

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS FAKULTETAS BIOCHEMIJOS IR MOLEKULINĖS BIOLOGIJOS KATEDRA

Biochemijos studijų programos magistrantė

Justina KAZOKAITĖ

Žmogaus karboanhidrazės VI jungimosi su sulfonamidiniais ligandais termodinaminė analizė

MAGISTRO DARBAS

Darbo recenzentė: Dr. Rasa Sukackaitė Darbo vadovas: Prof. Daumantas MATULIS

VILNIUS, 2014

Žmogaus karboanhidrazės VI jungimosi su sulfonamidiniais ligandais termodinaminė analizė

Darbas paruoštas:

Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje

Studentė: Justina Kazokaitė

Darbo vadovas: Prof. Daumantas MATULIS

VILNIUS, 2014

Turinys

ĮV	7ADAS 5				
1.	LIT	ERAT	ŪROS APŽVALGA	7	
	1.1.	Karbo	anhidrazių apžvalga	7	
		1.1.1.	Karboanhidrazių klasės	7	
		1.1.2.	α -karboanhidrazių katalizinis mechanizmas	9	
		1.1.3.	Karboanhidrazės VI apžvalga	11	
		1.1.4.	Karboanhidrazės pramonėje ir biomedicinoje	13	
		1.1.5.	Karboanhidrazių aktyvumo pokyčių sukeliamos ligos	14	
		1.1.6.	Mutagenezės taikymas karboanhidrazių tyrimuose	16	
	1.2.	Vaistų	kūrimo strategija \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots	17	
		1.2.1.	Karboanhidrazių slopikliai	18	
		1.2.2.	Karboanhidrazių aktyvatoriai	20	
	1.3.	Kuriar	nt vaistus naudojami termodinaminiai tyrimai	21	
		1.3.1.	Biomolekulių sąveikos termodinaminiai parametrai	21	
		1.3.2.	Biomolekulių saveikos tyrimo metodai	23	
2.	MEDŽIAGOS IR METODAI 2				
	2.1.	Reager	ntai, rinkiniai ir kitos medžiagos	25	
	2.2.	Terpės	ir tirpalai	27	
	2.3.	Metod	ai	28	
		2.3.1.	Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI geno klonavimas,		
			raiška, baltymo tirpumo patikrinimas ir gryninimas	28	
		2.3.2.	Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės II mutagenezė, geno raiš-		
			ka ir baltymo gryninimas	34	
		2.3.3.	Žmogaus karboanhidrazės VI gryninimas iš seilių	35	
		2.3.4.	Fluorescentinis terminio poslinkio metodas	35	
		2.3.5.	Izoterminė titravimo kalorimetrija	37	
		2.3.6.	Fermentinio aktyvumo matavimas	39	
		2.3.7.	Statistinė duomenų analizė	40	
3.	RE	ZULTA	TAI IR JŲ APTARIMAS	41	
R	EZU	LTATA	I IR JŲ APTARIMAS	41	
	3.1.	Rekom	binantinės žmogaus karboanhidrazės VI geno klonavimas, raiška,		
		baltyn	no tirpumo patikrinimas ir gryninimas	41	
	3.2.	Rekom	ıbinantinės žmogaus karboanhidrazės II mutagenezė, geno raiška ir		
		baltyn	o gryninimas	43	

3.3. Žmogaus karboanhidrazės VI gryninimas iš seilių	44	
3.4. Fermentinio aktyvumo tyrimai	45	
3.5. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI jungimosi su sulfonamidi-		
niais ligandais analizė	47	
3.6. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės II mutanto kaip modelio žmo-		
gaus karboanhidrazės VI jungimosi su sulfonamidiniais ligandais įvertinimas	49	
3.7. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI ir II mutanto jungimosi su		
etokzolamidu tikrųjų parametrų nustatymas	51	
3.8. Iš seilių išgrynintos žmogaus karboanhidrazės VI jungimosi su sulfonami-		
diniais ligandais analizė	54	
IŠVADOS	57	
SANTRAUKA		
SUMMARY	59	
	00	
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS		
LITERATŪROS SARAŠAS		
PADĖKA	71	

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

ΔG	—	laisvosios Gibso energijos pokytis
ΔH	—	entalpijos pokytis
ΔS	—	entropijos pokytis
ANS	—	8-anilino-1-naftaleno sulfonatas
APS	—	amonio persulfatas
AZM	_	acetazolamidas
BHI	_	mitybinė terpė (angl. Brain-Heart Infusion broth)
CA	_	karboanhidrazė (angl. Carbonic Anhydrase)
DMSO	_	dimetilsulfoksidas
dNTP	_	m deoksiribonukleozidtrifos fatas
DTT	_	ditiotreitolis
EZA	_	etokzolamidas
FTPM	_	fluorescentinis terminio poslinkio metodas
HEPES	_	4-(2-hidroksietil)-1-piperaziniletano sulfoninė rūgštis
IPTG	_	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas
ITK	_	izoterminė titravimo kalorimetrija
k_{kat}	_	katalizinė konstanta
LB	—	mitybinė terpė (angl. Lysogeny Broth)
K_b	_	jungimosi konstanta
K_d	_	disociacijos konstanta
MES	_	2-(N-morfilino)etansulfoninė rūgštis
MZM	—	metazolamidas
MOPS	_	3-(N-morfilino)propansulfoninė rūgštis
n	_	stechiometrija
NDS	_	natrio dodecilsulfatas
p	_	stebimasis reikšmingumo lygmuo
PGR	_	polimerazės grandininė reakcija
pI	_	izoelektrinis taškas
Pi	_	natrio fosfato buferinis tirpalas
PIPES	—	piperazino-N,N'-bis(2-etansulfoninė rūgštis)
PMSF	_	fenilmetilsulfonilfluoridas
R	_	universalioji dujų konstanta
SA	_	sulfanilamidas
SAP	_	krevečių šarminė fosfatazė (angl. Shrimp Alkaline Phosphatase)

S. O. C.	—	optimali mitybinė terpė	
		(angl. Super Optimal broth with Catabolite repression)	
TAE	—	DNR elektroforezės buferinis tirpalas (angl. $\mathit{TRIS}{-}\mathit{Acetate}{-}\mathit{EDTA})$	
TEMED	—	N, N, N'N'-tetrametiletilendiaminas	
TFMSA	_	trifluormetansulfonamidas	
T_m	—	baltymo lydymosi temperatūra (angl. Melting Temperature)	
TRIS	_	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis	

ĮVADAS

Grįžtama anglies dioksido hidratacijos reakcija yra fundamentinė daugelyje fiziologinių procesų. Ją katalizuoja karboanhidrazės (CA). Šie fermentai plačiai paplitę tiek prokariotuose, tiek eukariotuose. Žmogaus organizme randama 15 CA izofomų, iš kurių 3 neturi fermentinio aktyvumo. Kai kurių izoformų genų raiškos sutrikimai siejami su įvairiomis ligomis, pavyzdžiui, glaukoma ar navikų vystymuisi. Todėl jų gydymui ieškoma atrankiai tik su tam tikromis CA izoformomis sąveikaujančių slopiklių, neturinčių įtakos normaliai organizme funkcionuojančioms CA.

Pradiniame vaistinių preparatų kūrimo etape svarbi sąveikaujančių su baltymu, atsakingu už patologiją, ligandų (slopiklių ar aktyvatorių) atranka. Nors pasiekta didelė pažanga biofizikinių metodų pritaikymo baltymo–ligando tyrimų srityje, tačiau termodinaminiams biomolekulių sąveikos matavimams vis dar reikalingi dideli tirpių baltymų kiekiai, kuriuos sudėtinga išskirti iš modelinių organizmų. Problemos sprendimui vydoma mutagenezė, siekiant sukurti modelinius baltymus, pritaikomus tikslinių baltymų jungimosi su mažamolekuliniais junginiais analizėje. Vienas iš baltymo–ligando sąveikos tyrimo metodų, kuriam reikalingi maži baltymų kiekiai, yra fluorescentinis terminio poslinkio metodas. Jis naudojamas farmacinėje pramonėje naujų, besijungiančių su taikiniu molekulių nustatymui. Tai greita ir naši analizė, kuri patraukli tuo, kad leidžia nustatyti tiek silpnai, tiek stipriai sąveikaujančius ligandus, bet ji nesuteikia informacijos apie jungimosi reakcijos metu vykstančius šilumos pokyčius, kurie svarbūs baltymo–ligando sąveikos stiprumo įvertinimui. Juos galima išmatuoti atliekant izoterminės titravimo kalorimetrijos eksperimentus. Tačiau tam sunaudojami dideli baltymų kiekiai.

Šiame darbe biofizikiniais metodais tirtas sulfonamidinių ligandų jungimasis su vienintele sekretuojama CA izoforma – CA VI, išskirta iš *E. coli (Escherichia coli)* bakterijų bei žmogaus seilių. Nustatyti stebimieji sąveikos termodinamiai parametrai, kurie priklauso nuo eksperimento sąlygų. Jie svarbūs lyginant skirtingų junginių giminingumą. Be to, įvertinti etokzolamido – vieno iš sulfonamidinių slopiklių, pritaikomų CA raiškos pokyčių sukeltų ligų gydymui – jungimosi su žmogaus CA VI tikrieji parametrai. Jie eliminuoja kartu vykstančias protonizacijos/deprotonizacijos reakcijas ir nepriklauso nuo eksperimento sąlygų. Todėl tik ši informacija yra naudinga tiksliniame naujų vaistinių preparatų kūrime.

Darbo tikslas: ištirti žmogaus CA VI sąveiką su sulfonamidiniais ligandais.

Darbo uždaviniai:

 Gauti tris baltymus: rekombinantinę žmogaus CA VI, natyvią CA VI iš žmogaus seilių bei mutacijas – A65T, N67Q, F130Y, V134Q, L203T – turinčią žmogaus CA II, kuri būtų panaudota kaip modelis CA VI jungimosi su sulfonamidiniais ligandais tyrimuose. Patikrinti baltymų fermentinį aktyvumą.

- 2. Atlikti atrankaus sulfonamidinio ligando, besijungiančio tik su žmogaus CA VI, paiešką benzensulfonamidų bibliotekoje bei palyginti gautus stebimuosius termodinaminius parametrus su kitų CA izoformų jungimosi duomenimis.
- Įvertinti mutantinio žmogaus CA II baltymo kaip modelio tinkamumą žmogaus CA VI sąveikos su junginiais tyrimams.
- 4. Palyginti etokzolamido jungimosi su žmogaus CA II, mutantiniu žmogaus CA II baltymu ir žmogaus CA VI tikruosius termodinaminius parametrus.
- 5. Palyginti rekombinantinės žmogaus CA VI ir natyvios CA VI, išskirtos iš žmogaus seilių, sąveikas su sulfonamidiniais ligandais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Karboanhidrazių apžvalga

Fermentų karboanhidrazių (CA, EC 4.2.1.1) pagrindinė funkcija yra pH homeostazės palaikymas, katalizuojant grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją. Taip šie fermentai reguliuoja CO_2 , H⁺ ir HCO_3^- jonų koncentracijas ląstelės viduje ir užląstelinėje erdvėje. CA tyrimai prasidėjo 1933 m., kai iš jaučio eritrocitų buvo išskirta pirmoji CA (Meldrum and Roughton, 1933). Nuo to laiko analizuojama šių fermentų svarba įvairiuose fiziologiniuose procesuose: dujų apykaitoje, CO_2 ir HCO_3^- transporte per membraną, įvairių molekulių (gliukozės, karbamido, lipidų, pirimidino) biosintezės reakcijose, rūgščių–bazių pusiausvyros palaikyme, sekrecijoje, signalo perdavime, onkogenezėje, ląstelių proliferacijoje (Frost, 2014). Be to, CA yra plačiai naudojami modeliniai fermentai įvairiuose biofizikos, bioanalizės, organinės chemijos tyrimuose, kuriant naujus vaistus (Krishnamurthy et al., 2008).

1.1.1. Karboanhidrazių klasės

CA – plačiai gamtoje paplitę fermentai, kurie pagal aminorūgščių homologiją yra skirstomi į penkias klases (α , β , γ , δ , ζ) (Xu et al., 2008). Be pagrindinės grįžtamos CO₂ hidratacijos, CA katalizuoja ir kitas reakcijas (1 lentelė). Fermentai, priklausantys

1 lentelė. CA katalizuojamos reakcijos (Aggarwal et al., 2013).

```
\begin{split} \mathbf{O} = \mathbf{C} = \mathbf{O} + \mathbf{H}_2\mathbf{O} &\leftrightarrow \mathbf{H}\mathbf{CO}_3^- + \mathbf{H}^+ \\ \mathbf{O} = \mathbf{C} = \mathbf{N}\mathbf{H} + \mathbf{H}_2\mathbf{O} &\leftrightarrow \mathbf{H}_2\mathbf{N}\mathbf{C}\mathbf{O}\mathbf{O}\mathbf{H} \\ \mathbf{H}\mathbf{N} = \mathbf{C} = \mathbf{N}\mathbf{H} + \mathbf{H}_2\mathbf{O} &\leftrightarrow \mathbf{H}_2\mathbf{N}\mathbf{C}\mathbf{O}\mathbf{O}\mathbf{H} \\ \mathbf{R}\mathbf{C} = \mathbf{N}\mathbf{H} + \mathbf{H}_2\mathbf{O} &\leftrightarrow \mathbf{H}_2\mathbf{N}\mathbf{C}\mathbf{O}\mathbf{N}\mathbf{H}_2 \\ \mathbf{R}\mathbf{C} + \mathbf{H}_2\mathbf{O} &\leftrightarrow \mathbf{R}\mathbf{C}\mathbf{H}(\mathbf{O}\mathbf{H})_2 \\ \mathbf{R}\mathbf{C} + \mathbf{H}_2\mathbf{O} &\leftrightarrow \mathbf{R}\mathbf{C}\mathbf{O}\mathbf{O}\mathbf{H} + \mathbf{A}\mathbf{r}\mathbf{O}\mathbf{H} \\ \mathbf{R}\mathbf{S}\mathbf{O}_3\mathbf{A}\mathbf{r} + \mathbf{H}_2\mathbf{O} &\leftrightarrow \mathbf{R}\mathbf{S}\mathbf{O}_3\mathbf{H} + \mathbf{A}\mathbf{r}\mathbf{O}\mathbf{H} \\ \mathbf{A}\mathbf{r}\mathbf{F} + \mathbf{H}_2\mathbf{O} &\leftrightarrow \mathbf{H}\mathbf{F} + \mathbf{A}\mathbf{r}\mathbf{O}\mathbf{H} \\ \mathbf{A}\mathbf{r}\mathbf{F} + \mathbf{H}_2\mathbf{O} &\leftrightarrow \mathbf{H}\mathbf{F} + \mathbf{A}\mathbf{r}\mathbf{O}\mathbf{H} \\ \mathbf{A}\mathbf{r}\mathbf{F} = 2, 4\text{-dinitrofenil} \\ \mathbf{P}\mathbf{h}\mathbf{C}\mathbf{H}_2\mathbf{O}\mathbf{C}\mathbf{O}\mathbf{C}\mathbf{I} + \mathbf{H}_2\mathbf{O} &\leftrightarrow \mathbf{P}\mathbf{h}\mathbf{C}\mathbf{H}_2\mathbf{O}\mathbf{H} + \mathbf{C}\mathbf{O}_2 + \mathbf{H}_2\mathbf{O} \\ \mathbf{R}\mathbf{S}\mathbf{O}_2\mathbf{C}\mathbf{I} + \mathbf{H}_2\mathbf{O} &\leftrightarrow \mathbf{R}\mathbf{S}\mathbf{O}_3\mathbf{H} + \mathbf{H}\mathbf{C}\mathbf{I} \\ \mathbf{R} = \mathbf{m}\mathbf{e}\mathbf{t}\mathbf{i} \text{ arba fenil} \end{split}
```

pagrindinėms klasėms (α , β , γ), yra struktūriškai nepanašūs ir, manoma, kad atsirado vykstant konvergentinei evoliucijai (Liljas and Laurberg, 2000).

Žmogaus organizme randama 15 α -CA, iš kurių 3 fermentai (CA VIII, X, XI) neturi fermentinio aktyvumo (Pastorekova et al., 2006; Sly and Hu, 1995). Kitos 12 izoformų pasiskirsčiusios įvairiuose audiniuose, organuose ir skirtingose ląstelės vietose, pasižymi nevienodu kataliziniu efektyvumu (2 lentelė). Dauguma šių baltymų yra monomerai, sudaryti iš 7 α -spiralių ir 10 β -juostų, iš kurių 2 išsidėsčiusios antilygiagrečiai, kitos – lygiagrečiai viena kitos atžvilgiu. Tik 3 baltymai (CA VI, IX ir XII) yra dimerai (Aggarwal et al., 2013). Šios klasės baltymų kofaktorius yra cinkas. α -CA randamos ir bakterijose. Kai kurios iš jų pasižymi neįprastomis savybėmis. Pavyzdžiui, CA, išgrynintos iš chemolitotrofinių termofilinių bakterijų *Sulfurihydrogeninium yellowstonense*, pasižymi aukštu termostabilumu: kaitinant 2 val. 100 °C temperatūroje CA išlaiko 100 % fermentinį aktyvumą. Tokie baltymai gali būti panaudojami biotechnologijoje (Capasso et al., 2012).

2 lentelė. Žmogaus CA pasiskirstymas organuose bei audiniuose ir katalizinis efektyvumas. k_{kat} – katalizinė konstanta, K_M – Michaelio konstanta (Aggarwal et al., 2013).

CA IZOFORMA	VIETA LĄSTELĖJE	Organas/audinys	$k_{kat}/K_M \; ({\rm M}^{-1}{\rm s}^{-1})$
CA I	Citozolis	Eritrocitai, virškinamasis	$5,0 \times 10^{7}$
		traktas	
CA II	Citozolis	Eritrocitai, virškinamasis	1.5×10^8
		traktas, akys, osteoklastai,	
		inkstai, plaučiai, sėklidės,	
		smegenys	
CA III	Citozolis	Skersaruožiai raumenys,	$3,0 imes 10^5$
		adipocitai	_
CA IV	Prisijungusi	Inkstai, plaučiai, kasa,	$5,1 \times 10^7$
	prie membranos	smegenys, kapiliarai,	
		gaubtinė žarna, širdies	
~		raumenys	7
CA VA	Mitochondrijos	Kepenys	2.9×10^{7}
CA VB	Mitochondrijos	Sirdies ir skeleto raume-	$9,8 \times 10'$
		nys, kasa, inkstai, nuga-	
		ros smegenys, virškinama-	
		sis traktas	4.0 107
CA VI	Sekretuojama	Seilių ir pieno liaukos	$4,9 \times 10'$
	is ląsteles		0.0
CA VII	Citozolis	Centrine nervų sistema	$8,3 \times 10^{\circ}$
CA VIII CA IV	Citozolis	Centrine nervų sistema	Neaktyvi $E E \times 10^7$
CAIX	Iransmembranine	trakto gleivinė	$5,5 \times 10^{-5}$
CA X	Citozolis	Centrinė nervų sistema	Neaktyvi
CA XI	Citozolis	Centrinė nervų sistema	Neaktyvi
CA XII	Transmembraninė	Inkstų, žarnų ir reproduk-	$3,5 \times 10^7$
		cinių organų epitelis, akys,	
		navikai	
CA XIII	Citozolis	Inkstai, smegenys, plau-	$1,1 \times 10^7$
		čiai, žarnos, reprodukciniai	
		organai	
CA XIV	Transmembraninė	Inkstai, smegenys, kepenys	$3,9 \times 10^7$

 β -CA pasižymi plačia funkcine ir struktūrine įvairove. Jos randamos bakterijose ir augaluose (Frost, 2014). Tai oligomeriniai baltymai, kurių dydis yra nuo 45 iki 200 kDa. Kristalinės β -CA struktūros rodo, kad aktyviajame centre esantis cinko jonas koordinuoja-

mas dviejų cisteinų ir histidino, o ketvirtas ligandas yra vandens molekulė arba hidroksido jonas. Cianobakterijų karboksisomose esančios β -CA svarbios CO₂ koncentravimui (Emameh et al., 2014). Augaluose, kuriems būdingas C4 fotosintetinis ciklas, β -CA katalizuoja pirmą fotosintezės reakciją – atmosferinio CO₂ hidrataciją, kurios metu susidariusį HCO₃ panaudoja fosfoenolpiruvato karboksilazė. Augaluose, kuriems būdingas C3 fotosintetinis ciklas, β -CA palaiko pastovią CO₂ koncentraciją ribuliozės 1,5-bisfosfato karboksilazei. Be to, šios klasės baltymai dalyvauja lipidų sintezėje, padeda augalams apsisaugoti nuo ligų, abiotinio streso (Wang et al., 2014). Ištirta, kad kai kurios β -CA vykstant evoliucijai gavo naujas metabolines funkcijas. Anglies disulfito hidrolazė iš *Acidianus* struktūriškai ir genetiškai panaši į β -CA. Šis fermentas skaldo CS₂ į CO₂ ir H₂O, tačiau neturi CO₂ hidratacinio aktyvumo (Smeulders et al., 2011).

 γ -CA klasei priklausantys baltymai išskirti iš archėjų Metanosarcina thermophila. Šie fermentai yra trimerai ir reguliuoja acetato pernašą į ląstelę ir CO₂ iš ląstelės per acetato/bikarbonato jonų nešiklį. Išgryninus baltymus iš *E. coli* aplinkoje su deguonimi, nustatyta, kad jų aktyviajame centre esantis kofaktorius yra cinkas, koordinuojamas dviejų histidinų iš vieno monomero, trečio histido iš kito monomero ir vandens molekulės arba hidroksido jono. Tačiau *in vitro* eksperimentais γ -CA cinką pakeitus i kobaltą arba į geležį, fermentų katalizinis aktyvumas išauga tris kartus. Išgryninus baltymus aplinkoje be deguonies, fermentų aktyviajame centre nustatytas geležies jonas. Perkėlus juos į aplinką su deguonimi, fermentai praranda katalizinį aktyvumą, geležies jonas oksiduojasi ir yra pakeičiamas cinko jonu, esančiu buferiniame tirpale (Ferry, 2013). Šie tyrimai rodo geležies svarbą γ -CA kataliziniam aktyvumui.

 δ -CA ir ζ-CA randamos fitoplanktono jūrų dumbliuose *Thalassiosira weissflogii*, kurie vadinami jūrų diatomais. Jie ekologiškai svarbūs, nes atlieka 20 % globalios anglies fiksacijos (Samukawa et al., 2014). δ -CA ir ζ-CA dalyvauja anglies koncentravime. Dumbliuose jos kelis kartus padidina CO₂ kiekį lyginant su CO₂ koncentracija išorėje, kad efektyviai galėtų veikti ribuliozės 1,5-bisfosfato karboksilazė. ζ-CA aktyviajame centre yra kadmio jonas. Tačiau priklausomai nuo aplinkoje esančių jonų koncentracijos gali vykti spontaniškas kadmio pakeitimas cinku ir tokia ζ-CA išlieka kataliziškai aktyvi. Aktyviajame centre esantis metalo jonas koordinuojamas dviejų cisteinų ir histidino, o ketvirtas ligandas yra vandens molekulė arba hidroksido jonas. δ -CA yra monomerai, aktyviajame centre turintys cinko joną, kurį koordinuoja trys histidinai ir vandens molekulė arba hidroksido jonas (Del Prete et al., 2014).

1.1.2. α -karboanhidrazių katalizinis mechanizmas

CA II yra labiausiai ištirtas fermentas iš α -CA, kurį lengva išgryninti iš įvairių modelinių organizmų dideliais kiekiais. Jis pasižymi aukštais kinetiniais parametrais bei dideliu tirpumu. CA II aktyvusis centras išsidėstęs 13,0 Å gylio kūgio formos ertmėje, kuri yra sudaryta iš hidrofobinių (Val121, Val143, Leu198, Val207, Trp209) ir hidrofilinių sričių (Tyr7, Asn62, His64, Asn67, Thr199, Thr200) (1 pav.). Ertmės dugne yra cinko jonas, ku-



1 pav. CA II struktūra (PDB kodas 1CA2). Aktyvaus centro ertmės hidrofilinės sritys nuspalvintos mėlynai, hidrofobinės – raudonai (Alterio et al., 2012).

rį koordinuoja trys histidinai (His94, His96, His119) ir vandens molekulė arba hidroksido jonas (2 pav.).



2 pav. CA II struktūra (PDB kodas 1CA2). Aktyviajame centre esantis cinko jonas, koordinuojamas trijų histidinų, pažymėtas violetine sfera. α -spiralės nuspalvintos raudonai, β -klostės – geltonai (Alterio et al., 2012).

CA katalizuoja grįžtamą CO_2 hidratacijos reakciją, kuri vyksta ping–pong mechanizmu dviem etapais (E – fermentas, B – buferinis tirpalas):

- 1. $EZnOH^{-} + CO_2 \leftrightarrow EZnH_2O + HCO_3^{-}$
- 2. $EZnH_2O + B\leftrightarrow EZnOH^- + BH^+$

Pirmame etape fermento aktyviajame centre jungiasi CO_2 . Remiantis Rentgeno spindulių difrakcijos kristalografijos duomenimis (PDB kodas 3D92), nustatyta, kad hidrofobinėje CA II aktyvaus centro ertmėje yra vienintelė CO_2 jungimosi vieta. Vienas CO_2 deguonies atomas sąveikauja su Thr199, o kitas deguonies atomas išsidėsto tarp Zn^{2+} ir Val121. Esant tokiai molekulių pozicijai, CO_2 deguonies atomai yra vienodu atstumu iki hidroksido jono, prisijungusio prie Zn^{2+} . Šis hidroksido jonas yra puikus nukleofilas, kuris jungiasi prie elektrofilinio anglies atomo CO_2 molekulėje. Susidaro bikarbonato jonas (HCO_3^-), kurį iš aktyvaus centro išstumia vandens molekulė. Antrame etape atstatoma aktyvi fermento forma, perduodant vandens molekulės, prisijungusios prie Zn^{2+} , protoną buferiniam tirpalui (Domsic et al., 2008).

Antrame etape vykstanti deprotonizacija yra fermentinės reakcijos greitį ribojanti stadija. His64 yra CA regeneravimui į aktyvią bazinę formą svarbi aminorūgštis, kuri veikia kaip protonų šaudyklė. Rentgeno spindulių difrakcijos kristalografijos ir molekulinės dinamikos tyrimų duomenys rodo, kad His64 gali įgyti dvi skirtingas konformacijas: *in* $(7,5 \text{ Å nuo } Zn^{2+})$ ir *out* (12,0 Å nuo Zn^{2+}). *In* konformacijoje His64 prisijungia H⁺ nuo aktyviajame centre esančios vandens molekulės, o *out* konformacijoje His64 perduoda H⁺ buferiniam tirpalui (3 pav.). CA III mažą katalizės greitį lemia His64 pakeitimas į



3 pav. CA II aktyvaus centro struktūra (PDB kodas 1CA2). Zn^{2+} koordinuojamas trijų histidinų ir vandens molekulės arba hidroksido jono, kuris sudaro vandenilinius ryšius su kitomis aktyviajame centre esančiomis vandens molekulėmis (jos pažymėtos raudonais rutuliukais). Parodytos *in* ir *out* His65 konformacijos (Alterio et al., 2012).

Lys. CA VA ir CA VB šioje pozicijoje yra Tyr. Kitose α -CA His64 yra konservatyvi aminorūgštis (Aggarwal et al., 2013; Supuran, 2008).

1.1.3. Karboanhidrazės VI apžvalga

CA VI yra vienintelė sekretuojama α -CA izoforma. Pirmą kartą fermentas išskirtas iš avių paausinių liaukų ir seilių (Fernley et al., 1979). Vėliau CA VI gryninta iš žiurkių ir žmonių seilių (Feldstein and Silverman, 1984; Murakami and Sly, 1987). Baltymas randamas ne tik seilėse, bet ir piene, ašarose, kvėpavimo takuose, virškinimo trakto epitelyje (Karhumaa et al., 2001; Kaseda et al., 2006; Leinonen et al., 2004; Ogawa et al., 2002). Nustatyta, kad CA VI, nuryta su seilėmis, išlieka aktyvi ir skrandyje (Parkkila et al., 1997). Parkkila su kolegomis parodė, kad šios izoformos koncentracija kinta cirkadiniu ritmu: naktį miego metu ji yra labai žema, tačiau greitai padidėja pabudus ir valgant (Parkkila et al., 1995).

Šiuo metu žinoma, kad ląstelėje nuo skirtingų promotorių vyksta dviejų tipų CA VI sintezė. Įprastomis sąlygomis sekretuojama A tipo CA VI. Sergant neurodegeracinėmis ligomis, kai dėl sutrikusio aprūpinimo krauju audinyje sumažėja deguonies ir gliukozės kiekis, padidėja signalinės sekos neturinčios B tipo CA VI kiekis branduolyje ir citoplazmoje. Tuomet endoplazminiame tinkle pradedama CHOP (angl. *CCAAT/Enhancer-Binding Protein Homologous Protein*) baltymo sintezė. Jis reguliuoja B tipo CA VI raišką (Sok et al., 1999). Atlikti tyrimai neuronuose, kurie buvo auginti hipoksijos sąlygomis. Norint, kad neuronai išgyventų, naudotas smegenų neurotrofinis faktorius (angl. *brain-derived neurotrophic factor*), kuris indukuoja CHOP sintezę. Parodyta, kad tokiose ląstelėse padidėja B tipo CA VI kiekis, reikalingas apsaugai nuo hipoksijos pažeidimų, todėl ląstelės tampa gyvybingesnės. Be to, nustatyta, kad B tipo CA VI fermentinis aktyvumas mažesnis už A tipo CA VI fermentinį aktyvumą. Todėl manoma, kad B tipo CA VI pagrindinė funkcija nėra rūgščių-bazių pusiausvyros palaikymas (Matthews et al., 2014).

Hibridizacijos tyrimai parodė, kad CA VI genas yra pirmoje chromosomoje. Jis sudarytas iš 8 egzonų ir 7 intronų (Jiang and Gupta, 1999). Genas koduoja 42 kDa baltymą, kuris turi dvi N-ryšiu prisijungusias oligosacharidines grandines (Fernley et al., 1988). CA VI katalizinis aktyvumas yra panašus į gausiai organizme randamos CA I, tačiau mažesnis nei aktyviausios CA II. 2012 m. Pilka su kolegomis išsprendė CA VI kristalinę struktūrą (4 pav.). Baltymas yra dimeras. Greta esantys monomerų aktyvieji centrai yra nukreipti vienas į kitą. Toks dimerizacijos pobūdis skiriasi nuo CA IX ir CA XII dimerizacijos. CA VI monomerai susijungia sudarydami 11 vandenilinių ryšių. Baltymui stabilumo suteikia disulfidinis ryšys tarp Cys42 ir Cys224 (Pilka et al., 2012).

Seilėse esanti CA VI atsakinga už burnos pH homeostazės palaikymą. Sumažėjus seilių sekrecijai, pakinta CA VI koncentracija. Tai siejama su didesne infekcijų rizika ir dantų karieso formavimusi (Kivela et al., 1999). Kimoto ir jo bendradarbių atlikti tyrimai rodo, kad CA VI yra atsakinga už mikroorganizmų metabolizmo metu susidariusių rūgščių neutralizavimą. Pacientų, kurie skalavo burną su sacharozės ir acetazolamido, CA slopiklio, mišiniu, seilių pH pokyčiai buvo didesni už pacientų, kurie skalavo burną tik su sacharoze (Kimoto et al., 2006). Be to, nustatytas vaikų seilėse esančios CA VI fermentinis aktyvumas prieš ir po skalavimo sacharoze. Turinčių dantų kariesą vaikų seilėse esanti CA VI yra aktyvesnė ir jos koncentracija yra didesnė nei sveikus dantis turinčių vaikų. Tai galėtų būti siejama su didesniu mikroorganizmų išskiriamų rūgščių kiekiu ir jo neutralizavimo būtinybe. Autoriai mano, kad didesniam fermentiniam aktyvumui svarbus baltymo po-limorfizmas, lemiantis skirtingą antrinės struktūros susidarymą (Peres et al., 2010). Kiti



4 pav. CA VI struktūra (PDB kodas 3HS4). A – CA VI dimeras. Vienas monomeras nuspalvintas žydrai, kitas – rausvai. Aktyviajame centre esantys Zn^{2+} jonai nuspalvinti žaliai. B – CA VI dimerinės struktūros susidarymui svarbios aminorūgštys. C – CA VI dimeras, gautas A dalyje pavaizduotą struktūrą pasukus 90°. Pažymėti monomerų N ir C-galai (Pilka et al., 2012).

tyrimai rodo, kad sergančių diabetu žmonių seilių pH pokyčiai yra didesni nei normos atveju (Koç Öztürk et al., 2012). Jie labiausiai priklauso nuo HCO₃⁻ koncentracijos. Šie jonai neutralizuoja H⁺ veikiant CA. Kuo mažesnis CA fermentinis aktyvumas, tuo lėčiau vyksta neutralizacija ir tuo didesni seilių pH pokyčiai. Nustatyti tie patys sergančių diabetu žmonių CA VI aminorūgščių vieno nukleotido pokyčiai, kurie buvo rasti Peres ir jo kolegų tyrimo metu. Taip patvirtinta teigiama koreliacija tarp CA VI aktyvumo ir jos polimorfizmo.

Įdomus atradimas padarytas palyginus CA VI ir seilėse atrasto, skonio svogūnėlių augimą skatinančio baltymo gustino (angl. *gustin*) tyrimų rezultatus. Pasirodė, kad gustinas yra ta pati CA VI. Todėl maža CA VI koncentracija siejama su sumažėjusiu skonio suvokimu, padidėjusia skonio receptorių apoptoze skonio svogūnėliuose (Henkin et al., 1999). Topiramatas ir kiti CA slopikliai, kurie naudojami kaip vaistiniai preparatai, iškraipo skonio suvokimą, nes slopinama CA VI. Manoma, kad dėl šios priežasties mažinantiems svorį pacientams, vartojantiems topiramatą, sumažėja maisto poreikis (Frost, 2014).

1.1.4. Karboanhidrazės pramonėje ir biomedicinoje

 CO_2 lygis atmosferoje nuolat auga. Tai viena iš pagrindinių klimato kaitos priežasčių. Kuriant reaktorius, pritaikytus CO_2 dujų surinkimui, naudojamos imobilizuotos CA (Cowan et al., 2003). Tai galėtų padėti šiltnamio efekto problemos sprendimui. Sukurti bifunkciniai chimeriniai baltymai, kuriuos sudaro CA domenas iš Neisseria gonorrhoeae ir prie celiuliozės besijungiantis domenas iš Clostridium thermocellum. Tokie baltymai pritaikyti CO_2 surinkimui iš dujų, kurios susidaro kuro degimo metu (Liu et al., 2009). Dumbliai ir cianobakterijos, kurios geba fiksuoti anglį iš atmosferos CO_2 veikiant CA, yra puikūs šaltiniai biokuro gamybai (González and Fisher, 2014). Aukštas CA afiniškumas cinkui leidžia pritaikyti šiuos fermentus biosensorių kūrime. Panaudojant tokią technologiją galima nustatyti cinko kiekį nuotekose ar jūroje. Tai svarbu toksiškumo įvertininmui (Thompson and Jones, 1993).

CA plačiai naudojamos biomedicinoje. Viena iš sričių yra dirbtinių plaučių kūrimas. Jie reikalingi žmonėms, laukiantiems plaučių transplantacijos. Tokioje technologijoje ant membranos imobilizavus CA, nustatyta, kad CO_2 iš kraujo yra efektyviau pašalinamas (Kaar et al., 2007). Šiuo metu III fazės klinikiniuose tyrimuose yra vienas iš kraujo pakaitalų PolySFHb–SOD–CAT–CA (González and Fisher, 2014). Jis sudarytas iš hemoglobino (PolySFHb), pernešančio O_2 , superoksido dismutazės (SOD) ir katalazės (CAT), pasižyminčiomis antioksidaciniais aktyvumais, bei CA, reikalingos CO_2 šalinimui iš audinių. Tokio preparato naudojimas yra perspektyvesnis už viso kraujo perpylimą, nes jis yra sterilus ir neturi kraujo antigenų (Bian et al., 2012). Be to, CA pritaikomos tikslingam vaistų pernešimui į konkrečią vietą. Šios technologijos jautrios CO₂, HCO₃ koncentracijų ar pH pokyčiams. Vienas iš pavyzdžių yra hidrogelio struktūros pokyčiai, vykstantys dėl CO_2 koncentracijos pasikeitimo. Jų metu atpalaiduojamas hidrogelyje enkapsuliuotas baltymas, kuris yra vaistinis preparatas (Han D, 2012). Be to, NASA sukūrė konstrukcijas su CA, kuriose fermentai jungiasi su CO₂, taip mažindami šių dujų kiekį uždarose patalpose, pavyzdžiui, kosminiuose erdvėlaiviuose, povandeniniuose laivuose (Cowan et al., 2003). Taigi šie pavyzdžiai irodo plačią CA pritaikomumo sritį.

1.1.5. Karboanhidrazių aktyvumo pokyčių sukeliamos ligos

CA dalyvauja daugelyje fiziologinių procesų. Padidėjusi CA raiška arba sumažėjęs šių baltymų katalizinis aktyvumas sukelia tam tikras ligas. Jos yra sutrikusios CO_2 homeostazės pasekmė. Todėl CA yra terapiniai taikiniai ir jų slopikliai bei aktyvatoriai yra naudojami kaip vaistiniai preparatai.

CA ir glaukomos ryšys jau seniai žinomas (Friedenwald, 1949; Kinsey and Barany, 1949). Glaukoma – tai akių ligų grupė, kurios pasekmė yra regos praradimas dėl optinio nervo pažaidų. Sergant šia liga, išauga akies skysčio sekrecija tarp ragenos ir lęšiuko. Tai lemia akispūdžio padidėjimą, dėl kurio sumažėja kraujo patekimas į tinklainę bei pažeidžiamas optinis nervas. Nustatyta, kad akies skystyje yra didelė HCO₃ koncentracija. Šiuos jonus gamina akies obuolio kraujagyslėse esančios CA II, IV, XII. Vienas iš glaukomos gydymo būdų yra HCO₃, kuris skatina akies skysčio sekreciją, koncentracijos mažinimas. Tam naudojami CA slopikliai: brinzolamidas ir dorzolamidas. Jie veikia lokaliai, nesukelia šalutinio poveikio. Tačiau CA slopikliais glaukomos išgydyti nepavyksta, nes šie vaistai stabdo ligos progresavimą, o ne priežastį (Scozzafava and Supuran, 2014).

Padidėjusi CA IX ir XII raiška stebima smegenų, krūties, plaučių, gimdos kaklelio, inkstų, tiesiosios žarnos vėžinėse ląstelėse. Mikroaplinka yra svarbi naviko formavimuisi. Greitai proliferuojančioms vėžinėms lastelėms neužtenka deguonies, atkeliaujančio su krauju. Kaip atsakas į hipoksiją pasikeičia genų raiška. Vienas iš pavyzdžių yra CA IX raiškos padidėjimas. Fermentas palaiko stabilų vidulastelinį pH. Tai leidžia vėžinėms lastelėms prisitaikyti prie toksinių aplinkos sąlygų. Be to, CA IX mažina užląstelinį pH. Aktyvuojamos peptidazės, ardančios tarpląstelinį užpildą, pamatinę membraną, todėl vėžinės lastelės gali legviau judėti. Rūgštinis pH aktyvuoja nuo p53 priklausomą sveikų ląstelių apoptozę. Taip suformuojamos palankios sąlygos naviko plitimui (Benej et al., 2014). CA IX ir XII yra transmembraniai baltymai, kurių aktyvūs centrai yra išsidėstę ląstelės išorėje, todėl gali pasitarnauti kaip vėžinių ląstelių žymenys bei būti priešvėžinių vaistų taikiniais. Remiantis masių spektroskopijos ir Rentgeno spindulių difrakcijos kristalografijos duomenimis siekiama chemiškai susintetinti CA IX ir CA XII atrankius slopiklius. Pasinaudojant fagu bibliotekomis, kurie ekspresuoja antikūnus ant paviršiaus, rasti CA IX fermentinį aktyvumą slopinantys antikūnai (Murri-Plesko et al., 2011). Chimerinis monoklonininis antikūnas girentuksimabas, skirtas inkstų vėžio gydymui, yra III fazės klinikinių tyrimų stadijoje (Siebels et al., 2011; Tafreshi et al., 2014).

Viena iš sparčiai besivystančio pasaulio žmonių problemų yra nutukimas, kuris gali sukelti diabeta, įvairias širdies ir kraujagyslių ligas. Fundamentali nutukimo priežastis yra mitochondrijose esančių fermentų katalizinio aktyvumo sutrikimas, dėl kurio pakinta metaboliniai keliai. Šiuo metu sukurta daugybė vaistinių preparatų prieš nutukimą (fenfluraminas, fenterminas), tačiau jie sukelia šalutinį poveikį. Norint išvengti tokių pasekmių, reikia tikslingai slopinti konkrečius fermentus. Vieni iš tokių taikinių yra mitochondrijose esančios CA VA ir CA VB (Arechederra et al., 2013). Jos gamina HCO_3^- , naudojamą karbamido, gliukozės, lipidų sintezėje. HCO₃ reikalingas keturiems mitochondrijose esantiems fermentams: karbamoilfosfato sintetazei I (katalizuoja karbamoilfosfato sintezę iš NH_3 ir HCO_3^-), piruvato karboksilazei (katalizuoja oksalacetato sintezę iš piruvato ir HCO₃ panaudojant ATP), propionil-KoA karboksilazei (katalizuoja propionil-KoA karboksilinimą panaudojant HCO_3^- ir ATP), metilkrotonil-KoA karboksilazei (katalizuoja leucino skaidymą). Bet kurio iš šių keturių fermentų praradimas yra mirtinas. Tyrimai pelėse, kurių mitochondrijose nuslopinta CA VA ir VB raiška, parodė, kad jos išlieka gyvybingos. Manoma, kad nefermentinės CO_2 hidratacijos metu susidaro pakankamas $HCO_3^$ kiekis, reikalingas minėtiems keturiems fermentams. Todėl siekiama slopinti CA VA ir CA VB katalizinį aktyvumą. Tai gali lemti gliukozės ir lipdų pertekliaus sumažėjimą (Shah et al., 2013). Vienas iš tokių slopiklių yra topiramatas. 2012 m. JAV Maisto ir Vaistų Valdyba (FDA; angl. Food and Drug Administration) patvirtino šio vaistinio preparato naudojimą kartu su fenterminu, mažinančiu apetitą, nutukimo gydymui.

Nerviniuose audiniuose esančios CA II, CA IV, CA VII ir CA XIV yra atsakingos už smegenų skysčio susidarymą, dalyvauja nervinio impulso perdavime. CA daro įtaką įvairių nuo pH priklausomų baltymų fermentiniam aktyvumui: receptoriams, jonų kanalams, ląstelių jungtis sudarantiems baltymams (Ruusuvuori et al., 2013). Todėl esant tam tikriems susirgimams, dėl per didelės CA raiškos gaminama daugiau HCO_3^- , kuris sekretuojamas į sinapsinį plyšį ir aktyvuoja daugiau receptorių. Tokia padidėjusi bikarbonato sekrecija nerviniuose audiniuose siejama su migrena, epilepsija. Vienas iš antiepilepsinių vaistų yra zonisamidas. Jis neatrankiai slopina CA katalizinį aktyvumą, didina užląstelines dopamino, seratonino koncentracijas ir blokuoja natrio, kalcio kanalus (Frost, 2014).

CA VIII, X ir XI neturi CO₂ hidratacinio aktyvumo. Imunohistocheminiai tyrimai ir rezultatai, gauti iš kiekybinės PGR, parodė, kad didžiausias CA VIII kiekis randamas smegenėlių Purkinjė ląstelėse, o CA X ir XI – visoje centrinėje nervų sistemoje (Aspatwar et al., 2013). Padidėjusi CA VIII sintezė stebima vėžinėse plaučių, tiesiosios žarnos ląstelėse, o CA XI – skrandžio ir žarnų navikuose. Mutacija *CA8* gene sukelia protinius sutrikimus ir ataksiją. Mutuotos CA VIII kaupiasi Purkinjė ląstelėse ir neleidžia inozitolio 1,4,5-trifosfatui jungtis prie savo receptoriaus. Tuomet nebeaktyvinamas Ca²⁺ signalinis kelias, kuris yra svarbus raumenų susitraukimui, hormonų ir neurosiuntiklių išsiskyrimui, ląstelių dalijimuisi, genų raiškai, fermentų aktyvumui. Žmonės, sergantys ataksija, dėl užblokuoto inozitolio 1,4,5-trifosfato receptoriaus negali valingai kontroliuoti savo judesių, vaikšto atsirėmę į žemę ne tik kojomis, bet ir rankomis (Türkmen et al., 2009). Ligos gydymui reikalinga genų terapija.

Taigi minėtų ligų gydymui svarbu atrankiai slopinti tik susirgimą sukeliančias CA izoformas. Organizme normaliai funkcionuojančių CA veikla neturi būti stabdoma. Šiuo metu tokių atrankių slopiklių paieška vis dar vykdoma.

Kai kurių ligų gydymui reikalingas CA aktyvavimas. Aktyvatoriai jungiasi CA aktyvaus centro ertmėje ir pagreitina H⁺ pernešimą nuo vandens molekulės, kuri koordinuoja Zn²⁺, į buferinį tirpalą. Tyrimai gyvūnuose parodė, kad CA I ir CA II aktyvavimas fenilalaninu pagerina sinapsių efektyvumą. Pagreitėja procesas, kai presinapsinis neuronas aktyvuoja posinapsinį neuroną. Tai gali būti pritaikoma Alzhaimerio ligos gydymui, su senėjimu susijusiam atminties gerinimui (Supuran, 2008).

1.1.6. Mutagenezės taikymas karboanhidrazių tyrimuose

Fermentų evoliucija *in vitro* suteikia fundamentalių žinių apie baltymų katalizinį mechanizmą, slopinimo bei aktyvavimo procesus. Modifikuojant fermentus mutagenezės būdu, galima gauti didesniu kataliziniu aktyvumu pasižyminčius baltymus, pakeisti jų substratus bei sukurti efektyvesnius aktyvatorius ar slopiklius. Tai pritaikoma biotechnologijoje ir biomedicinoje.

CA yra vienas iš pavyzdžių, kai bandoma optimizuoti fermentus genų inžinerijos me-

todais. Daugumoje tyrimų, įvedant mutacijas į CA struktūrą, buvo keista:

- Zn²⁺ ligandai (Hunt and Fierke, 1997);
- iš aktyvaus centro į buferinį tirpalą H⁺ pernešančios aminorūgštys (Domsic et al., 2008);
- CO_2 surišančios hidrofobinės aminorūgštys, keičiant jų poliariškumą (Turkoglu et al., 2012);
- aminorūgštys, būdingos vienai CA izoformai, aminorūgštimis, būdingomis kitoms CA izoformoms, toje pačioje pozicijoje (Engstrand et al., 1995);
- aminorūgštys, kurių pokyčiai sukelia genetinius sutrikimus. Pavyzdžiui, CA II His107 mutacija į Tyr sukelia sindromą, kuriuo sergantiems žmonėms būdingas protinis atsilikimas, padidėjęs kaulų tankis, inkstų kanalų acidozė (Almstedt et al., 2009).

Kadangi CA yra terapinis taikinys, tai jų mutagenezės tyrimai yra vertingi atrankių slopiklių jungimosi tik su ligą sukeliančiomis CA izoformomis supratimui. Tai galėtų būti pritaikyta vaistinių preparatų kūrime.

1.2. Vaistų kūrimo strategija

Pasak Prof. G. Klebe, vaistų kūrimas yra mokslas, technologija ir menas viename. Naujų vaistų kūrime susilieja žinios ir technologijos, bet lemiamą įtaką daro žmogaus intuicija ir kūrybiškumas. Tam, kad organinis junginys virstų vaistiniu preparatu reikalingas chemikų, molekulinių biologų, biochemikų, farmacininkų, farmakologų, toksikologų ir gydytojų bendras darbas (Klebe, 2013).

Vaistų kūrimas – sudėtingas procesas, susidedantis iš keleto etapų. Pradžioje atliekami baltymo ir cheminio junginio sąveikos tyrimai. Šiuo metu išspręstos 550 000 mažų molekulių ir 85 000 baltymų ir baltymų–ligandų kompleksų kristalinės struktūros (Klebe, 2013). Minėti skaičiai auga eksponentiškai. Toliau vyksta farmakokinetiniai tyrimai *in* vitro. Kai turime sėkmingai atrinktą molekulę, kuri atrankiai jungiasi su patologiją sukeliančiu baltymu, reikia nustatyti jos ADMET (angl. *absorption, distribution, metabolism,* excretion, toxicity) parametrus: absorbciją, pasiskirstymą, metabolizmą, šalinimą, toksiškumą (Hann and Keserü, 2012). Aktyvi molelulė turi pereiti daugybę lipidinių membranų ir ląstelių erdvėskyrų, kad pasiektų baltymą–taikinį. Todėl nustatomas jos lipofiliškumas: išmatuojamas molekulės tirpumas oktanolyje ir vandenyje. Cheminė struktūra siejama su skvarbumo galimybėmis per molekulės gebėjimą atpalaiduoti supantį vandens molekulių tinklą ir po to sudaryti naujus vandenilinius ryšius. Be to, naudojantis žmogaus gaubtinės žarnos ląstelėmis, atliekami absorbijos per nešiklius tyrimai. Vaistinio preparato toksiškumas įvertinamas mažiausiai dvejose gyvūnų rūšyse, kurios artimiausios žmogui pagal metabolizmą ir farmakokinetiką (Klebe, 2013). Toliau atliekami klinikiniai tyrimai, kuriuos 1970 m. patvirtino FDA. Jie reikalingi ne tik vaisto saugumo ir efektyvumo nustatymui, bet ir besigydančio žmogaus gyvenimo kokybės, farmakoekonomikos ir kitų rezultatų įvertinimui. Jie skirstomi į keletą fazių. I fazės tyrimai lanksčiausi, jiems reikalingi 20–100 savanorių. Tiriamas vaisto metabolizmas, absorbcija, pašaliniai poveikiai, kai vaisto dozė didinama arba vykdoma pakartotinė terapija tuo pačiu vaistu. II fazės tyrimai griežtai kontroliuojami, jiems mažiausiai reikia poros šimtų žmonių. Įvertinama, kokia vaisto dozė reikalinga ligos gydymui ir vaisto veikimo efektyvumas. III fazės tyrimai yra kontroliuojami ir nekontroliuojami, juose gali dalyvauti nuo kelių šimtų iki kelių tūkstančių žmonių. Jie reikalingi galutiniam vaisto naudos ir sukeliamos rizikos nustatymui. IV fazės tyrimai atliekami jau po to, kai vaistas patvirtinamas ir pasirodo prekyboje. Jų metu išaiškinamos nepageidaujamos vaisto reakcijos. Praktikoje dažniausiai gauti rezultatai orientuojami į vaisto prekybą ir nukreipti prieš varžovų produktus. Dar kai kurios farmacijos kompanijos vykdo V fazės klinikinius tyrimus, kurių metu tiriamos naujos vaisto indikacijos ir dozavimo ribos (Chow and Liu, 2013).

Sėkmės atveju visi tyrimai gali trukti 10–15 metų. Naujo vaisto kūrimo ir jo pasirodymo prekyboje kaina nuolat didėja. Šiuo metu ji siekia 3,6–11 milijardų JAV dolerių. Tik didelės farmacijos kompanijos pajėgios sumokėti tokią sumą žinodamos, kad vaistas gali būti atmestas paskutinėse klinikinių tyrimų stadijose ir visada gali atsirasti naujas efektyvesnis vaistas (Klebe, 2013).

1.2.1. Karboanhidrazių slopikliai

Kadangi CA dalyvauja daugelyje fiziologinių procesų, tai kai kurių CA izoformų aktyvumo pokyčiai siejami su įvairiomis ligomis. Todėl ieškoma efektyvių, tik tam tikrą CA izoformą veikiančių slopiklių, neturinčių poveikio kitoms, normaliai organizme veikiančioms CA. Svarbu išanalizuoti kiekvieno izofermento jungimosi su slopikliais atrankumą.

CA slopiklių tyrimai prasidėjo 1940 m., kai buvo parodyta, kad sulfonamidai slopina CA veiklą (Keilin and Mann, 1940). Šiuo metu nustatyti trys CA slopinimo mechanizmai, paremti kristalografinės analizės rezultatais:

- aktyviajame centre esančios vandens molekulės išstūmimas. Prisijungiant slopikliui, išlaikoma tetraedrinė arba trikampės bipiramidės Zn²⁺ koordinacijos geometrija, kuri atitinkamai būdinga sulfonamidams (5 pav., A) ir metalus kompleksuojantiems anijonams (5 pav., B);
- jungimasis prie aktyviajame centre esančios vandens molekulės arba hidroksido jono. Tai būdinga natūraliems CA slopikliams: fenoliams (5 pav., C), poliaminams, pavyzdžiui, sperminams (5 pav., D);
- jungimasis aktyvaus centro ertmės aktyvatoriaus susirišimo srityje. Prisijungęs slopiklis užstoja kelią kitoms molekulėms link aktyvaus centro. Tai būdinga kumari-



nams, hidrolizuotiems iki 2-hidroksicinamono rugšties (5 pav., E), fulerenams, lakozamidams.

5 pav. α -CA aktyvusis centras, kuriame prisijungęs sulfonamidas (A), tiocianatas (B), fenolis (C), sperminas (D), hidrolizuotas kumarinas (E) (Durdagi et al., 2011).

Naujų slopiklių kūrimui naudojami du pagrindiniai metodai: "žiedo" ir "uodegos" (Scozzafava et al., 1999). "Žiedo" metodas paremtas įvarių aromatinių ir heterociklių žiedų paieška, prie kurių prijungiama sulfonamidinė grupė. "Uodegos" metodo esmė yra įvarių grupių įterpimas į jau sukurtą "žiedo" metodu struktūrą taip keičiant junginio tirpumą. Sulfanilamidas (SA), acetazolamidas (AZM), etokzolamidas (EZA) ir dichlorfenamidas (DCP), kurie sumažina akispūdį, buvo sukurti "žiedo" metodu (6 pav.). Tačiau

jie veikia sistemiškai ir slopina organizme normaliai veikiančias CA. Todėl sukeliamas stiprus šalutinis poveikis.



6 pav. "Žiedo" metodu sukurtų junginių cheminės struktūros. SA – sulfanilamidas, AZM – acetazolamidas, DCP – dichlorfenamidas, EZA – etokzolamidas.

Sulfonamidų pagrindu sukurtiems, mažu atrankumu tam tikrai CA izoformai pasižymintiems vaistų tyrimams naudojamos įvairios technologijos:

- fluorescuojantys slopikliai (Svastová et al., 2004);
- teigiamai ar neigiamai įkrauti slopikliai. Jie negali judėti per membraną, todėl slopina tik užlastelines CA (Menchise et al., 2005);
- hipoksijos sąlygomis aktyvuojami slopikliai (De Simone et al., 2006);
- slopikliai, turintys prijungtas angliavandenių grupes. Dėl didelio hidrofiliškumo tokios molekulės negali judėti per membraną, todėl yra giminingos tik užląstelinėms CA (Winum et al., 2009);
- CA slopikliais dengtos nanodalelės (Aaron et al., 2008).

Remiantis šiais metodais, vykdoma atrankių slopiklių, kurie jungtųsi tik su ligą sukeliančiomis CA izoformomis, paieška.

1.2.2. Karboanhidrazių aktyvatoriai

CA slopinimo ir aktyvinimo procesų supratimas yra svarbus kai kurių ligų gydymui. Aktyvinimo mechanizmas yra mažiau ištirtas nei slopinimo. Žinoma, kad CA aktyvatorius jungiasi aktyvaus centro ertmėje netoli His64, kuris veikia kaip protonų šaudyklė, ir pagreitina aktyvios fermento formos susidarymą. Dėl vandenilinių ryšių persitvarkymo vyksta greitesnis H⁺ pernešimas nuo aktyviajame centre esančios vandens molekulės į buferinį tirpalą. Manoma, kad aktyvatorius veikia kaip alternatyvi protonų šaudyklė arba pagerina His64 šaudyklės efektyvumą. Remiantis elektroninės mikroskopijos, kinetikos ir Rentgeno spindulių difrakcijos kristalografijos duomenimis, parodyta, kad efektyviausi CA aktyvatoriai yra aminorūgštys (L-histidas, L-prolinas), aminai (histaminas, seratoninas, adrenalinas), oligopeptidai (Temperini et al., 2008). Tačiau norint suprasti CA aktyvinimo svarbą esant kokiai nors patologijai, reikalingi platesni *in vivo* CA aktyvatorių tyrimai.

Įdomus atradimas buvo padarytas tiriant cianobakterijas ir kai kurias chemoautotrofines bakterijų rūšis, aktyviai fiksuojančias anglį HCO_3^- pavidalu. Tai vyksta citozolyje, kuriame susintetintos CA neturi katalizinio aktyvumo. Priešingai, dar šios bakterijos turi karboksisomas, kuriose esančios CA yra aktyvios ir verčia HCO_3^- į CO_2 , reikalingą ribuliozės 1,5-bisfosfato karboksilazei. Nustatyta, kad šių CA aktyvinimo/slopinimo mechanizmas siejamas su baltyme esančiu disulfidiniu ryšiu tarp Cys194 ir Cys200. Manoma, kad karboksisomose esančios CA oksiduojamos ir apsaugomos nuo įvairių reduktorių, pavyzdžiui, tioredoksino (Peña et al., 2010). Taip oksidacijos ir redukcijos reakcijos gali veikti CA katalizinį aktyvumą.

1.3. Kuriant vaistus naudojami termodinaminiai tyrimai

Biomolekulių nekovalentinės sąveikos yra svarbios įvairiuose biologiniuose procesuose: ligando sąveikoje su receptoriumi, signalo perdavime, genų raiškos reguliavime. Šiuose procesuose dalyvaujančių baltymų aktyvumo pokyčiai gali lemti patologijos pradžią. Viena iš svarbių dalių vaistų kūrime yra sąveikos tarp vaistinio preparato ir tikslinio baltymo supratimas. Termodinaminis jos charakterizavimas yra būtinas biomolekulių sąveikos optimizavimui (Rogez-Florent et al., 2014).

1.3.1. Biomolekulių sąveikos termodinaminiai parametrai

Svarbiausias biomolekulių sąveikos termodinaminis parametras yra laisvoji Gibso energija (ΔG). Ji siejama su disociacijos konstanta (K_d) sąryšiu:

$$\Delta G = RT \ln(K_d) \tag{1}$$

Egzoterminio proceso ΔG neigiama. Jis yra energetiškai palankus ir vyksta savaime. Endoterminio proceso ΔG teigiama. Kad jis vyktų, reikalinga papildoma energija iš aplinkos, todėl toks vyksmas yra energetiškai nepalankus. Esant pusiausvyros sąlygoms, proceso $\Delta G = 0$.

 ΔG susideda iš entalpinio (ΔH) ir entropinio ($T\Delta S$) komponentų:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \tag{2}$$

 ΔH yra sunaudotas arba atpalaiduotas energijos kiekis esant pastoviam slėgiui. Jis tiesiogiai išmatuojamas kalorimetriškai pagal šilumos pokyčius biomolekulių jungimosi metu. Netiesioginiu būdu van't Hoff entalpija (ΔH_{vH}) randama pagal K_b priklausomybę nuo temperatūros:

$$\frac{\mathrm{d}\ln(K_b)}{\mathrm{d}T} = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2} \tag{3}$$

 ΔS yra sistemos netvarkos matas. Kuo S didesnė, tuo sistemos tvarka mažesnė. ΔS apskaičiuojamas, kai žinomi ΔG ir ΔH :

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \tag{4}$$

Jungiantis baltymui su ligandu, S gali pasikeisti dėl vandens molekulių, gaubusių dvi molekules, išstūmimo sąveikos metu. Neigiamą ΔS gali lemti įvarių grupių, neleidžiančių vykti konformaciniams pokyčiams, įvedimas į molekulių struktūrą.

Vienodos ΔG vertės gali slėpti skirtingą ΔH ir $T\Delta S$ indėlį į jungimosi procesą. Pavyzdžiui, įvedus tam tikras modifikacijas į cheminį junginį, susidaro daugiau ryšių su taikiniu, todėl ΔH vertė tampa neigiamesnė. Tačiau susijungiant tokiam kompleksui padidėja sistemos tvarka, kuri lemia neigiamesnį $T\Delta S$ dydį. Pagal šių parametrų sąryšį (2 lygtis), ΔG nepasikeičia, nors ir ΔG sudarantys komponentai pakinta. Tai vadinama entalpijosentropijos kompensavimu (Chodera and Mobley, 2013). Jis gali lemti kitokį jungimosi pobūdį nei yra manoma. Išskaidžius ΔG į ΔH ir $T\Delta S$ komponentus, gaunama svarbi biomolekulių sąveikos informacija, naudinga tikslingam vaistinių kandidatų kūrimui. Naudingas entropinis indėlis gaunamas į junginio struktūrą įvedant įvairias hidrofobines grupes, kurios atpalaiduoja vandens molekules formuojantis kompleksui, o palankus entalpinis indėlis kuriamas didinant tikslinių cheminių ryšių su taikiniu kiekį. Nėra skirtumo, kuriuo būdu optimizuoti junginį, tačiau neigiamesne ΔH pasižyminčius junginius lengviau optimizuoti pradiniame vaistų kūrimo etape. Todėl siekiant kuo tiksliau suprasti dviejų biomolekulių jungimosi reakciją, reikalinga atskirti kiekvieno termodinaminio parametro indėlį (Garbett and Chaires, 2012).

Sąveikos stiprumą apibūdina jungimosi konstanta (K_b) , kuriai atvirkščias dydis yra K_d :

$$K_b = 1/K_d \tag{5}$$

 K_d parodo slopiklio koncentraciją, kuriai esant pusė fermento kiekio yra suformavę kompleksą su junginiu, o likusi dalis fermento – ne. Kuo mažesnės K_d , tuo stipresnė biomolekulių sąveika.

Taigi šie termodinaminiai dydžiai apibūdina biomolekulių sąveiką. Struktūriniai ir biologiniai tyrimai kartu su termodinamine informacija yra svarbūs pradiniame vaistų kūrimo etape.

1.3.2. Biomolekulių saveikos tyrimo metodai

Vaistinių kandidatų paieškoje plačiai pritaikomi įvairūs biofizikiniai metodai: fluorescentinis terminio poslinkio metodas (FTPM), branduolių magnetinis rezonansas (BMR), paviršiaus plazmono rezonansas (PPR) ir izoterminė titravimo kalorimetrija (ITK). Dauguma jų leidžia išmatuoti pusiausvyrąją jungimosi konstantą tarp dviejų atpažinimo procesui svarbių biomolekulių: dviejų baltymų, baltymo ir mažamolekulinio cheminio junginio, baltymo ir nukleorūgšties. Tačiau pilnam molekulių sąveikos supratimui svarbu nustatyti šių biologinių procesų platesnę kinetinę ir termodinaminę informaciją. Atliekant ligando, būsimo vaisto prototipo, paiešką didelėse cheminių junginių bibliotekose reikalingi didelio našumo metodai, pavyzdžiui, FTPM. Tokių molekulių patvirtinimui dažniausiai naudojami BMR arba PPR. Pilnam biomolekulių sąveikos energetiniam supratimui taikoma ITK (Holdgate et al., 2013).

Fluorescentinis terminio poslinkio metodas

Tai greitas, efektyvus ir našus biofizikinis būdas nustatyti terminį baltymo stabilumą ir atrinkti ligandus, sąveikaujančius su tam tikru baltymu. Šis metodas paremtas tuo, kad prisijungus ligandui keičiasi baltymo terminis stabilumas – padidėja arba sumažėja baltymo lydymosi temperatūra (T_m) . Esant tokiai temperatūrai, išsivyniojusio ir natyvaus baltymo koncentracijos lygios.

Šiame metode stebima fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo temperatūros. Fluorescencijos signalą sukuria solvatochrominis dažas. Tai gali būti ANS (Matulis et al., 2005), dapoksilo sulfoninė rūgštis (Cimmperman et al., 2008) arba "Sypro Orange" (Lo et al., 2004). Kai vandeniniame tirpale baltymas yra natyvios konformacijos ir tokioje būsenoje neturi hidrofobinių kišenių, vanduo gesina solvatochrominio dažo fluorescenciją. Didėjant temperatūrai, baltymas pradeda išsivynioti. Atsiveria jo hidrofobinės sritys, prie kurių prisijungia dažas. Tokioje hidrofobinėje aplinkoje vandens molekulės nepasiekia dažo, todėl jo fluorescencijos intensyvumas padidėja. Esant tam tikrai temperatūrai, baltymas denatūruoja, atitinkamai mažėja dažo fluorescencijos intensyvumas. Pagal šį signalą nustatoma T_m . Šio parametro pokytis pridėjus ligando yra proporcingas sąveikos tarp baltymo ir ligando giminingumui (Rogez-Florent et al., 2014).

Branduolių magnetinis rezonansas

Šis metodas leidžia tirti baltymų–ligandų ir baltymų–baltymų sąveikas tirpale. Informacija gaunama iš branduolių sukinių, paveikus magnetiniu lauku. Nesusijungusios biomolekulės apibūdinamos individualiais BMR signalais (cheminiu poslinkiu, relaksacijos greičiu, transliacijos ir difuzijos koeficientais), kurių pokyčiai sąveikos metu leidžia spręsti apie biomolekulių giminingumą ($K_d = 10 \text{ mM} - 10 \mu \text{M}$).

Struktūros analizei ir duomenų apie molekulių giminingumą gavimui BMR spektrai yra informatyvūs. Tačiau dažniausiai susiduriama su problemomis: baltymo dydis turi būti nedidesnis už 40 kDa (didesnių baltymų BMR signalai silpni ir persidengia), reikia didesnės nei 0,1 mM baltymo koncentracijos, baltymas turi būti žymėtas radioaktyvia žyme, reikalingi dviejų dimensijų BMR spektrai struktūrinės informacijos gavimui (Ciulli, 2013).

Paviršiaus plazmono rezonansas

Tai optinis metodas, paremtas elektromagnetinės energijos perdavimu tarp tirpalo ir metalo sluoksnio elektronų. Viena iš molekulių imobilizuojama ant metalo, dažniausiai aukso, plokštelės. Jos paviršiuje esantys elektronai yra iš dalies laisvi. Plazmonai – tai laisvųjų elektronų sistemos sukelti savitieji svyravimai. Jie gali susiformuoti elektronui sugėrus energijos kvantą, kai į metalo paviršių tam tikru kampu krinta poliarizuotos šviesos spindulys. Esant tokioms rezonancinėms sąlygoms, atsispindėjusios šviesos intensyvumas sumažėja.

Ant plokštelės užpilamas tirpalas su ištirpusia sąveikaujančia molekule. Bet kokia molekulių sąveika metalo paviršiuje, dėl kurios įvyksta masės pokytis ir pasikeičia virš metalo esančio sluoksnio lūžio rodiklis, lemia krintančio poliarizuoto spindulio kampo, vykstant rezonansui, nuokrypius. Taip šiuo metodu matuojamas molekulių giminingumas ($K_d =$ 1 mM – 1 pM) ir kinetinės konstantos. PPR spektroskopija pritaikoma vykdant ligandų paiešką bibliotekose, kai ant plokštelės užpilama daugybė ligandų ir atrenkamos tik sąveikaujančios molekulės (Ciulli, 2013; Rogez-Florent et al., 2014).

Izoterminė titravimo kalorimetrija

Šiuo metu tai vienintelis metodas, kuris leidžia tiesiogiai išmatuoti biomolekulių jungimosi entalpiją, reikalingą sąveikos mechanizmo supratimui. Pastovios temperatūros sąlygomis ligando tirpalas, esantis švirkšte, injekuojamas pasirinkto dydžio injekcijomis ir laiko intervalais į baltymo tirpalą, esantį kiuvetėje. Dėl baltymo ir ligando sąveikos bei abiejų tirpalų skiedimosi šiluma išskiriama arba sunaudojama. Eksperimentas paremtas elektrinės galios, reikalingos pašildyti arba atšaldyti kiuvetę su baltymo tirpalu, kad jos temperatūra išliktų tokia pat kaip palyginamosios kiuvetės, pokyčių matavimu.

ITK vadinamas auksiniu standartiniu metodu, nes vieno eksperimento metu galima išmatuoti keletą biomolekulių sąveikos termodinaminių parametrų. Iš integruotų smailių, žyminčių elektrinės galios pokyčius injekcijų metu, analizės nustatomos K_d , ΔH ir besijungiančių komponentų stechiometrija (n). Žinant K_d pagal 1 lygtį apskaičiuojama ΔG , o iš 4 sąryšio – ΔS . Taigi šis biofizikinis metodas leidžia termodinamiškai charakterizuoti sąveikaujančią sistemą (Damian, 2013).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Reagentai, rinkiniai ir kitos medžiagos

Alfa Aesar: gliukozė, TFMSA;

Allied chemical: bromtimolio mėlynasis;

BioRad: glicinas, TEMED;

Ferak Berlin: Tritonas–X100;

Fluka: bisakrilamidas, Coomassie Brilliant Blue R-250, etidžio bromidas, HCl, NaOH, Na₂B₄O₇, Na₃PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄×12H₂O, PIPES;

GE Healthcare: sefarozė, p-aminometilbenzeno sulfonamidais modifikuota agarozė; *Labochema*: karbamidas;

Matheson Coleman and Bell: bromfenolio mėlynasis;

Roche: chloramfenikolis, glicerolis, peptidazių slopiklių kokteilis tabletėmis, PMSF; Roth: agar–agaras, akrilamidas, ampicilinas, APS, BHI mitybinė terpė, CaCl₂, DMSO, HEPES, LB mitybinė terpė, MgCl₂, mielių ekstraktas, NaCl, triptonas; Serva: CH₃COONa;

Sigma Aldrich: ANS, AZM, CH₃COOH, EDTA, EZA 80 % H₃PO₄, imidazolas, KCl, MZM, MES, MgSO₄, MOPS, Na₂BO₇×10, Na₂SO₄, NDS, NiCl₂, TRIS;

Thermo Fisher Scientific: agarozė, IPTG, baltymų dydžio žymuo (Protein Molecular Weight Marker), DNR dydžio žymuo (GeneRulerTM DNA Ladder Mix), dažas DNR mėginių užnešimui ant agarozės gelio (6X Orange Loading Dye), fermentai klonavimui (NdeI, XhoI, DpnI, SAP, T4 DNR ligazė ir jų buferiniai tirpalai), dNTP mišinys, Pfu DNR polimerazė ir jos buferinis tirpalas, rinkiniai: "GeneJETTM Gel Extraction Kit", "GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit", "GeneJETTM PCR Purification Kit".

E. coli kamienai:

- 1. XLI–blue (*Stratagene*): naudotas rekombinantinės DNR padauginimui.
- 2. BL21(DE3) (Novagen) ir iš jo išvesti BL21(DE3)CodonPlus–RIL (Strategene) bei Rosetta[™] 2 (DE3) (Novagen): naudoti rekombinantinių baltymų raiškai. BL21(DE3) CodonPlus–RIL ir Rosetta[™] 2(DE3) kamieno ląstelės, skirtingai nei BL21(DE3), turi chloramfenikoliui atsparias plazmides, kuriose yra papildomi tRNR genai retai E. coli ląstelėse sutinkamiems kodonams (BL21(DE3)CodonPlus–RIL: AGA, AGG, AUA, CUA; Rosetta[™] 2(DE3): AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, CGG). Todėl jie skirti sunkiau BL21(DE3) kamiene gaunamų, eukariotinių baltymų sintezės pagerinimui. Dėl ląstelės chromosomoje esančio λ profago BL21(DE3), BL21(DE3)CodonPlus–RIL ir Rosetta[™] 2(DE3) kamieno ląstelės savo chromosomoje turi IPTG indukuojamą T7 RNR polimerazės geną. Susintetinta T7 RNR polimerazė jungiasi prie raiškos vektoriaus T7 promotoriaus ir pradedama tikslinio baltymo sintezė.

Genetinė konstrukcija ir vektorius:

pUC57–CAVI — genetinė konstrukcija, turinti viso ilgio CA VI geną ir koduojanti 308 aminorūgščių baltymą, pasižymintį UniProtKB duomenų bazėje nurodytu CA VI (P23280) polimorfizmu: devyniasdešimta aminorūgštis yra Gly vietoj Ser. Gauta iš VU Biochemijos instituto, Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus.

pET15b–CAII – genetinė konstrukcija, turinti CA II geną. Ją sukūrė Dr. Jurgita Matulienė.

pET15b — vektorius (*Novagen*), turintis atsparumo ampicilinui geną (AmpR), replikatorių ColE1 su plazmidės replikacijos pradžios tašku ori, T7 bakteriofago promotorių.

Pradmenys:

DNR sekos pateikiamos 5' \rightarrow 3' kryptimi.

T1 (CCAG<u>CAT**ATG**</u>TCTGACTGGACCTAC) – tiesioginis pradmuo CA VI geno, koduojančio baltymą nuo 21 iki 290 aminorūgšties, padauginimui. Pabraukta NdeI kirpimo vieta ir joje paryškintas transkripcijos pradžios kodonas ATG.

A1 (CTTATG<u>CTCGAG</u>**TTA**CTGGAATTCAGAGCC) – atvirkštinis pradmuo CA VI geno, koduojančio baltymą nuo 21 iki 290 aminorūgšties, padauginimui. Pabraukta XhoI kirpimo vieta ir paryškintas transkripcijos pabaigos kodonui TAA atvirkštinis komplementarus kodonas TTA.

3 lentelė. Mutagenezėje naudotų pradmenų sekos. Paryškinti nukleotidai, kurie CA II gene pakeičia atitinkamus nukleotidus, kad būtų įvestos tikslinės aminorūgščių mutacijos.

Mutacija	Pradmenų sekos	ILGIS
A65T	T2:CTCAACAATGGTCAT A CTTTCAACGTGGAG	30 nt
	A2:CTCCACGTTGAAAG T ATGACCATTGTTGAG	
m N67Q	T3:CAATGGTCATACTTTC C A G GTGGAGTTTGATGAC	34 nt
	A3:GTCATCAAACTCCACCTGGAAAGTATGACCATTG	
F130Y	T4:CCAAATATGGGGATTATGGGAAAGCTGTGCAG	32 nt
	A4:CTGCACAGCTTTCCCATAATCCCCATATTTGG	
V134Q	T5:GATTATGGGAAAGCT CA GCAGCAACCTGATGG	32 nt
	A5:CCATCAGGTTGCTGC TG AGCTTTCCCATAATC	
L203T	T6:GACCACCCCTCCTCTT AC GGAATGTGTGACCTG	33 nt
	A6:CAGGTCACACATTCC GT AAGAGGAGGGGGTGGTC	

T7–Prom (TAATACGACTCACTATAGGG) – tiesioginis pradmuo DNR sekoms nustatyti sekoskaitos metu.

T7–Term (GGGGTTATGCTAGTTATTGC) – atvirkštinis pradmuo DNR sekoms nustatyti sekoskaitos metu.

2.2. Terpės ir tirpalai

Terpės:

BHI mitybinė terpė: 37 g terpės ištirpinami 1 L dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje

LB mitybinė terpė: 25 g terpės ištirpinami 1 L dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje.

LB mitybinė terpė (agarizuota): 25 g terpės ištirpinami 1 L dejonizuoto vandens. Pridedama 15 g agar–agaro. Autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje.

S. O. C. mitybinė terpė: 2 g triptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 10 mM NaCl ir 3,5 mM KCl ištirpinami 100 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje. Atvėsinus pridedama 10 mM MgCl₂ ir 20 mM gliukozės. Terpė filtruojama, išpilstoma po 1 mL ir laikoma -20°C temperatūroje.

Tirpalai:

Akrilamido/bisakrilamido tirpalas (30 %): 29,2 g akrilamido ir 0,8 g bisakrilamido ištirpinami 70 mL dejonizuoto vandens ir filtruojama per stiklinį filtrą. Laikoma tamsiame inde 4 °C temperatūroje.

Baltymų elektroforezės dažas (6×): 0,6 % bromfenolio mėlynojo, 600 mM DTT, 60 % glicerolio, 12 % NDS, 300 mM TRIS, pH 6,8. Laikoma -20 °C temperatūroje.

Biomasės ardymo buferinis tirpalas: 25 mM TRIS, 200 mM Na_2SO_4 , 0,5 % tritono–X100, pH 5,6. 100 mL tokio tirpalo ištirpinama 1 tabletė peptidazių slopiklių kokteilio. Laikoma 4 °C temperatūroje.

Glicino–NDS–TRIS baltymų elektroforezės buferinis tirpalas (10×): 1,9 M glicino, 35 mM NDS, 25 mM TRIS, pH 8,3–8,6. Laikoma 4 °C temperatūroje.

Gryninimo buferinis tirpalas A: 25 mM MES, 200 mM Na₂SO₄, pH 5,6. Laikoma 4 °C temperatūroje.

Gryninimo buferinis tirpalas B: 25 mM MES, 200 mM Na_2SO_4 , 0,7 M imidazolo, pH 5,6. Laikoma 4 °C temperatūroje.

Gryninimo buferinis tirpalas C: 20 mM HEPES, 50 mM $\rm Na_2SO_4,$ pH 7,6. Laikoma 4 °C temperatūroje.

Gryninimo buferinis tirpalas D: 100 mM CH₃COONa, 500 mM NaClO₄, pH 5,6. Laikoma 4 °C temperatūroje.

Gryninimo buferinis tirpalas E: 25 mM MES, 50 mM Na₂SO₄, pH 5,6. Laikoma 4 °C temperatūroje.

Gryninimo buferinis tirpalas F: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4. Laikoma 4 °C temperatūroje.

Gryninimo buferinis tirpalas G: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 200 mM imidazolo, pH 7,4. Laikoma 4 °C temperatūroje. Kompetentinių ląstelių transformacijos buferis: 15 mM $CaCl_2 \times 2H_2O$, 250 mM KCl, 55 mM $MnCl_2 \times 4H_2O$, 10 mM PIPES. Tirpalas be PIPES filtruojamas ir laikomas -20°C temperatūroje. PIPES į bendrą kompetentinių ląstelių ruošimo tirpalą dedamas prieš pat naudojimą.

Poliakrilamido gelių dažas: 0,62 g Coomassie Brilliant Blue R-250 ištirpinama 113 mL 96,3 % etonolio, pridedama 23 mL acto rūgšties. Skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 250 mL. Laikoma kambario temperatūroje.

TAE DNR elektroforezės buferinis tirpalas ($50 \times$): 50 mM EDTA, 2 M TRIS, 57,1 mL acto rūgšties. Skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1 L. Laikoma kambario temperatūroje.

2.3. Metodai

2.3.1. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI geno klonavimas, raiška, baltymo tirpumo patikrinimas ir gryninimas

2.3.1.1. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI klonavimas

Kompiuterinės programos. Rekombinantinio CA VI geno klonavimas planuotas naudojantis A plasmid Editor v1.17 (ApE) ir pDRAW32 1.0 programomis. ApE programa leidžia "teoriškai" atlikti klonavimą: suranda vektoriaus multikloninėje srityje restrikcijos endonukleazių kirpimo vietas, jomis "sukarpo" vektorių bei planuojamą klonuoti polimerazės grandininės reakcijos (PGR) produktą, jį įstato į sukirptą vektoriaus dalį, leidžia pamatyti pilną DNR seką. pDRAW32 1.0 programa parodo visus sukurtos plazmidės su tiksliniu genu koduojamus atviro skaitymo rėmelius. Taip galima patikrinti, ar naudojant sukurtą plazmidę vyks tikslinio baltymo sintezė. Toks pasitikrinimas leidžia įsitikinti, ar klonavimas suplanuotas teisingai.

PGR. Reakcijai naudojama natyvi Pfu DNR polimerazė, išskirta iš *Pyrococcus furiosus. Pfu* DNR polimerazė pasižymi 5' \rightarrow 3' polimeraziniu bei 3' \rightarrow 5' egzonukleaziniu aktyvumais. Ruošiamas 50 µL mišinys:

- 1,25 fermento aktyvumo vienetų *Pfu* DNR polimerazės;
- 0,5 ng pUC57–CAVI plazmidės;
- po 0,5 μM tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų;
- 0,2 mM dNTP mišinio tirpalo;
- $1 \times Pfu$ buferinio tirpalo su MgSO₄;
- dejonizuoto vandens.

PGR atliekama termocikleryje pagal šią programą:

- 1. Pradinė DNR denatūracija 5 min 95 °C temperatūroje.
- 2. DNR denatūracija 30 s 95 °C temperatūroje.
- 3. Pradmenų prilydymas prie DNR 30 s 62 °C temperatūroje.

- 4. DNR sintezė 1 min 72 °C temperatūroje. 2–4 stadijos kartojamos 25 kartus.
- 5. Galutinis išsikišusių DNR galų užpildymas 5 min 72 °C temperatūroje.

Reakcijos produktai patikrinami 1,5 % agarozės gelyje.

DNR elektroforezė 1,5 % agarozės gelyje. 1× TAE DNR elektroforezės buferiniame tirpale paruošiamas 1,5 % agarozės gelis, turintis 0,5 µg/mL etidžio bromido. Elektroforezė vykdoma esant 8 V/cm^2 įtampai naudojant 1× TAE DNR elektroforezės buferinį tirpalą, turintį 0,25 µg/mL etidžio bromido. Po elektroforezės gelis analizuojamas ultravioletinėje šviesoje.

PGR produkto gryninimas iš PGR mišinio. PGR produktas iš PGR mišinio gryninamas naudojant "*GeneJETTM PCR Purification Kit*" rinkinį. Dirbama pagal gamintojo pateiktą protokolą. Išskirtos DNR koncentracija matuojama "*NanoDrop*" spektrofotometru ($\lambda = 260$ nm).

PGR produkto ir pET15b vektoriaus restrikcija. PGR produkto restrikcijos mišinys:

- po 10 fermento aktyvumo vienetų NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazių;
- 550 ng išgryninto PGR produkto;
- 2× Tango buferio;
- dejonizuoto vandens.

pET15b vektoriaus restrikcijos mišinys:

- po 10 fermento aktyvumo vienetų NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazių;
- 200 ng pET15b vektoriaus;
- 2× Tango buferio;
- dejonizuoto vandens.

Restrikcija vykdoma laikant šiuos mišinius 2 val. 37 °C temperatūroje. Po to mėginiai kaitinami 20 min 80 °C temperatūroje, kad fermentai prarastų aktyvumą.

Linearizuoto pET15b vektoriaus defosforilinimas. Pasibaigus restikcijos laikui, vektoriaus 5' galo fosfatai pašalinami į restrikcijos mišinį pridėjus SAP (1 fermento aktyvumo vienetą) bei $1 \times$ fermento buferinio tirpalo. Reakcija vykdoma 37 °C temperatūroje 30 min. Po to mišinys kaitinamas 20 min 65 °C, kad fermentas prarastų aktyvumą. Toliau restrikcijos linearizuotas vektorius ir sukarpytas PGR produktas frakcionuojami 1,5 % agarozės gelyje anksčiau aprašytu būdu.

DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio. Sukarpytas PGR produktas bei linearizuota plazmidė ultravioletinėje šviesoje išpjaunami iš agarozės gelio ir gryninami naudojant "*GeneJETTM Gel Extraction Kit*" rinkinį pagal gamintojo pateiktą protokolą. Išgrynintų produktų koncentracija matuojama "*NanoDrop*" spektrofotometru ($\lambda = 260$ nm).

Ligavimas. PGR produkto kiekis, reikalingas ligavimui, apskaičiuojamas pagal formulę:

PGR produkto santykis su vektoriumi × Vektoriaus kiekis (ng)×
$$\times \frac{\text{PGR produkto dydis (kb)}}{\text{Vektoriaus dydis (kb)}} = \text{PGR produkto kiekis (ng)}$$
(6)

PGR produkto ir vektoriaus santykis pasirenkamas empiriškai, dažniausiai naudojamas santykis 3:1. Vektoriaus kiekis ligavimo mišinyje gali svyruoti nuo 10–50 ng. Jis taip pat pasirenkamas empiriškai, dažniausiai – 25 ng.

PGR produkto kiekio ligavimo mišinyje apskaičiavimas:

$$3 \times \frac{0.815 \text{ kb}}{5,700 \text{ kb}} \times 25 \text{ ng} = 10,7 \text{ ng}$$

Ruošiamas 20 µL reakcijos mišinys:

- 10,7 ng PGR produkto;
- 25 ng pET15b vektoriaus;
- 1× ligavimo reakcijos buferinio tirpalo;
- 5 fermento aktyvumo vienetai T4 DNR ligazės;
- dejonizuoto vandens.

Reakcija vykdoma 5 min 22 °C temperatūroje. Ligavimo mišinys naudojamas E.~coli kompetentinių ląstelių transformacijai.

Kompetentinių E. coli ląstelių paruošimas

- 1. *E. coli* ląstelės steriliai užsėjamos Petri lėkštelėje ant kietos agarizuotos LB mitybinės terpės su atrankiu kiekvienam kamienui antibiotiku ir auginamos per naktį (16 val.) 37 °C temperatūroje, kol susiformuoja pavienės kolonijos.
- 2. Perkeliama viena *E. coli* bakterijų kolonija (2–3 mm skersmens) iš Petri lėkštelės į 10 mL LB mitybinę terpę su su atrankiu kiekvienam kamienui antibiotiku ir auginama termostatuojamoje purtyklėje per naktį (16 val.) 37 °C temperatūroje esant 250 purt./min.
- 3. Į 1 L kolbą su 250 mL LB mitybinės terpės ir atrankiu kiekvienam kamienui antibiotiku perkeliama 2,5 mL pradinės kultūros. Auginama termostatuojamoje purtyklėje

37 °C temperatūroje esant 250 purt./min tol, kol ląstelių suspensijos optinis tankis ($\lambda = 600$ nm) pasiekia apie 0,6.

- 4. Kolba perkeliama į ledo vonią ir laikoma 10 min.
- 5. Užaugusios ląstelės centrifuguojamos 10 min esant 1500 g
 4 °C temperatūroje.
- Terpė nupilama, apverstos kolbos statomos ant popierinio rankšluosčio ir laikoma 2 min, kad nubėgtų terpės likučiai.
- 7. Atsargiai suspenduojamos ląstelės 80 mL šalto transformacijos buferio.
- 8. Pakartojami 5 ir 6 etapai.
- 9. Atsargiai suspenduojamos ląstelės 20 mL šalto transformacijos buferio.
- 10. Pridedama 1,5 mL DMSO. Pamaišoma ir laikoma 10 min leduose.
- 11. Kompetentinės ląstelės išpilstomos po 100 μL į atšaldytus ependorfinius mėgintuvėlius ir užšaldomos skystame azote. Laikomos -80 °C temperatūroje.

Kompetentinių E. coli ląstelių transformacija

- Paruoštos Petri lėkštelės su agarizuota LB mitybine terpe ir reikiamu antibiotiku 1 val. pašildomos 37 °C temperatūroje. Transformuojant XLI–blue ir BL21(DE3) kamienus, naudojamos lėkštelės su ampicilinu (100 μg/mL), o BL21(DE3) Codon-Plus–RIL ir RosettaTM 2 (DE3) – su ampicilinu (100 μg/mL) ir chloramfenikoliu (34 μg/mL).
- 2. Kai atliekama ląstelių transformacija ligavimo mišiniu, į 50 µL kompetentinių XLI– blue kamieno ląstelių įdedama 5 µL ligavimo mišinio. Kai transformuojami baltymų raiškos kamienai BL21(DE3), BL21(DE3)CodonPlus–RIL ir Rosetta[™] 2(DE3) ar atliekamas pakartotinis konstrukto padauginimas XLI–blue kamiene, į 50 µL kompetentinių ląstelių įpilama 1 µL plazmidės.
- 3. Transformacijos mišinys laikomas 30 min ledo vonioje.
- 4. Vykdomas temperatūrinis šokas 90 s 42 °C temperatūroje, po to mišinys greitai perkeliamas į ledo vonią ir ten laikomas 2 min.
- 5. Į reakcijos mišinį pridedama 400 μ L skystos S. O. C. terpės ir ląstelės auginamos 45 min 37 °C temperatūroje termostatuojamoje purtyklėje esant 250 purt./min.
- 6. Mėginiai centrifuguojami 2 min esant 3300 g kambario temperatūroje. Terpė nupilama, ląstelės suspenduojamos likusiuose 100 μL terpės. Paimama 50 μL mišinio ir steriliai užsėjama ant pašildytos Petri lėkštelės. Lėkštelė laikoma termostate 37 °C temperatūroje per naktį (16 val.).

Plazmidinės DNR gryninimas. Plazmidinės DNR išskyrimui iš *E. coli* XLI–blue kamieno bakterijų biomasės naudojamas "*GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit*" rinkinys. DNR skiriama pagal gamintojo pateiktą protokolą. DNR koncentracija matuojama "*NanoDrop*" spektrofotometru ($\lambda = 260$ nm).

Klonų atranka. Kad įsitikintume, jog į vektorių teisingai įsistatė reikiamo dydžio fragmentas, konstruktas karpomas su NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis ir restrikcijos produktai analizuojami 1,5 % agarozės gelyje anksčiau aprašytais būdais. Teisingai sukarpytos plazmidinės DNR seka nustatoma VU Biotechnologijos instituto DNR seko-skaitos centre.

2.3.1.2. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI geno raiška

- Rekombinantinio CA VI geno raiška vykdyta BL21(DE3)CodonPlus–RIL ir Rosetta[™] 2(DE3) kamienuose. Iš pradžių į 100 mL BHI arba LB mitybinės terpės su 100 µg/mL ampicilino ir 34 µg/mL chloramfenikolio užsėjama viena kolonija nuo Petri lėkštelės ir auginama per naktį (16 val.) termostatuojamoje purtyklėje 37 °C temperatūroje esant 250 purt./min.
- 2. Per naktį auginta bakterijų kultūra persėjama į didesnį terpės tūrį santykiu 1:50 ir, priklausomai nuo naudojamo kamieno, į ją pridedama atitinkamo antibiotiko.
- 3. Auginama termostatuojamoje purtyklėje 37 °C temperatūroje esant 250 purt./min, kol ląstelių tirpalo optinis tankis ($\lambda = 600$ nm) pasiekia apie 0,6.
- 4. Baltymų raiškos prieš tikslinio baltymo raišką patikrinimui, paimamas 300 µL mėginys iš ląstelių kultūros. Jis paruošiamas analizei poliakrilamido gelyje: centrifuguojamas 2 min esant 3300 g kambario temperatūroje, terpė nupilama, nuosėdos suspenduojamos 30 µL 1× baltymų elektroforezės dažo ir mišinys pakaitinamas 5 min 95 °C temperatūroje.
- 5. Tikslinio baltymo sintezė indukuojama pridedant 1 mM IPTG ir 0,3 mM ZnSO₄. Toliau auginama per naktį (16 val.) 20 °C termostatuojamoje purtyklėje esant 250 purt./min.
- 6. Pasibaigus ląstelių auginimo laikui, paruošiamas ląstelių lizatas po tikslinio baltymo raiškos indukcijos. Norint paimti vienodą ląstelių kiekį prieš ir po indukcijos, pamatuojamas terpės optinis tankis pasibaigus ląstelių auginimo laikui ir padalinamas iš terpės optinio tankio, buvusio prieš tikslinio baltymo indukciją. Gautas santykis parodo, kiek kartų mažiau reikia paimti ląstelių suspensijos mėginio po baltymo indukcijos paruošimui. Mėginys paruošiamas analizei poliakrilamido gelyje 4 žingsnyje aprašytu būdu.
- 7. Užauginta bakterijų kultūra centrifuguojama 20 min esant 3300 g $4~^\circ\rm C$ temperatūroje. Terpė nupilama. Biomasė laikoma -20 $^\circ\rm C$ temperatūroje.
- 8. Paruošti ląstelių lizatų mėginiai analizuojami poliakrilamido gelyje vykdant klasikinę NDS elektroforezę (Sambrook et al., 1989). Toliau geliai dažomi 20 min poliakrilamido gelių dažu 25 °C temperatūroje esant 70 purt./min, o po to jie virinami distiliuotame vandenyje, kol išblunka, ~10 min.

2.3.1.3. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI tirpumo patikrinimas

- 1. 1 g bakterijų biomasės tirpinamas 6 mL biomasės ardymo buferiniame tirpale A.
- 2. Įpilama PMSF, kad galutinė koncentracija būtų 1 mM, ir maišoma 1 val. $4~^{\circ}\mathrm{C}$ temperatūroje.
- 3. Ląstelės ardomos ultragars
u10min kas60s darant60s pertraukas
esant70~%vibracijos amplitudei.
- 4. Lizatas centrifuguojamas 20 min esant 48254 g
 4 °C temperatūroje.
- Tirpių baltymų, esančių supernatante, koncentracija matuojama Bradfordo metodu. Nuosėdose esantys baltymai ištirpinami 8 M karbamido tirpale ir jų koncentracija taip pat matuojama Bradfordo metodu (Bradford, 1976).
- 6. Ruošiami tirpios ir netirpios baltymų frakcijų mėginiai: į 30 µL baltymo tirpalo pilama 6 µL $6 \times$ baltymų elektroforezės dažo. Mišiniai kaitinami 5 min 95 °C temperatūroje.
- 7. Mėginiai analizuojami poliakrilamido gelyje vykdant klasikinę NDS elektroforezę (Sambrook et al., 1989). Toliau geliai dažomi 20 min poliakrilamido gelių dažu 25 °C temperatūroje esant 70 purt./min, o po to jie virinami distiliuotame vandenyje, kol išblunka, ~10 min.

2.3.1.4. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI gryninimas

20–25 g bakterijų biomasės suspenduojami 100 mL biomasės ardymo buferinio tirpalo. Įpilama PMSF, kad galutinė koncentracija būtų 1 mM, ir maišoma 1 val. 4 °C temperatūroje. Biomasė ardoma ultragarsu ledo vonelėje 13 min kas 60 s darant 60 s pertraukas esant 70 % vibracijos amplitudei. Centrifuguojama 20 min esant 48254 g 4 °C temperatūroje. Vykdoma metalų chelatinė chromatografija. Baltymų tirpalas leidžiamas per kolonėlę (XK16, *GE Healthcare*), užpildytą 20 mL sefarozės su imobilizuotais Ni²⁺ jonais. Jos pusiausvyrinimui naudojamas gryninimo buferinis tirpalas A. Tekėjimo greitis – 80 mL/val. Baltymas desorbuojamas didinant imidazolo koncentraciją nuo 0 mM iki 700 mM (naudojant gryninimo buferinį tirpalą B). Frakcijose esančių baltymų koncentracija matuojama Bradfordo metodu (Bradford, 1976). Toliau baltymai analizuojami poliakrilamido gelyje vykdant klasikinę NDS elektroforezę (Sambrook et al., 1989). Sujungiamos tikslinį baltymą turinčios frakcijos. Baltymo tirpalas dializuojamas per naktį (16 val.) gryninimo buferiniame tirpale C.

Norint gauti tik teisingai susivyniojusias CA, baltymo tirpalas leidžiamas per kolonėlę (XK1, *GE Healthcare*), kuri yra užpildyta 3 mL p-aminometilbenzeno sulfonamidais modifikuota agaroze, vadinama afininiu sorbentu. Gryninimas paremtas CA sąveika su ant sorbento kovalentiškai prijungtais CA slopikliais (sulfonamidais). Kolonėlės pusiausvyrinimui naudojamas gryninimo buferinis tirpalas C. Tekėjimo greitis – 45 mL/val. Baltymas desorbuojamas gryninimo buferiniu tirpalu D. Frakcijose esančių baltymų koncentracija matuojama Bradfordo metodu (Bradford, 1976). Toliau baltymai analizuojami poliakrilamido gelyje vykdant klasikinę NDS elektroforezę (Sambrook et al., 1989). Sujungiamos tikslinį baltymą turinčios frakcijos. Baltymo tirpalas dializuojamas per naktį (16 val.) gryninimo buferiniame tirpale E.

2.3.2. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės II mutagenezė, geno raiška ir baltymo gryninimas

2.3.2.1. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės II mutagenezė

Kompiuterinės programos. Panaudojant kompiuterinio modeliavimo programą Accelrys Discovery Studio Visualizer Vers. 3.1, CA VI sekoje nustatytos aminorūgštys, turinčios įtakos baltymo jungimuisi su ligandu (atliko dr. Visvaldas Kairys). Taikant kryptingą mutagenezę (angl. site-directed mutagenesis) sukurtas CA II mutantas, kurio aktyviajame centre penkios aminorūgštys pakeistos į CA VI jungimosi su ligandu svarbias aminorūgštis: A65, N67, F130, V134, L203 atitinkamai į T, Q, Y, Q, T. Numeruojama pagal UniprotKB duomenų bazėje pateiktą CA II (P00918) aminorūgščių seką.

PGR. Kiekvienos mutacijos įvedimui vykdoma atskira PGR su dviem pradmenimis – tiesioginiu ir atvirkštiniu, turinčiais tikslines mutacijas. Jų sekos pateiktos 3 lentelėje. Ruošiamas 50 µL mišinys:

- 1,5 fermento aktyvumo vienetų natyvios *Pfu* DNR polimerazės;
- 50 ng pET15b–CAII plazmidės;
- po 125 ng tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų;
- 0,2 mM dNTP mišinio tirpalo;
- $1 \times Pfu$ buferinio tirpalo su MgSO₄;
- dejonizuoto vandens.

PGR atlikama termocikleryje pagal šią programą:

- 1. Pradinė DNR denatūracija 10 min 95 °C temperatūroje.
- 2. DNR denatūracija 3 min 95 °C temperatūroje.
- 3. Pradmenų prilydymas prie DNR 2 min. Temperatūra parenkama pagal pradmenį: 66 °C (A65T ir F130Y), 63 °C (N67Q), 71 °C (V134Q), 72 °C (L203T).
- 4. DNR sintezė 8 min 72 °C temperatūroje. 2–4 stadijos kartojamos 18 kartų.
- 5. Galutinis išsikišusių DNR galų užpildymas 10 min 72 °C temperatūroje.

Reakcijos produktai patikrinami 1,5 % agarozės gelyje anksčiau aprašytu būdu.
PGR produkto restrikcija. Po PGR gaunamas žiedinių plazmidžių mišinys, kuriame dalis plazmidžių sudarytos iš vienos motininės ir kitos naujai susintetintos mutuotos DNR grandinės bei dalis iš abiejų naujai susintetintų mutuotų DNR grandinių. Į reakcijos mišinį dedamas 1 fermento aktyvumo vienetas restrikcijos endonukleazės DpnI. Laikoma 1 val. 37 °C. Taip sukarpoma metilinta matricinė DNR.

Mutuota plazmide anksčiau aprašytu būdu transformuojamos *E. coli* XLI–blue kamieno (dam+) ląstelės. Plazmidė išgryninama naudojant "*GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit*" rinkinį. Ji toliau naudojama kaip matricinė DNR vykdant PGR kitos mutacijos įvedimui. Sekvenuojant plazmidinę DNR VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre, patvirtinami nukleotidų pokyčiai.

2.3.2.2. Mutuoto karboanhidrazės II geno raiška

Rekombinantinio CA II geno su tikslinėmis mutacijomis raiška vykdoma *E. coli* BL21 (DE3) kamiene pagal 2.3.1.2 skyriuje nurodyta metodiką. Skirtingai nuo ten nurodytų sąlygų, LB terpėje auginamose ląstelėse tikslinio baltymo sintezė indukuojama pridedant 0.2 mM IPTG ir 0.5 mM ZnSO₄.

2.3.2.3. Karboanhidrazės II mutanto gryninimas

10 g bakterijų biomasės suspenduojami 50 mL gryninimo buferiniame tirpale F. Toliau dirbama pagal 2.3.1.4. skyriuje nurodytą metodiką. Vykdoma metalų chelatinė ir afininė chromatografijos, tačiau naudojami kai kurie skirtingi buferiniai tirpalai. Kolonėlė, užpildyta 20 mL sefarozės su imobilizuotais Ni²⁺ jonais, pusiausvyrinama gryninimo buferiniu tirpalu F, o baltymas desorbuojamas didinant imidazolo koncentraciją nuo 0 mM iki 200 mM (naudojant gryninimo buferinį tirpalą G). Baltymo tirpalas dializuojamas per naktį (16 val.) gryninimo buferiniame tirpale F, kuris taip pat naudojamas kolonėlės, užpildytos 3 mL afininio sorbento, pusiausvyrinimui. Baltymas desorbuojamas gryninimo buferiniu tirpalu D ir dializuojamas per naktį (16 val.) gryninimo buferiniame tirpale F.

2.3.3. Žmogaus karboanhidrazės VI gryninimas iš seilių

Tyrime dalyvavo 25 žmonės. Seilės rinktos į 50 mL tūrio mėgintuvėlius, esančius ledo vonelėse. Žmogaus CA VI iš seilių gryninta pagal Parkkilos ir jo kolegų metodiką (Parkkila et al., 1990).

2.3.4. Fluorescentinis terminio poslinkio metodas

Tai biofizikinis būdas patikrinti, ar ligandas, būsimo vaisto prototipas, sąveikauja su tam tikru baltymu, siejamu su tam tikra liga, bei nustatyti terminį baltymo stabilumą.

Šiuo metodu analizuojamas nuo temperatūros priklausomas baltymo išsivyniojimas. Didėjant temperatūrai, baltymas denatūruoja. Jei ligandas stipriau jungiasi prie išsivyniojusio baltymo, tai baltymas destabilizuojamas. Priešingu atveju, jei ligandas jungiasi prie natyvaus baltymo, tai baltymas stabilizuojamas. Šiame metode temperatūros lemiama pusiausvyra tarp natyvios ir denatūravusios baltymo struktūrų stebima pridėjus solvatochrominio dažo – ANS, kurio fluorescencija padidėja hidrofobinėje aplinkoje. Vienas iš tokios aplinkos pavyzdžių yra atsiveriančios hidrofobinės baltymo sritys denatūruojant baltymui. ANS fluorescencijos intensyvumo pokyčiai aprašomi lygtimi:

$$y(T) = y_F + \frac{y_U - y_F}{1 + e^{\Delta_U G/RT}} = y_U + \frac{y_F - y_U}{1 + e^{-\Delta_U G/RT}},$$
(7)

kur y_F – natyvaus, y_U – išsivyniojusio baltymo–ANS komplekso fluorescencijos intensyvumas. Natyvaus ir išsivyniojusio baltymo–ANS komplekso fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo temperatūros aprašomos lygtimis:

$$y_N(T) = y_{F,T_m} + m_F(T - T_m),$$
(8)

$$y_U(T) = y_{U,T_m} + m_U(T - T_m), (9)$$

kur y_{F,T_m} ir y_{U,T_m} – natyvaus ir išsivyniojusio baltymo fluorescencijos intensyvumai esant T_m , m_N ir m_U – natyvaus ir išsivyniojusio baltymo fluorescencijų tiesių (bazinių linijų) nuokrypio kampai.

Baltymo išsivyniojimo laisvoji Gibso energija $(\Delta_U G_{(T)})$ priklauso nuo temperatūros. Ji išreiškiama per baltymo išsivyniojimo entalpiją $(\Delta_U H_{T_r})$ ir entropiją $(\Delta_U S_{T_r})$, kurios priklauso nuo temperatūros, bei šiluminę talpą $(\Delta_U C_p)$, kuri nepriklauso nuo temperatūros (Cimmperman et al., 2008).

$$\Delta_U G_{(T)} = \Delta_U H_{(T)} - T \Delta_U S_{(T)} = \Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T \left(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln \left(\frac{T}{T_r} \right) \right)$$
(10)

Įstačius 8, 9 ir 10 sąryšius į 7 lygtį, ANS fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo temperatūros išreiškiama:

$$y(T) = y_{F,T_m} + m_F(T - T_m) + \frac{y_{U,T_m} - y_{F,T_m} + (m_U - m_F)(T - T_m)}{1 + e^{(\Delta_U H_{T_m} + \Delta_U C_p(T - T_m) - T(\Delta_U S_{T_m} + \Delta_U C_p \ln(T/T_m)))/RT}}$$
(11)

Eksperimentiškai gautos ANS fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo temperatūros kreivės mažiausių kvadratų metodu derinamos pagal 11 lygtį keičiant šešis parametrus: $y_{F,T_m}, m_F, y_{U,T_m}, m_U, \Delta_U H_{T_r}$ ir T_m . Baltymo lydymosi temperatūros (T_m) nustatymo paklaida yra $\pm 0,2$ °C (Cimmperman and Matulis, 2011).

Sąveikos tarp baltymo ir ligando stiprumo įvertinimui reikalingi skirtingos ligando ir vienodos baltymo koncentracijos mėginiai. Trečdalio iš jų ligando koncentracija mažesnė

 \times

nei baltymo, likusiųjų – didesnė. Daroma prielaida, kad ligandas nesijungia arba jungiasi žymiai silpniau su išsivyniojusiu baltymu nei su natyviu baltymu. Tuomet bendra ligando koncentracija (L_t) , reikalinga pakelti baltymo lydymosi temperatūrą nuo T_r (kai tirpale nėra ligando) iki T_m (kai tirpale yra ligando) išreiškiama:

$$L_{t} = \left(1 - e^{\frac{\Delta_{U}H_{T_{r}}\Delta_{U}C_{p}(T-T_{r})-T\left(\Delta_{U}S_{T_{r}}+\Delta_{U}C_{p}\left(\ln\left(\frac{T}{T_{r}}\right)\right)\right)}{RT}}\right) \times \left(\frac{P_{t}}{2} + \frac{1}{e^{\frac{\Delta_{U}H_{T_{r}}\Delta_{U}C_{p}(T-T_{r})-T\left(\Delta_{U}S_{T_{r}}+\Delta_{U}C_{p}\left(\ln\left(\frac{T}{T_{r}}\right)\right)\right)}{RT}}e^{-\frac{\Delta_{b}H_{T_{0}}\Delta_{b}C_{p}(T-T_{0})-T\left(\Delta_{b}S_{T_{0}}+\Delta_{b}C_{p}\left(\ln\left(\frac{T}{T_{0}}\right)\right)\right)}{RT}}\right)}\right)$$

$$(12)$$

Čia L_t – bendra ligando koncentracija, P_t – bendra baltymo koncentracija, T_r – baltymo lydymosi temperatūra, kai ligando nėra, T_0 – palyginamoji temperatūra (šiame tyrime 25 °C arba 37 °C), T – absoliuti temperatūra (K), R – universalioji dujų konstanta, $\Delta_b H$, $\Delta_b S$, $\Delta_b C_p$ – atitinkamai baltymo jungimosi entalpija, entropija ir šiluminė talpa. Matulis ir jo kolegos aprašė šios lygties išvedimą (Matulis et al., 2005). Taip derinant eksperimentinius duomenis, rodančius L_t ir T_m priklausomybę, bei modelį, aprašomą 12 lygtimi, nustatoma ligando jungimosi konstanta (K_b).

Eksperimento sąlygos. Ruošiami vienodos baltymo ir skirtingos ligando koncentracijos mėginiai. Skiedžiant 50 mM Pi, 100 mM NaCl, pH 7,0 buferiniu tirpalu arba baltymo–ligando tyrimui plačiame pH intervale (pH 5–10) universaliu buferiniu tirpalu (50 mM Na₂BO₇×10, 100 mM CH₃COONa, 100 mM Na₂SO₄, 100 mM Pi), ruošiamas pradinis 20 µM baltymo tirpalas, turintis 100 µM ANS. Ligandas tirpinamas DMSO (10 mM). Jį skiedžiant vandeniu, ruošiami 0–200 µM ligandų tirpalai, turintys 4 % DMSO. Į mėginius išpilstoma po 10 µL pradinio 20 µM baltymo tirpalo ir po 10 µL atitinkamų koncentracijų ligando tirpalo. Gauti 10 µM baltymo tirpalai, turintys dvigubai mažesnę už pradinę ligando koncentraciją. Matavimai atliekami realaus laiko PGR termocikleryje "*Rotor-Gene 6000 (QIAGEN Rotor-Gene Q) spectrofluorimeter*" keliant temperatūrą 1 °C per minutę greičiu nuo 25 °C iki 99 °C. ANS sužadinimui naudojama 365 ± 20 nm šviesa, o fluorescencijos emisija registruojama esant 460 ± 15 nm bangos ilgiui. Matavimai pakartojami po 3 kartus. Gauti rezultatai apdorojami *ThermoFluor++ 1.4.2* ir *Microsoft Office Excel 2010* programomis.

2.3.5. Izoterminė titravimo kalorimetrija

Tai biofizikinis metodas, leidžiantis termodinamiškai charakterizuoti sąveikaujančią sistemą. Lyginant su kitais metodais, ITK turi daug privalumų: nereikalinga biomolekulių imobilizacija ar žymėjimas, sąveikos reakcija vyksta tirpale (Damian, 2013). Eksperimentas atliekamas specialiuose prietaisuose, kurie yra vadinami kalorimetrais. Juos sudaro dvi kiuvetės ir švirkštas. Palyginamoji kiuvetė užpildoma vandeniu, o darbinė – baltymo tirpalu. Jose palaikoma pastovi temperatūra ($\Delta T < 10^{-6}$ °C). Ligando tirpalu užpildomas švirkštas, iš kurio jis yra titruojamas į baltymo tirpalą. Dėl biomolekulių sąveikos metu vykstančių šiluminių pokyčių pakinta darbinės kiuvetės temperatūra. Kiekvienos injekcijos metu matuojama elektros srovės galia, reikalinga temperatūros pasikeitimo tarp palyginamosios ir darbinės kiuvečių kompensavimui, ir brėžiama ją atitinkanti smailė. Integruojamas kiekvienos smailės plotas, kuris yra proporcingas baltymo jungimosi su ligandu metu vykstantiems šilumos pokyčiams.

Iš eksperimentinius duomenis vaizduojančios izotermės galima nustatyti šešis termodinaminius parametrus:

- n stechiometriją. Iš jos galima sužinoti, kiek jungimosi vietų turi baltymas. Dar šis dydis rodo baltymo grynumą (ar turi priemaišų), jei gali būti palyginamas su anksčiau nustatyta n;
- K_d disociacijos konstantą. ITK metodu nustatoma biomolekulių sąveikos K_d gali būti nuo mM iki nM eilės su galimybe praplėsti šį intervalą iki pM eilės atliekant konkurentinio titravimo eksperimentus. Silpnų sąveikų (mM eilės) tyrimui reikalingi didesni baltymo ir ligando kiekiai nei stiprių (nM ir pM eilės);
- ΔH entalpijos pokytį, atspindintį keletą fenomenų. Norint nustatyti tik biomolekulių sąveikos entalpiją, reikia įvertinti, kad eksperimento metu nustatyta entalpija susideda iš keletos komponentų: skiedimo efektą atspindinčios šilumos, baltymo ir ligando buferinių tirpalų sudėties nesutapimų sukurtos šilumos jų maišymosi metu, buferių jonizacijos entalpijos, biomolekulių sąveikos entalpijos;
- ΔG laisvosios Gibso energijos pokytį. Kuo neigiamesnė šio dydžio vertė, tuo stipresnė biomolekulių sąveika. Jis apskaičiuojamas pagal 1 lygtį, kai žinoma K_d ;
- ΔS entropijos pokytį. Kuo teigiamesnė šio dydžio vertė, tuo sistemoje tvarka yra mažesnė. Jis apskaičiuojamas pagal 4 lygtį, kai žinoma ΔH ir ΔG ;
- ΔC_p šiluminės talpos pokytį. Atliekama keletą tokių pat eksperimentų skirtingose temperatūrose. Nustatoma ΔH priklausomybė nuo T ir tokios kreivės nuokrypio kampas rodo ΔC_p . Neigiamas ΔC_p kartu su teigiamu ΔS rodo hidrofobinę sąveiką, o teigiamas ΔC_p yra hidratacijos reakcijų bruožas.

Izotermę, pagal kurią galima tiksliai nustatyti termodinaminius duomenis, charakterizuoja trys dalys:

- 1. Žemesnioji plato pirmosiose injekcijose visas ligando kiekis susijungia su baltymu.
- 2. Tranzicija.
- 3. Aukštesnioji plato baltymas prisotintas ligandu, injekuojamas ligandas nebesijungia su baltymu, smailės rodo skiedimosi šilumą.

Tranzicijai reikalingas toks taškų kiekis, kuris leistų patikimai nustatyti K_d . Tokį izotermės sigmoidiškumą lemia Wiseman c–faktorius. Jis apskaičiuojamas planuojant eksperimentą pagal sąryšį:

$$c = n[P_t]K_b \tag{13}$$

Norint teisingai išmatuoti termodinaminius parametrus, reaguojančių molekulių koncentracijos paskaičiuojamos taip, kad Wiseman c–faktoriaus vertės kistų nuo 5 iki 500 (Wiseman et al., 1989). n nustatymo paklaida — ~5 %, ΔH ir K_b — ~10 % (Tellinghuisen, 2003).

Eksperimento sąlygos. Matavimai atliekami VP-ITC kalorimetru (*"Microcal, Inc."*). Paruošiami vienodos sudėties baltymo ir ligando buferiniai tirpalai, turintys tokį pat 1 % DMSO kiekį. Darbinė kiuvetė, kurios tūris yra 1,4 mL, užpildoma 4–6 μM baltymo tirpalu, o 300 μL tūrio švirkštas – 40–60 μM ligando tirpalu. Eksperimentai atliekami esant pastoviai 25 °C temperatūrai, kurių metu į baltymo tirpalą kas 200–240 s injekuojama 25–30 ligando tirpalo injekcijų esant 260 aps./min maišymo greičiui. Matavimai pakartojami po 2 kartus. Gauti rezultatai apdorojami programos *"Micro-Cal Origin 5.0"* ITC moduliu.

2.3.6. Fermentinio aktyvumo matavimas

CA katalizuojamos CO_2 hidratacijos metu kinta tirpalo pH dėl susidariusių H⁺. CA katalizinio aktyvumo tyrimuose pritaikomi įvairūs indikatoriai. Pagal jų šviesos sugerties pokytį dėl pasikeitusio tirpalo pH išmatuojami CA charakterizuojantys kinetiniai parametrai.

Eksperimento sąlygos. Matavimai atliekami naudojantis "Applied Photophysics SX.18MV-R" sustabdytos srovės (angl. stopped-flow) spektrofotometru 25 °C temperatūroje. Ruošiami du tirpalai: 5–200 nM baltymo buferinis tirpalas (25 mM MOPS, 25 mM NaCl, pH 7,0), turintis 30 µM bromtimolio mėlynojo, bei CO₂ prisotintas dejonizuotas vanduo. Abu tirpalai sumaišomi ir matuojama bromtimolio mėlynojo šviesos sugerties priklausomybė nuo laiko esant 615 nm bangos ilgiui. Tiriant savaiminę CO₂ hidratacijos reakciją baltymo i tirpalą nededama. Katalizuojamos reakcijos greitis yra lygus susidariusių protonų [H⁺] kiekiui per laiko vienetą ir buferinio tirpalo faktoriaus sandaugai:

$$v = \left(\frac{\mathrm{d}[\mathrm{H}^+]}{\mathrm{d}t}\right) * Q_{buf} \tag{14}$$

Čia Q_{buf} – buferinio tirpalo faktorius, apskaičiuojamas pagal Khalifah metodiką (Khalifah, 1971). Matavimai pakartojami po 2 kartus. Gauti rezultatai apdorojami *Microsoft Office Excel 2010* programa.

2.3.7. Statistinė duomenų analizė

Analizuojant CA VI, išskirtos iš dviejų skirtingų šaltinių, jungimąsi su slopikliais (3.8 skyrius), pritaikytas dviejų nepriklausomų imčių Stjudento t–testas (angl. Student t–test). Skirtumai tarp baltymų, išskirtų iš skirtingų šaltinių, jungimosi su slopikliais vertinami statistiškai nereikšmingais, kai nustatytas p reikšmingumo lygmuo yra didesnis už pasirinktą reikšmingumo lygmenį $\alpha = 0.05$. Stjudento t–testas atliktas naudojantis "GraphPad Prism 5.0" programa.

Norint parodyti duomenų sklaidą apie vidurkį, daugumai rezultatų pateikti aritmetinis vidurkis \pm standartinis nuokrypis. Jie apskaičiuoti naudojantis *Microsoft Office Excel* 2010 programa.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI geno klonavimas, raiška, baltymo tirpumo patikrinimas ir gryninimas

Vykdant geno, koduojančio pilno ilgio rekombinantinę žmogaus CA VI, raišką *E. coli* ląstelėse, tirpaus baltymo gauti nepavyko. Todėl sukonstruota plazmidė su tiksliniu genu, koduojančiu UniProtKB duomenų bazėje paskelbtą rekombinantinės žmogaus CA VI (P23280) seką nuo 21 iki 290 aminorūgšties. Šią fermento geno dalį nuspręsta klonuoti, atsižvelgiant į 2012 m. publikuotą straipsnį, kuriame Pilka su kolegomis aprašė žmogaus CA VI (21–290 aminorūgšties) kristalinę struktūrą (Pilka et al., 2012). Manyta, kad tokiu būdu bus gaunami pakankami tirpaus, stabilaus ir aktyvaus baltymo kiekiai, reikalingi biofizikiniams CA VI jungimosi su sulfonamidiniais ligandais tyrimams.

Rekombinantinę žmogaus CA VI buvo tikimasi gauti iš plazmide su tiksliniu genu transformuotų *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus-RIL ir RosettaTM 2(DE3) kamienų. Naudotos dvi mitybinės terpės: LB ir BHI. Ląstelės po CA VI geno raiškos indukcijos augintos per naktį (16 val.) 20 °C temperatūroje. Manyta, kad ilgesnis ląstelių auginimas po indukcijos žemesnėje temperatūroje bus palankesnis tirpaus baltymo susidarymui, nes jo susivyniojimas galės vykti ilgesnį laiką.



7 pav. A – E. coli baltymų raiškos patikrinimas poliakrilamido gelyje. Pažymėta 33 kDa dydžio rekombinantinė žmogaus CA VI. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1,2 – ląstelių lizatas prieš ir po CA VI geno raiškos indukcijos BL21(DE3)CodonPlus-RIL kamiene (ląstelės augintos BHI terpėje); 3,4 – ląstelių lizatas prieš ir po CA VI geno raiškos indukcijos BL21(DE3)CodonPlus-RIL kamiene (ląstelės augintos LB terpėje); 5,6 – ląstelių lizatas prieš ir po CA VI geno raiškos indukcijos RosettaTM 2(DE3) kamiene (ląstelės augintos BHI terpėje); 7,8 – ląstelių lizatas prieš ir po CA VI geno raiškos indukcijos RosettaTM 2(DE3) kamiene (ląstelės augintos LB terpėje). B – baltymų tirpumo patikrinimas poliakrilamido gelyje. Pažymėta 33 kDa dydžio rekombinantinė žmogaus CA VI. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1, 2 – tirpių ir netirpių baltymų frakcijos (RosettaTM 2(DE3)kamieno ląstelės augintos BHI terpėje); 3,4 – tirpių ir netirpių baltymų frakcijos (BL21(DE3)CodonPlus-RIL kamieno ląstelės augintos BHI terpėje); 5,6 – tirpių ir netirpių baltymų frakcijos (BL21(DE3)CodonPlus-RIL kamieno ląstelės augintos BHI terpėje); 7,8 – tirpių ir netirpių baltymų frakcijos (BL21(DE3)CodonPlus-RIL kamieno ląstelės augintos BHI terpėje); 7,8 – tirpių ir netirpių baltymų frakcijos (BL21(DE3)CodonPlus-RIL kamieno ląstelės augintos BHI terpėje); 7,8 – tirpių ir netirpių baltymų frakcijos (BL21(DE3)CodonPlus-RIL kamieno ląstelės augintos BHI terpėje); 7,8 – tirpių ir netirpių baltymų frakcijos (BL21(DE3)CodonPlus-RIL kamieno ląstelės augintos LB terpėje).

Remiantis 7 pav. pateiktais rezultatais, nustatyta, kad CA VI geno raiška vyksta abejuose kamienuose. Ji yra didžiausia BL21(DE3)CodonPlus-RIL kamiene (A dalis). Tačiau tirpus baltymas gaunamas tik RosettaTM 2(DE3) kamiene (B dalis). Ląstelių auginimui pasirinkta BHI terpė, nes joje greičiau dalijasi bakterijos, todėl greičiau indukuojama tikslinio geno raiška.

Kadangi rekombinantinė žmogaus CA VI turi heksahistidino uodegėlę, tai ji gryninta naudojant sefarozę su imobilizuotais Ni^{2+} jonais iš 6 g biomasės. Metalų chelatinėje chromatografijoje sąveika tarp baltymų ir sorbento vyksta susidarant koordinaciniams ryšiams tarp sorbento ligando su imobilizuotais Ni^{2+} jonais ir baltymo heksahistidino uodegėlės. Gauta 26 mg rekombinantinės žmogaus CA VI (8 pav.). Baltymo kiekis padalintas į dvi



8 pav. Rekombinantinės žmogaus CA VI elektroforezė poliakrilamido gelyje po gryninimo metalų chelatinės chromatografijos metodu. Pažymėta 33 kDa dydžio rekombinantinė žmogaus CA VI. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – tirpių baltymų frakcija prieš gryninimą; 2 – gryninimo metu ant kolonėlės nesisorbavusių baltymų frakcija; 3–8 – frakcijos su rekombinantine žmogaus CA VI.

lygias dalis ir dializuotas per naktį dviejuose skirtingų pH verčių buferiniuose tirpaluose (pH 5,6 ir pH 7,6), pasižyminčiuose vienoda jonine jėga. Tokie buferiniai tirpalai pasirinkti pagal baltymo pI, kuris yra 6,6. Siekta nustatyti, kokio pH buferiniame tirpale rekombinantinė žmogaus CA VI yra stabili. Ši informacija naudinga baltymo gryninimo schemos kūrimui, norint gauti kuo didesnį tirpaus baltymo kiekį. Išmatuota, kad dializuojant baltymo tirpalą buferiniame tirpale, kurio pH 5,6, po 16 val. liko 8 mg tirpaus baltymo, o buferiniame tirpale, kurio pH 7,6 – tik 1 mg tirpaus baltymo. Remiantis šiais rezultatais galima teigti, kad buferiniame tirpale, kurio pH = 5,6, yra palankios sąlygos baltymo susivyniojimui į natyvią struktūrą ir baltymas išlieka stabilus. Todėl nuspręsta užauginti daugiau biomasės ir gryninti baltymą naudojant buferinius tirpalus, kurių daugumos pH = 5,6. Iš 20 g biomasės po gryninimo metalų chelatinės (9 pav., A) ir afininės (9 pav., B) chromatografijų gauta ~20 mg rekombinantinės žmogaus CA VI. Norint gauti pakankamą baltymo kiekį, reikalingą biofizikiniams matavimams, rekombinantinė žmogaus CA VI gryninta 15 kartų, kiekvieną kartą iš 20–25 g biomasės gaunant 10–20 mg tikslinio baltymo.



9 pav. A – rekombinantinės žmogaus CA VI elektroforezė poliakrilamido gelyje po gryninimo metalų chelatinės chromatografijos metodu. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – tirpių baltymų frakcija prieš gryninimą; 2 – gryninimo metu ant kolonėlės nesisorbavusių baltymų frakcija; 3–8 – frakcijos su rekombinantine žmogaus CA VI. B – rekombinantinės žmogaus CA VI elektroforezė poliakrilamido gelyje po gryninimo afininės chromatografijos metodu. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – tirpių baltymų frakcija prieš gryninimą; 2 – gryninimo metu ant kolonėlės nesisorbavusių baltymų frakcija prieš gryninimą; 2 – gryninimo metu ant kolonėlės nesisorbavusių baltymų frakcija; 3–8 – frakcijos su rekombinantine žmogaus CA VI.

3.2. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės II mutagenezė, geno raiška ir baltymo gryninimas

Kai kurių CA izoformų gryninimo išeigos mažos – vos keli miligramai. Sudėtinga įvertinti jų jungimąsi su slopikliais, nes biofizikiniams matavimams reikalingi dideli baltymo kiekiai. Todėl mutantų kūrimo strategija, kai CA II aktyvus centras mutuojamas taip, kad būtų panašus į kitos CA izoformos aktyvų centrą, galėtų padėti išspęsti mažą baltymo gryninimo išeigos ir kai kurių izoformų sudėtingo gavimo prokariotuose problemas. CA II izoforma pasirinkta neatsitiktinai. Tai stabilus baltymas, kurio kristalai lengvai užauga. Tai aktyviausia CA izoforma (k_{kat} didesnė nei 10⁶ s⁻¹). Efektyviai ir pigiai gaunamas didelis šio rekombinantinio baltymo kiekis iš *E. coli* bakterijų. Lyginant CA II su CA VI, vieno gryninimo metu gaunama iki 20 mg CA VI, kai tuo tarpu efektyviai ląstelėje ekspresuojamos CA II pavyksta išgryninti iki 100 mg. Tolimesniems CA VI jungimosi su slopikliais matavimams reikalingus didesnius baltymo kiekius planuota gauti kuriant CA II mutanta. Remiantis kompiuteriniu modeliavimu, kuri atliko Dr. Visvaldas Kairys, CA II aktyviajame centre nustatytos penkios aminorūgštys – A65, N67, F130, V134, L203, kurias reiktų pakeisti atitinkamai į T, Q, Y, Q, T (10 pav.). Tuomet mutanto aktyvusis centras taptų panašus į CA VI, o likusia baltymo dalimi, nulemiančia efektyvią raišką ląstelėje ir nesudėtingą gryninimą – į CA II.

Taikant kryptingą mutagenezę, į CA II aktyvųjį centrą įvestos tikslinės mutacijos: A65T, N67Q, F130Y, V134Q, L203T. Geno seka patvirtinta sekoskaitos metodu. Jo raiškai naudotas BL21(DE3) kamienas, kuris skyriuje taip pat yra naudojamas CA II geno raiškai (11 pav., A). Baltymas grynintas du kartus taip, kaip grynininama CA II. Iš ~10 g biomasės po gryninimo metalų chelatinės ir afininės chromatografijos metodais gauta ~30 mg tirpaus tikslinio baltymo (11 pav., B ir C). Jo kiekis yra mažesnis už nor-



10 pav. Žmogaus CA II (PDB kodas 3M96) ir CA VI (PDB kodas 3FE4) aktyvieji centrai. CA II aminorūgštys pažymėtos pilkai, CA VI – purpurine spalva, mutuotos aminorūgštys – žaliai. Ruda spalva parodytas sulfonamidinis slopiklis.

maliai gaunamą CA II kiekį iš tiek pat biomasės. Manoma, kad to priežastis – natyvaus baltymo struktūroje pakeistos aminorūgštys, kurios trukdo baltymo susivyniojimui į teisingą struktūrą, todėl susidaro mažiau tirpaus mutantinio baltymo. Jo dydis patvirtintas masių spektroskopija (atliko Dr. V. Smirnovas).

3.3. Žmogaus karboanhidrazės VI gryninimas iš seilių

 $E.\ coli$ – tai patogus modelinis organizmas, naudojamas tikslinio baltymo gamybai. Tačiau analizuojant slopiklio jungimąsi su patologiją sukeliančiu baltymu, kurio sintezė vykdyta prokariotuose, dažnai kyla abejonių, ar gauti duomenys atitinka rezultatus, kurie būtų gauti tiriant analogišką, žmogaus organizme susintetintą baltymą. Bakterijose pilno ilgio baltymai dažniausiai būna netirpūs, todėl baltymas trumpinamas ir sintetinami tik jų kataliziniai domenai, bei nevyksta kai kurios baltymų potransliacinės modifikacijos, pavyzdžiui, glikozilinimas ir fosforilinimas. Tai gali lemti skirtingą baltymo susivyniojimą, dėl kurio galimi aktyviojo centro aplinkos pokyčiai ir klaidingi jungimosi su slopikliais



11 pav. A – *E. coli* BL21(DE3) kamieno ląstelių baltymų raiškos patikrinimas poliakrilamido gelyje. Pažymėtas 29 kDa CA II mutantinis baltymas. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1,2 – ląstelių lizatas prieš ir po tikslinio baltymo geno raiškos indukcijos. B – CA II mutantinio baltymo elektroforezė poliakrilamido gelyje po gryninimo metalų chelatinės chromatografijos metodu. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – tirpių baltymų frakcija prieš gryninimą; 2 – gryninimo metu ant kolonėlės nesisorbavusių baltymų frakcija; 3–9 – frakcijos su desorbuotais baltymais. C – CA II mutantinio baltymo elektroforezė poliakrilamido gelyje po gryninimo metodu. Takeliuose: M – baltymų frakcija prieš gryninimą; 2 – gryninimo afininės chromatografijos metodu. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – tirpių baltymų frakcija prieš gryninimą; 2 – gryninimo afininės chromatografijos metodu. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – tirpių baltymų frakcija prieš gryninimą; 2 – gryninimo afininės chromatografijos metodu. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – tirpių baltymų frakcija prieš gryninimą; 2 – gryninimo afininės chromatografijos metodu. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – tirpių baltymų frakcija prieš gryninimą; 2 – gryninimo metu ant kolonėlės nesisorbavusių baltymų frakcija; 3–6 – frakcijos su desorbuotu CA II mutantiniu baltymu.

analizės rezultatai.

Žmogaus CA VI yra vienas iš nedaugelio fermentų, kurį galima išgryninti tokį, koks jis yra žmogaus organizme. 1990 m. Parkkila su kolegomis išskyrė šį baltymą iš seilių ir panaudojo imunologiniams tyrimams (Parkkila et al., 1990). Remiantis jų sukurta metodika, iš 25 žmonių surinkta 0,5 L seilių ir išgryninti \sim 5 mg žmogaus CA VI. Afininė chromatografija vykdyta du kartus, norint gauti kuo švaresnį baltymą (12 pav.).



12 pav. A – žmogaus CA VI elektroforezė poliakrilamido gelyje po pirmo gryninimo afininės chromatografijos metodu. Pažymėta žmogaus CA VI. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1–8 – frakcijos su desorbuotais baltymais. B – žmogaus CA VI elektroforezė poliakrilamido gelyje po antro gryninimo afininės chromatografijos metodu. Pažymėta žmogaus CA VI. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1–8 – frakcijos su desorbuotais baltymą. Žmogaus CA VI. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1–8 – frakcijos su desorbuotais baltymą.

3.4. Fermentinio aktyvumo tyrimai

Sustabdytos srovės metodu įvertintos tirtų baltymų (CA VI, išskirtų iš žmogaus seilių, *E. coli*, bei CA II mutanto) katalizuojamų CO_2 hidratacijos reakcijų greičių priklausomybės nuo fermentų koncentracijos. Gauti rezultatai, tiriant CA VI iš *E. coli*, parodyti 13 pav. Kuo didesnė pridėto fermento koncentracija, tuo didesnis reakcijos greitis, nes mažėja indikatoriaus šviesos sugertis dėl susidarančių H⁺ jonų. Nustatyta tiesinė reakcijos greičio priklausomybė nuo fermento koncentracijos (13 pav., B dalis).



13 pav. Reakcijos greičio priklausomybė nuo rekombinantinės žmogaus CA VI, išskirtos iš *E. coli*, koncentracijos. A – pirminės kreivės; B – apdoroti duomenys.

Iš gautų rezultatų apskaičiuotos baltymų katalizinių konstantų (k_{kat}) vertės. Šis kinetinis parametras parodo substrato molekulių skaičių, kurį viena fermento molekulė paverčia produktu per vieną sekundę. Pagal 4 lentelėje pateiktus duomenis, nustatyta, kad įvedus penkias mutacijas į CA II aktyvųjį centrą, baltymas nepraranda fermentinio aktyvumo, tačiau jis susilpnėja, o CA VI, išgrynintos iš dviejų skirtingų šaltinių, k_{kat} vertės panašios. Išmatuotos k_{kat} vertės palygintos su literatūroje pateiktais duomenimis (Supuran, 2008). CA II aktyvumo duomenys sutampa, o CA VI – ne. Tokie rezultatai galimi dėl tirpalo pH ir baltymo šaltinio nesutapimų, kurie literatūros šaltinyje nenurodyti. Taigi

4 lentelė. Tirtų baltymų katalizinės konstantos. CA II matavimus atliko J. Smirnovienė, CA II mutanto – M. Kišonaitė.

Baltymas	k_{kat}, s^{-1}	$k_{kat}^*, \mathrm{s}^{-1}$
CA II	$1.4 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$
CA II mutantas	$1.3 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^4$	_
CA VI iš <i>E. coli</i>	$9,4 \times 10^4 \pm 3,0 \times 10^4$	$3,4 \times 10^5$
CA VI iš žmogaus seilių	$1.6 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^4$	_

* – literatūros duomenys (Supuran, 2008).

gauti baltymai yra kataliziškai aktyvūs. Todėl jie naudojami tolimesnei jungimosi su sulfonamidiniais ligandais termodinaminei analizei.

3.5. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI jungimosi su sulfonamidiniais ligandais analizė

Žmogaus CA VI slopiklių paieška svarbi tiek fundamentiniam fermento fiziologinio vaidmens supratimui, tiek jo įtakos įvairiuose patologiniuose procesuose pažinimui. Jau yra tyrimų, rodančių galimą CA VI ryšį su seilių liaukų naviku (Hassan et al., 2013), dantų karieso formavimusi (Kivela et al., 1999). FTPM nustatytos įvairių junginių ir CA VI stebimosios jungimosi konstantos (K_b) esant sąlygoms, panašioms į fiziologines (37 °C, pH = 7). Manoma, kad analogiška *in vitro* tirta biomolekulių sąveika turėtų vykti ir žmogaus organizme.

Arilsulfonamido grupės be pakaitų p $K_a = 10,1$ (Krishnamurthy et al., 2007). Norint sukurti kuo didesniu afiniškumu tiksliniams baltymams pasižyminčius arilsulfonamidinius slopiklius, siekiama sumažinti arilsulfonamido grupės p K_a iki tokio pH, koks yra žmogaus organizme (pH ~ 7). Todėl tiriama įvairių pakaitų benzeno žiede įtaka (Alterio et al., 2012). Kuo pakaitas elektroneigiamesnis, tuo CA slopiklis efektyvesnis dėl sumažėjusios arilsulfonamido grupės p K_a vertės. Vieni iš tokių pakaitų yra halogenai, pavyzdžiui, chloras. Anksčiau nustatyta, kad S-alkilinti benzimidazolai stipriau jungiasi su CA nei analogiški N-alkilinti ligandai (Čapkauskaitė et al., 2010). Todėl Vilniaus Universiteto Biotechnologijos institute, Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje Dr. Edita Čapkauskaitė susintetino 40 S-alkilintų junginių, suskirstytų į 4 grupes po 10 junginių pagal įvarių pakaitų padėtį sulfonamidinės grupės atžvilgiu benzeno žiede. Junginių efektyvu-



14 pav. Keturių grupių benzensulfonamidų jungimosi su skirtingomis CA izoformomis lg K_d vidurkiai, išmatuoti FTPM (Pi buferinis tirpalas, pH 7). Parodytos junginių, priklausančių skirtingoms grupėms, bendros struktūros. Pažymėtos kiekvienos grupės ligandų jungimosi su konkrečia CA izoforma lg K_d kitimo ribos (Čapkauskaitė et al., 2013).

mas ir atrankumas šešioms CA izoformoms pagal lg K_d vidurkį palyginti 14 pav. Kuo lg K_d vertė yra neigiamesnė, tuo slopiklio ir baltymo sąveika stipresnė. Pažymėtos kiekvienos grupės slopiklių jungimosi su konkrečia CA izoforma lg K_d kitimo ribos. Rezultatai publikuoti *Bioorganic Medicinal Chemistry* žurnale (Čapkauskaitė et al., 2013). Straipsnis pateikiamas prieduose.

Nustatyta, kad sulfonamidinės grupės atžvilgiu para padėtyje įvairias grupes turintys ligandai jungiasi su CA stipriau nei tokie pat slopikliai, turintys pakaitus meta padėtyje. Be to, stiprios chloro elektronų akceptorinės savybės sumažina arilsulfonamido grupės pK_a , todėl junginiai su orto padėtyje įvestu chloru jungiasi stipriau nei atitinkami junginiai be tokio pakaito su dauguma CA, tik ne su CA VI.

Pagal CA VI jungimosi su slopikliais duomenis, ji silpniausiai iš šešių CA izoformų sąveikauja su tirtais junginiais. Stipriausiai CA VI jungiasi su benzensulfonamidais, turinčiais chlorą *orto* padėtyje ir įvairias grupes, kurių pagrindą sudaro pirimidino žiedas, *meta* padėtyje sulfonamidinės grupės atžvilgiu. Iš jų baltymą labiausiai stabilizuoja junginys E46 (15 pav.), kurio pirimidino žiede įvesta daugiausiai hidrofilinių grupių: hidroksiir propionilgrupės. Toks ligandas ~3 kartus stipriau sąveikauja su CA VI nei analogiškas



15 pav. Rekombinantinės žmogaus CA VI lydymosi temperatūros priklausomybė nuo benzensulfonamidų E46, E49, E89 koncentracijos.

slopiklis, kurio pirimidino žiede nėra pakaitų (E89), ir 3–5 kartus stipriau nei junginiai, kurių pirimidino žiede įvestos hidrofobinės grupės: metilo, etilo, propilo, butilo. Tokių junginių pavyzdys yra E49, kuris pagal 15 pav. pateiktus rezultatus lemia mažiausius iš grafike parodytų baltymo be ligando ir baltymo–ligando komplekso T_m pokyčius. Taigi stipriau su CA VI sąveikauja tokie junginiai, kurie sudaro daugiau vandenilinių ryšių su CA VI aktyviojo centro aminorūgštimis.

Atrankaus sulfonamidinio ligando, kuris jungtųsi tik su CA VI ir nesijungtų su kitomis CA izoformomis, nerasta. Manoma, kad sudaromų vandenilinių ryšių kiekis lemia ligando ir CA VI jungimosi stiprumą. Tačiau detalesnis atrankumo įvertinimas sudėtingas dėl biomolekulių sąveikos silpnumo. Toliau planuojama CA VI kristalografinė analizė. Šiuo metu A. Smirnov sėkmingai išsprendė baltymo be ligando struktūrą. 16 pav. B dalyje ji



16 pav. A – rekombinantinės žmogaus CA VI monomerinės struktūros elektronų tankio žemėlapis, gautas Rentgeno spindulių difrakcijos metodu. Rožine sfera pavaizduotas aktyviajame centre esantis cinko jonas, o tamsiai mėlyni – trys aktyviajame centre esantys histidinai, koordinuojantys cinko joną. B – A. Smirnov (tamsiai mėlyna) ir Pilkos bei jo kolegų (šviesiai mėlyna) išspręstų rekombinantinių žmogaus CA VI struktūrų palyginimas.

palyginta su Pilkos bei jo kolegų nustatyta struktūra (Pilka et al., 2012). Matyti, kad baltymas yra dimeras. Tačiau A. Smirnov išspręsta struktūra pasižymi ~ 3 Å skiriamaja geba ir baltymo kristalai yra nestabilūs, greitai suyra. Tai apsunkina baltymo-ligando komplekso struktūrinę analizę, kuri leistų nustatyti junginio išsidėstymą baltymo aktyviajame centre. Dėl to būtų galima modifikuoti jį taip, kad vyktų stipresnė biomolekulių sąveika. Toliau planuojama keisti baltymo ilgį, siekiant pagerinti baltymo kristalų stabilumą.

3.6. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės II mutanto kaip modelio žmogaus karboanhidrazės VI jungimosi su sulfonamidiniais ligandais įvertinimas

Norint nustatyti, ar CA II mutantas yra patikimas modelis CA VI jungimosi su slopikliais analizei, tirtos CA II, CA II mutanto ir CA VI sąveikos su 50 atsitiktinai pasirinktų junginių. Išmatuotos K_d pateiktos prieduose ?? ir ?? lentelėse, o junginių cheminės struktūros – prieduose ??, ??, ?? pav. 17 pav. palygintos CA II ir CA II mutanto (raudoni taškai) bei CA VI ir CA II mutanto (juodi taškai) jungimosi su sulfonamidiniais ligandais lg K_d . Punktyrinė linija vaizduoja modelį, kaip išsidėstytų taškai, jei baltymų jungimasis su ligandais būtų vienodo stiprumo. Pagal gautus rezultatus matyti, kad dauguma juodų



17 pav. CA II ir CA II mutantinio baltymo (pažymėta raudonai) bei CA VI ir CA II mutantinio baltymo (pažymėta juodai) jungimosi su slopikliais $\lg K_d$ verčių tarpusavio palyginimas. Punktyrinė linija pažymėtas modelis, žymintis vienodas $\lg K_d$ vertes.

taškų yra išsidėstę išilgai tiesės, mažiau išsibarstę ir mažiau nutolę nuo tiesės nei raudoni taškai. Detaliau analizuojant baltymų jungimąsi su tirtais slopikliais, nustatyta, kad įvedus penkias mutacijas į CA II aktyvųjį centrą, 30 junginių sąveika su CA II mutantu tapo daugiau nei 10 kartų silpnesnė už sąveiką su CA II. Pavyzdžiui, išmatuota, jog VD11-49 junginys su CA II mutantu sąveikauja net 560 kartų silpniau. Priešingai, tik 5 sulfonamidiniai ligandai iš 50 su CA II mutantu jungiasi 10–18 kartų stipriau nei su CA VI, o kitų 45 junginių sąveikos su šiais baltymais stiprumas yra panašus ir skiriasi mažiau nei 7 kartus. Be to, nustatyti 2 junginiai, kurių sąveikų su CA VI ir CA II mutantu $K_d > 200 \mu$ M, tačiau jungimosi su CA II K_d vertės lygios 5,8–7,7 μ M. Tai rodo, kad CA II mutantinio baltymo jungimosi su sulfonamidiniais ligandais lg K_d vertės labiau panašios į CA VI, o ne CA II tuos pačius termodinaminius parametrus.

Norint tiksliau nustatyti, kokią įtaką 5 mutacijos lėmė baltymų jungimosi su ligandais laisvajai Gibso energijai, įvertinti baltymų jungimosi su slopikliais panašumo koeficientai. Jie apskaičiuoti pagal lygtis:

$$p_{CAII} = \frac{lgK_{d_1} - lgK_{d_2}}{lgK_{d_3} - lgK_{d_2}} \tag{15}$$

$$p_{CAVI} = \frac{lgK_{d_3} - lgK_{d_1}}{lgK_{d_3} - lgK_{d_2}} \tag{16}$$

Čia lg K_{d1} – CA II mutantinio baltymo, lg K_{d2} – CA II, lg K_{d3} – CA VI jungimosi su tuo pačiu sulfonamidiniu ligandu rezultatai. p_{CAII} ir p_{CAVI} vertės parodytos 18 pav. Remiantis pateiktais duomenimis, dauguma raudonų taškų, atitinkančių p_{CAII} , yra labiau nutolę nuo tiesės, atitinkančios nulines p vertes, nei juodi taškai, žymintys p_{CAVI} . Apskaičiuoti p_{CAII} ir p_{CAVI} vidurkiai: $p_{CAII} = 0.71$, o $p_{CAVI} = 0.29$. Šie duomenys rodo, kad CA VI ir



18 pav. CA II ir CA II mutantinio baltymo (pažymėta raudonai) bei CA VI ir CA II mutantinio baltymo (pažymėta juodai) jungimosi su slopikliais panašumo koeficientai. Linija pažymėtas modelis, rodantis, kad $\lg K_d$ vertės vienodos.

CA II mutanto jungimosi su ligandais skirtumai yra mažesni už CA II ir CA II mutanto sąveikos su tais pačiais junginiais skirtumus. Vadinasi, CA II mutanto ir sulfonamidinių ligandų stebimoji termodinamika pagal laisvąją Gibso energiją yra 71 % panaši į CA VI sąveikas su tais pačiais junginiais.

3.7. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI ir II mutanto jungimosi su etokzolamidu tikrųjų parametrų nustatymas

CA sąveikaujant su sulfonamidiniu ligandu, vyksta papildomos reakcijos. Todėl eksperimento metu nustatomi biomolekulių sąveikos stebimieji termodinaminiai parametrai apibūdina ne tik baltymo–ligando jungimąsi, bet ir kartu vykstančią ligando, baltymo ir buferio protonizacijos/deprotonizacijos reakcijas. Norint analizuoti junginio struktūros ir biomolekulių sąveikos koreliaciją, reikia įvertinti tikruosiuos termodinaminius parametrus, kurie nepriklauso nuo eksperimento sąlygų (buferinio tirpalo sudėties, pH) ir eliminuoja baltymo–ligando sąveikos metu vykstančius protonizacijos reiškinius (Baranauskienė and Matulis, 2012; Morkūnaitė et al., 2014).

Sulfonamidinio ligando sąveikai su CA didelę įtaką daro buferinio tirpalo pH. Tik deprotonizuotą sulfonamidinę grupę turintis slopiklis gali jungtis su CA, kurios aktyviajame centre cinko koordinuojamas hidroksido jonas turi būti protonizuotas. Biomolekulių sąveikos metu tokia elektriškai neutrali vandens molekulė išstumiama. Stipriausia sąveika stebima buferiniame tirpale, kurio pH yra artimiausia baltymo cinko koordinuojamos vandens molekulės ir slopiklio sulfonamidinės grupės pK_a vertėms. Esant tokioms sąlygoms, deprotonizuoto slopiklio ir aktyviajame centre protonizuotą hidroksido joną turinčios CA formų frakcijos yra didžiausios (atitinkamai $f_{\rm RSO_2NH^-}$ ir $f_{\rm CAZnH_2O}$). Jos apskaičiuojamos pagal sąryšius:

$$f_{\rm RSO_2NH^-} = \frac{10^{pH-pK_{\rm a-RSO_2NH_2}}}{1+10^{pH-pK_{\rm a-RSO_2NH_2}}}$$
(17)

$$f_{\rm CAZnH_2O} = \frac{10^{pH - pK_{\rm a-CAZnH_2O}}}{1 + 10^{pH - pK_{\rm a-CAZnH_2O}}}$$
(18)

Taigi tikroji jungimosi konstanta $(K_{b-tikr.})$ lygi stebimosios jungimosi konstantos $(K_{b-steb.})$ bei sandaugos tarp tirpale esančių $f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-}$ ir $f_{\text{CAZnH}_2\text{O}}$ santykiui:

$$K_{b-tikr.} = \frac{K_{b-steb.}}{f_{\rm RSO_2NH^-} f_{\rm CAZnH_2O}},\tag{19}$$

Iš $K_{b-tikr.}$ pagal 1 ir 2 lygtis apskaičiuojama baltymo jungimosi su slopikliu tikroji laisvoji Gibso energija ($\Delta G_{tikr.}$).

Biomolekulių sąveikos metu vyksta šiluminiai pokyčiai, kuriuos sukelia molekulių jungimasis ir kartu vykstančios protonizacijos bei deprotonizacijos reakcijos. Stebimoji jungimosi entalpija ($\Delta H_{steb.}$) susideda iš tikrosios jungimosi entalpijos ($\Delta H_{tikr.}$), ligando ($\Delta H_{\rm RSO_2NH^-}$), CA aktyviajame centre cinko koordinuojamo hidroksido jono ($\Delta H_{\rm CAZnH_2O}$) ir buferio protonizacijos entalpijų ($\Delta H_{\rm buf.}$):

$$\Delta H_{steb.} = \Delta H_{tikr.} + n_1 \Delta H_{\rm RSO_2NH^-} + n_2 \Delta H_{\rm CAZnH_2O} + (n_1 + n_2) \Delta H_{\rm buf.}, \qquad (20)$$

kur n_1 , n_2 – protonų kiekiai, apskaičiuojami pagal lygtis: $n_1 = 1 - f_{\rm RSO_2NH^-}$, $n_2 = f_{\rm CAZnH_2O} + 1$.

Medicinoje naudojamo etokzolamido (EZA) kaip CA slopiklio sąveika su CA II mutantiniu baltymu ir CA VI tirta dviem biofizikiniais metodais: ITK ir FTPM. Šis slopiklis yra vienas iš stipriausiai besijungiančių su CA komercinių junginių. Norint įvertinti tikruosius biomolekulių sąveikos termodinaminius parametrus, naudoti plataus pH intervalo buferiniai tirpalai. FTPM išmatuotos EZA jungimosi su CA II mutantu ir CA VI stebimosios laisvosios Gibso energijos ($\Delta G_{steb.}$) priklausomybės nuo pH, o ITK metodu nustatytos biomolekulių sąveikos $\Delta H_{steb.}$ priklausomybės nuo pH ir buferinio tirpalo. Gauti rezultatai palyginti su CA II jungimosi su EZA atitinkamais termodinaminiais parametrais (5 lentelė).

19 pav. pateikti grafikai, gauti taikant FTPM ir ITK. Taškai žymi eksperimentiškai nustatytus duomenis, o punktyrinės linijos rodo apskaičiuotus baltymo jungimosi su EZA tikruosius parametrus: $\Delta G_{tikr.}$ pagal 1, 5, 19 sąryšius, o $\Delta H_{tikr.}$ pagal 20 lygtį. Viršutinėje dalyje esančiuose grafikuose parodyta $\Delta G_{steb.}$ priklausomybės nuo pH "U" formos modeliai. $\Delta G_{steb.}$ nepriklauso nuo buferinio tirpalo sudėties, tačiau priklauso nuo pH. Biomolekulių sąveika silpnėja tiek didėjant, tiek mažėjant buferinio tirpalo pH. Mažesnio pH buferiniame tirpale yra mažesnė deprotonizuoto slopiklio frakcija, o didesnio pH – ma-



19 pav. EZA jungimosi su CA II, CA II mutanto ir CA VI stebimųjų laisvųjų Gibso energijų ($\Delta G_{steb.}$) priklausomybės nuo pH, išmatuotos FTPM (viršutinė paveikslo dalis), bei EZA jungimosi su baltymais stebimųjų jungimosi entalpijų ($\Delta H_{steb.}$) priklausomybės nuo buferinio tirpalo ir pH, išmatuotos ITK (apatinė paveikslo dalis). Taškai žymi eksperimentinius duomenis (25 °C), o punktyrinės linijos – apskaičiuotus tikruosius biomolekulių sąveikos parametrus ($\Delta G_{tikr.}$ ir $\Delta H_{tikr.}$). CA II matavimus atliko J. Smirnovienė.

žesnė CA, kurių aktyviajame centre cinko koordinuojama vandens molekulė, frakcija. Tai lemia teigiamesnę biomolekulių jungimosi $\Delta G_{steb.}$ vertę. Be to, stebimieji termodinaminiai dydžiai 7–23 kJ/mol skiriasi nuo apskaičiuotų tikrųjų parametrų. Tai rodo rezultatų priklausomybę nuo eksperimento sąlygų, šiuo atveju – buferinio tirpalo pH. Nustatyta, kad biomolekulių sąveika pagal tikruosius parametrus yra stipresnė nei pagal stebimuosius dydžius visų pH buferiniuose tirpaluose. Apskaičiuota, kad CA II mutanto jungimosi su EZA $\Delta G_{tikr.} = -52,4$ kJ/mol $\pm 0,7$ kJ/mol. To paties slopiklio sąveika su CA VI yra ~2,4 kJ/mol stipresnė ($\Delta G_{tikr.} = -54,5$ kJ/mol $\pm 0,8$ kJ/mol), o su CA II – ~5,8 kJ/mol stipresnė ($\Delta G_{tikr.} = -58,2$ kJ/mol $\pm 0,8$ kJ/mol). Taigi pagal sąveikos stiprumą EZA jungiasi su CA II mutantu panašiau kaip su CA VI nei su CA II.

EZA jungimosi su tirtais baltymais $\Delta H_{steb.}$ priklausomybės nuo pH ir buferinio tirpalo tirtos ITK metodu. Pirminiai ir integruoti duomenys pateikti prieduose ??–?? pav. $\Delta H_{steb.}$ rezultatai pavaizduoti 19 pav. apatinėje dalyje esančiuose grafikuose. Kaip ir FTPM, pastebima išmatuotų rezultatų priklausomybė nuo eksperimento sąlygų, šiuo atveju – buferinio tirpalo ir jo pH. Norint nustatyti $\Delta H_{tikr.}$, naudoti du buferiniai tirpalai, kurie skiriasi protonizacijos entalpijomis: TRIS ($\Delta H_{buf.} = -47.4$ kJ/mol, 25 °C) ir Pi $(\Delta H_{buf.} = -5,1 \text{ kJ/mol}, 25 \text{ °C})$. $\Delta H_{buf.}$ yra vienas iš $\Delta H_{steb.}$ komponentų (20 lygtis). Todėl tarp kai kurių eksperimentiškai nustatytų duomenų yra net ~40 kJ/mol skirtumas tiek vienodo buferio skirtingo pH tirpaluose, tiek vienodo pH skirtinguose buferiuose. Ištirta, kad EZA ir CA II mutanto jungimosi $\Delta H_{tikr.} = -62,0 \text{ kJ/mol} \pm 2,4 \text{ kJ/mol}$. Šis parametras panašus į EZA sąveikos su CA VI $\Delta H_{tikr.}$, kuri yra lygi -58,0 kJ/mol $\pm 3,0 \text{ kJ/mol}$. Tačiau CA II ir CA II mutanto jungimosi su EZA metu išskiriami energijos kiekiai skirasi ~11 kJ/mol (CA II mutanto $\Delta H_{tikr.} = -73,0 \text{ kJ/mol} \pm 2,1 \text{ kJ/mol}$). Remiantis šiais duomenimis, galima teigti, kad CA II mutanto jungimosi su EZA entalpinis indėlis yra panašesnis slopiklio sąveikos su CA VI, o ne su CA II, susidariusį šilumos kiekį. Penkios naujos aminorūgštys pakeičia CA II sąveiką su junginiais taip, kad ji tampa panaši į CA VI jungimąsi su tirtais ligandais tiek pagal stebimuosius, tiek pagal tikruosius termodinaminius parametrus.

5 lentelė. CA II, CA II mutantinio baltymo ir CA VI jungimosi su EZA tikrieji termodinaminiai parametrai: $\Delta G_{tikr.}$ – tikroji laisvoji Gibso energija, $\Delta H_{tikr.}$ – tikroji biomolekulių sąveikos entalpija.

Baltymas	$\Delta G_{tikr.}, \mathrm{kJ/mol}$	$\Delta H_{tikr.}, \mathrm{kJ/mol}$
CA II	$-58,5^{a} \pm 0,8$	$-73,0^a \pm 2,1$
CA II mutantas	$-52,4 \pm 0,7$	$-62,0 \pm 2,4$
CA VI	-54.4 ± 0.8	$-58,0 \pm 3,0$

 a – literatūros duomenys (Morkūnaitė et al., 2014).

Taigi dėl sudėtingo kai kurių CA izoformų gavimo iš prokariotinių organizmų taikoma nesunkiai gaunamos CA II mutagenezė. Analizuojama, ar kryptingai mutuojant CA II aktyvaus centro aminorūgštis, gautas modelinis baltymas su ligandais sąveikauja panašiai kaip ir CA izoforma, pagal kurios aktyvųjį centrą buvo atlikta CA II mutagenezė. Reikalingų įvesti mutacijų kiekis nėra apibrėžtas. Šiame darbe parodyta, kad įvedus 5 tikslines mutacijas į CA II aktyvųjį centrą, jis ne tik išlieka kataliziškai aktyvus, bet ir pagal sąveikos su junginiais laisvąją Gibso energiją yra 71 % panašus į CA VI. Publikuoti ir kitų mokslininkų atlikti panašūs darbai: Pinard su kolegomis į CA II aktyvųjį centrą įvedė 7 tikslines mutacijas ir analizavo baltymo kaip CA IX sąveiką su slopikliais (Pinard et al., 2013). Tai rodo, jog keičiant vienos CA izoformos aminorūgštis galima sukurti modelinį baltymą, atspindintį tikslinę CA izoformą.

3.8. Iš seilių išgrynintos žmogaus karboanhidrazės VI jungimosi su sulfonamidiniais ligandais analizė

Taikant FTPM, nustatyti 13 junginių sąveikos stebimieji ($\Delta G_{steb.}$) bei apskaičiuoti tikrieji EZA jungimosi ($\Delta G_{tikr.}$) parametrai su iš seilių išskirta žmogaus CA VI. Junginių cheminės struktūros pateiktos prieduose ?? pav. Rezultatai palyginti su analogiškais

duomenimis, gautais tiriant tų pačių junginių sąveikas su CA VI, iš
gryninta iš *E. coli* RosettaTM 2(DE3) kamieno ląstelių.

20 pav. parodytos iš žmogaus seilių ir bakterijų iš
grynintų CA VI sąveikų su junginiais $\Delta G_{steb.}$ vertės. Vienintelio VD
10-11 junginio sąveika su tirtais baltymais yra silpna, todėl imant 200 µM jo koncentraciją tikslio
s $\Delta G_{steb.}$ vertės nustatyti nepavyko. Norint įvertinti,



20 pav. Iš žmogaus seilių ir bakterijų išgrynintų CA VI sąveikų su junginiais stebimosios laisvosios Gibso energijos ($\Delta G_{steb.}$), išmatuotos FTPM (Pi buferinis tirpalas, pH 7). Pažymėti jų standartiniai nuokrypiai.

ar nėra statistiškai reikšmingo sąveikos su junginiais stiprumo skirtumo tiriant baltymus, sintetintus žmogaus seilėse ir bakterijose, atlikti dviejų nepriklausomų imčių, suskirstytų pagal skirtingą junginį, Stjudento t–testai. Vienu Stjudento t–testu analizuojami to paties

JUNGINYS	CA VI iš bakterijų jungimosi su	CA VI iš žmogaus seilių jungi-	p
	EZA $\Delta G_{steb.}$, kJ/mol	mosi su EZA $\Delta G_{steb.}$, kJ/mol	
EZA	-43,4; -42,9; -41,9	-41,3; -42,0; -41,0	$0,\!07$
AZM	-39,5; -38,4; -40,0	-38,5; -40,5; -39,4	0,86
MZM	-38,5; -40,6; -38,0	-39,8; -40,6; -39,8	$0,\!30$
VD10-9	-38,0; -36,3; -36,2	-35,6; -35,5; -36,1	$0,\!15$
VD10-12	-33,6; -35,4; -33,7	-32,5; -32,5; -33,1	0,07
VD10-13	-39,8; -40,6; -39,2	-37,4; -39,6; -38,8	$0,\!18$
VD10-16	-35,1; -36,8; -33,8	-31,2; -33,8; -33,7	$0,\!13$
VD10-21a	-32,8; -32,1; -32,1	-32,3; -32,7; -31,6	0,78
VD11-4-2	-42,6; -41,6; -40,9	-40,2; -40,6; -40,2	0,06
VD12-09	-31,5; -30,7; -32,4	-29,4; -32,5; -31,0	$0,\!61$
VD12-22	-36,7; -34,3; -36,7	-36,5; -36,1; -36,7	0,54
Topiramatas	-29,3; -31,5; -30,0	-30,9; -31,3; -30,6	$0,\!38$

6 lentelė. Iš žmogaus seilių ir bakterijų iš
grynintų CA VI sąveikų su junginiais $\Delta G_{steb.}$ (kJ/mol) ir St
judento t–testo p vertės.

junginio sąveikų su dviem baltymais duomenys. Kiekvienas baltymo jungimosi su ligandu

matavimo eksperimentas pakartotas po tris kartus. Pagal 6 lentelėje pateiktus duomenis, galima daryti išvadą, kad nėra statistiškai reikšmingo sąveikos stiprumo skirtumo tarp CA VI, išskirtos iš žmogaus seilių bei bakterijų, ir tirtų junginių ($p \ge 0.05$).

Tirti ne tik stebimieji, bet ir tikrieji CA VI, išskirtos iš skirtingų šaltinių, jungimosi su EZA parametrai. Pagal ΔG_{steb} priklausomybes nuo pH (21 pav.) apskaičiuotos



21 pav. EZA jungimosi su CA VI, išgrynintomis iš žmogaus seilių (A) ir bakterijų (B), stebimųjų laisvųjų Gibso energijų ($\Delta G_{steb.}$) priklausomybės nuo pH, išmatuotos FTPM. Taškai žymi eksperimentinius duomenis, o punktyrinė linija – apskaičiuotas biomolekulių sąveikos tikrąsias laisvąsias Gibso energijas.

7 lentelė. Iš žmogaus seilių ir bakterijų išgrynintų CA VI sąveikų su EZA tikrosios laisvosios Gibso energijos ($\Delta G_{tikr.}$), nustatytos FTPM.

Šaltinis	$\Delta G_{tikr.}, \mathrm{kJ/mol}$
Žmogaus seilės	$-56,2 \pm 1,1$
Prokariotinės <i>E. coli</i> ląstelės	$-54,4 \pm 0,8$

biomolekulių sąveikos $\Delta G_{tikr.}$ vertės (7 lentelė). Nustatyta, kad rekombinantinės CA VI ir iš žmogaus seilių išskirtos CA VI sąveikų su EZA $\Delta G_{tikr.}$ yra labai panašios.

Taigi bakterijose susintetinta rekombinantinė žmogaus CA VI (nuo 21 iki 290 aminorūgšties) pagal stebimuosius ir tikruosius sąveikos su tirtais junginiais parametrus yra tinkamas modelis žmogaus organizme sintetinamos CA VI sąveikos su tirtais junginiais matavimams. Tai rodo, kad bakterijose nevykstanti potransliacinė modifikacija – baltymų glikozilinimas – neturi reikšmingos įtakos sąveikos su tirtais junginiais stiprumui ir atrankumui. Gauti duomenys patvirtina, kad gryninant baltymą iš bakterijų, galima išvengti sudėtingos baltymo išskyrimo iš seilių procedūros, kai siekiama analizuoti žmogaus CA VI sąveikas su sulfonamidiniais ligandais.

IŠVADOS

- 1. Gauti baltymai: rekombinantinė žmogaus CA VI, mutantinis žmogaus CA II (A65T, N67Q, F130Y, V134Q, L203T) baltymas bei natyvi, iš žmogaus seilių išskirta CA VI yra kataliziškai aktyvūs.
- 2. Atrankaus junginio, sąveikaujančio tik su rekombinantine žmogaus CA VI, tirtoje sulfonamidinių ligandų bibliotekoje nerasta. Šio baltymo sąveika su benzensulfonamidais yra silpniausia iš tirtų CA izoformų.
- 3. Pagal laisvąją Gibso energiją mutantinis žmogaus CA II baltymas su sulfonamidiniais ligandais jungiasi 71% panašiai kaip žmogaus CA VI.
- 4. Mutantinio žmogaus CA II baltymo jungimosi su etokzolamidu parametrų tikrosios vertės ($\Delta G_{tikr.} = -52,4 \pm 0,7 \text{ kJ/mol}; \Delta H_{tikr.} = -62,0 \pm 2,4 \text{ kJ/mol}$) yra artimesnės žmogaus CA VI ($\Delta G_{tikr.} = -54,4 \pm 0,8 \text{ kJ/mol}; \Delta H_{tikr.} = -58,0 \pm 3,0 \text{ kJ/mol}$), o ne žmogaus CA II ($\Delta G_{tikr.} = -58,2 \pm 0,8 \text{ kJ/mol}; \Delta H_{tikr.} = -73,0 \pm 2,1 \text{ kJ/mol}$) atitinkamiems termodinaminiams dydžiams.
- 5. Nėra statistiškai reikšmingo skirtumo tarp tirtų junginių sąveikos su rekombinantine žmogaus CA VI ir natyvia CA VI, išskirta iš žmogaus seilių, stiprumo ($p \ge 0.05$).

Justina KAZOKAITĖ

MAGISTRO DARBAS

Žmogaus karboanhidrazės VI jungimosi su sulfonamidiniais ligandais termodinaminė analizė

SANTRAUKA

Karboanhidrazės (CA, EC 4.2.1.1) katalizuoja grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją. Ji svarbi pH homeostazės palaikymui. Žmogaus organizme yra 12 kataliziškai aktyvių CA izoformų, kurios dalyvauja įvairiuose fiziologiniuose procesuose. Tarpusavyje jos skiriasi pasiskirstymu audiniuose, vieta ląstelėje bei kataliziniu efektyvumu. Kai kurių CA genų raiškos pokyčiai siejami su įvariomis ligomis, pavyzdžiui, glaukoma ar navikų vystymusi. Todėl CA yra taikinys naujų vaistinių preparatų kūrime.

CA VI yra vienintelė sekretuojama CA izoforma. Ji randama seilėse, piene ir ašarose. Šio darbo pagrindinis tikslas buvo nustatyti rekombinantinės žmogaus CA VI jungimosi su įvairiais slopikliais stebimuosius, nuo pH priklausomus termodinaminius parametrus bei įvertinti sąveikos su etokzolamidu tikrąsias, nuo pH nepriklausomas charakteristikas. Dėl mažos baltymo gryninimo išeigos sukurtas CA VI modelis – CA II mutantinis baltymas, kuris pagal aminorūgščių išsidėstymą aktyviajame centre panašus į CA VI. Be to, įvertinti rekombinantinio baltymo ir jo analogo, išskirto iš žmogaus seilių, jungimosi su slopikliais skirtumai. Fermentų jungimosi su slopikliais reakcijos matuotos izoterminės titravimo kalorimetrijos ir fluorescentiniu terminio poslinkio metodais. Nustatyta, kad CA VI su benzensulfonamidais jungiasi silpniausiai iš tirtų CA izoformų. Atrankiai tik su CA VI besijungiančio slopiklio nerasta. Parodyta, kad nėra statistiškai reikšmingo skirtumo tarp tirtų junginių sąveikų su natyvia CA VI, išskirta iš žmogaus seilių, bei rekombinantine žmogaus CA VI, išgryninta iš bakterijų. Todėl glikozilinimas, nevykstantis *E. coli*, neturi įtakos baltymo sąveikos su slopikliais stiprumui ir bakterijose susintetinta CA VI yra puikus modelis žmogaus CA VI jungimosi su slopikliais tyrimui.

Justina KAZOKAITĖ

MASTER THESIS

THERMODYNAMIC ANALYSIS OF SULFONAMIDE LIGAND BINDING TO HUMAN CARBONIC ANHYDRASE VI

SUMMARY

Main function of carbonic anhydrases (CAs, EC 4.2.1.1) is the maintenance of pH homeostasis by catalyzing the reversible hydration of carbon dioxide. There are 12 human catalytic CA isoforms. They are involved in variety of physiological processes and differ from each other in tissue localization, cellular distribution, expression levels, and catalytic activity. It has been demonstrated that abnormal levels or activities of these enzymes have been often associated with different human diseases such as glaucoma, epilepsy, and progression in many types of hypoxic tumors. Consequently, in recent years CA isozymes have become an attractive drug target.

CA VI is the only secreted isoenzyme of the human CA family. This enzyme is found in saliva, tears, and milk. This study is focused on the analysis of observed pHdependent thermodynamic parameters of the range of potential inhibitors as well as intrinsic pH-independent parameters of etoxolamide binding to human recombinant CA VI. A CA VI-mimic protein as CA VI model was created via site-directed mutagenesis of CA II such that the active site resembles that of CA VI. In addition, differences in thermodynamics of recombinant CA VI and native salivary CA VI binding with potential inhibitors were evaluated. Interactions between the enzyme and inhibitors were determined by isothermal titration calorimetry and fluorescent thermal shift assay. It was found that binding reactions of CA VI with compounds are the weakest from all CA isoforms. Moreover, this study highlights that the absence of glycosylation in *E. coli* has no significant effect on the thermodynamics of inhibitor binding to CA VI. Therefore, recombinant CA VI expressed in bacteria is a perfect model to analyze reactions of inhibitor binding to native human CA VI.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Mokslinė publikacija:

 Čapkauskaitė E, Zubrienė A, Smirnov A, Torresan J, Kišonaitė M, <u>Kazokaitė J</u>, Gylytė J, Michailovienė V, Jogaitė V, Manakova E, Gražulis S, Tumkevičius S, Matulis D. Benzenesulfonamides with pyrimidine moiety as inhibitors of human carbonic anhydrases I, II, VI, VII, XII, and XIII. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013 Nov 15;21(22):6937-6947.

Stendiniai pranešimai dalyvautose konferencijose:

- 2012 balandis. Jogaitė V., Zubrienė, A., Morkūnaitė V., <u>Kazokaitė J.</u>, Gylytė, J., Baranauskienė L., Michailovienė V., Matulienė J., Matulis D. "Thermodynamics Of Inhibitor Binding To Recombinant Human CAXII". THE 9TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON CARBONIC ANHYDRASE. Antalija; Turkija.
- 2012 balandis. Čapkauskaitė E., Zubrienė A., Baranauskienė L., Manakova E., Tamulaitienė G., <u>Kazokaitė J.</u>, Kairys V., Gražulis S., Tumkevičius S., Matulis D. "Design of [(2-Pyrimidinylthio)acetyl]benzenesulfonamides as Inhibitors of Human Carbonic Anhydrases". THE 9TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON CARBONIC ANHYDRASE. Antalija; Turkija.
- 2012 liepa. <u>Kazokaitė J.</u>, Jogaitė V., Zubrienė A., Morkūnaitė V., Michailovienė V., Matulis D. "Thermodynamics of Inhibitor Binding to Recombinant Human CAVI and CAXII". TARPTAUTINIS EPIGENETIKOS SIMPOZIUMAS. Poitiers; Prancūzija.
- 4. 2012 rugsėjis. <u>Kazokaitė J.</u>, Morkūnaitė V., Jogaitė V., Zubrienė A., Michailovienė V., Matulis D. "Thermodynamics Of Inhibitor Binding To Recombinant Carbonic Anhydrases (CA) IV, VI and XII". TARPTAUTINĖ STUDENTŲ MOKSLINĖ KONFE-RENCIJA "THE COINS". Vilnius; Lietuva.
- 2012 lapkritis. <u>Kazokaitė J.</u>, Morkūnaitė V., Jogaitė V., Zubrienė A., Michailovienė V., Matulis D. "Thermodynamics Of Inhibitor Binding To Recombinant Carbonic Anhydrases (CA) IV, VI and XII". COST CM0804 MEETING. Salerno; Italija.
- 6. 2013 kovas. <u>Kazokaitė J.</u>, Matulis D. "Thermodynamics of Ethoxzolamide Binding to Recombinant Human Carbonic Anhydrase VI". TARPTAUTINĖ STUDENTŲ MOKSLINĖ KONFERENCIJA "OPEN READINGS". Vilnius; Lietuva.
- 2013 liepa. Jogaitė V., <u>Kazokaitė J.</u>, Michailovienė V., Zubrienė, A., Matulis D. "Thermal Stability of Recombinant Human Carbonic Anhydrases II and VI". 38TH FEBS CONGRESS. Peterburgas; Rusija.

- 2013 rugpjūtis. Jogaitė V., <u>Kazokaitė J.</u>, Michailovienė V., Zubrienė, A., Matulis D. "Stability Profiles of Recombinant Human Carbonic Anhydrases II and VI". 2ND CENTRAL AND EASTERN EUROPEAN CONFERENCE ON THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY. Vilnius; Lietuva.
- 2013 spalis. <u>Kazokaitė J.</u>, Milinavičiūtė G., Gylytė J., Dudutienė V., Jogaitė V., Matulienė J., and Matulis D. "Differences in Stability Profiles and Thermodynamics of Inhibitor Binding to Carbonic Anhydrases VI and XII Expressed in *E. coli* and Mamalian Cells". 2nd CARBONIC ANHYDRASE SATELLITE MEETING. Neapolis; Vilnius.
- 10. 2014 kovas. <u>Kazokaitė J.</u>, Milinavičiūtė G., Gylytė J., Dudutienė V., Matulienė J., and Matulis D. "Differences in Stability Profiles and Thermodynamics of Inhibitor Binding to Carbonic Anhydrases VI Expressed in *E. coli*, Mamalian Cells and Human Saliva". TARPTAUTINĖ STUDENTŲ MOKSLINĖ KONFERENCIJA "THE COINS". Vilnius; Lietuva.
- 11. 2014 kovas. <u>Kazokaitė J.</u>, Milinavičiūtė G., Gylytė J., Dudutienė V., Matulienė J., and Matulis D. "Differences in Stability Profiles and Thermodynamics of Inhibitor Binding to Carbonic Anhydrases VI Expressed in *E. coli*, Mamalian Cells and Human Saliva". TARPTAUTINĖ STUDENTŲ MOKSLINĖ KONFERENCIJA "OPEN READINGS". Vilnius; Lietuva.
- 12. 2014 gegužė. <u>Kazokaitė J.</u>, Milinavičiūtė G., Gylytė J., Dudutienė V., Matulienė J., and Matulis D. "Differences in Stability Profiles and Thermodynamics of Inhibitor Binding to Target Protein Purified from *E. coli*, Mamalian Cells and Human Saliva". EUROPEAN BIOTECHNOLOGY CONGRESS. Lecce; Italija.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Aaron JA, Chambers JM, Jude KM, Di Costanzo L, Dmochowski IJ, Christianson DW. Structure of a 129Xe-cryptophane biosensor complexed with human carbonic anhydrase II. J Am Chem Soc. 2008;130(22):6942–6943.
- Aggarwal M, Boone CD, Kondeti B, McKenna R. Structural annotation of human carbonic anhydrases. J Enzyme Inhib Med Chem. 2013;28(2):267–277.
- Almstedt K, Rafstedt T, Supuran CT, Carlsson U, Hammarström P. Small-molecule suppression of misfolding of mutated human carbonic anhydrase II linked to marble brain disease. Biochemistry. 2009;48(23):5358–5364.
- Alterio V, Fiore AD, Ambrosio K, Supuran CT, Simone GD. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? Chem Rev. 2012;112 (8):4421–4468.
- Čapkauskaitė E, Baranauskienė L, Golovenko D, Manakova E, Gražulis S, Tumkevičius S, Matulis D. Indapamide-like benzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrases I, II, VII, and XIII. Bioorg Med Chem. 2010;18(21):7357–7364.
- Čapkauskaitė E, Zubrienė A, Smirnov A, Torresan J, Kišonaitė M, Kazokaitė J, Gylytė J, Michailovienė V, Jogaitė V, Manakova E, Gražulis S, Tumkevičius S, Matulis D. Benzenesulfonamides with pyrimidine moiety as inhibitors of human carbonic anhydrases I, II, VI, VII, XII, and XIII. Bioorg Med Chem. 2013;21(22):6937–6947.
- Arechederra RL, Waheed A, Sly WS, Supuran CT, Minteer SD. Effect of sulfonamides as carbonic anhydrase VA and VB inhibitors on mitochondrial metabolic energy conversion. Bioorg Med Chem. 2013;21(6):1544–1548.
- Aspatwar A, Tolvanen MEE, Jokitalo E, Parikka M, Ortutay C, Harjula SKE, Rämet M, Vihinen M, Parkkila S. Abnormal cerebellar development and ataxia in CARP VIII morphant zebrafish. Hum Mol Genet. 2013;22(3):417–432.
- Baranauskienė L, Matulis D. Intrinsic thermodynamics of ethoxzolamide inhibitor binding to human carbonic anhydrase XIII. BMC Biophys. 2012;5:12.
- Benej M, Pastorekova S, Pastorek J. Carbonic Anhydrase IX: Regulation and Role in Cancer. Subcell Biochem. 2014;75:199–219.
- Bian Y, Rong Z, Chang TMS. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase-carbonic anhydrase: a novel biotechnology-based blood substitute that transports both oxygen and carbon dioxide and also acts as an antioxidant. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 2012;40(1-2):28–37.

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248– 254.
- Capasso C, De Luca V, Carginale V, Cannio R, Rossi M. Biochemical properties of a novel and highly thermostable bacterial alpha-carbonic anhydrase from Sulfurihydrogenibium yellowstonense YO3AOP1. J Enzyme Inhib Med Chem. 2012;27(6):892–897.
- Chodera JD, Mobley DL. Entropy-enthalpy compensation: role and ramifications in biomolecular ligand recognition and design. Annu Rev Biophys. 2013;42:121–142.
- Chow SC, Liu JP. Design and Analysis of Clinical Trials– Concepts and Methodologies. John Wiley & Sons, 3 edition. 2013.
- Cimmperman P, Baranauskienė L, Jachimovičiūtė S, Jachno J, Torresan J, Michailovienė V, Matulienė J, Sereikaitė J, Bumelis V, Matulis D. A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. Biophys J. 2008;95(7):3222–3231.
- Cimmperman P, Matulis D. Protein thermal denaturation measurements via a fluorescent dye, chapter 8, 247–274. RSC Publishing. 2011;.
- Ciulli A. Biophysical screening for the discovery of small-molecule ligands. Methods Mol Biol. 2013;1008:357–388.
- Cowan RM, Ge JJ, Qin YJ, McGregor ML, Trachtenberg MC. CO2 capture by means of an enzyme-based reactor. Ann N Y Acad Sci. 2003;984:453–469.
- Damian L. Isothermal titration calorimetry for studying protein-ligand interactions. Methods Mol Biol. 2013;1008:103–118.
- De Simone G, Vitale RM, Di Fiore A, Pedone C, Scozzafava A, Montero JL, Winum JY, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: Hypoxia-activatable sulfonamides incorporating disulfide bonds that target the tumor-associated isoform IX. J Med Chem. 2006;49(18):5544–5551.
- Del Prete S, Vullo D, Scozzafava A, Capasso C, Supuran CT. Cloning, characterization and anion inhibition study of the δ -class carbonic anhydrase (TweCA) from the marine diatom Thalassiosira weissflogii. Bioorg Med Chem. 2014;22(1):531–537.
- Domsic JF, Avvaru BS, Kim CU, Gruner SM, Agbandje-McKenna M, Silverman DN, McKenna R. Entrapment of carbon dioxide in the active site of carbonic anhydrase II. J Biol Chem. 2008;283(45):30766–30771.

- Durdagi S, Şentürk M, Ekinci D, Balaydın HT, Göksu S, Irfan Küfrevioğlu, Innocenti A, Scozzafava A, Supuran CT. Kinetic and docking studies of phenol-based inhibitors of carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII evidence a new binding mode within the enzyme active site. Bioorg Med Chem. 2011;19(4):1381–1389.
- Emameh RZ, Barker H, Tolvanen MEE, Ortutay C, Parkkila S. Bioinformatic analysis of beta carbonic anhydrase sequences from protozoans and metazoans. Parasit & Vectors. 2014;7:38.
- Engstrand C, Jonsson BH, Lindskog S. Catalytic and inhibitor-binding properties of some active-site mutants of human carbonic anhydrase I. Eur J Biochem. 1995;229(3):696–702.
- Feldstein JB, Silverman DN. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. J Biol Chem. 1984;259(9):5447–5453.
- Fernley RT, Wright RD, Coghlan JP. A novel carbonic anhydrase from the ovine parotid gland. FEBS Lett. 1979;105(2):299–302.
- Fernley RT, Wright RD, Coghlan JP. Complete amino acid sequence of ovine salivary carbonic anhydrase. Biochemistry. 1988;27(8):2815–2820.
- Ferry JG. Carbonic anhydrases of anaerobic microbes. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2013;21(6):1392–1395.
- Friedenwald J. The formation of the intraocular fluid. Am J Ophthalmol. 1949;32 Pt. 2(6):9–27.
- Frost SC. Physiological functions of the alpha class of carbonic anhydrases. Subcell Biochem. 2014;75:9–30.
- Garbett NC, Chaires JB. Thermodynamic studies for drug design and screening. Expert Opin Drug Discov. 2012;7(4):299–314.
- González JM, Fisher SZ. Carbonic anhydrases in industrial applications. Subcell Biochem. 2014;75:405–426.
- Han D KSTXTLZY Boissiere O. Two-way CO2-switchable triblock copolymer hydrogels. Macromolecules. 2012;45:7440–7445.
- Hann MM, Keserü GM. Finding the sweet spot: the role of nature and nurture in medicinal chemistry. Nat Rev Drug Discov. 2012;11(5):355–365.
- Hassan MI, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. Bioorg Med Chem. 2013;21(6):1570–1582.

- Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. Decreased parotid saliva gustin/carbonic anhydrase VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. Am J Med Sci. 1999;318(6):380–391.
- Holdgate G, Geschwindner S, Breeze A, Davies G, Colclough N, Temesi D, Ward L. Biophysical methods in drug discovery from small molecule to pharmaceutical. Methods Mol Biol. 2013;1008:327–355.
- Hunt JA, Fierke CA. Selection of carbonic anhydrase variants displayed on phage. Aromatic residues in zinc binding site enhance metal affinity and equilibration kinetics. J Biol Chem. 1997;272(33):20364–20372.
- Jiang W, Gupta D. Structure of the carbonic anhydrase VI (CA6) gene: evidence for two distinct groups within the alpha-CA gene family. Biochem J. 1999;344 Pt 2:385–390.
- Kaar JL, Oh HI, Russell AJ, Federspiel WJ. Towards improved artificial lungs through biocatalysis. Biomaterials. 2007;28(20):3131–3139.
- Karhumaa P, Leinonen J, Parkkila S, Kaunisto K, Tapanainen J, Rajaniemi H. The identification of secreted carbonic anhydrase VI as a constitutive glycoprotein of human and rat milk. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(20):11604–11608.
- Kaseda M, Ichihara N, Nishita T, Amasaki H, Asari M. Immunohistochemistry of the bovine secretory carbonic anhydrase isozyme (CA-VI) in bovine alimentary canal and major salivary glands. J Vet Med Sci. 2006;68(2):131–135.
- Keilin D, Mann T. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. Biochem J. 1940;34(8-9):1163–1176.
- Khalifah RG. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. I. Stopflow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. J Biol Chem. 1971; 246(8):2561–2573.
- Kimoto M, Kishino M, Yura Y, Ogawa Y. A role of salivary carbonic anhydrase VI in dental plaque. Arch Oral Biol. 2006;51(2):117–122.
- Kinsey V, Barany E. The rate of flow of aqueous humor; derivation of rate of flow and its physiologic significance. Am J Ophthalmol. 1949;32 Pt. 2(6):189–202.
- Kivela J, Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H. A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. Caries Res. 1999;33(3):178–184.
- Klebe G. Drug Design: Methodology, Concepts, and Mode-of-Action. Springer Verlag. 2013.

- Koç Öztürk L, Ulucan K, Akyüz S, Furuncuoğlu H, Bayer H, Yarat A. The investigation of genetic polymorphisms in the carbonic anhydrase VI gene exon 2 and salivary parameters in type 2 diabetic patients and healthy adults. Mol Biol Rep. 2012;39(5):5677–5682.
- Krishnamurthy V, Kaufman G, Urbach A, Gitlin I, Gudiksen K, Weibel D, Whitesides G. Carbonic Anhydrase as a Model for Biophysical and Physical-Organic Studies of Proteins and Protein-Ligand Binding. Chem Rev. 2008;108:946–1051.
- Krishnamurthy VM, Bohall BR, Kim CY, Moustakas DT, Christianson DW, Whitesides GM. Thermodynamic parameters for the association of fluorinated benzenesulfonamides with bovine carbonic anhydrase II. Chem Asian J. 2007;2(1):94–105.
- Leinonen JS, Saari KA, Seppänen JM, Myllylä HM, Rajaniemi HJ. Immunohistochemical demonstration of carbonic anhydrase isoenzyme VI (CA VI) expression in rat lower airways and lung. J Histochem Cytochem. 2004;52(8):1107–1112.
- Liljas A, Laurberg M. A wheel invented three times. The molecular structures of the three carbonic anhydrases. EMBO Rep. 2000;1(1):16–17.
- Liu Z, Bartlow P, Dilmore RM, Soong Y, Pan Z, Koepsel R, Ataai M. Production, purification, and characterization of a fusion protein of carbonic anhydrase from Neisseria gonorrhoeae and cellulose binding domain from Clostridium thermocellum. Biotechnol Prog. 2009;25(1):68–74.
- Lo MC, Aulabaugh A, Jin G, Cowling R, Bard J, Malamas M, Ellestad G. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. Anal Biochem. 2004;332(1):153–159.
- Matthews TA, Abel A, Demme C, Sherman T, Pan Pw, Halterman MW, Parkkila S, Nehrke K. Expression of the CHOP-inducible carbonic anhydrase CAVI-b is required for BDNF-mediated protection from hypoxia. Brain Res. 2014;1543:28–37.
- Matulis D, Kranz JK, Salemme FR, Todd MJ. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. Biochemistry. 2005;44(13):5258–5266.
- Meldrum N, Roughton F. Carbonic Anhydrase. Its preparation and properties. J Physiol. 1933;80(2):113–142.
- Menchise V, De Simone G, Alterio V, Di Fiore A, Pedone C, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: stacking with Phe131 determines active site binding region of inhibitors as exemplified by the X-ray crystal structure of a membraneimpermeant antitumor sulfonamide complexed with isozyme II. J Med Chem. 2005; 48(18):5721–5727.

- Morkūnaitė V, Gylytė J, Zubrienė A, Baranauskienė L, Kišonaitė M, Michailovienė V, Juozapaitienė V, Todd MJ, Matulis D. Intrinsic thermodynamics of sulfonamide inhibitor binding to human carbonic anhydrases I and II. J Enzyme Inhib Med Chem. 2014;1–8.
- Murakami H, Sly WS. Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. J Biol Chem. 1987;262(3):1382–1388.
- Murri-Plesko MT, Hulikova A, Oosterwijk E, Scott AM, Zortea A, Harris AL, Ritter G, Old L, Bauer S, Swietach P, Renner C. Antibody inhibiting enzymatic activity of tumour-associated carbonic anhydrase isoform IX. Eur J Pharmacol. 2011;657(1-3):173–183.
- Ogawa Y, Matsumoto K, Maeda T, Tamai R, Suzuki T, Sasano H, Fernley RT. Characterization of lacrimal gland carbonic anhydrase VI. J Histochem Cytochem. 2002; 50(6):821–827.
- Parkkila S, Kaunisto K, Rajaniemi L, Kumpulainen T, Jokinen K, Rajaniemi H. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. J Histochem Cytochem. 1990;38(7):941–947.
- Parkkila S, Parkkila AK, Lehtola J, Reinilä A, Södervik HJ, Rannisto M, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase protects gastroesophageal mucosa from acid injury. Dig Dis Sci. 1997;42(5):1013–1019.
- Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H. Circadian periodicity in salivary carbonic anhydrase VI concentration. Acta Physiol Scand. 1995;154(2):205–211.
- Pastorekova S, Parkkila S, Zavada J. Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. Adv Clin Chem. 2006;42:167–216.
- Peña KL, Castel SE, de Araujo C, Espie GS, Kimber MS. Structural basis of the oxidative activation of the carboxysomal gamma-carbonic anhydrase, CcmM. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(6):2455–2460.
- Peres RCR, Camargo G, Mofatto LS, Cortellazzi KL, Santos MCLG, Nobre-dos Santos M, Santos MN, Bergamaschi CC, Line SRP. Association of polymorphisms in the carbonic anhydrase 6 gene with salivary buffer capacity, dental plaque pH, and caries index in children aged 7-9 years. Pharmacogenomics J. 2010;10(2):114–119.
- Pilka ES, Kochan G, Oppermann U, Yue WW. Crystal structure of the secretory isozyme of mammalian carbonic anhydrases CA VI: implications for biological assembly and inhibitor development. Biochem Biophys Res Commun. 2012;419(3):485–489.

- Pinard MA, Boone CD, Rife BD, Supuran CT, McKenna R. Structural study of interaction between brinzolamide and dorzolamide inhibition of human carbonic anhydrases. Bioorg Med Chem. 2013;21(22):7210–7215.
- Rogez-Florent T, Duhamel L, Goossens L, Six P, Drucbert AS, Depreux P, Danzé PM, Landy D, Goossens JF, Foulon C. Label-free characterization of carbonic anhydrasenovel inhibitor interactions using surface plasmon resonance, isothermal titration calorimetry and fluorescence-based thermal shift assays. J Mol Recognit. 2014;27(1):46–56.
- Ruusuvuori E, Huebner AK, Kirilkin I, Yukin AY, Blaesse P, Helmy M, Kang HJ, El Muayed M, Hennings JC, Voipio J, Šestan N, Hübner CA, Kaila K. Neuronal carbonic anhydrase VII provides GABAergic excitatory drive to exacerbate febrile seizures. EMBO J. 2013;32(16):2275–2286.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, USA, 2 edition. 1989.
- Samukawa M, Shen C, Hopkinson BM, Matsuda Y. Localization of putative carbonic anhydrases in the marine diatom, Thalassiosira pseudonana. Photosynth Res. 2014;in press.
- Scozzafava A, Menabuoni L, Mincione F, Briganti F, Mincione G, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis of water-soluble, topically effective, intraocular pressure-lowering aromatic/heterocyclic sulfonamides containing cationic or anionic moieties: is the tail more important than the ring? J Med Chem. 1999;42(14):2641– 2650.
- Scozzafava A, Supuran CT. Glaucoma and the applications of carbonic anhydrase inhibitors. Subcell Biochem. 2014;75:349–359.
- Shah GN, Rubbelke TS, Hendin J, Nguyen H, Waheed A, Shoemaker JD, Sly WS. Targeted mutagenesis of mitochondrial carbonic anhydrases VA and VB implicates both enzymes in ammonia detoxification and glucose metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(18):7423–7428.
- Siebels M, Rohrmann K, Oberneder R, Stahler M, Haseke N, Beck J, Hofmann R, Kindler M, Kloepfer P, Stief C. A clinical phase I/II trial with the monoclonal antibody cG250 (RENCAREX®) and interferon-alpha-2a in metastatic renal cell carcinoma patients. World J Urol. 2011;29(1):121–126.
- Sly WS, Hu PY. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. Annu Rev Biochem. 1995;64:375–401.

- Smeulders M, Barends T, Pol A, Scherer A, Zandvoort M, Udvarhelyi A, Khadem A, Menzel A, Hermans J, Shoeman R, Wessels H, den Heuvel LV, Russ L, Schlichting I, Jetten M, den Camp HO. Evolution of a new enzyme for carbon disulphide conversion by an acidothermophilic archaeon. Nature. 2011;478(7369):412–6.
- Sok J, Wang XZ, Batchvarova N, Kuroda M, Harding H, Ron D. CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. Mol Cell Biol. 1999;19(1):495–504.
- Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. Nat Rev Drug Discov. 2008;7(2):168–181.
- Svastová E, Hulíková A, Rafajová M, Zaťovicová M, Gibadulinová A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastoreková S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. FEBS Lett. 2004;577(3):439–445.
- Tafreshi NK, Lloyd MC, Bui MM, Gillies RJ, Morse DL. Carbonic Anhydrase IX as an Imaging and Therapeutic Target for Tumors and Metastases. Subcell Biochem. 2014; 75:221–254.
- Tellinghuisen J. A study of statistical error in isothermal titration calorimetry. Anal Biochem. 2003;321(1):79–88.
- Temperini C, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase activation and the drug design. Curr Pharm Des. 2008;14(7):708–15.
- Thompson R, Jones E. Enzyme-based fiber optic zinc biosensor. Anal Chem. 1993; 65:730–734.
- Türkmen S, Guo G, Garshasbi M, Hoffmann K, Alshalah AJ, Mischung C, Kuss A, Humphrey N, Mundlos S, Robinson PN. CA8 mutations cause a novel syndrome characterized by ataxia and mild mental retardation with predisposition to quadrupedal gait. PLoS Genet. 2009;5(5):e1000487.
- Turkoglu S, Maresca A, Alper M, Kockar F, Işık S, Sinan S, Ozensoy O, Arslan O, Supuran CT. Mutation of active site residues Asn67 to Ile, Gln92 to Val and Leu204 to Ser in human carbonic anhydrase II: influences on the catalytic activity and affinity for inhibitors. Bioorg Med Chem. 2012;20(7):2208–2213.
- Wang M, Zhang Q, Liu FC, Xie WF, Wang GD, Wang J, Gao QH, Duan K. Familywide expression characterization of Arabidopsis beta-carbonic anhydrase genes using qRT-PCR and Promoter:GUS fusions. Biochimie. 2014;97:219–227.

- Winum JY, Poulsen SA, Supuran CT. Therapeutic applications of glycosidic carbonic anhydrase inhibitors. Med Res Rev. 2009;29(3):419–435.
- Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. Anal Biochem. 1989;179(1):131– 137.
- Xu Y, Feng L, Jeffrey PD, Shi Y, Morel FM. Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. Nature. 2008;452(7183):56–61.
PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju Prof. Daumantui Matuliui už galimybę atlikt magistro darbą VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje bei vertingas diskusijas ir patarimus rašant šį darbą. Taip pat dėkoju kasdien mane supusiems žmonėms, ypač Dr. Vaidai Juozapaitienei ir j. m. d. Vilmai Michailovienei už kritinio mąstymo genų inžinerijos ir baltymų gryninimo srityse suformavimą, Dr. Astai Zubienei ir Dr. Linai Baranauskienei už naudingus patarimus atliekant termodinaminius tyrimus, Joanai Smirnovienei už bendradarbiavimą katalizinio aktyvumo tyrimuose, Miglei Kišonaitei ir Dr. Vytautui Petrauskui už pagalbą baigiamojo darbo apipavidalinime \PTEXprograma, Dr. E. Čapkauskaitei ir Dr. V. Dudutienei už susintetintus junginius, Alexey Smirnov už išspręstą rekombinantinės žmogaus CA VI kristalinę struktūrą, Dr. V. Smirnovui už masių spektroskopijos tyrimus, ir studentei Godai Milinavičiūtei už aktyvų dalyvavimą mokantis darbe aprašytų metodų bei pagalbą juos atliekant. Ačiū visam kolektyvui už draugišką aplinką.

Bioorganic & Medicinal Chemistry 21 (2013) 6937-6947



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Benzenesulfonamides with pyrimidine moiety as inhibitors of human carbonic anhydrases I, II, VI, VII, XII, and XIII



Edita Čapkauskaitė^a, Asta Zubrienė^a, Alexey Smirnov^a, Jolanta Torresan^a, Miglė Kišonaitė^a, Justina Kazokaitė^a, Joana Gylytė^a, Vilma Michailovienė^a, Vaida Jogaitė^a, Elena Manakova^b, Saulius Gražulis^b, Sigitas Tumkevičius^c, Daumantas Matulis^{a,*}

^a Department of Biothermodynamics and Drug Design, Institute of Biotechnology, Vilnius University, Graičiūno 8, Vilnius LT-02241, Lithuania ^b Department of Protein–DNA Interactions, Institute of Biotechnology, Vilnius University, Graičiūno 8, Vilnius LT-02241, Lithuania ^c Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Vilnius University, Naugarduko 24, Vilnius LT-03225, Lithuania

ARTICLE INFO

Article history: Received 2 July 2013 Revised 6 September 2013 Accepted 11 September 2013 Available online 20 September 2013

Keywords: Carbonic anhydrase isozymes Isothermal titration calorimetry Thermal shift assay ThermoFluor® Sulfonamides as CA inhibitors Pyrimidine

ABSTRACT

Two groups of benzenesulfonamide derivatives, bearing pyrimidine moieties, were designed and synthesized as inhibitors of carbonic anhydrases (CA). Their binding affinities to six recombinant human CA isoforms I, II, VI, VII, XII, and XIII were determined by the thermal shift assay (TSA). The binding of several inhibitors was measured by isothermal titration calorimetry (ITC). Direct demonstration of compound inhibition was achieved by determining the inhibition constant by stopped-flow CO₂ hydration assay. The most potent compounds demonstrated selectivity towards isoform I and affinities of 0.5 nM. The crystal structures of selected compounds in complex with CA II, XII, and XIII were determined to atomic resolution. Compounds described here were compared with previously published pyrimidinebenzenesulfonamides.¹ Systematic structure–activity analysis of 40 compound interactions with six isoforms yields clues for the design of compounds with greater affinities and selectivities towards target CA isoforms.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Carbonic anhydrases (CAs) are ubiquitous metalloenzymes that catalyze the hydration of carbon dioxide to bicarbonate. There are 12 catalytically active and highly homologous CA isoforms in human body.^{2–4} Most CA isozymes constitute targets for the design and development of CA inhibitors for clinical applications. Classical CA inhibitors are aromatic sulfonamides.^{3,5–7} There are at least 30 clinically used CA inhibitors as drugs and more in clinical development.² Diffuse localization of CA isoforms in many tissues/organs limits potential pharmacological applications.^{7–10} The design of isozyme-specific inhibitors is the current challenge in the development of new therapeutic agents.

In our previous studies,¹ the synthesis of 4-substituted-benzenesulfonamides and 5-substituted-2-chlorobenzensulfonamides of series **1** and **4** incorporating phenyl or pyrimidine moieties have been described (Fig. 1). These compounds exhibited nanomolar affinities toward CA isozymes I, II, VII, and XIII. In most cases, the compounds bearing 2-Cl-benzenesulfonamide headgroup (compounds **4**) had lower binding affinity than benzenesulfonamide headgroup (compounds 1). Introduction of the pyrimidine substituent instead of benzene weakened the binding affinity to all tested CAs. However, pyrimidine-bearing compounds were more selective towards a particular CA isozyme.

The S-alkylated benzimidazoles are stronger CA binders than Nalkylated benzimidazoles and indapamide.¹¹ Therefore, compounds **1–4** were designed as the S-alkylated pyrimidines. Here we have designed [(2-pyrimidinylthio)acetyl]benzenesulfonamides **2a–j**, **3a–j** (Scheme 1) in the search for more potent and selective CA inhibitors. Furthermore, the binding measurements of compounds **1(a–j)** and **4(a–j)** have been extended to the catalytic domain of recombinant human CA VI and CA XII that has been implicated in cancer.^{8,12,13} The compounds are grouped according to four headgroups (compounds **1–4**) and were compared with each other according to their CA affinity and atomic position in crystal structures with CA II, XII, and XIII.

Detailed compound structure–affinity correlations were drawn. Comparison between the six tested CA isoforms showed selectivity profiles towards CA I, II, VII, and XIII. The correlations are useful for the design of compounds with greater affinities and selectivities towards target CA isoform and the development of lead compounds for therapeutic applications.

^{*} Corresponding author. Tel.: +370 5 269 1884; fax: +370 5 260 2116. E-mail addresses: daumantas.matulis@bti.vu.lt, matulis@ibt.lt (D. Matulis).

^{0968-0896/\$ -} see front matter @ 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.029



Figure 1. The structures of S-alkylated pyrimidine derivative compounds. Compounds are grouped into four sulfonamide headgroups (**1–4**) and 10 tailgroups (**a–j**) totaling 40 compounds. Compounds of series **1** and **4** have been published previously.¹



Scheme 1. Synthesis of compounds 2a-j and 3a-j.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

A series of benzenesulfonamides with a pyrimidine moietybearing substituent 1-4(a-j) were designed and synthesized as CA inhibitors (Fig. 1). The synthesis of S-alkylated pyrimidines 1(a-j) and 4(a-j) have been described previously.¹ S-substituted pyrimidine derivatives 2-3(a-j) were prepared by S-alkylation of pyrimidines a-j with 4-(bromoacetyl)-2-chlorobenzenesulfonamide (2) and 3-(bromoacetyl)benzenesulfonamide (3) using the same reaction conditions as described previously (Scheme 1).

2.1.1. Binding and inhibition studies

The dissociation constants K_d for compounds **1–4(a–j**) binding to six CA isozymes CA I, II, VI, VII, XII, and XIII were determined by the thermal shift assay (TSA). Standard compounds such as indapamide (IND), acetazolamide (AZM), and ethoxzolamide (EZA) were used as controls. The K_d s of all newly synthesized inhibitors of series **2–3(a–j**) are summarized in Table 1. The K_d values for compounds of series **1(a–j**) and **4(a–j**) from our earlier publication¹ are also shown, providing additional data for the catalytic domain of recombinant CA VI and cancer-associated isoform CA XII.

Several selected compounds, namely, **2a**, **2f**, and **2h**, were chosen to determine their affinities towards CAs I, II, VII, XII, and XIII by isothermal titration calorimetry (ITC) in order to compare with the TSA measurements (Table 2). ITC is a standard and convenient method to measure ligand affinities in the 10–1000 nM range. However, it consumes significantly more protein than TSA and has limitations in determining affinities stronger than 10 nM due to Wiseman factor¹⁴ exceeding 1000 at such conditions. Our measured K_{ds} by ITC confirmed the TSA measurements with the discrepancy in most cases not exceeding two fold in K_{d} . This confirmed the sufficient precision of TSA data.

Furthermore, CA II inhibition constant K_i for compounds **2f** and **3h** was determined using stop flow method which directly measures CO₂ hydration.^{15,16} The K_is were equal to 11 and 167 nM, for **2f** and **3h**, respectively. The values were slightly lower than the ones determined by TSA, most likely due to the different temperatures used in TSA experiment (37 °C) as compared to the stop-flow CO₂ hydration experiment (25 °C). However, there was a general agreement between two methods and it directly confirmed that such compounds were inhibitors of CA.

All three techniques showed that the *meta*-substituted benzenesulfonamides were less potent binders of all tested CAs than the *para*-substituted benzenesulfonamides. Figure 2 shows the CA VII melting curves (panels A and B) and the concentration-response curves of compounds **2j** and **3j** (panel C) obtained by TSA. Compound **2j** exhibited approximately 1000 times higher affinity to CA VII than the *meta*-substituted benzenesulfonamide **3j**.

Figure 2, panel D shows typical ligand dosing curves for several selected compounds binding to CA I obtained by TSA. The strongest stabilization effect on CA I has compound **2d**, it increased the melting temperature of protein by more than 10 °C depending on ligand concentration. The K_d value for **2d** was equal to 0.5 nM while 500 nM for **3c**.

In order to draw some conclusions and estimate compound headgroup and tail contributions to affinity, the averaged $\log K_d$ were drawn for each group of compounds for each CA (Fig. 3). There were four sulfonamide headgroups thus dividing the synthesized compounds in four series. The uncertainties in the bar chart show the range of K_d s for all tails (**a**–**j**) tested against each CA isoform. They are not the error bars but instead show the range of affinities covered by all tested compounds.

Several conclusions were drawn from this analysis. First, the position of the sulfonamide group on the headgroup benzene ring significantly influenced the binding strength to various CA isoforms. In most cases, the *para*-substituted benzenesulfonamide (compounds 1-2(a-j)) had higher binding affinity than their *meta*substituted benzenesulfonamide equivalents (compounds 3-4(a-j)). Second, the compounds bearing a chlorine atom in the benzenesulfonamide headgroup (compounds of series 2 and 4) had higher binding affinities than their analogs without chlorine (compounds of series 1 and 3).

According to this brief analysis the compound series could be sorted by activity in ascending order: 3 < 4 < 1 < 2. Interestingly, the biggest difference between the lowest and highest K_d values was for compounds 1(a-j) binding to CA XIII. This difference was equal to two, which corresponds to difference in K_{ds} by 100 times. As seen from the ranges, the substituents on pyrimidine ring tailgroup significantly influenced the binding affinities to CAs. The weakest binding CA isozyme was CA VI, especially for 1-3. Compounds 4(a-j) were weakest binders of CA I. In contrast, compounds 1-3 showed higher binding affinity for CA I than for other CAs.

The compounds can also be divided into two groups according to their pyrimidine tailgroups: oxopyrimidines (1-4(a-e)) and pyrimidines without the oxo group (1-4(f-j)). In the most cases, the compounds 1(a-j) exhibited strongest binding to CA I, II, and XIII. Pyrimidines without oxo group showed better binding affinity for CA II ($K_d = 12.5-16.7$ nM, except 1f) and CA VII ($K_d = 55.6-125$ nM) than oxopyrimidines ($K_d = 18-83$ and 143-250 nM, respectively). Conversely, CA XII was better bound by oxopyrimidines ($K_d = 909-1430$ nM, except 1j). Oxopyrimidine 1d with *tert*-butyl substituent exhibited highest binding affinity for CA I and XIII ($K_d = 1.9$ and 3.5 nM, respectively) among compounds of this series. Carbon chain elongation in the 5th position of the pyrimidine ring 1(g-i) did not affect the binding affinity by more than two fold to any of tested CAs.

Table 1 Compound dissociation constants for human recombinant CA isoforms I, II, VI, VII, XII, and XIII, determined by the thermal shift assay (TSA, 37 °C, pH 7.0)

Inhibitor	R ³	\mathbb{R}^4	R ⁵	Dissociation constants <i>K</i> _d (nM) for CA isoforms						
				CA I	CA II	CA VI	CA VII	CA XII	CA XIII	
1a				66.7	66.7	3700	167	556	357	
2a	OH	Н	Me	4.00	21.3	2500	35.7	333	33.3	
3a				833	1250	7100	4000	3700	1570	
4a				833	200	900	133	500	200	
1b				33.3	25.0	1300	143	714	13.0	
2b	OH	Bn	Me	20.0	66.7	1900	100	1110	25.0	
3b				2220	1110	3300	12,500	8330	1430	
4b				455	33.3	290	143	294	42.0	
1c				17.2	83.3	1250	250	90.9	62.5	
2c	OH	Н	Pr	10.0	111	4500	50.0	250	83.3	
3c				500	500	13,000	3330	2000	833	
4c				667	66.7	830	55.6	100	55.6	
1d				1.9	29.0	5000	180	143	3.5	
2d	OH	Н	t-Bu	0.50	40.0	9100	11.1	333	5.0	
3d				100	500	40,000	500	1250	167	
4d				100	50.0	2000	20.0	43.5	25.0	
1e				17.0	18.0	2500	200	370	286	
2e	OH	CO ₂ Et	Н	14.3	20.0	2800	25.0	250	76.9	
3e				1250	667	2100	1000	1250	2220	
4e				1250	50.0	200	25.0	200	125	
1f				22.2	33.3	2500	125	909	83.3	
2f	Me	Н	Me	5.00	16.7	2900	12.5	909	10.0	
3f				370	1000	13,000	6670	3330	1000	
4f				1000	222	1000	333	1430	333	
1g				30.3	12.5	5000	55.6	1000	28.6	
2g	Н	Et	Н	6.67	7.14	5000	10.0	286	2.08	
3g				500	667	8300	2500	3850	556	
4g				1820	143	670	333	1250	111	
1h				33.3	12.5	5000	66.7	1430	22.7	
2h	Н	Pr	Н	5.26	7.14	3300	16.7	345	1.25	
3h				370	556	5000	3330	4170	333	
4h				1000	100	1100	500	1110	67.0	
11		Der	п	41.7	14.3	5000	100	1430	28.6	
21	н	ви	н	6.25	7.09	3330	11.1	337	1.82	
31				500	313	4300	2220	1820	278	
41 1:				1430	167	3UU 010	200	1110	125	
1) 2:	п	ш	п	100./	10.7	910	5.00	220	125	
4j 2:	н	н	н	10.0	11.1	2000	5.00	2220	10.7	
-) 4:				/09	1110	1900	4000	3330	1330	
++j INID				4000	333	250	/ 14	10/0	333 100	
11ND E7A				14.0	0.71	230	0.71	26.0	12.0	
				14.0	17.0	33.U 190	17.0	122	15.0	
				1400	17.0	100	17.0	100	50.0	

Average standard deviation for TSA data was below 25%. The K_d for compounds 1(a-j) and 4(a-j) binding to CA I, II, VII, and XIII are taken from our previously published data.¹

Table 2Selected compound dissociation constants for human recombinant CA isoforms I, II,VII, XII, and XIII, determined by isothermal titration calorimetry (ITC, 37 °C, pH 7.0)

Compound	Dissociation constants $K_{\rm d}$ (nM), CA isoforms								
	CA I	CA II	CA VII	CA XII	CA XIII				
2a 2f 2h	≤10 ≤10 ≤10	20.2 14.5 9.9	87.5 60.6 26.0	278 461 282	37.5 8.1 ≼10				

In the whole series, the compounds $2(\mathbf{a}-\mathbf{j})$ had the highest binding affinity to CA I, II, VII, and XIII. Pyrimidines without oxo group exhibited the strongest binding to CA II ($K_d = 7.1-16.7$ nM), VII ($K_d = 5.0-16.7$ nM), and XIII ($K_d = 1.3-16.7$ nM) than oxopyrimidines ($K_d = 20-111$ nM, and 25–100 nM, except **2d**, and 25– 83 nM, except **2d**, respectively). Carbon chain elongation in the 5th position **2**(**g**-**i**) did not significantly affect the binding affinity for CAs but the introduction of carbon chain significantly increased the affinity for CA XIII (K_d s in the range 1.3–2.1 nM) by more than eight times as compared to a unsubstituted pyrimidine **2j** ($K_d = 16.7$ nM). Compound **2j** bearing no substituent was the most potent CA VII inhibitor ($K_d = 5$ nM). Compounds **3**(**a**–**j**) were the weakest CA II, VI, VII, XII, and XIII inhibitors (K_{ds} in the range 170–40000 nM). Most of them had higher affinity only to CA I, with the exception for oxopyrimidines **3b** and **3e** bearing bulky substituents in 5th position, which bound to CA I with micromolar affinity (K_{ds} 2.2 and 1.3 μ M, respectively). *tert*-Butyl substituted compound **3d** had the highest binding affinity to CA I (K_{d} = 100 nM) and XIII (K_{d} = 167 nM).

Compounds **4** exibited several interesting features. First, as mentioned above, compounds **4**(**a**-**j**) showed inverted CA I inhibition properties as compared with series **1**–**3**. Second, the influence of oxo group in pyrimidines to CA II and VII binding was reversed. Oxopyrimidines exhibited stronger binding to CA I (K_d = 100–830 nM, except **4e**), II (K_d = 33–67 nM, except **4a**), VI (K_d = 200–900 nM), VII (K_d = 20.0–143 nM), and XII (K_d = 44–500 nM) than pyrimidines without oxo group (K_d = 1000–4550 nM (CA I), 67–333 nM (CA II), 560–1100 nM (CA VI), 200–714 nM (CA VII), and 1110–1670 nM (CA XII), respectively). Compound **4d** was the best inhibitor of CA XII in the whole series of tested compounds (K_d = 44 nM), while compound **4e** was the most potent CA VI inhibitor.



Figure 2. The measurements of compound binding to CA I and VII as determined by the thermal shift assay (TSA). Panel A: the fluorescence melting curves of CA VII with **2j**. Panel B: the fluorescence melting curves of CA I with **3j**. Panel C: the melting temperatures (T_m) from data in panel A and B plotted as a function of added **2j** (\blacksquare) and **3j** (\blacktriangle) concentration. Panel D: TSA data for **2d**, **1d**, **2c**, **1c**, **1a**, and **3c** binding to CA I. The binding affinities of selected compounds ranged from 0.5 nM for **2d** to 500 nM for **3c**.

2.1.2. Analysis of the selectivity of binding

Compounds were termed selective if the affinities towards at least two isoforms differed at least 25 fold (Table 3). According

to this criterion, the compounds described in this study exhibited selectivity mostly for CA I, especially the oxopyrimidines with headgroup **2**. The 6-substituted oxopyrimidines, namely, **2a**, **2c**, and **2d**, are the best inhibitors, selective for CA I. *tert*-Butyl substituted oxopyrimidine **2d** (K_d = 0.5 nM) could be distinguished as the most effective and selective CA I inhibitor against CA II, VI, VII, XII, and XIII, with the selectivity ratio in the range of 10–18000 fold.

Three compounds with headgroup **1**, 5-alkyl substituted (**1g** and **1i**) and unsubstituted (**1j**) pyrimidines, showed similar CA II binding affinity (K_d = 12.5–16.7 nM). The alkyl chain insertion increased the CA XII/II selectivity ratio from 33 to 100 times and CA VI/II selectivity ratio from 55 to 400 times. However, compared to CA II binding to other CA isoforms in general, the unsubstituted pyrimidine derivative **1j** remained more selective (selectivity ratio over CA I, VII, and XIII was from 4 to 7.5 times).

Compounds **2j** and **4e** exhibited selectivity for CA VII. However, in almost all cases CA VII was inhibited weaker than CA II (except for **2c**, **2d**, and **4d** where CA VII was inhibited from 2.2 up to 3.6 times stronger than CA II) and CA XIII (except **1c**, **3e**, and **2e**, where the binding of CA VII was from 2.1 to 3.1 times stronger than CA XIII).

Several of the best CA XIII binding compounds, the 5-ethylpyrimidine **2g**, 5-butylpyrimidine **2i**, and 5-propylpyrimidine **2h** (K_d = 1.3–2.1 nM) also showed CA XIII selectivity properties (CA I, II and VII were bound from 3.2 to 13 times less, CA XII bound from 140 to 280-fold less, and CA VI was bound from 1800 to 2600-fold less strongly than CA XIII).

None of the compounds exhibited selectivity for CA VI or XII isoforms over other CAs.

2.2. Crystallography

The crystal structures of inhibitors **2j**, **2f**, and **3j** bound to recombinant human CA isoforms II, XII (catalytic domain), and XIII were solved to atomic resolution in order to compare the binding in the three different CA active sites. The data collection and refinement statistics as well as PDB access codes are presented in Supplementary Table 1. Electron densities of the compounds are presented in Supplementary Figure 1. Crystal structures of compounds with headgroups **1** and **4** bound to CA II have been



Figure 3. Compound affinities grouped according to compound headgroups for each CA isoform I, II, VI, VII, XII, and XIII. The bars show averages of K_d in logarithmic scale, each for 10 tailgroups with the affinity range depicted as error bars. The figure shows the tendencies of affinities towards the listed isozymes. *para*-Sulfonamides bind stronger than *meta*-sulfonamides to most CAs, but not to CA VI. Affinities are not only dependent on the structure of the compound, but also on the CA isozyme.

Table 3

Compound binding selectivity for CA isozymes I, II, VII, and XIII

Compound K_d (nM) to CA I						Ratio			
	R ³	\mathbb{R}^4	R ⁵	CA II/I	CA VI/I	CA VII/I	CA XII/I	CA XIII/I	
Compounds selective for CA I									
2d (0.5)	OH	Н	<i>t</i> -Bu	80	18,000	22	670	10	
2f (5.0)	Me	Н	Me	3.3	580	2.5	180	2.0	
2a (4.0)	OH	Н	Me	5.3	630	8.9	83	8.3	
2c (10)	OH	Н	Pr	11	450	5.0	25	8.3	
1c (17)	OH	Н	Pr	4.83	73	14.5	5.27	3.63	
3f (370)	Me	Н	Me	2.70	35	18.0	9.00	2.70	
Compound K_d (nM) to CA II					Ratio				
	R ³	R ⁴	R ⁵	CA I/II	CA VI/II	CA VII/II	CA XII/II	CA XIII/II	
Compounds selective for CA II									
1i (14.3)	Н	Bu	Н	2.9	350	7.0	100	2.0	
1g (12.5)	Н	Et	Н	2.4	400	4.4	80	2.3	
1j (16.7)	Н	Н	Н	4.0	55	4.0	33	7.5	
Compound K _d (nM) to CA VII						Ratio			
	R ³	\mathbb{R}^4	R ⁵	CA I/VII	CA II/VII	CA VI/VII	CA XII/VII	CA XIII/VII	
Compounds selective for CA VII									
2j (5.0)	Н	Н	Н	2.0	2.2	500	170	3.3	
4e (25)	OH	CO ₂ Et	Н	50	2.0	8.0	8.0	5.0	
Compound K_{d} (nM) to CA XIII						Ratio			
	R ³	\mathbb{R}^4	R ⁵	CA I/XIII	CA II/XIII	CA VI/XIII	CA VII/XIII	CA XII/XIII	
Compounds selective for CA XIII									
2h (1.3)	Н	Pr	Н	4.2	5.7	2600	13	280	
2i (1.8)	Н	Bu	Н	3.4	4.2	1800	6.1	200	
2g (2.1)	Н	Et	Н	3.2	3.4	2400	4.8	140	



PRO-202

PRO-201

PRO-202

PRO-201

THR-200

D

VAL-135

В 2j-CA XII



2f-CA II

LEU-141

THR-200

PHE-131

PHE-131

_E-91

GLN-92 HIS-119

HIS-94

VAL-12

Ε



PRO-201

PRO-200

THR-198



С

LEU-206

PRO-204

2j-CA XIII

VAL-134

PHE-133

ARG-93

GLN-HIS-121

HIS-96

PRO-203 HIS-91 V/A HIS HIS-93 115-98

Figure 4. Crystal structures of CA isoforms bound with 2j, 2f, and 3j. Compound 2j and 2f bound in the active site of CA II are shown in yellow, 2j and 3j bound to CA XII are cyan, and 2j and 2f bound to CA XIII are colored in pink. Zn²⁺ is shown as a pink sphere. Amino acids and their surfaces that make van der Waals contacts with inhibitors are shown in orange, side chains and surfaces of active site residues that do not contact with inhibitors are colored in cyan. Hydrogen bonds are shown as red dotted lines. Blue small spheres are water molecules. Solvent molecules (ethyleneglycol or PEG) are colored in green.

published previously¹ and thus can be compared with the crystal structures described in this manuscript (Fig. 4).

The benzenesulfonamide moieties of headgroup **1** (**1a**, **1i**, **1f**, and **1j** in CA II, PDB ID 3SX8, 3SAP, 3SBH, and 3SBI, respectively¹ and headgroup **3** compounds (**3j** in CA XII) are found in a very similar position as in the crystal structure PDB ID 2WEJ¹⁷ (Supplementary Fig. 2, panel A) in CA II. The position of the 2-chlorobenzenesulfonamide moiety of compounds **2** (**2j** in CA II, CA XII and CA XIII and **2f** in CA II and CA XIII) and **4** (**4f** and **4g** in CA II, PDB ID 3S9T and 3SAX, respectively¹ is similar in all three isoforms (Supplementary Fig. 2, panel B) and coincides with the crystal structure PDB ID 2WEH.¹⁷ The orientation of the ring is determined by chlorine substituent¹⁷ which is found in the hydrophobic pocket.

Compounds 1 bind in a very similar mode to CA II active site with the pyrimidine ring positioned between Phe131 and Pro202 as described previously.¹ The long hydrophobic butyl group of compound **1i** is orientated along the hydrophobic edge of the active site wall in CA II formed by Pro202. It seems that this substituent drives the pyrimidine ring further towards Pro202. Indeed, the binding of **1i** to CAII is one of the strongest among compounds **1** (Table 1). In other three cases (**1a**, **1f**, and **1j**), the binding of compounds **1** to the CA II active site does not seem to depend on the pyrimidine ring substituents.

Compounds **2** are represented by the crystal structures of **2j** bound to CA II, CA XII, and CA XIII (Fig. 4, panels A–C) and **2f** bound to CA II and CA XIII (Fig. 4, panels D and F). Since the CA XIII asymmetric unit cell contains two protein chains, we chose the protein chain B in the further analysis of CA XIII–**2j** complex, where **2j** was modeled in two alternative conformations (panel C in Supplementary Figs. 1 and 4). Similarly, one representative protein chain was chosen in CA XII–**2j** (chain D) and CA XIII–**2f** (chain A) crystal structures, because the positions of ligands are very similar between protein subunits in these complexes.

The orientation of 2j in the active sites of CA XIII and CA II is the same. The pyrimidine is orientated between Pro202 (Pro204 in CA XIII) and Phe131 (Phe133 in CA XIII). The alternative conformation of 2j in CA XIII locates the pyrimidine on the other side of Phe133 (Fig. 4, panel C). Interestingly, nitrogen atoms of the pyrimidine ring in this alternative conformation make hydrogen bonds with Arg93 and Gln94, whereas the sulfur of the linker interacts with Gln94. Compound 2f in CA XIII probably due to more bulky dimethylpyrimidine substituent is shifted more towards the center of the substrate-binding pocket in CA XIII, than 2j (Supplementary Fig. 3, panel A). In CA XII, the pyrimidine ring of 2j compound is oriented along the loop that is made of residues with short side chains Ala129 and Ser130 (Supplementary Fig. 3, panel B). Such orientation is impossible in the active sites of neither CA II nor CA XIII, because the position is occupied by phenylalanine. In addition, there is also a hydrogen bond between pyrimidine nitrogen of 2j and Ser130 of CA XII (Fig. 4, panel B and Supplementary Fig. 3, panel B). The *K*_d of **2j** for CA XII is 833 nM, and the *K*_d s for CA II and XIII are 11.1 and 16.7 nM, respectively (Table 1). The weaker binding of 2j to CA XII could be explained by lesser van der Waals contacts with the protein side chains, not compensated by the hydrogen bond.

Compounds **3** are represented by the crystal structure of **3j** in CA XII (Fig. 4, panel E). The asymmetric unit of CA XII crystals contains four protein chains; the ligand in all subunits is bound in a similar way, therefore we chose the ligand bound to the chain D for further analysis. The principal difference of the CA XII active site from CA II as well as CA XIII is the absence of phenylalanine side chain. A small nonpolar side chain of alanine (Ala129) takes place of Phe131 in CA XII. Therefore, when the first ring of **3j** in CA XII coincides with those of the compounds **1** in CA II, the *meta*-positioned linker of **3j** is directed towards the loop carrying Ala129. Such an orientation would not be possible in CA II due to the bulky side chain of Phe131. The pyrimidine ring of **3j** in CA XII is located at the same edge of the active site as group **1** pyrimidines, but in the different (orthogonal) orientation, which is favored additionally by the hydrogen bond between pyrimidine and hydroxyl group of Ser133 in CA XII.

It is interesting to compare the binding of Cl-benzenesulfonamide containing compounds between groups 2 and 4 which differ by the position of pyrimidine substituents. The binding of compounds 4, namely, 4f and 4g in the active site of CA II has been described previously¹ (PDB ID 3S9T and 3SAX, respectively). The orientation of the linker of compounds **4** is fixed by the hydrogen bonds between carbonyl oxygen and Gln92 and Asn67 in CA II. This hydrogen bonding defines the orientation of the pyrimidine in compounds 4, which is not possible for the para-positioned pyrimidines of the compounds **2** due to steric clash with phenylalanine. The *para*-linker, as in groups **1** and **2**, allows the second ring to be positioned further towards the Pro202 and Phe131 and allows for the van der Waals interaction with Val135, which could not be reached by the pyrimidine moiety of compounds 4. These additional interactions of compounds **2** with hydrophobic amino acids can influence more than 10 times higher binding affinity of these inhibitors to tested CAs than compounds 4.

The binding of compounds **2** and **3** can be compared by superimposing **2j** and **3j** in the active site of CA XII (Supplementary Fig. 4). Since there is no phenylalanine in the active site of CA XII, the linker is oriented in a different way than in CA II and XIII. In the complexes with CA XII, the pyrimidine rings of both compounds coincide, because *meta*- and *para*-positions of linkers compensate for the different orientations of the chlorobenzene and benzene rings. Both compounds make hydrogen bonds with Ser130 or Ser133 of CA XII. The K_d of **2j** for CA XII is 833 nM, and the K_d of **3j** is 3330 nM (Table 1), thus **2j** binds four times stronger than **3j**. Therefore, the hydrogen bond of the pyrimidine ring is not important for the binding of the ligand. The presence of chlorine in the headgroup ring influenced the binding more strongly, than the substituents in the pyrimidine ring.

3. Conclusions

Two novel series of carbonic anhydrase inhibitors, 2-chloro-4-{[(pyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}benzenesulfonamides and 3-{[(pyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}benzenesulfonamides, were synthesized and characterized. Their binding to six recombinant human CA I, II, VI, VII, XII, and XIII was determined by the thermal shift assay and confirmed by ITC and stopped-flow CO₂ hydration assay. Compounds described here were compared with previously published pyrimidinebenzenesulfonamides. The binding affinity of para-substituted benzenesulfonamides was found to be greater than meta-substituted derivatives. The introduction of ortho-chlorine to the para-substituted benzensulfonamide inverts the selectivity of inhibitors from CA II to CA I. Compound 2d {[(4tert-butyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}-2chlorobenzenesulfonamide had subnanomolar affinity for CA I $(K_d = 0.5 \text{ nM})$ and was highly selective for CA I, a rare feature among benzenesulfonamides. X-ray crystallographic structures provided structural details of inhibitor binding to CA II. XII. and XIII and will be used for the further development of selective CA inhibitors. The benzenesulfonamide moieties of headgroup 1 (in CA II) and headgroup 3 (in CA XII) compounds are found in a very similar position. The position of the 2-chlorobenzenesulfonamide moiety of compounds 2 (in CA II, XII and XIII) and 4 (in CA II) is similar in all three isoforms. Decreased affinity of compounds for CA XII, compared with CA II and XIII can be explained by the more hydrophilic nature of the CA XII binding site and substitution of amino acid Phe131 (Phe133 in CA XIII), which makes van der Waals contacts with inhibitors in CA II and XIII by Ala131 in CA XII.

4. Experimental section

4.1. Chemistry

Synthesis of 4-(bromoacetyl)benzenesulfonamide (**1**) and 3-(bromoacetyl)benzenesulfonamide (**3**) was achieved from commercially available 1-(4-aminophenyl)ethanone and 1-(3-aminophenyl)ethanone, respectively, as described in Ref. **18**. Synthesis of 4-(bromoacetyl)-2-chlorobenzenesulfonamide (**2**) was accomplished from 1-(4-amino-3-chlorophenyl)ethanone as described in Ref. **18**. 1-(4-amino-3-chlorophenyl)ethanone was synthesized by chlorination of 1-(3-aminophenyl)ethanone with *N*-chlorosuccinimide in acetonitrile.^{19,20} Synthesis of 5-(2-bromoacetyl)-2chlorobenzensulfonamide (**4**) was accomplished from commercially available 1-(4-chloro-3-nitrophenyl)ethanone as described in Refs. **18**.21.

2-Mercaptopyrimidines **a**, **c**, **e**, **f**, **h**, and **j** are commercially available. 6-Alkyl-2-thioxo-2,3-dihydro-4(1*H*)-pyrimidinones **b**,²² **c**,²³ and **d**²³ were synthesized by condensation of an appropriately substituted β -keto ester with thiourea. 5-Alkyl-2(1*H*)-pyrimidinethiones **g** and **i** were prepared from thiourea and 2-alkyl-1,1,3,3-tetraethoxypropane as described previously.²⁴ All ingredients were purchased from Sigma–Aldrich and Alfa Aesar GmbH.

The melting points of the compounds were determined in open capillaries on a Thermo Scientific 9100 Series apparatus without further correction. IR spectra were obtained on a Perkin–Elmer FT-IR spectrophotometer Spectrum BX II in KBr. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian Unity Inova spectrometer (300 and 75 MHz, respectively) in DMSO- d_6 using residual DMSO signals (2.52 and 40.21 ppm for ¹H and ¹³C NMR spectra, respectively) as the internal standard. TLC was performed with silica gel 60 F254 aluminum plates (Merck) and visualized with UV light. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a Dual-ESI Q-TOF 6520 mass spectrometer (Agilent Technologies). The purity of target compounds was controled using an HPLC system with UV detection.

4.1.1. General procedure for the syntheses of 2a-j and 3a-j

A mixture of the corresponding pyrimidine $(\mathbf{a}-\mathbf{j})$ (0.360 mmol), appropriate compound **2** or **3** (0.360 mmol), and sodium acetate (33.9 mg, 0.414 mmol) in tetrahydrofuran (3 ml) was stirred at room temperature for 24 h. The reaction mixture was poured into water. The precipitate was filtered off, washed with water and then with diethyl ether to yield **2a–j** or **3a–j**.

4.1.1.1. 2-Chloro-4-{[(4-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}benzenesulfonamide (B18) (2a). Yield 79%, mp 179–181 °C. IR ν cm⁻¹: 3351, 3257 (NH₂, NH), 1699 (CO), 1664 (CONH). ¹H NMR δ ppm: (1:0.92) 1.95 (3H, s, CH₃, open chain form (o)), 2.17 (2.79H, s, CH₃, cyclic form (c)), 3.55 (0.92H, d, J = 12.6 Hz, *CH*₂COH, c), 3.69 (0.92H, d, J = 12.3 Hz, *CH*₂COH, c), 4.73 (2H, s, CH₂CO, o), 5.93 (0.92H, s, C₅--H, c), 5.97 (1H, br s, C₅'-H, o), 7.55 (0.92H, d, J = 8.1 Hz, C₅-H, c), 7.66 (1.84H, s, NH₂, c), 7.72 (0.92H, s, C₃-H, c), 7.85 (2H, s, NH₂, o), 7.96 (0.92H, d, J = 8.4 Hz, C₆-H, c), 8.14 (2H, s, C₅₋₆-H, o), 8.24 (1H, s, C₃-H, o), 12.49 (1H, br s, NH, o). HRMS calcd for C₁₃H₁₂ClN₃O₄S₂ ([M+H]⁺): 374.0031, found: 374.0027.

4.1.1.2. 3-{[(4-Methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)sulfa-nyl]acetyl}benzenesulfonamide (C18) (3a). Yield 77%, mp 169–171 °C. IR ν cm⁻¹: 3308, 3211 (NH₂, NH), 1708 (CO), 1638 (CONH). ¹H NMR δ ppm: (1:0.19) 1.93 (3H, s, CH₃, o), 2.19

(0.57H, s, CH₃, c), 3,57 (0,19H, d, J = 12,6 Hz, CH_2 COH, c), 3,63 (0,19H, d, J = 12,3 Hz, CH_2 COH, c), 4.76 (2H, s, CH₂CO, o), 5.95 (0.19H, s, C_{5'}-H, c), 5.97 (1H, br s, C_{5'}-H, o), 7.43 (0.38H, s, NH₂, c), 7.56–7.63 (2.38H, m, NH₂, o, C_{4,5}-H, c), 7.77–7.82 (1.38H, m, C₅-H, o, C₆-H, c), 7.94 (0.19H, s, C₂-H, c), 8.11 (1.19H, d, J = 8.1 Hz, C₄-H, o, OH, c), 8.31 (1H, d, J = 8.1 Hz, C₆-H, o), 8.45 (1H, s, C₂-H, o), 12.62 (1H, br s, NH, o). HRMS calcd for C₁₃H₁₃N₃O₄S₂ ([M+H]⁺): 340.0420, found: 340.0424.

4.1.1.3. 4-{[(5-Benzyl-4-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl) sulfanyl]acetyl]-2-chlorobenzenesulfonamide (B19) (2b). Yield 90%, mp 138–140 °C. IR ν cm⁻¹: 3386, 3249 (NH₂, NH), 1664 (CO), 1648 (CONH). ¹H NMR δ ppm: (1:0.95) 1.94 (3H, s, CH₃, o), 2.20 (2.85H, s, CH₃, c), 3.55–3.74 (5.80H, m, *CH*₂COH, c, *CH*₂Ph, o, c), 4.73 (2H, s, CH₂CO, o), 7.12–7.27 (9.75H, m, Ph-H, o, c), 7.60 (0.95H, dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, C₅-H, c), 7.68 (1.90H, s, NH₂, c), 7.73 (0.95H, d, *J* = 1.8 Hz, C₃-H, c), 7.85 (2H, s, NH₂, o), 7.97 (0.95H, d, *J* = 8.1 Hz, C₆-H, c), 8.14 (2H, s, C_{5,6}-H, o), 8.24 (1H, s, C₃-H, o), 12.55 (1H, br s, NH, o). HRMS calcd for C₂₀H₁₈ClN₃O₄S₂ ([M+H]⁺): 464.0500, found: 464.0507.

4.1.1.4. 3-{[(5-Benzyl-4-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}benzenesulfonamide (C19) (3b). Yield 73%, mp 165–167 °C. IR ν cm⁻¹: 3264, 3234 (NH₂, NH), 1688 (CO), 1637 (CONH). ¹H NMR δ ppm: (1:0.27) 1.92 (3H, s, CH₃, o), 2.20 (0.81H, s, CH₃, c), 3.63-3.70 (3.08H, m, *CH*₂COH, c, *CH*₂Ph, o, c), 4.76 (2H, s, CH₂CO, o), 7.17–7.25 (6.35H, m, Ph-H, o, c), 7.43 (0.54H, s, NH₂, c), 7.56–7.63 (2.54H, m, NH₂, o, C_{4,5}–H, c), 7.76–7.81 (1.27H, m, C₅–H, o, C₆–H, c), 7.99 (0.27H, s, C₂–H, c), 8.12 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, C₄–H, o), 8.31 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, C₆–H, o), 8.46 (1H, s, C₂–H, o), 12.80 (1H, br s, NH, o). HRMS calcd for C₂₀H₁₉N₃O₄-S₂ ([M+H]⁺): 430.0890, found: 430.0892.

4.1.15. 2-Chloro-4-{[(6-oxo-4-propyl-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}benzenesulfonamide (B20) (2c). Yield 77%, mp 178–180 °C. IR ν cm⁻¹: 3370, 3247 (NH₂, NH), 1655 (CO), 1641 (CONH). ¹H NMR δ ppm: (1:0.75) 0.68 (3H, t, J = 7.2 Hz, CH₃, o), 0.93 (2.25H, t, J = 7.2 Hz, CH₃, c), 1.21–1.33 (2H, m, CH₂, o), 1.57–1.69 (1.50H, m, CH₂, c), 2.12 (2H, t, J = 6.6 Hz, CH₂, o), 2.41 (1.50H, t, J = 7.2 Hz, CH₂, c), 3.55 (0.75H, d, J = 12.6 Hz, CH₂COH, c), 3.71 (0.75H, d, J = 12.3 Hz, CH₂COH, c), 4.72 (2H, s, CH₂CO, o), 5.91 (0.75H, s, C₅–H, c), 5.93 (1H, br s, C₅–H, o), 7.56 (0.75H, d, J = 8.1 Hz, C₅–H, c), 7.67 (1.50H, s, NH₂, c), 7.73 (0.75H, s, C₃–H, c), 7.86 (2H, s, NH₂, o), 7.97 (0.75H, d, J = 8.4 Hz, C₆–H, c), 8.07 (0.75H, br s, OH, c), 8.15 (2H, s, C_{5,6}–H, o), 8.25 (1H, s, C₃–H, o), 12.67 (1H, br s, NH, o). HRMS calcd for C₁₅H₁₆-ClN₃O₄S₂ ([M+H]⁺): 402.0344, found: 402.0346.

3-{[(6-Oxo-4-propyl-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)sulfa-4.1.1.6. nyl]acetyl}benzenesulfonamide (C20) (3c). Yield 83%, mp 189–191 °C. IR v cm⁻¹: 3311 (NH₂, NH), 1707 (CO), 1638 (CONH). ¹H NMR δ ppm: (1:0.18) 0.65 (3H, t, J = 7.5 Hz, CH₃, o), 0.92 $(0.54H, t, J = 7.5 Hz, CH_3, c), 1.25 (2H, sext, J = 7.2 Hz, CH_2, o),$ 1.63 (0.36H, sext, J = 7.5 Hz, CH₂, c), 2.13 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH₂, o), 2.41 (0.36H, t, J =7.2 Hz, CH₂, c), 3.59 (0.18H, d, J =12.6 Hz, CH₂-COH, c), 3.63 (0.18H, d, J =12.9 Hz, CH₂COH, c), 4.75 (2H, s, CH₂CO, o), 5.93 (1.18H, br s, C_{5'}-H, c, C_{5'}-H, o), 7.43 (0.36H, s, NH₂, c), 7.57-7.63 (2.36H, m, NH₂, o, C_{4.5}-H, c), 7.77-7.82 (1.36H, m, C₅-H, o, C₆-H, c), 7.95 (0.18H, s, C₂-H, c), 8.03 (0.18H, OH, c), 8.11 (1H, d, J =7.8 Hz, C₄-H, o), 8.33 (1H, d, J =8.1 Hz, C₆-H, o), 8.44 (1H, s, C₂-H, o), 12.42 (1H, br s, NH, o). HRMS calcd for $C_{15}H_{17}N_3O_4S_2$ ([M+H]⁺): 368.0733, found: 368.0732.

4.1.1.7. 4-{[(4-*tert***-Butyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}-2-chlorobenzenesulfonamide (B21) (2d).** Yield 88%, mp 183–185 °C. IR v cm⁻¹: 3347, 3273 (NH₂, NH), 1707 (CO), 1641 (CONH). ¹H NMR δ ppm: (1:0.75) 0.97 (9H, s, (CH₃)₃, o), 1.22 (6.75H, s, (CH₃)₃, c), 3.54 (0.75H, d, *J* = 12.3 Hz, *CH*₂COH, c), 3.72 (0.75H, d, *J* = 12.3 Hz, *CH*₂COH, c), 4.82 (2H, s, CH₂CO, o), 5.92 (0.75H, s, C₅·-H, c), 5.98 (1H, br s, C₅·-H, o), 7.57 (0.75H, dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, C₅-H, c), 7.67 (1.50H, s, NH₂, c), 7.74 (0.75H, d, *J* = 1.8 Hz, C₃-H, c), 7.87 (2H, s, NH₂, o), 7.97 (0.75H, d, *J* = 8.1 Hz, C₆-H, c), 8.13–8.20 (2H, m, C_{5.6}-H, o), 8.25 (1H, s, C₃-H, o), 12.62 (1H, br s, NH, o). HRMS calcd for C₁₆H₁₈ClN₃O₄S₂ ([M+H]⁺): 416.0500, found: 416.0501.

4.1.1.8. 3-{[(*4-tert*-Butyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}benzenesulfonamide (C21) (3d). Yield 88%, mp 191–193 °C. IR ν cm⁻¹: 3345, 3225 (NH₂, NH), 1707 (CO), 1646 (CONH). ¹H NMR δ ppm: (1:0.20) 0.96 (9H, s, (CH₃)₃, o), 1.22 (1.80H, s, (CH₃)₃, c), 3.58 (0.20H, d, *J* = 12.3 Hz, *CH*₂COH, c), 3.65 (0.20H, d, *J* = 12.3 Hz, *CH*₂COH, c), 4.82 (2H, s, CH₂CO, o), 5.92 (0.20H, s, C₅'-H, c), 5.97 (1H, br s, C₅'-H, o), 7.43 (0.40H, s, NH₂, c), 7.57–7.63 (2.40H, m, NH₂, o, C_{4.5}-H, c), 7.78–7.83 (1.40H, m, C₅-H, o, C₆-H, c), 7.97 (0.20H, s, C₂-H, c), 8.02 (0.20H, OH, c), 8.12 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, C₄-H, o), 8.35 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, C₆-H, o), 8.44 (1H, s, C₂-H, o), 12.62 (1H, br s, NH, o). HRMS calcd for C₁₆H₁₉-N₃O₄S₂ ([M+H]⁺): 382.0890, found: 382.0887.

4.1.1.9. Ethyl 2-({2-[4-(aminosulfonyl)-3-chlorophenyl]-2-oxoethyl}sulfanyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-5-carboxylate

(B23) (2e). Yield 91%, mp 303–305 °C. IR v cm⁻¹: 3370, 3246 (NH₂, NH), 1728 (CO₂Et, CO), 1702 (CONH). ¹H NMR δ ppm: (1:0.93) 1.20–1.27 (5.79H, m, CH₃, o, c), 3.63 (0.93H, d, J = 12.6 Hz, *CH*₂COH, c), 3.79 (0.93H, d, J = 12.6 Hz, *CH*₂COH, c), 3.79 (0.93H, d, J = 12.6 Hz, *CH*₂COH, c), 4.15–4.23 (3.86H, m, CH₂, o, c), 4.93 (2H, s, CH₂CO, o), 7.64–7.68 (2.79H, m, C₅–H, c, NH₂, c), 7.83 (0.93H, s, C₃–H, c), 7.87 (2H, s, NH₂, o), 7.98 (0.93H, d, J = 8.1 Hz, C₆–H, c), 8.16 (2H, s, C_{5,6}–H, o), 8.24 (1H, s, C₃–H, o), 8.32 (1H, s, C₄–H, o), 8.46 (0.93H, s, C₄–H, c), 13.45 (1H, br s, NH, o). HRMS calcd for C₁₅H₁₄ClN₃O₆S₂ ([M+H]⁺): 432.0085, found: 432.0080.

4.1.10. Ethyl 2-({2-[3-(aminosulfonyl)phenyl]-2-oxoethyl} sulfanyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-5-carboxylate (C23) (3e). Yield 89%, mp 255–257 °C. IR ν cm⁻¹: 3369, 3232 (NH₂, NH), 1731 (CO₂Et), 1699 (CO), 1687 (CONH). ¹H NMR δ ppm: (1:0.19) 1.17–1.27 (3.57H, m, CH₃, o, c), 3.67 (0.19H, d, J = 12.9 Hz, *CH*₂COH, c), 3.73 (0.19H, d, J = 12.9 Hz, *CH*₂COH, c), 3.73 (0.19H, d, J = 12.9 Hz, *CH*₂COH, c), 7.58–7.62 (2.19H, m, NH₂, o, C₅-H, c), 7.70 (0.19H, d, J = 8.1 Hz, C₄-H, c), 7.79–7.84 (1.19H, m, C₅-H, o, C₆-H, c), 8.03 (0.19H, s, C₂-H, c), 8.13 (1H, d, J = 7.8 Hz, C₄-H, o), 8.30–8.33 (1.19H, m, C₆-H, o, C₄'-H, c), 8.45 (1H, s, C₂-H, o), 8.47 (0.19H, s, C₄'-H, c), 13.47 (1H, br s, NH, o). HRMS calcd for C₁₅H₁₅N₃O₆S₂ ([M+H]⁺): 398.0475, found: 398.0474.

4.1.11. 2-Chloro-4-{[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfa-nyl]acetyl}benzenesulfonamide (B24) (2f). Yield 68%, mp 155–157 °C. IR ν cm⁻¹: 3294 (NH₂), 1698 (CO). ¹H NMR δ ppm: 2.24 (6H, s, 2CH₃), 4.71 (2H, s, CH₂CO), 6.95 (1H, s, C₅-H), 7.85 (2H, s, NH₂), 8.15 (2H, s, C_{5.6}-H), 8.25 (1H, s, C₃-H). ¹³C NMR δ ppm: 23.8, 38.3, 116.8, 127.8, 130.1, 131.5, 131.6, 141.1, 145.0, 167.7, 169.3, 194.2. HRMS calcd for C₁₄H₁₄ClN₃O₃S₂ ([M+H]⁺): 372.0238, found: 372.0235.

4.1.1.12. 3-{[(4,6-Dimethylpyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}benzenesulfonamide (C24) (3f). Yield 80%, mp 174–176 °C. IR ν cm⁻¹: 3287 (NH₂), 1701 (CO). ¹H NMR δ ppm: 2.23 (6H, s, 2CH₃), 4.72 (2H, s, CH₂CO), 6.94 (1H, s, C₅·-H), 7.55 (2H, s, NH₂), 7.78 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, C₅-H), 8.11 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, C₄-H), 8.32 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, C₆-H), 8.45 (1H, s, C₂-H). ¹³C NMR δ ppm: 23.9, 38.1, 116.8, 125.8, 130.4, 130.5, 132.2, 137.9, 145.5, 167.7, 169.4, 194.7. HRMS calcd for $C_{14}H_{15}N_3O_3S_2$ ([M+H]⁺): 338.0628, found: 338.0627.

4.1.13. 2-Chloro-4-{[(5-ethylpyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl} benzenesulfonamide (B25) (2g). Yield 85%, mp 87–9 °C. IR ν cm⁻¹: 3272 (NH₂), 1687 (CO). ¹H NMR δ ppm: 1.16 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₃), 2.54 (2H, q, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 4.82 (2H, s, CH₂CO), 7.87 (2H, s, NH₂), 8.16 (2H, s, C_{5.6}-H), 8.24 (1H, s, C₃-H), 8.48 (2H, s, C_{4',6'}-H). ¹³C NMR δ ppm: 15.6, 22.9, 39.0, 127.9, 130.2, 131.7 (2C), 133.0, 140.5, 145.2, 157.8, 167.5, 193.4. HRMS calcd for C₁₄₋ H₁₄ClN₃O₃S₂ ([M+H]⁺): 372.0238, found: 372.0241.

4.1.1.14. 3-{[(5-Ethylpyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}benzene-sulfonamide (C25) (3g). Yield 80%, mp 131–133 °C. IR ν cm⁻¹: 3321 (NH₂), 1679 (CO). ¹H NMR δ ppm: 1.16 (3H, t, *J* = 7.8 Hz, CH₃), 2.50–2.55 (2H, m, CH₂ superposed with DMSO), 4.85 (2H, s, CH₂CO), 7.57 (2H, s, NH₂), 7.80 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, C₅-H), 8.12 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, C₄-H), 8.33 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, C₆-H), 8.46 (1H, s, C₂-H), 8.49 (2H, s, C_{4'.6'}-H). ¹³C NMR δ ppm: 15.6, 22.9, 39.0, 125.8, 130.5, 130.7, 132.3, 133.0, 137.3, 145.5, 157.8, 167.7, 193.7. HRMS calcd for C₁₄H₁₅N₃O₃S₂ ([M+H]⁺): 338.0628, found: 338.0629.

4.1.1.15. 2-Chloro-4-{[(5-propylpyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl} benzenesulfonamide (B26) (2h). Yield 86%, mp 80–82 °C. IR ν cm⁻¹: 3362 (NH₂), 1692 (CO). ¹H NMR δ ppm: 0.87 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₃), 1.56 (2H, sext, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 2.48 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 4.83 (2H, s, CH₂CO), 7.87 (2H, s, NH₂), 8.16 (2H, s, C_{5,6}-H), 8.24 (1H, s, C₃-H), 8.47 (2H, s, C_{4',6'}-H). ¹³C NMR δ ppm: 14.1, 24.1, 31.5, 39.1, 127.9, 130.2, 131.5, 131.7 (2C), 140.5, 145.2, 158.2, 167.6, 193.4. HRMS calcd for C₁₅H₁₆ClN₃O₃S₂ ([M+H]⁺): 386.0394, found: 386.0391.

4.1.1.16. 3-{[(5-Propylpyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}benzene-sulfonamide (C26) (3h). Yield 78%, mp 125–127 °C. IR ν cm⁻¹: 3310, 3283 (NH₂), 1698 (CO). ¹H NMR δ ppm: 0.88 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CH₃), 1.56 (2H, sext, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 2.49 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, CH₂), 4.85 (2H, s, CH₂CO), 7.57 (2H, s, NH₂), 7.80 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, C₅-H), 8.12 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, C₄-H), 8.33 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, C₆-H), 8.48 (3H, s, C₂-H, C_{4',6'}-H). ¹³C NMR δ ppm: 14.1, 24.1, 31.5, 39.0, 125.9, 130.5, 130.7, 131.4, 132.3, 137.2, 145.5, 158.2, 167.7, 193.7. HRMS calcd for C₁₅H₁₇N₃O₃S₂ ([M+H]⁺): 352.0784, found: 352.0783.

4.1.1.17. 4-{[(5-Butylpyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}-2-chlorobenzenesulfonamide (B27) (2i). Yield 78%, mp 91–93 °C. IR ν cm⁻¹: 3327, 3272 (NH₂), 1702 (CO). ¹H NMR δ ppm: 0.88 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₃), 1.28 (2H, sext, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 1.52 (2H, quint, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 2.48–2.53 (2H, m, CH₂, superposed with DMSO), 4.82 (2H, s, CH₂CO), 7.87 (2H, s, NH₂), 8.16 (2H, s, C_{5,6}-H), 8.24 (1H, s, C₃-H), 8.47 (2H, s, C_{4',6'}-H). ¹³C NMR δ ppm: 14.3, 22.3, 29.1, 33.0, 39.1, 127.9, 130.2, 131.7 (3C), 140.5, 145.2, 158.10, 167.5, 193.4. HRMS calcd for C₁₆H₁₈ClN₃O₃S₂ ([M+H]⁺): 400.0551, found: 400.0555.

4.1.1.18. 3-{[(5-Butylpyrimidin-2-yl)sulfanyl]acetyl}benzene-sulfonamide (C27) (3i). Yield 91%, mp 122–124 °C. IR ν cm⁻¹: 3310, 3273 (NH₂), 1698 (CO). ¹H NMR δ ppm: 0.89 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₃), 1.28 (2H, sext, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 1.52 (2H, quint, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 2.48–2.53 (2H, m, CH₂, superposed with DMSO), 4.85 (2H, s, CH₂CO), 7.57 (2H, s, NH₂), 7.80 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, C₅-H), 8.12 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, C₄-H), 8.33 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, C₆-H), 8.47 (3H, s, C₂-H, C_{4',6'}-H). ¹³C NMR δ ppm: 14.3, 22.3, 29.2, 33.0, 39.0, 125.9, 130.5, 130.7, 131.6, 132.3, 137.2, 145.5, 158.1, 167.7, 193.7. HRMS calcd for C₁₆H₁₉N₃O₃S₂ ([M+H]⁺): 366.0941, found: 366.0943.

4.1.1.19. 2-Chloro-4-[(pyrimidin-2-ylsulfanyl)acetyl]benzenesulfonamide (B28) (2j). Yield 81%, mp 174–176 °C. IR ν cm⁻¹: 3334 (NH₂), 1688 (CO). ¹H NMR δ ppm: 4.86 (2H, s, CH₂CO), 7.23 (1H, t, *J* = 4.8 Hz, C₅--H), 7.86 (2H, s, NH₂), 8.16 (2H, s, C_{5,6}-H), 8.25 (1H, s, C₃-H), 8.59 (2H, d, *J* = 4.8 Hz, C_{4',6'}-H). ¹³C NMR δ ppm: 39.1, 118.2, 128.0, 130.2, 131.7 (2C), 140.4, 145.2, 158.5, 170.5, 193.2. HRMS calcd for C₁₂H₁₀ClN₃O₃S₂ ([M+H]⁺): 343.9925, found: 343.9921.

4.1.1.20. 3-[(Pyrimidin-2-ylsulfanyl)acetyl]benzenesulfonamide (**C28**) (**3j**). Yield 78%, mp 176–178 °C. IR ν cm⁻¹: 3279 (NH₂), 1702 (CO). ¹H NMR δ ppm: 4.88 (2H, s, CH₂CO), 7.23 (1H, t, J = 4.8 Hz, C₅-H), 7.57 (2H, s, NH₂), 7.81 (1H, t, J = 8.1 Hz, C₅-H), 8.12 (1H, d, J = 8.1 Hz, C₄-H), 8.33 (1H, d, J = 7.8 Hz, C₆-H), 8.47 (1H, s, C₂-H), 8.60 (2H, d, J = 4.8 Hz, C₄·G·-H). ¹³C NMR δ ppm: 38.6, 117.7, 125.4, 130.1, 130.3, 131.9, 136.8, 145.1, 158.0, 170.2, 193.2. HRMS calcd for C₁₂H₁₁N₃O₃S₂ ([M+H]⁺): 310.0315, found:

4.1.2. Open and cyclic forms of the pyrimidinones

In our previous research tautomerism of **1a–e** and **4a–e** was investigated.¹ An investigation of the **2a–e** and **3a–e** compound structures by NMR spectrocopy showed that the ¹H and ¹³C NMR spectra of pyrimidinones in DMSO- d_6 solution contained two sets of signals (Table 4). These results led to a suggestion that this phenomenon could be due to the existence of compounds **2a–e** and **3a–e** in two forms: open chain I and cyclic II (Scheme 2).

4.2. Protein preparation

310.0314.

Expression and purification of CA II, VII, XII, and XIII has been previously described: CA II in,²⁵ CA VII and XIII in Ref. 26 and CA XII in Ref. 13.

The cDNA of CA I was purchased from RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (Berlin, Germany). For recombinant protein production, a DNA fragment encoding CA I from 3 to 291 amino acids was created from initial construct pCMV– SPORT6—CA I, using restriction endonuclease MboII, blunt-ended with T4 DNA Polymerase and cloned into XhoI and NcoI sites of pET15b vector. The recombinant CA I protein represents almost the full length human protein, missing only two N-terminal amino acids.

Expression of the recombinant CA I was done in *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain (Novagen). Transformed cells colony was



Scheme 2. Open chain I and cyclic II forms of compounds 2a-e and 3a-e.

transferred to LB medium, containing 100 µl/mg ampicillin and grown at 37 °C and 220 rpm for 16 h. Then the saturated culture was diluted (1:50) in fresh LB medium, containing 100 µl/mg ampicillin, 60 µM ZnSO₄ and grown at 37 °C and 220 rpm to OD₆₀₀ \approx 0.8. The expression of CA I was induced with 0,2 mM isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) and 0.4 mM ZnSO₄. The cells were grown for 4 h at 30 °C, harvested by centrifugation at 4000g for 20 min at 4 °C and lysed by sonication.

Soluble protein was purified using a Sepharose CL-6B, with linked triazine dye yellow light resistant 2KT,²⁷ followed by anion exchange chromatography on S-Sepharose (Amersham, GE Health-care Bio-Sciences AB, Uppsala).

Eluted protein was dialysed against the storage buffer containing 20 mM *N*-(2-hydroxyethyl)-piperazine-*N*-2-ethanesulphonic acid (HEPES, pH 7.8) and 0.05 M NaCl and stored at -80 °C. The CA I preparations were analysed by SDS–PAGE to check for purity and found to be higher than 95%. Protein concentrations were determined by UV–VIS spectrophotometry using an extinction coefficient $\varepsilon_{280} = 44920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and confirmed by the standard Bradford method. Molecular weight of the protein has been confirmed by mass spectrometry. Theoretical MW is 28799.1 Da and it was found to be 28799.6 Da.

The cDNA encoding CA VI from 21 to 290 amino acids was amplified by PCR from full CA VI gene purchased from RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (Berlin, Germany), using forward primer with Ndel recognition site (underlined)—5' CCAGCATATGTCTGACTGGACCTAC 3' and reverse primer with XhoI recognition site—5' CTTATGCTCGAGTTACTGGAATTCAGAGCC 3'. The PCR product was cloned into the bacterial expression vector pET15b (Novagen) via Ndel and XhoI restriction sites fusing a $6 \times$ His-tag to the N terminus of the protein.

The resultant recombinant CA VI has the catalytic domain and lacks the signal and the N terminal sequences. Expression of recombinant CA VI was done in *E. coli* Rosetta2 (DE3) strain (Novagen). A colony of transformed cells was transferred to Brain

Table 4

Characteristic chemical shifts of ¹H and ¹³C NMR spectra of open chain I and cyclic II forms of compounds **2a–e** and **3a–e** in DMSO-d₆ solution

Compound		¹³ C NM	R spectra	¹ H NMR spectra		
	SCH ₂ C=O in I	SCH ₂ OH in II	SCH ₂ C=0 in I	SCH ₂ COH in II	SCH ₂ CO in I	SCH ₂ in II
2a	38.2	42.1	193.5	95.7	4.73 (2H, s)	3.55 (0.92H, d, $J = 12.6$ Hz),
3a	38.0	42.6	193.9	96.6	4.76 (2H, s)	3.59 (0.9211, d, J = 12.5 Hz) 3.57 (0.19H, d, J = 12.6 Hz), 3.63 (0.19H, d, J = 12.3 Hz)
2b	37.9	42.4	193.4	96.0	4.73 (2H, s)	3.55-3.74 (5.80H, m, CH ₂ COH, c, CH ₂ Ph, o, c)
3b	37.9	42.8	193.9	97.0	4.76 (2H, s)	3.63-3.70 (3.08H, m, CH ₂ COH, c, CH ₂ Ph, o, c)
2c	37.9	42.2	193.4	95.7	4.72 (2H, s)	3.55 (0.75H, d, <i>J</i> = 12.6 Hz),
						3.71 (0.75H, d, J = 12.3 Hz)
3c	38.0	42.6	193.7	96.6	4.75 (2H, s)	3.59 (0.18H, d, <i>J</i> = 12.6 Hz),
						3.63 (0.18H, d, <i>J</i> = 12.9 Hz)
2d	37.4	42.2	193.4	95.5	4.82 (2H, s)	3.54 (0.75H, d, <i>J</i> = 12.3 Hz),
						3.72 (0.75H, d, J = 12.3 Hz)
3d	37.4	42.6	192.9	96.4	4.82 (2H, s)	3.58 (0.20H, d, <i>J</i> = 12.3 Hz),
						3.65 (0.20H, d, <i>J</i> = 12.3 Hz)
2e	39.2	42.8	192.3	96.8	4.93 (2H, s)	3.63 (0.93H, d, <i>J</i> = 12.6 Hz),
						3.79 (0.93H, d, <i>J</i> = 12.6 Hz)
3e	39.2	42.6	192.7	96.8	4.96 (2H, s)	3.67 (0.19H, d, <i>J</i> = 12.9 Hz),
						3.73 (0.19H, d, J = 12.9 Hz)

Heart Infusion (BHI) medium, containing 100 µg/ml ampicillin and 34 µg/ml chloramphenicol and was grown at 37 °C and 220 rpm for 16 h. Then the saturated culture was diluted (1:50) in fresh BHI medium, containing 100 µg/ml ampicillin, 34 µg/ml chloramphenicol, and 0.03 mM ZnSO₄ and was grown to OD₆₀₀ \approx 0.8. The expression of recombinant CA VI was induced with 1 mM isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) containing 0.3 mM ZnSO₄. The culture was grown for 20 h at 20 °C and 250 rpm. The cells were harvested by centrifugation at 4000g for 20 min at 4 °C.

The pellet was suspended in lysis buffer (25 mM MES, 0.5% Triton X-100, 0.1 M Na₂SO₄, pH 5.6, and 1 mM PMSF) containing the protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). The cells were incubated at 4 °C for 60 min and then disrupted by sonication. The supernatant, containing soluble proteins, was obtained after centrifugation at 20,000g for 25 min. Soluble protein was purified using a Sepharose–IDA–Ni⁺² affinity column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala), followed by cation exchange chromatography on SP-Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala). Eluted protein was dialysed against the storage buffer (25 mM MES, 50 mM Na₂SO₄, pH 5.8) and stored at -80 °C.

The purity of CA VI was analysed by sodium dodecylsulfate– polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). Protein concentrations were determined by UV–VIS spectrophotometry using an extinction coefficient ε_{280} = 52892.5 M⁻¹ cm⁻¹ and confirmed by the standard Bradford method. Molecular weight of the protein has been confirmed by mass spectrometry. Theoretical MW is 33180.9 Da and it was found to be 33050.0 Da. The difference of 131.2 Da is attributed to the N-terminal Met.

4.3. Determination of compound binding and inhibition of CAs

4.3.1. Thermal shift assay

The thermal shift assay measurements were performed in a Corbett Rotor-Gene 6000 (QIAGEN Rotor-Gene Q) instrument using the blue channel (excitation 365 ± 20 , detection 460 ± 15 nm). Samples contained 5–10 μ M protein, 0–200 μ M compound, 50 μ M ANS (8-anilino-1-naphthalene sulfonate) in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 100 mM NaCl and the final DMSO concentration 2%. The applied heating rate was 1 °C/min. Data analysis was performed as previously described.²⁸

4.3.2. Isothermal titration calorimetry

Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments were performed using ITC₂₀₀ and/or VP-ITC instruments (Microcal, Inc., Northampton, USA) with 5–20 μ M protein solution in the cell and 50–200 μ M of the ligand solution in the syringe. A typical experiment consisted of 18 or 25 injections (2 or 10 μ l each) added at 2 or 3 min intervals, respectively for the two calorimeters. Experiments were performed at 37 °C in a 50 mM sodium phosphate buffer containing 100 mM NaCl at pH 7.0, with a final DMSO concentration of 2%, equal in the syringe and the cell.

4.3.3. CO₂ hydration assay

The carbon dioxide hydration activity of the recombinant human CA II was measured using Applied Photophysics SX.18MV-R stop-flow spectrometer according to Refs. 15,16.

4.4. Crystallography

4.4.1. Crystallization

CA II was concentrated for crystallization to the concentration of 40–60 mg/ml, CA XII and CA XIII were concentrated to the concentration of 20–30 mg/ml. Crystallization was started by mixing of equal volumes of the protein and reservoir buffer in a sitting drop. Crystallization buffers for CA II consisted of 2.2–2.5 M sodium malonate pH 7.5 with or without addition of 0.1 M sodium bicine at pH 9.0. CA XIII was crystallized either in buffer containing 0.1 M sodium citrate, pH 5.5, 0.1 M sodium acetate, pH 4.5, and 30% (w/v) PEG4000 or in 0.1 M ammonium acetate, pH 7.0, 0.1 M sodium acetate, pH 4.5, and PEG3350 26% (w/v). The same reservoir buffers were used in crystallization of CA XII. Crystals were soaked with 0.5 mM solution of the ligand prepared by mixing of 50 mM solution of ligand in DMSO with 50 μ l of reservoir buffer from the crystallization plate. Crystals of CA XIII and XII were flash cryo-cooled after several minute soaking in corresponding reservoir buffers supplemented with 15% (v/v) of ethylene glycol as cryoprotector.

4.4.2. Data collection and structure determination

Diffraction data from complexes of CA II with compounds 2i and CAXII with 3j were collected at the EMBL beam line X11 at the DORIS storage ring (DESY, Hamburg). Data from CA XIII and CA XII complexes with **2i** were collected at the EMBL beam line P14. the storage ring PETRAIII (DESY, Hamburg). Data from crystals of CA II-2f and CA XIII-2f were collected using X-ray diffractometer MicroMax 007 HF (Rigaku, Japan) at the Institute of Biotechnology (Vilnius, Lithuania). Datasets were processed using MOSFLM^{29,30} and SCALA.³¹ Initial phases for molecular replacement for CA II crystal structures were calculated with 3HLJ PDB entry²⁸ excluding heteroatoms and ligands. Initial phases for CA XII crystal structures were obtained using the PDB entry 1JD0, and structures of CA XIII were solved using PDB entry 2NNO as initial models for molecular replacement, which was performed using MOLREP.³² REFMAC³³ and COOT³⁴ were used for structure refinement and model building. Inhibitors were modeled using AVOGADRO,³⁵ and corresponding topology and parameters for refinement were generated by LIBREFMAC.³⁶ Statistics of data collection and refinement is presented in Supplementary Table 1. Co-ordinates and structure factors are deposited in RCSB Protein Databank, PDB IDs are given in Supplementary Table 1. All graphic representations of crystal structures were produced using PYMOL.37

Acknowledgments

This research was funded by a Grant (No. LIG-09/2012) from the Research Council of Lithuania. Diffraction data were collected at the EMBL/DESY, Hamburg, P14 beamline at PETRA III storage ring and X11 at DORIS storage ring. Access to the measurement facilities was funded by the FP7-REGPOT-2009-1 program (project 245721 MoBiLi). M.K. and A.S. acknowledge support by project 'Promotion of Student Scientific Activities' (VP1-3.1-ŠMM-01-V-02-003) from the Research Council of Lithuania. This project is funded by the Republic of Lithuania and European Social Fund under the 2007–2013 Human Resources Development Operational Programme's priority 3. Authors thank Zita Liutkevičiūtė and Vytautas Smirnovas for the help with mass spectrometry analysis of synthetic compounds and proteins and local contacts at the EMBL beamlines Dr. G. Bourenkov and Dr. M. Cianci for the help with beamline operation.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.029.

References and notes

- 1. Capkauskaite, E.; Zubriene, A.; Baranauskiene, L.; Tamulaitiene, G.; Manakova, E.; Kairys, V.; Grazulis, S.; Tumkevicius, S.; Matulis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 51, 259.
- 2. Supuran, C. T. Nat. Rev. Drug Disc. 2008, 7, 168.
- Krishnamurthy, V. M.; Kaufman, G. K.; Urbach, A. R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K. L.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. Chem. Rev. 2008, 108, 946.

- 4. Sly, W. S.; Hu, P. Y. Annu. Rev. Biochem. 1995, 64, 375.
- Alterio, V.; Fiore, A. D.; D'Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; Simone, G. D. Chem. Rev. 2012, 112, 4421.
- 6. Pastorekova, S.; Kopacek, J.; Pastorek, J. Curr. Top. Med. Chem. 2007, 7, 865.
- 7. Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Casini, A. Med. Res. Rev. 2003, 23, 146.
- Hassan, M. I.; Shajee, B.; Waheed, A.; Ahmad, F.; Sly, W. S. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21, 1570.
- Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T. *Expert Opin. Ther. Patents* 2006, 16, 1627.
- Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Conway, J. Carbonic Anhydrase–Its Inhibitors and Activators; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2004. pp 1–363.
- Capkauskaite, E.; Baranauskiene, L.; Golovenko, D.; Manakova, E.; Grazulis, S.; Tumkevicius, S.; Matulis, D. Bioorg. Med. Chem. 2010, 18, 7357.
- 12. Whittington, D. A.; Waheed, A.; Ulmasov, B.; Shah, G. N.; Grubb, J. H.; Sly, W. S.; Christianson, D. W. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001, 98, 9545.
- Jogaite, V.; Zubriene, A.; Michailoviene, V.; Gylyte, J.; Morkunaite, V.; Matulis, D. Bioorg. Med. Chem. 2013, 21, 1431.
- Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L. N. Anal. Biochem. 1989, 179, 131.
 Khalifah, R. G. J. Biol. Chem. 1971, 246, 2561.
- Dudutiene, V.; Zubriene, A.; Smirnov, A.; Gylyte, J.; Timm, D.; Manakova, E.; Grazulis, S.; Matulis, D. Bioorg. Med. Chem. 2013, 21, 2093.
- Scott, A. D.; Phillips, C.; Alex, A.; Flocco, M.; Bent, A.; Randall, A.; O'Brien, R.; Damian, L.; Jones, L. H. ChemMedChem 2009, 4, 1985.
- Fujikura, T.; Miigata, K.; Hashimoto, S.; Imai, K.; Takenaka, T. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 1982, 30, 4092.
- 19. Zanka, A.; Kubota, A. Synlett 1999, 1984.
- 20. Nickson, T. E.; Roche-Dolson, C. A. Synthesis 1985, 6, 669.
- 21. Oelschlager, H. Justus Liebigs Ann. Chem. 1961, 641, 81.
- Baker, B. R.; Schaub, R. E.; Joseph, J. P.; McEvoy, F. J.; Williams, J. H. J. Org. Chem. 1953, 18, 133.

- Anderson, G. W.; Halverstadt, I. F.; Miller, W. H.; Roblin, R. O. J. Am. Chem. Soc. 1945, 67, 2197.
- 24. Kruse, V. R.; Breitmaier, E. Chem. Zeit. 1977, 101, 305.
- Cimmperman, P.; Baranauskiene, L.; Jachimoviciute, S.; Jachno, J.; Torresan, J.; Michailoviene, V.; Matuliene, J.; Sereikaite, J.; Bumelis, V.; Matulis, D. *Biophys. J.* 2008, 95, 3222.
- Sudzius, J.; Baranauskiene, L.; Golovenko, D.; Matuliene, J.; Michailoviene, V.; Torresan, J.; Jachno, J.; Sukackaite, R.; Manakova, E.; Grazulis, S.; Tumkevicius, S.; Matulis, D. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, *18*, 7413.
- Marcisauskas, R.; Karalyte, D.; Sudziuviene, O.; Pesliakas, I.-G. Use of Triazine Dyes in Purification of T4 Poly-Nucleotide Kinase. In *Protein–Dye Interactions: Developments and Applications*; Vijayalakshmi, M., Bertrand, O., Eds.; Springer: Netherlands, 1989; pp 331–336.
- Baranauskiene, L.; Hilvo, M.; Matuliene, J.; Golovenko, D.; Manakova, E.; Dudutiene, V.; Michailoviene, V.; Torresan, J.; Jachno, J.; Parkkila, S.; Maresca, A.; Supuran, C. T.; Grazulis, S.; Matulis, D. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2010, 25, 863.
- 29. Leslie, A. G. W. Joint CCP4+ ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography, 1992, 26.
- 30. Leslie, A. G. W. Acta Crystallogr., Sect. D 2006, 62, 48.
- 31. Evans, P. Acta Crystallogr., Sect. D 2006, 62, 72.
- 32. Vagin, A.; Teplyakov, A. J. Appl. Crystallogr. 1997, 30, 1022.
- 33. Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Acta Crystallogr., Sect. D 1997, 53, 240.
- 34. Emsley, P.; Cowtan, K. Acta Crystallogr., Sect. D 2004, 60, 2126.
- Avogadro, Avogadro: An Open-Source Molecular Builder and Visualization Tool. Version 1.0.0. http://avogadro.openmolecules.net/, 2009.
- Vagin, A. A.; Steiner, R. A.; Lebedev, A. A.; Potterton, L.; McNicholas, S.; Long, F.; Murshudov, G. N. Acta Crystallogr., Sect. D 2004, 60, 2184.
- 37. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrodinger, LLC