

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra

Biochemijos studijų programos magistrantė

Aistė KASILIAUSKAITĖ

Magistrinis darbas

**Mitochondrinės karboanhidrazės VB klonavimas,
ekspresija, gryninimas bei jungimosi su slopikliais tyrimas**

Darbo vadovas
Dr. Daumantas Matulis

Vilnius 2013

Mitochondrinės karboanhidrazės VB klonavimas, ekspresija, gryninimas bei jungimosi su slopikliais tyrimas

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje

Aistė KASILIAUSKAITĖ

Darbo vadovas:

Dr. Daumantas MATULIS

Konsultantai:

Vilma Michailovienė

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
1.1 KARBOANHIDRAZIŲ APŽVALGA	8
1.1.1 Bendra karboanhidrazių apžvalga	8
1.1.2 Žmogaus karboanhidrazės, jų struktūra	8
1.1.3 Žmogaus karboanhidrazių VA ir VB apžvalga.....	11
1.1.4 Karboanhidrazės – vaistų kūrimo taikiny.....	15
1.2 TERMODINAMIKOS TAIKYMAS BALTYMŲ TYRIMAMS	17
1.2.1 Baltymų ir ligandų sąveikos termodinamika	17
1.2.2 Termodinaminiai metodai vaistų kūrime	18
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	20
2.1 MEDŽIAGOS, RINKINIAI, TERPĖS, BUFERINIAI TIRPALAI IR KITOS NAUDOTOS PRIEMONĖS.....	20
2.2 METODAI	23
2.2.1 Klonavimas, ekspresija, gryninimas	23
2.2.2 Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodas.....	26
2.2.3 Terminio poslinkio metodas	27
2.2.4 Aktyvumo matavimas sustabdytos tėkmės metodu	28
2.2.5 Duomenų apdorojimas, statistinė analizė.....	28
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	30
3.1 CA VB GENETINIŲ KONSTRUKCIJŲ KŪRIMAS, EKSPRESIJA IR GRYNINIMAS	30
3.2 FERMENTINIO AKTYVUMO NUSTATYMAS SUSTABDYTOS TĖKMĖS METODU.....	36
3.3 BALTYMO STABILUMO ĮVERTINIMAS.....	37
3.4 CA VB SĄVEIKOS SU SLOPIKLAIS TYRIMAS TAIKANT TERMINIO POSLINKIO METODĄ	40
3.4 CA VB AKTYVIAJAME CENTRE ESANČIO HIDROKSIDO JONO pK_a REIŠMĖS NUSTATYMAS.....	43
3.5 CA VB JUNGIMOSI SU SULFONAMIDINIŲ SLOPIKLIU MATAVIMAS TAIKANT IZOTERMINIO TITRAVIMO KALORIMETRIJĄ.....	45
IŠVADOS	50
SUMMARY	51
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	52

Santrumpos

ANS	1,8-anilinonaftaleno sulfonatas
APS	Amonio persulfatas
AZM	Acetazolamidas (N-[5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il] acetamidas)
BHI	Mitybinė terpė (<i>angl.</i> Brain Heart Infusion)
CA	Karboanhidrazė (<i>angl.</i> Carbonic Anhydrase)
DMSO	Dimetilsulfoksidas
dNTP	Deoksiribonukleotidas
EDTA	Etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska
EZA	Etokzolamidas (6-etoksi-2-benzotiazolsulfonamidas)
G	Laisvoji Gibso energija
H	Entalpija
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfoninė rūgštis
IC_{50}	Fermento slopinimo rodiklis, tokia slopiklio koncentracija, kuriai esant 50% aktyvumo yra užslopinta
IPTG	Izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas
ITK	Izoterminio titravimo kalorimetrija
K_b	Jungimosi pusiausvyros konstanta
LB	Mitybinė terpė (<i>angl.</i> Lysogeny Broth)
L_t	Bendra ligando koncentracija
MES	2-(N-morfolino)-etansulfoninė rūgštis
NDS-PAAG	Natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė

PGR	Polimerazės grandininė reakcija
PIPES	Piperazino-N,N'-bis(2-etansulfoninė rūgštis)
PMSF	Fenilmetilsulfonilchloridas
S	Entropija
SAP	Krevečių šarminė fosfatazė (<i>angl.</i> Shrimp Alkaline Phosphatase)
SOC	Optimali mitybinė terpė (<i>angl.</i> Super Optimal broth with <u>Catabolite repression</u>)
T	Temperatūra
T_m	Baltymo denatūracijos temperatūra
TAE	DNR elektroforezės buferinis tirpalas (<i>angl.</i> TRIS–Acetate–EDTA)
TEMED	N,N,N'N'-tetrametiletilendiaminas
TPM	Terminio poslinkio metodas
TRIS	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

IVADAS

Žmogaus karboanhidrazės priklauso α -CA šeimai, kurios tarpusavyje skiriasi molekulinėmis ypatybėmis, lokalizacija ląstelėje, pasiskirstymu organuose ir audiniuose, ekspresijos lygiu, kinetinėmis savybėmis, atsaku į skirtingas slopiklių klases (Alterio et al., 2012). Mitochondrinės karboanhidrazės VB ir VA yra vienos mažiausiai ištirtos karboanhidrazės iš visų žmogaus organizme randamų 15 karboanhidrazių izoformų. Tyrimus apsunkina tai, jog sudėtinga gauti aktyvius ir stabilus fermentus. Karboanhidrazės VB ir VA didžiausia homologija tarpusavyje pasižymi minčios karboanhidrazės bei vienintelės iš visų karboanhidrazių ekspresuojamos mitochondrijose. Nors baltymų lokalizacija ląstelėje ir sutampa, tačiau jų ekspresija žmogaus organizme skiriasi. Dėl skirtingo pasiskirstymo organizme ir evoliucijos netolygumo, manoma, kad CA VA ir CA VB atlieka skirtingus fiziologinius vaidmenis (Shah et. al., 2000), tačiau detalesniais tyrimais iki šiol tai dar neįrodyta. Remiantis literatūra CA VB pasižymi didesniu kataliziniu aktyvumu nei CA VA (Vullo et al., 2006), todėl CA VB įgyja didesnę svarbą įvairiuose biocheminiuose bei biofizikiniuose tyrimuose.

Mitochondrinės CA paskirtis buvo pasiūlyta, tuomet kai buvo įrodyta, jog mitochondrijos išorinė membrana yra nepralaidi HCO_3^- jonams, kurie dalyvauja oksalacetato sintezėje iš piruvato katalizuojant piruvato karboksilazei. Todėl penktoji karboanhidrazė yra svarbi tokiuose biologiniuose procesuose, kaip gliukoneogenezė ar amoniako detoksifikacija kepenyse. Manoma, jog mitochondrinės karboanhidrazės, padeda palaikyti normalias β -ląstelių funkcijas bei yra susijusios su insulino reguliacija organizme (Parkkila AK, et. al., 2000). Tačiau padidėjęs CAVB aktyvumas siejamas ir su kai kuriomis ligomis. Šiuo metu, kaip galimas vaistų taikiny, ji minima gydant nutukimą, centrinės nervų sistemos ligas bei patologinius smegenų pažeidimus, kurie pasireiškia sergantiems cukriniu diabetu (Supuran, 2008, Price et. al., 2012).

Bandant įveikti minėtas ligas mitochondrinė CA VB gali tapti nauju bei aktualiu vaistinių medžiagų kūrimo taikiniu. Todėl tampa svarbi jos slopiklių paieška, kurie būtų selektyvūs, tirpūs, neturėtų pašalinio veikimo bei farmokologinių apribojimų.

Darbo tikslas – mitochondrinės karboanhidrazės VB klonavimas, ekspresija, gryninimas, jungimosi su sulfonamidiniais ligandais įvertinimas izoterminio titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodais.

Darbo uždaviniai:

- 1) Aktyvios ir stabilios mitochondrinės karboanhidrazės VB gavimas.
- 2) CA VB stabilumo, esant įvairioms sąlygoms ir kai pridėta įvairių ligandų/medžiagų, eksperimentinis nustatymas terminio poslinkio metodu.
- 3) CA VB sąveikos su sulfonamidiniais slopikliais matavimas terminio poslinkio metodu.
- 4) Karboanhidrazės VB jungimosi termodinaminių parametrų nustatymas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Karboanhidrazių apžvalga

1.1.1 Bendra karboanhidrazių apžvalga

Karboanhidrazės (CA, EC 4.2.1.1) tai metalofermentai randami visose gyvosios gamtos karalystėse. Jos yra koduojamos penkių nepriklausomai evoliucijos eigoje išsivysčiusių karboanhidrazių genų šeimose: α – CA randamos gyvūnuose bei žaliuosiuose dumbliuose, β – CA – augaluose, γ – CA – archebakterijose bei eubakterijose, δ – CA – jūriniuose dumbliuose, ϵ – CA – kai kuriose bakterijose. Šių šeimų baltymų tretinės ir ketvirtinės struktūros nepanašios, tačiau visos jos aktyviajame centre turi metalo joną: α – CA, β – CA, δ – CA – cinko (Zn^{2+}), γ – CA – Fe^{2+} (aktyvumo nepraranda ir esant Zn^{2+} ar Co^{2+} jonams), ϵ – CA – kadmio (Cd^{2+}) (Supuran, 2011).

Visos fermentinį aktyvumą turinčios karboanhidrazės katalizuoja grįžtamąją anglies dioksido hidratacijos reakciją ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). Ši reakcija svarbi daugelyje biologinių procesų: kvėpavimo reguliacijai ir dujų apykaitai, *pH* palaikymui, kaulų vystymuisi, kalcifikacijai, seilių gamybai, centrinei nervų sistemai, prisitaikymui esant oksidaciniam ląstelės stresui, auglių formavimuisi, metaboliniams keliams, tokiems, kaip gliukoneogenezė, lipogenezė ir kt. Kadangi karboanhidrazės dalyvauja daugelyje fiziologinių procesų, jų aktyvumo ar raiškos pokyčiai gali lemti įvairias patologijas žmogaus organizme. Dėl šios priežasties pastaruoju metu karboanhidrazių kaip medicininės chemijos taikinio svarba vis didėja. Jos naudojamos kuriant naujus vaistus bei kaip fermentų sistema įvairiuose biofizikos, bioanalizės, fizikinės ar organinės chemijos tyrimuose (Hassan et al., 2013).

1.1.2 Žmogaus karboanhidrazės, jų struktūra

Visos žmogaus karboanhidrazės priklauso α - CA šeimai, identifikuota 15 izoformų, kurios tarpusavyje skiriasi molekulinėmis ypatybėmis, lokalizacija ląstelėje, pasiskirstymu organuose ir audiniuose, ekspresijos lygiu, kinetinėmis savybėmis, atsaku į skirtingas slopiklių klases. Pagal lokalizaciją ląstelėje CA galima skirstyti į keturias grupes (1 pav.): citozolinės (CA I, II, III, VII ir XIII), susijusios su membrana (CA IV, IX, XII, XIV), mitochondrinės (CA VA, VB) ir sekretuojamos (CA VI). Dvylika izoformų pasižymi fermentiniu aktyvumu (CA I - IV, VA, VB, VI, VII, IX, XII - XIV), likusios trys (CA VIII,

X, XI) į CA panašūs baltymai (CARPS) neturi jokio katalizinio aktyvumo (Alterio et al., 2012).

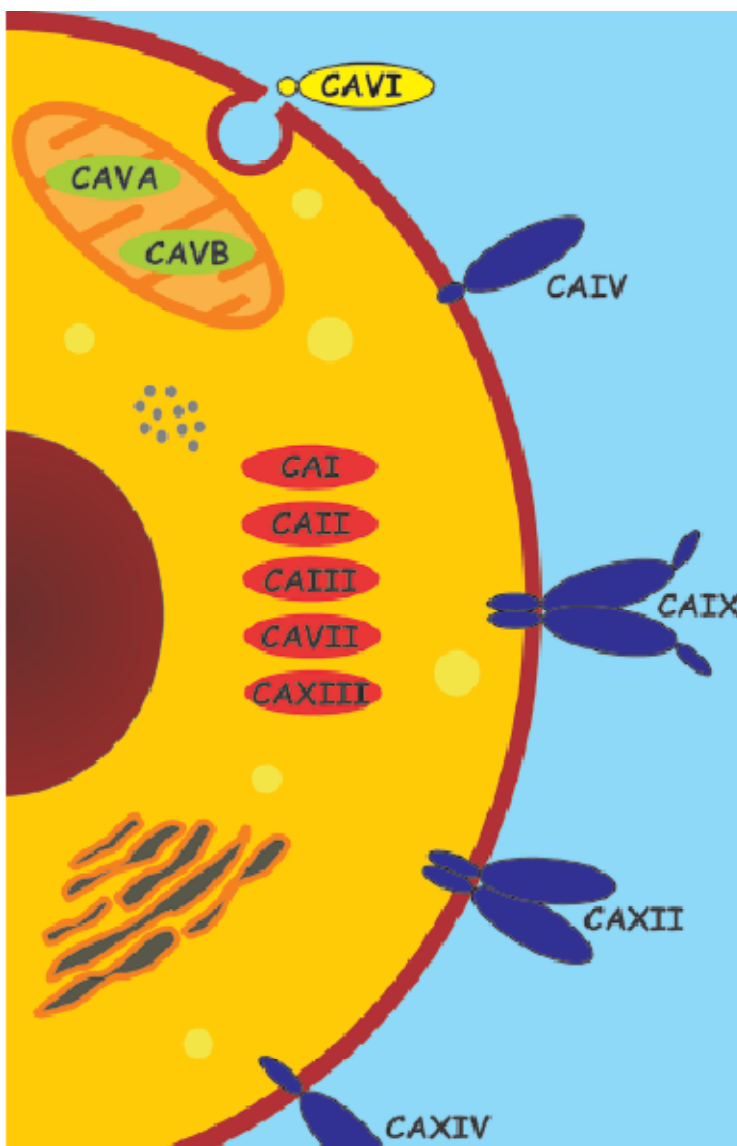
CA I – citozolinis izofermentas randamas daugelyje audinių, tačiau didžiausia jo ekspresija eritrocituose. Sunku paaiškinti jo fiziologinę reikšmę organizme, nes fermento nebuvimas raudonuosiuose kraujo kūneliuose neatskleidė jokių anomalijų ar susirgimų (Knaus et al., 2011).

CA II – labiausiai paplitęs fermentas iš visų karoanhidrazių bei turintis aukščiausią katalizinį aktyvumą. Jis dalyvauja *pH* balanso palaikyme, rūgščių-bazių homeostazėje, CO₂ pernašoje eritrocituose, plaučiuose (Almstedt et al., 2009).

CA III – tai žemiausią katalizinį aktyvumą turinti karboanhidrazė. Ji reguliuoja ląstelių augimą bei atsakinga už glikozaminglikano formavimąsi jungiamųjų audinių ląstelėse (Zimmerman et al., 2004).

CA IV – pirmoji atrasta su membrana susijusi karboanhidrazė, kuri palaiko homeostazę smegenyse, *pH* plaučiuose, katalizuoja CO₂ hidrolizę raumenyse fizinės veiklos metu (Ochrietor et al., 2005).

CA VI – pagrindinė sekretuojamos karoanhidrazės funkcija yra *pH* palaikymas seilėse. Jos maža ekspresija siejama su sumažėjusiu skonio suvokimu, padidėjusia skonio receptorių



1 pav. Žmogaus karboanhidrazių lokalizacija ląstelėje (Alterio et al., 2012).

apoptoze skonio svogūnėliuose, dantų kariesu, rūgščių sukeltais gleivių pažeidimais virškinimo trakte (Smith et al., 2006).

CA VII – ekspresuojama centrinėje nervų sistemoje. Histocheminiai tyrimai atskleidė, jog ji svarbi smegenų skysčio susidaryme (De Simone et. al., 2009).

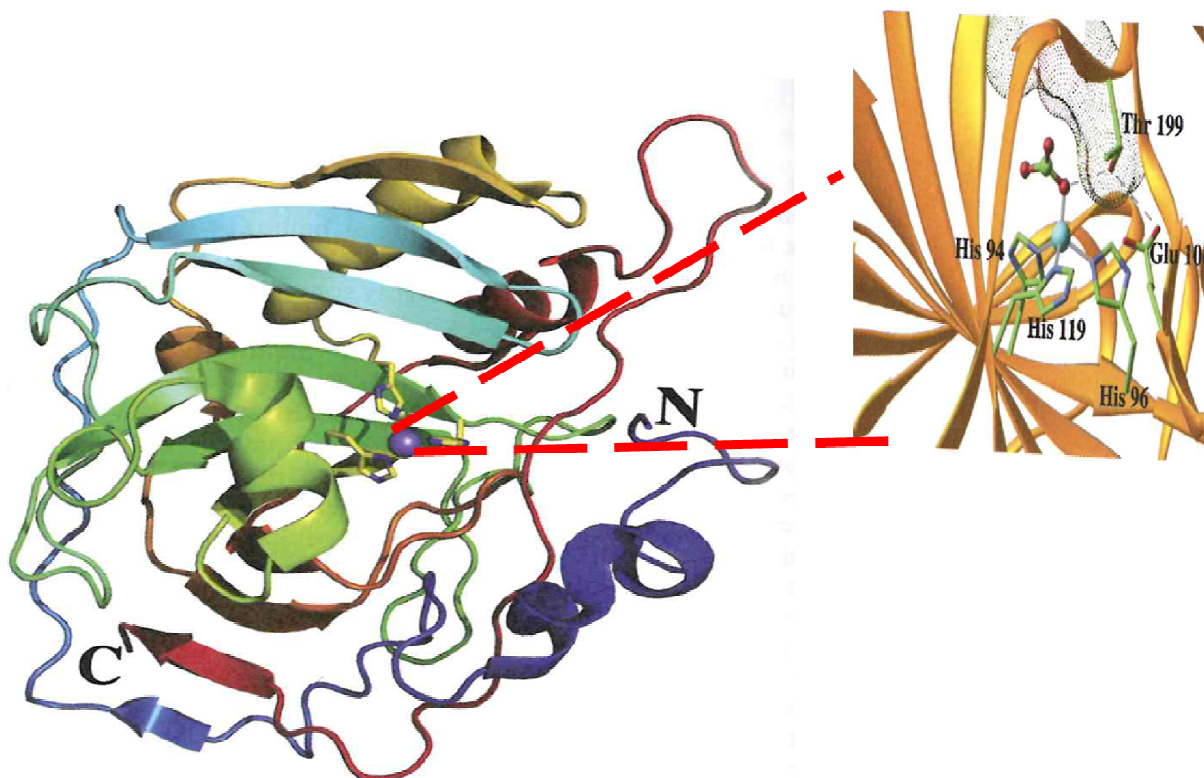
CA IX – naudojama, kaip žymė aptinkant hipoksinius auglius bei diagnozuojant krūties vėžį. Tyrimais įrodyta, kad jos ekspresijos ir aktyvumo padidėjimas susijęs su onkologiniais susirgimais (Knaus et al., 2011).

CA XII – jos padidėjusi raiška nustatyta vėžinėse ląstelėse. Manoma, kad dėl padidėjusios protonų koncentracijos pasikeičia užląstelinės terpės *pH* (parūgštėja). Toks užląstelinės terpės *pH* pokytis sudaro reikiamas sąlygas augti navikui ir formuotis metastazėms (Tafreshi et al., 2012).

CA XIII – paskutinė atrasta citozolinė karboanhidrazė. Lokalizacija organizme plati, randama užkrūčio liaukoje, priešinėje liaukoje, gaubtinėje žarnoje, plonojoje žarnoje, blužnyje. Reprodukcinuose organuose padeda palaikyti tinkamas sąlygas apvaisinimui (Di Fiore et al., 2009).

CA XIV - dalyvauja viduląstelinio ir užląstelinio pH reguliavime. Ekspresuojama tinklainėje, centrinėje nervų sistemoje, smegenyse, kepenyse, širdyje, plonojoje žarnoje, gaubtinėje žarnoje, inkstuose, šlapimo pūslėje, skeleto raumenyse (Nagelhus et at., 2005).

Žmogaus karboanhidrazių kristalinių struktūrų (išskyrus CA VA ir CA VB, kurios dar nėra nustatytos) analizė atskleidė, jog nepriklausomai nuo skirtingos lokalizacijos ar kinetinių savybių, jų struktūra panaši: centre antiparaleliai išsidėsčiusios β – juostos, apsuptos α – spiralių bei papildomų β – grandinių. Aktyviajame centre, kurio gylis apie 13 Å, o plotis 12 Å, randamas cinko jonas, koordinuojamas trijų histidinių liekanų (His 94, His 96, His 119), o Thr 199 ir Glu 106 aminorūgštys sudarydamos Van der Valso bei vandenilinius ryšius orientuoja substratą (CO₂) aktyviajame centre (2 pav.).



2 pav. Karboanhidrazių struktūra remiantis CA II struktūra (PDB 2CAB). Mėlyna spalva pažymėtas N' – galas, raudona – C' – galas. Dešinėje paveiklso pusėje pavaizduotas CA aktyvusis centras (adaptuota iš Voet et al., 2011).

Karboanhidrazės yra monomerai, išskyrus CA VI, IX ir XII, pastarosios aptinkamos, kaip dimerai, kurių konformacija tarpusavyje nėra panaši. Manoma, jog dėl kitokios struktūros dimerinės karboanhidrazės gali atlikti specifines funkcijas audiniuose, kuriuose yra ekspresuojamos (Alterio et al., 2012).

1.1.3 Žmogaus karboanhidrazių VA ir VB apžvalga

Karboanhidrazė V pirmą kartą buvo išskirta iš jūrų kiaulytės kepenų 1987 metais (Dodgson 1987). Identifikavus paskutiniąją karboanhidrazę žmogaus organizme – CA VB (Fujikawa-Adachi et. al., 1999), buvo nutarta karboanhidrazę V pavadinti CA VA. Karboanhidrazė VB – tai baltymas sudarytas iš 317 aminorūgščių, pirmosios 33 aminorūgštys sudaro baltymo lyderinę seką. CA VB ir CA VA didžiausia homologija tarpusavyje pasižyminčios karboanhidrazės vienintelės iš visų karboanhidrazių ekspresuojamos mitochondrijose. Nors baltymų lokalizacija ląstelėje ir sutampa, tačiau jų ekspresija žmogaus organizme skiriasi. CA VB randama kasoje, inkstuose, seilių liaukose, stuburo smegenyse, širdyje, skeleto raumenyse, kepenyse, tuo tarpu CA VA aptinkama kepenyse, skeleto raumenyse ir inkstuose (Shah et. al., 2000). Skirtinga minėtųjų karboanhidrazių ir genų lokalizacija: CA5B genas sutinkamas žmogaus Xp22.1 chromosomoje, CA5A – 16q24.

Palyginus CA VA ir CA VB sekas (3 pav.) nustatyta, jog jos identiškos 59%. Analizuojant filogenetinį giminingumą tarp CA VA ir CA VB įrodyta, jog CA VB seka daug konservatyvesnė (CA VB žmogaus ir pelės sekos identiškos 89%, CA VA – 71%). Remiantis filogenetiniu medžiu teigiama, jog CA VB evoliucionavo 4,5 karto lėčiau negu CA VA. Spėjama, jog lėtesnę CA VB evoliuciją galėjo lemti baltymo paviršiaus sąveikos su kitais baltymais. Lyginant CA VB ir CA VA sekas taip pat pastebima, jog CA VB turi keturis cisteinus, o CA VA tik du, kurie, tikriausiai, dalyvauja disulfidinio ryšio sudaryme. Tačiau norint tiksliai atsakyti, kokie aminorūgščių skirtumai galbūt lemia baltymų skirtingas konformacijas, reikia nustatyti kristalines jų struktūras. Šito iki šiol padaryti nepavyko. Dėl skirtingo pasiskirstymo organizme ir evoliucijos netolygumo manoma, kad CA VA ir CA VB atlieka skirtingus fiziologinius vaidmenis (Shah et. al., 2000), tačiau detalesniais tyrimais tai dar neįrodyta.

Q9Y2D0_CA_VB/1-317	1	MVVMNSLRVILQASPGKLLWRKFQIPRFMPARPCSLYTCTYKTRNRALHPLWESV	55
P35218_CA_VA/1-305	1	MLGRNTWKTSASFSLVEQMWAPLWSRSMRPGRWCSQRSQAWQTSNNTLHPLWTVP	55
Q9Y2D0_CA_VB/1-317	56	DLVPGGDQSPINIRWRDSVYDPGLKPLTISYDPATCLHWNNGYSLVEFEDST	110
P35218_CA_VA/1-305	56	VSVPGGTRQSPINIQWRDSVYDPQLKPLRVSYEAAASCLYIWNTRYLQVEFDDAT	110
Q9Y2D0_CA_VB/1-317	111	DKSVIKGGPLEHNYRLKQFHFHWGAIDAWGSEHTVDISKCFPAELHLVHWNARFE	165
P35218_CA_VA/1-305	111	EASGISGGPLENHRYRLKQFHFHWGAVNEGSEHTVDGHAYPAELHLVHWNSSVKYQ	165
Q9Y2D0_CA_VB/1-317	166	NFEDAALAEENGLAVIGVFLKLGKHHKEQLKLVDTLPSIKHKDALVEFGSFDPSCL	220
P35218_CA_VA/1-305	166	NYKEAVVGENGLAVIGVFLKLGAAHQTQLRLVDILPEIKHKDARAAMRPFDPSTL	220
Q9Y2D0_CA_VB/1-317	221	MPTCPDYWTYSGLSTTPPLSESVTWIIKKQPEVDHDLQEQFRTLLFTSEGEKEK	275
P35218_CA_VA/1-305	221	LPTCWDYWTYAGSLSTTPPLTESVTWIIKKEPVEVAPSQLSAFRTLLFSALGEEK	275
Q9Y2D0_CA_VB/1-317	276	RMVDNFRPLQLPLMNRVRSFRRHDYVLNVQAKPKPATSQATP	317
P35218_CA_VA/1-305	276	MMVNNYRPLQLPLMNRKVASFQATNEGTRS	305

3 pav. Mitochondrinių karboanhidrazių sekų palyginimas. Mėlynai pažymėtos aminorūgštys identiškai sutampa abejose sekose.

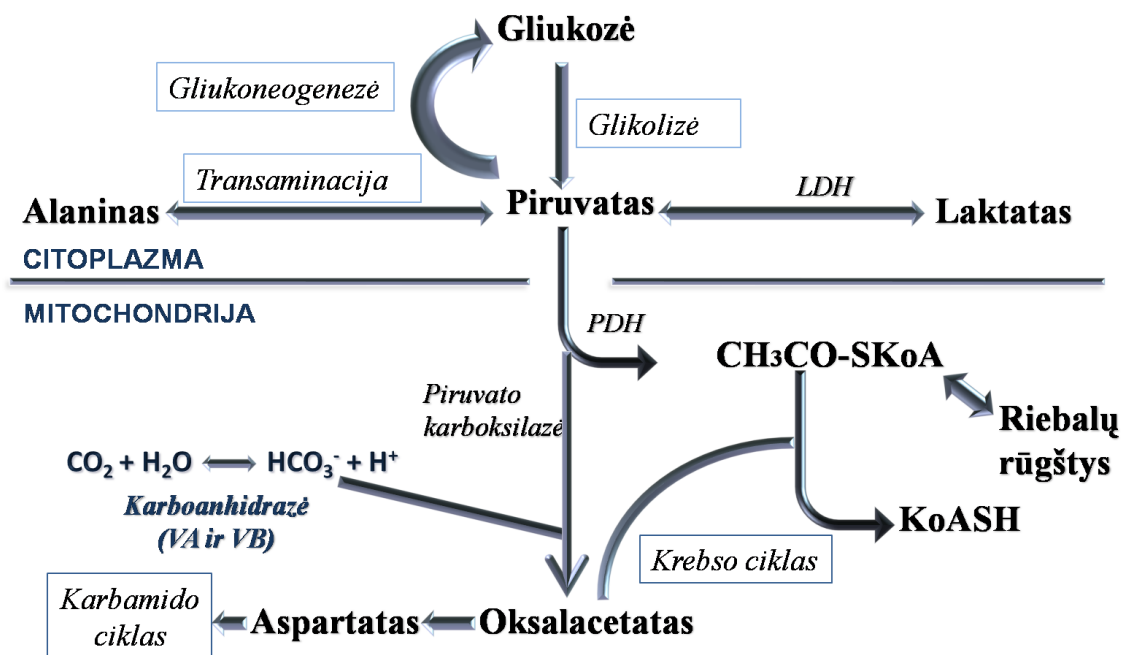
Abi mitochondrinės izoformos nepasižymi dideliu kataliziniu aktyvumu (Fujikawa-Adachi et. al., 1999). Tai būtų galima paaiškinti atsižvelgiant į aminorūgštis, esančias aktyviajame centre ir lyginant jas su aukštą (CAII) bei žemą (CAI, CA III) katalizinį aktyvumą turinčių karboanhidrazių aminorūgštimis (4 pav.). Karboanhidrazių fermentiniam aktyvumui reikalingas cinko jonas, koordinuojamas trimis histidinių liekanomis (94, 96, 119 pozicijos, remiantis CA I nomenklatūra) ir vandens molekulės ar hidroksido jono. Nukleofilinės atakos metu susidaro bikarbonatas, koordinuojamas cinko jono. Bikarbonatas atpalaiduojamas tirpale, o jį keičia vandens molekulė. Susidariusi rūgštinė fermento forma regeneruojama į aktyvią bazinę formą vykstant protono pernašai iš aktyviojo centro į aplinką. Šią pernašą gali palengvinti aktyviajame centre esanti histidino liekana (His 64) (5 pav.), kurios neturi mitochondrinės CA. Tai viena iš priežasčių, kuri galėtų lemti baltymo žemą

Aminoglycosides *numeris*

	7	29	61	62	64	65	66	67	68	91	92	94	96	106	107	111	119	121	131	141	143	145	192	194	198	199	200	201	202	204	206	207	209	211	244	246
Q9Y2D0_CA_VB	T	S	N	N	Y	S	F	L	E	K	Q	H	H	E	H	A	H	V	F	L	V	G	W	Y	L	T	T	P	P	S	S	W	I	N	R	
P35218_CA_VA	T	S	N	T	Y	L	F	Q	E	K	Q	H	H	E	H	A	H	V	Y	L	V	G	W	Y	L	T	T	P	T	S	W	I	N	R		
P00915_CA_I	Y	S	N	V	H	S	F	H	N	F	Q	H	H	E	H	A	H	A	L	L	V	G	W	Y	L	T	H	P	P	Y	S	W	I	N	R	
P00918_CA_II	Y	S	N	N	H	A	F	N	E	I	Q	H	H	E	H	A	H	V	F	L	V	G	W	Y	L	T	T	P	P	L	C	W	W	N	R	
P07451_CA_III	Y	S	N	N	K	T	C	R	V	R	Q	H	H	E	H	A	H	V	F	I	V	G	W	Y	F	T	T	P	P	E	C	I	W	L	N	R

13

Mitochondrinės CA funkcija buvo pasiūlyta tuomet, kai buvo įrodyta, jog mitochondrijos išorinė membrana nepralaidi H^+ jonams. Karboanhidrazės VA ir VB katalizuoja grįžtamąją hidrataciją iki HCO_3^- jonų, kurie dalyvauja oksalacetato sintezėje iš piruvato katalizuojant piruvato karboksilazei (6 pav.). Todėl penktoji karboanhidrazė yra svarbi tokiuose procesuose, kaip gliukoneogenezė ar amoniako detoksifikacija kepenyse. Manoma, jog mitochondrinės karboanhidrazės susijusios su insulino reguliacija organizme. Citozolinis NADPH reikalingas palaikyti normalioms β -ląstelių funkcijoms, taip pat ir insulino sekrecijai jose. NADPH susidaro vykstant malato konvertacijai į piruvatą. Malatas citozolyje susidaro tuomet, kai trikarboksilitų pernašos sistema oksalacetatą, kuriam susidaryti padėjo CA V, perneša pro mitochondrijos membraną (Parkkila AK, et. al., 1998). Šiuo metu mitochondrinės karboanhidrazės, kaip galimi vaistų taikiniai, minimi esant keletui susirgimų.



6 pav. Mitochondrinių karboanhidrazių vaidmuo (adaptuota iš Price et. al., 2012).

Pirmas iš jų, tai nutukimas. Pasaulio sveikatos organizacija pranašauja, jog 2015 metais daugiau, kaip 2,3 milijardo žmonių kankins viršsvoris, iš jų daugiau nei 700 milijonams bus diagnozuotas nutukimas. Jis lemia padidėjusį sergamumą dislipidemija, hipertenzija, aterogeneze bei 2 tipo diabetu. Nutukimas taip pat yra vėžinių susirgimų priežastis: gaubtinės žarnos, krūties, inkstų, virškinamojo trakto. Viršsvoris susijęs ir su

psichologinėmis problemomis, tokiomis, kaip depresija ar savęs nuvertinimu (Heal et al., 2013). Įrodyta, jog riebalų rūgščių biosintezė lipogenezės metu organizme padidėja išaugus acetil-KoA kiekiui. Acetil-KoA susidaro mitochondrijose piruvato oksidacinio dekarboksilinimo metu. Vidinė mitochondrijų membrana yra nelaidi acetil-KoA, todėl jis yra pernešamas citrato forma, kurios susidarymui reikalingas oksalacetatas. Pastarojo koncentracija mitochondrijoje gali būti mažinama, slopinant CA V veiklą, tokiu būdu mažėtų ir riebalų rūgščių susidarymas (Supuran, 2008).

Sergant cukriniu diabetu pastebėtas pericitų mažėjimas, kuris gali lemti kraujagyslių pažeidimus bei būti diabetinės retinopatijos ar pataloginių pokyčių smegenyse priežastimi. Nustatyta, jog pericitų mažėjimui daro įtaką oksidacinis ląstelių stresas, kurį sukelia aktyviųjų deguonies formų (ROS) padidėjimas mitochondrijų kvėpavimo grandinėje. Esant hiperglikemijai, nuo insulino nepriklausomų audinių ląstelėse padidėja gliukozės koncentracija, o tai, vykstant Krebso ciklui, padidina elektronų donorų (redukuoto FADH_2 bei redukuoto NADH) kiekį. Elektronų donoriai generuoja protonų gradientą per vidinę mitochondrijų membraną, o esant dideliame elektrocheminiam potencialų skirtumui – prailginama superoksidų gyvavimo trukmė. Įrodyta, jog superoksidų kiekis ląstelėje mažėja slopinant mitochondrinę karboanhidrazę VB. Dėl šios priežasties keliama hipotezė, jog CA VB gali būti taikinytis gydant su oksidaciniu stresu susijusias centrinės nervų sistemos ligas (Price et al., 2012).

1.1.4 Karboanhidrazės – vaistų kūrimo taikinytis

Tyrimai atskleidė, jog CA atlieka svarbų vaidmenį fiziologiniuose procesuose, o jų padidėjusi ekspresija ar aktyvumas lemia skirtingus susirgimus. Be prieš tai minėtų su CA V veikla susijusių ligų, nustatyta, kad karboanhidrazės atsakingos už įvairaus tipo anemiją, o jų slopikliai gali būti naudojami, kaip indikatoriai autoimuninės hemolitinės anemijos identifikavimui. CA II padidėjusi raiška lemia osteoporozės vystymąsi, taip pat ji naudojama, kaip žymė nustatant virškinamojo trakto auglius. CA III sutrikusi veikla siejama su sunkiaja miastenija – autoimunine neurorauumenine liga. CA IV veiklos pakitimai lemia tinklainės uždegimą, žmonėms pasireiškia periferinio matymo defektas. CA IX ir CA XII padidėjusi ekspresija siejama su vėžiniais susirgimais (Supuran, 2008).

Bandant įveikti su CA veikla susijusias ligas, karboanhidrazės tampa aktualiu vaistinių medžiagų kūrimo taikiniu. Naujų vaistų kūrime vis svarbesnė CA slopiklių paieška,

kurie neturėtų farmakologinių apribojimų: būtų selektyvūs, tirpūs ir be pašalinio veikimo. Karboanhidrazės yra slopinamos dviejų klasių junginiais: anijonais ir sulfonamidais. Struktūriniai duomenys parodė, jog sulfonamidai jungiasi prie aktyviajame centre deprotonizuotoje formoje esančio cinko jono, sudarydami tetraedrinę geometriją: ligando azoto atomas prisijungia prie Zn^{2+} bei suformuojami vandeniliniai ryšiai su baltymo Thr 199 aminorūgšties liekana, kuri vandenilniais ryšiais susijungusi su Glu 106 (CA II atveju). Dauguma karoanhidrazių slopinamos aromatinių ir heterociklinių sulfonamidų (Supuran 2008, Krishnamurthy et al., 2008).

Šiuo metu CA veiklą reguliuojantys bei klinikiniais tikslais naudojami 25 vaistai: diuretikai, antigliaukominiai, antikonvulsiniai, antivėžiniai preparatai (7 pav.). Vienas iš jų acetazolamidas nuo 1956 metų klinikiniais tikslais pradėtas vartoti gydant gliukomą, kalnų ligą, gerybinius kaulų pažeidimus. Metazolamidas vartojamas kaip diuretikas, be to turi mažesnę šalutinį poveikį inkstams nei acetoazolamidas. Dorzolamidas, etozolamidas, dichlorfenamidas vartojami gydant akių ligas (Supuran, 2008). Manoma, jog topiramato veikimo mechanizmas gali būti aiškinamas tuo, jog jis slopina CA V veiklą. Iki šiol topiramatas buvo naudojamas epilepsijos ir bipolinio sutrikimo gydymui. Tačiau topiramatu epilepsiją besigydantiems žmonėms nustatytas svorio kritimas (Ben-Menachem et. al., 2003). Gydant maniakinę depresiją olanzapinu ir valproatu pastebėtas svorio augimas, tuo tarpu vartojant topiramatą tos pačios ligos gydymui pacientų svoris ėmė mažėti (Milano et. al., 2012). Preparatas pradėtas naudoti klinikiniuose tyrimuose, kaip galimas vaistas prieš nutukimą, tačiau ilgalaikis jo vartojimas siejamas su parastezija, skonio pojūčio pakitimais, atminties pablogėjimu bei teratogeniniu poveikiu. Manoma, jog topiramato šalutinį poveikį būtų galima sumažinti jį vartojant kartu su fenteraminu. Vartojant kompleksinį vaistą reikalingos mažesnės sudedamųjų dalių dozės, todėl stebimas mažesnis jų šalutinis poveikis, be to didesnis svorio kritimas nei preparatus vartojant atskirai (Powell et. al., 2012).

Fundamentalus supratimas apie baltymo ir ligando sąveiką reikalauja supratimo apie jungimosi proceso pusiausvyros konstantą (K_b) :

$$K_b = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (2)$$

Žinodami jungimosi konstantą, galime apskaičiuoti laisvąją Gibso energiją, kuri apibūdina reakcijos giminingumą:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K_b \quad (3)$$

Baltymų natyvios struktūros stabilumą užtikrina labai didelis skaičius silpnų, nekovalentinių ryšių, kurių ryšio energija yra mažesnė, negu kovalentinio ryšio, bet būtent didelis skaičius ryšių ir lemia komplekso stabilumą. Tokių ryšių sudarymą arba suardymą (nekovalentinių jungčių persiskirstymą) baltymui pereinant iš laisvos į surištą būseną nusako reakcijos entalpija (ΔH).

Entropija (ΔS) yra reakcijos netvarkingumo matas. Teigiama entropija arba padidėjęs sistemos laisvės laipsnių skaičius siejamas su vandens molekulės atpalaidavimu nuo susidariusio bimolekulinio komplekso paviršiaus. Žinodami reakcijos entalpiją ir laisvąją Gibso energiją entropiją nesunkiai galime apskaičiuoti:

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T \quad (4)$$

Termodinaminių parametrų naudojimas biologiškai svarbių sąveikų supratimui yra svarbi ir farmacinės intervencijos kūrimo dalis. Tiriant baltymų jungimąsi su ligandais modeliuojami nauji junginiai, kurie gali būti panaudojami, kaip vaistinės medžiagos gydant įvairius susirgimus (Ladbury 2010, Cooper et al., 2001).

1.2.2 Termodinaminiai metodai vaistų kūrime

Baltymo jungimosi su ligandu termodinamikai tirti taikomi fluorescenciniai, liuminescenciniai, spektroskopiniai, masių spektroskopijos, žiedinio dichroizmo, paviršiaus plazmonų rezonansų ir kt. metodai. Iš visų termodinaminių parametrų lengviausia eksperimentiškai pamatuoti ligando jungimosi entalpiją, t.y. entalpijos pokytį, kuris nustatomas baltymui pereinant iš laisvos (neprijungtos) į su ligandu susijungusią būseną. Šiuo metu populiariausias ir lengviausiai atliekamas yra izoterminio titravimo kalorimetrijos metodas, kuriuo tiesiogiai ir pakankamai tiksliai matuojama beveik bet kurio bimolekulinio

proceso sąveikos entalpija. Priklausomai nuo eksperimento sąlygų gali būti nustatoma ir jungimosi konstanta bei reakcijos stochiometrija (Baranauskienė et. al., 2009, Matulis, 2008).

Entalpiniai ir entropiniai duomenys atskleidžia tiriamos sistemos energetinius virsmus. Tai gali būti naudinga norint apibūdinti bimolekulinę sąveiką ir kaip ją būtų galima keisti siekiant didesnio afiniškumo tarp molekulių. Pavyzdžiui, pasirenkant junginį su palankiausia entalpija galima teigti, jog tokios struktūros molekulė lemia geriausią sąveiką su tiriamuoju objektu, todėl giminiškumo įvertinimas modeliuojant ryšius tampa mažiau reikšmingas. Termodinaminių parametrų nustatymas gali atlikti svarbų vaidmenį kuriant vaistų paieškos programas (Ladbury, 2010).

Terminio poslinkio metodą galima naudoti įvertinant baltymo stabilumą bei nustatant ligando jungimosi afiniškumą. Nustačius, kokiomis sąlygomis reikia laikyti konkretų baltymą, kokio buferinio tirpalo *pH* reikia jį saugant, kokių stabilizatorių reikėtų pridėti, kad baltymas išliktų stabilus, galima optimizuoti baltymo gryninimą, kristalinimą, t.y. tuos metodus, kurie naudojami naujų vaistų sudedamųjų dalių identifikavimui (Nettleship et. al., 2008). Naujų ligandų atradimas taip pat svarbi dalis vaistinių medžiagų sudedamųjų dalių paieškoje (Giuliani et. al., 2008). Pastebėta koreliacija tarp baltymo denatūracijos temperatūros ir jungimosi su slopikliu giminiškumo (Bullock et. al., 2005, McDonnell et. al., 2009). Taikant terminio poslinkio metodą kartu su kitais biocheminiais IC_{50} metodais, galima suprasti molekulių jungimosi energetinius pokyčius (Zhang, Monsma, 2010).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos, rinkiniai, terpės, buferiniai tirpalai ir kitos naudotos priemonės

Naudotos medžiagos ir rinkiniai pateikti pagal gamintoją:

- *Aldrich*: ANS, EZA;
- *BioRad*: TEMED, glicinas, β-merkaptio etanolis;
- *Boehringer Mannheim*: DTT;
- *Ferak Berlin*: Tritonas–X100;
- *Fluka*: bisakrilamidas, Coomassie Brilliant Blue R-250, etidžio bromidas, guanidino hidrochloridas, HCl, NaOH, Na₂B₄O₇, Na₃PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄·12H₂O;
- *GE Healthcare*: sefarozė, p-aminometilbenzeno sulfonamidais modifikuota agarozė;
- *Matheson Coleman & Bell*: bromfenolio mëlis;
- *Peaxum*: ZnSO₄, MnCl₂·4H₂O;
- *Roche*: chloramfenikolis, glicerolis, peptidazių slopiklių tabletės, PMSF;
- *Roth*: akrilamidas, ampicilinas, APS, CaCl₂·2H₂O, DMSO, HEPES, PIPES, LB mitybinė terpė, BHI mitybinė terpė, MgCl₂, mielių ekstraktas, NaCl, triptonas;
- *Sigma*: AAZ, CH₃COOH, EDTA, 80 % H₃PO₄, imidazolas, KCl, MES, MgSO₄, topiramatas;
- *Thermo Fisher Scientific*: agarozė, IPTG, baltymų dydžio žymuo (Protein Molecular Weight Marker), DNR dydžio žymuo (GeneRuler™ DNA Ladder Mix), dažas DNR mėginių užnešimui ant agarozės gelio (6X Orange Loading Dye), fermentai klonavimui: restrikcijos endonukleazės (NdeI, XhoI), krevečių šarminė fosfatazė (SAP), T4 DNR ligazė ir jų buferiniai tirpalai, dNTP mišinys, *Pfu* DNR polimerazė ir jos buferinis tirpalas, DNR gryninimo rinkiniai: „GeneJET™ Gel Extraction Kit“, „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“, „GeneJET™ PCR Purification Kit“.

E.coli kamienai:

Plazmidės DNR išskyrimui naudotas *E. coli* bakterijų kamienas XL1-blue (*Stratagene*).

Karboanhidrazės VB raiškai naudoti *E.coli* bakterijų kamienai:

- BL21 (DE3) (*Novagen*)

- Rosetta 2 (DE3) (*Novagen*)
- BL21 (DE3)-CodonPlus-RIL (*Stratagene*)

Genetinės konstrukcijos:

pCMV-SPORT6-CA VB: plazmidė, turinti pilno ilgio CA VB baltymo geną.

pET15b-6xHis-CAVB (40-317): plazmidė, turinti CA5B geną, kuris koduoja CA VB baltymą nuo 40 iki 317 aminorūgšties bei N' – gale turi šešių histidinių uodegėlę.

pET21b-CAVB-6xHis (40-317): plazmidė, turinti CA5B geną, kuris koduoja CA VB baltymą nuo 40 iki 317 aminorūgšties bei C' – gale turi šešių histidinių uodegėlę.

pET21b-CAVB-6xHis (34-317): plazmidė, turinti CA5B geną, kuris koduoja CA VB baltymą nuo 34 iki 317 aminorūgšties bei C' – gale turi šešių histidinių uodegėlę. Ši genetinė konstrukcija sukurta VU Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje (dr. V.Časaitė).

Genetinių konstrukcijų kūrimui naudoti pradmenys:

T1(5'-CAAGCAACCCCCTAACTCGAGCATATC-3'): tiesioginis pradmuo naudotas pET15b-6xHis-CA VB (40-317) plazmidės kūrimui.

A1(5'-GATATGCTCGAGTTAGGGGGTTGCTTG-3'): atvirkštinis pradmuo naudotas pET15b-6xHis-CA VB (40-317) plazmidės kūrimui.

T2 (5'-CTATCATATGACTTACAAAACCCGGACC-3'): tiesioginis pradmuo naudotas pET21b-CA VB-6xHis (40-317) plazmidės kūrimui.

A2 (5'-GAATCTGGAGGGGGGTTGCTTGGCT-3'): atvirkštinis pradmuo naudotas pET21b-CA VB-6xHis (40-317) plazmidės kūrimui.

T3 (5'-TTCTCGAGGGGGGTTGCTTGGCTGGT-3'): tiesioginis pradmuo naudotas pET21b-CA VB-6xHis (34-317) plazmidės kūrimui.

A3 (5'-GTCATATGTGCAGCCTCTATACTTGTA-3'): atvirkštinis pradmuo naudotas pET21b-CA VB-6xHis (34-317) plazmidės kūrimui.

Genetinių konstrukcijų kūrimui naudoti vektoriai (*Novagen*):

- pET 15b
- pET 21b

Terpės:

Terpės paruoštos remiantis laboratorijos vadovu (Green, Sambrook, 2012):

- **Agarizuota 1,5 %LB (Luria/Miller) mitybinė terpė**
- **LB mitybinė terpė**
- **SOC mitybinė terpė**

BHI (Brain Heart Infusion) mitybinė terpė – ruošta pagal gamintojo nurodymus.

Buferiniai tirpalai ir tirpalai:

Buferiniai tirpalai ir tirpalai paruošti remiantis laboratorijos vadovu (Green, Sambrook, 2012):

- **Akrilamidas/Bis – akrilamidas 30%**
- **1,5 M TRIS, pH 8,8**
- **0,5 M TRIS, pH 6,8**
- **10% amonio persulfatas**
- **10% natrio dodecilsulfatas**
- **0,5 % bromfenolio mėlis**
- **Coomassie Brilliant Blue R-250 dažo tirpalas**
- **Pavyzdžio buferinis tirpalas 6x**
- **Elektroforezės buferinis tirpalas 10x**
- **TAE DNR elektroforezės buferinis tirpalas 50x**

1 M IPTG tirpalas: 5 g IPTG tirpinama 21 mL dejonizuoto vandens.

Kompetentinių ląstelių transformacijos buferinis tirpalas: 15 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 250 mM KCl, 55 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mM PIPES. Tirpalas be PIPES filtruojamas ir laikomas -20°C temperatūroje. PIPES į bendrą kompetentinių ląstelių ruošimo tirpalą dedamas prieš pat naudojimą.

Biomasės ardymo buferinis tirpalas: 25 mM TRIS, 0,1 M NaCl, 0,1 M imidazolo, 1% tritono, 2 mM β -merkaptio etanolis, proteazių slopiklių tabletė, 1 mM PMSF, *pH* 7,50.

Gryninimo buferinis tirpalas A: 25 mM TRIS, 0,1 M NaCl, 0,1 M imidazolo, 10% glicerolio, 2 mM β -merkaptio etanolis, *pH* 7,50.

Gryninimo buferinis tirpalas B: 25 mM TRIS, 0,1 M NaCl, 0,5 M imidazolo, 10% glicerolio, 2 mM β -merkaptio etanolis, *pH* 7,50.

Saugojimo buferinis tirpalas: 25 mM TRIS, 0,1 M NaCl, 10% glicerolio, 1mM DTT, *pH* 7,50.

2.2 Metodai

2.2.1 Klonavimas, ekspresija, gryninimas

Genetinių konstrukcijų kūrimas:

Polimerazinė grandininė reakcija, DNR elektroforezė 1,5 % agarozės gelyje, PGR produkto ir vektoriaus restrikcija – restrikcijos endonukleazėmis Nde I ir Xho I, linearizuoto vektoriaus defosforilinimas krevečių šarmine fosfataze (SAP) ir ligavimas T4 DNR ligaze buvo atlikti naudojantis laboratorijos vadovu (Green, Sambrook,, 2012). PGR produktas iš PGR mišinio buvo išgrynintas naudojant „GeneJET™ PCR Purification Kit“ rinkinį. Sukarpytas PGR produktas bei linearizuota plazmidė UV šviesoje buvo išpjauti iš agarozės gelio ir gryninami naudojant „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ rinkinį. Dirbta pagal gamintojo pateiktą protokolą. Išskirtos DNR ir išgrynintų produktų koncentracija matuota „NanoDrop“ spektrofotometru ($\lambda = 260$ nm).

Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas

1. *E. coli* ląstelės steriliai užsėjamos ant kietos agarizuotos LB mitybinės terpės su selektyviu kiekvienam kamienui antibiotiku Petri lėkštelėje ir auginamos per naktį 37°C temperatūroje, kol susiformuoja pavienės kolonijos.
2. Perkeliama viena *E. coli* bakterijų kolonija iš Petri lėkštelės į 10 mL LB mitybinę terpę su selektyviu kiekvienam kamienui antibiotiku, auginama termostatuojamoje 16 val., 37°C temperatūroje esant 250 aps/min.
3. Į kolbą su LB mitybine terpe ir selektyviu kiekvienam kamienui antibiotiku perkeliama pradinė kultūra, skiedžiant ją santykiu 1:100. Auginama termostatuojamoje purtyklėje 37°C temperatūroje esant 250 aps/min, kol ląstelių suspensijos optinis tankis ($\lambda = 600$ nm) pasiekia apie 0,55.
4. Kolba perkeliama į ledo vonią, kur laikoma 10 min.
5. Ląstelės centrifuguojamos 10 min esant 1500 g 4°C temperatūroje.
6. Pašalinamas supernatantas.
7. Ląstelės atsargiai suspenduojamos šaltame transformacijos buferiniame tirpale (80 ml).
8. Pakartojami 5 ir 6 etapai.

9. Ląstelės atsargiai suspenduojamos šaltame transformacijos buferiniame tirpale (20 ml). Pridedama 1,5 mL DMSO, sumaišoma ir inkubuojama 10 min ledo vonioje.
10. Kompetentinės ląstelės išpilstomos į atšaldytus ependorfinius mėgintuvėlius (po 100 µL) bei užšaldomos skystame azote. Laikomos -80°C temperatūroje.

Kompetentinių XL1-blue, BL21 (DE3), Rosetta 2 (DE3), BL21 (DE3)-CodonPlus-RIL ląstelių transformacija:

1. Paruoštos Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe bei atrankiu antibiotiku, šildomos 37°C temperatūroje apie 1 val.
2. Į 50 µl kompetentinių ląstelių įdedama 1 µl plazmidės (1µg/µl plazmidės).
3. Transformacijos mišinys inkubuojamas 30 min ledo vonioje.
4. Vykdomas temperatūrinis šokas 90 s 42°C temperatūroje.
5. Mėgintuvėlis su mišiniu perkeliamas į ledo vonią ir ten laikomas 2 min.
6. Į reakcijos mišinį pridedama 400 µl skystos SOC terpės bei atliekama inkubacija termostatuojamoje purtyklėje 37°C temperatūroje 45 min esant 220 aps/min.
7. 50 µl transformuotų kompetentinių ląstelių tūris steriliai užsėjamas ant pašildytos Petri lėkštelės.
8. Lėkštelė inkubuojama termostate 37°C temperatūroje 16 val.

Plazmidinės DNR gryninimas sekoskaitai nustatyti:

Plazmidinės DNR išskyrimui iš *E. coli* XL1 blue kamieno bakterijų biomasės naudojamas „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį. Gryninta pagal standartinį protokolą. DNR koncentracija nustatyta „NanoDrop“ spektrofotometru ($\lambda = 260$ nm).

CA VB baltymo raiška *E. coli* kamienuose:

1. Mitybinė terpė (LB arba BHI) su atrankiu antibiotiku (50 mg/ml ampicilino bei 20 mg/ml chloramfenikolio (chloramfenikolis naudojamas, kai transformuojamos Rosetta 2 (DE3) ir BL21 (DE3)-CodonPlus-RIL kompetentinės ląstelės)) užsėjama viena kolonija iš Petri lėkštelės ir auginama per naktį 37°C temperatūroje esant 250 aps/min.
2. Per naktį auginta kultūra persėjama į naują terpę (LB arba BHI, skiedžiant ją santykiu 1:100) su atrankiu antibiotiku (50 mg/ml ampicilino bei 20 mg/ml chloramfenikolio (chloramfenikolis naudojamas, kai transformuojamos Rosetta 2 (DE3) ir BL21 (DE3)-CodonPlus-RIL kompetentinės ląstelės)) ir 0,1 mM ZnSO₄.

3. Auginama termostatuojamoje purtyklėje (180 aps/min) 37°C temperatūroje, kol optinis tankis pasiekia ~0,5 ($\lambda=600$ nm).
4. Prieš CA VB raiškos indukciją paruošiamas kontrolinis mėginys, rodantis ląstelės baltymų raišką prieš tikslinio baltymo raiškos indukciją. Paimama 300 μ l ląstelių suspensijos, nucentrifuguojama, supernatantas nupilamas, biomasė suspenduojama 30 μ l pavyzdžio buferiniame tirpale, kaitinama 5 min 95°C temperatūroje.
5. Tikslinio baltymo raiškos indukcija atliekama pridodant IPTG tirpalo (galutinė koncentracija 0,1 mM) ir 0,1 mM ZnSO₄. Biomasė auginama 4 val. 30°C temperatūroje.
6. Tikslinio baltymo raiškos įvertinimui po indukcijos paruošiamas visų ląstelės baltymų mėginys. Norint paimti vienodą ląstelių kiekį prieš ir po indukcijos, pamatuojamas ląstelių optinis tankis pasibaigus auginimo laikui ir padalinamas iš optinio tankio, buvusio prieš tikslinio baltymo indukciją. Gautas santykis parodo, kiek kartų reikia skiesti ląstelių suspensiją mitybine terpe, kad jos optinis tankis būtų lygus kontrolinio ląstelių baltymų mėginio optiniam tankiui. Mėginys centrifuguojamas, vandeninė frakcija pašalinama, nuosėdos suspenduojamos 30 μ l pavyzdžio buferiniame tirpale ir kaitinamas 5 min 95°C temperatūroje.
7. Užauginta bakterijų kultūra centrifuguojama 15 min 6000 aps/min greičiu, supernatantas pašalinamas, biomasė laikoma –20°C temperatūroje.
8. Mėginiai (prieš indukciją ir po jos) analizuojami NDS-PAAG būdu.

CA VB baltymo tirpumo nustatymas:

Biomasė tirpinama ardymo buferiniame tirpale maišant 1 val., 4°C temperatūroje. Ardoma ultragarsu („Bandolin Sonopuls“, VS 70T angalis) 10 min, kas 60 s darant 60 s pertrauką, esant 70% amplitudei. Lizatas centrifuguojama 20 min 20000 aps/min greičiu 4°C temperatūroje. Supernatantas leidžiamas per mažą (1 ml) chromatografijos kolonėlę (Sephacrose 6B-CL IDA) su imobilizuotais Ni⁺² jonais. Baltymas desorbuojamas gryninimo buferiniu tirpalu B. Bradfordu metodu nustatoma ar frakcijose yra baltymo. Frakcijos, kuriose buvo kiekybiškai nustatytas baltymas analizuojamos NDS-PAAG būdu.

CA VB baltymo gryninimas:

Biomasė tirpinama ardymo buferiniame tirpale maišant 1 val., 4°C temperatūroje. Ardoma ultragarsu („Bandolin Sonopuls“, VS 70T angalis) 15 min, kas 60 s darant 60 s pertrauką, esant 70% amplitudei. Centrifuguojama 20 min 20000 aps/min greičiu.

Supernatantas leidžiamas per chromatografijos kolonėlę (Sephacrose 6B-CL IDA) su imobilizuotais Ni^{+2} jonais. Baltymas desorbuojamas didinant konkurentinio ligando (imidazolo) koncentraciją (gryninimo buferinis tirpalas A ir B). Baltymo koncentracija nustatoma Bradfordo metodu. Chromatografijos frakcijos tikrinamos NDS-PAAG būdu, remiantis elektroforegrama ir chromatograma sujungiamos tikslinį baltymą turinčios frakcijos. Baltymas koncentruojamas, po to atliekama dializė saugojimo buferiniame tirpale. Saugoma – 80°C temperatūroje.

Baltymų elektroforezė:

Elektroforezė 12% NDS-PAAG, denatūruojant baltymo molekules atliekama Lemlio metodu (Laemmli 1970).

Kiekybinis baltymų nustatymas:

Baltymų koncentracija mėginiuose buvo nustatyta Bradfordo metodu (Bradford, 1976).

2.2.2 Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodas

Eksperimentai atliekami Microcal VP-ITC kalorimetru. Kiuvetės tūris 1,4 ml, švirkšto tūris – 250 μl . Ruošiami du mėginiai po 2 ml: baltymo tirpalas, kuris pilamas į kiuvetę ir slopiklio tirpalas, kuriuo užpildomas švirkštas. Prieš pradedant ITC eksperimentą palaukiama, kol nusistovės bazinė linija.

Naudojamas baltymo ir ligando koncentracijų santykis 1:10. Toks koncentracijų santykis rekomenduojamas tam, kad būtų galima išmatuoti jungimosi ir skiedimosi šilumas, t.y. visi baltymo aktyvieji centrai turi būti išotinti ligandu maždaug eksperimento viduryje. ITC eksperimentuose kiekvienos pridėtos ligando injekcijos sukeltas šilumos pokytis priklauso nuo reakcijos tūrio, koncentracijų, jungimosi entalpijos pokyčio, jungimos

konstantos, skiedimosi šilumos, stochiometrijos ir nuo prieš tai pridėto slopiklio kiekio. Po kiekvienos injekcijos sumažėja neužimtų ligando prisijungimo centrų ir todėl mažėja šilumos pokytis. Visas šilumos kiekis po i -tosios injekcijos apskaičiuojamas, kai V_0 – mėginio kiuvetės tūris, ΔH – sąveikos entalpija, $[ML]_i$ – susidariusio komplekso koncentracija po i -tosios injekcijos:

$$Q = V_0 \Delta H \sum \Delta [ML]_i = V_0 \Delta H [ML]_i \quad (5)$$

Atliekant eksperimentus baltymo koncentracija 5 μM , o slopiklio 50 μM , jų tirpalus sudaro vienodos pagalbinių medžiagų koncentracijos: 50 mM Tris buferinio tirpalo, 100 mM NaCl ir 1% DMSO. Eksperimentuose taikytas maišymo greitis 260 aps/min, atliekamos 25 injekcijos, vienos injekcijos tūris 10 μl , o tarpas tarp injekcijų – 200 s. Eksperimentai atlikti 25°C temperatūroje.

2.2.3 Terminio poslinkio metodas

Prieš atliekant eksperimentus terminio poslinkio metodu slopiklis ištirpinamas DMSO, tuomet skiedžiamas iki norimos koncentracijos buferiniu tirpalu (DMSO galutinė koncentracija tirpale 2%). Baltymo ir ligando tirpalai ruošiami atskirai, po to į mėgintuvėlius išpilstomi po 10 μl baltymo ir tam tikros koncentracijos ligando tirpalai. Eksperimentai atlikti esant pastoviai galutinei baltymo koncentracijai – 5 μM ir kintamoms slopiklių koncentracijoms (200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,13 μM ir 0 μM). Matavimams naudotas universalus buferinis tirpalas (pH nuo 5,0 iki 9,5) bei fosfatinis buferinis tirpalas (pH 7,0), turintis 100 μM NaCl ir 100 μM ANS. ANS paskirtis – dažas reporteris, kurio fluorescencija kinta išsivyniojant baltymui. Iš baltymo išsivyniojimo kreivės galima nustatyti jo denatūracijos temperatūrą (T_m), kuriai esant baltymo išsivyniojimo grįžtamoji reakcija yra pusiausvyros būsenoje, o natyvaus ir išsisukusio baltymo struktūrų koncentracijos yra lygios. Eksperimentai atliekami R-Corbet fluorimetru, keliant temperatūrą 1°C per minutę intervale nuo 25°C iki 100°C. Fluorescencijos priklausomybę nuo temperatūros aproksimuojame kreive:

$$y = \frac{(y_n + m_n T) + (y_u + m_u T) \times e^{\frac{-\Delta H_u^{T_m}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) + \frac{\Delta C_{p,u}}{R} \left(\ln \left(\frac{T}{T_m} \right) + \frac{T_m}{T} - 1 \right)}}{1 + e^{\frac{-\Delta H_u^{T_m}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) + \frac{\Delta C_{p,u}}{R} \left(\ln \left(\frac{T}{T_m} \right) + \frac{T_m}{T} - 1 \right)}} \quad (6)$$

kur T – absoliučioji temperatūra; $\Delta H_u^{T_m}$ – baltymo išsivyniojimo entalpinis pokytis; $\Delta C_{p,u}$ – šiluminė talpa; y_n ir y_u – atitinkamai natyvaus ir denatūravusio baltymo fluorescencija (ikitransitinė ir potransitinė linijos priklausomos nuo temperatūros); m_n ir m_u – atitinkamai natyvaus ir denatūravusio baltymo fluorescencijos tiesių nuokrypio kampai.

Pateiktuose rezultatuose baltymo denatūracijos temperatūros nuo ligando koncentracijos aprašoma modeliu, kuris remiasi formule:

$$L_t = (1 - K_u^{T_m}) \left(\frac{P_t}{2} + \frac{1}{K_u^{T_m} K_{b,n}^{T_m}} \right) \quad (7)$$

Kur L_t – bendra ligando koncentracija; P_t – bendra baltymo koncentracija; $K_u^{T_m}$ – baltymo denatūracijos pusiausvyros konstanta; $K_{b,n}^{T_m}$ – jungimosi pusiausvyros konstanta.

Lygtis nusako priklausomybę tarp jungimosi ir denatūracijos pusiausvyros konstantų bei bendrą ligando ir baltymo koncentracijų.

2.2.4 Aktyvumo matavimas sustabdytos tėkmės metodu

Fermento aktyvumo nustatymui buvo naudota sustabdytos tėkmės (*angl.* stopped-flow) technika („Applied Photophysics“). Matavimų metu naudojami du tirpalai: pirmąjį sudaro karboanhidrazė, buferinis tirpalas (20 mM HEPES, 20 mM NaCl, *pH* 7,4) ir indikatorius (bromtimolio mėlynasis), antrąjį – CO₂ prisotintas dejonizuotas vanduo. Bėgant laikui H₂CO₃ rūgštis mažina tirpalo *pH*, todėl indikatoriaus šviesos sugertis mažėja iki pastovios vertės. Pagal indikatoriaus šviesos sugerties pokytį įvertinamas karboanhidrazės aktyvumas. Tiriant savaiminę CO₂ hidratacijos reakciją į pirmąjį tirpalą nededama karboanhidrazės.

2.2.5 Duomenų apdorojimas, statistinė analizė

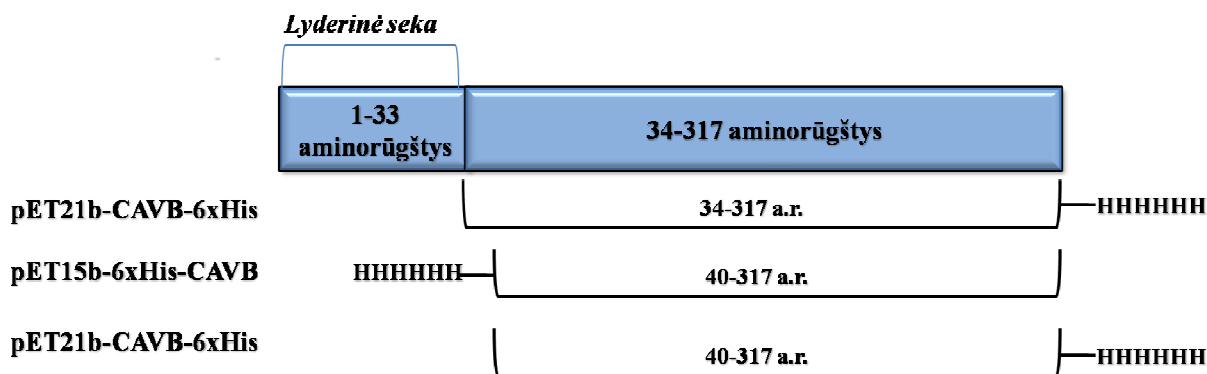
CA VB geno klonavimas planuotas naudojantis programomis: A plasmid Editor v1.17 (ApE) ir pDRAW32 1.0. Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu gauti rezultatai apdoroti Microcal™Origin™v5,0 programa. Terminio poslinkio metodu gauti rezultatai apdoroti ThermoFluor++1.4.2 programa. Grafikai nubraižyti GraphPad Prism 6 programa.

Reikšmės, kurių įvertinta matavimų standartinė paklaida, pateikiamos, kaip trijų matavimų vidurkis (terminio poslinkio ir izoterminio titravimo kalorimetrijos metodais gauti duomenys). Statistinė analizė atlikta GraphPad Prism 6 programa.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

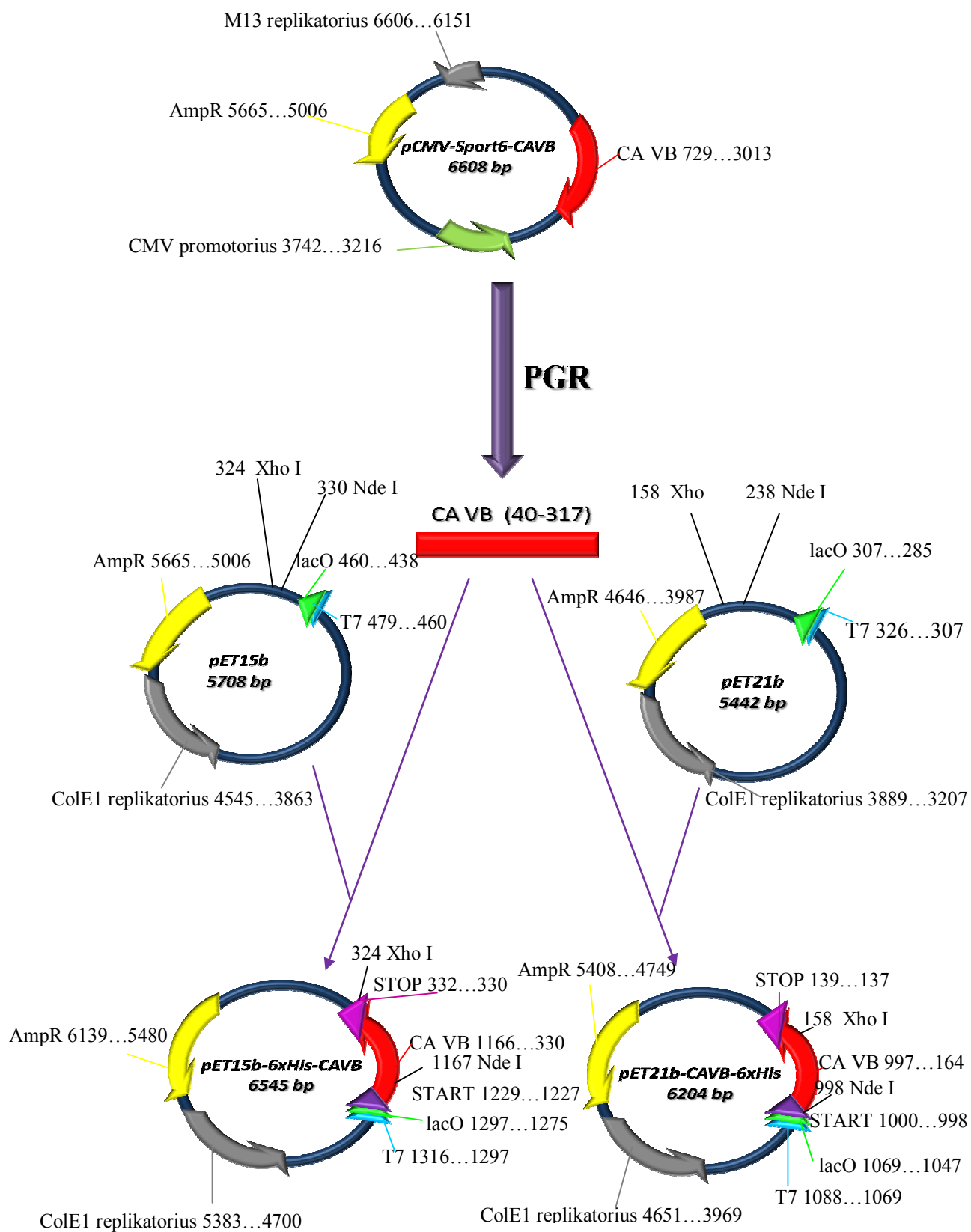
3.1 CA VB genetinių konstrukcijų kūrimas, ekspresija ir gryninimas

Moksliniame tiriamajame darbe CA VB tikslinio baltymo gavimui buvo naudotos trys genetinės konstrukcijos, kurios viena nuo kitos skyrėsi aminorūgščių skaičiumi, heksahistidino uodegėlės pozicija bei raiškos vektoriais (8 pav.).



8 pav. Genetinės konstrukcijos naudotos tikslinio CA VB baltymo gavimui.

Naudojant pirmąją pateiktą genetinę konstrukciją nepavyko gauti stabilaus baltymo, su kuriuo būtų galima atlikti tolimesnius tyrimus. Todėl buvo nuspręsta sukurti dvi naujas genetines konstrukcijas (9 pav.), kurios atitinka UniProt duomenų bazėje pateiktą (Q9Y2D0) žmogaus CA VB baltymo seką nuo 40 iki 317 aminorūgšties. Nuo pirmosios genetinės konstrukcijos likusios dvi skyrėsi tuo, kad jų ekspresuojamų tikslinių baltymų sekos šešiomis aminorūgštimis trumpesnės. Nuspręsta sutrumpinti baltymo seką, nes tarp pašalintų aminorūgščių buvo du cisteinai, kurie galbūt galėjo oksiduotis, sudaryti tarpusavyje disulfidinius tiltelius ir lemti tai, jog baltymas buvo nestabilus bei sudarydamas agregatus krito į nuosėdas.



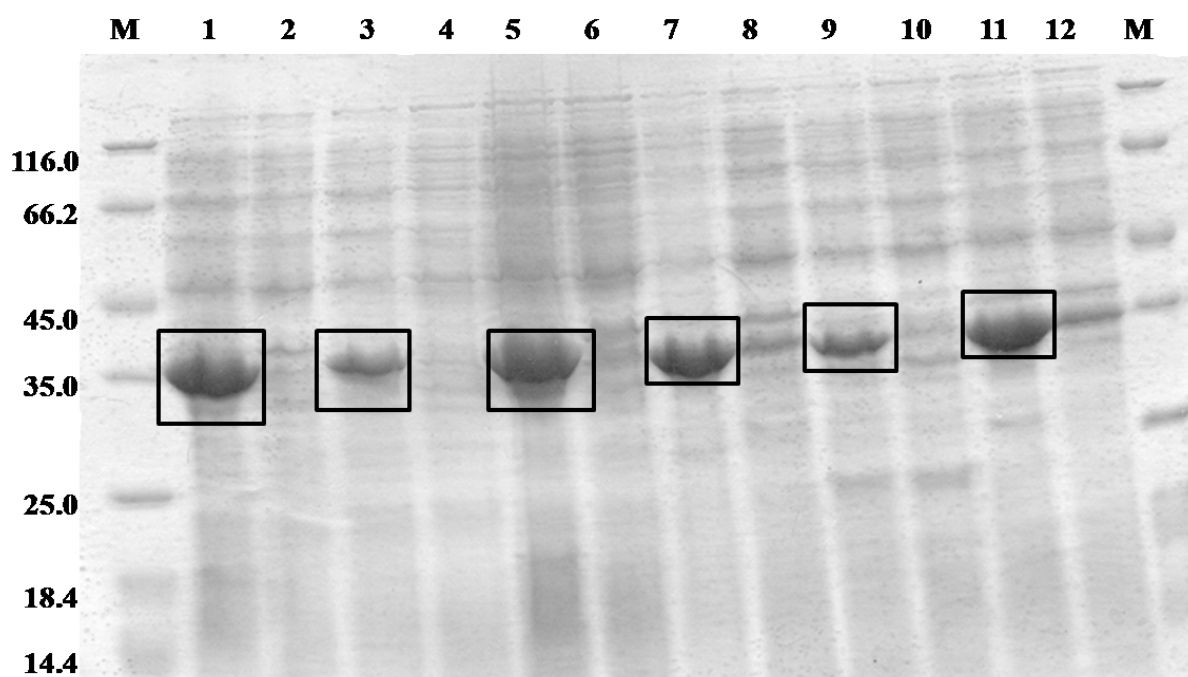
9 pav. Klonavimo schema. Nuo pCMV-SPORT6-CAVB plazmidės PGR metodu gautas CA VB fragmentas, koduojantis baltymą nuo 40 iki 317 aminorūgšties, įsiuvas į baltymų raiškos vektorius pET15b ir pET21b. Gautos dvi genetinės konstrukcijos: pET15b-6xHis-CAVB ir pET21b-CAVB-6xHis.

Prieš patikrinant baltymų raišką tikslinių genų sekos nustatytos VU Biotechnologijos instituto sekvenavimo centre. Apskaičiuotos baltymų molekulinės masės, teoriniai izoelektriniai taškai (*pI*) bei ekstinkcijos koeficientai naudojant Šveicarijos bioinformatikos instituto internetiniame puslapyje pateiktu „ProtParam“ įrankiu (1 lentelė).

1 lentelė. Rekombinantinių CA VB baltymų molekulinės masės, teoriniai *pI* taškai ir ekstinkcijos koeficientai.

Genetinės konstrukcijos pavadinimas	Molekulinė masė, kDa	Teorinis <i>pI</i>	Ekstinkcijos koeficientas,
pET21b-CAVB-6xHis	33,10	6,33	55920
pET15b-6xHis-CAVB	34,19	6,57	56045

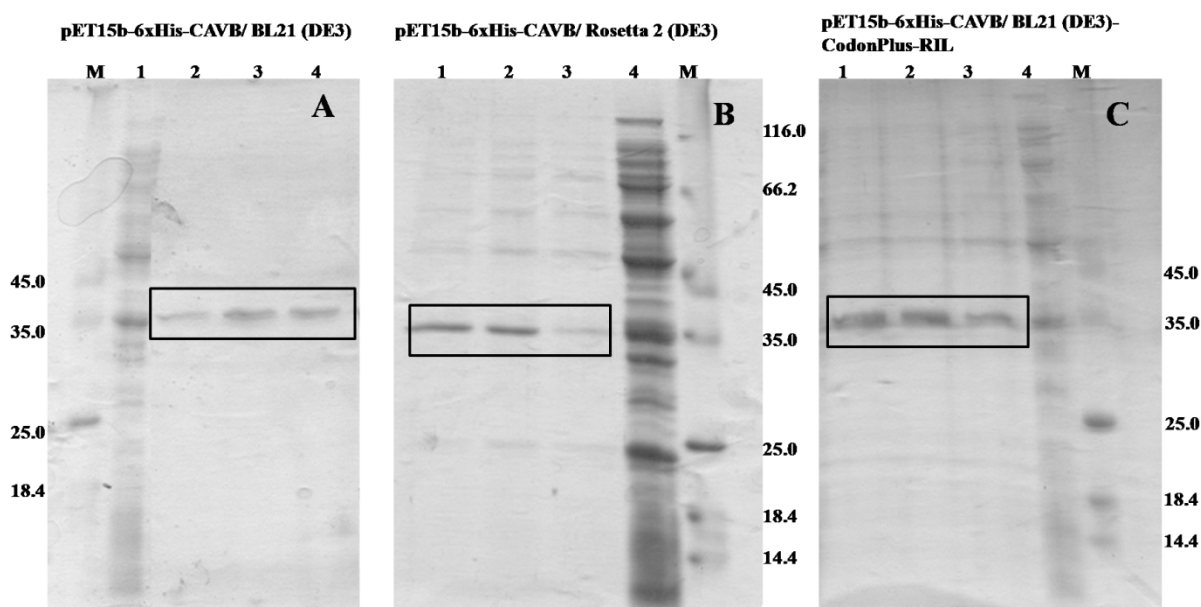
Atlikta kompetentinių *E.coli* BL21(DE3), Rosetta 2 (DE3), BL21(DE3)-CodonPlus-RIL ląstelių transformacija, naudojant DNR plazmides, ir patikrinta baltymų raiška (10 pav.).



10 pav. CA VB baltymo raiškos patikrinimas NDS-PAAG, kai transformuojami skirtingi *E. coli* kamienai, naudojant skirtingas DNR plazmides. M – baltymų dydžio žymuo SM0431; 1,2 – ląstelių suspensijos mėginiai po ir prieš CA VB raiškos indukciją, kai transformuotos BL21(DE3)-CodonPlus-RIL ląstelės, naudojant pET21b-CAVB-6xHis; 3,4 – ląstelių suspensijos mėginiai po ir prieš CA VB raiškos indukciją, kai transformuotos Rosetta 2 (DE3) ląstelės, naudojant pET21b-CAVB-6xHis; 5,6 – ląstelių suspensijos mėginiai po ir prieš CA VB raiškos indukciją, kai transformuotos BL21(DE3) ląstelės, naudojant pET21b-CAVB-6xHis; 7,8 – ląstelių suspensijos mėginiai po ir prieš CA VB raiškos indukciją, kai transformuotos BL21(DE3)-CodonPlus-RIL ląstelės, naudojant pET15b-6xHis-CAVB; 9,10 – ląstelių suspensijos mėginiai po ir prieš CA VB raiškos indukciją, kai transformuotos Rosetta 2 (DE3) ląstelės, naudojant pET15b-6xHis-CAVB; 11,12 – ląstelių suspensijos mėginiai po ir prieš CA VB raiškos indukciją, kai transformuotos BL21(DE3) ląstelės, naudojant pET15b-6xHis-CAVB.

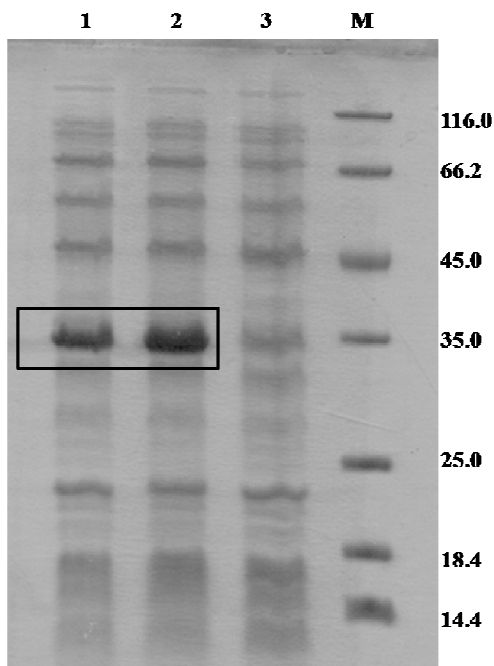
Remiantis NSD – PAAG rezultatais galima teigti, jog transformavus skirtingus *E.coli* kamienus, naudojant pET21b-CAVB-6xHis ir pET15b-6xHis-CAVB plazmides, stebima CA VB baltymo biosintezė, o raiškos lygis yra pakankamas norint atlikti tolimesnius tyrimus. Tačiau atlikus baltymų tirpumo patikrinimą nustatyta, jog, kai tikslinio baltymo gavimui

naudojama pET21b-CAVB-6xHis plazmidė, CA VB baltymas sintetinamas intarpiniais kūneliais, tuo tarpu naudojant pET15b-6xHis-CAVB – gautas tirpus baltymas (11 pav.). Dėl šios priežasties CA VB tikslinio baltymo biomasės auginimui pasirinkta genetinė konstrukcija, turinti CA5B geną, koduojantį CA VB baltymą nuo 40 iki 317 aminorūgšties bei N' – gale turintį šešių histidinių uodegėlę (pET15b-6xHis-CAVB).



11 pav. CA VB baltymo tirpumo patikrinimas NDS-PAAG, kai transformuoti skirtingi *E. coli* kamieniai, naudojant pET15b-6xHis-CAVB genetinę konstrukciją. A – CA VB baltymo tirpumo patikrinimas, kai transformuotos BL21 (DE3) ląstelės; B – CA VB baltymo tirpumo patikrinimas, kai transformuotos Rosetta 2 (DE3) ląstelės; C – CA VB baltymo tirpumo patikrinimas, kai transformuotos BL21(DE3)-CodonPlus-RIL ląstelės. M – baltymų dydžio žymuo SM0431; 1 (A), 4 (B), 4 (C) – suardytų ląstelių mėginiai; 2-4 (A), 1-3 (B) ir 1-3 (C) – tirpių baltymų frakcijų mėginiai.

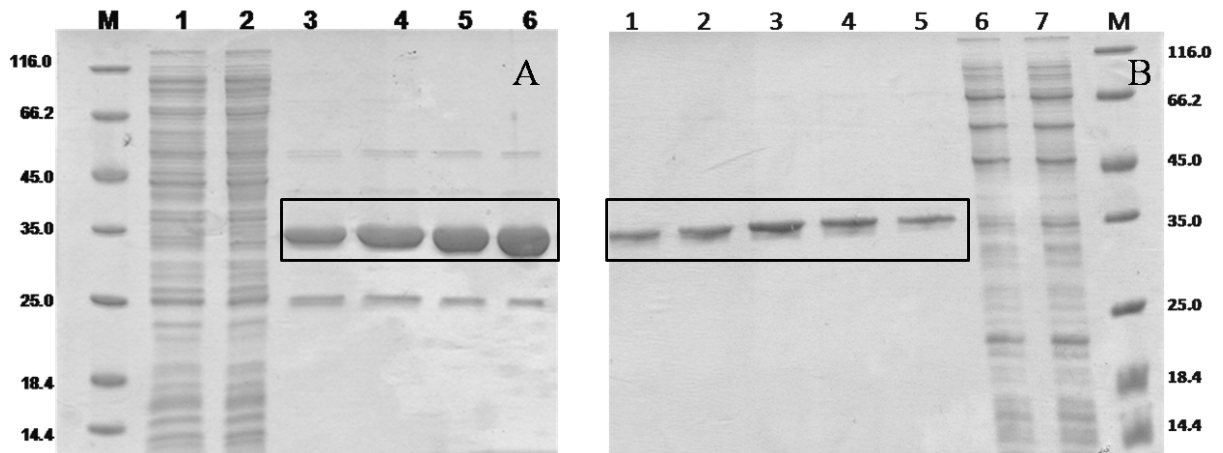
Biomasės auginimo sąlygas buvo stengiamasi parinkti tokias, kad baltymas būtų ne tik tirpus, bet ir jo gaunamas kiekis būtų kuo didesnis. Todėl po indukcijos IPTG biomasė buvo auginama skirtingą laiko tarpą (12 pav.), kad būtų galima įvertinti, kuriuo pasirinktu būdu baltymo ekspresija yra didesnė.



12 pav. CA VB baltymo raiškos patikrinimas, biomasę auginant skirtingą laiko periodą (Rosetta 2 (DE3) ląstelės). M – baltymų dydžio žymuo SM0431; 1 – ląstelių suspensijos mėginys po 20 val. indukcijos 20 temperatūroje; 2 – ląstelių suspensijos mėginys po 4 val. indukcijos 30 temperatūroje; 3 – ląstelių suspensijos mėginys prieš indukciją.

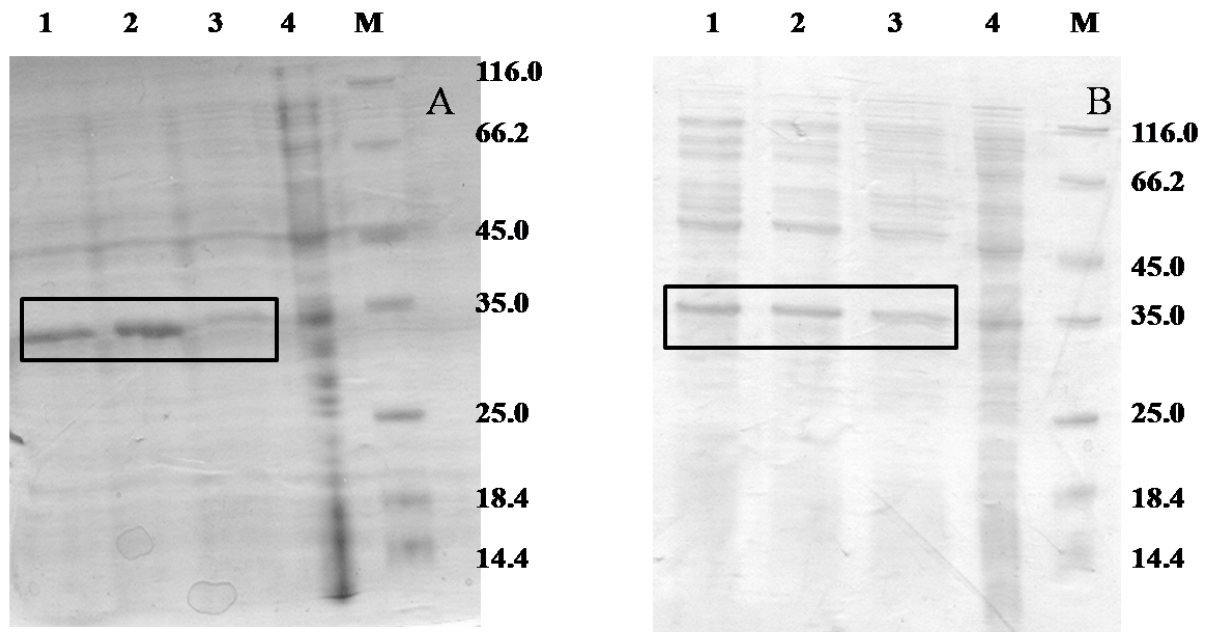
Iš 12 paveiksle pavaizduotos elektroforegramos daroma išvada, jog baltymo raiška geresnė, kai indukcija atliekama 4 val. 30 temperatūroje, o ne 20 val. 20 temperatūroje.

Baltymo gryninimas atliekamas pasitelkiant metalo chelatinę chromatografiją, baltymą desorbuojant linijiniu gradientu didinant konkurentinio ligando koncentraciją (žr. metodai 2.2.1). Biomasė buvo auginama dviejose skirtingose mitybinėse terpėse (LB ir BHI), jų įtaka baltymo raiškai pastebėta nebuvo. Tačiau atlikus gryninimą vienodomis sąlygomis matome, jog, kai biomasė auginama LB mitybinėje terpėje, tikslinis baltymas gaunamas su priemaišomis, kurių nepastebime naudojant BHI mitybinę terpę (13 pav.).



13 pav. CA VB gryninimo metalo chelatinės chromatografijos metodu rezultatai NDS-PAAG. A – biomasė auginta LB mitybinėje terpėje (Rosetta 2 (DE3) ląstelės); B - biomasė auginta LB mitybinėje terpėje (Rosetta 2 (DE3) ląstelės). M – baltymų dydžio žymuo SM0431; 1 (A), 7 (B) – suardytų ląstelių mėginiai prieš baltymo gryninimą; 2 (A), 6 (B) – nesisorbavusios baltymo frakcijos; 3-6 (A) ir 1-5 (B) – baltymo frakcijos po gryninimo.

Biomassės auginimui naudojant tą pačią mitybinę terpę (BHI), tačiau skirtingus transformuotus *E.coli* kamienus, ir gryninimą atliekant tomis pačiomis sąlygomis, pastebėta, jog baltymas be priemaišų gaunamas tik tuomet, kai CA VB raiškai buvo naudotos Rosetta 2 (DE3) ląstelės (13 B-14 pav.).



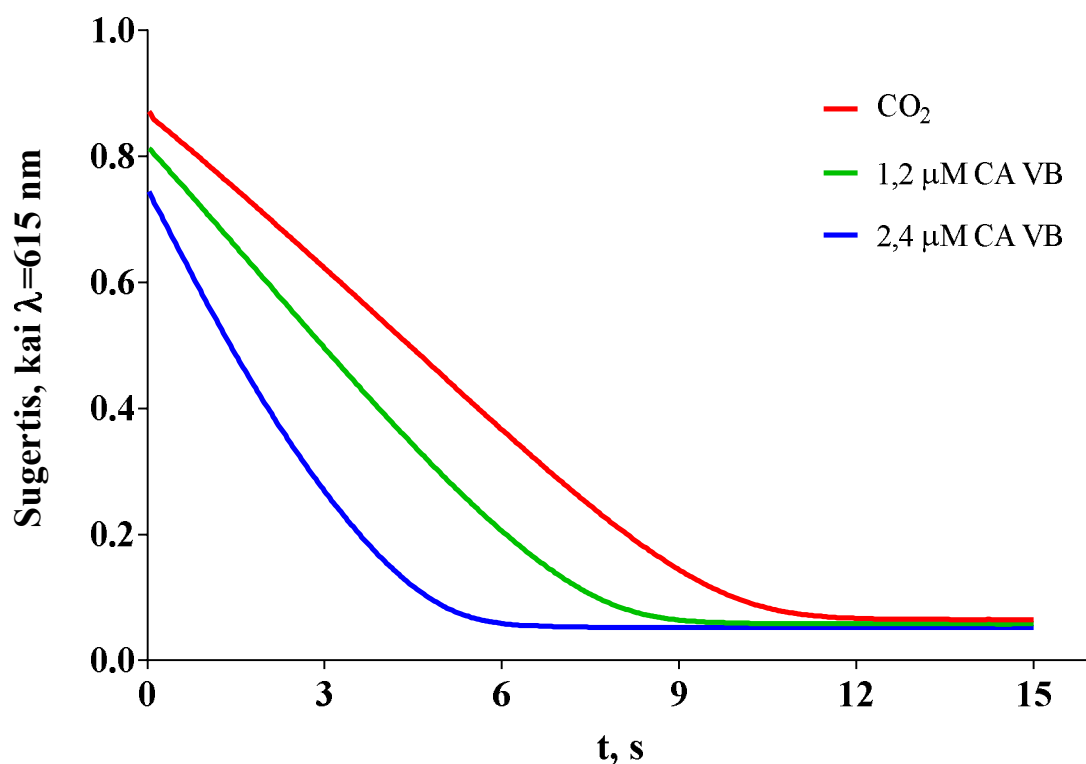
14 pav. CA VB gryninimo metalo chelatinės chromatografijos metodu rezultatai NDS-PAAG. A – CA VB baltymo raiškai naudotos BL21(DE3)-CodonPlus-RIL ląstelės; B – CAVB baltymo raiškai naudotos BL21(DE3) ląstelės. M – baltymų dydžio žymuo SM0431; 4 (A), 4 (B) – suardytų ląstelių mėginiai prieš baltymo gryninimą; 1-3 (A) ir 1-3 (B) – baltymo frakcijos po gryninimo.

Atsižvelgiant į gautus rezultatus, toliau CA VB baltymo gavimui buvo naudojama BHI mitybinė terpė, kompetentinės *E.coli* Rosetta 2 (DE3) ląstelės bei pET15b-6xHis-CAVB genetinė konstrukcija. Gautas baltymo molekulinė masė buvo nustatyta masių spektroskopijos metodu („Agilent Technologies 6520“ skysčių chromatografijos ir masių spektroskopijos aparatu, atliko dr. V.Smirnovas) bei atitiko prieš tai teoriškai apskaičiuotą (1 lentelė). Gautas baltymo kiekis ~7 mg, o jo grynumas daugiau nei 95 % (nustatyta NDS-PAAG).

3.2 Fermentinio aktyvumo nustatymas sustabdytos tėkmės metodu

Sustabdytos tėkmės metodas – tai spektroskopinis metodas, kurio dėka galima nustatyti fermento aktyvumą. Metodas patrauklus tuo, jog įmanoma detektuoti greitai vykstančias reakcijas. Be to reakcijoje dalyvaujantys komponentai sumaišomi labai greitai (mažiau nei per 1 ms), o jų kiekiai nedideli. Metodo ekonomiškumas išskiria jį iš kitų tėkmės metodų ir lemia tai, kad jis plačiai naudojamas biocheminių reakcijų greičių tyrime.

Sustabdytos tėkmės metodu buvo išmatuotas CO₂ hidratacijos greitis. Norint įsitikinti, jog gautas baltymas yra aktyvus ir jį bus galima naudoti termodinaminiuose tyrimuose, atlikti matavimai ir su juo (15 pav.).

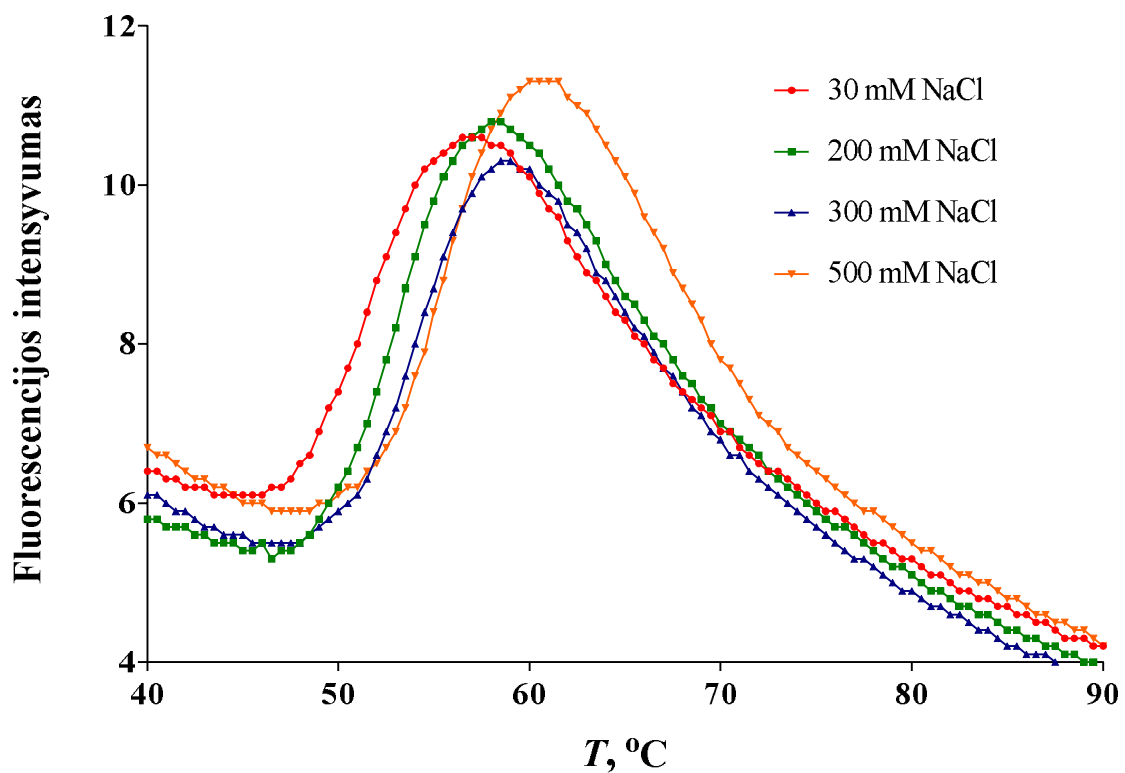


15 pav. Karboanhidrazės VB aktyvumo įvertinimas.

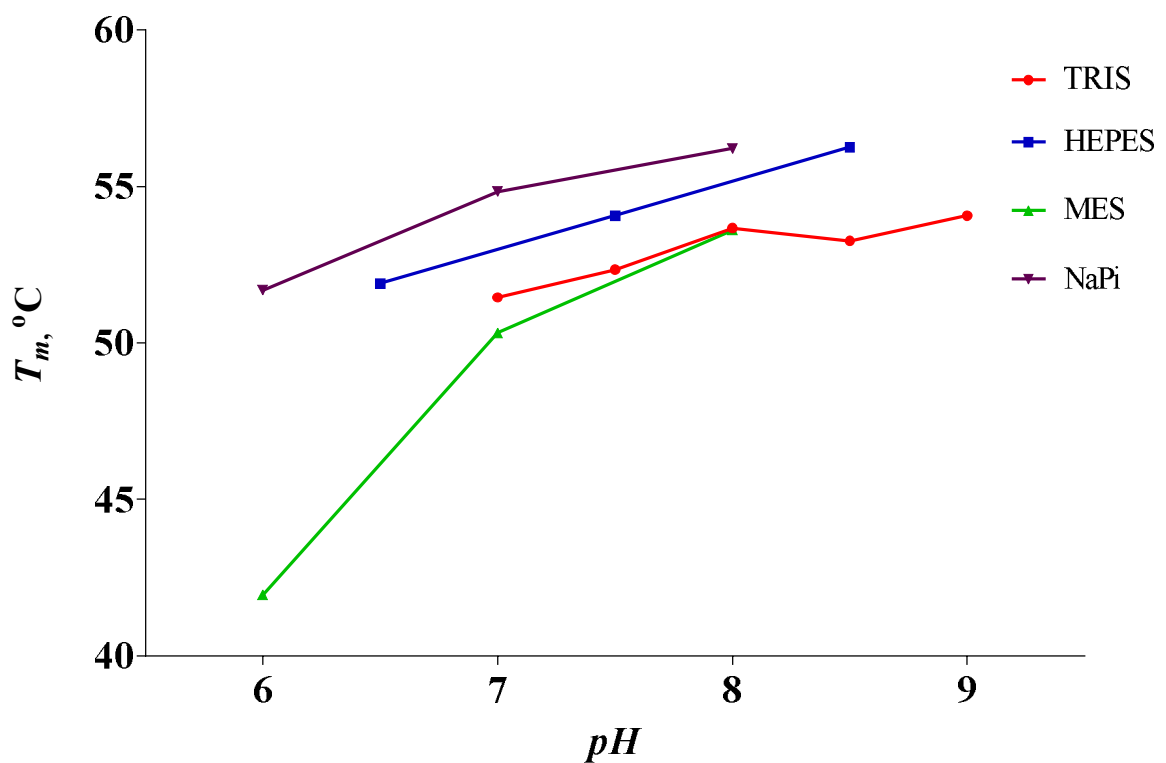
Pateiktame paveiksle matome, kad CO₂ hidratacija iki bikarbonato jono vyksta greičiau, kai reakcijoje dalyvauja CA VB. Reakcijos didesnę greitį lemia ir didėjanti fermento koncentracija. Daroma išvada, jog gautas fermentas yra aktyvus ir jį bus galima naudoti tolimesniuose tyrimuose.

3.3 Baltymo stabilumo įvertinimas

Terminio poslinkio metodu, keliant temperatūrą nuolatiniu per 1 minutę greičiu, buvo įvertinta buferinių tirpalų, jų *pH*, druskos koncentracijos bei slopiklių įtaka rekombinantinės CA VB stabilumui. Metodo esmė – fluorescencinis baltymo temperatūrinis stabilumo tyrimas, esant skirtingoms baltymo laikymo sąlygoms. Kuo didesnė baltymo denatūracijos temperatūra (T_m), tuo stabilesnis baltymas tiriamose sąlygose (16-18 pav.).



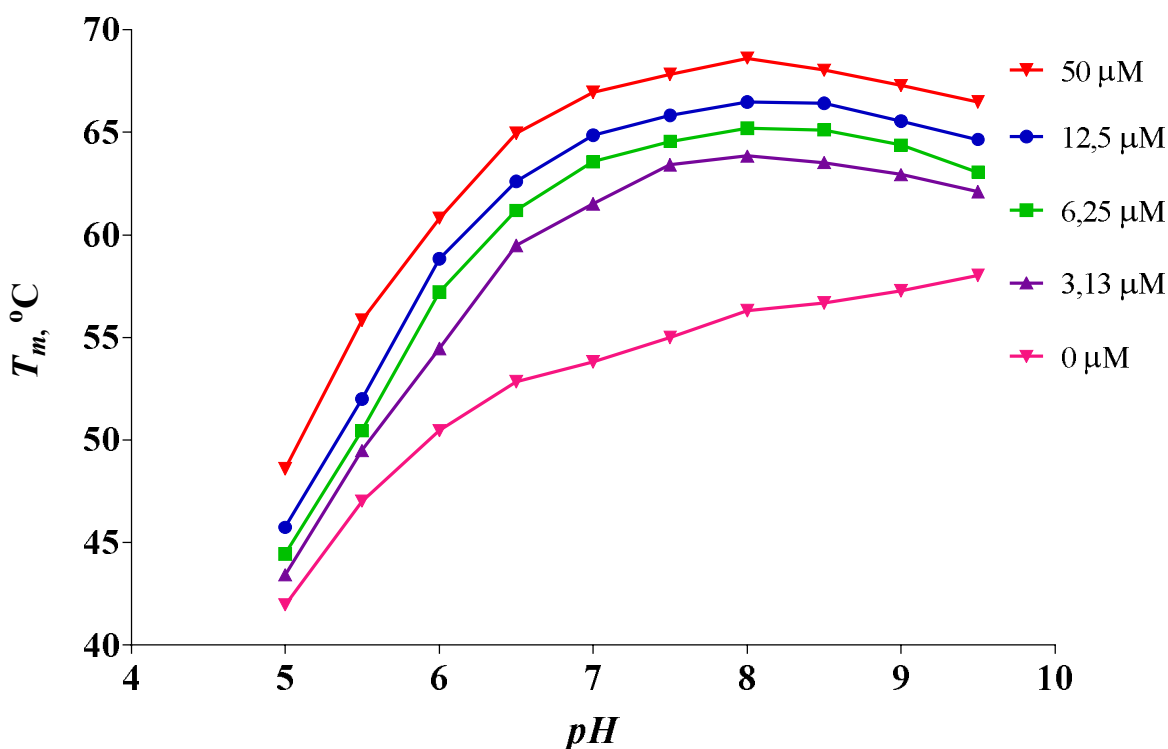
16 pav. Tipinis fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas esant skirtingoms NaCl koncentracijoms, kai CA VB koncentracija pastovi.



17 pav. CA VB denatūracijos temperatūros priklausomybė nuo pH esant skirtingiems buferiniams tirpalams.

Remdamiesi 16 paveikslu galime teigti, jog NaCl druskos buvimas buferiniame tirpale stabilizuoja CA VB, todėl buferinio tirpalo joninės jėgos palaikymui naudojama būtent

ši druska. Taip pat matome, kad baltymo stabilumas didėja, didėjant buferinių tirpalų pH (17 pav.). Didžiausias baltymo denatūracijos temperatūros pokytis stebimas naudojant MES buferinį tirpalą (pH 6,0-7,0). Aukščiausias T_m , kai baltymas yra fosfatiniame buferiniame tirpale. Nors baltymo stabilumas ir didėja didėjant pH , tačiau saugojimui nepasirinktos aukštos pH reikšmės, todėl, jog būtų išlaikytas vienodas buferinio tirpalo komponentų santykis ir nesumažėtų buferinė talpa.

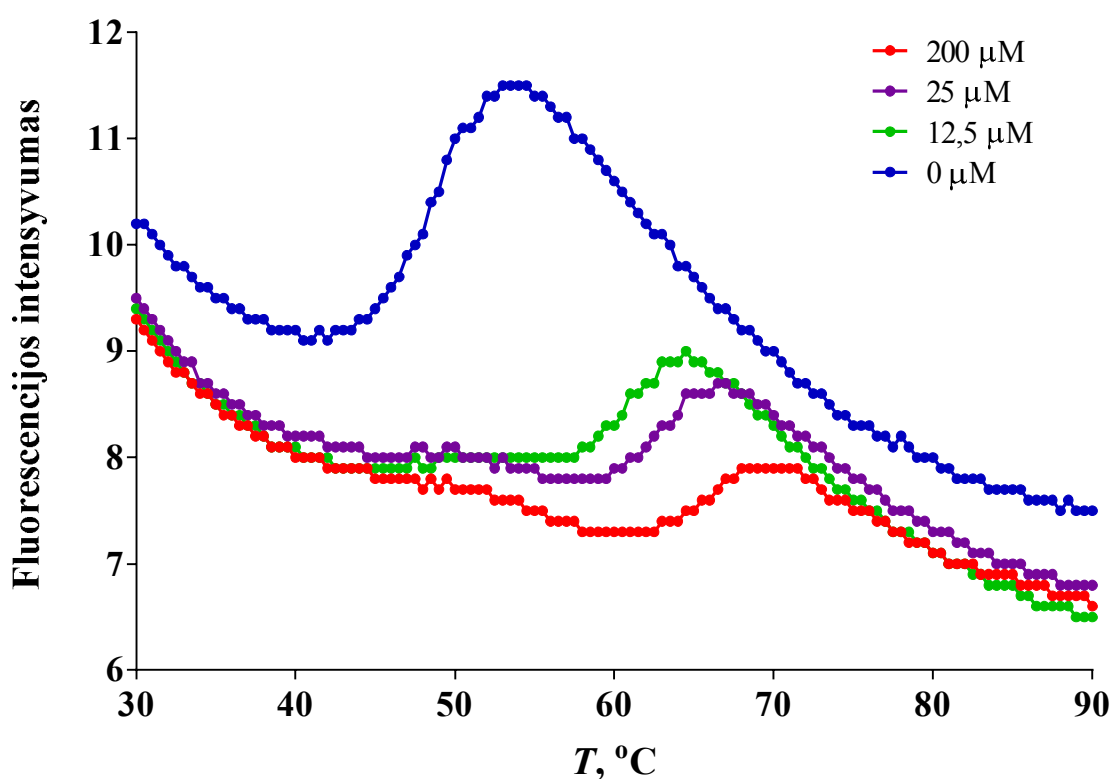


18 pav. Baltymo denatūracijos temperatūros priklausomybė nuo buferinio tirpalo pH jungiantis su komerciniu slopikliu EZA.

TPM eksperimentų metu didinant temperatūrą, baltymas denatūruoja, tačiau baltymą gali stabilizuoti prie jo natyvios būsenos besijungiantis ligandas. 18 paveiksle matome, jog besijungiantis ligandas EZA stabilizuoja CA VB. Taip pat matome, kad baltymo stabilumui įtakos turi ir buferinio tirpalo pH , iki pH 8,0 baltymo stabilumas didėja, vėliau ima mažėti. Jeigu ligandas būtų jungęsis stipriau prie išsivyniojusios baltymo formos nei natyvios, tuomet matytumėme baltymo destabilizaciją. Didėjant baltymo slopiklio koncentracijai, denatūracijos temperatūra mažėtų.

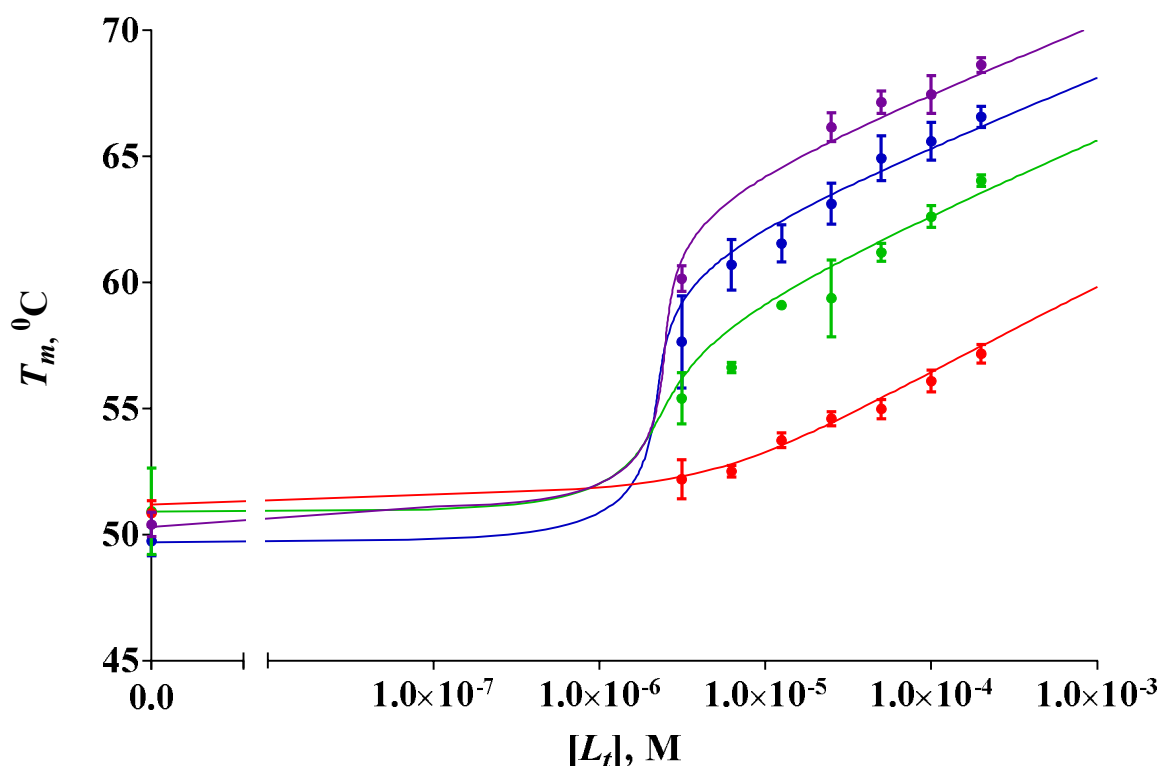
3.4 CA VB sąveikos su slopikliais tyrimas taikant terminio poslinkio metodą

CA VB jungimasis su sulfonamidiniais ligandais buvo išmatuotas taikant terminio poslinkio metodą. Atlikus eksperimentus gaunamos ANS fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros kreivės (19 pav.). Iš gautų TPM kreivių nustatoma baltymo denatūracijos temperatūra (T_m) bei stebimosios jungimosi konstantos ($K_{b,stab}$) esant skirtingoms ligando koncentracijoms (20 pav.).



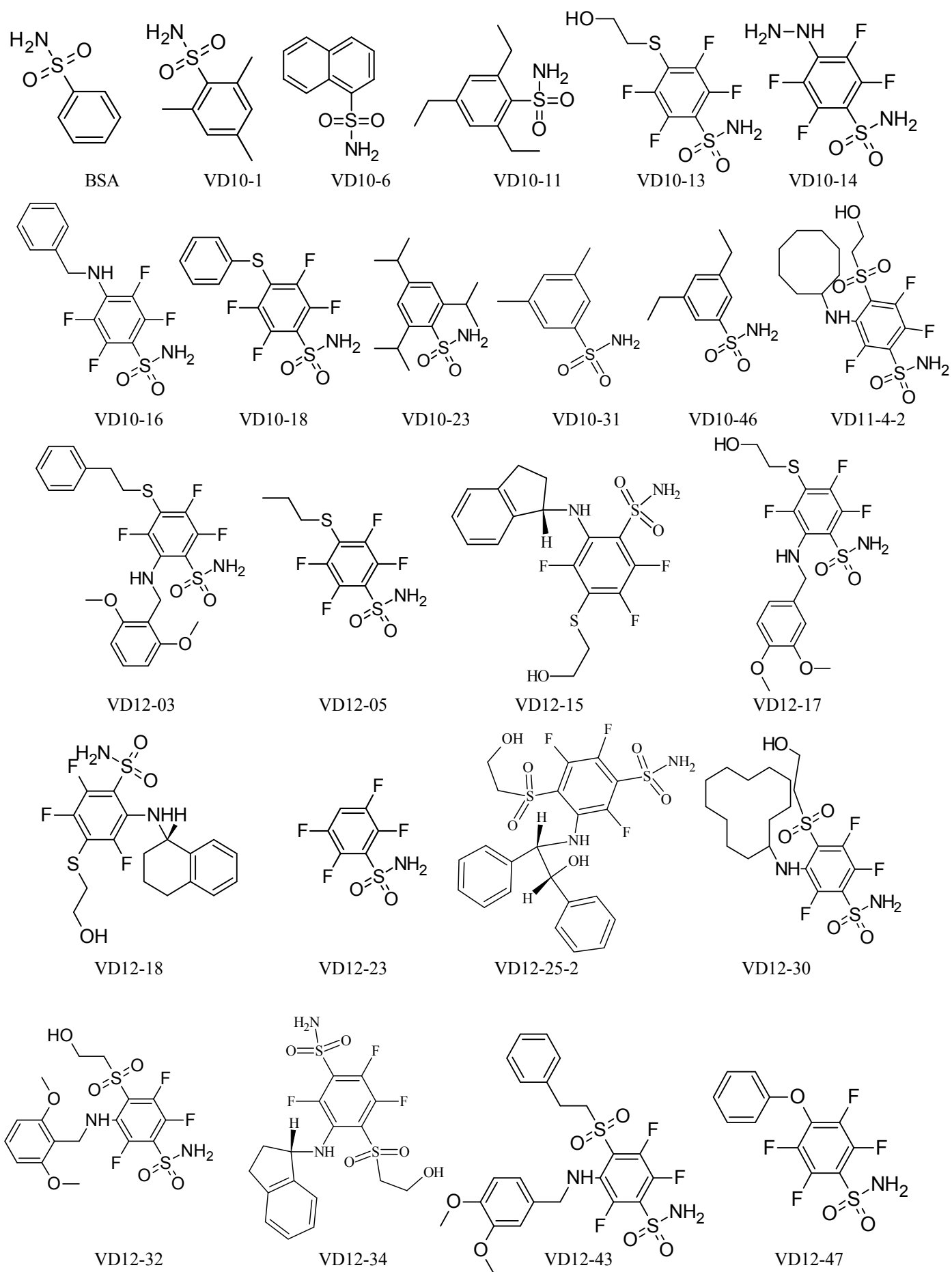
19 pav. Tipinis fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas esant skirtingoms komercinio ligando topiramato koncentracijoms, kai CA VB koncentracija pastovi.

Kol temperatūra nedidelė ir baltymas natyvios formos, fluorescencija yra labai nežymi. Fluorescencija intensyvėja, kai baltymas pradeda išsivynioti ir atsiveria hidrofobinės sritys, prie kurių jungiasi dažas. Pasiėkus tam tikrą temperatūrą, visas baltymas denatūruoja. Tuomet fluorescencija pradeda mažėti, kadangi dažo fluorescencija mažėja didėjant temperatūrai.

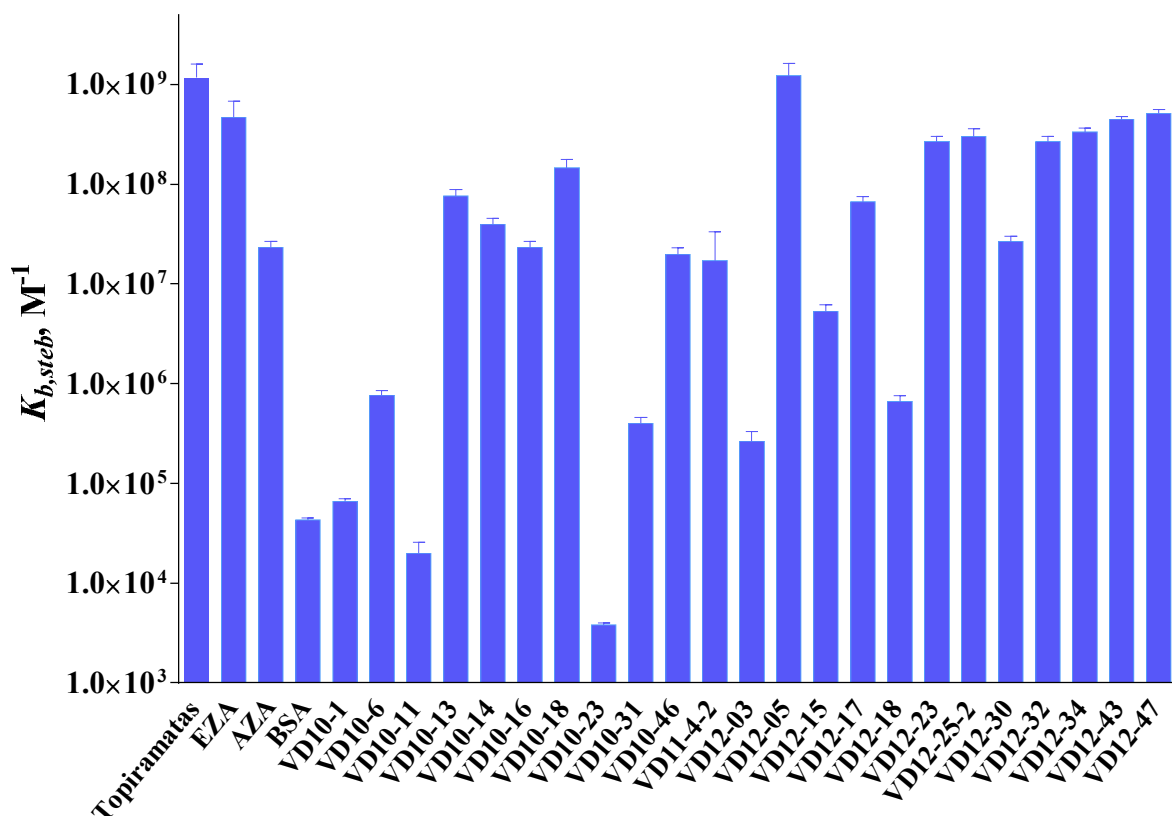


20 pav. CA VB baltymo T_m priklausomybė nuo ligandų koncentracijos. Taškai žymi eksperimentinius rezultatus, tiesės – modelį (7 formulė). Violetine spalva – sąveika su VD12-05; mėlyna – topiramatu; žalia – AZA, raudona – VD10-6.

Ieškant CA VB selektyvių slopiklių terminio poslinkio metodu buvo išmatuotos baltymo stebimosios jungimosi konstantos su komerciniais slopikliais (topiramatu, EZA, AZA) bei Biotermodynamikos ir vaistų tyrimo skyriuje susintetintais (susintetino dr. V.Dudutienė) sulfonamidiniais slopikliais (21 pav.). 20 paveiksle matome, jog sintetinis slopiklis VD12-05 pakelia baltymo denatūracijos temperatūrą stipriau negu komerciniai slopikliai: topiramatas ar AZA, ir daug labiau negu silpnai besijungiantis VD10-6. Stebimosios jungimosi konstantos gautos įvertinus baltymo denatūracijos temperatūros priklausomybę nuo sulfonamidinių slopiklių koncentracijos pateikiamos 22 paveiksle.



21 pav. Darbe naudoti sintetiniai sulfonamidiniai slopikliai.



22 pav. CA VB sąveikos su sulfoamidiniais slopikliais stebimosios jungimosi konstantos ($K_{b,stab}$).

CA VB stipriausiai jungiasi su komerciniu slopikliu topiramatu ir sintetiniu VD12-05. Silpniausia sąveika stebima tarp CA VB ir VD10-23. Iš sintetinių slopiklių dar būtų galima išskirti VD12-43, VD12-47, VD12-25-2, VD12-23, VD12-32, VD12-34, geriausiai besijungiančius su CA VB, tačiau šie slopikliai taip pat gerai sąveikauja ir su kitomis karboanhidrazių izoformomis. Nors sąveika tarp CA VB ir VD10-46 nėra stipriausia, tačiau šis junginys iš visų CA izoformų, geriausiai sąveikauja su karboanhidraze VB (stebimosios jungimosi pusiausvyros konstantos su kitomis karboanhidrazių izoformomis nustatytos Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje). VD10-46 galėtų būti potencialus CA VB atrankus slopiklis, kuris su kitomis karboanhidrazių izoformomis nesąveikautų arba jų slopinimas būtų silpnas.

3.4 CA VB aktyviajame centre esančio hidroksido jono pK_a reikšmės nustatymas

Ieškant naujų karboanhidrazių slopiklių, svarbūs ne tik termodinaminiai parametrai, bet ir struktūriniai baltymo-ligando komplekso duomenys. Stebimieji termodinaminiai

parametrai nesuteikia informacijos apie baltymo ir ligando sąveiką, kuri koreliuotų su struktūriniu analize. Norint įvertinti sąsają tarp struktūrinių ir termodinaminių duomenų, reikia nustatyti tikruosius termodinaminius parametrus, t.y. parametrus, kurie apibūdintų ne tik jungimosi reakciją, bet ir kitas tuo metu vykstančias reakcijas. Karboanhidrazių ir sulfoamidinių slopiklių jungimosi reakcijas lydi mažiausiai dar dvi reakcijos: hidroksido jono koordinuojančio Zn^{2+} protonizacijos ir slopiklio sulfonamidinės grupės deprotonizacijos. Sulfonamidinio ligando ir karboanhidrazių jungimasis yra stipriausias pH intervale, kuriame ligandas yra deprotonizuotas, karboanhidrazės aktyviajame centre, esantis hidroksido jonas protonizuotas. Tikroji jungimosi konstanta (K_b) yra susijusi su stebimąja jungimosi konstanta ($K_{b,steb}$) ir deprotonizuoto ligando bei baltymo, turinčio cinko joną koordinuojančią vandens molekulę frakcijomis (atitinkamai $f_{RSO_2NH^-}$, f_{CAZnH_2O}):

$$K_b = K_{b,steb} / f_{RSO_2NH^-} f_{CAZnH_2O} \quad (8)$$

Tuomet stebimoji laisvoji Gibso energija yra lygi:

$$\Delta G_{steb} = -RT \ln(K_b / f_{RSO_2NH^-} f_{CAZnH_2O}) \quad (9)$$

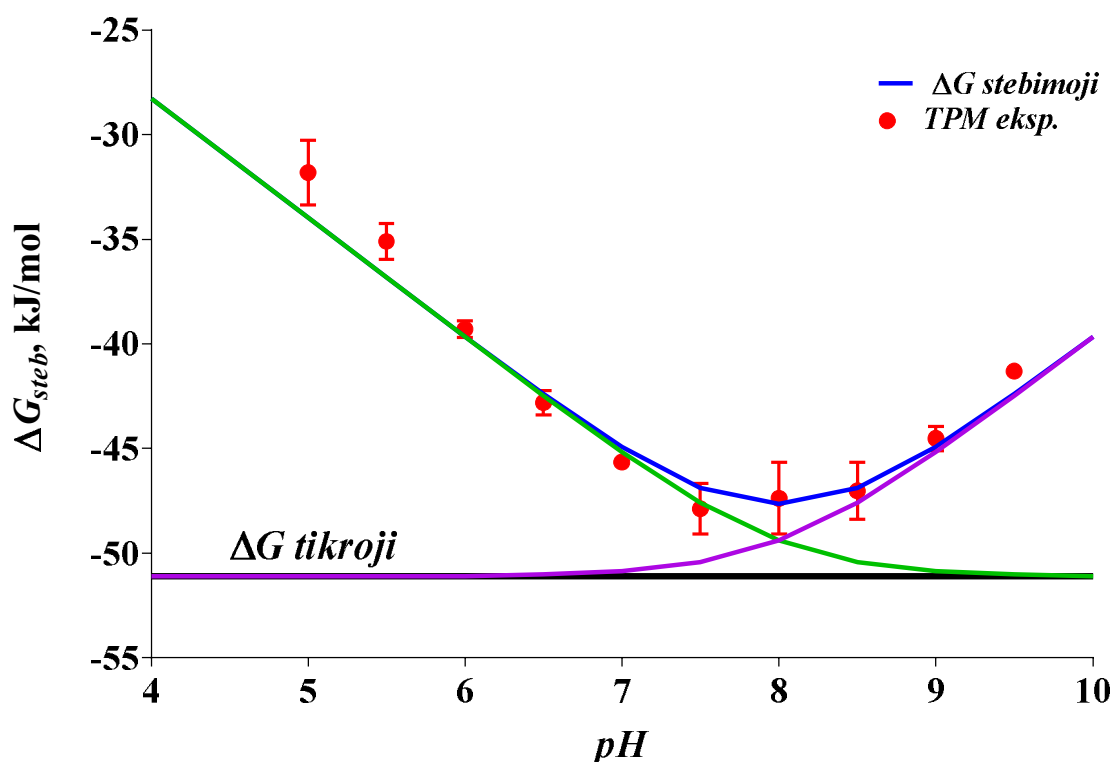
Deprotonizuoto sulfonamido ir protonizuotos CA frakcijos apskaičiuojamos:

$$f_{RSO_2NH^-} = \frac{10^{pH-pK_a-sulfonamido}}{1+10^{pH-pK_a-sulfonamido}} \quad (10)$$

$$f_{CAZnH_2O} = 1 - \frac{10^{pH-pK_a-CAZnH_2O}}{1+10^{pH-pK_a-CAZnH_2O}} \quad (11)$$

Iš pateiktų formulių matome, kad sulfonamidinių junginių dalies tirpale deprotonizacija, o karboanhidrazės protonizuota, esant tam tikram pH , priklauso nuo pK_a (Baranauskienė, Matulis, 2012).

Sąveikos stebimosios ΔG_{steb} reikšmės pavaizduotos 23 paveiksle. Simuliuojant K_b ir $pK_{a-CAZnH_2O}$, kai EZA pK_a yra lygi 8,0 (Remko, 2004), eksperimentiniai duomenys aproksimuoti teorine kreive atitinkančią 9 lygtį. Nustačius K_b galima apskaičiuoti tikrąją ΔG reikšmę.

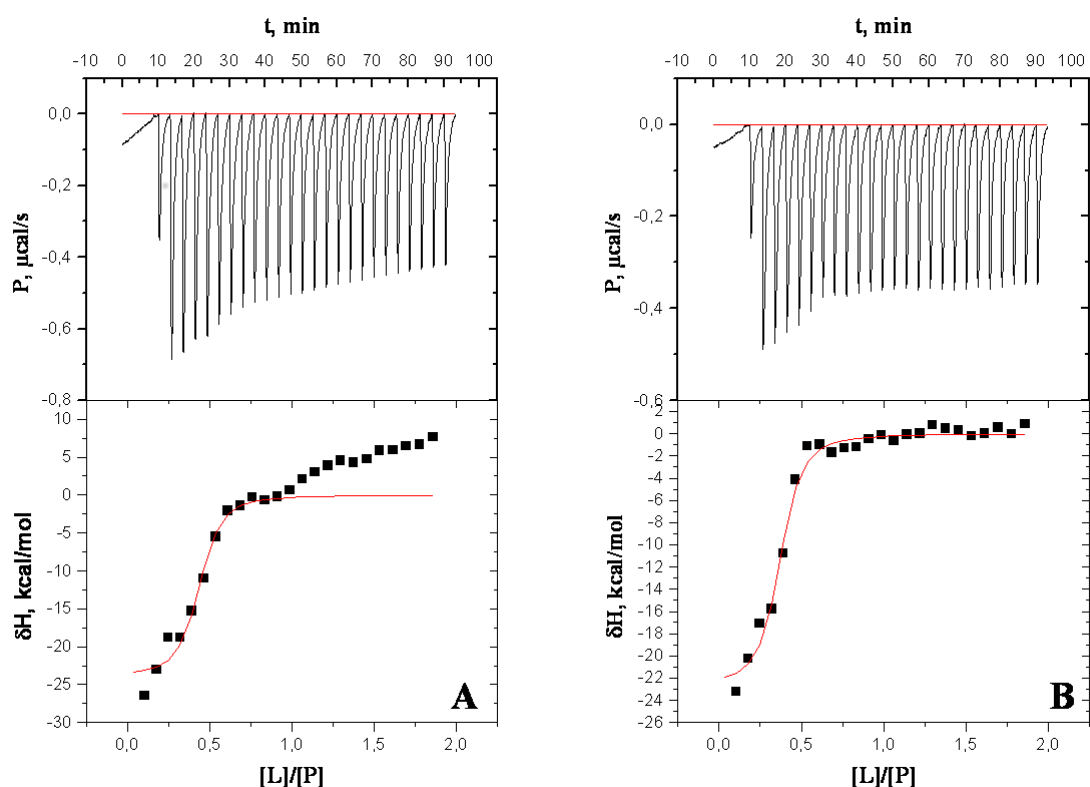


23 pav. CA VB ir EZA sąveikos ΔG_{steb} priklausomybė nuo pH . Taškai žymi eksperimentinius duomenis; mėlyna kreivė – modelį, aprašytą 9 formule; horizontali juoda linija – tikrąją jungimosi ΔG ; žalia – EZA sulfonamidinės grupės deprotonizacijos stebimąją ΔG ; violetinė - hidroksido jono, esančio CA VB aktyviajame centre, protonizacijos stebimąją ΔG .

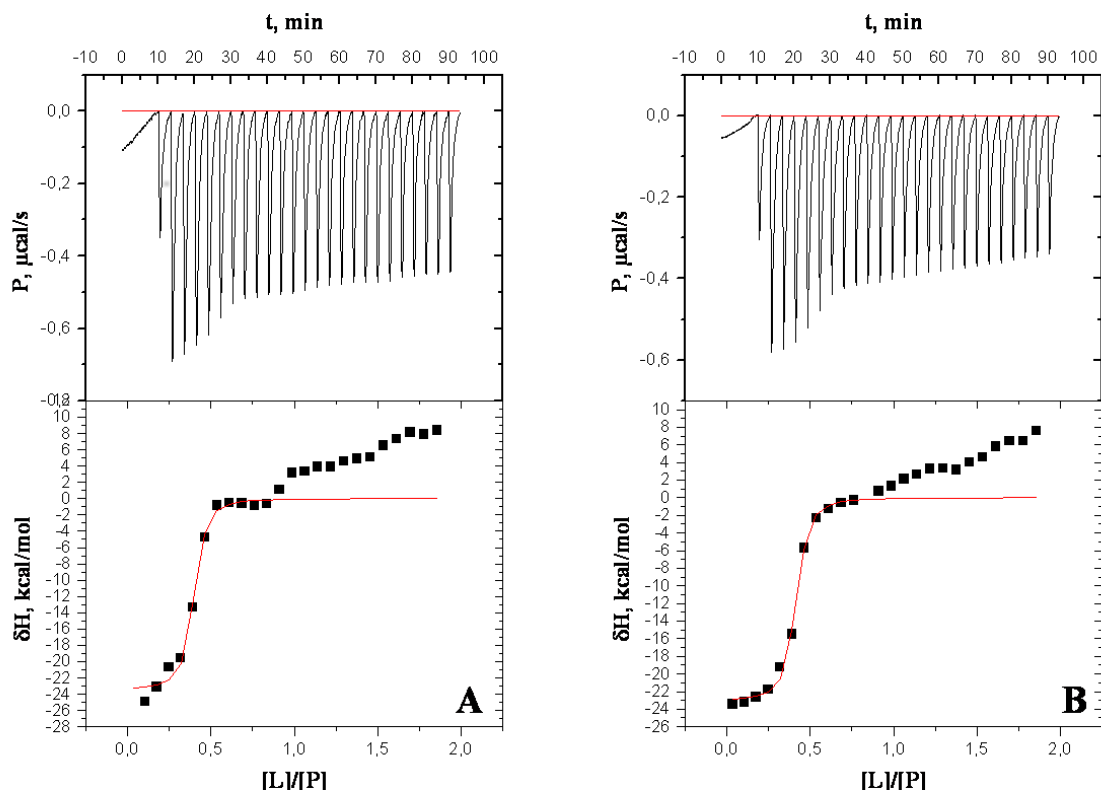
Apskaičiuotos tikroji $\Delta G = -51,1 \text{ kJ/mol}$, o $K_b = 9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Nustatyta Karboanhidrazės vandens molekulės $pK_a = 8,0$. Eksperimentiniai duomenys ne visai atitinka modelį, nes eksperimentais sunku gauti tikslias jungimosi $K_{b,steb}$ esant mažoms pH reikšmėms.

3.5 CA VB jungimosi su sulfonamidiniu slopikliu matavimas taikant izoterminio titravimo kalorimetriją

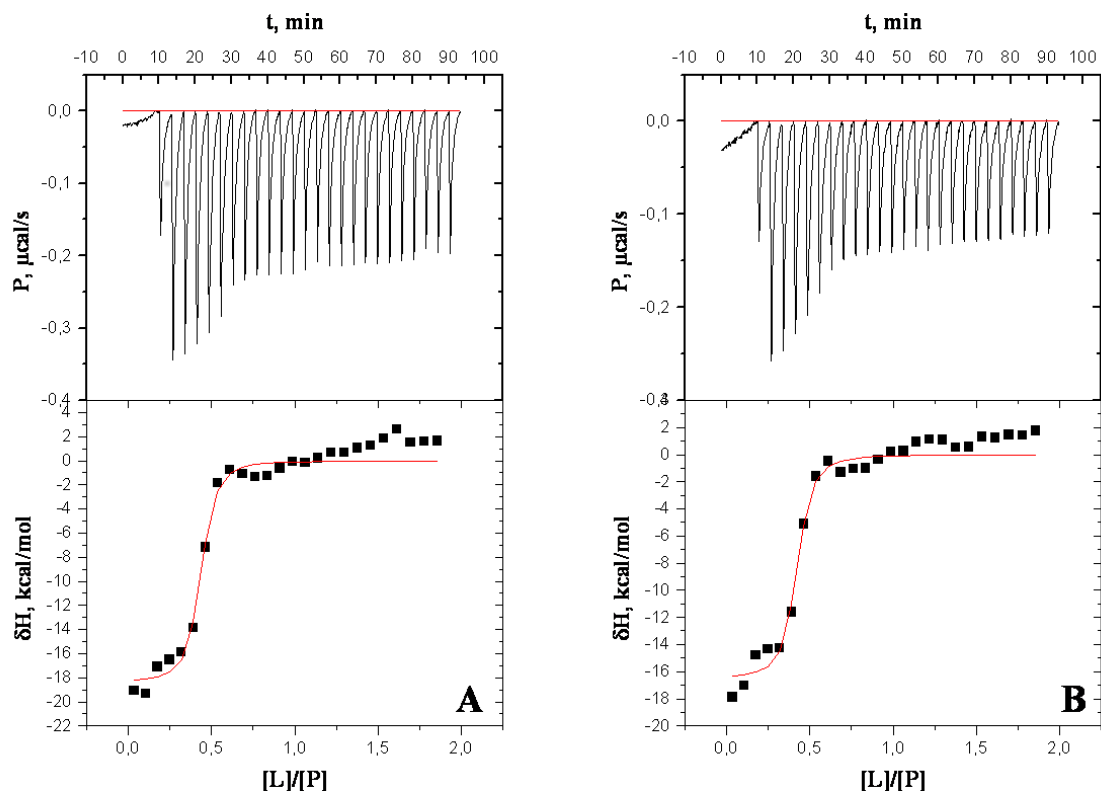
Išsiskirianti šiluma sąveikaujant CA VB ir sulfonamidiniui slopikliui EZA buvo išmatuota izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu, esant skirtingoms pH reikšmėms. 24-27 paveiksluose pavaizduotos jungimosi kreivės, viršuje pateikiami pirminiai ITK duomenys, kuriuose raudona linija pažymėta bazinė linija, apačioje – ITK eksperimentų metu išmatuoti galios pokyčiai, perskaičiuoti į šilumos kiekio pokyčius. Taškai atitinka eksperimentinius duomenis, kurie aproksimuoti teorine kreive.



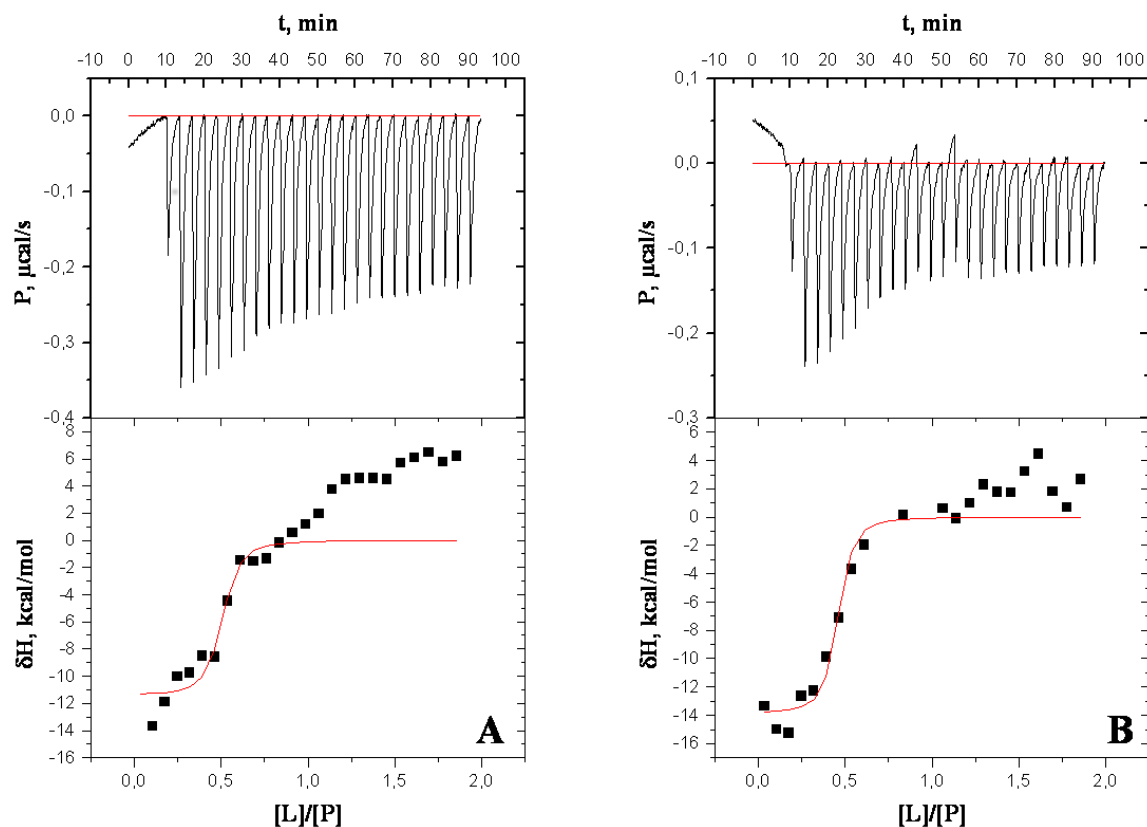
24 pav. ITK metodu gautos kreivės jungiantis CA VB ir EZA, esant skirtingoms TRIS buferinio tirpalo pH reikšmėms. A paveikslas atitinka duomenis gautus esant pH 5,5, B paveikslas – 6,0. $[L]/[P]$ – ligando ir baltymo molinis santykis.



25 pav. ITK metodu gautos kreivės jungiantis CA VB ir EZA, esant skirtingoms TRIS buferinio tirpalo pH reikšmėms. A paveikslas atitinka duomenis gautus esant pH 6,5, B paveikslas – 7,0. $[L]/[P]$ – ligando ir baltymo molinis santykis.



26 pav. ITK metodu gautos kreivės jungiantis CA VB ir EZA, esant skirtingoms TRIS buferinio tirpalo pH reikšmėms. A paveikslas atitinka duomenis gautus esant pH 7,5, B paveikslas – 8,0. $[L]/[P]$ – ligando ir baltymo molinis santykis.



27 pav. ITK metodu gautos kreivės jungiantis CA VB ir EZA, esant skirtingoms TRIS buferinio tirpalo pH reikšmėms. A paveikslas atitinka duomenis gautus esant pH 8,5, B paveikslas – 9,0. $[L]/[P]$ – ligando ir baltymo molinis santykis.

Remiantis gautais grafikais matome, kad eksperimentuose ligando ir baltymo santykis $n \sim 0,45$. CA VB jungimosi su EZA parametrai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. CA VB jungimosi su EZA ITK metodu gauti parametrai, esant skirtingoms pH reikšmėms, 25°C temperatūroje.

pH	$K_{b,steb}, M^{-1}$	$\Delta G_{steb}, kJ/mol$	$\Delta H_{steb}, kJ/mol$	$T\Delta S, kJ/mol$
5,5	$1,93 \times 10^7$	-41,59	-100,21	-58,00
6,0	$1,65 \times 10^7$	-41,20	-95,40	-54,20
6,5	$5,72 \times 10^7$	-44,28	-98,16	-53,88
7,0	$5,39 \times 10^7$	-44,14	-96,69	-78,45
7,5	$4,24 \times 10^7$	-43,54	-77,15	-28,82
8,0	$7,49 \times 10^7$	-44,95	-69,29	-21,32
8,5	$5,36 \times 10^7$	-44,12	-47,78	-3,66
9,0	$6,38 \times 10^7$	-44,55	-58,16	-13,61

Iš gautų duomenų galime teigti, jog karboanhidrazė VB geriausiai jungiasi su EZA, kai TRIS buferinio tirpalo pH yra 8,0 ($K_{b,steb} = 7,49 \times 10^7 M^{-1}$). Matome, jog stebimoji jungimosi konstanta didėja didėjant buferinio tirpalo pH , vėliau stebimas jos mažėjimas.

Jungimosi stebimosios entalpijos varijuoja nuo -100,21 kJ/mol (pH 5,5) iki -47,78 (pH 8,5), o stebimieji termodinaminiai parametrai yra priklausomi nuo pH (28 pav.). Tikroji jungimosi entalpija (ΔH) yra įvertinama žinant stebimąją (ΔH_{steb}) jungimosi entalpiją, slopiklio (ΔH_l), CA (ΔH_{CA}) ir buferinio tirpalo (ΔH_{buf}) protonizacijos entalpijas:

$$\Delta H = \Delta H_{steb} - n_l \Delta H_l - n_{CA} \Delta H_{CA} + n \Delta H_{buf} \quad (12)$$

Jungimosi metu paimamą arba atiduodamą protonų skaičių (n) galima apskaičiuoti iš žinomų ligando ir baltymo pK_a reikšmių (Matulis, 2008):

$$n_{CA} = 1 - \left(1 - \frac{10^{pH-pK_{a-CAZnH_2O}}}{1+10^{pH-pK_{a-CAZnH_2O}}}\right) \quad (13)$$

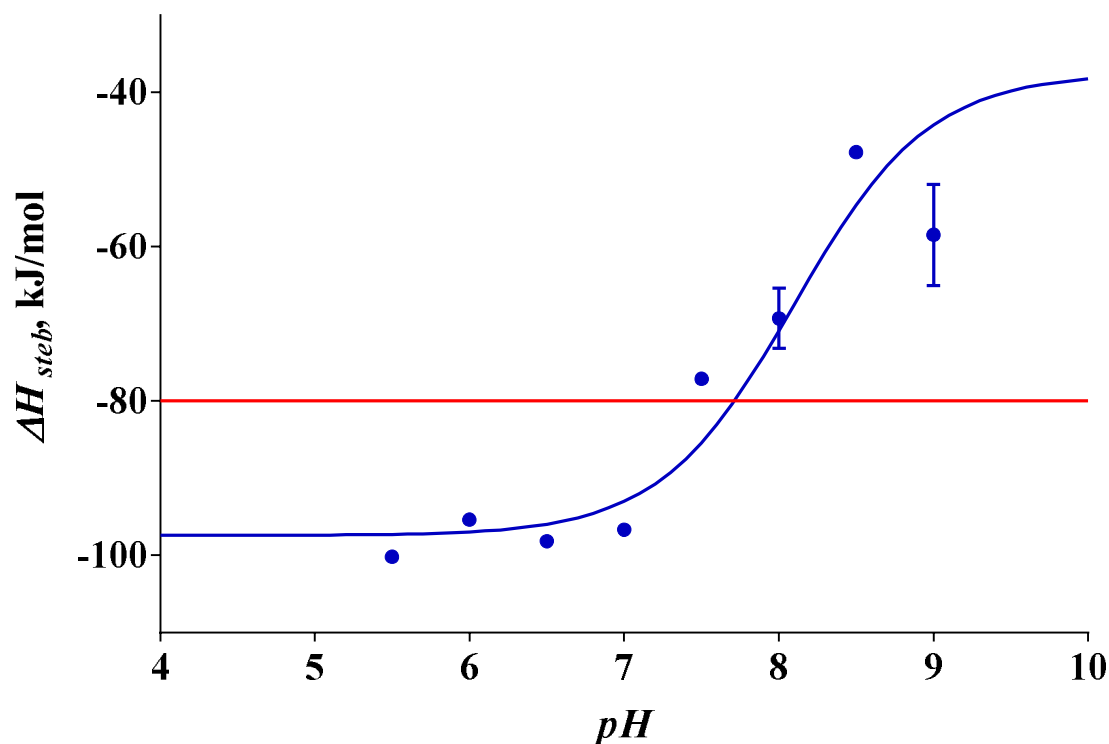
$$n_l = \frac{10^{pH-pK_{a-sulfonamido}}}{1+10^{pH-pK_{a-sulfonamido}}} - 1 \quad (14)$$

$$n = n_{CA} + n_l \quad (15)$$

n_{CA} - protonų skaičius, paimamas protonizuojantis baltymo hidroksido jonui;

n_l - protonų skaičius, kurį atpalaiduoja ligando sulfonamidinė grupė deprotonizacijos metu;

n - bendras protonų skaičius jungiantis baltymui ir sulfonamidiniui ligandui.



28 pav. Entalpijos priklausomybė nuo pH jungiantis CA VB ir EZA. Taškai žymi eksperimentinius duomenis, mėlyna linija – modelį, aprašytą 12 lygtimi, raudona – tikrąją entalpiją.

Nustatyta tikroji jungimosi entalpija lygi -80,0 kJ/mol. Tačiau norint tiksliai ją įvertinti reiktų žinoti entalpijos priklausomybę nuo pH skirtingos protonizacijos buferiniame tirpale (fosfatiniame). Taip reiktų atlikti daugiau eksperimentų skirtingose temperatūrose, jog būtų galima nustatyti reakcijos šiluminę talpą.

IŠVADOS

1. Sukūrus genetinę konstrukciją, koduojančią mitochondrinės karboanhidrazės VB baltymą nuo 40 iki 317 aminorūgšties bei parinkus tinkamiausias ekspresijos sąlygas išgrynintas aktyvus ir stabilus fermentas.
2. Terminio poslinkio metodu nustatyta, jog CA VB stabilumas priklauso nuo naudojamų buferinių tirpalų pH , o NaCl druskos buvimas juose stabilizuoja baltymą.
3. Remiantis terminio poslinkio metodu gautais duomenis galima teigti, kad CA VB geriausiai jungiasi su komerciniu slopikliu topiramatu ($K_{b,steb} = 1,2 \times 10^9$) ir sintetiniu VD12-05 ($K_{b,steb} = 1,2 \times 10^9$). Nors sintetinis junginys VD10-46 nepasižymi tokia stipria sąveika ($K_{b,steb} = 2 \times 10^7$), tačiau jis iš visų CA izoformų, geriausiai sąveikauja būtent su mitochondrine karboanhidraze VB.
4. Terminio poslinkio metodu išmatuota žmogaus karboanhidrazės VB jungimosi su etokzolidu tikroji laisvoji Gibso energija ($\Delta G = -51,1 \text{ kJ/mol}$) bei įvertinta baltymo aktyviajame centre esančio hidroksido jono pK_a (8,0). Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu išmatavus stebimąsias jungimosi entalpijas nustatyta tikroji sąveikos entalpija $\Delta H = -80,0 \text{ kJ/mol}$.

Cloning, expression, purification and inhibition studies of mitochondrial carbonic anhydrase VB

SUMMARY

Mitochondrial carbonic anhydrase VB has been shown to convert CO₂ produced by TCA cycle. Still it is very little known about CA VB, however it plays an important role in mitochondrial *pH* regulation and biosynthetic reactions. Inhibition of these processes by sulfonamide inhibitors provided pharmacological evidence that mitochondria need CA for the metabolic processes. Also, mitochondrial CA may provide a new therapeutic target for oxidative stress related illnesses of the central nervous system or for obesity treatment.

During this thesis work were created expression plasmids, which showed expression of recombinant mitochondrial carbonic anhydrase VB, the protein has been purified. Thermodynamics of enzyme's binding with commercial and synthetic inhibitors was determined by thermal shift assay and isothermal titration calorimetry. This thesis also described under which inhibitor most strongly interacts with carbonic anhydrase VB. Furthermore, the observed thermodynamic parameters were evaluated, protonation *pKa* and the intrinsic binding parameters, independent of *pH*, were calculated.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Almstedt K, Rafstedt T, Supuran CT, Carlsson U, and Hammarstrom P. 2009. Small-molecule suppression of misfolding of mutated human carbonic anhydrase II linked to marble brain disease. *Biochem* 48:5358-5364.
2. Alterio A, Di Fiore A, D'Ambrosio K, Supuran CT, De Simone G. 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem Rev* 112:4421-4468.
3. Baranauskienė L, Matulis D. 2012. Intrinsic thermodynamics of acetazolamide inhibitor binding to human carbonic anhydrase XIII.
4. Baranauskienė L, Petrikaitė V, Matulienė J, Matulis D. 2009. Titration Calorimetry Standards and the Precision of Isothermal Titration Calorimetry Data. *Int J Mol Sci* 10:2752-2762.
5. Ben-Menachem E, Axelsen M, Johanson EH, Stagge A, Smith U. 2003. Predictors of weight loss in adults with topiramate-treated epilepsy. *Obes Res* 11:556-562.
6. Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
7. Bullock AN, Debreczeni JE, Fedorov OY, Nelson A, Marsden BD, Knapp S. 2005. Structural basis of inhibitor specificity of the human protooncogene proviral insertion site in moloney murine leukemia virus (PIM-1) kinase. *J Med Chem* 48(24):7604-7614.
8. Cooper A, Johnson CM, Lakey JH, Nöllmann M. 2001. Heat does not come in different colours: entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. *Biophys Chem* 93(2-3):215-230.
9. De Simone G, Scozzafava A, Supuran CT. 2009. Which carbonic anhydrases are targeted by the antiepileptic sulfonamides and sulfamates? *Chem Biol Drug Des* 74(3):317-21.
10. Di Fiore A, Monti SM, Hilvo M, Parkkila S, Romano V, Scaloni A, Pedone C, Scozzafava A, Supuran CT, De Simone G. 2009. Crystal structure of human carbonic anhydrase XIII and its complex with the inhibitor acetazolamide. *Proteins* 74:164-175.

11. Dodgson SJ. 1987. Inhibition of mitochondrial carbonic anhydrase and ureagenesis: a discrepancy examined. *J Appl Physiol* 63(5):2134-41.
12. Fujikawa-Adachi K, Nishimori I, Taguchi T, Onishi S. 1999. Human mitochondrial carbonic anhydrase VB. *J Biol Chem* 274(30):21228-21233.
13. Giuliani SE, Frank AM, Collart FR. 2008. Functional assignment of solute-binding proteins of ABC transporters using a fluorescence-based thermal shift assay. *Biochemistry* 47(52):13974-13984.
14. Green MR, Sambrook J. 2012. Molecuclng cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab Press. 4th ed.
15. Hassan MI, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS. 2013. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioor Med Chem* 21(6):1570-82.
16. Heal DJ, Gosden J, Smith SL. 2013. A review of late-stage CNS drug candidates for the treatment of obesity. *Int J Obes* 37:107-117.
17. Knaus EE, Innocenti A, Scozzafava A, Supuran CT. 2011. Phenylethynylbenzenesulfonamide regioisomers strongly and selectively inhibit the transmembrane, tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII over the cytosolic isoforms I and II. *Bioorg Med Chem Lett* 21:5892-5896.
18. Krishnamurthy VM, Kaufman GK, Urbach AR, Gitlin I, Gudiksen KL, Weibel DB, Whitesides GM. 2008. Carbonic Anhydrase as a Model for Biophysical and Physical-Organic Studies of Proteins and Protein-Ligand Binding. *Chem Rev* 108:946–1051.
19. Ladbury JE. 2010. Calorimetry as a tool for understanding biomolecular interections and aid to drug design. *Biochem Soc Trans* 38:888-893.
20. Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–5.
21. Matulis D. 2008. Baltymų fizikinė chemija. Technologija, Kaunas.
22. McDonnell PA, Yanchunas J, Newitt JA, Tao L, , Kiefer SE, Ortega M, Kut S, Burford N, Goldfarb V, Duke GJ, Shen H et al. 2009. Assesing compound binding to the Eg5 motor domain using athermal shift assay. *Anal Biochem* 392(1):59-69.
23. Milano W, De Rosa M, Milano L, Nolfè G, Petrella C, Ingenito A, Capasso A. 2012. Topiramate in the treatment of obesity by psychotropic drugs in a patient with bipolar disorder: a case report. *Curr Neurobiol* 3(1):1-2.
24. Nagelhus EA, Mathiisen TM, Bateman AC, Haug FM, Ottersen OP, Grubb JH, Waheed A, Sly WS. 2005. Carbonic anhydrase XIV is enriched in specific membrane

- domains of retinal pigment epithelium, Muller cells, and astrocytes. *Proc Natl Acad of Sci USA* 102(22):8030-5.
25. Nettleship JE, Brown J, Groves MR, Geerlof A. 2008. Methods for protein characterization by mass spectrometry, thermal shift (ThermoFluor) assay, and multiangle or static light scattering. *Methods Mol Biol* 426:299-318.
 26. Nishimori I, Vullo D, Innocenti A, Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT. 2005. Carbonic anhydrase inhibitors. The mitochondrial isozyme VB as a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *J Med Chem* 48:7860-7866.
 27. Ochrietor JD, Clamp MF, Moroz TP, Grubb JH, Shah GN, Waheed A, Sly WS, Linser PJ. 2005. Carbonic anhydrase XIV identified as the membrane CA in mouse retina: strong expression in Müller cells and the RPE. *Exp Eye Res* 81(4):492-500.
 28. Parkkila AK, Scarim AL, Parrkila S, Waheed A, Corrbet JA, Slym WS. 1998. Expression of carbonic anhydrase V in pancreatic beta cells suggests role for mitochondrial carbonic anhydrase in insulin secretion. *J Biol Chem* 273(18):24620-24623.
 29. Powell AG, Apovian CM, Arrone LJ. 2012, The combination of phentaramine and topiramate is an effective adjunct to diet and lifestyle modification for weight loss and measures of comorbidity in overweight or obese adults with additional metabolic risk factors. *EBM* 17(1):14-15.
 30. Price TO, Eranki V, Banks WA, Ercal N, Shah GN. 2012. Topiramate treatment protects blood-brain barrier pericytes from hyperglycemia-induced oxidative damage in diabetic mice. *Endocri* 153(1):362-372.
 31. Remko M, von der Lieth CW. 2004. Theoretical study of gas-phase acidity, pKa, lipophilicity, and solubility of some biologically active sulfonamides. *Bioorg Med Chem* 12(20):5395-403.
 32. Scott AD et al. 2009. Thermodynamic optimization in drug discovery: a case study using carbonic anhydrase inhibitors. *ChemMedChem* 4:1985-1989.
 33. Shah GN, Hewett-Emmett D, Grubb JH, Migas MC, Fleming RE, Waheed A, Sly WS. 2000. Mitochondrial carbonic anhydrase CA VB: differences in tissue distribution and pattern of evolution from those of CA VA suggest distinct physiological roles. *PNAS* 97(4):1677-1682.
 34. Sly WS, Hu PY. 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem* 64:375-401.

35. Smith CE, Nanci A, Moffatt P. 2006. Evidence by signal peptide trap technology for the expression of carbonic anhydrase 6 in rat incisor enamel organs. *P Eur J Oral Sci* 114:164-165.
36. Supuran CT. 2008. Carbonic anhydrase: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Disc* 7:168-179.
37. Supuran CT. 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 20:3467-3474.
38. Supuran CT. 2011. Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics? *FPHAR* 2(34):1-6.
39. Tafreshi NK, Bui MM, Bishop K, Lloyd MC, Enkemann SA, Lopez AS, Abrahams D, Carter BW, Vagner J, Grobmyer SR, Gillies RJ, Morse DL. 2012. Noninvasive detection of breast cancer lymph node metastasis using carbonic anhydrases IX and XII targeted imaging probes. *Clin Cancer Res* 18:207-219.
40. Voet D, Voet JG. 2011. Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. 4th ed.
41. Vullo D, Nishimori I, Innocenti A, Scozzafava A, Supuran CT. 2006. Carbonic anhydrase activators: an activation study of the human mitochondrial isoforms VA and VB with amino acids and amines. *Bioorg Med Chem Lett* 17:1336-1340.
42. Zhang R, Monsma F. 2010. Fluorescence-based thermal shift assays. *Curr Opin Drug Discov Devel* 13(4):389-402.
43. Zimmerman UJ, Wang P, Zhang X, Bogdanovich S, Forster R. 2004. Anti-oxidative response of carbonic anhydrase III in skeletal muscle. *IUBMB Life* 56(6):343-347.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju dr. Daumantui Matuliui už suteiktas žinias, naudingus patarimus bei pastabas. Taip pat dėkoju Vilmai Michailovienei, dr. Vaidai Jogaitei už pasiūlymus ir patarimus įgyvendinant molekulinės biologijos eksperimentus, dr. Astai Zubrienei už pagalbą atliekant termodinaminius tyrimus bei visiems Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriaus darbuotojams už draugišką atmosferą.