VILNIAUS UNIVERSITETAS Gamtos mokslų fakultetas Neurobiologijos ir biofizikos katedra

> Biofizikos studijų programos studentė Vaida MORKŪNAITĖ

> > Magistrinis darbas

# Karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII slopiklių paieška bei tikrųjų termodinaminių parametrų nustatymas

Darbo vadovas

Dr. D. Matulis

Vilnius 2013

# Karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII slopiklių paieška bei tikrųjų termodinaminių parametrų nustatymas

Vaida MORKŪNAITĖ

Parašas \_\_\_\_\_

Darbo vadovas:

Dr. Daumantas MATULIS

Parašas \_\_\_\_\_

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Karboanhidrazės	8
1.1.1. Karboanhidrazių klasės	8
1.1.2. Karboanhidrazių struktūra ir homologija	9
1.2. Katalizinis karboanhidrazių aktyvumas	12
1.3. Karboanhidrazių izofermentai	15
1.3.1. Karboanhidrazė I	16
1.3.2. Karboanhidrazė II	
1.3.3. Karboanhidrazė VII	17
1.3.4. Karboanhidrazė XII	
1.3.5. Karboanhidrazé XIII	18
1.4. Karboanhidrazių raiškos slopinimas	19
1.5. Ligando jungimosi su baltymu termodinamika	22
1.6. Terminio poslinkio metodas	22
1.7. Izoterminė titravimo kalorimetrija	27
1.8. "Tikrieji" parametrai	29
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	
2.1. Naudoti reagentai	31
2.2. Ligandų jungimosi su baltymais matavimai terminio poslinkio metodu	31
2.3. Ligandų jungimosi su baltymais matavimai izoterminės titravimo kalorimetrijos metodu	32
2.4. Junginių pK <sub>a</sub> verčių nustatymas	32
2.5. Fermento izoformų jungimosi entalpijų nustatymas	32
3. REZULTATAI	
3.1. Karboanhidrazės izoformų jungimasis su slopikliais	33
3.2. Baltymų pK <sub>a</sub> ir jungimosi protonizacijos entalpijos verčių nustatymas	40

# TURINYS

3.3. Tikrieji jungimosi parametrai	45
3.4. Išmatuotųjų ir tikrinių jungimosi parametrų palyginimas	53
4. REZULTATŲ APTARIMAS	56
4.1. Stebimieji jungimosi parametrai	56
4.2. Baltymų-ligandų jungimosi termodinaminiai parametrai	58
4.3. Protonizacijos/deprotonizacijos reakcijų įtaka jungimuisi	58
4.4. Tirtų slopiklių atrankumas karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII izoformoms	60
4.5. Slopiklių termodinaminis optimizavimas	61
IŠVADOS	63
SANTRAUKA	64
SUMMARY	65
LITERATŪROS SĄRAŠAS	

# **SANTRUMPOS**

- ANS 1,8-anilinonaftaleno sulfonatas;
- CA karboanhidrazė;
- CARP į karboanhidrazę panašus baltymas (angl. CA-related protein);
- c koeficientas kalorimetrijoje, parodantis reakcijos pilnumą;
- EZA etokzolamidas
- ITC izoterminė titravimo kolorimetrija (angl. Isothermal Ttitration Calorimetry);
- K<sub>b</sub> jungimosi konstanta;
- $k_{cat}/K_M$  katalizinės ir Michaelio-Menten konstantų santykis;
- K<sub>d</sub> disociacijos konstanta;
- $K_i$  slopinimo konstanta;
- **n** stechiometrija;
- SAR struktūros-aktyvumo koreliacija (angl. Structure-activity relationship);
- $\mathbf{T}$  temperatūra;
- $T_m$  baltymo lydymosi temperatūra;
- TSA terminio poslinkio metodas (angl. Thermal Shift Assay);
- $\Delta C_p$  šiluminės talpos pokytis;
- $\Delta H$  entalpijos pokytis;

#### **ĮVADAS**

Vaistų kūrimas yra ilgas procesas, apimantis daug skirtingų mokslo krypčių. Jis prasideda naujo taikinio, atsakingo už ligą, identifikavimu ir baigiasi naujos efektyviai gydyti gebančios, molekulės sinteze. Kad visa tai būtų pasiekta, reikia daugybės skirtingų mokslo krypčių, galinčių atlikti atskirus žingsnius vaisto kūrimo proceso metu, įtakos (Chene, 2012). Viena iš tokių krypčių yra termodinamika, suteikianti daug svarbios informacijos apie junginio ir taikinio sąveikos energetiką.

Termodinaminis ligando-taikinio jungimosi charakterizavimas parūpina svarbios informacijos apie molekulinių ryšių susidarymą vykstant jungimuisi. Šio proceso supratimas ir jo optimizavimas, atsižvelgiant į struktūrines taikinio ir ligando savybes, yra pagrindas sėkmingam vaistų kūrimui (Holdgate et al., 2010).

Biofizikiniai metodai gali turėti įtakos šio proceso vystymui. Technologijos pastaraisiais metais sparčiai plėtojosi, todėl patikimumas, našumas, aukšta kokybė ir prieinamumas leidžia rinktis daug metodų, svarbių modernioms vaistų paieškoms.

Visapusiška termodinaminė analizė yra būtina vaistų kūrimo procese tam, kad būtų pagreitintas vaisto, turinčio optimalias energetines sąveikas, kūrimas (Garbett & Chaires, 2012).

Baltymų duomenų banke yra daugiau nei 7000 baltymų, iš kurių apie 800 turi unikalias struktūras. Visos jos gali būti naudojamos vaistų kūrimui (Amzel, 1998).

Vieni iš tokių baltymų yra karboanhidrazės (EC 4.2.1.1). Tai plačiai paplitę cinko fermentai, randami tiek prokariotuose, tiek eukariotuose. Žmoguje yra 12 aktyvių šio fermento izoformų. Jie yra efektyvūs katalizatoriai anglies dioksido hidratacijai į bikarbonato joną ir protoną, vaidinantys svarbų vaidmenį pH homeostazėje, elektrolitų sekrecijoje, jonų transporte, biosintetinėse reakcijose (Winum, 2009).

Per didelė kai kurių izoformų ekspresija gali sukelti fiziologinių funkcijų sutrikimus ir prisidėti prie tokių patologinių procesų kaip naviko vystymasis ar skysčių kaupimasis akyje (glaukoma) (Hynninen et al., 2011), todėl šio fermento slopinimas reikalingas daugelio ligų gydymui (Baranauskienė & Matulis, 2012).

Biotechnologijos institute Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje pagrindinis dėmesys skiriamas priešvėžinio taikinio ir jo slopiklio sąveikos analizei. Veikla apima taikinių – rekombinantinių karboanhidrazių bei karščio šoko baltymų – gamybą, slopiklių šiems taikiniams sintezę bei jų sąveikos matavimus, stengiantis įvertinti termodinaminių parametrų ir struktūros koreliacijas. Magistro studijų metu atlikau baltymo-ligando jungimosi matavimus biofizikiniais metodais, tapau 2 straipsnių (viename iš jų aprašyti eksperimentai pateikiami ir šiame darbe) bei 5 stendinių pranešimų tarptautinėse konferencijose bendraautore. Atlieku Latvijos Organinės sintezės institute Organinės chemijos skyriuje sintetinamų karboanhidrazių slopiklių matavimus izoterminės titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodais taip prisidėdama prie mokslinio Baltijos šalių bendradarbiavimo palaikymo. Šiame institute susintetintų slopiklių jungimosi termodinaminiai parametrai ir yra analizuojami šiame magistriniame darbe.

Šio darbo tikslas – įvertinti sulfonamidinių tiofenų bei sacharinų sąveikas su karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII izoformomis.

Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti tokie uždaviniai:

 Išmatuoti karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII jungimąsi su sacharininiais ir tiofeniniais sulfonamidais terminio poslinkio bei izoterminės titravimo kalorimetrijos metodais.

- Įvertinti termodinaminius jungimosi parametrus.
- Apskaičiuoti tikrinius jungimosi termodinaminius parametrus.
- Palyginti sacharininių ir tiofeninių sulfonamidų jungimąsi.
- Palyginti išmatuotus ir tikruosius jungimosi termodinaminius parametrus.
- Įvertinti junginių funkcinių grupių įtaką jungimuisi.
- Įvertinti junginių atrankumą karboanhidrazės izoformoms.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

#### 1.1. Karboanhidrazės

Karboanhidrazės (angl. *Carbonic anhydrases*, *CA*, EC 4.2.1.1) priklauso liazių šeimai. Tai yra cinką turintys fermentai, kurie katalizuoja grįžtamą reakciją tarp anglies dioksido hidratacijos ir bikarbonato dehidratacijos ( $CO_2 + H_2O \Leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ ). Anglies dioksidas ( $CO_2$ ) yra pagrindinis metabolitas visuose gyvuosiuose organizmuose. Jis egzistuoja pusiausvyroje su bikarbonatu ( $HCO_3^-$ ), kuris yra silpnai tirpus lipidinėje membranoje. Anglies dioksidas gali laisvai difunduoti į ląstelę ir iš jos, o bikarbonatas turi būti transportuojamas. Bikarbonato vertimas į anglies dioksidą palengvina jo pernašą į ląstelės vidų, o ten jį išlaikyti padeda  $CO_2$  vertimas į bikarbonatą. Grįžtamasis anglies dioksido virtimas bikarbonatu fiziologiniame pH vyksta lėtai, todėl organizmas gamina fermentus šio proceso pagreitinimui (http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004\_1/Page1.htm): anglies dioksido hidratacijos greičio konstanta yra 8,5·10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, o šią reakciją katalizuojant aktyviausiai karboanhidrazei (CA II) k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> vertė siekia 1,5·10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (Elder, 2004).

Šie fermentai ne tik palengvina anglies dioksido ir protonų transportą per biologinę membraną, bet dalyvauja ir daugelyje kitų procesų, tokių kaip kvėpavimas ir fotosintezė eukariotuose ar cianato degradacija prokariotuose. Karboanhidrazės gali panaikinti viduląstelinį pH gradientą. Tai svarbu, norint palaikyti pastovų rūgštingumą (http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004\_1/Page1.htm). Augaluose ir kai kuriose bakterijose CA izofermentai vaidina svarbų vaidmenį fotosintezės ir kitose biosintetinėse reakcijose (titnagdumbliuose dalyvauja anglies dioksido fiksacijoje) (Supuran, 2010).

#### 1.1.1. Karboanhidrazių klasės

Yra žinomos 5 genetiškai skirtingos CA klasės: α-, β-, γ-, δ-, ζ. Visos jos yra metalofermentai. α-, β- ir δ-CA aktyviajame centre turi Zn(II) jonus, γ-CA, greičiausiai, turi Fe(II) (bet yra aktyvūs esant Zn(II) ar Co(II) jonams), o ζ-CA klasė turi Cd(II) arba Zn(II). Tretinė šių penkių CA klasių struktūra labai skiriasi viena nuo kitos: α-CA yra monomeriniai baltymai (retai dimerai), β-CA gali būti dimerai, tetramerai ar oktamerai (Supuran, 2010) (šios klasės fermentai turi 4 cinko jonus, sukuriančius keturias galimas fermento aktyvias sritis (http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=49)). γ-CA yra trimerai, o δ- ir ζ-CA, manoma, jog yra monomerai. Nors šių skirtingų klasių nariai turi labai mažai sekos ar struktūros panašumų, bet atlieka tą pačią funkciją (Supuran, 2010). α-CA yra randamos žinduoliuose, pirmuonyse, dumbliuose, žalių augalų citoplazmoje ir kai kuriose bakterijose. β-CA dažniausiai aptinkamos bakterijose, dumbliuose, vienaskilčių ir dviskilčių augalų chloroplastuose, taip pat daugelyje grybų ir kai kuriose archėjose. γ-CA randamos archėjose ir kai kuriose bakterijose. δ- ir ζ-CA rastos tik jūriniuose titnagdumbliuose (Supuran, 2010).

α-CA klasės izofermentai labiausiai tyrinėjami lyginant su kitomis izoformomis, nes yra plačiausiai paplitę ir tai yra vienintelė šių fermentų klasė, kurios raiška vyksta žmonių audiniuose ir organuose (Ohradanova et al., 2012). Šiame darbe taip pat pagrindinis dėmesys skiriamas šiai klasei.

Be to, kad vykdo anglies dioksido hidrataciją (1.1 lentelė, 1 reakcija), α-CA dalyvauja tokiose reakcijose kaip cianato hidratacija į karbamo rūgštį (1.1 lentelė, 2 reakcija) arba cianamido į šlapalą (1 lentelė, 3 reakcija), aldehidų hidratacija į gem-diolius (1.1 lentelė, 4 reakcija), karboksilinių ar sulfonilinių rūgščių esterių hidrolizė (1.1 lentelė, 5 ir 6 reakcijos), taip pat ir kituose mažiau ištirtuose hidrolitiniuose procesuose, kuriuose halidai, chloroformatai ar sulfonilchloridai veikia kaip substratai (1.1 lentelė, 7-9 reakcijos) (Truppo et al., 2012).

#### 1.1 lentelė. α-CA vykdomos reakcijos (Aggarwal, Kondeti & McKenna, 2013)

- 1. O=C=O + H<sub>2</sub>O ↔ HCO<sub>3</sub>-+ H\*
- 2.  $O=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCOOH$
- HN=C=NH + H<sub>2</sub>O ↔ H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub>
- RCHO + H<sub>2</sub>O ↔ RCH(OH)<sub>2</sub>
- 5. RCOOAr + H₂O ↔ RCOOH + ArOH
- 6. RSO<sub>3</sub>Ar + H<sub>2</sub>O ↔ RSO<sub>3</sub>H + ArOH
- ArF + H<sub>2</sub>O ↔ HF + ArOH Ar = 2,4 - dinitrophenyl
- 8.  $PhCH_2OCOCl + H_2O \leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
- 9.  $RSO_2CI + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + HCI$ <u>R = Methyl or Phenyl (Ph)</u>

#### 1.1.2. Karboanhidrazių struktūra ir homologija

Žinduoliuose buvo ištirta 16 CA izofermentų (McDevitt & Lambert, 2011). Žmogaus organizme jų yra 15, iš kurių dvylika – kataliziškai aktyvios (Aggarwal, Boone, Kondeti & McKenna, 2013).

Kam organizmui reikia tiek daug CA izoformų vis dar lieka neaišku. Daugelyje audinių izoformų yra gausu ir jos viena su kita susijusios, bet yra keletas audinių ar organų, kur

dominuoja tik viena ar dvi (pvz., dauguma hipoksinių navikų turi tik CA IX ir /arba XII); kepenyse dominuoja CA VA ir XIV, ir t.t.) (Supuran, 2011).

Visų žmogaus karboanhidrazių sekų palyginimas parodė ženklų šių sekų panašumą (1.1 pav.). CA sekų ilgis yra 260-459 aminorūgštys. (Hassan et al., 2013).

CAH1 CAH2 CAH3 CAH4 CAH5A CAH5A CAH5B CAH6 CAH6 CAH7 CAH10 CAH10 CAH11 CAH12 CAH13 CAH14	QRLPRMQEDSPLGGGSSGEDDPLGEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLPGEEDL NE	000000000000000000000000000000000000000
CAH1 CAH2 CAH3 CAH5A CAH5A CAH5B CAH5B CAH6 CAH7 CAH8 CAH9 CAH10 CAH11 CAH12 CAH13 CAH14	A S P DWG Y D D K NG P E Q W S K L 	19 19 19 122 21 221 57 220 21 57 220 21
CAH1 CAH2 CAH3 CAH4 CAH5A CAH5A CAH5 CAH6 CAH7 CAH8 CAH9 CAH10 CAH11 CAH12 CAH13 CAH14	YPIANG NN OSPVDIKTSETKHDTSEKPISVSYNPATAKEIINVG SFHVNFE FFIAKG ER OSPVDITTARYDPSLKESVS YDQATSLRILNNG AFNVEFD VPVKW GONCQKDR OSPINIVTTKAKVDKKLGRFFFSG YDKQTWTQNNG SFVVFD VPVKW GONCQKDR OSPINIVTTKAKVDKKLGRFFFSG YDKKQTWTQNNG SVNNLLE VSVPGG TR OSPINIVTKAKVDKKLGRFFFSG YDKKQTWTQNNG SVNNLLE VSVPGG DR OSPINIVTKAKVDKKLGRFFFSG YDAKQTWTQNNG SVNNLLE YPVGG DR OSPINIVTKAKVDKLGRFFFSG YDAKQTWTQNNG SVVNLLE YPAGG DR OSPINIVTKAKVDKLGRFFFSG YEAASCLYUWNG TVQISL YPIAQG DR OSPINIVG SYLVPISVG YEAASCLYUNG TVQISL YPIAQG DR OSPINISSQAVYSPSL QPLELS YEACHSLSITNNG SVQVDFN FPDANG FF OSPINISSQAVYSPSL DVRLSFN YGRCHSLSITNNG SVQUDFN SPACAG FF OSPINISSMISSAN PSL DVRLSFN GGEKLNGTLYNTG HVSSLRLD SLCAVG FR OSPINISSNIY PPLTPLRLS GGEKLNGTLYNTG HVSSLRLD SLCAVG FR OSPIDLHSDLLQYDAS FF LEFQQYNLSANKQFLITNG HVSSLRLD SLCAVG FR OSPIDLSSNIK SVYDFL TVLRS GGEKLNGTLYNTG HVSSLRLD SLCAVG FR OSPIDLSSNIK SVYDFL TVLRS TGESKVSGTNYNTG HVSSLRLD SLCAVG FR OSPIDLSSNIK SVYDFL TVLRS YDSSAKILSNIG SVSLLFLA YPSCG LL OSPIDLSSNIK SVYDFL TVLRS YDSSAKILSNIG SVSLLFLA YPSCG FR OSPIDLSSNIK SVYDFD TVLS YDSSAKILSNIG SVSLLFA	771 7779 453300 8772 6775 11872 67726
CAH1 CAH2 CAH3 CAH4 CAH5A CAH5B CAH6 CAH6 CAH6 CAH1 CAH10 CAH10 CAH11 CAH12 CAH13 CAH14	DNDNRSVIK GGP FSD SYRLFQ FHY HWG STNEH GSHTVDGVKYSAELHVAHWNSA DSQDKAVLK GGP LDG TYRLIQ FHY HWG SIDGQ GSHTVDGVKYSAELHLVHWNSA DTYDRSMLR GG LDG TYRLIQ FHY HWG SIDGQ GSHTVDGVKYAAELHLVHWN - P- NKASISGG GLPAP YQAKQLHLHWG SIDGH GSHTVDGVKYAAELHLVHWNSV- DATEASGIS GGPLEN HYRLKQ FHY HWG AIDAWGSENTVDGVKYAAELHLVHWNSV- DSTDKSVIKGG PLEH NYRLKQ FHY HWG AIDAWGSENTVDGVKYAAELHLVHWNSV- STMRMTVA DGTV YIAQQMH HWGGASSEIS GSHTVDGKF FPAELHLVHWNAV- STMRMTVA DGTV YIAQQMH WWGGASSEIS GSHTVDGKF FPAELHLVHWNAV- STMRMTVA DGTV YIAQQMH WWGGASSEIS GSHTVDG TAHVIE I HIVHYNS - - SKSVLSGGPL DQ GHFFLYEVRY WG RENQRGSENTVDG TAHVIE HIVHWNAK- SKSVLSGCPL DQ GHFFLYEVRY WG RENQRGSENTVEGHTVFKAFP MELHLIHWN ST - FGLEMALG PGRY YRALQLHLWG SADSQGSENTVEGHTVFKAFP MELHLIHWNST - STMFYGG GD LY SHKLSEL KLFG SADSQGSENTVEGHTVFKAFP MELHLIHWNST - SDMHIQGL QGFL SHKLSELRLFG SADSQGSENLUNGQAFSGEVOL HYNHE SDMHIQGL QSR YFATQLHLWG - NARDF GSENTVEGQHFSAEVOL HYNKS - SDHHQGL QSR YFALQLHUWG - SADDAGSENQUNHQOFSAEVOL HYNKE STMHYWY SUGPL YRALQLHUWG SADDAGSENQUNHQUSSAEVAN STHYWNS - GFLUY SHKLSELRLFG SADSQGSENLUNGQAFSGEVOL HYNKE STMHIQGL QSR YFATQLHUWG SADDAGSEN VUNGQAFSAEVOL HYNSD - STHYLGGL QFR YFAQLHUWG SADDH GSEN YWG SAAELHVYHWNSD - STLYLGGL PRK YVAAQLHLWWG - SADDHGSEN YWG SAAELHVYHWNSD - STLYLGGL PRK YVAAQLHLWWG - SADDHGSEN YWG SAAELHVYHWNSD -	126 125 125 129 129 127 129 128 220 164 139 128 27 127
CAH1 CAH2 CAH3 CAH5A CAH5B CAH6 CAH6 CAH7 CAH8 CAH9 CAH10 CAH11 CAH112 CAH13 CAH13 CAH14	K SSLAFRASKADGLAVIGVLMKVGE - ANPKLQKVL - DALQAIKTKGKRAPFTNFDPST GDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGE - ANPKLQKVL - DALQAIKTKGKRAPFTNFDPST K DDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGE - ANPKLQKVV - DVLDSIKTKGKRAPFTNFDPSC T RNVKE QDFDEIAVLGIFLKIGH - ENGEFQIFL - DALDKIKTKGKEAPFTKFDPSC T RNVKE QDFDEIAVLGVFLKIGA - HQTLQRLV - DILPEIKHKDARAMRPFDPST R ENFEDALEENGLAVIGVFLKLGA - HHQTLQRLV - DILPEIKHKDARAMRPFDPST K KSYDI QDAPDGLAVLAFVEVKN - YFENTYSNFISHLANIKYFQRTTLGDVQD K STFGEASAPDGLAVUGVFLKIGA - HHXELQKLV - DTLPSIKHKDALVEFGSFDPSC K KSYDI QDAPDGLAVLAFVEVKN - YFENTYSNFISHLANIKYFQRTTLTCDDVQD K STFGEASAPDGLAVVGVFLETGD - EHPSMNRLT - DALYMVRFKGTKAQFSCFNPKC L GSIDE VGKPHGIAILAFVEVG - ENVGLKAVT - EILQDIQYKGKSKTIPCFNPNT A ARVDE LGRPGGLAVLAFLEEG - PEENSATKQLLSRLEEIAEEGSETQVFGLDISA L TNVTEAKSPNGLAVLAFLEEG - PEENSATSNPFLSKLINNDTITRISYKNDAYLLQGLNIEE L GNFSANSRGFNGLAILSJVNVASTSNPFLSKLLNNDTITRISYKNDAYLLQGLNIEE L SSTSSAHEDGLAVLGVLQUFLGG - SFNPSYDKIFSHQHVKKGEAFVDGPNIEE K PSFVEAHEPGGLAVLGVLQUFQIGE - PNSQLQKIT - DTLDSIKEKGKQTRFNPFLEE	183 182 1881 1881 1866 1865 72295 1865 185 185

CAHI	TTESSTDEWTWPERTTERTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTSTS	24
CAH2	LIDE SLOWTYD GSLTTDLLECVTVLLEE ISVSSEAVLEEBELNENGEGEDEEL	23
CAHS	IFRACRDYWTYOGSFTTBRCFFCTYWLLLFFRMTYSSDOMAKIDSLISSAFNFPPVP	23
CAHA	LIDKERKINHVENLASI, TERTOREKVVWTVFREDTOIHERATI, AROKIVVDKEOTVS-	24
CANEA		23
CANSA		2.4
CANSE	UNPTCPDIWTESGELTTPLESESVI WITK KOPVEVDRDQLEQFRILLFISEGERERK	
CARG	LIPKNDQRIITIRGSDTTPPCTENVRWFVLADFVLSKTQVKLENSLDBRNK	- 4 9
CAH7	LLPA SRHYWTYPGSLTTPPLSESVTWIVLREPICISEROMGKPRSLLFTSEDDERIH	24
CAHS	LLPDPL-LRDWWVEGSLTIPPCSEGVTWILFRYPLTISQLQIEEPRRLKHVKGAELVE	20
CAH9	LLPSDFSRYFQYEGSLTTPPCAQGVIWTVFNQTVNLSAKQLHTLSDTLWGPGDS	33
CAH10	LIPETSSFITTDGSRTIPPCIETASWIIMNKPVYITRMOMHSLRLLSQNQPSQIFLS	28
CAH11	LFPESFGFITYQGELSTPPCSETVTWILIDRALNITSLOMHSLRLLSQNPPSQIFQS	25
CAH12	LLPERTAEYYRYRGSLTTPPCNPTVLWTVFRNPVQISQEQLLALETALYCTHMDDPSP	24
CAH13	LLPP SWDYWTYPGSLTVPPLLESVTWIVLKQPINISSQQLAKFRSLLCTAEGEAAAF	24
CAH14	LLPKQLGQYFRYNGSLTTPPCYQSVLWTVFYRRSQISMEQLEKLQGTLFSTEEE-PS-	24
	L	
		26
CARL		20
CAH2		25
CARS	LVSNWRPP PINNRVVRASPA	40
CAH4	MKDNVRPLQQLGQRTVIKSGAPGRPLPWALPALLGPMLACLLAGFLR	- 21.94
CAHSA		
	QATNEGTRSQATNEGTRS	26
CAH5B	QATNEGTRSQATNEGTRSQATNEGTRS	26
САН5В САН6	QATMEGTRSQATMEGTRSQATMEGTRS	262827
CAH5B CAH6 CAH7	QATMEGTRSQATMEGTRSQATMEGTRS	26 28 27 26
CAH5B CAH6 CAH7 CAH8	WVNYRPLQPLMNRKVWASPQATNEGTRS- WVDNFRPLQPLMNRTVRSSPRHDYUNVQARPKPATSQATP TIHNDYRRTQPLNNRVVESNPPNQEYTLGSEFQFY WVNNFRPPQPLSGRVVKASFRA	2628272628
CAH5B CAH6 CAH7 CAH8 CAH9	QATMEGTRSQATMEGTRSQATMEGTRS	26 28 27 26 28 38
CAH5B CAH6 CAH7 CAH8 CAH9 CAH9 CAH10	KVNNYRPLOPLMNKKVWASFQATMEGTRS- MVDNFRPLOPLMNKTVRSSFRHDYVLNVQAKPKPATSQATF- 	26 28 27 26 28 38 32
CAH5B CAH6 CAH7 CAH8 CAH9 CAH10 CAH11		26 28 27 26 28 38 32 30
CAH5B CAH6 CAH7 CAH8 CAH9 CAH10 CAH11 CAH12	QATMEGTRS	26 28 27 26 28 38 30 29
CAH5B CAH6 CAH7 CAH8 CAH9 CAH10 CAH11 CAH12 CAH13	QATMEGTRS	26 28 27 26 28 32 30 29 26
CAH5B CAH6 CAH7 CAH8 CAH9 CAH10 CAH11 CAH12 CAH13 CAH14		26 27 28 27 28 32 30 26 28 29 26 28

1.1 pav. Žmogaus karboanhidrazių izoformų aminorūgščių sekų palyginimas. Sekos, vienodos visoms CA izoformoms, pažymėtos tamsiai pilka, mažiau sutampančios šviesiai pilka spalvomis. Sutampantys histidinai (koordinuojantys metalo joną) pažymėti žaliai. Aktyvios sritys pažymėtos raudonai. Vandenilio prisijungimo akceptorius treoninas pažymėtas šviesiai mėlyna spalva. Antrinės struktūros elementai yra pažymėti virš amino rūgščių sekos, kur kilpas sudarančios aminorūgštys pažymėtos juoda linija,  $\beta$  klostės žaliomis juostomis, o  $\alpha$  spiralės raudonomis rodyklėmis (Hassan et al., 2013).

Antrinės struktūros analizė parodė, kad CA I, CA II ir CA III turi labai didelį panašumą (1.2 lentelė). Beveik visos CA turi dvi identiškas polipeptidines grandines, išskyrus CA II, CA III ir CA VIII, kurios turi 1 grandinę, ir CA IX, kuri sudaryta iš 4 grandinių.

CAs	CAI	CAII	CAIII	CAIV	CAVA	CAVB	CAVI	CAVII	CAVIII	CAIX	CAX	CAXI	CAXII	CAXIII	CAIV
CAL	100														
CAII	60	100													
CAIII	53	58	100												
CAIV	30	33	31	100											
CAVA	47	50	45	23	100										
CAVB	46	52	43	23	58	100									
CAVI	31	33	32	26	27	24	100								
CAVII	50	56	49	31	48	49	34	100							
CAVIII	39	40	38	27	33	34	28	41	100						
CAIX	31	33	20	25	27	26	35	35	31	100					
CAX	26	28	27	23	24	24	19	27	27	20	100				
CAXI	25	30	28	22	24	26	18	26	28	21	50	100			
CAXII	35	34	31	26	27	25	32	37	28	36	21	19	100		
CAXIII	59	59	57	28	46	47	33	52	39	34	27	27	34	100	
CAXIV	34	35	34	25	29	25	32	35	27	37	19	23	40	37	100

1.2 lentelė. CA sekų panašumai išreikšti procentais(Hassan et al., 2013).

Dauguma CA izoformų (išskyrus VI, IX ir XII) egzistuoja kaip monomerai, sudaryti iš 7 dešinio sukimo  $\alpha$  spiralių ir susuktų  $\beta$  klosčių, suformuotų iš 10  $\beta$  gijų (2 paralelės ir 8 antiparalelės) (Aggarwal, Kondeti & McKenna, 2013) (1.2 pav.).



1.2 pav. Karboanhidrazės II struktūrą vaizduojantis modelis. Centre esantis cinko jonas pavaizduotas kaip violetinis apskritimas, koordinuojamas trijų histidinų ir hidroksido jono. Nurodyti N- ir C-terminaliniai domenai. Raudonai pažymėtos  $\alpha$ -spiralės, geltonai  $\beta$ -klostės (Alterio et al., 2012).

Karboanhidrazės atlieka skirtingas funkcijas specifinėse žmogaus organizmo vietose. Jų nebuvimas ar funkcionavimo sutrikimas gali sukelti ligas (http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=49), todėl CA izofermentai yra svarbūs taikiniai diuretikų, glaukomą, epilepsiją, nutukimą, vėžį gydančių vaistų kūrime (Pacchiano et al., 2011).

#### 1.2. Katalizinis karboanhidrazių aktyvumas

Katalizinis CA aktyvumas yra detaliai išnagrinėtas. Visose fermento klasėse metalo hidroksidas, kuris suformuojamas vandeniui koordinuojant metalo joną, yra kataliziškai aktyvus. Neutraliame pH veikia kaip stiprus CO<sub>2</sub> molekulės, prisijungusios hidrofobinėje kišenėje, nukleofilas.

α-CA aktyvi sritis yra išsidėsčiusi didelėje kūgio formos ertmėje, kuri pasiekia fermento centrą. Šią sritį sudaro metalo jonas su trimis baltymo ligandais, esančiais prie vandens molekulės/hidroksido jono (http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=49). Katalizinis Zn(II) jonas yra šios ertmės apačioje (Kockar et al., 2010). α-, γ-, ir δ-CA klasėse metalo jono ligandai yra trys His liekanos, o β- ir ζ-CA turi vieną His ir dvi Cys liekanas (http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=49).

Visi komponentai aktyviajame centre išsidėstę taip, kad sudarytų tetraedrą. Buvo nustatyta, jog Zn(II) arba Co(II) gali išsidėstyti sudarydami trikampę bipiramidinę ar aštuonšonės koordinacijos formą (1.3 pav.).



1.3 pav. Aktyvaus centro geometrinės koordinacijos: a) tetraedrinė, cinko jonui jungiantis su sulfonamidine junginio grupe, b) trikampė bipiramidinė, cinko jonui jungiantis su anijoniniu slopikliu (Supuran, 2008).

Histidinų grupė įtraukta į protonų šaudyklės procesus tarp aktyvios srities ir aplinkos (grupei priklauso His94, His96, His119, His64, His4, His3, His17, His15 ir Hi10) (1.4 pav.). Protonų šaudyklė yra atsakinga už vandens molekulės, prisijungusios prie cinko jono, vertimą į hidroksido joną prieš katalizę (Hassan et al., 2013). Daugumoje fermentų metalo koordinuojamo vandens virtimas į metalo hidroksidą yra katalizinės reakcijos greitį nulemiantis faktorius, dėl kurio tam tikrų  $\alpha$ - ir  $\zeta$ -CA k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> vertės didesnės nei 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, todėl CA yra efektyviausias gamtoje randamas katalizatorius (http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=49).

His64 yra išlaikytas CA I, CA II, CA IV, CA VI, CA VII ir CA XIII izoformose, bet CA III turi lizino liekaną šioje padėtyje ir dėl to turi apytiksliai 0.3% aktyvumo, lyginant su CA II. CA III trys histidino liekanos skirtingose padėtyse 64, 67, ir 131 yra pakeistos Lys64, Arg67 ir Phe131 ir jos dalyvauja protonų pernešime katalizės metu (Hassan et al., 2013).



1.4 pav. Katalizinis α-CA centras (Supuran, 2008).

Prie Zn<sup>2+</sup> prisijungusios tirpiklio molekulės yra sujungtos vandeniliniais ryšiais su kitomis vandens molekulėmis, vadinamomis giluminiu vandeniu (angl. *The deep water*) ir su aminorūgšties Thr199 hidroksido dalimi, kuri sudaro jungtį su Glu106 karboksiline dalimi. Šios sąveikos padidina prie Zn<sup>2+</sup> prisijungusios vandens molekulės nukleofiliškumą ir orientuoja CO<sub>2</sub> substratą į vietą, "patogiausią" nukleofilinei atakai. Daugelio CA izoformų aktyvusis centras sudarytas iš dviejų skirtingų dalių – hidrofobinių ir hidrofilinių aminorūgščių sričių. Aminorūgštys, esančios 121, 131, 141, 143, 198 ir 209 pozicijose sudaro hidrofobinę sritį, o 62, 64, 67, 92 ir 200 pozicijose, sudaro hidrofilinę. Visos šios aminorūgštys yra įtrauktos į katalizę (Kockar et al., 2010).

Aktyvi fermento forma (prie cinko prisijungęs hidroksido jonas) (1.5 pav. a) stipriai nukleofiliškai atakuoja CO<sub>2</sub> molekulę, kuri yra prisijungusi kaimyninėje hidrofobinėje kišenėje. Dėl to vyksta bikarbonato formavimasis koordinuojamas cinko (1.5 pav. b). Bikarbonato jonas yra pakeičiamas vandens molekule ir paleidžiamas į tirpalą. Susiformuoja rūgštinė fermento (lygtyje žymimas raide E) forma, kuri yra kataliziškai neaktyvi (1.5 pav. c) (Supuran, 2008).

 $CO_2 + EZnOH^+ \leftrightarrow EZnHCO_3^+ \leftrightarrow EZnH_2O^{2+} + HCO_3^-$  (Maupin & Voth, 2010).

Pagrindinės formos regeneravimas vyksta perduodant protoną iš aktyvios srities į aplinką, kuriame gali dalyvauti aktyvios srities liekana (tokia kaip His64) arba buferinis tirpalas (Supuran, 2008).

Vanduo, prisijungęs prie cinko jono, yra suskaidomas į protoną ir hidroksido joną (1.5 pav. d). Neigiamą hidroksido joną stabilizuoja teigiamas cinko jonas, kuris gali prisijungti anglies dioksidą (http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=49).

His64 – EZnH<sub>2</sub>O<sup>2+</sup> + B ↔ H<sup>+</sup>His64 – ZnOH<sup>+</sup> + B ↔ His64 – EZnOH<sup>+</sup> + BH<sup>+</sup> (Maupin & Voth, 2010). B raide lygtyje žymimas buferinis tirpalas.



1.5 pav. Karboanhidrazių katalizuojamos reakcijos schema (Supuran, 2008). Paveikslėlio paaiškinimas pateikiamas tekste.

### 1.3. Karboanhidrazių izofermentai

Žmogaus organizme esančios CA izoformos skiriasi viena nuo kitos kataliziniu aktyvumu, paplitimu audiniuose ir pasiskirstymu ląstelėje (1.3 lentelė).

CA I, CA II, CA III, CA VII ir CA XIII yra citozolinės. CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV yra susijungusios su membrana. CA VI sekretuojama į seiles ir pieną. CA VA ir CA VB yra mitochondrinės. Taip pat yra trys CA katalizinio aktyvumo neturinčios formos, vadinamos į CA panašiais baltymais (*angl. CA-related proteins, CARPs*): CARP VIII, CARP X ir CARP XI (1.6 pav.) (http://www.worthington-biochem.com/CA/default.html). Jie neaktyvūs dėl to, jog neturi vieno ar daugiau cinką koordinuojančių histidinų. Dėl šios priežasties CARP nedalyvauja CO<sub>2</sub> hidratacijos procese (Hassan et al., 2013).

Izoformo	k <sub>cat</sub>	K <sub>M</sub>	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub>	Pasiskirstymas					
	$(s^{-1})$	( <b>mM</b> )	$(M^{-1} s^{-1})$	Ląstelėje	Audiniuose/Organuose				
CA I	$2 \cdot 10^{5}$	4,0	5,0·10 <sup>7</sup>	Citozolinė	Raudonuosiuose kraujo kūneliuose, virškinamajame trakte				
CA II	1,4·10 <sup>6</sup>	9,3	1,5·10 <sup>8</sup>	Citozolinė	Raudonuosiuose kraujo kūneliuose,virškinamajame trakte, akyse, osteoklastuose, inkstuose, plaučiuose, sėklidėse, smegenyse				
CA III	$1,0.10^4$	33,3	$3,0.10^{5}$	Citozolinė	Griaučių raumenyse, adipocituose				
CA IV	1,1.10 <sup>6</sup>	21,5	5,1.107	Membrana	Inkstuose, plaučiuose, kasoje, smegenyse, kapiliaruose, gaubtinėje žarnoje, širdies raumenyse				
CA VA	$2,9 \cdot 10^5$	10,0	$2,9.10^{7}$	Mitochondrinė	Kepenyse				
CA VB	9,5·10 <sup>5</sup>	9,7	9,8·10 <sup>7</sup>	Mitochondrinė	Širdies ir griaučių raumenyse, kasoje, inkstuose, virškinamajame trakte, stuburo smegenyse				
CA VI	$3,4.10^{5}$	6,9	4,9·10 <sup>7</sup>	Sekretuojama į seiles ir pieną	Seilių ir pieno liaukose				
CA VII	$9,5 \cdot 10^5$	11,4	$8,3.10^{7}$	Citozolinė	Centrinėje nervų sistemoje				
CARP VIII		-		Citozolinė	Centrinėje nervų sistemoje				
CA IX	$3,8.10^{5}$	6,9	$5,5.10^{7}$	Transmembraninė	Navikuose, virškinamajame trakte				
CARP X		-		Citozolinė	Centrinėje nervų sistemoje				
CARP XI		-		Citozolinė	Centrinėje nervų sistemoje				
CA XII	$4,2.10^{5}$	12,0	3,5·10 <sup>7</sup>	Transmembraninė	Inkstų, žarnyno, ninė reprodukciniame epiteliuose akyse, navikuose				

1.3 lentelė. CA izoformų katalizinis efektyvumas ir pasiskirstymas (Aggarwal, Boone, Kondeti & McKenna, 2013).

CA XIII	1,5·10 <sup>5</sup>	13,8	$1,1.10^{7}$	Citozolinė	Inkstuose, smegenyse, plaučiuose, žarnose, reprodukciniame trakte
CA XIV	$3,1.10^{5}$	7,9	3,9·10 <sup>7</sup>	Transmembraninė	Inkstuose, smegenyse, kepenyse



1.6 pav. CA izoformų pasiskirstymas ląstelėje ir jų katalizinis aktyvumas. Mėlyna spalva pažymėtos ląstelės citoplazmoje, raudona – mitochondrijose esančios karboanhidrazės, žaliai pažymėtos susijungusios su membrana, o geltonai – sekretuojamos CA izoformos. Du pliusai žymi dideliu kataliziniu aktyvumu pasižyminčias izoformas, vienas pliusas – mažesniu, pliusas ir minusas nurodo, kad aktyvumas labai mažas, o minusas reiškia, kad izofermentas neaktyvus (Truppo et al., 2012).

Šiame darbe dėmesys skiriamas penkioms karboanhidrazių izoformoms: CA I, CA II, CA VII, CA XII ir CA XIII.

#### 1.3.1. Karboanhidrazė I

CA I yra randama visoje gyvūnų karalystėje (Manokaran et al., 2010). Žmogaus organizme CA I ir CA II yra pagrindiniai izofermentai, kurių didelės koncentracijos yra eritrocitų citozolyje (Ekinci et al., 2010), tačiau CA I ekspresija yra 5-6 kartus didesnė nei CA II. Nors CA I yra labiausiai paplitęs nehemoglobininis baltymas raudonosiose kraujo ląstelėse, tačiau jo nebuvimas neparodė jokių pakitimų (Kockar et al., 2010).

CA I greitina hidratacijos reakciją bei skatina kalcio druskų formavimąsi, todėl didelė CA I ekspresija vaidina svarbų vaidmenį kaulėjimo procese (Chang et al., 2012). Be to, siekiant atskirti autoimuninę hemolitinę mažakraujystę nuo kitų anemijos tipų, ši izoforma tarnauja kaip biožymeklis (Kockar et al., 2010). Per didelė šio fermento raiška sukelia tinklainės ir smegenų edemą (Alterio et al., 2012).

CA I turi 33% CA II katalizinio aktyvumo. Abu fermentai turi didelę sekos homologiją.

Šios izoformos unikalus bruožas – aktyviajame centre esanti His200 aminorūgštis, kai tuo tarpu CA II ir dauguma kitų izoformų šioje padėtyje turi treoniną. Todėl CA I aktyviojo centro ertmė yra gerokai mažesnė lyginant su CA II (Kockar et al., 2010).

#### 1.3.2. Karboanhidrazė II

Tai labiausiai paplitusi karboanhidrazių izoforma (Mahdiuni et al., 2013). Ji ekspresuojama beveik kiekviename audinyje ir organe, įskaitant osteoklastus kauluose, choroidinių rezginių epitelį, tinklainės Miulerio ląsteles, hepatocitus, inkstus, oligodendrocitus (Kockar et al., 2010) ir astrocitus (Klier et al., 2011) smegenyse, seilių liaukas, eritrocitus ir trombocitus (Kockar et al., 2010).

CA II genas (*CA2*) buvo nustatytas 8q22 chromosomos genų sankaupoje, kurioje yra CA I, CA III ir CA XIII genai (Bootorabi et al., 2010). *CA2* yra 20 kb ilgio ir turi 7 egzonus (Bosley et al., 2011). Nors CA II ir CA I genai yra išsidėstę toje pačioje chromosomoje, bet šių fermentų raiška audiniuose tarpusavy nėra susijusi (Hassan et al., 2013).

*CA2* raiškos sutrikimai yra osteoporozės, susietos su inkstų kanalėlių rūgštėjimu (žinomos kaip CA II nepakankamumo sindromas), ir Guibaud-Vainsel sindromo (padidėjęs kaulų tankis (http://www.rightdiagnosis.com/medical/guibaud\_vainsel\_syndrome.htm)) priežastis (Kockar et al., 2010). Atlikti tyrimai parodė padidėjusią CA II raišką stemplės, inkstų, plaučių navikuose bei esant gliomai (Hynninen et al., 2011). Be to, tai gali būti ir epilepsijos, glaukomos bei edemos priežastis (Alterio et al., 2012).

Iš kitų karboanhidrazių CA II išsiskiria labai dideliu fermentiniu aktyvumu (1.3 lentelė) (Iliuta et al., 2013). Yra tik keletas prokariotinių ekstremofilinių karboanhidrazių, kurių fermentinis aktyvumas yra panašus, tačiau jų termostabilumas didesnis (Aggarwal, Kondeti & McKenna, 2013).

Dėl CA II savybių (dideli kinetiniai parametrai, lengva ekspresija, didelis tirpumas) šį izofermentą tikimasi panaudoti ir pramoniniams tikslams, t.y. išmetamųjų dujų anglies dioksido surinkimui. Jau yra sukurti CO<sub>2</sub> surinkimo ir jo pavertimo biokuru metodai, panaudojant iš dumblių išskirtas karboanhidrazes (Aggarwal, Kondeti & McKenna, 2013).

#### 1.3.3. Karboanhidrazė VII

CA VII yra viena iš mažiausiai išnagrinėtų ir suprastų citozolinių CA izoformų. Šis fermentas daugiausia yra ekspresuojamas smegenyse (žievėje, hipokampe bei gumbure) ir prisideda prie neuroninio sužadinimo bei impulsų generavimo (Fiore et al., 2010). Taip pat įtrauktas į cerebrospinalinio skysčio gaminimą centrinėje nervų sistemoje (Aggarwal, Kondeti & McKenna, 2013). CA VII raiška vyksta ir keliuose kituose organuose: skrandyje, dvylikapirštėje ir gaubtinėje žarnose, kepenyse bei skeleto raumenyse (Bootorabi et al., 2010). CA VII gali būti įtraukta į neuropatinio skausmo (skausmas, atsirandantis dėl pačios nervų sistemos pažeidimo arba jos funkcijos sutrikdymo) kontrolę (Fiore et al., 2010), naudojama kaip gliomos biožymeklis (Bootorabi et al., 2011). Raiškos padidėjimas sukelia epilepsiją (Alterio et al., 2012).

Kaip ir CA II, CA VII turi labai didelį katalizinį aktyvumą. Šio fermento kcat/K<sub>M</sub> vertė yra lygi  $8,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Bet priešingai nei CA II, CA VII turi mažesnį pasiskirstymą žmogaus organizme(Truppo et al., 2012).

Žmogaus *CA7* genas yra 16q22 chromosomoje, tuo tarpu kitų citozolinių karboanhidrazių (CA I, CA II, CA III ir CA XIII) genų vieta yra chromosomoje 8q21. *CA7* yra 10 kb ilgio bei turi 7 egzonus ir 6 intronus. Šis genas koduoja baltymą, sudarytą iš 263 aminorūgščių (Bootorabi et al., 2010). Didelis šio fermento sekos panašumas su kitomis citozolinėmis karboanhidrazių izoformomis (CA VII/CA I = 50%, CA VII/CA II = 55%, CA VII/CA III = 49%, CA VII/CA XIII = 52 %). Tai nulemia labai didelį baltymų tretinių struktūrų panašumą (Fiore et al., 2010).

#### 1.3.4. Karboanhidrazė XII

CA XII yra transmembraninis baltymas, turintis užląstelinį katalizinį domeną (Morris et al., 2011). Jis yra ekspresuojamas sveiko endometrinio epitelio bazolateralinėje plazminėje membranoje. Šis fermentas taip pat randamas inkstų, gaubtinės žarnos ir pieno liaukų epitelinėse ląstelėse. Pernelyg didelė šio fermento ekspresija aptinkama keliuose vėžio tipuose (Hynninen et al., 2011), tokiuose kaip difuzinė astrocitoma, žarnų, krūties, kasos, kiaušidžių ir inkstų karcinomos. *In vitro* ir *in vivo* tyrimai parodė, kad CA XII funkciškai susijusi su navikiniais procesais ir prisideda prie naviko ląstelių gyvybingumo ir augimo palaikymo neutralizuodama viduląstelinio pH rūgštingumą. Jos ekspresija sumažėja kai pH vėl tampa įprastinis (Ilie et al., 2011).

CA XII taip pat gali būti aktyvi tarpiniame metabolizme, pvz., gliukoneogenezėje, šlapalo ar riebalų rūgščių sintezėje (Hassan et al., 2013).

#### 1.3.5. Karboanhidrazė XIII

CA XIII yra citozolinis fermentas, randamas seilių pažandinėje bei užkrūčio liaukose, inkstuose, plonojoje žarnoje (Hilvo et al., 2008), blužnyje, prostatoje, gaubtinėje žarnoje (Hassan et al., 2013) ir reprodukciniuose organuose (Hilvo et al., 2008). CA XIII yra lokalizuota sėklidėse viso spermos ląstelių vystymosi metu, ekspresuojama gimdos kaklelyje ir gimdos gleivinės liaukose. Tai parodo, kad šis fermentas yra įtrauktas į apvaisinimo procesą (Supuran et al., 2010) ir padeda palaikyti tinkamas sąlygas ląstelių dauginimuisi (Hassan et al., 2013). Per didelė šios karboanhidrazės izoformos raiška sukelia nevaisingumą (Alterio et al., 2012).

CA XIII aminorūgščių seka labai panaši į kitų citozolinių izoformų sekas: CA XIII/CA I =59%, CA XIII/CA II=60%, CA XIII/CA III =58%, CA XIII/CA VII=53% (Hilvo et al., 2008).

Tai yra vidutinio efektyvumo katalizatorius, tačiau slopinimo mechanizmas panašus į CA II (Baranauskienė & Matulis, 2012).

#### 1.4. Karboanhidrazių raiškos slopinimas

Dauguma CA izofermentų yra svarbūs taikiniai terapijoje. α-CA raiškos reguliavimas yra naudojamas glaukomos, edemos, epilepsijos, osteoporozės ir kitų ligų gydymui (http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=49).

Pagrindinis taikinys yra α-CA klasė, esanti žinduoliuose, tačiau šiuo metu vis daugiau atliekama tyrimų su β- ir γ-CA klasių izofermentais, randamais bakterijose, grybuose ir archėjose, kurie gali būti reikšmingi taikiniai gydant infekcines ligas (http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=49). Kadangi viena iš organizmo sutrikimo priežasčių yra padidėjusi CA izoformų raiška ląstelėse ir audiniuose, tuo tikslu yra kuriami karboanhidrazių slopikliai.

CA slopikliai priklauso 4 pagrindinėms klasėms:

- Sulfonamidai (ir jų izoesteriai, tokie kaip sulfamatai, sulfamidai ir t.t.) bei su metalu kompleksą sudarantys anijonai, kurie aktyvioje fermento srityje koordinuoja cinko joną į tetraedrinę ar trigonalinę bipiramidinę konformacijas (1.7 pav. A ir B).
- Fenoliai, kurie jungiasi prie cinko koordinuojamos vandens molekulės/hidroksido jono aktyviojoje srityje per dviejų vandenilinių jungčių tinklą (1.7 pav. C) (Durdagi et al., 2011). Fenolio OH grupė prisikabina prie vandens molekulės/hidroksido jono, susijungusio su cinku, per vandenilinę jungtį. Antra vandenilinė jungtis yra formuojama tarp tos pačios slopiklio OH grupės ir Thr199 amido grupės (Davis et al., 2010).
- Poliamidai, tokie kaip sperminai ir spermidinai, kurie jungiasi labai panašiai kaip fenoliai, t.y. prisikabindami prie vandens molekulės/hidroksido jono, kuris koordinuojamas cinko (1.7 pav. D).

 Kumarinai bei tiokumarinai, kurie turi slopinimo mechanizmą, nepriklausantį nuo cinko jono. Jie jungiasi (hidrolizuotoje formoje) į aktyvios srities vietą kaip aktyvatoriai, taip užblokuodami įėjimą į šią sritį (1.7 pav. E) (Durdagi et al., 2011).



1.7 pav. Karboanhidrazių slopinimo mechanizmas sulfonamidiniais ligandais (A ir B), fenoliais (C), poliamidais (D) ir kumarinais (E) (modifikuota iš(Durdagi et al., 2011)).

Klasikiniai CA slopikliai yra pirminiai sulfonamidai (RSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>). Tai yra labiausiai ištirti organiniai slopikliai, turintys įvairų medicininį taikymą. Jie naudojami daugiau nei 50 metų kaip diuretikai ir vaistai glaukomai gydyti (Supuran, 2011).

Sulfonamidinė grupė prisijungia prie katalizinio metalo jono fermento aktyviajame centre ir blokuoja jo funkcijas. Kartu su SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grupe į aktyvųjį centrą patenka ir maža slopinanti molekulė. CA aktyvi sritis toleruoja skirtingas struktūrines ypatybes slopiklio "uodegos" dalyje, tokias kaip dydis, forma ir krūvis, polinės bei hidrofobinės grupės ir t.t. Šis toleravimas leidžia struktūriškai manipuliuoti kuriamo ligando biofarmacinėmis ir toksikologinėmis savybėmis (Lopez et al., 2010).

Tačiau pagrindinė problema karboanhidrazių slopiklių kūrime yra susijusi su didžiuliu izoformų skaičiumi, jų pasklidusia lokalizacija daugelyje audinių ir organų (Turkoglu et al., 2012), pernelyg mažais skirtumais CA aktyviajame centre (Aggarwal, Kondeti & McKenna, 2013) bei slopiklių, kurie būtų atrankūs tam tikriems izofermentams, trūkumu (Turkoglu et al., 2012).

Yra apie 30 vaistų, priklausančių sulfonamidų ar sulfamatų klasei, slopinančių CA aktyvumą (Supuran, 2011).

Acetazolamidas yra CA slopiklis, naudojamas glaukomos, kalnų ligos ir lengvos širdies hipertenzijos gydymui. Mažinant NaCl ir bikarbonato reabsorbciją inkstų proksimaliniame vamzdelyje, jis taip pat gali veikti kaip nestiprus diuretikas. Metazolamidas taip pat yra CA slopiklis, kuris yra sunkiau pašalinamas nei acetazolamidas ir mažiau susijęs su pašaliniais inkstų efektais. Dorzolamidas yra sulfonamidas, naudojamas didesnio vidinio akies slėgio sumažinimui pacientams, kenčiantiems nuo glaukomos ar per didelio akies įtempimo. Topiramatas yra silpnas CA slopiklis (1.8 pav.) (Hassan et al., 2013).



1.8 pav. Sulfonamidinių karboanhidrazių slopiklių struktūrinės formulės. 1 – acetazolamidas, 2 – metazolamidas, 3 – dorzolamidas, 4 – topiramatas.

Dėl neselektyvaus slopiklių veikimo bei dėl to, jog karboanhidrazės yra pasiskirsčiusios daugelyje audinių ir organų, šie vaistai sukelia pašalinį poveikį, tokį kaip galūnių nutirpimas ir dilgčiojimas, metalo skonis, depresija, nuovargis, bendras negalavimas, svorio praradimas, sumažėjęs libido, skrandžio sudirginimas, metabolinė acidozė, inkstų akmenys ir laikina trumparegystė (Carta et al., 2012). Tai skatina atidžiau įvertinti struktūrinius izoformų skirtumus ir panaudoti juos kuriant naujus ir labiau specifiškus slopiklius (Aggarwal, Kondeti & McKenna, 2013). Esami junginiai gali būti naudojami kaip pradinės struktūros naujų slopiklių kūrimui (Supuran, 2011).

Tikslingas slopiklių kūrimas su stipriomis jungimosi savybėmis reikalauja detalių naujai susintetintų junginių struktūros-aktyvumo sąveikos (angl. *Structure-activity relationship*, *SAR*) tyrimų, jungimosi termodinamikos ir baltymo-ligando komplekso įvertinimo. Tam ypač svarbus yra jungimosi entalpijos nustatymas (Baranauskienė & Matulis, 2012).

#### 1.5. Ligando jungimosi su baltymu termodinamika

Ligandui jungiantis su baltymu, pastarojo pusiausvyra tarp išsivyniojusios ir natyvios struktūrų pasislenka į natyvią formą (Matulis et al., 2005), t.y. baltymas yra stabilizuojamas:  $[U]+[L] \stackrel{\kappa_a}{\leftrightarrow} [N]+[L] \stackrel{\kappa_b}{\leftrightarrow} [NL]$ (1)

kur [U] atitinka laisvo išsivyniojusio baltymo, [L] – laisvo igando, [N] – laisvo natyvaus baltymo, o [NL] – natyvaus baltymo su prisijungusiu ligandu koncentracijas.

Baltymo stabilumo ir ligando jungimosi pusiausvyros konstantos yra susijusios su laisvosiomis išsivyniojimo ir jungimosi energijomis:

$$K_{u} = \frac{\left[U\right]}{\left[N\right]} = e^{-\frac{\Delta_{U}G_{(T)}}{RT}} = e^{-\frac{\left(\Delta_{U}G_{(T)} - T\Delta_{U}S_{(T)}\right)}{RT}} = e^{-\frac{\left(\Delta_{U}H_{Tr} + \Delta_{U}C_{p}\left[T - T_{r} - T\left(\Delta_{U}ST_{r} + \Delta_{U}C_{p}\ln\left(\frac{T}{T_{r}}\right)\right)\right)\right)}{RT}}$$
(2)

$$K_{b} = \frac{\left[NL\right]}{\left[N\right]\left[L\right]} = e^{-\frac{\Delta_{b}G_{T}}{RT}} = e^{-\frac{\Delta_{b}H_{T} - T\Delta_{b}S_{T}}{RT}} = e^{-\frac{\left(\Delta_{b}H_{T_{0}} + \Delta_{b}C_{p}(T - T_{0}) - T\left(\Delta_{b}S_{T_{0}} + \Delta_{b}C_{p}\ln\left(\frac{T}{T_{0}}\right)\right)\right)}{RT}}$$
(3)

 $K_U$  yra baltymo išsivyniojimo pusiausvyros konstanta,  $K_b$  yra ligando jungimosi prie natyvaus baltymo konstanta.  $\Delta_U G_{(T)}, \Delta_U H_{(T)}, \Delta_U S_{(T)}$  ir  $\Delta_U C_p$  yra nuo temperatūros priklausomos baltymo stabilumo laisvosios Gibso energijos, entalpijos, entropijos ir šiluminės talpos funkcijos. O  $\Delta_b G_{(T)}, \Delta_b H_{(T)}, \Delta_b S_{(T)}$  ir  $\Delta_U C_p$ yra nuo temperatūros priklausomos ligando jungimosi laisvosios Gibso energijos, entalpijos, entropijos ir šiluminės talpos funkcijos.

Lygtys, nurodančios viso baltymo ( $P_t$ ) ir viso ligando ( $L_t$ ) kiekį:

$$P_{t} = [N] + [U] + [NL]$$

$$L_{t} = [L] + [NL]$$
(5)

Jas sujungus su (2) lygtimi ir pertvarkius, gaunama visa ligando koncentracija, reikalinga stabilizuoti baltymą:

$$L_{t} = \left(K_{u} - 1\right) \times \left(\frac{P_{t}}{2K_{U}} + \frac{1}{K_{b}}\right)$$
(Cimmperman & Matulis, 2011). (6)

#### 1.6. Terminio poslinkio metodas

Fluorescencinė skenavimo fluorimetrija, dar vadinama termofluoru<sup>®</sup> ar terminio poslinkio metodu (angl. *Thermal Shift Assay*, *TSA*), yra analizės metodas, naudojamas nustatyti baltymus stabilizuojančias sąlygas, tokias kaip buferiai, druskos ir t.t. Taip pat ji naudojama ieškant ligandų, kurie jungiasi ir stabilizuoja natyvią baltymo formą.

Baltymo išsivyniojimas registruojamas stebint fluorescenciją kylant temperatūrai. Į baltymo tirpalą yra dedamas dažas (Sorrell et al., 2010). Jis turi būti solvatochromiškas (pvz.,

ANS, SYPRO Orange), t.y. pasižymėti savybe nefluorescuoti vandenyje (vanduo tokio dažo fluorescenciją gesina), bet stipriai fluorescuoti nepolinėje aplinkoje (tokioje kaip hidrofobinės sritys, atsiveriančios baltymui išsivyniojant). Eksperimento pradžioje dažas su natyviu baltymu nesąveikauja. Kylant temperatūrai baltymas termiškai denatūruojamas, atsiveria jo hidrofobinės sritys ir dėl stiprios sąveikos tarp dažo ir šių sričių labai padidėja fluorescencijos signalas (Santos et al., 2012).

Termofluoro metodas vaizdina baltymo išsivyniojimą kaip atsaką į temperatūros didėjimą, charakterizuojamą smailėjančios formos perėjimo kreive tarp išsivyniojusios ir neišsivyniojusios struktūrų (1.9 pav.) (Kopec & Schneider, 2011). Šio terminio perėjimo vidurinis taškas yra vadinamas baltymo lydymosi temperatūra (T<sub>m</sub>) ir atitinka temperatūrą, kur išsivyniojimo laisvoji Gibso energija yra lygi nuliui, o natyvaus bei išsivyniojusio baltymo koncentracijos yra lygios (Santos et al., 2012). Baltymas pradeda išsivynioti dėl nuo temperatūros priklausomo Gibso energijos mažėjimo (Sorrell et al., 2010).



1.9 pav. Kreivės, gautos išmatavus ligando jungimasi su baltymu terminio poslinkio metodu (mano duomenys).

Junginys, kuris jungiasi prie baltymo paprastai sukelia Gibso energijos didėjimą. Tai sukelia teigiamą T<sub>m</sub> poslinkį lyginant su baltymu be ligando (Sorrell et al., 2010) (1.10 pav.). Ligando jungimasis prie baltymo suformuoja ligando-baltymo kompleksą, kurio lydymosi temperatūra  $T_{m_b}$ dažniausiai didesnė nei laisvo baltymo. Iš eksperimentinių duomenų nustatyta koreliacija tarp ligando jungimosi stiprumo ir lydymosi temperatūros poslinkio ( $\Delta T_m = T_{mb} - T_m$ ) (Hau et al., 2011).



1.10 pav. Baltymo stabilumo nustatymas fluorescenciniu terminio poslinkio metodu (Matulis, 2008).

Dauguma vieno domeno globulinių baltymų išsivynioja pakaitinus juos iki maždaug 60 laipsnių. Tariant, kad yra dvi baltymo būsenos, natyvi ir išsivyniojusi, baltymo išsivyniojimo tikimybė aprašoma lygtimi:

$$P_U = \frac{1}{1 + e^{\frac{\Delta_U G}{RT}}}$$
(7)

kur  $\Delta_{\mathbf{U}}\mathbf{G}$  yra išsivyniojimo laisvoji Gibso energija, R – universali dujų konstanta ir T – absoliuti temperatūra. Išsivyniojimo laisvoji Gibso energija gali būti išreiškiama per entalpijos ( $\Delta_{\mathrm{U}}$ H), entropijos ( $\Delta_{\mathrm{U}}$ S) ir šiluminės talpos ( $\Delta_{\mathrm{U}}$ C<sub>p</sub>) pokyčius, išsivyniojant baltymui arba baltymo-ligando sistemai:

$$\Delta_U G = \Delta_U H_{T_m} + \Delta_U C_p \left( T - T_m \right) - T \left( \Delta_U S_{T_m} + \Delta_U C_p \ln \left( \frac{T}{T_m} \right) \right)$$
(8)

Dažo fluorescencijos intensyvumas gali būti išreikštas lygtimi:

$$y(T) = y_U P_U + y_F (1 - P_u)$$
(9)

kur  $\mathbf{y}_{\mathbf{F}}$  yra dažo, prisijungusio prie natyvaus baltymo, fluorescencijos intensyvumas prieš išsivyniojimo perėjimą (tranziciją);  $\mathbf{y}_{\mathbf{U}}$  yra dažo, prisijungusio prie išsivyniojusio baltymo, fluorescencijos intensyvumas po perėjimo. 1– $P_U$  yra tikimybė, kad baltymas natyvios būsenos (Cimmperman & Matulis, 2011).

Pertvarkius (10) lygtį, gauname lygtį, apibūdinančią baltymo išsivyniojimo kreives:

$$y(T) = y_F + \frac{y_U - y_F}{1 + e^{-\frac{\Delta_U G_{(T)}}{RT}}} = y_U + \frac{y_F + y_U}{1 + e^{-\frac{\Delta_U G_{(T)}}{RT}}}$$
(10)

Eksponentė nurodo tikimybę, jog baltymas, kurio laisvoji energija yra  $\Delta_U G_{(T)}$ , išsivynios. Tiek pradinis, tiek galutinis fluorescencijos intensyvumas keičiasi dėl temperatūros ir gali būti aproksimuotas kaip tiesinė priklausomybė:

$$y_{F(T)} = y_{F,T_m} + m_F (T - T_m)$$
(11)

$$y_{U(T)} = y_{U,T_m} + m_U (T - T_m)$$
(12)

 $m_F$  yra fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros pokrypio kampas, kai dažas yra prisijungęs prie natyvaus baltymo;  $m_U$  yra fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros pokrypio kampas, kai dažas yra prisijungęs prie išsivyniojusio baltymo. Tiesinė ANS fluorescencijos priklausomybė nuo temperatūros yra pirma aproksimacija. Realiai, ANS fluorescencijos priklausomybė nuo temperatūros nėra tiesinė. Nepaisant to, pirmoji aproksimacija dažnai duoda pakankamai tikslias baltymo lydymosi temperatūras. Sujungus 8, 10-12 lygtis, gaunamas modelis, pagal kurį aproksimuojamos baltymo lydymosi kreivės.

$$y(T) = y_{F,T_{m}} + m_{F}(T - T_{m}) + \frac{(y_{U,T_{m}} - y_{F,T_{m}}) + (m_{U} - m_{F})(T - T_{m})}{\left(\Delta_{U}H_{T_{m}} + \Delta_{U}C_{p}(T - T_{m}) - T\left(\Delta_{U}S_{T_{m}} + \Delta_{U}C_{p}\ln\left(\frac{T}{T_{m}}\right)\right)\right)}$$
(13)  
$$1 + e^{-RT}$$

(Matulis et al., 2005)

Jungimosi konstanta fiziologinėje temperatūroje T<sub>0</sub> išreiškiama lygtimi:

$$K_{b,T_0} = e^{-\frac{\left(\Delta_b H_{T_0} - T_0 \Delta_b S_{T_0}\right)}{RT_0}}$$
(14)

(Cimmperman & Matulis, 2011)

 $K_d$  nustatymas iš  $T_m$  ir  $T_m$  priklausomybės nuo ligando koncentracijos ( $L_t$ ) simuliacija atliekama remiantis lygtimis:

$$K_{d}^{T_{m}} = K_{d}^{37^{\circ}C} \times e^{\left[\frac{-\Delta H_{L}^{37^{\circ}C}}{1,9872} \times \left(\frac{1}{298,15} - \frac{1}{T_{m}}\right) + \frac{\Delta C_{pL}}{1,9872} \times \left(\ln\left(\frac{298,15}{T_{m}}\right) + 1 - \frac{298,15}{T_{m}}\right)\right]}$$
(15)

$$K_{u}^{T_{m}} = e^{\left[\frac{\Delta H_{u}^{T_{0}}}{1,9872} \left(\frac{1}{T_{0}} - \frac{1}{T_{m}}\right) + \frac{\Delta C_{pu}}{1,9872} \left(\ln\left(\frac{T_{m}}{T_{0}}\right) + \frac{T_{0}}{T_{m}} - 1\right)\right]}$$
(16)

$$L_{t} = \left(1 - \frac{1}{K_{u}^{T_{m}}}\right) \times \left(\frac{P_{t}}{2} + K_{u}^{T_{m}} \times K_{d}^{T_{m}}\right)$$
(17)

$$L_f^{T_m} = L_T - \frac{P_t}{2} \times \left(1 - \frac{1}{K_u^{T_m}}\right)$$
<sup>(18)</sup>

$$K_{d}^{T_{m}} = \frac{\left[L_{f}^{T_{m}}\right]}{e^{\left[\frac{\Delta H_{u}}{1,9872} \times \left(\frac{1}{T_{0}} - \frac{1}{T_{m}}\right) + \frac{\Delta C_{pu}}{1,9872} \times \left(\ln\left(\frac{T_{m}}{T_{0}}\right) + \frac{T_{0}}{T_{m}} - 1\right)\right]}} - 1$$

$$K_{d}^{37^{\circ}C} = \frac{\left[K_{d}^{T_{m}}\right]}{e^{\left[\frac{\Delta H_{L}^{37^{\circ}C}}{1,9872} \times \left(\frac{1}{29815} - \frac{1}{T_{m}}\right) + \frac{\Delta C_{pL}}{1,9872} \times \left(\ln\left(\frac{29815}{T_{m}}\right) + 1 - \frac{29815}{T_{m}}\right)\right]}}$$
(20)

T<sub>0</sub> ir T<sub>m</sub> yra išsivyniojimo temperatūros tranzicijos viduryje kai nėra ir kai yra ligandas.  $K_d^{T_m}$  ir  $K_d^{37^{\circ}C}$  yra disociacijos konstantos T<sub>m</sub> srityje ir 37 laipsnių temperatūroje.  $K_u^{T_m}$  yra išsivyniojimo konstanta tranzicijos vidurio temperatūroje esant ligandui.  $\Delta H_L^{37^{\circ}C}$  ir  $\Delta H_u^{T_0}$  yra entalpijos pokytis ligandui prisijungiant 37 laipsnių temperatūroje ir išsivyniojimo entalpijos pokytis tranzicijos vidurio temperatūroje kai nėra ligando.  $\Delta C_{pL}$  ir  $\Delta C_{pu}$  yra šiluminės talpos pokytis ligandui jungiantis ir išsivyniojimo šiluminės talpos pokytis.  $L_f^{T_m}$  yra laisvo ligando koncentracija temperatūroje T<sub>m</sub>, kai L<sub>t</sub> ir P<sub>t</sub> yra viso ligando ir viso baltymo koncentracijos (Vilenchik et al., 2011).

Ligando tinkamumas taikiniui yra charakterizuojamas lygtimi

$$-RT\ln K = \Delta G = \Delta H - T\Delta S \tag{21}$$

kur  $\Delta G$  yra laisvosios Gibso energijos pokytis,  $\Delta H$  entalpijos pokytis,  $\Delta S$  entropijos pokytis, T absoliuti temperatūra, K pusiausvyros konstanta, R dujų konstanta. Buvo pastebėta, kad entalpijos įtakojami junginiai yra labiau tinkami tolimesniems optimizavimams nei tie, kuriuos įtakoja entropija (Hau et al., 2011).

Atidėję  $T_m$  priklausomybę nuo pridėto ligando koncentracijos, gauname grafiką, parodytą 1.11 pav. Taškai žymi eksperimentines  $T_m$  reikšmes, o linija atitinka pagal (6) formule aprašytą modelį. Pirmasis taškas yra kontrolinis (ten nėra ligando). Kreivė gana tiksliai pakartoja eksperimentinius taškus (Matulis, 2008).



1.11 pav. Baltymo lydymosi temperatūros  $T_m$  priklausomybė nuo ligando koncentracijos (Matulis, 2008).

TSA naudojamas baltymo-ligando jungimosi konstantų, reikalingų farmacijos pramonėje, nustatymui. Šis biofizikinis metodas gali būti taikomas bet kokiai baltymo-ligando nekovalentinio jungimosi reakcijai, nepriklausomai nuo to, ar ligandas stabilizuoja ar destabilizuoja baltymą po jungimosi (Zubrienė et al., 2010).

#### 1.7. Izoterminė titravimo kalorimetrija

Molekulinių ryšių analizavimui buvo sukurta daug skirtingų metodų, bet izoterminė titravimo kolorimetrija (angl. *Isothermal titration calorimetry*, *ITC*) yra unikali savo gebėjimu suteikti daug termodinaminės informacijos vienu eksperimentu (Ghai et al., 2012). Ji tiesiogiai matuoja šiluminius parametrus, kai formuojamos ar nutraukiamos nekovalentinės jungtys molekulėms sudarant kompleksą. Kiti metodai reikalauja netiesioginių skaičiavimų remiantis van't Hoff<sup>°</sup>o lygtimi (22 lygtis) (Ladbury, 2010).

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial \frac{1}{T}}\right)_{p} = -\frac{\Delta H}{R}$$
(22)

ITC yra plačiai naudojama mokslo ir farmacijos tyrimams. Tai yra vienintelis metodas, kuris išmatuoja disociacijos konstantą (K<sub>d</sub>), molinę jungimosi entalpiją ( $\Delta$ H) ir jungimosi stechiometriją (n) vienu eksperimentu. Jungimosi izotermės forma parodo kaip tikslai K<sub>d</sub> vertės gali būti apibrėžtos (Broecker et al., 2011). Šiems trims parametrams galima gauti jungimosi 1:1 rezultatus su maždaug 1% santykine standartine paklaida (Falconer & Collins, 2011). Iš šių verčių galima apskaičiuoti laisvąją Gibso energiją  $\Delta$ G ir entropijos indėlį jungimuisi

$$(-T\Delta S),$$

$$\Delta G = -RT \ln K_{b}$$
(23)

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \tag{24}$$

kur R yra dujų konstanta (8.314 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>), o T yra temperatūra Kelvino laipsniais.

Jungimosi entalpija  $\Delta H$  priklauso nuo temperatūros. Matavimai skirtingose temperatūrose leidžia apskaičiuoti jungimosi šiluminę talpą  $\Delta C_p$  iš lygties  $\Delta C_p = \delta \Delta H / \delta T$ . Todėl yra įmanoma išgauti visus jungimosi termodinaminius parametrus atlikus vos kelis eksperimentus (Ghai et al., 2012).

ITC veikimas pagrįstas vieno reaktanto titravimu į kitą, esant izoterminėms sąlygoms. Matuojamas signalas yra dviejų reaktantų absorbuota arba išsiskyrusi šiluma jungimosi metu. Šis šilumos pokytis yra matuojamas nustatant galią, kuri yra reikalinga pastovios temperatūros palaikymui. Pastovi temperatūra palaikoma tokia, kokia yra palyginamajame tirpale, kuris yra palyginamojoje celėje (Ghai et al., 2012). Palyginamoji celė yra standartinė celė, pripildyta vandens ar buferio. Mėginio ir palyginamąją celes jungia jautrios termoporos, naudojamos matuoti šilumos pokytį (Krishnamoorthy & Mohanty, 2011).

Kiekviena injekcija sukelia signalo piką, kuris grįžta į bazinę liniją po keleto minučių. Visą seką sudaro 20 – 30 tokių individualių eksperimentų, kai titrantas yra injekuojamas į celę, kurioje yra reaktantas ir produktai, susidarę ankstesnių injekcijų metu (Tellinghuisen, 2012).

Ligando titravimo metu išskirtos/sugertos šilumos pokyčio greičio priklausomybė nuo laiko yra nubraižoma kaip termograma. Ji turi eilę asimetrinių Gauso pikų. Kiekvieno piko integravimas parodo šiluminės energijos dydį, susidarantį kiekviename titracijos žingsnyje. Pirmoje titracijos pusėje integruota šios energijos vertė parodo šilumą, įtrauktą į baltymoligando komplekso formavimąsi. Kai pasiekiamas įsotinimas, stebima tik ligando skiedimosi šiluma. Skiedimosi šilumos, gautos titravimo metu, pataisa atliekama sudedant dviejų titravimų indėlius: pirma, ligando titravimas į buferį, antra, buferio titravimas į baltymą. Gauti rezultatai atimami iš galutinių baltymo-ligando titravimo rezultatų (Krishnamoorthy & Mohanty, 2011). ITC eksperimentuose šiluminės energijos pokytis yra išgaunamas integruojant individualius termogramos pikus vienos jungimosi srities modeliu, per grafiko viršų nubrėžiant bazinę liniją ir integruojant plotus tarp nustatytos bazinės linijos ir gautos kreivės. Visų smailių plotai atidedami atskirame grafike. Iš jų nustatomi jungimosi parametrai (1.12 pav.) (Matulis, 2008).



1.12 pav. Izoterminės titravimo kolorimetrijos metodu gauta titravimo kreivė ir jos integruota forma (Baranauskienė & Matulis, 2012) (Jogaite et al., 2013).

ITC eksperimentai gali išmatuoti disociacijos konstantą 100  $\mu$ M – 10 nM ribose; eksperimento modifikacija gali išplėsti šią ribą (Ladbury, 2010). Tinkamiausia makromolekulių koncentracija apibūdinama c parametru ( $c = K_b \times M$ ). Optimalios c vertės yra ribose tarp 10 ir 1000 (MR Duff et al., 2011). Ekstremaliomis sąlygomis, kai jungimasis yra labai silpnas ( $c \rightarrow 0$ ) arba labai stiprus ( $c \rightarrow \infty$ ), K<sub>d</sub> negali būti nustatytas tiksliai tiesioginiu ITC eksperimentu. Tam, kad K<sub>d</sub> būtų tiksliai apibūdinta, literatūroje siūlomos skirtingos c vertės ribos: 1-1000, 10-200, 1-500 ar 500-1000 (Broecker et al., 2011).

1.13 pav. parodytos teorinės titravimo kreivės, gautos esant įvairiems c faktoriams. Jei c faktorius yra labai didelis, kreivė yra labai stati ir iš jos negalima tiksliai apskaičiuoti jungimosi konstantos. Jei c faktorius labai mažas, kreivė gaunama gulsčia, nes pridėjus ligando vyksta tik dalinis jungimasis (Matulis, 2008). c faktorius neturi įtakos entalpijos matavimams.



1.13 pav. Teorinės izoterminio titravimo kreivės, esant įvairiems c faktoriams (Matulis, 2008).

Broecker et al. (2011) savo straipsnyje teigia, kad eksperimentai tiksliausiai atliekami c vertei esant 40 (Broecker et al., 2011).

# 1.8. "Tikrieji" parametrai

Dauguma straipsnių, aprašančių naujų junginių jungimąsi su fermentais, apsiriboja išmatuotais termodinaminiais jungimosi parametrais arba slopinimo konstantomis (K<sub>i</sub>). Tokie duomenys yra naudingi kuriant naujus slopiklius, tačiau jie neturėtų būti naudojami struktūros-aktyvumo sąveikai (angl. *structure-activity relationships,SAR*). Tinkama SAR gali būti nustatyta tik su tikraisiais jungimosi parametrais, kurie yra atskirti nuo reakcijų, vykstančių tuo pačiu metu kaip ir jungimasis. Dažniausiai tokios reakcijos yra protonizacija ir deprotonizacija.

Žodžiu "tikrasis" apibūdinami parametrai, kurie nusako faktinę jungimosi reakciją. Sulfonamidinio slopiklio jungimosi prie karboanhidrazės atveju tikrieji jungimosi komponentai yra deprotonizuotas sulfonamidas ir CA, turinti protonizuotą prie cinko prisijungusią vandens molekulę. Tik šios dvi formos jungiasi viena prie kitos. Tokie atvejai yra galimi ne su visais karboanhidrazių izofermentais ir tik su tais slopikliais, kurių pK<sub>a</sub> ženkliai žemesnis nei 7. Dauguma sulfonamidinių slopiklių pK<sub>a</sub> yra tarp 8 ir 11, todėl deprotonizuotoje formoje yra mažos junginio, kuris jungiasi prie baltymo, frakcijos. Dėl šios priežasties išmatuotos jungimosi energijos yra sumažėjusios ir nepanašios į tikruosius parametrus (Baranauskienė & Matulis, 2012).

Daugumos CA izofermentų pKa ~7. Todėl slopiklių jungimasis yra priklausomas nuo pH. Šios jungimosi reakcijos privalo būti smulkiai išanalizuotos, tam kad būtų galima išgauti tikruosius parametrus.

Tikroji jungimosi konstanta susijusi su aktyvių jungimosi dalių frakcijomis. Be to, reikia žinoti ir stebimąją jungimosi konstantą:

$$K_b = \frac{K_{b_{obs}}}{\left(f_{RSO_2NH^-} f_{CAZ_nH_2O}\right)}$$
(25)

kur deprotonizuoto sulfonamido ir protonizuotos CA frakcijos, kaip pH funkcijos yra:

$$f_{RSO_2NH^-} = \frac{10^{pH - pK_{a_sulfonamidt}}}{1 + 10^{pH - pK_{a_sulfonamidt}}}$$
(26)

$$f_{CAZ_nH_2O} = 1 - \frac{10^{pH - pK_{a_Zn_water}}}{1 + 10^{pH - pK_{a_Zn_water}}}$$
(27)

Tikroji jungimosi entalpija turi išmatuotos jungimosi entalpijos ( $\Delta_b H_{obs}$ ), slopiklio entalpijos ( $\Delta_{b\_proton\_inh}H$ ), CA ( $\Delta_{b\_proton\_CA}H$ ) ir buferio protonizacijos ( $\Delta_{b\_proton\_CA}H$ ) entalpijos indėlius:

$$\Delta_b H = \Delta_b H_{obs} - n_{inh} \Delta_{b\_proton\_inh} H - n_{CA} \Delta_{b\_proton\_CA} H - n \Delta_{b\_proton\_buf} H$$
(28)  
kur  $n_{inh} = f_{RSO_2NH^-} - 1$ ,  $n_{CA} = 1 - f_{CAZ H_2O}$ ,  $n = -(n_{inh} + n_{CA})$  (Jogaite et al., 2013).

# 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

#### 2.1. Naudoti reagentai

- 1. ANS (gamintojas "Sigma-Aldrich")
- 2. Natrio chloridas (gamintojas "Sigma-Aldrich")
- 3. DMSO (gamintojas "Roth")
- 4. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (gamintojas "Fluka Chemie AG")
- 5. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (gamintojas "Fisher Scientific")
- 6. TRIS bazė (gamintojas "Sigma-Aldrich")
- 7. TRIS HCl (gamintojas"Sigma-aldrich")
- 8. Sulfonilinti tiofenai (susintetinti Latvijos organinės sintezės institute, organinės chemijos skyriuje)



 Sacharininiai junginiai (susintetinti Latvijos organinės sintezės institute, organinės chemijos skyriuje)



# **2.2. Ligandų jungimosi su baltymais matavimai terminio poslinkio metodu** Ligando ir baltymo tirpalai paruošiami atskirai:

- Ligandas ištirpinamas DMSO, gaunamas 0,01 M tirpalas. Jį skiedžiant vandeniu ruošiami 400 μM, 266,66 μM, 177,78 μM, 118,52 μM, 79,02 μM, 52,68 μM, 35,12 μM, 23,42 μM, 15,60 μM, 10,40 μM, 6,94 μM ir 0 μM koncentracijų tirpalai, kuriuose DMSO kiekis yra 4%.
- Paruošiamas baltymo tirpalas, kuriame yra 100 μM ANS, 100 mM fosfatinio buferio (pH=7), 100 mM NaCl ir 20 μM baltymo.

Į mėgintuvėlius įpilama po 10 µL ligando ir baltymo tirpalų. Galutiniuose tirpaluose, kurie bus matuojami terminio poslinkio metodu, yra 10 µM baltymo koncentracija ir skirtingos ligando koncentracijos, DMSO kiekis 2%. Matavimai atliekami realaus laiko PGR aparatu (R-Corbet), temperatūra keliama 1°C per minutę nuo 25 iki 99 °C. Žadinama 365 nm ilgio banga, fluorescencija registruojama ties 460 nm.

Gauti rezultatai apdorojami ThermoFluor++ 1.4.2 ir Microsoft Office Excel programomis.

# 2.3. Ligandų jungimosi su baltymais matavimai izoterminės titravimo kalorimetrijos metodu

Atskirai paruošiama po 2 mL ligando ir baltymo tirpalų:

- Į tirpalą, kuriame yra 50 mM fosfatinio buferio, 100 mM NaCl ir 2% DMSO, įpilami tiek fermento, kad jo galutinė konc tirpale būtų 5 μM fermento.
- Ligando tirpale junginio turi būti 10 kartų daugiau nei CA izoformos baltymo tirpale (t.y. 50 µM), tačiau NaCl, buferio ir DMSO koncentracijos lieka tokios pat.

Tokie baltymo ir ligando kiekiai reikalingi tam, kad praėjus pusei eksperimento visi baltymo aktyvieji centrai būtų susijungę su ligandu ir daugiau jungimasis nebevyktų.

Eksperimentai atliekami VP-ITC kalorimetru (gamintojas "Microcal"). Švirkštas užpildomas ligando, o celė baltymo tirpalais. Nustatomos 25 injekcijos, kurių metu baltymas bus titruojamas ligandu. Viena injekcija trunka 5 sekundes, injekuojama kas 200 sekundžių. Vienos injekcijos tūris yra 10 μL. Eksperimentai atliekami 25°C temperatūroje.

Duomenys apdorojami Origin5 programa.

# 2.4. Junginių pK<sub>a</sub> verčių nustatymas

Eksperimentuose naudojamų ligandų vertės nustatomos naudojant ChemAxon kompanijos Marvin programos įrankį MarvinSketch.

### 2.5. Fermento izoformų jungimosi entalpijų nustatymas

Baltymo izoformų jungimosi entalpijos nustatomos ITC metodu. Eksperimentai atliekami naudojant gerai ištirtą komercinį karboanhidrazių slopiklį etokzolamidą (EZA).

Išmatuojamas fermento jungimasis su slopikliu dviejuose buferiniuose tirpaluose, kurių protonizacijos entalpijos skiriasi – fosfatiniame ir TRIS. Matavimai atliekami skirtinguose pH.

Duomenys apdorojami naudojant Origin5 ir Microsoft Office Excel programas.

# **3. REZULTATAI**

#### 3.1. Karboanhidrazės izoformų jungimasis su slopikliais

Terminio poslinkio ir izoterminės titravimo kalorimetrijos metodais buvo išmatuotos tiriamų slopiklių jungimosi su I, II, VII, XII ir XIII karboanhidrazių izoformomis konstantos. Eksperimentų atlikimas naudojant du skirtingus metodus duoda patikimesnius rezultatus nei rezultatai, išmatuoti tik vienu metodu.

Dauguma tiofeninių sulfonamidų su CA izofermentais jungėsi stipriau lyginant su sacharininiais junginiais, todėl terminio poslinkio grafike kreivių lydymosi temperatūros labiau pasislinkusios į aukštesnių temperatūrų pusę, esant toms pačioms junginių koncentracijoms baltymo tirpale (3.1 pav.).



3.1 pav. Terminio poslinkio metodu gautos CA XIII jungimosi su A4 ir B3 junginiais kreivės, esant skirtingoms junginio koncentracijoms.

Šiuo metodu išmatavus junginio B1, neturinčio sulfonamidinės grupės, jungimąsi su visomis CA izoformomis, poslinkio nebuvo (3.2 pav.). Tai parodo, jog šie sacharininiai junginiai, neturėdami pirminės sulfonamidinės grupės, negali būti karboanhidrazių slopikliai.



3.2 pav. Terminio poslinkio metodu gautos CA VII jungimosi su B1 junginiais kreivės, esant skirtingoms junginio koncentracijoms.

Tam, kad būtų nustatytos jungimosi konstantos, nubrėžiamas  $T_m$  priklausomybės nuo ligando koncentracijų grafikas (3.3 pav.). Prie eksperimentinių rezultatų, keičiant jungimosi

konstantą, priartinamos modelinės kreivės, apskaičiuotos pagal (6) lygtį ir tokiu būdu nustatomi jungimosi termodinaminiai parametrai.



3.3 pav. CA XIII jungimosi su A4 ir B3 junginiais bei CA VII jungimosi su B1 ligandu dozavimo kreivės. CA izoformų ir slopiklių poros parinktos atsitinktinai, kad iliustruotų jungimosi skirtumus.

ITC metodu nebuvo galima tiksliai nustatyti visų jungimosi konstantų dėl per stiprios kai kurių ligandų sąveikos su fermentu (c faktorius > 1000). Tokios kreivės gautos statesnės, lyginant su kreivėmis, kai matavimų c faktorius buvo ribose tarp 1 ir 1000 (3.4 pav.). Tada buvo pasitikima tik terminio poslinkio metodu išmatuotomis konstantomis. Kitu atveju, kai ITC eksperimentiniai duomenys buvo patikimi, buvo apskaičiuojamas ITC ir TSA metodais gautų jungimosi konstantų vidurkis ir tokie duomenys buvo naudojami tolimesnėms analizėms (3.1 lentelė). Jungimosi entalpijų matavimams šiuo metodu c faktorius, kai jis yra daugiau už 1000, neturi įtakos.



3.4 pav. Izoterminėms titravimo kalorimetrijos metodu gautos kreivės CA II jungiantis su junginiu A1 (kairėje) ir B3 (dešinėje).

Junginys	CAI	CA II	CA VII	CA XII	CA XIII
A1	8,5·10 <sup>8</sup>	1,8·10 <sup>8</sup>	$1,7.10^{8}$	$4,2.10^{7}$	$2,1\cdot 10^7$
A2	$2,8.10^{8}$	6,5.107	$3,7.10^{7}$	$2,0.10^{7}$	$2,1\cdot 10^7$
A3	3,0·10 <sup>8</sup>	$1,7.10^{8}$	$3,3.10^{7}$	1,9·10 <sup>7</sup>	$1,7.10^{7}$
A4	$2,3 \cdot 10^{9}$	$5,0.10^9$	$3,2.10^{9}$	$3,5.10^{8}$	7,6·10 <sup>8</sup>
A5	$6,0.10^{7}$	$2,4.10^{8}$	$2,5 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^7$	$3,0.10^{7}$
B1	$1,0.10^4$	$1,0.10^4$	$1,0.10^4$	$1,0.10^4$	$1,0.10^4$
B2	$6,3 \cdot 10^5$	$3,2.10^{6}$	$1,9.10^{6}$	8,8·10 <sup>6</sup>	7,6·10 <sup>6</sup>
B3	$2,6.10^{7}$	$3,3.10^{7}$	6,0.107	$2,5.10^{6}$	$2,2.10^{7}$
B4	$3,0.10^{9}$	$4,0.10^{8}$	$2,3.10^{8}$	$4,5.10^{7}$	$1,5.10^{8}$

3.1 lentelė. Tiriamų junginių jungimosi su I, II, VII, XII ir XIII karboanhidrazių izoformomis išmatuotos jungimosi konstantos ( $M^{-1}$ ).

Tam, kad būtų lengviau įvertinti funkcinių grupių įtaką jungimuisi bei slopiklių atrankumą karboanhidrazių izoformoms, jungimosi konstantos pagal (23) formulę buvo perskaičiuotos į laisvąsias Gibso energijas ir atidėtos adityvumo "žemėlapiuose" (3.5 ir 3.6 pav.). Laisvosios Gibso energijos aprašo sąveikos stiprumą. Jei jos vertė neigiama, esant pastoviai temperatūrai ir slėgiui, procesas vyks spontaniškai (Matulis, 2008). Kuo mažesnė laisvosios Gibso energijos vertė, tuo junginys yra geresnis karboanhidrazės slopiklis.

3.5 pav. Išmatuotos laisvosios Gibso energijos tiofeniniams sulfonamidams jungiantis su I, II, VII, XII ir XIII CA izoformomis bei  $\Delta$ G pokyčiai atsirandantys dėka pridėtos/pakeistos junginio funkcinės grupės.
3.6 pav. Išmatuotos laisvosios Gibso energijos sacharininiams junginiams jungiantis su I, II, VII, XII ir XIII CA izoformomis bei  $\Delta$ G pokyčiai atsirandantys dėka pridėtos/pakeistos junginio funkcinės grupės.

Pagrindinis jungimosi matavimų uždavinys yra suprasti kaip termodinaminiai parametrai koreliuoja su besijungiančio komplekso struktūra. Tyrinėjant baltymo-ligando sąveikas daugiausia dėmesio skiriama bandymams išsiaiškinti, kuri junginio funkcinė grupė įtakoja termodinaminius parametrus, t.y. analizuojama, kokie cheminiai pokyčiai padarytų jungimąsi dar stipresniu ir labiau specifiniu (Baranauskienė et al., 2009).

Skaičiai prie horizontalių ir vertikalių rodyklių adityvumo "žemėlapiuose" parodo kaip pakinta laisvoji Gibso energija pridėjus/pakeitus funkcinę junginio grupę. Skaičiai, esantys prie kampu pakreiptų rodyklių parodo laisvosios Gibso energijos pokytį slopikliui jungiantis su skirtingais karboanhidrazių izofermentais.

Tiofeninių sulfonamidų atveju A1 junginiui jungiantis su pirma karboanhidraze laisvoji Gibso energija lygi -51,0±0,8 kJ/mol. Jungimosi reakcijos su kitomis CA izoformomis ΔG tampa mažiau neigiama.

Pakeitus benzeno žiedą benzilo grupe (A2 junginys) jungimosi su CA izoformomis reakcijos laisvoji Gibso energija tapo labiau teigiama.  $\Delta G$  vertė labiausiai negiama A2 jungiantis su CA I ( $\Delta G$ = -48,2±1,2 kJ/mol), o labiausiai teigiama – su CA XII ir CA XIII ( $\Delta G$ = -41,7±1,3 kJ/mol).

Ligando A4 laisvoji Gibso energija jungiantis su CA I tapo neigiamesnė ( $\Delta\Delta G$ = - 2,4±0,9 kJ/mol) lyginant su A1 slopikliu. Jungimosi su kitomis CA izoformomis laisvosios Gibso energijos irgi tapo labiau neigiamos.

Vertinant A4 junginio laisvosios Gibso energijos pokyčius jam s1veikaujant su skirtingomis CA izoformomis, labiausiai neigiama ∆G gauta vykstant šio slopiklio jungimosi reakcijai su CA II bei CA VII ir ji yra apytiksliai lygi -54,5 kJ/mol. Teigiamiausia šio termodinaminio parametro vertė ligandui jungiantis su CA XIII.

A2 slopiklio funkcinės benzilo grupės pakeitimas S-2-metiltiofenu (A3 junginys) jungimuisi su karboanhidraze I įtakos neturėjo. Tačiau tai turėjo įtakos jungimuisi su CA II ( $\Delta\Delta G$ = -2,4±1,6 kJ/mol). S1veikos su kitomis CA izoformomis S-2-metiltiofenas neįtakojo lyginant su A2 junginiu. Tačiau kaip ir A2 slopiklio jungimosi atveju, A3 stipriausiai jungėsi su CA I ( $\Delta G$ = -48,4±1,0), o silpniausiai su CA XII ir CA XIII ( $\Delta G$ = -41,0±2,0 kJ/mol).

A5 ligando sąveikos su CA I  $\Delta G$  vertė tapo labiau teigiama, bet laisvosios Gibso energijos vertė tampa neigiamesnė slopikliui jungiantis su kitais karboanhidrazės izofermentais lyginant su A2 jungimusi. Didžiausias skirtumas matomas jungimosi su CA VII reakcijoje ( $\Delta\Delta G$ = -4,7±1,3 kJ/mol). Vertinant A5 laisvosios Gibso energijos pokytį jam jungiantis su skirtingomis CA izoformomis,  $\Delta G$  vertė labiausiai neigiama vykstant sąveikai su CA II ir CA VII ( $\Delta G$ = -48±1,1 kJ/mol). Labiausiai teigiama vertė gauta jungimosi reakcijoje su CA XII ( $\Delta G$ = -42,7±0,5 kJ/mol).

Stipriausias tiofeninių sulfonamidų jungimąsis vyksta karboanhidrazių izofermentams jungiantis su A4 slopikliui. Tačiau nei vienas iš tirtų junginių nepasižymėjo labai dideliu selektyvumu CA izoformoms (3.7 pav.).



3.7 pav. Tiofeninių sulfonamidų jungimosi su karboanhidrazių izoformomis stulpelinė diagrama.

Atliekant eksperimentus su sacharininiais junginiais B1 ligandas nesijungė (arba jungėsi labai silpnai) su CA izoformomis, t.y. šio ligando jungimosi laisvoji Gibso energija yra teigiamesnė nei -22,8 kJ/mol, nes kai ligando koncentracija tirpale yra 200  $\mu$ M, terminio poslinkio metodu negalime išmatuojame mažesnių jungimosi konstantų nei 10<sup>4</sup> M (3.8 pav.).



3.8 pav. Baltymo denatūracijos temperatūros, simuliuotos priklausomybės nuo pridėtos ligando koncentracijos ir nuo ligando jungimosi konstantų (Matulis, 2008). Iš apatinės kreivės matome, jog esant ligando koncentracijai 200  $\mu$ M, poslinkio, kai jungimasis labai silpnas (Kb $\leq 10^4$  M<sup>-1</sup>), matyti negalime.

Ligandas B2 stipriausiai jungėsi su CA XII ir CA XIII ( $\Delta G$ = -40±1.8 kJ/mol). Mažiausiai neigiama  $\Delta G$  vertė gauta B2 jungiantis su CA I (-33,1±1,2 kJ/mol).

Prie B2 jungio pridėjus alkino grupę (B3 junginys) jungimosi su CA I, CA II, CA VII ir CA XIII laisvoji Gibso energija tapo neigiamesnė lyginant su B2 ligandu. Jungimosi su CA XII reakcijos ΔG tapo teigiamesnė.

Mažiausia  $\Delta G$  vertė gauta jungiantis B3 slopikliui su CA VII ( $\Delta G$ = -44,4±0,3 kJ/mol), o didžiausia su CA XII ( $\Delta G$ = -36,5±0,9 kJ/mol).

Pakeitus B3 junginyje esančią alkino grupę (2-etil)fenilo grupe (B4 junginys), laisvosios Gibso energijos jungiantis su CA izoformomis tapo neigiamesnės. Neigiamiausia  $\Delta G$  vertė B4 jungimosi reakcijoje gauta ligandui jungiantis su CA I ( $\Delta G$ = -54,1±1,0 kJ/mol), o teigiamiausia jungiantis su CA XII ( $\Delta G$ = -43,7±0,4 kJ/mol) izoformomis.

B1 junginio, neturinčio sulfonamidinės grupės, laisvosios Gibso energijos išmatuoti negalima dėl labai silpno jungimosi. Sacharininis junginys, turintis pirminę sulfonamidinę grupę, bet neturintis kitos funkcinės grupės, jungėsi ne stipriai, lyginant su ligandais, turinčiais papildomas funkcines grupes. Tačiau nei vienas iš tirtų sacharininių junginių nepasižymėjo labai dideliu selektyvumu CA izoformoms (3.9 pav.).



3.9 pav. Sacharininių sulfonamidų jungimosi su karboanhidrazių izoformomis stulpelinė diagrama. B1 junginys neturi pirminės sulfonamidinės grupės, todėl jo jungimosi  $\Delta G$ > -22,8 kJ/mol. Stulpelinėje diagramoje tokia vertė atidėta kaip atskaitos taškas, vertinant kitų ligandų, turinčių pirminę sulfonamidinę grupę, jungimosi stiprumą.

### 3.2. Baltymų pK<sub>a</sub> ir jungimosi protonizacijos entalpijos verčių nustatymas

Vykstant ligando-baltymo jungimuisi, tuo pačiu metu vyksta ir kitos papildomos reakcijos, pagrinde protonizacija-deprotonizacija. Stebėti šių reakcijų įtaką galima matuojant jungimosi entalpijas izoterminės titravimo kalorimetrijos metodu buferiuose, turinčiuose skirtingas entalpijas, esant įvairioms pH vertėms. Tokie eksperimentai buvo atlikti izoterminės titravimo kalorimetrijos metodu naudojant komercinį karboanhidrazių slopiklį EZA, kurio sulfonamidinės grupės pK<sub>a</sub> yra 8. Dėl to jungimosi metu sulfonamidinė grupė turi deprotonizuotis, o hidroksido molekulė, esanti prie cinko jono aktyviajame fermento centre, turi protonizuotis tam, kad galėtų vykti jungimosi reakcija. Be to, slopiklis ir fermentas protonus atiduoda į/pasiima iš juos supančio buferinio tirpalo. Tris buferio protonizacijos entalpija yra didelė ir lygi -47,4 kJ/mol, tuo tarpu fosfatinio buferio entalpija lygi -5,1 kJ/mol (Baranauskienė and Matulis, 2012), todėl vykstant jungimosi reakcijai šiuose buferiniuose tirpaluose išmatuotos entalpijos ženkliai skiriasi (3.10 pav.).



3.10 pav. CA XII jungimosi su EZA reakcijos entalpijos, išmatuotos skirtinguose buferiniuose tirpaluose, pH= 8,5.

Eksperimentai buvo atlikti su I ir XII karboanhidrazių izoformomis Tris ir fosfatiniame buferiniuose tirpaluose 25°C temperatūroje.

Iš gautų ITC kreivių matoma, kad reakcija yra stipriai egzoterminė, t.y. jungimosi metu išsiskiria šiluma. Dideli pikai parodo eksperimento metu vykstančių reakcijų (jungimosi, protonizacijos-deprotonizacijos), o maži pikai – skiedimosi metu išskiriamą šilumą (3.11 pav.). Kreivės statumas nusako jungimosi stiprumą – kuo kreivė statesnė, tuo jungimasis stipresnis.



3.11 pav. ITC kreivė EZA jungiantis su CA XII. Matavimai atlikti Tris buferyje, pH= 7,5, 25°C temperatūroje.

3.12 pav. rodo integruotas ITC kreives ir jų priklausomybę nuo pH (esant vienodam buferiniam tirpalui).



3.12 pav. EZA jungimasis su CA XII fosfatiniame buferyje, esant skirtingoms pH vertems, 25°C temperatūroje.

Išmatuotos CA I jungimosi su EZA entalpijos fosfatiniame buferyje kinta nuo -16,0 kJ/mol pH= 4,5 iki -91,0 kJ/mol pH= 9,5 (3.2 lentelė). Tris buferyje kinta nuo -60,0 kJ/mol, kai pH= 6,8 iki -45,4 kJ/mol, kai pH= 9,2 (3.3 lentelė).

pH	$K_b, M^{-1}$	ΔG, kJ/mol	ΔH, kJ/mol	TΔS, kJ/mol
4,5	$3,8.10^{6}$	-37,6	-16,0	17,3
5,2	$3,4\cdot 10^{6}$	-37,3	-14,1	18,6
5,5	$4,7.10^{6}$	-38,1	-17,1	16,9
6,1	$3,6.10^{6}$	-37,4	-19,8	14,2
6,6	$1,5 \cdot 10^7$	-40,9	-22,0	15,1
7,0	$2,6\cdot 10^7$	-42,3	-29,1	10,6
7,6	$1,9.10^{7}$	-41,6	-34,4	5,7
8,0	$1,0.10^{7}$	-40,1	-48,7	-7,0
8,4	$6,8.10^{6}$	-39,0	-59,4	-16,4
8,6	$2,4.10^{6}$	-36,5	-70,0	-26,9
8,7	$5,2.10^{6}$	-38,3	-73,1	-27,9
9,0	$4,1.10^{6}$	-37,8	-75,6	-30,3
9,4	$1,1.10^{6}$	-34,5	-83,3	-39,1
9,6	$1,5.10^{6}$	-35,2	-91,0	-44,7

3.2 lentelė. Išmatuoti CA I jungimosi su EZA termodinaminiai parametrai fosfatiniame buferyje.

3.3 lentelė. Išmatuoti CA I jungimosi su EZA termodinaminiai parametrai Tris buferyje.

pН	$K_b, M^{-1}$	∆G, kJ/mol	ΔH, kJ/mol	TΔS, kJ/mol
6,8	$7,1.10^{6}$	-39,1	-59,7	-16,6
7,2	$1,6.10^{7}$	-41,1	-59,7	-14,9
7,8	$1,6.10^{7}$	-41,2	-58,5	-13,9

8,4	$9,9.10^{6}$	-39,9	-53,7	-11,0
8,8	1,6·10 <sup>7</sup>	-41,1	-48,1	-5,6
9,2	$8,3.10^{6}$	-39,5	-45,4	-4,7

Išmatuotos CA XII jungimosi su EZA entalpijos fosfatiniame buferyje varijuoja nuo – 28,15 kJ/mol kai pH= 5,0 iki -67,4 kJ/mol, kai pH= 9,0 (3.4 lentelė).

3.4 lentelė. Išmatuoti CA XII jungimosi su EZA termodinaminiai parametrai fosfatiniame buferyje.

pH	$K_b, M^{-1}$	ΔG, kJ/mol	ΔH, kJ/mol	TΔS, kJ/mol
5,0	$5,3 \cdot 10^{6}$	-38,4	-28,2	10,2
5,5	$6,5 \cdot 10^{6}$	-38,9	-31,0	7,8
6,0	$1,4.10^{7}$	-40,8	-30,4	10,4
6,5	$3,5 \cdot 10^7$	-43,0	-34,6	8,4
7,0	$1,2.10^{8}$	-46,0	-39,5	6,5
7,5	$1,5 \cdot 10^8$	-46,6	-51,6	-5,0
8,0	$9,8 \cdot 10^7$	-45,6	-57,1	-11,5
8,5	8,0·10 <sup>7</sup>	-45,1	-61,5	-16,4
9,0	$2,3.10^{7}$	-42,0	-67,4	-25,4

CA XII-EZA jungimosi entalpijos Tris buferyje kinta nuo -62,17 kJ/mol, kai pH=5,0, iki -38,2, kai pH=9,0 (3.5 lentelė).

3.5 lentelė. Išmatuoti CA XII jungimosi su EZA termodinaminiai parametrai fosfatiniame buferyje.

рН	K <sub>b</sub> , M <sup>-1</sup>	ΔG, kJ/mol	ΔH, kJ/mol	TΔS, kJ/mol
5,0	$1,2.10^{7}$	-40,5	-62,2	-21,7
5,5	$7,0.10^{6}$	-39,1	-63,0	-23,9
6,0	$2,2.10^{7}$	-42,0	-64,2	-22,3
6,5	$7,8.10^{7}$	-45,1	-61,5	-16,5
7,0	$6,0.10^{7}$	-44,4	-55,7	-11,3
7,5	$1,4.10^{8}$	-46,6	-50,0	-3,5
8,0	$7,0.10^{7}$	-44,8	-45,6	-0,8
8,5	$3,2.10^{7}$	-42,8	-37,3	5,5
9,0	$2,8 \cdot 10^7$	-42,5	-38,2	4,3

Išmatuotos entalpijos vertės atidedamos grafikuose kaip pH funkcijos (3.13 ir 3.14pav.). Iš gautų duomenų matome, jog termodinaminiai parametrai yra stipriai priklausomi nuo buferinio tirpalo ir pH.

Prie eksperimentinių duomenų privedami teoriniai, kurie grafike pavaizduoti ištisinėmis linijomis ir išskaičiuoti remiantis (28) lygtimi. Teorinės kreivės priartinamos prie eksperimentinių duomenų keičiant fermento aktyviajame centre esančios prie cinko jono prisijungusios vandens molekulės pK<sub>a</sub> bei entalpijos vertes ir tikrosios jungimosi entalpijos vertę. Karboanhidrazės I gauta Zn-H<sub>2</sub>O pK<sub>a</sub> vertė lygi 8,3, o CA XII Zn-H<sub>2</sub>O pK<sub>a</sub>= 7. CA I cinko  $\Delta$ H= -50 kJ/mol, o CA XII  $\Delta$ H= -28 kJ/mol.

Tikroji jungimosi entalpija išskaičiuota pagal gautus duomenis CA I izoformai yra -43 kJ/mol, o CA XII izoformai tikroji  $\Delta$ H= -50 kJ/mol. Pritaikius tą patį modelį, kitų tikrųjų baltymo jungimosi su įvairiais ligandais parametrų išskaičiavimui pakanka vieno ITC eksperimento atlikto bet kuriame pH toje pačioje temperatūroje.



3.13 pav. CA I jungimosi su EZA protonizacijos entalpijų vertės, gautos atlikus eksperimentus fosfatiniame (juodi kvadratukai) ir Tris (balti kvadratukai) buferiniuose tirpaluose įvairiuose pH.

Tris buferyje nepavyko gauti rezultatų žemesniuose ir aukštesniuose pH dėl jungimosi stechiometrijos sumažėjimo eksperimento metu.



3.14 pav. CA XII jungimosi su EZA protonizacijos entalpijų vertės, gautos atlikus eksperimentus fosfatiniame (juodi kvadratukai) ir Tris (balti kvadratukai) buferiniuose tirpaluose įvairiuose pH.

Kitų karboanhidrazės izoformų protonizacijos entalpijas ir pK<sub>a</sub> vertes Biotechnologijos institute Biotermodinamikos ir vaistų tryimų skyriuje išmatavo Joana Gylytė (CA II), Vilma

Pilipuitytė (CA VII) ir Lina Baranauskienė (CA XIII (Baranauskienė & Matulis, 2012)). Visų CA pK<sub>a</sub> ir entalpijų vertės pateiktos 3.6 lentelėje.

CA izoforma	Zn-H2O pK <sub>a</sub>	Protonizacijos ∆H, kJ/mol		
CA I	8,3	-50		
CA II	7,1	-26		
CA VII	7,1	-33		
CA XII	7,0	-28		
CA XIII	8,3	-26		

3.6 lentelė. Karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII aktyviajame centre esančio cinko jono pKa ir protonizacijos entalpijų vertės.

Šios vertės leidžia įvertinti baltymo, kurio aktyviajame centre esanti prie cinko jono prisijungusi vandens molekulė yra deprotonizuotoje formoje, frakciją.

### 3.3. Tikrieji jungimosi parametrai

Išmatuoti jungimosi termodinaminiai parametrai suteikia informacijos apie junginio gebėjimą slopinti fermentą ir to slopinimo stiprumą. Tačiau to nepakanka norint įvertinti energijos-struktūros koreliacijas. Tam turėtų būti naudojami tik tikrieji parametrai. Gaunamos vertės yra be papildomų reakcijų, vykstančių jungimosi metu, įtakos. Taip sužinomi tik ryšių, susidarančių tarp fermento ir ligando, termodinaminiai parametrai.

Tam, kad būtų galima išskaičiuoti tikruosius parametrus, reikia žinoti eksperimentiniu būdu gautas jungimosi konstantų vertes (3.1 lentelė) ir buferinio tirpalo protonizacijos entalpiją. Taip pat aktyviajame fermento centre prie cinko jono esančios molekulės, prie kurios jungiasi slopiklis, protonizacijos entalpiją ir p $K_a$  vertę (3.6 lentelė) bei analizuojamo ligando protonizacijos entalpiją bei p $K_a$  vertę (3.7 lentelė).

Visi eksperimentai buvo atliekami 25°C temperatūroje fosfatiniame buferyje, kurio protonizacijos entalpija šioje temperatūroje yra -5,1 kJ/mol (Baranauskienė & Matulis, 2012).

Sulfonamidinių slopiklių protonizacijos entalpijos yra labai panašios. Komercinių ligandų acetazolamido, metazolamido, trifluorometansulfonamido ir 4karboksibenzensulfonamido šios vertės varijuoja nuo -4,8±0,7 iki -6,0±0,2 kcal/mol 25°C temperatūroje. Šiame darbe tikrinių parametrų skaičiavimams buvo imama vertė, lygi šių 4 komercinių slopiklių protonizacijos entalpijų vidurkiui ( $\Delta$ H= -22,8±0,8 kJ/mol). Gautos tiofeninių sulfonamidų ir sacharininių junginių jungimosi su I, II, VII, XII ir XIII karboanhidrazių izoformomis tikrųjų parametrų vertės pateiktos 10 lentelėje ir adityvumo "žemėlapiuose" (3.14 ir 3.15 pav.).

Junginio B1 tikrieji termodinaminiai parametrai nebuvo išskaičiuoti, nes dėl pernelyg silpno jungimosi negalima išmatuoti šio ligando jungimosi konstantos bei entalpijos.

3.7 lentelė. CA I, CA II, CA VII, CA XII ir CA XIII jungimosi su tiriamais junginiais tikrosios jungimosi konstantos (dimensija moliais (M)) bei kiekvieno junginio sulfonamidinės grupės pK<sub>a</sub> vertės. B1 junginys pirminės sulfonamidinės grupės neturi.

	Junginio pirminės sulfonamidinės grupės pK <sub>a</sub>	CAI	CA II	CA VII	CA XII	CA XIII
A1	8,6	3,8·10 <sup>10</sup>	$1,4.10^{10}$	$1,3.10^{10}$	$3,5 \cdot 10^{9}$	9,7·10 <sup>8</sup>
A2	8,7	$1,4.10^{10}$	$5,7 \cdot 10^{9}$	$3,2.10^{9}$	$4,2.10^{9}$	1,1·10 <sup>9</sup>
A3	8,7	$1,5.10^{10}$	$1,5 \cdot 10^{10}$	$2,8 \cdot 10^9$	1,9·10 <sup>9</sup>	8,6·10 <sup>8</sup>
A4	8,1	$3,1.10^{10}$	9,2·10 <sup>10</sup>	7,3·10 <sup>10</sup>	8,9·10 <sup>9</sup>	1,9·10 <sup>9</sup>
A5	8,0	5,3·10 <sup>8</sup>	4,9·10 <sup>9</sup>	5,2·10 <sup>9</sup>	1,5·10 <sup>9</sup>	3,6·10 <sup>8</sup>
<b>B</b> 1	-	$1,0.10^{4}$	$1,0.10^{4}$	1,0·10 <sup>4</sup>	$1,0.10^{4}$	1,0·10 <sup>4</sup>
B2	9,5	$2,0.10^{8}$	$1,7.10^{9}$	$1,0.10^{9}$	$5,3 \cdot 10^{9}$	$2,4.10^{9}$
B3	9,2	$4,4.10^{9}$	9,8·10 <sup>9</sup>	$1,8.10^{10}$	$8,2.10^{8}$	3,8·10 <sup>9</sup>
B4	9,2	5,1·10 <sup>11</sup>	$1,2 \cdot 10^{11}$	$6,7 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^{10}$	$2,6\cdot 10^{10}$

3.15 pav. Tikrieji termodinaminiai parametrai tiofeniniams sulfonamidams jungiantis su I, II, VII, XII ir XIII CA izoformomis bei šių parametrų pokyčiai, atsirandantys dėka pridėtos/pakeistos junginio funkcinės grupės.

3.16 pav. Tikrieji termodinaminiai parametrai sacharininiams junginiams jungiantis su I, II, VII, XII ir XIII CA izoformomis bei šių parametrų pokyčiai, atsirandantys dėka pridėtos/pakeistos junginio funkcinės grupės.

Tiofeninių sulfonamidų atveju ligandui A1 jungiantis su karboanhidraze I reakcijos laisvoji Gibso energija yra -60,4±0,8 kJ/mol. Stiprus entalpijos indėlis šiai reakcijai ( $\Delta$ H= -46,0±0,5 kJ/mol, T $\Delta$ S= 14,4±0,9 kJ/mol). Jungiantis su kitomis karboanhidrazių izoformomis  $\Delta$ G vertės gaunamos teigiamesnės. Labiausiai teigiama  $\Delta$ G vertė gaunama A1 jungiantis su CA XIII ( $\Delta$ G= -51,3±0,7 kJ/mol). Šią reakciją taip pat labiau įtakoja entalpija nei entropija ( $\Delta$ H= -34,2±0,1, T $\Delta$ S= 17,1±0,7) (3.17 pav.).



3.17 pav. A1 ligando tikrieji termodinaminiai parametrai jam jungiantis su CA izofermentais.

Pakeitus A1 slopiklio benzeno žiedą benzilo grupe (A2 junginys), sukeliamas jungimosi su CA I, CA II ir CA VII izoformomis laisvosios Gibso energijos teigiamėjimas. Taip pat padidėja entropijos įtaka šiam jungimuisi. Pakeitus funkcinę grupę ΔG vertė tapo neigiamesnė slopikliui jungiantis su CA XII ir CA XIII izofermentais, tačiau gautos vertės yra paklaidos ribose. Kaip ir su I, II bei VII karboanhidrazėmis, taip ir vykstant A2 ligando jungimuisi su CA XIII izoforma padidėja entropijos indėlis jungimuisi lyginant su A1 slopikliu.

A4 slopiklio jungimosi su karboanhidraze I laisvosios Gibso energijos vertė tampa labiau neigiama, tačiau ši vertė yra paklaidos ribose. Neigiamesnė ΔG vertė pastebima ligandui jungiantis su kitais CA izofermentais. Taip pat padidėja entalpijos indėlis šioms reakcijoms, išskyrus CA XII. CA XII jungimosi su A4 spontaninį vyksmą labiau įtakoja entropija.

A2 jungimosi laisvoji Gibso energija neigiamiausia vykstant sąveikai su CA I. Didesnis entalpija indėlis jungimuisi lyginant su entropija (kJ/mol,  $\Delta$ H= -43,4±0,3 kJ/mol, T $\Delta$ S= 14,6±1,2kJ/mol). Teigiamiausia Gibso energija šiam slopikliui jungiantis su CA XIII . Šios reakcijos vyksmui entalpijos ir entropijos indėlis yra vienodas ( $\Delta$ H= -25,8±0,1 kJ/mol, T $\Delta$ S= 25,7±1,0 kJ/mol) (3.18 pav.).



3.18 pav. A2 ligando tikriniai termodinaminiai parametrai jam jungiantis su CA izofermentais.

A2 junginio benzilo grupę pakeitus S-2-metiltiofenu (A3 junginys) laisvoji Gibso energija vykstant jungimosi reakcijai su CA II tapo labiau neigiama ( $\Delta\Delta G$ = -2,4±1,6 kJ/mol).  $\Delta G$  neigiamesnė ir ligandui jungiantis su CA I, bet šis pokytis yra paklaidos ribose ( $\Delta\Delta G$ = 0,1±1,6 kJ/mol).  $\Delta G$  vertė tapo labiau teigiama vykstant reakcijai su CA XII ( $\Delta\Delta G$ = 2,0±1,9 kJ/mol).

A5 slopiklio jungimosi su CA izoformomis laisvosios Gibso energijos tapo teigiamesnės lyginant su A2, išskyrus jungimąsi su CA VII. Tačiau ir šis A5 jungimosi su CA VII laisvosios Gibso energijos pokytis, lyginant su A2 ligando jungimusi, yra paklaidos ribose  $(\Delta\Delta G=-1,1\pm1,3 \text{ kJ/mol}).$ 

A3 ligando jungimosi su CA I ir CA II reakcijų laisvosios Gibso energijos yra vienodos ( $\Delta G$ = 58,1 kJ/mol), tačiau jungimasis su I karboanhidrazės izoforma yra labiau įtakojamas entalpijos ( $\Delta H$ = -50±0,2 kJ/mol, T $\Delta S$ = 8,1 kJ/mol) lyginant su CA II ( $\Delta H$ = -43,4±0,6 kJ/mol, T $\Delta S$ = 14,7±1,4 kJ/mol). Teigiamiausia  $\Delta G$  vertė gauta vykstant šio ligando jungimuisu su CA XIII ( $\Delta G$ = -51,0±1,1 kJ/mol). A3 jungimąsi su tiriamomis CA izoformomis entalpija įtakoja labiau nei entropija (3.19 pav.).



3.19 pav. A3 ligando tikriniai termodinaminiai parametrai jam jungiantis su CA izofermentais.

A4 slopiklio jungimosi laisvosios Gibso energijos vertė yra labiausiai neigiama jam jungiantis su II ir VII karboanhidrazių izoformomis ( $\Delta G$ = -62 kJ/mol). Jungimosi reakcija su CA II yra labiau įtakojama entalpijos ( $\Delta H$ = -56,7±0,6 kJ/mol, T $\Delta S$ = 5,9±1,7 kJ/mol) lyginant su CA VII ( $\Delta H$ = -37,7±0,4 kJ/mol, T $\Delta S$ = 24,3±0,7 kJ/mol). Teigiamiausia  $\Delta G$  vertė A4 ligandui jungiantis su CA XII ( $\Delta G$ = -56,8±07 kJ/mol,  $\Delta H$ = -34,1±0,2 kJ/mol, T $\Delta S$ =22,7±0,7 kJ/mol) (3.20 pav.).



3.20 pav. A4 ligando tikriniai termodinaminiai parametrai jam jungiantis su CA izofermentais.

A4 slopiklio benzeno žiedą pakeitus benzilo grupe gaunamas junginys A5. Funkcinės grupės pakeitimas sumažina  $\Delta G$  vertes su visomis tiriamomis CA izoformomis. Tačiau A5 ligando jungimąsi su CA VII ir CA XII labiau įtakoja entalpija lyginant su A4 junginio jungimusi su šiomis CA izoformomis. Bet CA VII jungimosi su slopikliu entalpijos įtakos padidėjimas yra paklaidos ribose ( $\Delta\Delta H$ = -1,0±1,8 kJ/mol).

A5 ligandas panašiai jungiasi tiek su CA II, tiek su CA VII ( $\Delta G$ = -55±1,2 kJ/mol), tačiau jungimosi reakcija su VII karboanhidrazės izoforma yra labiau įtakojama entalpijos ( $\Delta H$ = -38,7±1,8 kJ/mol, T $\Delta S$ = 16,7±2,1 kJ/mol) lyginant su CA II ( $\Delta H$ = -25,7±0,4 kJ/mol, T $\Delta S$ = 29,6±0,7 kJ/mol). Teigiamiausia Gibso energija gauta A5 ligandui jungiantis su CA XIII ( $\Delta G$ = -48,9±0,5 kJ/mol). Šią reakciją stipriai įtakoja entalpija ( $\Delta H$ = -37,6±0,1 kJ/mol, T $\Delta S$ = 11,3±0,5 kJ/mol) (3.21 pav.).



3.21 pav. A5 ligando tikriniai termodinaminiai parametrai jam jungiantis su CA izofermentais.

Sacharininių junginių atveju eksperimentinius rezultatus perskaičiavus į tikrines vertes, B2 ligando neigiamiausia laisvosios Gibso energijos vertė gauta jam jungiantis su XII karboanhidrazės izoforma ( $\Delta G$ = -55,5±1,3 kJ/mol). Ši reakcija yra stipriai įtakojama entropijos ( $\Delta H$ = -17,3±0,2 kJ/mol, T $\Delta S$ = 38,2±1,3 kJ/mol). Tačiau jungimąsi su kitomis CA izoformomis įtakoja entalpija. Neigiamiausia jungimosi, kurį įtakoja entalpija, Gibso energija yra -53,6±1,3 kJ/mol ir ji gauta slopikliui jungiantis su CA XIII ( $\Delta H$ = -48,5±0,7 kJ/mol, T $\Delta S$ = 5,1±1,5 kJ/mol). Teigiamiausia laisvosios Gibso energijos vertė gauta B2 jungiantis su karboanhidraze I ( $\Delta G$ = -47,4±1,2 kJ/mol). Šią reakciją entalpija įtakoja labiausiai ( $\Delta H$ = -51,8±1,3 kJ/mol, T $\Delta S$ = -4,4±1,8 kJ/mol) lyginant su reakcijomis, kai analizuojamas ligandas jungiasi prie CA II, CA VII, CA XII ar CA XIII izoformų.

Prie B2 junginio prijungus 2-butino grupę (B3 junginys) jungimosi su I, II, VII ir XIII CA izoformomis laisvoji Gibso energija tapo neigiamesnė. Reakcijos su CA I ir CA VII ir CA XIII tapo mažiau įtakojamos entalpijos nei junginio, neturinčio šios funkcinės grupės jungimosi atveju. CA XII jungiantis su B3 junginiu laisvoji Gibso energija tapo teigiamesnė  $2,6\pm1,6$  kJ/mol. Padidėjo entalpijos įtaka bei sumažėjo entropijos indėlis ( $\Delta\Delta H$ = -9,9±0,5 kJ/mol, T $\Delta\Delta$ S= -12,5±1,6 kJ/mol) lyginant su junginiu B2. B3 junginio jungimasis su karboanhidraze XII  $\Delta G$  vertė yra teigiamiausia, lyginant su sąveikomis šiam ligandui jungiantis prie kitų CA izoformų ( $\Delta G$ = -52,9 kJ/mol). Šį jungimąsi įtakoja entalpija, tačiau entalpijos įtaka šiai jungimosi reakcijai yra tik nedaug didesnė lyginant su entropijos indėliu ( $\Delta H$ = -27,2±0,5 kJ/mol, T $\Delta S$ = 25,7±1,0 kJ/mol). Labiausiai spontaninė reakcija vyksta B3 ligandui jungiantis su CA VII ( $\Delta G$ = -60,8±0,3 kJ/mol). Ši reakcija yra labiau įtakojama entropijos nei entalpijos ( $\Delta H$ = -26,4±0,6 kJ/mol, T $\Delta S$ = 34,4±0,7 kJ/mol). Šiam ligandui jungiantis su kitomis CA izoformomis, jungimosi spontaniškumą įtakoja entalpija. Teigiamiausia  $\Delta G$  vertė gauta ligandui jungiantis su CA XII.

Pakeitus B3 junginyje esančią 2-butino grupę 2-etilfenilo funkcine grupe jungimosi su CA izoformomis laisvoji Gibso energija tapo neigiamesnė. Neigiamiausia tapo ligandui jungiantis su CA I izoforma ( $\Delta\Delta G$ = -12,2 kJ/mol). Funkcinės grupės pakeitimas ligando jungimosi su CA I, CA VII ir CA XII reakcijas padarė labiau įtakojamas entalpijos nei B3 junginio atveju. Dėl funkcinės grupės pakeitimo entropijos įtaka labiausiai padidėjo junginio jungimuisi su II CA izoforma.

Ligando B4 jungimosi su visomis tiriamomis CA izoformomis laisvoji Gibso energijos, apskaičiavus tikruosius parametrus, yra labiausiai neigiamos lyginant su kitais šiame darbe analizuojamais sacharininiais junginiais. Neigiamiausia laisvoji Gibso energija gaunama B4 jungiantis su I karboanhidraze ( $\Delta G$ = -69,5 kJ/mol) ir ši reakcija yra stipriai įtakojama entalpijos ( $\Delta H$ = -65,2±1,3kJ/mol, T $\Delta S$ = 4,3±1,6 kJ/mol). Analizuojamo slopiklio jungimosi su CA VII izoforma  $\Delta G$  vertė irgi yra labai neigiama ( $\Delta G$ = -64,3±0,4kJ/mol). Šios reakcijos entalpijų ir entropijų vertės yra beveik vienodos ( $\Delta H$ = -33,0±1,0 kJ/mol, T $\Delta S$ = 31,3±1,1 kJ/mol). Teigiamiausia laisvosios Gibso energijos vertė gauta šiam junginiui jungiantis su CA XII ( $\Delta G$ = -58,1±0,4,  $\Delta H$ = -42,3±0,2 kJ/mol, T $\Delta S$ = 15,8±0,4 kJ/mol).

### 3.4. Išmatuotųjų ir tikrinių jungimosi parametrų palyginimas

Vertinant tiriamų ligandų jungimosi su karboanhidrazių izoformomis termodinaminius parametrus, stebimieji skiriasi nuo tikrųjų. Stebimieji parametrai parodo, jog su CA II, CA VII, CA XII ir CA XIII stipriausiai jungiasi A4 junginys. Tik su CA I stipriau jungiasi B4. Tačiau išskaičiavus protonizacijos-deprotonizacijos įtaką, palankiausi termodinaminiai parametrai gauti tiriamoms CA izoformoms jungiantis su junginiu B4.

Pateikiami tikrinių ir eksperimentinių jungimosi laisvųjų Gibso energijų verčių palyginamieji grafikai bei lentelė, kurioje suskaičiuoti šių laisvųjų Gibos energijų verčių skirtumai.



3.22 pav. A1 ligando jungimosi su CA izoformomis eksperimentinių ir tikrinių ΔG verčių palyginimas.







3.26 pav. A5 ligando jungimosi su CA izoformomis eksperimentinių ir tikrinių ΔG verčių palyginimas.



3.23 pav. A2 ligando jungimosi su CA izoformomis eksperimentinių ir tikrinių ΔG verčių palyginimas.



3.25 pav. A4 ligando jungimosi su CA izoformomis eksperimentinių ir tikrinių ΔG verčių palyginimas.



3.27 pav. B2 ligando jungimosi su CA izoformomis eksperimentinių ir tikrinių ΔG verčių palyginimas.



3.28 pav. B3 ligando jungimosi su CA izoformomis eksperimentinių ir tikrinių ΔG verčių palyginimas.



3.29 pav. B4 ligando jungimosi su CA izoformomis eksperimentinių ir tikrinių ΔG verčių palyginimas.

3.8 lentelė. Tikrinių ir stebimųjų laisvųjų Gibso energijų verčių skirtumai (kJ/mol).

	A1	A2	A3	A4	A5	B2	B3	B4
CA1	-9.40	-9.80	-9.70	-6.50	-6.18	-14.30	-15.00	-15.4
CA2	-10.80	-11.10	-11.10	-7.80	-7.53	-15.60	-14.10	-16.6
CA7	-10.70	-11.10	-11.00	-7.70	-7.50	-15.60	-16.40	-16.6
CA12	-11.00	-13.20	-11.30	-8.00	-9.20	-15.90	-16.40	-14.4
CA13	-9.48	-9.80	-9.70	-2.20	-6.20	-14.30	-15.00	-15.1

### 4. REZULTATŲ APTARIMAS

#### 4.1. Stebimieji jungimosi parametrai

Labiausiai dominantys termodinaminiai parametrai matuojant slopiklių jungimąsi su karboanhidrazių izofermentais yra jungimosi konstantos, parodančios su baltymu susijungusio ir nesusijungusio ligando santykį tirpale ir laisvosios Gibso energijos, parodančios molekulės jungimosi prie baltymo, afiniškumą.

Baltymo ir ligando sąveikos metu vyksta protonizacijos-deprotonizacijos reakcijos (Matulis & Todd, 2004). Matulio ir Todd (2004) straipsnyje aprašyti jungimosi eksperimentai, atlikti skirtinguose buferiniuose tirpaluose. Gauti rezultatai parodo, jog jungimosi konstantos (kaip ir laisvosios Gibso energijos) nepriklauso nuo buferio, o entalpijos yra priklausomos. Todėl stebimųjų entalpijų ir entropijų analizė neturi prasmės, nes stebimieji parametrai nesuteikia pakankamai naudingos informacijos apie junginį, kuria remiantis būtų galima kurti naujus slopiklius. Tačiau žinant stebimąsiaslaisvąsias Gibso energijas galima numatyti kaip stipriai vyktų sąveika organizme.

Heterocikliniai sulfonamidai yra vieni iš labiausiai tyrinėjamų karboanhidrazių slopiklių. Po atliktų tyrimų mokslininkai priėjo prie išvadų: a) sulfonamidai, turintys penkianarius žiedus yra efektyvesni CA slopikliai nei tie, kurie turi šešianarius; b) azoto ir sieros atomų buvimas žiede susijęs su geresnėmis CA izoformų slopiklių savybėmis. Tačiau tokie junginiai, kaip 5-pakeistas-1,3,4-tiadiazolo-2-sulfonamidas, 6-pakeistas-benzotiazolo-2-sulfonamidas ir 1,3,4-tiadiazolino-2-sulfonamidas, kurie turi ir sieros ir azoto atomus žiede, aprašomi tik kaip dalinai efektyvūs. Geresniais junginiais laikomi tiofeno-2-sulfonamidai, neturintys papildomų azoto ir sieros atomų bei jie aprašomi kaip geresni slopikliai, nepriklausomai nuo funkcinių grupių (Alterio et al., 2012). Šie ligandai yra analizuojami ir šiame darbe. Stipriausiai iš jų su tirtomis karboanhidrazių izoformomis jungiasi A4 junginys, turintis fenilsulfonil funkcinę grupę. Stipriausiai jis sąveikauja su CA II ir CA VII (skirtumas tarp šių jungimųsi yra paklaidos ribose). Be to, junginys A3, turintis funkcinėje grupėje penkianarį žiedą, jungėsi su CA izoformomis beveik taip pat kaip ir A2, funkcinėje grupėje turintis šešianarį. Tik jungimasis su CA II buvo kiek stipresnis ( $\Delta\Delta G$ = -2,4±1,6 kJ/mol).

Junginys, kurio "uodegoje" yra prijungtas tiofenas, literatūroje įvardinamas kaip stiprus CA I slopiklis (Ki= 5,3-6,1 nM), turintis geras jungimosi savybes su I, II, IX ir XII CA (Alafeefy et al., 2013). Tačiau šiame darbe toks junginys buvo geresnis CA I slopiklis tik lyginant su A5 junginiu, o CA XII slopino silpniausiai. Straipsniuose teigiama, kad nepriklausomai nuo funkcinės grupės, kuri yra prie tiopheno-2-sulfonamidinės dalies, šie slopikliai yra labai stipriai prisijungiantys aktyviajame fermento centre su labai mažais žiedo orientacijos skirtumais (4.1 pav.) (Alterio et al., 2012).



4.1 pav. Tiofenų prisijungimo karboanhidrazės aktyviajame centre schema (Alterio et al., 2012).

Palyginimui su straipsnyje pateikta slopiklio jungimosi CA aktyviajame centre, Biotechnologijos instituto Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriuje A. Smirnov atliko kristalografinę A4 ligando jungimosi su karboanhidraze II analizę. 4.2 pav. iliustruoja šio slopiklio sąveiką su CA II.



4.2. Ligando B4 jungimosi karboanhidrazės II aktyviajame centre kristalinė struktūra.

Sacharininiai slopikliai yra saviti ir įvairiapusiški junginiai, galintys prisijungti prie metalo jono (Baran & Yilmaz, 2006). Tačiau informacijos apie juos, kaip karboanhidrazių slopiklius, galima rasti nedaug. Keliuose straipsniuose yra aprašomi B1 junginio matavimai su CA izofermentais (CA I K<sub>i</sub>= 18540 nM, CA II K<sub>i</sub>= 5950 nM, CA XII K<sub>i</sub>= 633 nM (Kohler et al., 2007)), tačiau juose pateikiami tik vieno ir to paties autoriaus matavimų duomenys, todėl tokie rezultatai nėra visiškai patikimi, o mano darbe eksperimentai buvo atliekami dviem skirtingais metodais. Atlikus eksperimentus su penkiomis CA izoformomis K<sub>d</sub> buvo gauta  $< 200 \mu$ M. Tačiau šis junginys gali ganėtinai stipriai slopinti karboanhidrazes, jei prijungiama sulfonamidinė grupė, o prijungiant papildomas funkcines grupes, galima dar labiau pagerinti ligando slopinimo savybes. Junginys B4 slopina kai kurias CA izoformas stipriau nei tiofeniniai sulfonamidai.

#### 4.2. Baltymų-ligandų jungimosi termodinaminiai parametrai

Išmatuotos EZA jungimosi su CA I ir CA XII entalpijos parodo reakcijos priklausomybę nuo pH, atsirandančią dėka buferio protonizacijos-deprotonizacijos. Gautos jungimosi konstantos labai skiriasi esant įvairioms pH vertėms ir šis skirtumas būtų dar didesnis, jei junginio, kurio jungimosi reakcija su CA izoformomis yra matuojama, pK<sub>a</sub> būtų didesnė (etokzolamido pK<sub>a</sub>= 8,0) (Jogaite et al., 2013).

Be to, yra ženklus skirtumas tarp kai kurių karboanhidrazės izoformų p $K_a$  verčių (9 lentelė) (Jogaite et al., 2013). Todėl esant toms pačioms eksperimentų sąlygoms skirtingų CA izoformų frakcijos tirpaluose nebus vienodos.

Lyginant gautus rezultatus su dar nepublikuotais Matulio ir Todd komercinės karboanhidrazės I matavimais, šių autorių gauta cinko pK<sub>a</sub> vertė lygi 8,5±0,2. Cinko jono entalpija apytiksliai yra  $\Delta$ H= -7,5kcal/mol, t.y. -31,4 kJ/mol. O pačio fermento, išmatavus jo jungimąsi su AZM skirtinguose pH fosfatiniame ir Tris buferiuose tikroji jungimosi entalpija lygi -44,4 kJ/mol. Rekombinantinės CA I cinko jono entalpija yra didesnė nei komercinės. Tačiau tai yra dėl skirtingų slopiklių, su kuriais buvo matuotas jungimasis, įtakos. Cinko pK<sub>a</sub> bei tikroji CA I izoformos entalpija gautos tokios pat lyginant su Matulio ir Todd eksperimentų rezultatais. Šie duomenys parodo, jog komercinių ir rekombinantinių fermentų jungimosi termodinaminiai parametrai nesiskiria.

### 4.3. Protonizacijos/deprotonizacijos reakcijų įtaka jungimuisi

Kalorimetriškai išmatuotos jungimosi entalpijos eksperimentiniai duomenys nesuteikia patikimos informacijos apie ryšių tarp ligando ir baltymo susidarymo termodinaminius parametrus, nes tuo pat metu vyksta papildomos reakcijos, tokios kaip ligando, baltymo ir buferio protonizacija arba deprotonizacija. Tam, kad būtų galima įvertinti struktūros ir jungimosi stiprumo koreliaciją reikia atimti šių reakcijų įtaką. Tokie duomenys jau yra patikimi vertinant junginio struktūrines savybes ir kuriant naujus slopiklius. Ligando jungimasis su CA izoforma bus stipriausias esant pH vertei, kai slopiklis yra deprotonizuotas, o hidroksido jonas, prisijungęs prie cinko, protonizuotas. Todėl, kuo didesnė junginio pK<sub>a</sub>, tuo pokytis tarp stebimųjų ir tikrųjų parametrų yra didesnis (Jogaite et al., 2013).

3.8 lentelėje pateikti tikrinių ir stebimųjų ΔG verčių skirtumai. Kadangi A2 ir A3 junginių pK<sub>a</sub> vertės yra vienodos, tai ir laisvosios Gibso energijos pokyčiai šiems ligandams jungiantis su CA izoformomis yra beveik vienodi. Labiausiai ΔG vertės skiriasi šiems junginiams jungiantis su CA XII, bet šį skirtumą, greičiausiai, įtakoja struktūrinės baltymo aktyviojo centro ir slopiklio funkcinės grupės savybės. Junginių B3 ir B4 pK<sub>a</sub> vertės irgi yra vienodos, todėl ir Gibso energijų skirtumai yra labai panašūs. Didžiausias skirtumas yra jungimosi reakcijose su CA II ir CA XII. Kadangi skirtumai nesusiję su protonizacijos reakcijomis, tai gali būti susiję struktūriškai, t.y. tas pats junginys su skirtingomis CA jungiasi skirtingai dėl CA paviršiaus skirtumų, o skirtingų junginių su ta pačia CA jungimasis skirtingas dėl ligando struktūrinių skirtumų (Matulis & Todd, n.d.).

Iš tirtų junginių, ligando B2 p $K_a$  vertė yra didžiausia. Tai reiškia, jog jo frakcija tirpale, kurio pH= 7, yra nedidelė. Tačiau jam jungiantis su fermentu pasireiškia didelė protonizacijos įtaka.

Taigi, pagrindinis slopiklių afiniškumo CA izoformoms skirtumas slypi junginių pK<sub>a</sub> verčių skirtumuose. Išskaičiavus ligando deprotonizacijos reakcijas, laisvosios Gibso energijos tampa smarkiai neigiamesnės (Matulis & Todd, 2004). O kai kurie junginiai pasirodo turintys gersnius termodinaminius jungimosi parametrus lyginant su eksperimentiškai gautomis jungimosi parametrų vertėmis. Šiuo atveju toks junginys yra B4, kurio jungimosi laisvoji Gibso energija, entalpija bei entropija išskaičiavus protonizacijos/deprotonizacijos reakcijų įtaką tapo gerokai palankesnės jungimuisi lyginant su stebimaisiais parametrais.

Papildomų reakcijų įtaką jungimuisi galima pamatyti ir palyginus B2 junginio jungimąsi. Šio slopiklio p $K_a$  vertė yra didžiausia. Tačiau stebimoji jungimosi konstanta mažiausia, lyginant su kitais besijungiančiais junginiais ( $K_b$ = 6,3·10<sup>5</sup> M jungiantis su CA I). Tačiau išskaičiavus tikruosius termodinaminius parametrus,  $K_b$  vertė nedaug besiskiria nuo kitų junginių jungimosi.

Be to, B2 jungimosi su CA I tkroji entalpija yra didesnė, nei laisvoji Gibso energija. Entalpijos įtakojami junginiai laikomi kaip stipriau besijungiantys, atrankesni ir efektyvesni nei entropijos įtakojami analogai (Nunez et al., 2012). Jei pasiekiama labai gera jungimosi entalpijos įtaka, tai ne visada atsispindi jungimęsi, nes entalpijos dydis yra kompensuojamas entropijos praradimu (Freire, 2008).

### 4.4. Tirtų slopiklių atrankumas karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII izoformoms

Tikslingas karboanhidrazių slopiklių kūrimas labai svarbus daugelio ligų gydymui. Tam reikia gerai suprasti fermento ir ligando sąveikos mechanizmą. Tuo tikslu bandoma įvertinti tikruosius termodinaminius parametrus bei atskirų funkcinių grupių įtaką jungimuisi. Tačiau žmogaus organizme esančios karboanhidrazės izoformos, randamos daugelyje audinių ir organų, todėl dauguma junginių slopina visas CA. Tai sukelia pašalinius poveikius. Tuo tikslu siekiama sukurti ligandus, kurie CA izoformas slopintų atrankiai.

Nors literatūra teigia, kad tiofeno-2-sulfonamidai, kurių funkcinė grupė yra penkianaris žiedas, atrankiai slopina CA I (Alterio et al., 2012), tačiau įvertinus kiekvieno tirto tiofeninio sulfonamido jungimosi su CA izoformomis tikruosius parametrus ženkliai atrankaus slopinimo nebuvo (4.3 pav.).

Labai atrankiai karboanhidrazių neslopino ir sacharininiai sulfonamidai (4.4 pav). Apie juos, kaip CA izoformų slopiklius literatūroje pateikiama nedaug, todėl reiktų įvertinti daugiau šios klasės junginių, kad būtų galima suprasti funkcinių grupių įtaką jų jungimuisi. Iš šių eksperimentų žinome tik tiek, jog neturėdami papildomos sulfonamidinės grupės šie junginiai negali būti karboanhidrazių slopikliai.



4.3 pav. Tiofeninių sulfonamidų jungimosi su karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII izoformomis tikrųjų laisvųjų Gibso energijų palyginimas.



4.4 pav. Sacharininių sulfonamidų jungimosi su karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII izoformomis tikrųjų laisvųjų Gibso energijų palyginimas. B1 junginys neturi pirminės sulfonamidinės grupės, todėl jo jungimosi  $\Delta G$ > -22,8 kJ/mol. Stulpelinėje diagramoje tokia vertė atidėta kaip atskaitos taškas, vertinant kitų ligandų, turinčių pirminę sulfonamidinę grupę, jungimosi stiprumą.

### 4.5. Slopiklių termodinaminis optimizavimas

Entalpijos ir entropijos vertės susijusios (24) lygtimi (Rudra et al., 2008). Molekulė, kuri konformaciškai atitinka baltymo aktyvųjį centrą, turi didesnį jungimosi afiniškumą, kuris gali būti optimizuojamas išgaunant neigiamesnę  $\Delta$ H vertę, teigiamesnę  $\Delta$ S arba sukuriant palankią jungimuisi šių parametrų kombinaciją. Tačiau, dauguma  $\Delta$ H ir  $\Delta$ S kombinacijų sukelia tokį pat jungimosi afiniškumą, t.y. gaunama tokia pati  $\Delta$ G. Bet šių junginių savybės ir "elgsena", esant skirtingoms sąlygoms, nėra tokia pati (Velazquez-Campoy et al., 2001).

Entalpijos-entropijos kompensacijos teorija teigia, kad reakcijos terpės ir sąlygų modifikacija įtakoja jungimosi entropiją bei entalpiją. Kai tik reakcijos sąlygos pakeičiamos (pH, temperatūra ir t.t.), šie termodinaminiai parametrai irgi atitinkamai pasikeičia. Nubrėžtos tokių reakcijų  $\Delta$ H ir –T $\Delta$ S kreivės yra tiesės (4.5 pav.). Stipresnė molekulinė sąveika ar ryšių susidarymas (susijęs su entalpija) sukuria junginio konformacinės laisvės sumažėjimą ir dėl to didesnį susidariusios sistemos tvarkingumą (susijęs su entropija). Tai sukelia entalpijosentropijos kompensavimą (Rudra et al., 2008).



4.5 pav. Slopiklių jungimosi su karboanhidrazių izoformomis termodinaminio optimizavimo kreivė. Mėlynai žymimas junginio A1 jungimasis, raudonai – A2, žaliai – A3, geltonai – A4, rudai – A5, rožine spalva pažymėtas B2, violetine – B3, pilka – B4. Rombais pažymėta karboanhidrazės I izoforma, kvadratu – CA II, apskritimu – CA VII, trikampiu – CA XII, stačiakampiu – CA XIII. Punktyrinės linijos žymi sritis, kur disocijacijos konstantos lygios 100, 1 ir 0,01 nM.

4.5 pav. pavaizduota slopiklių jungimosi su karboanhidrazių izoformomis termodinaminio optimizavimo kreivė. Viena spalva pažymėtos figūros išsidėsto maždaug vienoje tiesėje, t.y. vyksta šių dviejų termodinaminių parametrų kompensavimas. Figūrų pasibarstymas atsiranda dėl struktūrinių karboanhidrazių skirtumų ir tai gali palengvinti atrankių slopiklių įvertinimą.

# IŠVADOS

1. Stipriausiai su karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII izoformomis besijungiantis ligandas yra A4, t.y. tiofeninis sulfonamidas, turintis sulfoninę benzeno funkcinę grupę.

2. Sacharininiai junginiai, neturintys pirminės sulfonamidinės grupės, neslopina karboanhidrazių.

3. Karboanhidrazės II tikroji jungimosi entalpija yra labiau neigiama lyginant su karboanhidraze I.

4. Baltymo ir ligando jungimąsi stipriai įtakoja pH ir buferinis tirpalas.

5. Kuo didesnė junginio pKa, tuo pokytis tarp stebimųjų ir tikrųjų jungimosi termodinaminių parametrų yra didesnis.

6. Išskaičiavus tikruosius jungimosi parametrus, geriausiai su karboanhidrazių izoformomis besijungiantis junginys yra B4.

7. Sacharininių sulfonamidų jungimuisi su karboanhidrazių izoformomis didžiausią teigiamą įtaką turėjo 2-etilfenilo funkcinė grupė, o tiofeninių sulfonamidų jungimuisi didžiausią tegiamą įtaką turėjo benzensulfoninė funkcinė grupė.

8. Junginių atrankumas karboanhidrazių izoformoms yra nedidelis.

Vilniaus universitetas Gamtos mokslų fakultetas Neurobiologijos ir biofizikos katedra Vaida Morkūnaitė Karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII slopiklių paieška bei tikrųjų termodinaminių parametrų nustatymas

### SANTRAUKA

Karboanhidrazės (EC 4.2.1.1, CA) yra metalofermentai, katalizuojantys grįžtamą anglies dioksido hidratacijos į bikarbonato joną ir protoną reakciją. Žmogaus kūne yra 12 aktyvių šio fermento izoformų. Padidėjusi jų ekspresija susijusi su organizmo funkcijų sutrikimais, todėl šie izofermentai yra svarbūs taikiniai farmacijos pramonėje.

Tiofeniniai ir sacharininiai sulfonamidai yra geri CA slopikliai. Funkcinių grupių keitimas gali pagerinti šių junginių termodinamines savybes.

Šio darbo tikslas – įvertinti tiofeninių bei sacharininių sulfonamidų sąveikas su karboanhidrazių I, II, VII, XII ir XIII izoformomis.

Rezultatai parodė, kad jungimosi reakcijos yra priklausomos nuo pH ir buferinio tirpalo. Protonizacijos/deprotonizacijos reakcijos stipriai įtakoja termodinaminius tiriamų ligandų jungimosi parametrus. Skirtumas tarp stebimųjų ir tikrųjų jungimosi termodinaminių parametrų yra didesnis, kai junginio pKa vertė yra didesnė. Todėl eksperimentiniai duomenys negali būti naudojami naujų junginių kūrimui. Tik tikrieji parametrai yra prasmingi stengiantis suprasti struktūrines ir aktyvumo koreliacijas. Vilnius University Faculty of Natural Sciences Department of Biochemistry and Biophysics Vaida Morkūnaitė Inhibitors search and determination of intrinsic binding parameters to carbonic anhydrases I, II, VII, XII and XIII

### **SUMMARY**

Carbonic anhydrases (EC 4.2.1.1, CA) are ubiquitous metallo-enzymes that catalyze reversible hydration of carbon dioxide to bicarbonate ion and proton. There are 12 active izoforms in human body. Overexpression of these proteins is contributes to organism function disorders. Therefore, carbonic anhydrases are important targets for pharmaceutical research.

Thiophene and saccharine sulfonamides are potential CA inhibitors. Replacement of functional groups of these compounds can make better binding properties for these ligands.

The aim of this research was to estimate interactions of thiophene and saccharine sulfonamides binding to recombinant human carbonic anhydrases I, II, VII, XII and XIII.

Results show that the binding reactions are very dependent on pH and buffer. Protonation/deprotonation reactions strongly influence the thermodynamic parameters of binding of investigated compounds. The difference of observed and intrinsic data depends on compound pK<sub>a</sub>. Accordingly to this, experimental data cannot be used for development of new compounds. Only intrinsic parameters can be used for the structure-activity relationship (SAR) analysis.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

[Aggarwal, Boone, Kondeti & McKenna, 2013] Aggarwal, M., Boone, C.,
 Kondeti, B. & McKenna, R. (2013), 'Structural annotation of human carbonic anhydrases', J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 28(2), 267–277.

[Aggarwal, Kondeti & McKenna, 2013] Aggarwal, M., Kondeti, B. & McKenna, R. (2013), 'Insights towards sulfonamide drug specificity in ?-carbonic anhydrases', *Bioorg. Med. Chem.* 21, 1526–1533.

[Alafeefy et al., 2013] Alafeefy, A., Isik, S., Abdel-Aziz, H., Ashourd, A., Vullo, D., Al-Jaber, N. & Supuran, C. (2013), 'Carbonic anhydrase inhibitors: Benzenesulfonamides incorporating cyanoacrylamide moieties are low nanomolar/subnanomolar inhibitors of the tumor-associated isoforms ix and xii', *Bioorg. Med. Chem.* 21, 1396–1403.

[Alterio et al., 2012] Alterio, V., Fiore, A. D., D'Ambrosio, K., Supuran, C. & Simone, G. D. (2012), 'Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: How to design specific ddrug targeting 15 different isoforms?', *Chem. Rev.* 112, 4421–4468.

[Baran & Yilmaz, 2006] Baran, E. & Yilmaz, V. (2006), 'Metal complexes of saccharin', *Coord. Chem. Rev.* **250**, 1980–1999.

[Baranauskienė & Matulis, 2012] Baranauskienė, L. & Matulis, D. (2012), 'Intrinsic thermodynamics of ethoxzolamide inhibitor binding to human carbonic anhydrase xiii', *BMC Biophysics* 5, 1–11.

[Baranauskienė et al., 2009] 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. [Bootorabi et al., 2011] Bootorabi, F., Haapasalo, J., Smith, E., Haapasalo, H.
& Parkkila, S. (2011), 'Carbonic anhydrase vii–a potential prognostic marker in gliomas', *Health (N. Y.)* 3, 6–12.

[Bootorabi et al., 2010] Bootorabi, F., Janis, J., Smith, E., Waheed, A., Kukkurainen, S., , Hytonen, V., Valjakka, J., Supuran, C., Vullo, Sly, W. & Parkkila, S. (2010), 'Analysis of a shortened form of human carbonic anhydrase vii expressed in vitro compared to the full-length enzyme', *Biochimie* **92**, 1072– 1080.

[Bosley et al., 2011] Bosley, T., Salih, M., Alorainy, I., Islam, M., Oystreck, D., Suliman, O., al Malki, S., Suhaibani, A., Khiari, H., Beckers, S., van
Wesenbeeck, L., Perdu, B., AlDrees, A., Elmalik, S., Hul, W. & Abu-Amero, K. (2011), 'The neurology of carbonic anhydrase type ii de?ciency syndrome', *Brain* 134, 3502–3515.

[Broecker et al., 2011] Broecker, J., Vargas, C. & Keller, S. (2011), 'Revisiting the optimal c value for isothermal titration calorimetry', *Anal. Biochem.* **418**, 307–309.

[Carta et al., 2012] Carta, F., Scozzafava, A. & Supuran, C. (2012), 'Sulfonamide: a patent review (2008-2012)', *Expert Opin. Ther. Patents* 22, 747–758.

[Chang et al., 2012] Chang, X., Zheng, Y., Yang, Q., Wang, L., Pan, J., Xia, Y., Yan, X. & Han, J. (2012), 'Carbonic anhydrase i (ca1) is involved in the process of bone formation and is susceptible to ankylosing spondylitis', *Arthritis Research & Therapy* 14, 1–14.

[Chene, 2012] Chene, P. (2012), 'Can biochemistry drive drug discovery beyond simple potency measurements?', *Drug Discovery Today* **17**, 388–395.

[Cimmperman & Matulis, 2011] Cimmperman, P. & Matulis, D. (2011), Protein Thermal Denaturation Measurements via a Fluorescent Dye, Royal Society of Chemistry, chapter 8, pp. 247–274. [Davis et al., 2010] Davis, R., Poulsen, A. I. I.-A. & Supuran, C. (2010), 'Carbonic anhydrase inhibitors. identification of selective inhibitors of the human mitochondrial isozymes va and vb over the cytosolic isozymes i and ii from a natural product-based phenolic library', *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 14–18.

[Durdagi et al., 2011] Durdagi, S., Senturk, M., Ekinci, D., Balaydin, H.,
Goksu, S., Kufrevioglu, O., Innocenti, A., Scozzafava, A. & Supuran, C. (2011),
'Kinetic and docking studies of phenol-based inhibitors of carbonic anhydrase
isoforms i, ii, ix and xii evidence a new binding mode wiwith the enzyme active site', *Bioorg. Med. Chem.* 19, 1381–1389.

[Ekinci et al., 2010] Ekinci, D., Cavdar, H., Talaz, O., Senturk, M. & Supuran, C. (2010), 'No-releasing esters show carbonic anhydrase inhibitory action against human isoforms i and ii', *Bioorg. Med. Chem.* 18, 3559–3563.

[Elder, 2004] Elder, I. (2004), Kinetic and structural studies on the activation of the proton transfer in catalysis by carbonic anhydrase, Master's thesis, University of Florida.

[Falconer & Collins, 2011] Falconer, R. & Collins, B. (2011), 'Survey of the year 2009: applications of isothermal titration calorimetry', J. Mol. Recognit. 24, 1–16.

[Fiore et al., 2010] Fiore, A. D., Truppo, E., Supuran, C., Alterio, V., Dathan, N., Bootorabi, F., Parkkila, S., Monti, S. & Simone, G. D. (2010), 'Crystal structure of the c183s/c217s mutant of human ca vii in complex with acetazolamide', *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 5023–5026.

[Freire, 2008] Freire, E. (2008), 'Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class?', *Drug Discovery Today* **13**, 869–874.

[Garbett & Chaires, 2012] Garbett, N. & Chaires, J. (2012), 'Thermodynamic studies for drug design and screening', *Expert Opin Drug Discov.* **7(4)**, 299–314. [Ghai et al., 2012] Ghai, R., Falconer, R. & Collins, B. (2012), 'Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research-survey of the literature from 2010', *J. Mol. Recognit.* **25**, 32–52.

[Hassan et al., 2013] Hassan, I., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F. & Sly, W. (2013), 'Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes', *Bioorg. Med. Chem.* 21(6), 1570–1582.

[Hau et al., 2011] Hau, J., Fontana, P., Zimmermann, C., de Pover, A., Erdmann, D. & Chene, P. (2011), 'Leveraging the contribution of thermodynamic in drug discovery with the help of fluorescence-based thermal shift assay', J. Biomol. Screen. 16, 552–557.

[Hilvo et al., 2008] Hilvo, M., Innocenti, A., Monti, S., Simone, G. D., Supuran, C. & Parkkila, S. (2008), 'Recent advances in research on the most novel carbonic anhydrases, ca xiii and xv', *Curr. Pharm. Des.* 14, 672–678.

[Hynninen et al., 2011] Hynninen, P., Parkkila, S., Huhtala, H., Pastorekova,
S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W. & Tomas, E. (2011), 'Carbonic anhydrase isozymes ii, ix, and xii in uterine tumors', *APMIS* 120, 117–129.

[Ilie et al., 2011] Ilie, M., Hofman, V., Ortholan, C., Ammadi, R., Bonnetaud, C., Havet, K., Venissac, N., Mouroux, J., Mazure, N., Pouyssegur, J. & Hofman, P. (2011), 'Overexpression of carbonic anhydrase xii in tissues from resectable non-small cell lung cancers is a biomarker of good prognosis', *Int. J. Cancer* 128, 1614–1623.

[Iliuta et al., 2013] Iliuta, I., Iliuta, M. & Larachi, F. (2013), 'Catalytic co2 hydration by immobilized and free human carbonic anhydrase ii in a laminar ?ow microreactor – model and simulations', *Separation and Puri?cation Technology* **107**, 61–69. [Jogaite et al., 2013] Jogaite, V., Zubrienė, A., Michailovienė, V., Gylyte, J., Morkūnaitė, V. & Matulis, D. (2013), 'Characterization of human carbonic anhydrase xii stability and inhibitor binding', *Bioorg. Med. Chem.* 21, 1431– 1436.

[Klier et al., 2011] Klier, M., Schuler, C., Halestrap, A., Sly, W., Deitmer, J. & Becker, H. (2011), 'Transport activity of the high-affinity monocarboxylate transporter mct2 is enhanced by extracellular carbonic anhydrase iv but not by intracellular carbonic anhydrase ii', *The Journal of Biological Chemistry* 31, 27781–27791.

[Kockar et al., 2010] Kockar, F., Maresca, A., Aydin, M., Isik, S., Turkoglu, S., Sinan, S., Arslan, O., Güler, O., Turan, Y. & Supuran, C. (2010), 'Mutation of phe91 to asn in human carbonic anhydrase i unexpectedly enhanced both catalytic activity and af?nity for sulfonamide inhibitors', *Bioorg. Med. Chem.* 18, 5498–5503.

[Kohler et al., 2007] Kohler, K., Hillebrecht, A., Wischeler, J., Innocenti, A., Heine, A., Supuran, C. & Klebe, G. (2007), 'Saccharin inhibits carbonic anhydrases: Possible explanation for its unpleasent metallic aftertaste', *Angew. Chem., Int. Ed.* **46**, 7697–7699.

[Kopec & Schneider, 2011] Kopec, J. & Schneider, G. (2011), 'Comparison of fluorescence and light scattering based methods to assess formation and stability of protein-protein complexes', *Journal of Structural Biology* **175**, 216–223.

[Krishnamoorthy & Mohanty, 2011] Krishnamoorthy, J. & Mohanty, S.
 (2011), 'Open-itc: an alternate computational approach to analyze the isothermal titration calorimetry data of complex binding mechanisms', *J. Mol. Recognit.* 24, 1056–1066.

[Ladbury, 2010] Ladbury, J. (2010), 'Calorimetry as a tool for understanding biomolecular interactions and an aid to drug design', *Biochem. Soc. Trans.* 38, 888–893. [Lopez et al., 2010] Lopez, M., Bornaghi, L., Innocenti, A., Vullo, D., Charman, S., Supuran, C. & Poulsen, S.-A. (2010), 'Sulfonamide linked neoglycoconjugates-a new class of inhibitors for cancer-associated carbonic anhydrases', J. Med. Chem. 53, 2913–2926.

[Mahdiuni et al., 2013] Mahdiuni, H., Nooshin, B., Varzandian, M., Ghadami, S., Khazaei, M., Nikbakht, M. & Khodarahmi, R. (2013), 'Appraisal of sildena?l binding on the structure and promiscuous esterase activity of native and histidine-modi?ed forms of carbonic anhydrase ii', *Biophys. Chem.* 175-176, 1–16.

[Manokaran et al., 2010] Manokaran, S., Banerjee, J., Mallik, S. & Srivastava, D. (2010), 'Stabilization of anionic and neutral forms of a fluorophoric ligand at the active site of human carbonic anhydrase i', *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1965–1973.

[Matulis, 2008] Matulis, D. (2008), *Baltymų fizikinė chemija*, Technologija.

[Matulis et al., 2005] Matulis, D., Kranz, J., Salemme, F. & Todd, M. (2005), 'Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: Measurements of binding affinity and stoichiometry using thermofluor', *Biochemistry* **44**, 5258–5266.

[Matulis & Todd, 2004] Matulis, D. & Todd, M. (2004), *Thermodynamics-Structure Correlations of Sulfonamide Inhibitor Binding to Carbonic Anhydrase*, John Wiley & Sons, chapter 6, pp. 107–132.

[Matulis & Todd, n.d.] Matulis, D. & Todd, M. (n.d.), Sulfonamide inhibitor binding to carbonic anhydrase by microcalorimetry: Dissection of thermodynamic parameters of linked reactions.

[Maupin & Voth, 2010] Maupin, C. & Voth, G. (2010), 'Proton transport in carbonic anhydrase: Insights from molecular simulation', *Biochim. Biophys. Acta* **1804(2)**, 332–341.

[McDevitt & Lambert, 2011] McDevitt, M. & Lambert, L. (2011), 'Molecular evolution and selection pressure in alpha-class carbonic anhydrase family members', *Biochim. Biophys. Acta* **1814**(**12**), 1854–1861.

[Morris et al., 2011]Morris, J., Chiche, J., Grellier, C., Lopez, M., Bornaghi, L., Maresca, A., Supuran, C., Pouyssegur, J. & Poulsen, S.-A. (2011), 'Targeting hypoxic tumor cell viability with carbohydrate-based carbonic anhydrase ix and xii inhibitors', *J. Med. Chem.* **54**, 6905–6918.

[MR Duff et al., 2011] MR Duff, J., Grubbs, J. & Howell, E. (2011), 'Isothermal titration calorimetry for measuring macromolecule-ligand affinity', *Journal of Visualized Experiments* **55**, 1–4.

[Nunez et al., 2012] Nunez, S., Venhorst, J. & Kruse, C. (2012), 'Target-drug interactions: first principles and their application to drug discovery', *Drug Discovery Today* **17**, 10–22.

[Ohradanova et al., 2012] Ohradanova, A., Vullo, D., nad J Pastorek, S. P.,
 Jackson, D., Worheide, G. & Supuran, C. (2012), 'Cloning, characterization and sulfonamide inhibition studies of an ?-carbonic anhydrase from the living fossil sponge astrosclera willeyana', *Bioorg. Med. Chem.* 20, 1403–1410.

[Pacchiano et al., 2011] Pacchiano, F., Carta, F., Vullo, D., Scozzafava, A. & Supuran, C. (2011), 'Inhibition of ?-carbonic anhydrases with ureido-substituted benzenesulfonamides', *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21(1), 102–105.

[Rudra et al., 2008] Rudra, S., Singh, H., Basu, S. & Shivhare, U. (2008),
'Enthalpy entropy compensation during thermal degradation of chlorophyll in mint and coriander puree', *Journal of Food Engineering* 86, 379–387.

[Santos et al., 2012]Santos, S., Bandeiras, T., Pinto, A., Teixeira, M. & Carrondo, M. (2012), 'Thermofluor-based optimization strategy for the stabilization and crystallcrystal of campylobacter jejuni desulforubrerythrin', *Protein Expr. Purif.* **81**, 193–200.
[Sorrell et al., 2010]Sorrell, F., Greenwood, G., Birchall, K. & Chen, B. (2010), 'Development of a differential scanning fluorimetry based high throughput screening assay for the discovery of affinity binders against an anthrax protein', *J. Pharm. Biomed. Anal.* **52**, 802–808.

[Supuran, 2008] Supuran, C. (2008), 'Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators', *Nature reviews* **7**, 168–181.

[Supuran, 2010] Supuran, C. (2010), 'Carbonic anhydrase inhibitors', *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20(12)**, 3467–3474.

[Supuran, 2011] Supuran, C. (2011), 'Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms', *Mol. Divers.* **15(2)**, 305–316.

[Supuran et al., 2010] Supuran, C., Fiore, A. D., Alterio, V., Monti, S. & Simone, G. D. (2010), 'Recent advances in structural studies of the carbonic anhydrase family: the crystal structure of human ca ix and ca xiii', *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3246–3254.

[Tellinghuisen, 2012] Tellinghuisen, J. (2012), 'Designing isothermal titration calorimetry experiments for the study of 1:1 binding: Problems with the "standard protocol"', *Anal. Biochem.* **424**, 211–220.

[Truppo et al., 2012] Truppo, E., Supuran, C., Sandomenico, A., Vullo, D., Innocenti, A., Fiore, A. D., Alterio, V., Simone, G. D. & Monti, S. (2012), 'Carbonic anhydrase vii is s-glutathionylated witwith loss of catalytic activity and affinity for sulfonamide inhibitors', *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1560–1564.

[Turkoglu et al., 2012] Turkoglu, S., Maresca, A., Alper, M., Kockar, F., Isik, S., Sinan, S., Ozensoy, O., Arslan, O. & Supuran, C. (2012), 'Mutation of active site residues asn67 to ile, gln92 to val and leu204 to ser in human carbonic anhydrase ii: Influences on the cartalytic activity and affinity for inhibitors', *Bioorg. Med. Chem.* 20, 2208–2213.

[Velazquez-Campoy et al., 2001] Velazquez-Campoy, A., Luque, I. & Freire, E. (2001), 'The application of thermodynamic methods in drug design', *Thermochim. Acta* 380, 217–227.

[Vilenchik et al., 2011] Vilenchik, L., Sheth, P., Chuang, C.-C. & Le, H. (2011), 'Affinity characterization-mass spectrometry methodology for quantitative analyses of small molecule protein binding in solution', *Anal. Biochem.* **418**, 10–18.

[Winum, 2009] Winum, C. S. S.-Y. (2009), *Introduction to Zinc Enzymes as* Drug Targets, A John Wiley & Sons,Inc., chapter 1, pp. 3–12.

[Zubrienė et al., 2010] Zubrienė, A., Gutkowska, M., Matulienė, J., Chaleckis, R., Michailovienė, V., Voroncova, A., Venclovas, ., Zylicz, A. & Matulis, D. (2010), 'Thermodynamics of radicicol binding to human hsp90 alpha and beta isoforms', *Biophys. Chem.* 152, 153–163.

1.