyviajame centre, buvo keičiama ZnCl₂ koncentracija auginimo terpėje. Didžiausia koncentracija, kuriai esant augo bakterijos – 1 mM. Gauta baltymo su Zn(II) 46%. (3.1 lentelė, 3.2 pav.).



3.2 pav. hCA III ekspresija skirtingomis $ZnCl_2$ koncentracijomis (NDS-PAAG). Takeliuose: 1, 2 – bendras lizatas prieš ir po indukcijos (0,2 mM IPTG), auginimo terpėje 0,4 mM $ZnCl_2$ koncentracija; 3, 4 – bendras lizatas prieš ir po indukcijos (1 mM $ZnCl_2$ konc.). Rodyklėmis parodyta hCA III (~30 kDa).

3.1 lentelė. Baltymo su Zn(II) aktyviajame centre kiekio didinimas, keičiant auginimo terpėje ZnCl₂ koncentraciją.

Auginimo terpėje ZnCl ₂ konc., mM	Baltymo dalis su Zn(II), %
0,4	~25*
1	~46*
2	Silpnai augo biomasė

* Zn(II) analize atlikta ChF prof. S. Tautkaus.

3.2. Žmogaus karboanhidrazės III gryninimas

Biomasė suardyta ultragarsu, kiek didesnė dalis baltymo gauta tirpioje frakcijoje (3.3 pav.). Kadangi baltymas turėjo heksahistidino uodegėlę grynintas naudojant Ni²⁺ jonų chromatografinę kolonėlę ir KM jonų mainų kolonėlę, norint pasiekti didesnį grynumą ir sukoncentruoti baltymą. Prie Ni(II) jonų kabinasi heksahistidino uodegėlė koordinaciniais ryšiais ir leidžiant imidazolo gradientą tikslinis baltymas atsikabina ir atskiriamas. Toliau frakcijos, kur didžiausia tikslinio baltymo koncentracija apjungiamos ir leidžiamos per antrąją kolonėlę – jonų mainų. Leidžiamas pH gradientas ir kai pH pasiekia tikslinio baltymo izoelektrinį tašką, šis atsikabina. Baltymas gautas su nežymia priemaiša, kuri visada gryninasi kartu.

hCA III yra nestabili, kadangi paviršiuje turi 5 Cys (Cys66, Cys181, Cys188, Cys203 ir 206), kurie gali oksiduotis esant deguonies arba kitam oksidatoriui ir sudaryti disulfidinius tiltelius tarpusavyje arba su kito baltymo molekulės paviršiuje esančiais Cys. Ilgiau laikant kambario ar net 4°C temperatūroje jis išsėda į nuosėdas. Todėl laikomas -80°C, 20 mM Mes pH 6,5, 0,05 M Na₂SO₄, 2mM DTT tirpale.



3.3 pav. Suardytos biomasės ultragarsu didesnė dalis baltymo yra tirpioje frakcijoje. Takeliuose: 1 – bendras lizatas po indukcijos; 2 – tirpi frakcija; 3 – netirpi frakcija po suardymo ultragarsu.



3.4 pav. hCA III gryninimo imobilizuotų Ni²⁺ jonų chromatografijos metodu rezultatai (NDS-PAAG). 1 – tirpi frakcija, užnešama ant kolonėlės; 2 – gryninimo metu nesisorbavusi frakcija; 3-8 – frakcijos su tiksliniu baltymu.

3.5 pav. hCA III gryninimas jonų mainų chromatografijos metodu rezultatai (NDS-PAAG). 1 – užnešimas ant kolonėlės, apjungtos frakcijos su tiksliniu baltymu iš imobilizuotų jonų kolonėlės; 2-8 – chromatografijos frakcijos su tiksliniu baltymu.

3.3. Žmogaus karboanhidrazės III stabilumo įvertinimas

hCAIII rekombinantiniam baltymui buvo atliktas stabilumo įvertinimas terminio poslinkio metodu. Buvo parinkti įvairūs reagentai, įvairių pH verčių skirtingi buferiai, įvertinta jų įtaka baltymo stabilumui.

Buvo nustatyta baltymo denatūravimo temperatūra esant skirtingoms osmolitų (gliukozės, imidazolo, urėjos, guanidino vendenilio chlorido) koncentracijoms (3.6 pav.). Osmolitai dažniausiai destabilizuoja baltymą. Rekombinantinę žmogaus karboanhidrazę III destabilizuoja visi tirtieji osmolitai: labai stipriai guanidino vandenilio chloridas (GuCl) ir imidazolas. Urėja ir gliukozė silpnai destabilizuoja. Tai parodo, kaip kontrolė, kad stebimos tranzicijos bandymo metu yra dėl baltymo denatūracijos, o ne dėl kitų procesų.

Taip pat buvo įvertinta įvairių katijonų įtaka baltymo stabilumui (3.7 pav.). Dauguma tirtų vienvalenčių ir dvivalenčių jonų (Na, Mg, Sr, Ba, Ca) nestipriai destabilizavo baltymą. Trivalenčių jonų, Eu, Ce, Tb, Y, panašus poveikis – denatūravimo temperatūra sumažėjo ~1°C. Stipriausia destabilizavo Ru, $dT_m \sim -3^{\circ}C$. Kiti metalai (3.8 pav.): Fe³⁺ ir Cu²⁺ silpnai destabilizuoja baltymą ($dT_m \sim -1^{\circ}C$), o Ni²⁺ kiek stipriau ($dT_m \sim -2^{\circ}C$). Labai stipria

destabilizuoja baltymą Zn^{2+} ($dT_m \sim -6^{\circ}C$), tai gana neįprasta, kadangi karboanhidrazė savo aktyviajame centre turi Zn(II).



3.6 pav. hCA III stabilumo priklausomybė nuo pridėtų osmolitų koncentracijos.



3.7 pav. Baltymo denatūravimo temperatūros skirtumas lyginant su 0 mM druskų koncentracija. A – chlorido druskų koncentracija 5 mM; B – chlorido druskų koncentracija 50 μ M.



3.8 pav. Baltymo denatūravimo temperatūros skirtumas, esant 50µM druskų koncentracijai, lyginant su 0 mM druskų

koncentracija.

Anijonų įtaka baltymo stabilumui pavaizduota 3.9 paveiksle. Tiocianato (SCN⁻) ir nitrato (NO₃⁻) jonai gana stipriai destabilizuoja baltymą (dT_m -2 – (-3)°C), o Br⁻ ir I⁻ jonai silpnai, dT_m ~ -1°C. Sulfatas (SO₄²⁻) ir chloridas (Cl⁻) beveik neturėjo įtakos baltymo stabilumui. Kiti anijonai (F⁻, HCO₃⁻, piridinas) stabilizavo baltymą dT_m ~ 1°C.

Baltymo stabilumui turi įtakos ir organinio tirpiklio koncentraciją. Tai labai svarbu, kadangi matuojant slopiklių jungimąsi prie baltymo slopikliai tirpinami dimetilsulfokside (DMSO).

Akivaizdu iš 3.10 paveikslo, kad DMSO destabilizuoja baltymą, todėl visada įvertinama, kad tiriamajame mėginyje DMSO koncentracija neviršytų 2%. Glicerolio nedaro stiprios įtakos baltymo stabilumui, netgi šiek tiek jį stabilizuoja.



3.9 pav. Balymo denatūravimo temperatūros skirtumas lyginant su 0 mM druskų koncentracija. Druskų koncentracija 100 mM.



3.10 pav. Organinių tirpiklių įtaka baltymo stabilumui.

Skirtinguose buferiuose gauta hCA III stabilumo priklausomybė nuo pH pavaizduota 12 pav. Galima ją palyginti su teorine baltymo paviršiaus krūvio priklausomybe nuo pH (3.11 pav.), kuri gauta pagal Henderseno-Haselbacho lygtį:

$$pH = pK_{a} + \lg \frac{[A^{-}]}{[HA]}$$
$$[A^{-}] = \frac{10^{(pH - pK_{a})}}{1 + 10^{(pH - pK_{a})}}$$
$$[HA] = \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK_{a})}}$$

Matome, kad rekombinantinės hCA III izolektrinis taškas yra apie 7. Iš balymo stabilumo įvertinimo rezultatų matome, kad baltymas stabiliausiais, tai yra jo T_m didžiausia, tarp pH 6,5 ir 9,5. Tai neblogai koreliuoja su teoriniais rezultatais, kadangi pH intervale 7 – 9 baltymo molekulės krūvis yra artimas 0. Skirtinguose buferiuose hCA III stabilumas panašus, esant pH 6,5 – 9. Mažesniuose pH buferių įtaka skirtinga, pvz. citratinis buferis kiek labiau destabilizuoja hCA III ties pH 6 lyginant su acetatiniu buferiu, tačiau esant didesnėms pH vertėms neturi įtakos stabilumui. O Mes buferis pH 5,5 kiek destabilizuoja baltymą stipriau negu acetatinis buferis.



3.11 pav. Teorinė hCA I, II ir III molekulės krūvio priklausomybės nuo pH kreivė. Teorinis pI hCA I – 6,81, hCA II – 7,22, hCA III – 7,03.



3.12 pav. hCA I, II ir III denatūravimo temperatūros priklausomybė nuo pH skirtinguose buferiuose (hCA I ir II stabilumo įvertinimas atliktas biotermodinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijoje L. Baranauskienės, nepublikuoti duomenys).

Galima palyginti žmogaus karboanhidrazių I, II ir III stabilumo priklausomybę nuo pH ir buferių. Teorinės paviršiaus krūvio priklausomybės nuo pH kreivės labai panašios visų trijų karboanhidrazių. Gana panašus stabilumas yra ir skirtinguose pH buferiuose. Kiek labiau skiriasi stabilumas žemesniuose pH bei pH 8 karbonatiniame buferyje: labiau destabilizuoja hCA I ir II negu III.

Nors iš pirmo žvilgsnio gana panašūs stabilumo rezultatai mažesnių pH srityje, bet sulyginus gautus rezultatus (3.13 pav.) matome, kad stabilumas skiriasi skirtinguose pH ir buferiuose pH intervale 4 – 6,5. Citratiniame buferyje pH 5,5 ir 6,5 stabilumo tendencija panaši visų trijų CA. Bet skiriasi stabilumas: hCA III yra stabiliausia šiame buferyje, o hCA I yra mažiausiai stabili, denatūravimo temperatūra yra apie 5°C mažesnė negu hCA III. Fosfatiniame buferyje (NaPi) stabilumas gana panašus visų trijų. Mes buferyje kiek mažiau stabili yra hCA III pH 5,0 ir 6,0, jos denatūravimo temperatūra yra apie 2°C mažesnė negu hCA I. Mažuose pH 4-5 stabilumas labai skirtingas. hCA I pH 5 acetatiniame buferyje denatūravimo temperatūra yra \sim 6°C mažesnė negu hCA II, bet hCA III denatūravimo temperatūra yra net 9°C mažesnė negu hCA II. Žemesniuose pH hCA I ir III denatūruoja kambario temperatūroje, o hCA II T_m yra \sim 36°C. Formiatiniame buferyje hCA II yra nestabili, o hCA I ir III denatūravimo temperatūra yra apie 40°C.



3.13 pav. hCA I, II ir III denatūravimo temperatūros priklausomybė nuo pH skirtinguose buferiuose 4-6,5 pH srityje. (hCA I ir II stabilumo įvertinimas atliktas biotermodinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijoje L. Baranauskienės, nepublikuoti duomenys).

3.4. Žmogaus karboanhidrazės III jungimasis su sulfonamidiniais slopikliais

Karboanhidrazės dalyvauja įvairiose fiziologiniuose procesuose ir sutrikusi veikla lemia tam tikras patologijas. Tai pat jos yra paplitusios visuose organizmuose ir katalizuoja gyvybiškai svarbią reakciją. Todėl yra svarbu rasti tokius jų slopiklius, kurie būtų specifiški tam tikrai karboanhidrazių klasei ir izoformai. Todėl dažnai reikia patikrinti jungimąsi su daug slopiklių, kad rastume specifiškų tam tikrai CA izoformai. Terminio poslinkio metodu galima vienu metu matuoti net 96 mėginius tokiu būdu galima patikrinti jungimąsi su daug slopiklių ir nustatyti jungimosi parametrus.



3.14 pav. Tirtų sulfonamidų struktūrinės formulės.

Mano darbe buvo matuotas hCA III jungimasis su sulfonamidiniais terminio poslinkio metodu 20 mM Mes pH 6,5, 50 mM Na₂SO₄, 2mM DTT buferyje. Buvo išmatuotas jungimasis su 17 slopiklių: 6 komerciniais CA slopikliais – trifuolmetansulfonamidu (TFMSA), metazolamidu (MZM), karboksibenzensulfonamidu (CARBS), etokzolamidu (EZM), acetazolamidu (AZM) ir sulfanilamidu (SAA) ir 11 susintetinti Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijoje dr. Virginijos Dudutienės, kurių struktūrinės formulės pateiktos 3.14 pav.

Terminio poslinkio metodu gaunamos dažo reporterio dapoksilo sulfoninės rūgšties fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo temperatūros kreivės (3.15 pav.). Kol temperatūra nedidelė ir baltymas natyvios formos fluorescensija vandeninėje terpėje yra labai nežymi (Matulis *et al.*, 2005).Fluorescencija intensyvėja, kada pradeda išsivynioti baltymas ir atsiveria hidrofobinės sritys, dažas jungiasi prie jų, o jo fluorescencija labai intensyvi hidrofobinėje aplinkoje. Pasiekus tam tikrą temperatūrą visas baltymas denatūruoja, o tada fluorescencija pradeda mažėti, kadangi dažo fluorescencija mažėja didėjant temperatūrai. Iš šių grafikų nustatoma hCA III denatūracijos temperatūra (T_m), esant skirtingoms slopiklio koncentracijoms. T_m atitinka tą temperatūrą, kurioje pusė baltymo jau yra denatūravę, o pusė dar ne, tai yra kurioje denatūravusio ir natyvaus baltymo laisvosios energijos yra lygios (Matulis, et al, 2005). Didėjant slopiklio koncentracijai didėja terminis baltymo stabilumas. Kaip matome 3.15 pav. grafikas slenkasi į didesnės temperatūros pusę, didinant slopiklio koncentraciją, vadinasi baltymo stabilumas didėja.



3.15 pav. Fluorescencijos intensyvumo priklausomybė keliant temperatūrą esant skirtingoms TFMSA koncentracijoms.

Baltymo lydymosi temperatūros priklausomybė nuo slopiklio koncentracijos (3.16 pav.) gaunama aproksimuojant teorine kreive 14 lygtį simuliuojant parametrus (jungimosi konstantą, denatūravimo entalpiją). Nustatomos denatūravimo entalpijos ir jungimosi

konstantos, iš jų apskaičiuojama jungimosi laisvoji energija. Nustatyti parametrai apibendrinti 3.2 lentelėje.

hCA III geriausiai iš tirtų slopiklių jungiasi su TFMSA (33.8 pav. A) (jungimosi laisvoji energija -41,7 kJ/mol, esant 37°C) ir kur kas silpniau su AZM (3.8 pav. A), EZA (3.8 pav. B) bei MZM (3.8 pav. B), kurių jungimasis labai panašus (jungimosi Δ G -29 – (-30) kJ/ mol 37°C temperatūroje). Tačiau nepavyko nustatyti jungimosi su kitais slopikliais (CARBS, SAA bei VD junginiais) (1 pav. priede), kadangi šiuo metodu mažiausia nustatoma jungimosi konstanta – 10⁴, o didžiausia jungimosi laisvoji energija ~ -23 kJ/mol 37°C temperatūroje.

3.2 lentelė. hCA III jungimosi su 17 slopiklių terminio poslinkio metodu gauti parametrai: laisvoji Gibso energija (ΔG_{vid}), jungimosi konstanta (K_b), disociacijos konstanta (K_d) (matavimų paklaida ~5%).

0				
Slopiklis	ΔG _{vid} (kJ/mol)	K _{b,vid} , M ⁻¹	$K_{d,vid}, \mu M$	Denatūracijos entalpija, kJ/
	· · ·	_		mol
TFMSA	-40.25	$1,13\cdot10^{7}$	0,0889	550
AZM	-29.30	1,36·10 ⁵	7,37	550
EZA	-29.30	1,36·10 ⁵	7,37	550
MZM	-29.63	$1,55 \cdot 10^5$	6,44	550
CARBS	>-23	$< 10^{4}$	>100	550
SAA	>-23	$< 10^{4}$	>100	550
VD5	>-23	$< 10^{4}$	>100	550
VD6	>-23	$< 10^{4}$	>100	550
VD9	>-23	$< 10^{4}$	>100	550
VD20	>-23	$< 10^{4}$	>100	550
VD65	>-23	$< 10^{4}$	>100	550
VD70	>-23	$< 10^{4}$	>100	550
VD78	>-23	$< 10^{4}$	>100	550
VD80	>-23	$< 10^{4}$	>100	550
VD81	>-23	$< 10^{4}$	>100	550
VD90	>-23	$< 10^{4}$	>100	550
VD94	>-23	$< 10^{4}$	>100	550





3.16 pav. hCA III lydymosi temperatūros (T_m) priklausomybė nuo slopiklio koncentracijos [L_t]. A pavaizduota jungimosi su TFMSA ir AZM, B pavaizduota jungimosi su EZA ir MZM kreivės.

3.5. Žmogaus karboanhidrazių I, II ir III jungimosi su slopikliais palyginimas

hCA III jungimosi su slopikliais gautus parametrus galima palyginti su hCA I ir II jungimosi parametrais nustatytais terminio poslinkio metodu (išmatuota Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijoje L. Baranauskienės, nepublikuoti duomenys). Jungimosi konstantos ir laisvosios energijos pokytis apibendrinti 3.3 lentelėje ir 3.17 pav.

	hCA I*		hCAII*		hCAIII	
Slopiklis	ΔG _{vid} , kJ/mol	$K_{b,vid}, M^{-1}$	ΔG _{vid} , kJ/mol	$K_{b,vid}, M^{-1}$	ΔG _{vid} , kJ/mol	K _b ,vid
VD5	-33,37	7,02·10 ⁵	-33,61	7,73·10 ⁵	> -23	< 10 ⁴
VD6	-32,68	5,31·10 ⁵	-32,74	$5,44 \cdot 10^5$	> -23	$< 10^{4}$
VD9	-38,42	$5,37 \cdot 10^{6}$	-37,65	$3,94 \cdot 10^{6}$	> -23	$< 10^{4}$
VD20	-33,19	6,52·10 ⁵	-33,49	7,38·10 ⁵	> -23	$< 10^{4}$
VD65	-34,98	$1,34.10^{6}$	-33,90	8,68·10 ⁵	> -23	$< 10^{4}$
VD70	-35,66	$1,77 \cdot 10^{6}$	-33,15	6,42·10 ⁵	> -23	$< 10^{4}$
VD78	-32,03	4,09.105	-41,02	$1,53 \cdot 10^7$	> -23	$< 10^{4}$
VD80	-32,50	4,93·10 ⁵	-32,44	4,82·10 ⁵	> -23	$< 10^{4}$
VD81	-30,51	2,21.105	-29,18	1,29.105	> -23	$< 10^{4}$
VD90	-35,64	$1,75 \cdot 10^{6}$	-33,26	6,72·10 ⁵	> -23	$< 10^{4}$
VD94	-35,20	$1,47.10^{6}$	-36,84	$2,85 \cdot 10^{6}$	> -23	$< 10^{4}$
AZM	-36,32	$2,30.10^{6}$	-36,14	$2,15 \cdot 10^{6}$	-29,30	1,36·10 ⁵
MZM	-43,32	3,88·10 ⁷	-37,44	$3,62 \cdot 10^{6}$	-29,63	1,55·10 ⁵
TFMSA	-46,07	$1,18.10^{8}$	-39,07	6,99·10 ⁶	-40,25	$1,13 \cdot 10^7$
CARBS	-33,08	6,24·10 ⁵	-32,34	4,63.105	> -23	$< 10^{4}$
EZA	-45,60	9,76·10 ⁷	-43,45	$4,09.10^{7}$	-29,30	1,36·10 ⁵

3.3 lentelė. hCA I, II, III jungimosi su slopikliais parametrai (paklaida ~5%).

* hCA I ir hCA II jungimosi duomenys, gauti terminio poslinkio metodu, Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijos nepublikuoti duomenys (L. Baranauskienės).

Matome, kad hCA I ir II labai panašios jungimosi konstantos daugelio slopiklių, kurių jungimasis įvairus: silpniau besijungiantis – VD81, K_b 1-2·10⁵; stipriau jungiasi VD5, VD6, VD20, VD80 ir CARBS – K_b 4-7·10⁵; stipriai jungiasi su VD9, VD90, VD94 ir EZA – K_b 1-5·10⁶. Visi minėti slopikliai nesijungia su hCA III, tik EZA slopiklis silpnai sąveikauja su šiuo baltymu, K_b 1,4·10⁵. Tačiau jo jungimasis yra kur kas stipresnis su hCA I ir hCA II: lyginant K_b vertes I ir II izofermentų atveju ji yra 2-3 eilėmis didesnė negu hCA III išmatuota K_b vertė.



3.17 pav. Jungimosi konstantų (A) ir laisvųjų energijų pokyčių (B) palyginimas trijų hCA izofermentų (I, II, III) su 16 slopiklių (hCA I ir hCA II jungimosi duomenys, gauti terminio poslinkio metodu, Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijos nepublikuoti L. Baranauskienės duomenys).

Kiti tirti slopikliai yra specifiškesni tam tikrai tirtai hCA izoformai. hCA I jungimosi konstanta su MZM yra viena eile didesnė negu hCA II ir net trim eilėm didesnė negu hCA III.

Tačiau TFMSA atveju, hCA I jungimosi konstanta yra tik viena eile didesnė negu hCA II ir hCA III, kurios panašiai jungiasi su šiuo slopikliu. hCA III atveju TFMSA yra geriausias slopiklis, tai gali būti susiję su jos aktyvaus centro struktūra, kadangi šalia Zn(II) 7,1 Å atstumu ir šalia įėjimo į aktyvų centrą išsidėstęs Phe198 benzeno žiedas (Duda *et al.*, 2005), kuris yra barjeras jungiantis didelę hidrofobinę grupę turintiems sulfonamidiniams slopikliams, bet netrukdo prisijungti mažą hidrofobinę dalį turintiems sulfonamidams, kaip pavyzdžiui TFMSA atveju trifluormetilo grupė.

Todėl MZM yra specifiškesnis hCA I, tačiau gana stipriai jungiasi ir su hCA II, o TFMSA nespecifiškai ir stipriai jungiasi prie visų trijų tirtų karboanhidrazių, tai susiję su jo struktūrą: nedidelė molekulė (3.7 pav.), todėl gali lengvai įlysti į aktyvų centrą ir prisijungti prie Zn(II). Šių trijų hCA izoformų aktyvaus centro struktūrinius ypatumus aptariami 3.7. skyrelyje.

hCA II jungimosi konstanta su VD78 dviem eilėm didesnė negu hCA I. Šis slopiklis yra specifiškesnis būtent šiam baltymui iš tirtų hCA, jo K_b 1,5·10⁷, nes silpniau jungiasi su hCA I (K_b 4,1·10⁵) ir nesijungia su hCA III (3.3 lentelė ir 3.17 pav.).

Šie rezultatai rodo, kad nors ir hCA I, II ir III tretinės struktūros ir sekos yra panašios, tačiau būtent aktyvaus centro sandaros skirtumai yra esminiai jų jungimuisi su slopikliais. Todėl modeliuojant slopiklius aktyviajame centre galima palyginti gautus jungimosi rezultatus su aktyvių centrų struktūros ypatumais.

3.6. hCA III jungimosi su TFMSA matavimas izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu ir palyginimas su hCA I ir II

Pilnam supratimui ligando jungimosi su baltymu neužtenka nustatyti tik jungimosi konstantą, o iš jos apskaičiuoti laisvosios energijos pokytį. Svarbu nustatyti reakcijos metu išsiskyrusį šilumos kiekį, t.y. entalpijos pokytį, esant tam tikrai temperatūrai. Žinant indelį entalpijos ir entropijos laisvosios energijos pokyčiui, galima įvertinti šios sąveikos šaltinį (Ladbury *et al.*, 2004).

Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu buvo išmatuotas hCA III jungimasis su TFMSA 20 mM Mes pH 6,5, 50 mM Na₂SO₄ 0,2 mM DTT buferyje. Į tirpalą dedama reduktoriaus (DTT), kadangi, kaip minėta, hCA III savo paviršiuje turi 5 Cys liekanas, kurios gali oksiduotis ir todėl baltymas yra nestabilus.



B

3.18 pav. hCA III jungimosi su TFMSA izoterminio titravimo metodu gauti pirminiai duomenys (A, raudona linija pažymėta bazinė linija) ir suintegruota kreivė (B, taškai atitinka eksperimentinius rezultatus, kurie aproksimuojami teorine kreive (6) – pažymėta mėlyna kreive).

Izoterminio titravimo kalorimetrijos gauti rezultatai pateikti 3.4 lentelėje. Buvo matuojamas išsiskyrusios šilumos kiekis titruojant baltymą slopikliu. Slopiklio koncentracija parinkta tokia, kad visi baltymo molekulių aktyvieji centrai būtų įsotinti maždaug eksperimento viduryje, tuomet galima išmatuoti ne tik jungimosi šilumą, bet ir skiedimosi, kuri yra atmetama. Todėl buvo parinktas baltymo ir slopiklio koncentracijų santykis 1:5, kadangi žinoma, kad baltymo su Zn yra tik 46%. O baltymo koncentracija parenkama tokia,

kad *C* parametras būtų tarp 10 ir 100. Kadangi terminio poslinkio metodu nustatyta jungimosi konstanta ~10⁷, todėl koncentracija parenkama 20 μ M (vėlgi dėl 46% baltymo su Zn).

Buvo problematiška išmatuoti išsiskyrusios šilumos kiekį hCA III ir TFMSA jungimosi metu, kadangi eksperimentas buvo atliekamas 25° C temperatūroje, o baltymas nėra stabilus tokioje temperatūroje netgi esant 2 mM DTT koncentracijai. Buvo bandoma surasti optimalią DTT koncentracija, kuriai esant galėtų nusistovėti tiesi bazinė linija. Esant 2 mM DTT koncentracijai, bazinė linija nenusistovėdavo tiesi, kadangi vyko oksidacijos – redukcijos reakcija tarp DTT ir vandenyje ištirpusio ir oro deguonies. Sumažinus koncentraciją DTT iki 0,2 mM tiesi bazinė linija nusistovėdavo per 2 val. Kaip matome 3.18 paveiksle eksperimento metu bazinė linija nukrypdavo po kiekvienos injekcijos, tai gali būti susiję su DTT, kadangi švirkšte esanti tirpalas nekontaktuoja su oro deguonimi. Be to, dėl mažesnės DTT koncentracijos, 260 aps./min. maišymo ir gana ilgo eksperimento (trukdavo apie 4 val.) dalis baltymo galėjo denatūruoti eksperimento metu, todėl stoichiometrija nevisiškai atitinka baltymo dalies su Zn (II), kiek išmatuota Zn analizės metu: ITK metodu išmatuota – 0,28 ± 0,09, o Zn analizės metu nustatyta baltymo dalis su Zn(II) – 0,46.

3.4 lentelė. hCA III jungimosi su TFMSA išmatuoti parametrai ITK metodu 25°C temperatūroje, pH 6,5 iš 3 pakartojimų.

Parametras	Išmatuota vertė
n	$0,28 \pm 0,09$
K _b , M ⁻¹	$2,06 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^6$
ΔG , kJ/mol	$-35,9 \pm 1,3$
ΔH , kJ/mol	$-11,1 \pm 4,2$
-TΔS, kJ/mol	$-24,8 \pm 2,9$
$\Delta S. J/mol \cdot K$	83.2 ± 10.0





3.19 paveiksle pavaizduota hCA III jungimosi su TFMSA laisvosios energijos pokyčiui entropinis ir entalpinis indėlis. Nedidelis entalpijos pokytis rodo, kad jungimosi metu nesusidaro palanki sąveika (vandenilinės jungtys, van der Valso sąveika) tarp slopiklio ir baltymo molekulės. Didelį entropinį indelį lemia palankesnis tirpiklio molekulių

persitvarkymas po sąveikos. Numanoma, kad tirpiklio molekulės aktyviajame centre yra tvarkingai išsidėsčiusios (jų entropija yra neigiama), o sąveikos metu dalis jų išstumiamos iš aktyvaus centro.

Galima palyginti gautus rezultatus su hCA I ir II jungimusi su TFMSA (3.5 lentelė ir 3.20 pav.). hCA I ir II jungimasis panašus: laisvosios Gibso energijos pokyčiai panašūs, bet kiek skiriasi entalpinis ir entropinis indeliai. hCA I atveju entropinis pokytis yra nepalankus, bet jis kompensuojamas sąveika tarp baltymo ir slopiklio. hCA II atveju entalpinis ir entropinis indėlis yra palankūs, tačiau dominuoja sąveika tarp slopiklio ir baltymo. O hCA III jungimasis yra silpnesnis (laisvosios energijos pokytis mažesnis) ir kas svarbu, skiriasi entropijos ir entalpijos indėlis jungimuisi. hCA III atveju jungimuisi didžiausias indėlis yra entropinis, t.y. tirpiklio molekulių palankus persiorientavimas, o hCA I ir II atveju atvirkščiai didžiausias indelis yra entalpinis, vadinasi sąveikoje dominuoja vandeniliniai ryšiai, van der Valso sąveika.

3.5 lentelė. hCA I , II (išskirtos iš eritrocitų) ir rekombinantinės hCA III jungimosi su TFMSA parametrai 25°C temperatūroje, pH 6,5.

	hCA I*	hCA II*	hCA III	
$\Delta G, kJ/mol$	-42,41	-46,37	-36,04	
ΔH , kJ/mol	-48,57	-40,34	-11,12	
-T∆S, kJ/mol	6,164	-6,03	-24,91	
[*] Nepublikuoti dr. D. Matulio duomenys.				



3.20 pav. Žmogaus karboanhidrazės I, II ir III jungimosi su TFMSA entalpijos ir entropijos indeliai laisvajai energijai (hCA I ir II – nepublikuoti dr. D. Matulio duomenys).

3.7. hCA III struktūrų palyginimas su hCA I bei II ir slopiklių modeliavimas hCA III aktyviajame centre

hCA I, II ir III erdvinės struktūros tirtų yra labai panašios. Tačiau aktyviojo centro struktūra turi esminių skirtumų, kurie ir lemia tokius skirtingą slopiklių jungimąsi su baltymais.

Tirtosios karboanhidrazės yra citozoliniai fermentai. Sulyginus trijų citozolinių CA amino rūgščių sekas pasirodė, kad hCA III sekos panašumas su h CA I yra 55%, o su hCA II -58% (Nishimori et al., 2007b), o hCA I su hCA II turi 60% sekos panašumo (Hewett-Emmett ir Tashian, 1996). hCA II ir hCA III yra 24 konservatyvios amino rūgštys. Šie izofermentai vra didžiausio ir mažiausio aktyvumo CO2 hidratacijos tarp visų žinduolių CA (Supuran ir Scozzafava, 2007). Iš šių amino rūgščių 18 sudaro vandenilinių jungčių tinklą aktyviame centre, būtinų baltymo surišimui su substratu arba su slopikliu (Casini et al., 2003; Simone et al., 2005). 15 iš jų yra konservatyvios hCA III ir hCA II. Ir iš nesutampančių 3-jų amino rūgščių, dvi yra ypač svarbios katalizei (tai būtų 64 padėtyje hCA I ir hCA II yra His, o hCA III – Lys, ir 198 padėtyje hCA I ir hCA II yra Leu, o hCA III – Phe). His64 yra labai svarbus protonų šaudyklei katalitiškai aktyviose CA izofermentuose (CA I, II, IV, VII, IX, XII, XIII ir XIV) (Casini et al., 2003; Simone et al., 2005; Supuran ir Scozzafava, 2007), pagerinanti protono pernešima nuo prie Zn(II) prisijungusio vandens aktyviajame centre į terpę, susidarant nukleofilui (šis etapas yra visos CO₂ hidratacijos reakcijos greitį limituojanti stadija). CA III Lys64 yra mažiau efektyvus protono perdavime lyginant su His dėl didesnio pK_a (Lys ε -NH₂ pKa yra 9, o His imidazolo žiedo – 7) (Supuran *et al.*, 2003). Kita vertus amino rūgštis, esanti 198 padėtyje, yra išsidėsčiusi pačiame viduryje aktyvaus centro (Duda et al., 2005). Kai ji yra santykinai mažas Leu (hCA I ir hCA II atveju) aktyviajame centre yra pakankamai vietos prisijungti slopikliams/aktyvatoriams, kaip rodo rentgeno spindulių difrakcijos kristalografinė analizė. O didelis Phe benzeno žiedas yra erdvinis trukdis CA III aktyviajame centre tikriausiai trukdantis daugumos slopiklių jungimuisi. Dėl šių dviejų faktorių CA III pasižymi labai mažu katalitiniu aktyvumu lyginant su CA II ir CA I bei mažai slopinamas dauguma sulfonamidinių slopiklių (Supuran ir Scozzafava, 2007).

Šie struktūriniai skirtumai gali turėti įtakos tirtų baltymų jungimuisi su ligandais. Todėl buvo sulygintos šių baltymų struktūros, gautos rentgeno spindulių difrakcijos kristalografinės analizės būdu. Erdviškai struktūros labai panašios, tačiau esminiai skirtumai yra fermentų aktyviuosiuose centruose. 3.21 pav. pavaizduota hCA I, II ir III aktyvių centrų kišenės. hCA I ir II labai panašūs aktyvių centrų įėjimai, o hCA III akivaizdžiai mažesnis.



3.21 pav. Aktyvių centrų paviršiaus palyginimas: A – hCA I (1hcb.pdb); B – hCA II (1ca2.pdb); C – hCA III (1z93.pdb).



3.22 pav. Aktyvaus centro palyginimas hCA III su I ir II. A – hCA I (1hcb.pdb) pažymėta žaliai ir hCA III (1z93.pdb) pažymėta melsvai; B – hCA II (1ca2.pdb) – geltonai ir hCA III – melsvai. Bendros amino rūgštys pažymėtos juodai.



3.23 pav. hCA III molekulė (1z93.pdb). Šalia aktyvaus centro pavaizduotas Phe198 melsvai.

3.22 paveiksle yra palyginta hCA I ir III (A) bei hCA II ir III (B) aktyvių centrų struktūra. Abiem atvejais pagrindinis skirtumas yra 198 padėtyje esanti amino rūgštis, hCA I

ir II atveju – Leu, o hCA III atveju – Phe. Fenilalanino benzeno žiedas yra didelis lyginant su leucino amino rūgšties liekana, be to jis yra išsidėstęs šalia aktyvaus centro įėjimo (3.23 pav.). Todėl tai svarbus struktūros skirtumas, kuris lemia tokius skirtingus rezultatus jungiantis slopikliams. hCA I aktyviajame cente 200 padėtyje yra His, o hCA II ir III šioje padėtyje turi treoniną. Tačiau jis yra išsidėstęs giliau aktyvaus centro kišenėje ir nėra toks didelis barjeras prisijungti slopikliams, ką ir rodo gauti slopiklių jungimosi rezultatai.

Prie žmogaus karboanhidrazės III stipriausiai besijungiantis slopiklis iš tirtųjų yra TFMSA. Pabandyta pamodeliuoti TFMSA molekulę hCA III aktyviajame centre, kadangi rentgeno spindulių difrakcijos kristalografinės analizės metodu nėra nustatyta hCA III su TFMSA struktūra. 3.24 paveiksle pavaizduota sumodeliuota hCA III su TFMSA ir hCA II su TFMSA nustatyta rentgeno spindulių difrakcijos kristalografinės analizės metodu struktūra. TFMSA jungiasi prie Zn(II) jono ir sudaro tetraedrinę geometriją kartu su jį koordinuojančiais His imidazolo žiedais. 3.24 paveiksle pavaizduoti sumodeliuota hCA III aktyviajame centre TFMSA, sumodeliuoti kampai yra artimi hCA II su TFMSA sudaromiems kampams. hCA III atstumas nuo sulfonamidinės grupės iki Zn(II) yra mažesnis negu hCA II atveju. O kampas tarp TFMSA azoto ir Zn(II) jono taip pat artimas TFMSA prisijungusio prie Zn(II) hCA II aktyviajame centre.



3.24 pav. Tetraedriniai kampai: A - hCA III (1z93.pdb) sumodeliuota struktūra su TFMSA (paimta iš 1bcd.pdb); B – hCA II su TFMSA rentgeno spindulių difrakcijos kristalografinės analizės metodu gauta struktūra (1bcd.pdb). C ir D – kampas tarp TFMSA ir Zn(II) atitinkamai sumodeliuota hCA III aktyviajame centre ir hCA II nustatyta kristalografinės analizės metodu (1bcd.pdb).

Sumodeliuotoje struktūroje hCA III aktyviajame centre TFMSA išsidėsto taip, kad nuo Phe198 benzeno žiedo iki TFMSA fluoro 3,12 Å, tai didesnis atstumas negu van der Valso spindulių suma – 3,05 Å (trigonalinės C spindulys 1,7 Å ir fluoro 1,35 Å). Atstumas nuo sulfonamidinės grupės deguonies iki Phe198 metilen grupės yra 3,04 Å. Tai kiek mažesnis atstumas negu van der Valso spindulius 3,4 Å. Be to TFMSA molekulės sumodeliutoje struktūroje atstumai nuo deguonies (sulfonamidinėje grupėje) ir Thr199 pepdidinės jungties N yra 2,93 Å, optimalus vandenilinio ryšio atstumas O…H-N yra 2,9-3,0 Å (Daune, 1999). Bet atstumas nuo sulfonamidinės grupės amino yra 2,75 Å, tai jau per mažas atstumas. Tačiau baltymo molekulė nėra statiška, galimi tam tikri nedideli konformaciniai pokyčiai aktyviajame centre.

3.6 lentelė. Van der Valso spinduliai (Å) įvairių atomų (duomenys iš Daune, 1999).

Atomas	Van der Valso spindulys (Å)	Atomas	Van der Valso spindulys (Å)
Tetraedrinė C	2,0	Tedtraedrinis N	2,0
Trigonalinė C	1,7	Trigonalinis N	1,7
O (C=O)	1,4	Dvivalentė S	1,85
O (OH)	1,6	S (SH)	2,0
O (COOH)	1,5	F	1,35
		Н	0,9





Taip pat buvo sumodeliuota hCA III aktyviajame centre vienas iš Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje susintetintas sulfonamidinis slopiklis – VD65 (3.26 pav.). hCA III aktyviajame centre buvo sumodeliuota taip, kad būtų optimalūs tetraedriniai kampai tarp VD65 sulfonamidinio azoto ir His imidazolo žiedų koordinuojamo Zn(II). Sumodeliuotoje struktūroje labai arti išsidėsčiusi slopiklio molekulė šalia Phe198 benzeno žiedo. Atstumas tarp Phe ir VD65 trigonalinių anglių (aromatinių žiedų) yra 2,06 Å, o turėtų būti pagal van der Valso spindulius mažiausiai 3,4 Å. Taip par ir atstumas iki trigonalinio azoto yra per mažas – 2,56 Å, o turėtų būti mažiausiai 3,4 Å (trigonalinio azoto van der Valso spindulys 1,7 Å, kaip

ir trigonalinės anglies). Atstumas nuo sulfonamidinės grupės deguonies iki VD65 trigonalinės anglies yra 2,34 Å, o van der Valso spindulių suma yra 3,1 Å, tai vėlgi nepakankamas atstumas. Todėl matome, kad ši mokekulė erdviškai netelpa hCA III aktyviajame centre, kas koreliuoja su gautais jungimosi su slopikliais rezultatais.



3.26 pav. hCA III (1z93.pdb) sumodeliuotos struktūros su VD65 atstumai iki aktyvaus centro amino rūgščių liekanų (A) ir tetraedro kampai (B).

3.8. Atliktų darbų trumpa apžvalga

Žmogaus karboanhidrazė III ekspresuota *E. coli* ir išgryninta. Buvo atliktas stabilumo įvertinimas esant įvairiems reagentams ir panaudota jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais tyrimams.

hCA III jungimasis su sulfonamidiniais slopikliais skiriasi nuo hCA I ir II. Tai susiję su aktyvaus centro struktūriniais skirtumais. Terminio poslinkio metodu gauti rezultatai rodo, kad hCA III silpnai (su EZA, AZM ir MZM) arba visai nesijungia (su CARBS, SAA ir VD junginiais) su sulfonamidiniais slopikliais turinčiais didelę šoninę grupę. hCA I ir II labai gerai jungiasi su minėtais slopikliais.

hCA I, II ir III jungimosi su TFMSA nustatyti termodinaminiai parametrai yra gana skirtingi. Manoma, kad tai vėlgi gali būti susiję su aktyvių centrų struktūros skirtumais. hCA III jungimuisi su TFMSA didžiausias indėlis yra entropinis. Tai gali būti susiję su mažesniu aktyviu centru ir entropiškai nenaudingai išsidėsčiusių vandens molekulių išstūmimu iš aktyvaus centro. Entalpijos pokytis jungimosi metu yra santykinai mažas, nes, manoma, kad nesusidaro stipri sąveika tarp baltymo ir slopiklio molekulių. hCA I ir II atveju, atvirkščiai, didžiausias indėlis yra entalpinis.

Sulyginus hCA I, II ir III aktyvių centrų struktūras nustatėme, kad pagrindinis skirtumas yra 198 padėtyje esanti amino rūgštis: hCA I ir II atveju – leucinas, o hCA III – fenilalaninas. Sumodeliavus TFMSA ir VD65 hCA III aktyviajame centre, akivaizdu, kad pagrindinis barjeras prisijungti slopikliams, turintiems didesnę šoninę grupę, yra Phe198 hCA III aktyviajame centre, išsidėstęs šalia aktyvaus cento įėjimo.

Šie rezultatai rodo, kad norint rasti tokius sulfonamidinius slopklius, kurie stipriai slopintų hCA III jie turi turėti nedidelę šoninę grupę, tačiau tikėtina, kad jie slopins ir kitas CA izoformas. Todėl reikalingi tolimesni tyrimai, norint rasti labai specifiškus slopiklius būtent šiam izofermentui. O tam tikrai CA izoformai specifiški slopikliai, kurie neslopina hCA III, turėtų, atvirkščiai, turėti didelę šoninę grupę.

IŠVADOS

- 1. Terminio poslinkio metodu nustatyta jungimasis su sulfonamidiniais slopikliais tendencija: stipriausiai jungiasi TFMSA (K_b 1,1·10⁷), silpniau EZA, AZM ir MZM ($K_b \sim 1,4\cdot10^5$ -1,6·10⁵). Nebuvo aptiktas jungimasis su VD junginiais bei SAA ir CARBS šiuo metodu. Tirtų sulfonamidinių slopiklių savitumas hCA III aktyviajam centrui išsidėsto tokia eile: TFMSA > MZM, AZM, EZA > VD junginiai.
- hCA I ir II su TFMSA jungimasis panašus kaip ir hCA III. Tačiau jos kur kas stipriau jungiasi su kitais tirtais slopikliais: su MZM, EZA ir AZM K_b 2·10⁶ 1·10⁸; su VD junginiais 5·10⁵ 2·10⁷.
- Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu nustatyta hCA III jungimosi su TFMSA termodinaminiai parametrai: ΔG ~ -36 kJ/mol, ΔH ~ -11 kJ/mol, ΔS ~83 J/mol·K. Jungimosi laisvosios energijos pokytį lemia daugiausia palankus didelis entropinis pokytis, kiek mažiau palankus entalpinis pokytis.
- hCA I ir II jungimosi su TFMSA laisvoji energija yra didesnė atitinkamai -42 ir -46 kJ/mol, tačiau jungimosi entropijos pokytis yra kur kas didesnis negu hCA III: ~ -49 ir ~ -40 kJ/mol. hCA I ir II jungimosi laisvosios energijos pokytį lemia palankus entalpinis pokytis.
- 5. Sumodeliavus hCA III aktyviajame centre TFMSA ir VD65, matoma, kad dižiausias erdvinis trukdis jungiantis sulfonamidiniams slopikliams yra Phe198 benzeno žiedas.
- Gauti rezultatai rodo, kad didesni slopikliai stipriai veikiantys hCA I ir II, silpnai veikia hCA III aktyvumą, o tai svarbu kuriant slopiklius specifiškus CA izoformoms.

7. VILNIUS UNIVERSITY

FACULTY OF CHEMISTRY DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

Lina Malinauskaitė

PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN CARBONIC ANHYDRASE III AND A STUDY OF SULFONAMIDE INHIBITORS BINDING

Bachelor thesis

Summary

Carbonic anhydrases are widely-spread enzymes that catalyze a reversible carbon dioxide hydration. Human carbonic anhydrases play important roles in various physiological processes and pathologies. The specific inhibition of their function by sulfonamide inhibitors can be used in therapy of certain human diseases, such as epilepsy and glaucoma.

Human carbonic anhydrase III (hCA III) is a slowest catalyst among 15 human carbonic anhydrases. It is present in slowly skeletal muscle, liver and adipocytes. In this study we prepared recombinant hCA III and determined the thermodynamics of interaction between hCA III and 17 sulfonamides derivates by thermal shift assay and isothermal titration calorimetry. hCA III was resistant to all sulfonamide derivates synthesized in Laboratory of Biothermodynamics and Drug Design as well as sulfanilamide and 4-carboxybenzene sulfonamide. It was weakly inhibited by ethoxzolamide, methazolamide and acetazolamide, but strongly by the smallest inhibitor trifluoromethanesulfonamide. It is likely, that those inhibitor-binding tendencies depend on a relatively large residue of Phe198, situated in the cavity of the active site.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo bakalaurinio darbo vadovams dr. J. Matulienei ir dr. D. Matuliui už suteiktas žinias, pastabas ir labai naudingus patarimus; Biotermidinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijos darbuotojams: L. Baranauskienei už naudingus patarimus atliekant termodinaminius tyrimus, V. Michailovienei už pagalbą atliekant baltymų gryninimo darbus ir naudingus patarimus. Be to, dėkoju visam Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų laboratorijos kolektyvui už naudingus patarimus ir palaikymą rašant šį darbą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- 1. Alber BE, and Ferry JG. A carbonic anhydrase from the archaeon Methanosarcina thermophila. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:6909-13.
- 2. Alver A, Ucar F, Keha EE, Kalay E, and Ovali E. Effects of leptin and insulin on CA III expression in rat adipose tissue. J Enzyme Inhib Med Chem 2004;19:279-81.
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K (eds.) (1997). Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons: New York.
- Casini A, Antel J, Abbate F, Scozzafava A, David S, Waldeck H, Schafer S, and Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II and IV. Bioorg Med Chem Lett 2003;13:841-5.
- Chirica LC, Elleby B, and Lindskog S. Cloning, expression and some properties of alphacarbonic anhydrase from Helicobacter pylori. Biochim Biophys Acta 2001;1544:55-63.
- Coligan JE, Dunn BM, L. PH, W. SD, and T. WP. (2000). Current protocols in protein science. John Wiley & Sons: New York.
- Cox EH, McLendon GL, Morel FMM, Lane TW, Prince RC, Pickering IJ, and George GN. The Active Site Structure of Thalassiosira weissflogii Carbonic Anhydrase 1. Biochemistry 2000;39:12128-30.
- Daune M. (1999). Molecular biophysics: structures in motion. Oxford University Press: Oxford.
- Diwu Z, Lu Y, Zlang C, Klaubert DH, and Huagland RP. Fluorescent Molecular Probes and Use of Fluorescent Solvatochromic Dapoxyl Dyes. Photochemistry and Photobiology 1997;66:424-31.
- Duda DM, Tu C, Fisher SZ, An H, Yoshioka C, Govindasamy L, Laipis PJ, Agbandje-McKenna M, Silverman DN, and McKenna R. Human carbonic anhydrase III: structural and kinetic study of catalysis and proton transfer. Biochemistry 2005;44:10046-53.
- Elder I, Fisher Z, Laipis PJ, Tu C, McKenna R, and Silverman DN. Structural and kinetic analysis of proton shuttle residues in the active site of human carbonic anhydrase III. Proteins 2007;68:337-43.
- 12. Esbaugh AJ, and Tufts BL. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. Respir Physiol Neurobiol 2006;154:185-98.

- 13. Fisher Z, Hernandez Prada JA, Tu C, Duda D, Yoshioka C, An H, Govindasamy L, Silverman DN, and McKenna R. Structural and kinetic characterization of active-site histidine as a proton shuttle in catalysis by human carbonic anhydrase II. Biochemistry 2005;44:1097-105.
- Freyer MW, and Lewis EA. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. Methods Cell Biol 2008;84:79-113.
- 15. Hewett-Emmett D, and Tashian RE. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. Mol Phylogenet Evol 1996;5:50-77.
- 16. Hilvo M, Tolvanen M, Clark A, Shen B, Shah GN, Waheed A, Halmi P, Hanninen M, Hamalainen JM, Vihinen M, Sly WS, and Parkkila S. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. Biochem J 2005;392:83-92.
- 17. Iverson TM, Alber BE, Kisker C, Ferry JG, and Rees DC. A closer look at the active site of gamma-class carbonic anhydrases: high-resolution crystallographic studies of the carbonic anhydrase from Methanosarcina thermophila. Biochemistry 2000;39:9222-31.
- Yamamoto T, Kikkawa R, Yamada H, and Horii I. Investigation of proteomic biomarkers in in vivo hepatotoxicity study of rat liver: toxicity differentiation in hepatotoxicants. J Toxicol Sci 2006;31:49-60.
- Keilin D, and Mann T. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. Biochem J 1940;34:1163-76.
- 20. Kim G, and Levine RL. Molecular determinants of S-glutathionylation of carbonic anhydrase 3. Antioxid Redox Signal 2005;7:849-54.
- 21. Kimber MS, and Pai EF. The active site architecture of Pisum sativum beta-carbonic anhydrase is a mirror image of that of alpha-carbonic anhydrases. Embo J 2000;19:1407-18.
- 22. Kisker C, Schindelin H, Alber BE, Ferry JG, and Rees DC. A left-hand beta-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon Methanosarcina thermophila. Embo J 1996;15:2323-30.
- Kivela AJ, Kivela J, Saarnio J, and Parkkila S. Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours. World. J. Gastroenterol. 2005;11:155-63.

- 24. Krishnamurthy VM, Kaufman GK, Urbach AR, Gitlin I, Gudiksen KL, Weibel DB, and Whitesides GM. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. Chem Rev 2008;108:946-1051.
- 25. Ladbury JE, Doyle ML, and Doyle MLB. (2004). Biocalorimetry 2: applications of calorimetry in the biological sciences. John Wiley: Chichester.
- 26. Lane TW, and Morel FM. A biological function for cadmium in marine diatoms. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:4627-31.
- 27. Li L, and Falany CN. Elevated hepatic SULT1E1 activity in mouse models of cystic fibrosis alters the regulation of estrogen responsive proteins. J Cyst Fibros 2007;6:23-30.
- 28. Liljas A, Hakansson K, Jonsson BH, and Xue Y. Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. Recent crystallographic analyses. Eur J Biochem 1994;219:1-10.
- 29. Liljas A, and Laurberg M. A wheel invented three times. The molecular structures of the three carbonic anhydrases. EMBO Rep. 2000;1:16-7.
- 30. Lindskog S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. Pharmacol Ther 1997;74:1-20.
- 31. Liu M, Walter GA, Pathare NC, Forster RE, and Vandenborne K. A quantitative study of bioenergetics in skeletal muscle lacking carbonic anhydrase III using 31P magnetic resonance spectroscopy. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:371-6.
- Matulis D, Kranz JK, Salemme FR, and Todd MJ. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. Biochemistry 2005;44:5258-66.
- 33. Mitsuhashi S, Mizushima T, Yamashita E, Yamamoto M, Kumasaka T, Moriyama H, Ueki T, Miyachi S, and Tsukihara T. X-ray structure of beta-carbonic anhydrase from the red alga, Porphyridium purpureum, reveals a novel catalytic site for CO(2) hydration. J Biol Chem 2000;275:5521-6.
- 34. Nishimori I, Minakuchi T, Kohsaki T, Onishi S, Takeuchi H, Vullo D, Scozzafava A, and Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: the beta-carbonic anhydrase from Helicobacter pylori is a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. Bioorg Med Chem Lett 2007a;17:3585-94.
- 35. Nishimori I, Minakuchi T, Onishi S, Vullo D, Cecchi A, Scozzafava A, and Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: cloning, characterization, and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with sulfonamides. Bioorg Med Chem 2007b;15:7229-36.

- 36. Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H, Shah GN, Grubb JH, Waheed A, and Sly WS. Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:1918-23.
- Pastorekova S, Parkkila S, Pastorek J, and Supuran CT. Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2004;19:199-229.
- 38. Perozzo R, Folkers G, and Scapozza L. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. J Recept Signal Transduct Res 2004;24:1-52.
- Raisanen SR, Lehenkari P, Tasanen M, Rahkila P, Harkonen PL, and Vaananen HK. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. Faseb J 1999;13:513-22.
- 40. Sambrook J, Russell DW, and Sambrook JMc. (2006). The condensed protocols from Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.
- 41. Scozzafava A, Mastrolorenzo A, and Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. Expert Opin Ther Patents 2006;16:1627-64.
- 42. Simone GD, Fiore AD, Menchise V, Pedone C, Antel J, Casini A, Scozzafava A, Wurl M, and Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Zonisamide is an effective inhibitor of the cytosolic isozyme II and mitochondrial isozyme V: solution and X-ray crystallographic studies. Bioorg Med Chem Lett 2005;15:2315-20.
- 43. Smith KS, Jakubzick C, Whittam TS, and Ferry JG. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:15184-9.
- 44. Steponėnienė L, Tautkus S, and Kazlauskas R. Determination of zinc in plants and grains by atomic absorption spectrometry. Chemija 2003;2:99-102.
- 45. Supuran CT, and Scozzafava A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. Bioorg Med Chem 2007;15:4336-50.
- 46. Supuran CT, Scozzafava A, and Casini A. Carbonic anhydrase inhibitors. Med Res Rev 2003;23:146-89.
- 47. Svastova E, Hulikova A, Rafajova M, Zat'ovicova M, Gibadulinova A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, and Pastorekova S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. FEBS Lett 2004;577:439-45.
- 48. Thiry A, Dogne JM, Masereel B, and Supuran CT. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. Trends. Pharmacol. Sci. 2006;27:566-73.

- 49. Tripp BC, Smith K, and Ferry JG. Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. J Biol Chem 2001;276:48615-8.
- 50. Wistrand PJ. Carbonic anhydrase III in liver and muscle of male rats purification and properties. Ups J Med Sci 2002;107:77-88.
- 51. Zimmerman UJ, Wang P, Zhang X, Bogdanovich S, and Forster R. Anti-oxidative response of carbonic anhydrase III in skeletal muscle. IUBMB Life 2004;56:343-7.

PRIEDAS



68



1 pav. hCA III lydymosi temperatūros (T_m) priklausomybė nuo slopiklio koncentracijos [L_t] su skirtingais slopikliais (A –CARBS ir SAA, B – VD5 ir VD6, C – VD9 ir VD20, D – VD65 ir VD70, E – VD78 ir VD80, F – VD81, VD 90 ir VD 94).