

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos fakultetas

Biochemijos studijų programos studentė

Justina KAZOKAITĖ

Bakalauro darbas

**Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI gavimas, stabilumo
apibūdinimas ir jungimosi su slopikliais matavimas**

Darbo vadovas Dr. D. Matulis

Konsultantai Dr. V. Jogaitė

j. m. d. V. Michailovienė

Vilnius 2012

**Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI gavimas, stabilumo
apibūdinimas ir jungimosi su slopikliais matavimas**

Darbas atliktas VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje

Justina KAZOKAITĖ

Darbo vadovas:

Dr. Daumantas MATULIS

Konsultantai:

Dr. Vaida JOGAITĖ

j. m. d. Vilma MICHAILOVIENĖ

TURINYS

SANTRUMPOS	4
IVADAS.....	5
1.LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. Karboanhidrazių apžvalga	6
1.1.1. Karboanhidrazių klasės.....	6
1.1.2. α -karboanhidrazių aktyvusis centras ir katalizuojamos reakcijos	7
1.1.3. Ligos, susijusios su α -karboanhidrazių sutrikusia veikla.....	9
1.1.4. Žmogaus karboanhidrazės VI apžvalga.....	11
1.2. Karboanhidrazių slopikliai.....	12
1.3. Baltymo ir ligando jungimosi termodinamika ir tyrimo metodai	15
1.3.1. Terminio poslinkio metodo apžvalga	15
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	20
2.1. Naudoti prietaisai, medžiagos ir tirpalai.....	20
2.1.1. Naudoti prietaisai	20
2.1.2. Naudotos medžiagos ir rinkiniai	21
2.1.3. Naudotos terpės ir tirpalai	23
2.2. Metodai.....	25
2.2.1. Rekombinantinio hCA VI geno klonavimas	25
2.2.2. Rekombinantinio hCA VI geno raiškos gavimas	29
2.2.3. Rekombinantinės hCA VI tirpumo patikrinimas ir gryninimas	31
2.2.5. Rekombinantinės hCA VI stabilumo įvertinimas ir jungimosi su slopikliais matavimas terminio poslinkio metodu	32
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	35
3.1. Rekombinantinio hCA VI geno klonavimas.....	35
3.2. Rekombinantinio hCA VI geno raiškos ir baltymo tirpumo patikrinimas	36
3.2.1. Rekombinantinio hCA VI geno raiškos patikrinimas naudojant pET15b-hCAVI-1 konstrukta	36
3.2.2. Rekombinantinio hCA VI geno raiškos patikrinimas naudojant pET15b-hCAVI-2 konstrukta	36
3.3. Rekombinantinės hCA VI gryninimas	39
3.4. Rekombinantinės hCA VI stabilumo įvertinimas	41
3.5. Rekombinantinės hCA VI jungimasis su sulfonamidiniais slopikliais	45
IŠVADOS.....	49
SUMMARY	50
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	51

SANTRUMPOS

ANS	1,8-anilinonaftaleno sulfonatas
APS	Amonio persulfatas
AZM	Acetazolamidas (N-[5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamidas)
CA	Karboanhidrazė (<i>angl. Carbonic Anhydrase</i>)
DMSO	Dimetilsulfoksidą
dNTP	Deoksiribonukleotidas
EDTA	Etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska
EZA	Etokzolamidas (6-etoksi-2-benzotiazolsulfonamidas)
hCA	Žmogaus karboanhidrazė (<i>angl. human Carbonic Anhydrase</i>)
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfoninė rūgštis
IPTG	Izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas
LB	Mitybinė terpė (<i>angl. Lysogeny Broth</i>)
MES	2-(N-morfilino)etansulfoninė rūgštis
MZM	Metazolamidas (N-[3-metil-5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2il]acetamidas)
NDS	Natrio dodecilsulfatas
PGR	Polimerazės grandininė reakcija
PIPES	Piperazino-N,N'-bis(2-etansulfoninė rūgštis)
PMSF	Fenilmetilsulfonilchloridas
purt./min	Purtymai per minutę
SAA	Sulfanilamidas (4-aminobenzensulfonamidas)
SAP	Krevečių šarminė fosfatazė (<i>angl. Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)
S. O. C.	Optimali mitybinė terpė (<i>angl. Super Optimal broth with Catabolite repression</i>)
TAE	DNR elektroforezės buferinis tirpalas (<i>angl. TRIS–Acetate–EDTA</i>)
TEMED	N,N,N'N'-tetrametiletildiaminas
TFMSA	Trifluormetansulfonamidas
TRIS	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

IVADAS

Karboanhidrazės (CA) – tai gamtoje paplitę fermentai, katalizuojantys grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją. Žinduoliuose aptikta 16 CA izoformų, kurios skiriasi tarpusavyje vieta ląstelėje, pasiskirstymu audiniuose, aktyvumu bei funkcijomis.

Kadangi šie fermentai dalyvauja daugelyje fiziologinių procesų, tai kai kurių CA izoformų aktyvumo pokyčiai siejami su įvairiomis ligomis, pavyzdžiui, glaukoma ar vėžiu. 1940 m. buvo nustatyta, kad sulfonamidai yra puikūs CA slopikliai. Nuo to laiko ieškoma efektyvių, selektyvių tam tikrą CA izoformą veikiančių slopiklių, neturinčių poveikio kitoms, normaliai organizme veikiančioms CA. Todėl svarbu išanalizuoti kiekvieno izofermento jungimosi su slopikliais selektyvumą.

Baltymo ir ligando sąveikos tyrimui pasirinktas terminio poslinkio metodas. Juo šiame darbe nustatyti rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VI (hCA VI) jungimosi su keletu slopiklių termodinaminiai parametrai ir įvertintas gauto baltymo stabilumas skirtingomis sąlygomis.

Darbo tikslas: gauti tirpią rekombinantinę hCA VI, įvertinti jos stabilumą skirtingomis sąlygomis ir nustatyti jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais termodinامينius parametrus.

Darbo uždaviniai:

- klonuoti hCA VI geną;
- nustatyti optimalią ZnSO_4 koncentraciją ir parinkti labiausiai tinkamą hCA VI raiškai *Escherichia coli* (*E. coli*) kamieną, kuriame rekombinantinės hCA VI raiška ir tirpumas būtų didžiausi;
- išgryninti rekombinantinę hCA VI;
- parinkti buferinį tirpalą, kuriame rekombinantinė hCA VI būtų stabiliausia;
- nustatyti rekombinantinės hCA VI jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais termodinامينius parametrus terminio poslinkio metodu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Karboanhidrazių apžvalga

Karboanhidrazės (CA, EC 4.2.1.1) yra fermentai, katalizuojantys grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją. Ji yra svarbi pH reguliacijai ir palaikymui, CO₂ fiksacijai dumbliuose ir augaluose, jonų, skysčių, dujų apykaitai kvėpavimo ir virškinimo sistemose, elektrolitų sekrecijai, molekulių (karbamido, gliukozės, lipidų, pirimidino) biosintezei, rūgščių ir druskų šalinimui, kai kuriems signaliniams keliams, kalcifikacijai (Pastorekova et al., 2006; Nishimori et al., 2007). Pirmoji CA buvo išskirta iš jaučio eritrocitų 1933 m. (Meldrum ir Roughton, 1933). Šie fermentai plačiai naudojami kaip modeliai įvairiuose biofizikos, bioanalizės, organinės chemijos tyrimuose, kuriant naujus vaistus (Krishnamurthy et al., 2008).

1.1.1. Karboanhidrazių klasės

CA plačiai paplitusios gamtoje. Pagal aminorūgščių sekos homologiją CA yra skirstomos į penkias klases: α -CA klasei priskiriamos CA randamos stuburiniuose, bakterijose, dumbliuose, augalų citoplazmoje, β -CA randamos augaluose, dumbliuose, bakterijose, γ -CA randamos archėjose, bakterijose, δ -CA ir ζ -CA aptinkamos jūriniuose dumbliuose, kurie yra svarbi fitoplaktono dalis (Supuran, 2011).

Žinduoliuose yra 16 skirtingų α -CA izoformų, kurios skiriasi savo funkcija, aktyvumu, vieta ląstelėje bei pasiskirstymu audiniuose. 15 iš jų randama žmogaus organizme. CA VIII, X ir XI sekos panašios į kitų CA sekas, tačiau baltymai neturi CO₂ hidratacinio aktyvumo (Esbaugh ir Tufts, 2006). Kiti izofermentai yra aktyvūs. Jų pasiskirstymas ląstelėje labai įvairus: CA I–III, VII ir XIII yra citozolinės, CA VI sekretuojama, CA IV yra užląstelinė ir prisijungusi prie membranos, CA VA ir VB yra mitochondriniai fermentai, CA IX, XII ir XIV yra transmembraniniai baltymai, kurių aktyvusis centras yra užląstelinėje erdvėje (Nishimori, 2007). Remiantis Rentgeno spindulių difrakcijos kristalografijos duomenimis nustatyta, kad α -CA aktyviajame centre yra cinko jonas.

β -CA yra oligomeriniai baltymai, kurie susiformuoja iš 2–6 monomerų. Prokariotuose esančios β -CA aktyviajame centre turi cinko joną, sudarantį koordinacinius ryšius su dviem cisteiniais, histidinu ir aspartatu. Chloroplastuose randamų β -CA aktyviajame centre cinko jonas koordinuojamas dviejų cisteinų, histidino ir vandens molekulės. β -CA, randamos

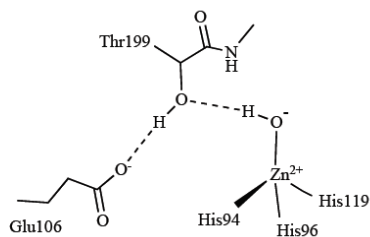
fotosintetinančiuose organizmuose, reikalingos CO₂ fiksacijai ir transportui. Augaluose, kurie naudoja C₃ anglies fiksacijos metabolinį kelią fotosintezėje, β-CA yra mezofilinių ląstelių chloroplastuose. Jos palengvina CO₂ difuziją per chloroplastų membranas, dalyvauja lipidų biosintezėje, padeda apsaugoti nuo ligų. Atogrąžų augaluose, kuriems yra būdingas C₄ anglies fiksacijos metabolinis kelias, β-CA randamos jų mezofilinių ląstelių citozolyje ir katalizuoja atmosferoje esančio CO₂ hidrataciją. Reakcijos metu susidaro bikarbonatas, kuris yra fosfoenolpiruvato karboksilazės substratas, reikalingas tolimesnėms fotosintezės reakcijoms vykti (Ludwig, 2011). Prokariotuose esančios β-CA gamina bikarbonatą, kuris reikalingas aminorūgščių, nukleorūgščių, riebiųjų rūgščių metabolizmui (Mitsubishi et al., 2004).

γ-CA yra homotrimerai. Skirtingai nei α-CA ir β-CA, kurios aktyviajame centre turi cinko joną, γ-CA aktyviajame centre turi geležies (II) joną. Tačiau γ-CA išlieka aktyvios, jei geležies (II) jonas pakeičiamas cinko ar kobalto jonu (Ferry, 2010). Neseniai buvo nustatyta augalų mitochondrijų komplekse esanti γ-CA. Spėjama, kad ji svarbi anglies transportui tarp mitochondrijų ir chloroplastų, taip padidinamas CO₂ fiksacijos efektyvumas (Martin et al., 2009).

δ-CA ir ζ-CA yra monomerai, aptinkami fitoplanktono jūrų dumbliuose *Thalassiosira weissflogii*. Ištirta, kad δ-CA aktyviajame centre yra cinko jonas, o ζ-CA gali spontaniškai aktyviajame centre esantį cinko joną pakeisti kadmio jonu. Spėjama, kad taip šie fermentai prisitaikę veikti metalų jonais užterštuose vandenynuose. Tai padeda jūrų dumbliams greičiau augti (Xu et al., 2008; Supuran, 2011).

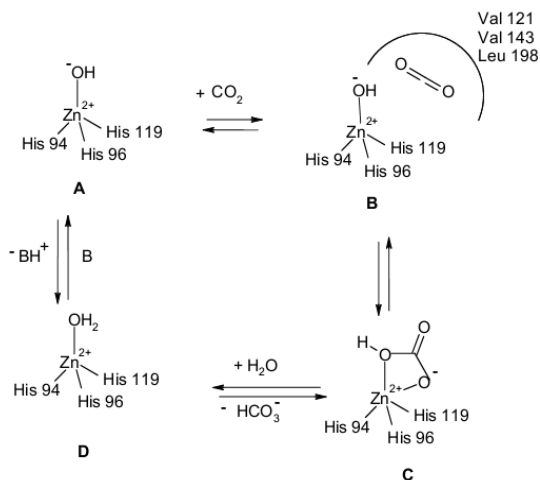
1.1.2. α-karboanhidrazių aktyvusis centras ir katalizuojamos reakcijos

α-CA pagrindinė katalizuojama reakcija yra grįžtama anglies dioksido hidratacija. Fermentiniam α-CA aktyvumui būtinas cinko jonas, kuris pagal Rentgeno spindulių difrakcijos kristalografijos duomenis yra 15 Å gylio aktyvaus centro kišenės dugne. Jį koordinuoja trys histidinais (His94, His96 ir His119) ir vandens molekulė arba hidroksido jonas (Christianson ir Fierke, 1996). Hidroksido jonas sudaro vandenilinius ryšius su Thr199 hidroksilo grupe, kuri vandenilniais ryšiais jungiasi su Glu106 karboksilo grupe (1.1 pav.). Šios sąveikos padidina vandens nukleofilumą ir hidrofobinėje kišenėje, suformuotoje iš Val121, Val143 ir Leu198, substratas (CO₂) orientuojamas palankia nukleofilinei atakai kryptimi. Cinko jono koordinacijai su trimis histidinais bei hidroksido jonu būdinga tetraedro forma (Supuran, 2008).



1.1 pav. hCA II aktyvusis centras (Supuran, 2008).

α -CA katalizuojama reakcija vyksta pagal „Ping-Pong“ mechanizmą. Ją galima suskirstyti į tam tikras stadijas. Reakcijos pradžioje fermento aktyviajame centre esantis cinko jonas koordinuoja hidroksido joną (1.2 pav. A), kuris toliau atakuoja CO_2 (1.2 pav. B). Susidaro cinko jono koordinuojamas bikarbonatas (1.2 pav. C). Jis pakeičiamas vandens molekule (1.2 pav. D). Ši rūgštinė fermento forma yra neaktyvi. Vyksta deprotonacija, kad būtų regeneruotas hidroksido jonas. Tai reakcijos greitį ribojanti stadija. Protonas pernešamas ant kitos aminorūgšties, kuri veikia kaip protonų šaudyklė, tiesiogiai perduodanti protoną nuo vandens aktyviajame centre į išorę. Nustatyta, kad karboanhidrazėse I, II, IV, VII, IX ir XII-XIV tokia protonų šaudyklė yra His64 (Krishnamurthy et al., 2008; Supuran, 2008). Taip pagreitinama fermento regeneracija į aktyvią bazinę formą.



1.2 pav. α -CA katalizuojamos CO_2 hidratacijos mechanizmas (Supuran, 2008).

Be grįžtamos CO_2 hidratacijos α -CA katalizuoja ir kitas reakcijas (1.3 pav.). Tačiau iki šiol nėra aišku, ar jos, išskyrus CO_2 hidrataciją, turi fiziologinę reikšmę.

$\text{O}=\text{C}=\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	1
$\text{O}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCOOH}$	2
$\text{HN}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCONH}_2$	3
$\text{RCHO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCH(OH)}_2$	4
$\text{RCOOAr} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCOOH} + \text{ArOH}$	5
$\text{RSO}_3\text{Ar} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{H} + \text{ArOH}$	6

1.3 pav. α -CA katalizuojamos reakcijos: 1 – CO₂ hidratacija iki bikarbonato, 2 – izociano rūgšties hidratacija iki karbamido rūgšties, 3 – cianamido hidratacija iki karbamido, 4 – aldehydų hidratacija iki gem-diolų, 5 – karboksirūgšties esterų hidrolizė, 6 – sulfoninės rūgšties esterų hidrolizė (Supuran, 2008).

1.1.3. Ligos, susijusios su α -karboanhidrazių sutrikusia veikla

α -CA dalyvauja daugelyje svarbių fiziologinių procesų. Jų aktyvumo pokyčiai sukelia tam tikras ligas, kurios yra sutrikusios CO₂ homeostazės pasekmė.

Viena iš tokių ligų yra glaukoma – antra pagal dažnumą pasaulyje aklumo priežastis po pirmą vietą užimančios tinklainės degeneracijos (Mincione et al., 2009). Pacientų, sergančių glaukoma, akies audinyje esančios CA II, III, IV, XII gamina per daug bikarbonato jonų. Jie skatina akies skysčio sekreciją. Tuomet padidėja akispūdis, dėl kurio sumažėja kraujo patekimas į tinklainę bei pažeidžiamas optinis nervas. Ilgainiui, negydant glaukomos, žmogus apanka. Ligos gydymui naudojami CA slopikliai jau daugiau nei penkiasdešimt metų, bet dėl vaistų sukeliama stipraus šalutinio poveikio, visiškai pagydyti glaukomos nepavyksta. Šios nesėkmės priežastis – nepakankamai selektyvus vaistų poveikis tam tikroms, už ligos eigą atsakingoms CA. Vaistuose esantys slopikliai veikia ir CA, esančias kituose audiniuose (inkstuose, raudonosiose kraujo ląstelėse, skrandyje, plaučiuose), kurios žmogaus organizmui yra gyvybiškai būtinos (Krishnamurthy et al., 2008).

Kita liga, kurios sukeltų mirčių skaičius auga kasmet ir Pasaulinės Sveikatos Organizacijos duomenimis 2030 m. sieks 13,1 milijono mirčių per metus, yra vėžys. Nustatyta, kad vėžinėse ląstelėse, padidėjus CA IX ir XII raiškiai, gaminama daugiau bikarbonato jonų ir protonų nei normaliose. Dėl padidėjusios protonų koncentracijos pasikeičia užląstelinės terpės pH. Jis pasidaro rūgštinis. Toks užląstelinės terpės pH rūgštėjimas sudaro reikiamas sąlygas augti navikui ir formuotis metastazėms (Krishnamurthy et al., 2008). CA IX ir XII yra transmembriniai baltymai, kurių aktyvūs centrai yra išsidėstę ląstelės išorėje, todėl gali pasitarnauti kaip vėžinių ląstelių žymenys bei būti priešvėžinių vaistų taikiniais. Šiuo metu stengiamasi sukurti selektyvius, tam tikram vėžiniui susirgimui gydyti reikalingus CA IX ir XII slopiklius, kurie neturėtų įtakos kitų ląstelės CA veiklai.

Dar viena pasaulyje plačiai paplitusi liga yra nutukimas, kuris gali būti kitų susirgimų – širdies ir kraujagyslių ar medžiagų apykaitos ligų, pavyzdžiui diabeto – priežastimi. Vieni iš taikinių nutukimo gydymui yra mitochondrijose esančios CA VA ir CA VB. Jos gamina bikarbonatą, reikalingą karbamido, gliukozės, lipidų sintezei, reguliuoja gliukozės kiekį kraujyje. Vykstant gliukoneogenezei, mitochondrijose esanti piruvato karboksilazė katalizuoja piruvato karboksilinimą, naudojant bikarbonatą ir ATP iki oksalacto rūgšties. Lipogenezės metu, katalizuojant acetil-KoA karboksilazei, bikarbonatas prijungiamas prie acetil-KoA. Reakcijai reikalinga ATP energija. Susidaro malonil-KoA, iš kurio sintetinamos riebalų rūgštys. Kadangi dėl pakitusios CA VA ir CA VB veiklos susidaro daugiau bikarbonato, tai pagaminama daugiau oksalacto rūgšties, malonil-KoA, iš kurių sintetinama daugiau gliukozės ir riebalų rūgščių, lemiančių nutukimą. Todėl norima selektyviai slopinti CA VA ir CA VB. Jau atrasta keleta CA slopiklių nutukimui gydyti. Vienas iš jų yra topiramatas. Jis mažina kūno svorį nutukusiems žmonėms. Kitas plačiai naudojamas slopiklis yra zonisamidas. Jis ne tik efektyviai mažina svorį, bet ir gydo valgymo sutrikimus: bulimiją ir anoreksiją (Simone, 2008).

Nustatyta, kad nerviniuose audiniuose esančios CA II, CA IV, CA VII ir CA XIV yra atsakingos už smegenų skysčio susidarymą, dalyvauja nervinio impulso perdavime. Esant tam tikriems susirgimams, dėl per didelės CA raiškos gaminama daugiau bikarbonato, kuris sekretuojamas į sinapsinį plyšį ir aktyvuoja daugiau receptorių. Tokia padidėjusi bikarbonato sekrecija nerviniuose audiniuose siejama su migrena, epilepsija. Jau minėti CA slopikliai topiramatas ir zonisamidas gali ne tik mažinti svorį nutukusiems žmonėms, bet naudojami kaip antiepilepsiniai vaistai, reguliuojantys smegenų veiklą (Simone, 2008).

CA, neturinčios CO₂ hidratacinio aktyvumo, siejamos su neurodegeneracinėmis ligomis, vėžiu. Ištirta, kad CA VIII sintetinama beveik visuose organuose, daugiausia smegenelėse, kepenyse ir plaučiuose, o CA X ir XI – centrinėje nervų sistemoje. CA VIII, XI svarbios plaučių, virškinimo trakto navikų vystymuisi (Lu et al, 2004; Morimoto et al, 2005). Ištirta, jog mutacija CA VIII gene sukelia ataksiją. Mutuotos CA VIII kaupiasi Purkinjė ląstelėse, esančiose smegenėlių žievėje, 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 (Turkmen et al., 2009). Ligos gydymui reikalinga genų terapija, kuri mažintų mutuoto CA VIII baltymo esamą koncentraciją ir naują sintezę.

Sparčiai besivystantis bakterijų atsparumas kuriams antibiotikams yra aktuali problema. Pastebėta, kad CA slopikliai gali būti naudojami bakterijų (*Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*), pirmuonių (*Plasmodium falciparum*), grybų (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) sukeltų ligų gydymui, nes jie užblokuoja tam tikrų patogeninių CA, dalyvaujančių svarbiuose metabolizmo keliuose, veiklą, todėl mikroorganizmai nebeišgyvena (Zimmerman et al., 2004; Klengel et al., 2005; Nishimori et al., 2007).

Minėtų ligų gydymui ieškoma vaistų, galinčių atrankiai sąveikauti tik su tam tikra CA izoforma, atsakinga už sukeltą susirgimą, mažinant jos geno raišką ir atstatant ląstelės normalią fiziologinę būseną. Svarbu, kad tokie vaistai neturėtų įtakos normaliai organizme funkcionuojančių CA veiklai. Todėl reikia ištirti kiekvieno izofermento jungimosi su tam tikrais slopikliais selektyvumą.

1.1.4. Žmogaus karboanhidrazės VI apžvalga

CA VI pirmą kartą buvo išskirta iš avių paausinių liaukų ir seilių (Fernley et al., 1979). Vėliau ji buvo gryninama iš žiurkių, karvių ir žmonių seilių (Feldstein ir Silverman, 1984; Hooper 1995; Murakami ir Sly, 1987). Šiuo metu yra žinoma, kad ląstelėje nuo skirtingų promotorių vyksta dviejų tipų CA VI sintezė: įprastomis sąlygomis sekretuojama A tipo CA VI. Streso metu sintetinama signalinės sekos neturinti citozolinė B tipo CA VI (Sok et al., 1999). Ji mažai ištirta. Įdomus atradimas buvo padarytas palyginus CA VI ir seilėse atrasto, skonio svogūnėlių augimą skatinančio baltymo gustino (*angl.* Gustin) sekvenavimo, aktyvumo ir kitus duomenis. Pasirodė, kad gustinas yra ta pati CA VI (Thatcher et al., 1998).

Hibridizacijos tyrimai parodė, kad hCA VI genas yra pirmoje chromosomoje. Jis koduoja 42 kDa baltymą, turintį dvi N-ryšiu prisijungusias oligosacharidines grandines (Kivela et al., 1999). 2012 metais Ewa Pilka su bendradarbiais išsprendė hCA VI kristalinę struktūrą. Baltymas yra dimeras. Monomerai susijungia sudarydami 11 vandenilinių ryšių. Baltymui stabilumo suteikia disulfidinis ryšys tarp Cys42 ir Cys224 (Pilka et al., 2012).

hCA VI katalizinis aktyvumas yra didelis. Jis yra panašus į gausiai organizme randamos hCA I ir vėžinėse ląstelėse sintetamos hCA IX aktyvumą, tačiau mažesnis nei aktyviausios hCA II. Pagal 1.1 lentelėje pateiktus duomenis hCA VI katalizinės konstantos (k_{kat}) ir katalizinio efektyvumo vertės (k_{kat}/K_M) yra tos pačios eilės kaip ir hCA I ir hCA IX, tačiau mažesnės nei hCA II.

1.1 lentelė. Karboanhidrazių katalizuojamos CO₂ hidratacijos reakcijos kinetiniai parametrai esant 20°C ir pH 7,5. k_{kat} – katalizinė konstanta, K_M – Michaelio konstanta (Nishimori et al., 2007).

<i>Izoforma</i>	$k_{kat}(s^{-1})$	$k_{kat}/K_M(M^{-1}s^{-1})$
<i>hCA I</i>	$3,4 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^7$
<i>hCA II</i>	$1,4 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^8$
<i>hCA VI</i>	$3,4 \cdot 10^5$	$4,9 \cdot 10^7$
<i>hCA IX</i>	$3,8 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^7$

hCA VI aptinkama seilėse, seilių liaukose, ašarų liaukose, kasoje, nosies liaukose, stemplėje, plaukų folikuluose, storiojoje žarnoje, virškinimo trakto gleivėse, kepenyse, piene (Leinonen, 2008). Nustatyta, kad hCA VI, nuryta su seilėmis, išlieka aktyvi ir skrandyje (Parkkila et al., 1997). Seilėse esančios hCA VI koncentracija kinta cirkadiniu ritmu: naktį miego metu ji yra labai žema, tačiau greitai padidėja pabudus (Kivela et al., 1999). Maža hCA VI koncentracija siejama su sumažėjusiu skonio suvokimu, padidėjusia skonio receptorių apoptoze skonio svogūnėliuose, dantų kariesu, rūgščių sukeltais gleivių pažeidimais virškinimo trakte (Leinonen, 2008). Didelė šio fermento koncentracija motinos piene 3–5 dienos po gimdymo, funkcinis ir struktūrinis baltymo stabilumas skrandžio rūgštinėje terpėje, skonio svogūnėlių augimo skatinimo funkcija rodo, kad hCA VI yra svarbus fermentas naujagimių virškinimo trakto vystymuisi (Karhumaa et al., 2001).

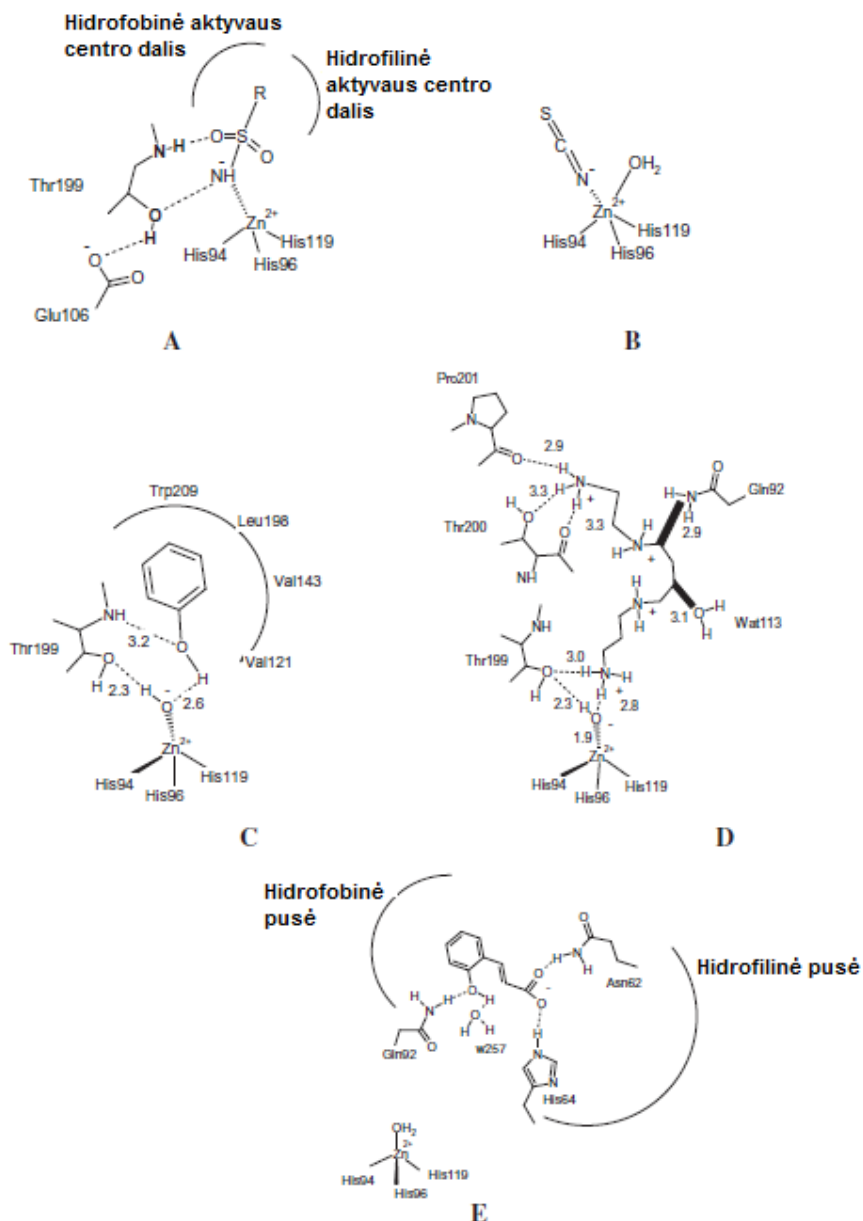
1.2. Karboanhidrazių slopikliai

1940 m. Thaddeus Mann ir David Keilin pirmą kartą pastebėjo, kad sulfonamidai slopina CA veiklą. Nuo tada pradėta kurti vaistus sulfonamidų pagrindu CA sukeltų ligų gydymui. Šiuo metu yra žinomos keturios CA slopiklių klasės:

1. anijonai ir sulfonamidai, kurie prisijungia aktyviajame centre išstumdami vandens molekulę (1.4 pav. A ir B);
2. fenolis ir jo pagrindu sukurti junginiai, kurie jungiasi prie cinko koordinuojamo hidroksido jono (1.4 pav. C);
3. poliaminai, pavyzdžiui, sperminas, spermidinas, kurie panašiai kaip fenoliai jungiasi prie cinko koordinuojamo hidroksido jono (1.4 pav. D);
4. kumarinai, kurie prisijungia prie CA užstodami kelią kitoms molekulėms link aktyvaus centro (1.4 pav. E) (Durdagi et al., 2011).

Sulfonamidų pakeitimo reakcija vyksta, kai šis slopiklis būna deprotonizuotas. CA sąveikos su slopikliu metu aktyviame centre esantis cinko jonas jungiasi su trimis histidinais bei

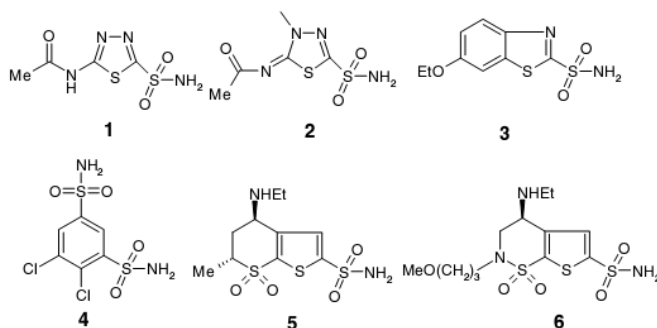
sulfonamido azoto atomu sudarydamas tetraedro formą. Sulfonamidas vandeniliniais ryšiais taip pat sąveikauja su Thr199, kuris vandeniliniais ryšiais susijungęs su Glu106 bei kitomis hidrofilinėmis ir hidrofobinėmis CA aminorūgščių šoninėmis grupėmis. Nustatyta, kad anijonai, pavyzdžiui, tiocianatas, chloridas, irgi gali jungtis prie cinko jono. Tuomet cinko ligandai tarpusavy išsidėsto tetraedro arba trigonalinės bipiramidės forma.



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

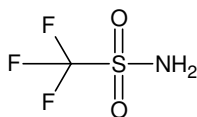
Šiuo metu CA sukeltų ligų gydymui naudojami slopikliai yra acetazolamidas, metazolamidas, etokzolamidas, dichlorofenamidas, dorzolamidas ir brinzolamidas. Šių

junginių struktūrinės formulės pateiktos 1.5 paveiksle. Acetazolamidas kaip vaistas pradėtas naudoti nuo 1956 m. Jis yra diuretikas, dar naudojamas glaukomos, cistinurijos, Marfano sindromo, epilepsijos priepuolių, idiopatinės intrakranijinės hipertenzijos ir kalnų ligos gydymui. Etokzolamidas taip pat yra diuretikas. Jis naudojamas dvylikapirštės žarnos opų, glaukomos ir kai kurių epilepsijos formų gydymui. Glaukomos gydymui dar naudojami metazolamidas, dichlorofenamidas, dorzolamidas bei brinzolamidas (Supuran, 2008).



1.5 pav. Vaistiniuose preparatuose naudojamų sulfonamidų struktūrinės formulės: 1 – acetazolamidas, 2 – metazolamidas, 3 – etokzolamidas, 4 – dichlorofenamidas, 5 – dorzolamidas, 6 – brinzolamidas. Me atitinka CH_3 , o Et – C_2H_5 (Supuran ir Scozzafava, 2007).

Be minėtų heterociklinių junginių dar buvo kuriami halo-alifatiniai CA slopiklai. Į struktūrą įvedamas fluoro arba chloro atomas, taip sumažinama ligando pK_a reikšmė. Tai yra svarbu, nes tik deprotonizuotas slopiklis gali jungtis prie cinko jono CA aktyviajame centre. Vienas iš labiausiai žinomų stiprių halo-alifatinų CA slopiklių yra trifluormetansulfonamidas (TFMSA). Jo struktūrinė formulė pateikta 1.6 paveiksle.



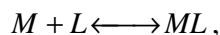
1.6 pav. TFMSA struktūrinė formulė.

Pagrindinė problema kuriant vaistus sulfonamidų pagrindu yra mažas jų selektyvumas tam tikroms CA izoformoms. Tokie vaistai difunduoja į įvairias ląsteles ir, slopindami organizmui reikalingas CA, sukelia šalutinį, žalingą poveikį. Nustatyta, kad slopikliai negali pereiti per ląstelės membranas, jei prie jų prijungiami tam tikri pakaitai (polimerai, piridinai, karbohidratai). Tai padeda nukreipti priešvėžinius preparatus į vėžio vystymesi dalyvaujančių CA IX ir CA XII aktyviuosius centrus. (Lopez et al., 2010). Šiuo metu šveicarų mokslininkai pradeda naudoti nanodaleles, prie kurių prijungia ne tik CA slopiklį, bet ir monokloninius antikūnus, nukreipiančius nanodaleles į tuos audinius, kur padidėjusi tam tikrų CA raiška

(Neri, 2012). Tačiau sulfonamidų pagrindu sukurtų vaistų selektyvumo problema vis dar neišspręsta.

1.3. Baltymo ir ligando jungimosi termodinamika ir tyrimo metodai

Makromolekulės (pavyzdžiui, baltymo) ir ligando jungimosi reakcija užrašoma taip:



kur M – makromolekulė, L – ligandas, ML – jų kompleksas.

Šios sąveikos supratimui svarbu nustatyti jungimosi pusiausvyros konstantą, kuri išreiškiama:

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

Jungimosi konstanta yra atvirkščiai proporcinga slopiklio disociacijos pusiausvyros konstantai:

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

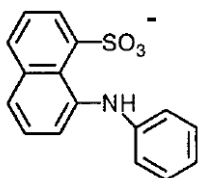
Baltymo sąveikos su ligandu tyrimui naudojami kalorimetriniai metodai leidžia rasti jungimosi pusiausvyros konstantą be substrato ir produkto pusiausvyrinių koncentracijų nustatymo. Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu išmatuojama ne tik reakcijos jungimosi konstanta, bet ir entalpija. Naudojami ir kiti įvairūs metodai, leidžiantys tirti baltymo jungimosi su ligandu termodinamiką: fluorescenciniai, liuminescenciniai metodai, cirkuliarinis dichroizmas, masių spektrometrija, magnetinis rezonansas, paviršiaus plazmono rezonansas, kapiliarinė elektrofozė ir kt.

1.3.1. Terminio poslinkio metodo apžvalga

Šiuo metu naudojami įvairūs būdai, kurie leidžia patikrinti, ar ligandas (būsimo vaisto prototipas) sąveikauja su tam tikru baltymu, atsakingu už ligos sukėlimą. Vienas iš jų yra terminio poslinkio metodas. Jis dar vadinamas termofluoru (*angl.* Thermofluor). Tai biofizikinis būdas atrinkti sąveikaujančius ligandus ir nustatyti terminį baltymo stabilumą, nes pagaminus naują baltymą svarbu žinoti, kokį buferinį tirpalą, pH ir kitas sąlygas pasirinkti, kad baltymas tirpale liktų stabilus kuo ilgesnį laiką.

Terminio poslinkio metode naudojamas fluorescencinis 1,8-anilinonaftaleno sulfonato (ANS) dažas. Tai yra anijonas, kurio struktūrinė formulė pateikta 1.7 paveiksle. ANS sudarytas iš nepolinio anilinonaftaleno žiedo, kuris jungiasi prie nepolinių baltymo sričių, ir

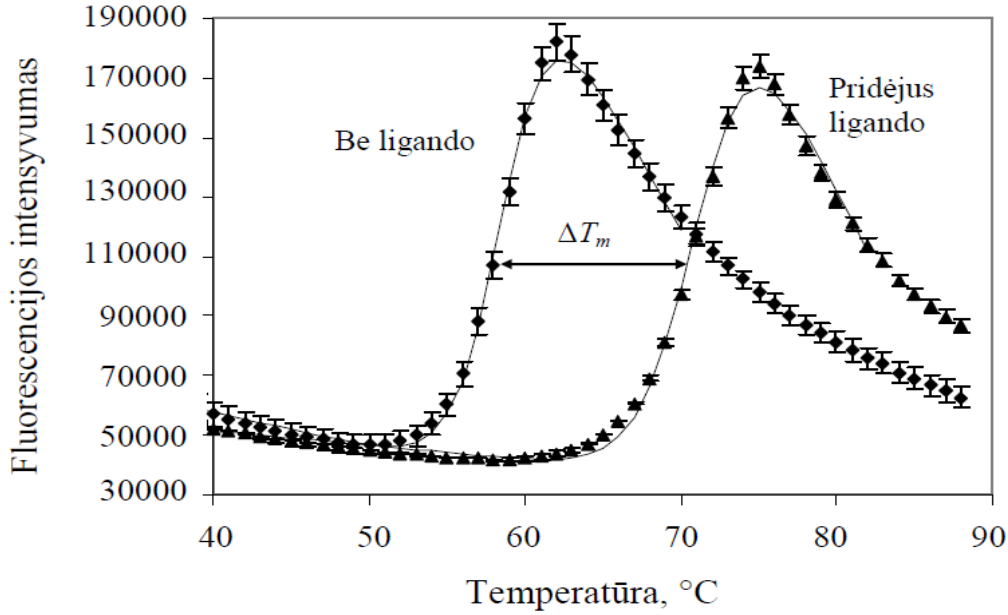
neigiamą krūvį turinčios sulfonato grupės, kuri jungiasi prie teigiamai įkrautų baltymo aminorūgščių šoninių grupių. Taip ANS jungiasi prie baltymo, sudarydamas hidrofobinius ir joninius ryšius (Matulis ir Lovrien, 1998). Ištirta, kad ANS, prisijungusio prie apomiglobino ir apohemoglobino hidrofobinių sričių, fluorescencija yra lygi jo fluorescencijai organiniuose tirpikliuose (Stryer, 1965). Naudojant ANS, nustatytos serumo albumino hidrofobinės sritys bei tirtos baltymų ir lipidų sąveikos (Daniel ir Weber, 1966; Kane ir Bernlohr, 1996). Įrodyta, kad didėjant temperatūrai ANS slopina CA agregaciją (Kundu ir Guptasarma, 1999).



1.7 pav. ANS struktūrinė formulė (Matulis ir Lovrien, 1998).

Kai vandeniniame tirpale baltymas yra natyvios konformacijos ir tokioje būsenoje neturi hidrofobinių kišenių, vanduo gesina ANS fluorescenciją. Didėjant temperatūrai, baltymas pradeda išsivynioti. Atsiveria jo hidrofobinės sritys, prie kurių prisijungia ANS. Tokioje hidrofobinėje aplinkoje vandens molekulės nepasiekia ANS, todėl jo fluorescencijos intensyvumas padidėja. Esant tam tikrai temperatūrai baltymas denatūruoja, atitinkamai mažėja ANS fluorescencijos intensyvumas. Be to, ištirta, kad ANS fluorescencija priklauso nuo temperatūros: keliant temperatūrą fluorescencijos intensyvumas mažėja (Diwu et al., 1997).

Esant tam tikrai temperatūrai, išsivyniojusio ir natyvaus baltymo koncentracijos lygios ir išsivyniojimo laisvoji Gibso energija lygi nuliui. Tokia temperatūra vadinama baltymo lydymosi temperatūra (T_m). Kai prie baltymo prisijungia ligandas, dažniausiai padidėja išsivyniojimo laisvoji Gibso energija. Todėl komplekso, sudaryto iš baltymo ir ligando, T_m didesnė nei baltymo T_m (1.8 pav.).



1.8 pav. ANS fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo temperatūros, kai tirpale yra baltymas (●) ir baltymas su ligandu (▲) (Matulis, 2008).

Toliau didinant temperatūrą, fluorescencija mažėja. Tokie fluorescencijos intensyvumo pokyčiai aprašomi lygtimi:

$$y = y_N + \frac{y_U - y_N}{1 + e^{\frac{\Delta_u G}{RT}}} = y_U + \frac{y_N - y_U}{1 + e^{-\frac{\Delta_u G}{RT}}} \quad (1)$$

Čia y_N – natyvaus, y_U – išsivyniojusio baltymo–ANS komplekso fluorescencija, T – absoliuti temperatūra Kelvinais, R – universalioji dujų konstanta. Natyvaus ir išsivyniojusio baltymo–ANS komplekso fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo temperatūros aprašomos lygtimis:

$$y_N = y_{N,T_m} + m_N (T - T_m), \quad (2)$$

$$y_U = y_{U,T_m} + m_U (T - T_m), \quad (3)$$

kur y_{N,T_m} ir y_{U,T_m} – natyvaus ir išsivyniojusio baltymo fluorescencijos 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 ($\Delta_U H_{Tr}$) ir entropiją ($\Delta_U S_{Tr}$), kurios priklauso nuo temperatūros, bei šiluminę talpą ($\Delta_U C_p$), kuri nepriklauso nuo temperatūros:

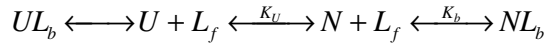
$$\Delta_U G_{(T)} = \Delta_U H_{(T)} - T \Delta_U S_{(T)} = \Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T \left(\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln \left(\frac{T}{T_r} \right) \right), \quad (4)$$

kur T_r yra baltymo lydymosi temperatūra, kai tirpale nėra ligando. Jai esant, baltymo išsivyniojimo entalpija ir entropija yra žinomos.

Įstatome (2), (3) ir (4) lygtis į (1) lygtį. Tuomet fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo temperatūros išreiškiama:

$$y = y_{N,T_m} + m_N (T - T_m) + \frac{y_{U,T_m} - y_{N,T_m} + (m_U - m_N)(T - T_m)}{1 + e^{\frac{\Delta_u H_{T_m} + \Delta_u C_p (T - T_m) - T \left(\Delta_u S_{T_m} + \Delta_u C_p \left(\ln \frac{T}{T_m} \right) \right)}{RT}}} \quad (5)$$

Didėjant temperatūrai, baltymas denatūroja. Jei ligandas stipriau jungiasi prie išsivyniojusio baltymo, tai baltymas destabilizuojamas. Priešingu atveju, jei ligandas jungiasi prie natyvaus baltymo, tai baltymas dažniausiai stabilizuojamas ir pusiausvyra tarp natyvos ir išsivyniojusios baltymo būsenų pasislenka link natyvos:



kur U – išsivyniojęs baltymas, UL_b – išsivyniojusio baltymo ir prisijungusio ligando kompleksas, L_f – laisvas ligandas, N – natyvus baltymas, NL_b – natyvaus baltymo ir prisijungusio ligando kompleksas. Bendri baltymo (P_t) ir ligando (L_t) kiekiai:

$$P_t = [N] + [U] + [NL_b] + [UL_b] \quad (6)$$

$$L_t = [L_f] + [NL_b] + [UL_b] \quad (7)$$

Baltymo išsivyniojimo pusiausvyros konstanta (K_U) siejama su baltymo išsivyniojimo laisvąja Gibso energija ($\Delta_U G_{(T)}$):

$$K_U = \frac{[N]}{[U]} = e^{-\Delta_U G_{(T)} / RT} = e^{-(\Delta_U H_{(T)} - T \Delta_U S_{(T)}) / RT} = e^{-(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T (\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T / T_r))) / RT}, \quad (8)$$

kur $\Delta_U G_{(T)}$, $\Delta_U H_{(T)}$, $\Delta_U S_{(T)}$ ir $\Delta_U C_p$ yra baltymo išsivyniojimo laisvoji Gibso energija, entalpija, entropija ir šiluminė talpa.

Ligando jungimosi su natyviu baltymu pusiausvyros konstanta (K_b) priklauso nuo laisvosios Gibso energijos, susidarančios ligandai jungiantis prie baltymo ($\Delta_b G_{(T)}$):

$$K_b = \frac{[NL_b]}{[N][L_f]} = e^{-\Delta_b G_{(T)} / RT} = e^{-(\Delta_b H_{T_r} - T \Delta_b S_{T_r}) / RT} = e^{-(\Delta_b H_{T_o} + \Delta_b C_p (T - T_o) - T (\Delta_b S_{T_o} + \Delta_b C_p \ln(T / T_o))) / RT}, \quad (9)$$

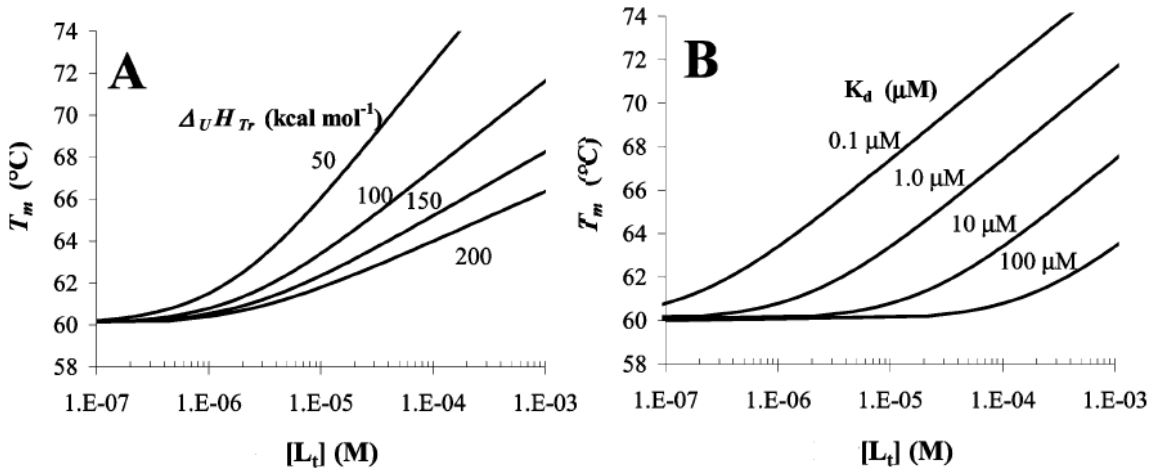
kur $\Delta_b G_{(T)}$, $\Delta_b H_{(T)}$, $\Delta_b S_{(T)}$, $\Delta_b C_p$ yra ligando jungimosi su natyviu baltymu laisvoji Gibso energija, entalpija, entropija ir šiluminė talpa, o T_o yra temperatūra, kurioje tiriamas ligando jungimasis su baltymu (dažniausiai 37°C).

Daroma prielaida, kad ligandas nesijungia arba jungiasi žymiai silpniau su išsivyniojusi 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:

$$L_t = (1 - K_U) \cdot \left(\frac{P_t}{2} + \frac{1}{K_U K_b} \right) = (1 - e^{-(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_P (T - T_r) - T (\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_P \ln(T/T_r))) / RT}) \cdot \left(\frac{P_t}{2} + 1 / e^{-(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_P (T - T_r) - T (\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_P \ln(T/T_r))) / RT} e^{-(\Delta_b H_{T_o} + \Delta_b C_P (T - T_o) - T (\Delta_b S_{T_o} + \Delta_b C_P \ln(T/T_o))) / RT} \right) \quad (10)$$

10 lygtis yra abstrakti ir tiksliai neišsprendžiama per T_m kaip L_t funkcija. Vietoj to kreivės simuliuojamos skaičiuojant bendrą ligando koncentraciją, kurios reikia norint pasiekti eksperimentiškai nustatytą T_m (Matulis et al., 2005).

Terminio poslinkio metodu matuojama baltymų T_m esant skirtingoms slopiklio koncentracijoms bei, žinant baltymo išsivyniojimo entalpiją ($\Delta_U H$), randama slopiklio disocijacijos pusiausvyros konstanta (K_d). 1.9 paveiksle parodyta, kaip baltymo lydymosi temperatūra (T_m) priklauso nuo slopiklio koncentracijos, kai baltymo išsivyniojimo entalpijos ir slopiklio disocijacijos pusiausvyros konstantos yra skirtingos.



1.9 pav. T_m priklausomybė nuo slopiklio koncentracijos, esant skirtingoms baltymo išsivyniojimo entalpijoms (A) ir slopiklio disocijacijos pusiausvyros konstantoms (B) (Matulis et al., 2005).

$\Delta_U H$ nepriklauso nuo tiriamo slopiklio. Esant tam tikrai slopiklio koncentracijai, baltymų su mažesne išsivyniojimo entalpija T_m pokytis didesnis nei tų baltymų, kurių išsivyniojimo entalpija yra didelė (1.9 pav. A). T_m pokytis priklauso ir nuo K_d . Stipriai besijungiančių slopiklių K_d mažesnė ir jie labiau padidina T_m nei silpnai besijungiantys, kai slopiklio koncentracija yra vienoda (1.9 pav. B) (Matulis et al., 2005).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudoti prietaisai, medžiagos ir tirpalai

2.1.1. Naudoti prietaisai:

- autoklavas;
- baltymų elektroforezės aparatas „BIO-RAD“ ir jo priedai;
- DNR elektroforezės aparatas „Sigma-Aldrich“ ir jo priedai;
- gryninimo sistema „AKTA explorer“;
- kaitinamoji vonelė „Kleinfeld Labortechnik MBT250“;
- kaitinimo plytelė „ИСКОПКА“;
- laminarinis boksas;
- magnetinė maišyklė „BIOSAN“;
- pH-metras „LaboChema“;
- PGR termocikleris „Eppendorf Mastercycler personal“;
- purtyklė „BIOSAN Multi-vortex V-32“;
- realaus laiko PGR termocikleris „Rotor-Gene 6000 (QIAGEN Rotor-Gene Q) spectrofluorimeter“;
- spektrofotometras „Jenway 6305“;
- spektrofotometras „NanoDrop“;
- svarstyklės „KERN 572“;
- šaldoma centrifuga „Beckmann“ (JA – 20 ir JA – 10 rotorai);
- šaldoma mikrocentrifuga „Eppendorf Centrifuge 5415 R“;
- termostatas „Eppendorf ThermoStat plus“;
- termostatuojama purtyklė „LaboChema“;
- ultragarso šaltinis „Bandolin Sonopuls“ (VS 70T antgalis);
- UV/WL šaltinis su gelių dokumentavimo sistema „MiniBis Pro“.

2.1.2. Naudotos medžiagos ir rinkiniai:

- Aldrich: ANS, EZA;
- Alfa Aesar: gliukozė, TFMSA;
- BioRad: TEMED, glicinas;
- Ferak Berlin: Tritonas–X100;
- Fluka: bisakrilamidas, Coomassie Brilliant Blue R-250, etidžio bromidas, guanidino hidrochloridas, HCl, NaOH, Na₂B₄O₇, Na₃PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄·12H₂O, PIPES;
- GE Healthcare: sefarozė, p-aminometilbenzeno sulfonamida is modifikuota agarozė;
- Labochemia: karbamidas;
- Matheson Coleman & Bell: bromfenolio mėlis;
- Реахим: ZnSO₄, MnCl₂·4H₂O;
- Roche: chloramfenikolis, glicerolis, peptidazių slopiklių kokteilis tabletėmis, PMSF;
- Roth: agar–agaras, akrilamidas, ampicilinas, APS, CaCl₂, DMSO, HEPES, LB mitybinė terpė, MgCl₂, mielių ekstraktas, NaCl, triptonas;
- Serva: CH₃COONa;
- Sigma: AZM, BaCl₂·2H₂O, CH₃COOH, EDTA, 80 % H₃PO₄, imidazolas, KCl, MZM, MES, MgSO₄, natrio citratas, natrio formiatas, natrio sukcinatas, NaBr, NaF, NaI, Na₂SO₄, NDS, NiCl₂, TRIS, SAA;
- Thermo Fisher Scientific: agarozė, IPTG, baltymų dydžio žymuo (Protein Molecular Weight Marker), DNR dydžio žymuo (GeneRuler™ DNA Ladder Mix), dažas DNR mėginių užnešimui ant agarozės gelio (6X Orange Loading Dye), fermentai klonavimui (NdeI, XhoI, SAP, T4 DNR ligazė ir jų buferiniai tirpalai), dNTP mišinys, *Pfu* DNR polimerazė ir jos buferinis tirpalas, rinkiniai: „GeneJET™ Gel Extraction Kit“, „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“, „GeneJET™ PCR Purification Kit“.

***Escherichia coli* kamienai:**

E. coli XLI–blue (Stratagene): naudotas rekombinantinės hCA VI raiškos konstrukto pET15b–hCAVI–1 (1 – 308 aminorūgšties) ir pET15b–hCAVI–2 (21 – 280 aminorūgšties) padauginimui.

E. coli BL21 (DE3) ir iš jo išvestas RosettaTM 2 (DE3) (Novagen) bakterijų kamienai, naudoti rekombinantinės hCA VI raiškai. RosettaTM 2 (DE3) kamienas, skirtingai nei BL21 (DE3), turi chloramfenikoliui atsparią plazmidę pRARE2, kurioje yra papildomi tRNR genai septyniems, retai *E. coli* ląstelėse sutinkamiems kodonams: AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, CGG, todėl jis skirtas sunkiau paprastame BL21 (DE3) kamienne gaunamų, eukariotinių baltymų sintezei pagerinti. Dėl į ląstelės chromosomoje esančio λ profago tiek BL21 (DE3), tiek RosettaTM 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.

hCA VI konstruktas ir vektorius:

pUC57-hCAVI – konstruktas, turintis viso ilgio hCA VI geną ir koduojantis 308 aminorūgčių baltymą, pasižymintį UniProtKB duomenų bazėje nurodytu hCA VI (P23280) polimorfizmu: devyniasdešimt aminorūgštis yra glicinas vietoj serino. Konstruktas gautas iš kolegų (VU Biochemijos instituto, Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus).

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

Pradmenys:

T1 (5'–TGGACATATGAGGGCCCTGGTG–3') – tiesioginis pradmuo hCA VI geno padauginimui pilno ilgio rekombinantiniam baltymui gauti. Pabraukta NdeI kirpimo vieta ir joje paryškintas transkripcijos pradžios kodonas ATG.

A1 (5'–GGCCTCGAGTCAGTTCAATGCTCTTCT–3') – atvirkštinis pradmuo hCA VI geno padauginimui pilno ilgio rekombinantiniam baltymui gauti. Pabraukta XhoI kirpimo vieta ir paryškintas transkripcijos pabaigos kodonui TGA atvirkštinis komplementarus kodonas TCA.

T2 (5'–CCAGCATATGTCTGACTGGACCTAC–3') – tiesioginis pradmuo hCA VI geno, koduojančio baltymą nuo 21 iki 280 aminorūgštis, padauginimui. Pabraukta NdeI kirpimo vieta ir joje paryškintas transkripcijos pradžios kodonas ATG.

A2 (5'–GAGTCTCGAGTTAATTCGGAAGTTGGATTC–3') – atvirkštinis pradmuo hCA VI geno, koduojančio baltymą nuo 21 iki 280 aminorūgšties, padauginimui. Pabraukta XhoI kirpimo vieta ir paryškintas transkripcijos pabaigos kodonui TAA atvirkštinis komplementarus kodonas TTA.

T7–Prom (5'–TAATACGACTCACTATAGGG–3') – tiesioginis pradmuo pET15b–hCAVI–1 ir pET15b–hCAVI–2 konstrukto sekoms nustatyti sekoskaitos metu.

T7–Term (5'–GGGGTTATGCTAGTTATTGC–3') – atvirkštinis pradmuo pET15b–hCAVI–1 ir pET15b–hCAVI–2 konstrukto sekoms nustatyti sekoskaitos metu.

2.1.3. Naudotos terpės ir tirpalai

Terpės:

LB mitybinė terpė: 25 g terpės ištirpinami viename litre distiliuoto vandens. Autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje.

LB mitybinė terpė (agarizuota): 25 g terpės ištirpinami viename litre 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 ir buferiniai 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 (6X): 0,6 % bromfenolio mėlio, 600 mM DTT, 60 % glicerolio, 12 % NDS, 300 mM TRIS (pH 6,8). Išpilstoma po 1 mL ir laikoma -20°C temperatūroje.

Baltymų elektroforezės poliakrilamido gelyje tirpalai:

1) 12 % apatinis frakcionuojantis gelis (5,0 mL):

30 % akrilamido/bisakrilamido tirpalas	2 mL
1,5 M TRIS pH 8,8	1,25 mL
10 % NDS	50 µL
H ₂ O	1,585 mL
10 % APS	25 µL
TEMED	2,5 µL

2) 4 % viršutinis koncentruojantis gelis (2,5 mL):

30 % akrilamido/bisakrilamido tirpalas	0,335 mL
0,5 M TRIS pH 6,8	0,625 mL
10 % NDS	25 µL
H ₂ O	1,5 mL
10 % APS	12,5 µL
TEMED	2,5 µL

Biomasės ardymo buferinis tirpalas: 25 mM TRIS, 100 mM Na₂SO₄, 50 mM imidazolo, 0,5 % tritono-X100. 100 mL tokio tirpalo ištirpinama 1 tabletė peptidazių slopiklių kokteilio. Tirpalo pH koreguojamas iki 8,5. Laikoma 4°C temperatūroje.

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

Kompetentinių ląstelių transformacijos buferis: 15 mM CaCl₂·2H₂O, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂·4H₂O, 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 (50X): 50 mM EDTA, 2 M TRIS, 57,1 mL acto rūgšties. Skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Laikoma kambario temperatūroje.

2.2. Metodai

2.2.1. Rekombinantinio hCA VI geno klonavimas

Kompiuterinės programos

hCA VI geno klonavimas planuotas naudojantis programomis: A plasmid Editor v1.17 (ApE) ir pDRAW32 1.0. ApE programa leidžia „teoriškai“ atlikti klonavimą: suranda vektoriaus multikloninėje srityje patogių naudoti restrikcijos endonukleazijų kirpimo vietas, jomis „sukarpo“ vektorių bei planuojamą klonuoti PGR produktą, jį įstato į sukirptą vektoriaus dalį, leidžia pamatyti sukurto konstrukto pilną DNR seką. pDRAW32 1.0. programa parodo visus konstrukto koduojamus atviro skaitymo rėmelius, o tai leidžia patikrinti, ar naudojant tokiu būdu sukurtą konstruktą vyks tikslinio baltymo sintezė. Toks pasitikrinimas leidžia įsitikinti, ar klonavimas suplanuotas teisingai.

Polimerazės grandininė reakcija

Polimerazės grandininė reakcija (PGR) taikoma norint padauginti DNR fragmentus. Reakcijai panaudota *Pfu* DNR polimerazė, išskirta iš *Pyrococcus furiosus*. *Pfu* DNR polimerazė pasižymi 5'→3' polimeraziniu bei 3'→5' egzonukleaziniu aktyvumais. Ruošiamas 50 µl mišinys:

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

PGR atlikta 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 65°C temperatūroje.
4. DNR sintezė 1 min 72°C temperatūroje.
5. Galutinis išsikišusių DNR galų užpildymas 5 min 72°C temperatūroje.

2–4 stadijos kartojamos 25 kartus.

Reakcijos produktai patikrinami 1,5 % agarozės gelyje.

DNR elektroforezė 1,5 % agarozės gelyje

Paruošiamas 1,5 % agarozės gelis 1X TAE DNR elektroforezės buferiniame tirpale, turintis 0,5 µg/mL etidžio bromido. Sumaišoma 5 µL mišinio, gauto po PGR, su 1 µL dažo (6X Orange Loading Dye) ir užnešama ant gelio. Šalia mėginių užnešami 4 µL DNR dydžio žymens (GeneRuler™ DNA Ladder Mix). Elektroforezė vykdoma esant 8 V/cm² įtampai naudojant 1X TAE DNR elektroforezės buferinį tirpalą, turintį 0,25 µg/mL etidžio bromido. Orange G dažui, esančiam 6X Orange Loading Dye tirpale, pasiekus gelio apačią, elektroforezė nutraukiama. Gelis analizuojamas ultravioletinėje šviesoje.

PGR produkto gryninimas iš PGR mišinio

PGR produktas iš PGR mišinio gryninamas naudojant „GeneJET™ PCR Purification Kit“ rinkinį. Dirbama pagal gamintojo pateiktą protokolą. Išskirtos DNR koncentracija matuojama „NanoDrop“ spektrofotometru ($\lambda = 260$ nm).

PGR produkto ir pET15b vektoriaus restrikcija

<i>PGR produkto restrikcijos mišinys:</i>	<i>pET15b vektoriaus restrikcijos mišinys:</i>
▪ po 10 fermento aktyvumo vienetų NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazių; ▪ 415 ng išgryninto PGR produkto; ▪ 2X Tango buferio; ▪ dejonizuoto vandens.	▪ po 10 fermento aktyvumo vienetų NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazių; ▪ 200 ng pET15b vektoriaus; ▪ 2X 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 defosforilimas

Pasibaigus restrikcijos laikui, vektoriaus 5' galo fosfatai pašalinami į restrikcijos mišinį pridėjus SAP (1 fermento aktyvumo vieneta) bei 1X fermento buferinio tirpalo.

Reakcija vykdoma 37°C temperatūroje 30 min. Po to reakcijos 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 UV šviesoje išpjaunami iš agarozės gelio ir gryninami naudojant „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ rinkinį pagal gamintojo pateiktą protokolą. Išgrynintų produktų koncentracija matuojama „NanoDrop“ spektrofotometru ($\lambda = 260 \text{ nm}$).

Ligavimas

PGR produkto kiekis reikalingas ligavimui apskaičiuojamas pagal formulę:

PGR produkto santykis su vektoriumi $\cdot$ (PGR produkto dydis (kb)/Vektoriaus dydis (kb)) $\cdot$ vektoriaus kiekis (ng) = PGR produkto kiekis (ng)

PGR produkto/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:

pET15b–hCAVI–1 konstruktui: $3 \cdot (0,929 \text{ kb} / 5,708 \text{ kb}) \cdot 25 \text{ ng} = 12,2 \text{ ng}$

pET15b–hCAVI–2 konstruktui: $3 \cdot (0,788 \text{ kb} / 5,708 \text{ kb}) \cdot 25 \text{ ng} = 10,3 \text{ ng}$

Ruošiamas 20 μL reakcijos mišinys:

- 12,2 ng PGR produkto pET15b–hCAVI–1 konstruktui, 10,3 ng PGR produkto pET15b–hCAVI–2 konstruktui;
- 25 ng pET15b vektoriaus;
- 1X 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 ant kietos agarizuotos LB mitybinės terpės su selektyviu kiekvienam kamienui antibiotiku Petri lėkštelėje 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 selektyviu 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 selektyviu kiekvienam kamienui antibiotiku perkeliama 2,5 mL pradinės kultūros. Auginama termostatuojamoje purtyklėje 37°C temperatūroje esant 250 purt./min tol, kol ląstelių tirpalo optinis tankis ($\lambda = 600$ nm) pasiekia apie 0,55.
4. Kolba perkeliama į ledo vonią ir laikoma 10 min.
5. Užaugusios ląstelės centrifuguojamos 10 min esant 1500 g 4°C temperatūroje.
6. 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 4 ir 5 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 greitai išpilstomos po 100 μ L į atšaldytus ependorfinius mėgintuvėlius ir užšaldomos skystame azote. Laikomos -80°C temperatūroje.

Kompetentinių *E. coli* ląstelių transformacija

1. 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 μ g/mL), o RosettaTM 2 (DE3) – su ampicilinu (100 μ g/mL) ir chloramfenikoliu (34 μ g/mL).
2. Kai po ligavimo atliekama ląstelių transformacija ligavimo mišiniu, į 50 μ L kompetentinių XLI–blue kamieno ląstelių įdedama 5 μ L ligavimo mišinio. Kai transformuojami baltymų raiškos kamienai BL21 (DE3) ir RosettaTM 2 (DE3) ar atliekamas pakartotinis konstrukto padauginimas XLI–blue kamienne, tai į 50 μ L kompetentinių ląstelių įpilama 1 μ L 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. Toliau 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 „GeneJET™ 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. Atrinktos plazmidinės DNR seka nustatoma VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre.

2.2.2. Rekombinantinio hCA VI geno raiškos gavimas

hCA VI raiška *E. coli* bakterijų BL21 (DE3) ir Rosetta™ 2 (DE3) kamienuose

1. Vykdam baltymo raišką BL21 (DE3) kamienne, į 100 mL LB mitybinės terpės su 100 µg/mL ampicilino, o Rosetta™ 2 (DE3) kamienne – į 100 mL 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 didesnę 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 0,7.
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 1X baltymų elektroforezės dažo ir mišinys pakaitinamas 5 min 95°C temperatūroje.

5. Tikslinio baltymo raiška indukuojama pridedant 1 mM IPTG ir 0,1–0,7 mM ZnSO₄ (iš pradžių indukcijai naudota 0,1 mM ZnSO₄, vėliau, siekiant gauti kuo daugiau tirpaus ir aktyvaus baltymo, ZnSO₄ koncentracija buvo padidinta iki 0,7 mM). Toliau auginama dviem būdais: arba 4 val. 30°C, arba 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 ląstelių optinis tankis pasibaigus auginimo laikui ir padalinamas iš optinio tankio, buvusio prieš tikslinio baltymo indukciją. Gautas santykis parodo, kiek kartų mažiau reikia paimti ląstelių kultūros mėginio pasibaigus auginimo laikui. Mėginys paruošiamas analizei poliakrilamido gelyje 4 žingsnyje aprašytu būdu.
7. Užauginta bakterijų kultūra centrifuguojama 20 min esant 3300 g 4°C temperatūroje. Terpė nupilama. Biomasa laikoma -20°C temperatūroje.
8. Paruošti ląstelių lizatų mėginiai analizuojami poliakrilamido gelyje.

Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje:

Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelyje atliekama pagal Laemmli metodiką (1970 m.). Apatinis frakcionuojantis gelio tirpalas pilamas tarp švariai nuvalytų dviejų elektroforezės stiklų paliekant 2 cm atstumą nuo jų viršaus. Tam, kad gelio paviršius būtų lygus, jis užsluoksniuojamas distiliuotu vandeniu. Polimerizacija kambario temperatūroje trunka apie 30 min. Po to užsluoksniuotas distiliuotas vanduo nupilamas, sustingusio gelio paviršius nusausinamas filtriniu popieriumi. Pilamas viršutinio gelio tirpalas iki elektroforezės stiklų viršaus ir įstatomos „šukutės“. Polimerizacija kambario temperatūroje trunka apie 30 min. Viršutiniam geliui sustingus, stiklai su geliu statomi į elektroforezės aparatą, aparato blokas užpilamas 1X glicino–NDS–TRIS baltymų elektroforezės buferiniu tirpalu ir išimamos „šukutės“. Į susidariusius gelio šulinėlius įnešami baltymų dydžio žymuo ir mėginiai. Elektroforezė vykdoma esant 50 mA stiprio srovei, kol dažo linija pasiekia frakcionuojančio gelio apačią. Toliau gelis dažomas 20 min poliakrilamido gelių dažu 25°C temperatūroje esant 70 purt./min. Po to virinamas distiliuotame vandenyje 10 min, kol išblunka.

2.2.3. Rekombinantinės hCA VI tirpumo patikrinimas ir gryninimas

Tirpių ir netirpių baltymų nustatymas:

1. 1 g bakterijų biomasės tirpinamas 6 mL ardymo buferiniame tirpale.
2. Įpilama PMSF, kad galutinė koncentracija būtų 1 mM, ir maišoma 1 val. 4°C temperatūroje.
3. Ląstelės ardamos ultragarsu 10 min kas 60 s darant 60 s pertraukas esant 50 % vibracijos amplitudei.
4. Lizatas centrifuguojamas 20 min esant 48254 g 4°C temperatūroje.
5. Tirpių baltymų, esančių supernatante, koncentracija matuojama Bradfordo metodu. Nuosėdose esantys baltymai ištirpinami 2 mL 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 6X baltymų elektroforezės dažo. Mišiniai kaitinami 5 min 95°C temperatūroje.
7. Mėginiai analizuojami poliakrilamido gelyje.

Rekombinantinės hCA VI gryninimas

6 g bakterijų biomasės suspenduojami 25 mL ardymo buferinio tirpalo. Įpilama PMSF, kad galutinė koncentracija būtų 1 mM, ir maišoma 1 val. 4°C temperatūroje. 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, užpildytą 10 mL sefarozės su imobilizuotais Ni^{2+} jonais. Jos pusiausvyrinimui naudotas 25 mM TRIS buferinis tirpalas, kuriame yra 100 mM Na_2SO_4 , 50 mM imidazolo, pH 8,5. Tekėjimo greitis – 70 mL/val. Baltymas desorbuojamas didinant imidazolo koncentraciją nuo 50 mM iki 700 mM. Frakcijose esančių baltymų koncentracija matuojama Bradfordo metodu (Bradford, 1976). Toliau baltymai analizuojami poliakrilamido gelyje. Sujungiamos tikslinę baltymą turinčios frakcijos. Baltymo tirpalas dializuojamas per naktį (16 val.) 100 mM TRIS buferiniame tirpale su 200 mM Na_2SO_4 , pH 8,5.

Norint gauti tik teisingai susivyniojusias CA, baltymo tirpalas leidžiamas per kolonėlę, 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 100 mM TRIS

buferinis tirpalas su 200 mM Na₂SO₄, pH 8,5. Tekėjimo greitis – 45 mL/val. Baltymo desorbcijai naudojamas 100 mM CH₃COONa buferinis tirpalas su 400 mM NaN₃, pH 5,6. Frakcijose esančių baltymų koncentracija matuojama Bradfordo metodu (Bradford, 1976). Toliau baltymai analizuojami poliakrilamido gelyje. Sujungiamos tikslinį baltymą turinčios frakcijos. Baltymo tirpalas dializuojamas per naktį (16 val.) 25 mM MES buferiniame tirpale su 50 mM Na₂SO₄, pH 5,9.

2.2.5. Rekombinantinės hCA VI stabilumo įvertinimas ir jungimosi su slopikliais matavimas terminio poslinkio metodu

Rekombinantinės hCA VI stabilumo įvertinimas

Skiedžiant dializės buferiniu tirpalu (25 mM MES su 50 mM Na₂SO₄, pH 5,9), ruošiamas pradinis 20 µM rekombinantinės hCA VI tirpalas, turintis 100 µM ANS. Į mėginius išpilstoma po 10 µL pradinio baltymo tirpalo ir po 10 µL reagentų tirpalų (2.1 ir 2.2 lentelės), kurių įtaką baltymo stabilumui norima iširti.

2.1 lentelė. Buferiniai tirpalai, naudoti hCA VI stabilumui įvertinti (galutinė koncentracija 100 mM).

NaHCO ₃ , pH 8,0	NaFosfatas, pH 6,0	NaFosfatas, pH 7,0	NaFosfatas, pH 8,0	PIPES, pH 6,5	PIPES, pH 7,5
NaCitratas, pH 3,5	NaCitratas, pH 4,5	NaCitratas, pH 5,5	NaCitratas, pH 6,5	NaCitratas, pH 7,5	NaFormiatas, pH 3,0
NaFormiatas, pH 3,5	NaSukcinatas, pH 6,5	NaSukcinatas, pH 7,0	NaAcetatas, pH 4,0	NaAcetatas, pH 4,5	NaAcetatas, pH 5,0
NaAcetatas, pH 5,5	HEPES, pH 6,5	HEPES, pH 7,5	HEPES, pH 8,5	TRIS, pH 7,5	TRIS, pH 8,0
TRIS, pH 8,5	TRIS, pH 9,0	MES, pH 5,0	MES, pH 6,0	Glicinas, pH 9,5	

2.2 lentelė. Reagentai ir jų galutinės koncentracijos, naudotos hCA VI stabilumui įvertinti.

1125,0 mM karbamido	562,5 mM karbamido	281,3 mM karbamido	140,6 mM karbamido	70,3 mM karbamido	35,2 mM karbamido	750,0 mM guanidino hidrochlorido	375,0 mM guanidino hidrochlorido
187,5 mM guanidino hidrochlorido	93,8 mM guanidino hidrochlorido	1000,0 mM gliukozės	500,0 mM gliukozės	250,0 mM gliukozės	125,0 mM gliukozės	62,5 mM gliukozės	31,3 mM gliukozės
250,0 mM imidazolo	125,0 mM imidazolo	62,5 mM imidazolo	31,3 mM imidazolo	50,0 mM BaCl ₂	50,0 mM CaCl ₂	50,0 mM KCl	50,0 mM MgCl ₂
50,0 mM NaCl	100,0 mM NaBr	100,0 mM NaCl	100,0 mM NaF	100,0 mM NaI	100,0 mM Na ₂ SO ₄	500,0 mM NaCl	250,0 mM NaCl
125,0 mM NaCl	62,5 mM NaCl	31,3 mM NaCl	500,0 mM Na ₂ SO ₄	250,0 mM Na ₂ SO ₄	125,0 mM Na ₂ SO ₄	62,5 mM Na ₂ SO ₄	31,3 mM Na ₂ SO ₄
2 % DMSO	5 % DMSO	10 % DMSO	2 % glicerolio	5 % glicerolio	10 % glicerolio	2,0 mM EDTA	20,0 mM EDTA
50,0 mM EDTA	H ₂ O						

Rekombinantinės hCA VI stabilumo priklausomybei nuo pH tirti naudoti du universalūs buferiniai tirpalai:

1. 100 mM natrio acetato, 100 mM natrio fosfato, 50 mM natrio borato ir 100 mM natrio chlorido, pH 4,6–9;
2. 100 mM natrio acetato, 100 mM natrio fosfato, 50 mM natrio borato ir 100 mM natrio sulfato, pH 4,6–9.

Į mėginius išpilstoma po 10 µL pradinio baltymo tirpalo ir po 10 µL atitinkamo pH universalaus buferinio tirpalo. 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 sužaditimui naudojama 365 ± 5 nm šviesa, o fluorescencijos emisija registruojama esant 460 ± 5 nm bangos ilgiui.

Slopiklių jungimosi su rekombinantine hCA VI matavimas terminio poslinkio metodu

Po gryninimo metalų chelatinės chromatografijos metodu matuotas jungimasis su sulfonamidiniais slopikliais. Skiedžiant 100 mM TRIS buferiniu tirpalu, kuriame yra 200 mM Na₂SO₄, pH 8,5, ruošiamas pradinis 20 µM rekombinantinės hCA VI tirpalas, turintis 100 µM ANS. Sąveikai su sulfonamidiniais slopikliais matuoti terpėje, kurios pH 7,5, pradinis 20 µM

rekombinantinės hCA VI tirpalas su 100 μM ANS ruošiamas skiedžiant universaliu buferiniu tirpalu, kuriame yra 100 mM natrio acetato, 100 mM natrio fosfato, 50 mM natrio borato 100 mM natrio sulfato, pH 7,5.

Ligandas ištirpinamas DMSO, gauto tirpalo koncentracija yra 10 mM. Jį skiedžiant vandeniu, ruošiami 200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM ir 0 μM ligandų tirpalai, turintys 4 % DMSO. Į mėginius išpilstoma po 10 μL pradinio 20 μM baltymo tirpalo, turinčio 100 μM ANS, ir po 10 μL atitinkamos koncentracijos ligando tirpalo. Gauti 10 μM baltymo tirpalai, turintys 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM ir 0 μM ligando. 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 sužaditimui naudojama 365 $\pm$ 5 nm šviesa, o fluorescencijos emisija registruojama esant 460 $\pm$ 5 nm bangos ilgiui.

Duomenų apdorojimas

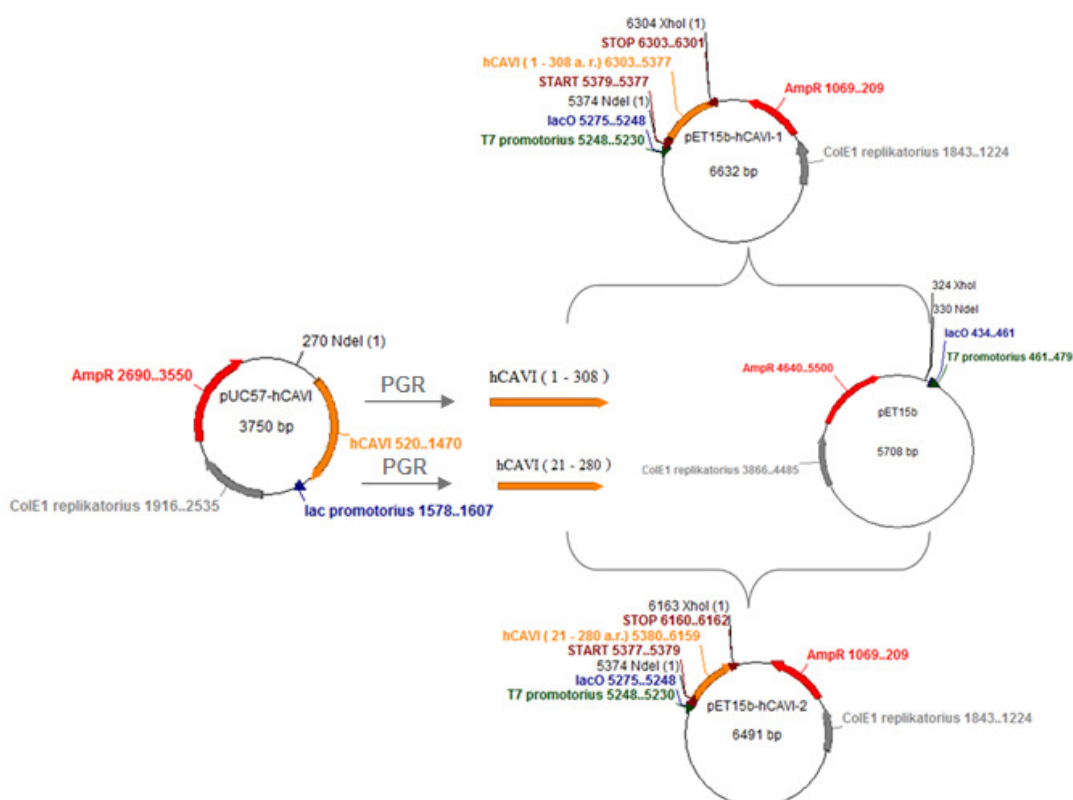
Terminio poslinkio metodu gauti rezultatai apdoroti ThermoFluor++ 1.4.2 ir Microsoft Office Excel programomis.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Rekombinantinio hCA VI geno klonavimas

Sukonstruoti du hCA VI konstruktai: pET15b–hCAVI–1 bei pET15b–hCAVI–2, skirti hCA VI geno raiškai *E. coli* ląstelėse:

- **pET15b–hCAVI–1** konstrukto rekombinantinis hCA VI genas koduoja UniProtKB duomenų bazėje paskelbtą hCA VI (P23280) seką nuo 1 iki 308 (paskutinės) aminorūgštis;
- **pET15b–hCAVI–2** konstrukto rekombinantinis hCA VI genas koduoja UniProtKB duomenų bazėje paskelbtą hCA VI (P23280) seką nuo 21 iki 280 aminorūgštis. Šią fermento geno dalį nuspręsta klonuoti, atsižvelgiant į anksčiau Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje sėkmingai gautos rekombinantinės hCA XII (30–291 aminorūgštis) sekos palyginimą su laukinio tipo hCA VI (wt hCA VI) (palyginimas atliktas MultAlin programa). Wt hCA VI baltymo sekos dalis, panašiausia į rekombinantinės hCA XII (30–291 aminorūgštis) seką buvo panaudota rekombinantinės hCA VI kūrimui.



3.1 pav. hCA VI klonavimo schema. Nuo pUC57–hCAVI plazmidės PGR metodu gauti 929 ir 788 bp hCA VI fragmentai įsiuvami į baltymų raiškos vektorių pET15b. Gauti du konstruktai: pET15b–hCAVI–1 (1–308 aminorūgštis) ir pET15b–hCAVI–2 (21–280 aminorūgštis).

3.2. Rekombinantinio hCA VI geno raiškos ir baltymo tirpumo patikrinimas

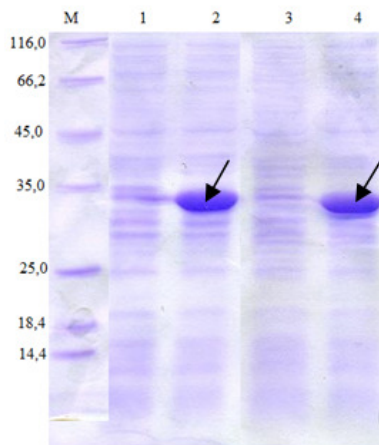
3.2.1. Rekombinantinio hCA VI geno raiškos patikrinimas naudojant pET15b–hCAVI–1 konstrukta

Rekombinantinį hCA VI baltymą buvo tikimasi gauti iš pET15b–hCAVI–1 plazmide transformuoto *E. coli* BL21 (DE3) kamieno. Keičiant ląstelių auginimo sąlygas, buvo siekiama gauti kuo didesnę kiekį tirpaus, stabilaus ir aktyvaus baltymo. Eksperimentų pradžioje ląstelės iki tikslinio baltymo raiškos indukcijos IPTG buvo augintos 37°C temperatūroje. Pasiekus ląstelių tirpalo optinį tankį apie 0,7, į terpę buvo pridėdama 1 mM IPTG bei 0,1 mM ZnSO₄ ir ląstelės toliau augintos 4 val. 30°C. Tačiau reikiamo baltymo sintezė nevyko. Pakeitus auginimo sąlygas ir po indukcijos auginant per naktį (16 val.) 20°C temperatūroje, tikslinio baltymo taip pat negauta.

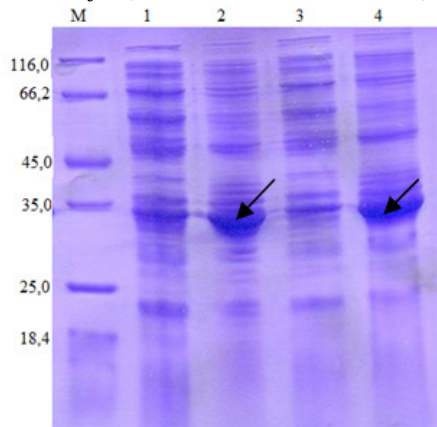
Pakeitus BL21 (DE3) kamieną į Rosetta™ 2 (DE3) ir auginant ląsteles anksčiau aprašytais sąlygomis rekombinantinė hCA VI (1–308 aminorūgštis) irgi negauta.

3.2.2. Rekombinantinio hCA VI geno raiškos patikrinimas naudojant pET15b–hCAVI–2 konstrukta

Nepavykus gauti rekombinantinio hCA VI baltymo raiškos naudojant pET15b–hCAVI–1 konstrukta, buvo sukurtas pET15b–hCAVI–2 konstruktas. Jo raiškai naudotas *E. coli* BL21 (DE3) kamienas. Ląstelės buvo augintos 37°C temperatūroje, kol jų optinis tankis pasiekė apie 0,7. Tuomet į terpę buvo pridėta 1 mM IPTG bei 0,1 mM ZnSO₄ ir ląstelės toliau augintos 4 val. 30°C. Tačiau rekombinantinės hCA VI geno raiškos nebuvo. Tuomet nuspręsta padidinti ZnSO₄ koncentraciją indukcijos metu. Manoma, kad kuo didesnė ZnSO₄ koncentracija terpėje, tuo turėtų vykti efektyvesnė aktyvios hCA VI sintezė, mat Zn²⁺ yra CA kofaktorius. Padidinus ZnSO₄ koncentraciją iki 0,3 ir 0,4 mM hCA VI sintezė įvyko (3.2 pav.), tačiau baltymas buvo netirpus (3.3 pav.).

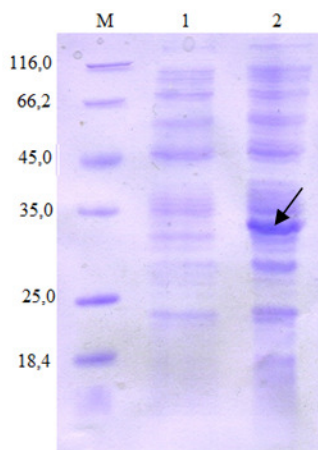


3.2 pav. Baltymų raiškos *E. coli* BL21 (DE3) kamienne patikrinimas poliakrilamido gelyje. Rodyklėmis pažymėta 32 kDa dydžio rekombinantinė hCA VI. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1,2 – ląstelių lizatas prieš ir po hCA VI raiškos indukcijos (1 mM IPTG, 0,3 mM ZnSO₄); 3,4 – ląstelių lizatas prieš ir po hCA VI raiškos indukcijos (1 mM IPTG, 0,4 mM ZnSO₄).

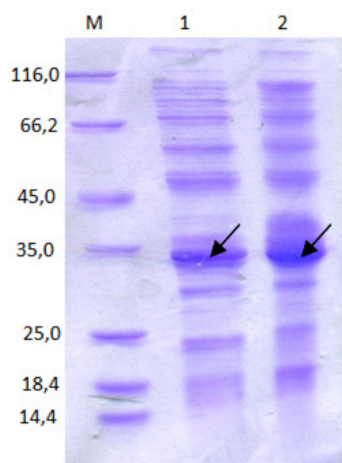


3.3 pav. *E. coli* BL21 (DE3) kamienne gautų baltymų tirpumo patikrinimas poliakrilamido gelyje. Rodyklėmis pažymėta netirpi 32 kDa dydžio rekombinantinė hCA VI. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1, 2 – tirpi ir netirpi baltymų frakcijos (kai baltymo raiškos indukcijai naudota 1 mM IPTG, 0,3 mM ZnSO₄); 3,4 – tirpi ir netirpi baltymų frakcijos (kai baltymo raiškos indukcijai naudota 1 mM IPTG, 0,4 mM ZnSO₄).

Gavus netirpų rekombinantinį hCA VI baltymą BL21 (DE3) kamienne, buvo nuspręsta pET15b–hCAVI–2 plazmide transformuoti RosettaTM 2 (DE3) kamieną. Ląstelės augo lėtai, jų optinis tankis pasiekė apie 0,7 per 7 val. Tada į terpę buvo pridėta 1 mM IPTG bei 0,3 mM ZnSO₄ ir toliau auginta per naktį (16 val.) 20°C temperatūroje. Manyta, kad ilgesnis ląstelių auginimas po indukcijos žemesnėje temperatūroje sudarys palankesnes sąlygas vykti tirpaus baltymo raiškai, nes jo susivyniojimas galės vykti ilgesnį laiką. Taip pavyko gauti tirpią rekombinantinę hCA VI (3.4 pav. ir 3.5 pav.).



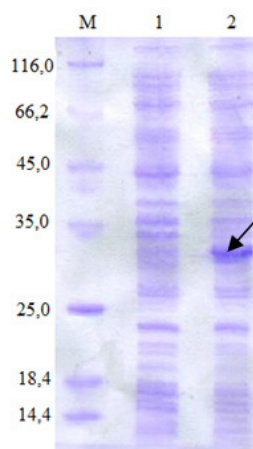
3.4 pav. Baltymų raiška *E. coli* RosettaTM 2 (DE3) kamiene. Rodykle pažymėta 32 kDa dydžio rekombinantinė hCA VI. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – ląstelių lizatas prieš hCA VI raiškos indukciją; 2 – ląstelių lizatas po hCA VI raiškos indukcijos.



3.5 pav. *E. coli* RosettaTM 2 (DE3) kamiene gautų baltymų tirpumo patikrinimas poliakrilamido gelyje. Rodyklėmis pažymėtos tirpi ir netirpi 32 kDa rekombinantinė hCA VI. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – tirpių baltymų frakcija; 2 – netirpių baltymų frakcija.

Iš elektroforezės duomenų galime teigti, kad efektyvesnė baltymo raiška vyksta BL21 (DE3) kamiene nei RosettaTM 2 (DE3). Tačiau tirpus baltymas gaunamas tik RosettaTM 2 (DE3) kamiene, todėl šis kamienas naudojamas tolimesniems tyrimams.

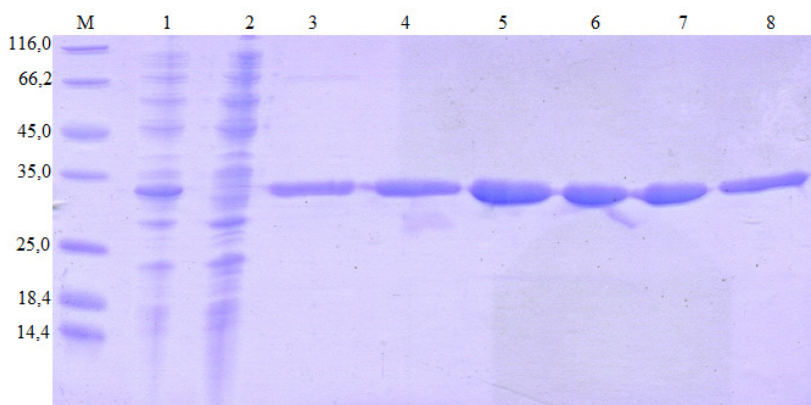
Be to, buvo nuspręsta padidinti ZnSO_4 koncentraciją hCA VI raiškos indukcijos metu iki 0,5 mM ir patikrinti, ar vyks efektyvesnė rekombinantinės hCA VI sintezė, ar tokia koncentracija jau yra nuodinga ląstelėms. Pasirodė, kad tokia ZnSO_4 koncentracija ląstelėms dar nėra pavojinga ir rekombinantinės hCA VI sintezė įvyko (3.6 pav.). Todėl nutarta patikrinti, ar vyks tikslinio baltymo sintezė padidinus ZnSO_4 koncentraciją raiškos indukcijos metu iki 0,7 mM. Tuomet ląstelės augo labai lėtai, hCA VI negauta. Vadinasi, tokia ZnSO_4 koncentracija yra ląstelėms nuodinga.



3.6 pav. Baltymų raiška *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) kamiene. Rodykle pažymėta 32 kDa dydžio rekombinantinė hCA VI. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – ląstelių lizatas prieš hCA VI raiškos indukciją; 2 – ląstelių lizatas po hCA VI raiškos indukcijos.

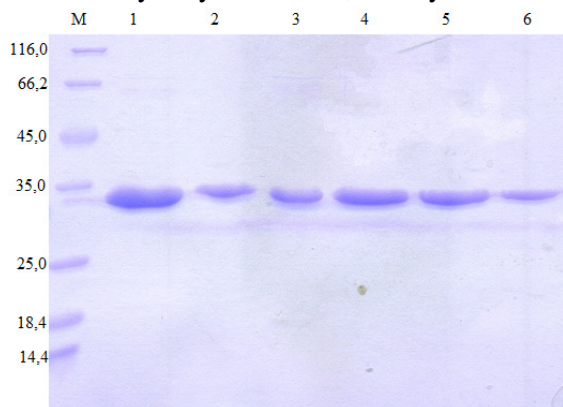
3.3. Rekombinantinės hCA VI gryninimas

Pirmiausia buvo gryninamas baltymas iš biomasės, kurios augimo metu hCA VI raiškos indukcijai naudota 1 mM IPTG ir 0,3 mM ZnSO₄. Kadangi baltymas turi heksahistidino uodegėlę, tai jis grynintas naudojant sefarozę su imobilizuotais Ni²⁺ jonais. Metalų chelatinėje chromatografijoje sąveika tarp baltymų ir sorbento vyksta susidarant koordinaciniams ryšiams tarp sorbento ligando su imobilizuotais Ni²⁺ jonais ir baltymo heksahistidino uodegėlės. Baltymas desorbuojamas didinant imidazolo koncentraciją nuo 50 mM iki 700 mM (3.7 pav.).



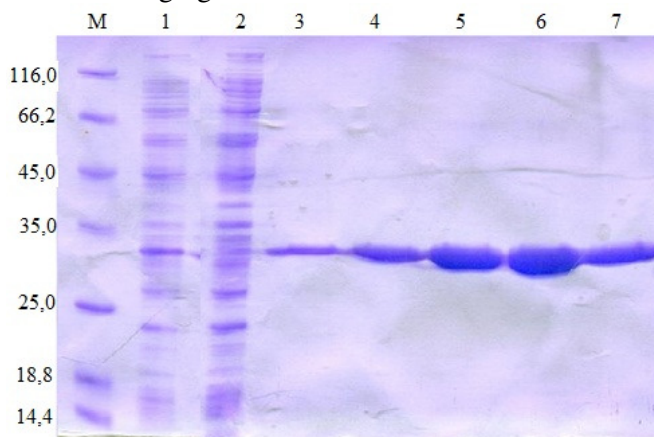
3.7 pav. hCA VI elektroforezė poliakrilamido gelyje po gryninimo metalų chelatinės chromatografijos metodu. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – tirpi baltymų frakcija prieš gryninimą; 2 – gryninimo metu ant sorbento nesisorbavusių baltymų frakcija; 3–8 – frakcijos su rekombinantine hCA VI, kuri desorbuota didinant imidazolo koncentraciją nuo 50 mM iki 700 mM.

Norint pašalinti neteisingai susivyniojusias CA, baltymo tirpalas leistas per kolonėlę, užpildytą afininiu sorbentu. Gauta 14 mg teisingai susivyniojusios hCA VI, sąveikaujančios su sulfonamidiniais CA slopikliais (3.8 pav.). Be to, VU ChF prof. S. Tautkaus atlikta šio baltymo cinko analizė parodė, kad baltymo koncentracija lygi cinko koncentracijai. Vadinasi, 100 % baltymo yra su cinku, kuris yra būtinas CA ir sulfonamidinio slopiklio jungimuisi.



3.8 pav. hCA VI elektroforezė poliakrilamido gelyje po gryninimo afininės chromatografijos metodu. Naudotas sorbentas su kovalentiškai prijungtais sulfonamidiniais slopikliais. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – tirpių baltymų frakcija po gryninimo metalų chelatinės chromatografijos metodu; 2–6 – frakcijos su rekombinantine hCA VI, kuri desorbuota su 400 mM NaN_3 .

Kadangi mūsų gauto tirpaus baltymo išeiga buvo nedidelė, nutarta dar padidinti ZnSO_4 koncentraciją indukcijos metu. Manyta, kad taip bus gaunama daugiau aktyvaus baltymo. Todėl dar atliktas gryninimas iš biomasės, kai tikslinio baltymo raiškos indukcijai naudota 1 mM IPTG ir 0,5 mM ZnSO_4 . Po gryninimo metalų chelatinės chromatografijos metodu gauta tirpi rekombinantinė hCA VI (3.9 pav.). Tačiau baltymas iškrito į nuosėdas. Manoma, kad baltymo sintezė vyko greičiau ir jis nespėjo susivynioti į natyvią konformaciją, todėl suformavo agregatus.

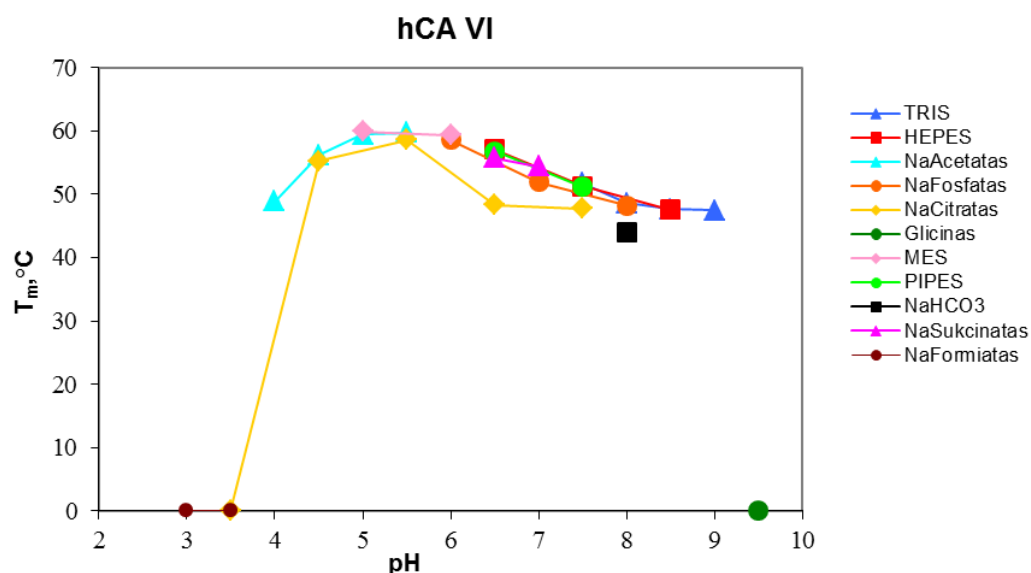


3.9 pav. hCA VI elektroforezė poliakrilamido gelyje po gryninimo metalų chelatinės chromatografijos metodu. Takeliuose: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – tirpių baltymų frakcija prieš gryninimą; 2 – gryninimo metu ant sorbento nesisorbavusių baltymų frakcija; 3–7 – frakcijos su rekombinantine hCA VI, kuri desorbuota didinant imidazolo koncentraciją nuo 50 mM iki 700 mM.

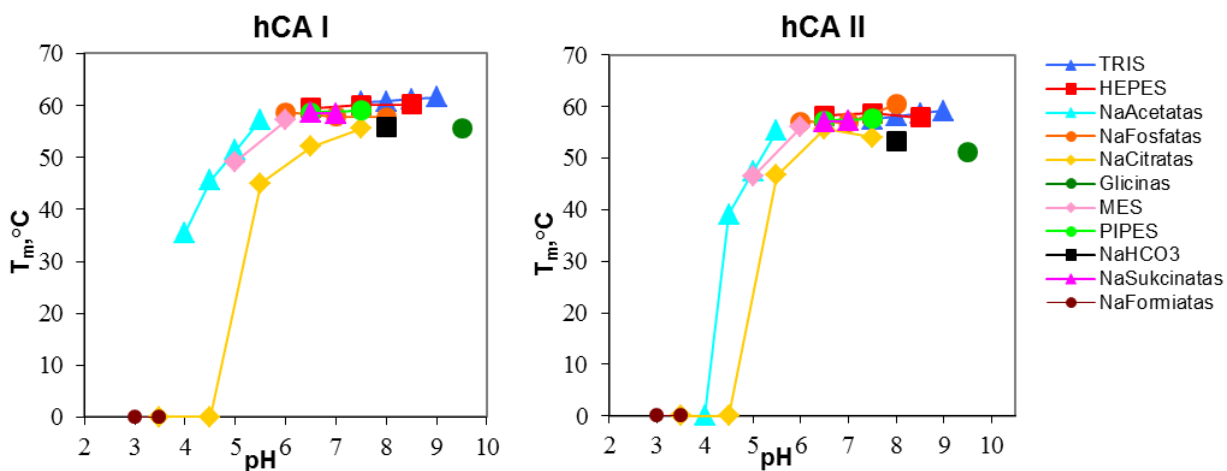
3.4. Rekombinantinės hCA VI stabilumo įvertinimas

Terminio poslinkio metodu įvertinta įvairių reagentų, buferinių tirpalų ir jų pH įtaka rekombinantinės hCA VI stabilumui. Kuo didesnė baltymo lydymosi temperatūra (T_m), tuo stabilesnis baltymas tiriamose sąlygose.

Sėkmingai išgryninus baltymą svarbu parinkti buferinį tirpalą ir kitus jo komponentus, kuriame baltymas liktų stabilus kuo ilgesnį laiką. Norint sužinoti, kokiame buferiniame tirpale rekombinantinė hCA VI stabiliausia, nustatyta baltymo T_m skirtingoms sąlygoms (3.10 pav.). Palyginta su hCA I ir hCA II T_m tose pačiose sąlygose (3.11 pav.).



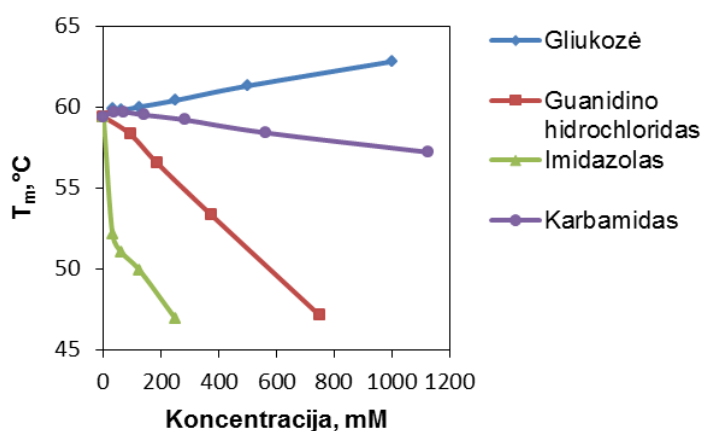
3.10 pav. Rekombinantinės hCA VI lydymosi temperatūros priklausomybė nuo pH. Matavimų paklaida 0,3°C.



3.11 pav. Rekombinantinių hCA I ir hCA II lydymosi temperatūrų priklausomybė nuo pH. Išmatuota Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje L. Baranauskienės. Matavimų paklaida 0,3°C.

Pagal 3.10 paveikslą pateiktus duomenis, rekombinantinė hCA VI stabiliausia buferiniuose tirpaluose, kurių pH 5–6. Tai parodo aukšta baltymo lydymosi temperatūra natrio acetato buferiniame tirpale, kurio pH 5 ($T_m = 59,4^\circ\text{C}$) arba pH 5,5 ($T_m = 59,7^\circ\text{C}$), bei MES buferiniame tirpale, kurio pH 5 ($T_m = 59,9^\circ\text{C}$) arba pH 6 ($T_m = 59,4^\circ\text{C}$). Pasirinkta po gryninimo rekombinantinę hCA VI laikyti MES buferiniame tirpale, kurio pH 5,9. hCA I, kuri organizme gausiausiai randama, stabiliausia TRIS buferiniuose tirpaluose, kurių pH 7,5–9. Didžiausią katalitinį aktyvumą turinti hCA II stabiliausia natrio fosfato buferiniame tirpale, kurio pH 8. hCA I, kaip ir hCA II, rūgštinėje terpėje destabilizuojama. Pavyzdžiui, hCA I lydymosi temperatūra $10,7^\circ\text{C}$ mažesnė už hCA VI lydymosi temperatūrą MES buferiniame tirpale, kurio pH 5, o hCA II lydymosi temperatūra 12°C mažesnė už hCA VI lydymosi temperatūrą natrio acetato buferiniame tirpale, kurio pH 5. hCA I ir hCA VI denatūruoja buferiniuose tirpaluose, kurių pH 3,5, o hCA II – pH 4. Natrio citratas šiek tiek destabilizuoja tirtas CA izoformas, nes baltymų lydymosi temperatūra citratiniuose buferiniuose tirpaluose žemesnė nei to paties pH kituose buferiniuose tirpaluose. Šarminėje terpėje, pavyzdžiui, TRIS buferiniuose tirpaluose pH didėjant nuo 7,5 iki 9, hCA I ir hCA II lydymosi temperatūra didėja, o hCA VI – mažėja. Glicino buferiniame tirpale, kurio pH 9,5, hCA I ir hCA II išlieka stabilios, o hCA VI – denatūruoja. Manoma, kad didesnis hCA VI stabilumas rūgštinėje terpėje leidžia baltymui išlikti aktyviam seilėse, kurių pH ~ 7 , ir rūgštinėje skrandžio aplinkoje, kur baltymas patenka nurytas su seilėmis.

Įvertinta osmolitų įtaka rekombinantinės hCA VI stabilumui (3.12 pav.).

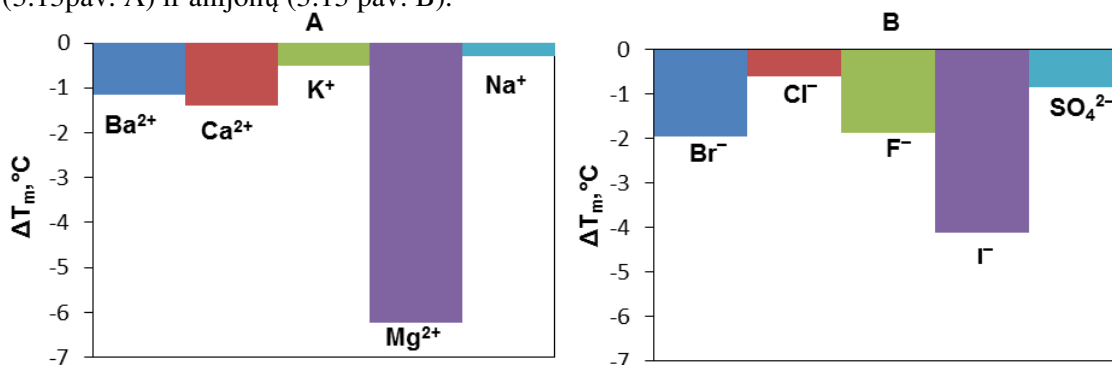


3.12 pav. Rekombinantinės hCA VI lydymosi temperatūros priklausomybė nuo osmolitų koncentracijos. Matavimų paklaida $0,3^\circ\text{C}$.

Baltymą stabilizuojantys osmolitai padeda baltymui išlaikyti natyvią konformaciją, o destabilizuojantys osmolitai denatūruoja baltymą. Gliukozė yra vienintelis rekombinantinę hCA VI stabilizuojantis osmolitas, karbamidas – silpnai destabilizuojantis, guanidino

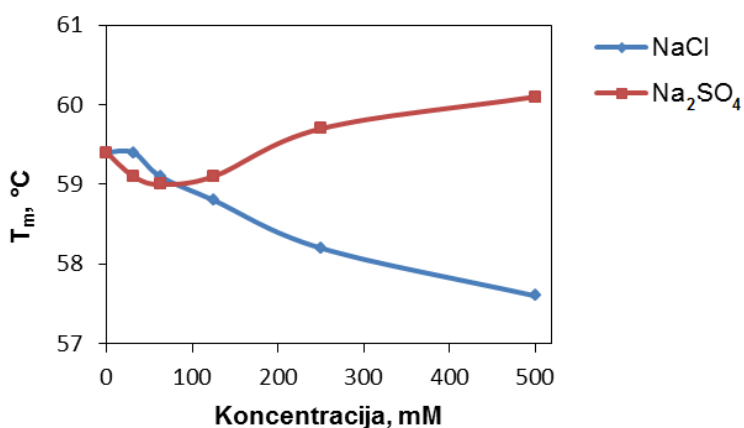
hidrochloridas ir imidazolas – stipriai destabilizuojantys baltymą. Gryninant metalų chelatinės chromatografijos metodu, rekombinantinė hCA VI desorbuota didinant imidazolo koncentraciją iki 700 mM, o pagal 22 paveiksle pateiktus duomenis baltymas stipriai destabilizuojamas esant 250 mM imidazolo koncentracijai. Manoma, kad dializės metu vyksta po metalų chelatinės chromatografijos gautos rekombinantinės hCA VI renatūracija ir atkurama natyvi baltymo struktūra.

Nustatyta, kaip rekombinantinės hCA VI stabilumas priklauso nuo įvairių katijonų (3.13 pav. A) ir anijonų (3.13 pav. B).



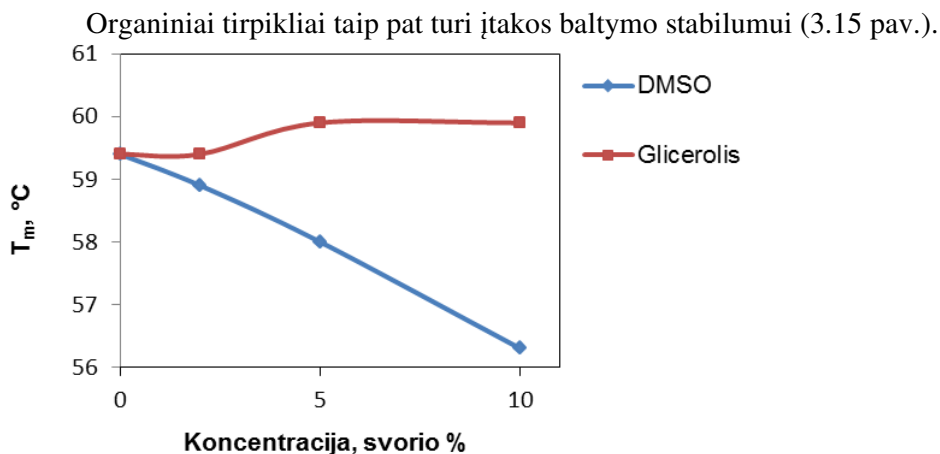
3.13 pav. Rekombinantinės hCA VI lydymosi temperatūrų skirtumas lyginant su druskų neturinčiu baltymo tirpalu. A – įvairių katijonų sudaromų chlorido druskų koncentracija 50 mM; B – įvairių anijonų natrio druskų koncentracija 100 mM. Matavimų paklaida 0,3°C.

Visi tirti katijonai ir anijonai silpnai destabilizuoja baltymą, išskyrus: Mg²⁺ ($\Delta T_m = -6,2^\circ\text{C}$) ir I⁻ ($\Delta T_m = -4,1^\circ\text{C}$). Na⁺, K⁺, Cl⁻ ir SO₄²⁻ lydymosi temperatūrą sumažina mažiau nei per 1°C, o Ba²⁺, Ca²⁺, Br⁻ ir F⁻ – mažiau nei per 2°C. Šie rezultatai rodo, kad rekombinantinės hCA VI gryninimo buferiuose geriausia druska joninei jėgai palaikyti, reikalingai baltymų sąveikų pašalinimui, yra NaCl arba Na₂SO₄. 3.14 paveiksle pavaizduota šių druskų įtaka baltymo stabilumui.



3.14 pav. Rekombinantinės hCA VI lydymosi temperatūros priklausomybė nuo NaCl ir Na₂SO₄ koncentracijos. Matavimų paklaida 0,3°C.

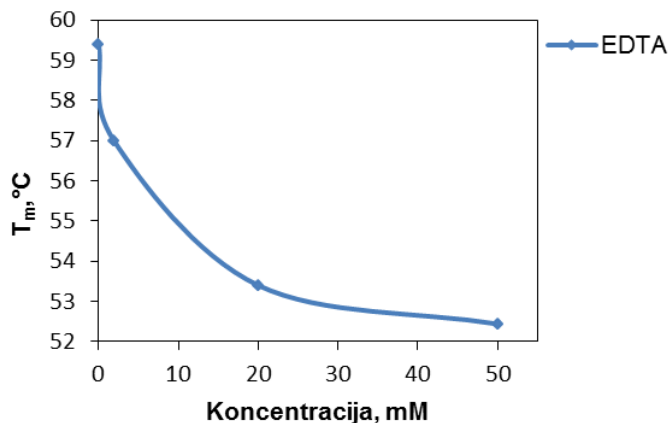
Esant apie 90 mM koncentracijai, NaCl ir Na₂SO₄ vienodai mažina lydymosi temperatūrą. Kai koncentracija mažesnė nei 90 mM, Na₂SO₄ stipriau destabilizuoja baltymą nei NaCl. Druskų įtaka baltymo stabilumui priešinga esant didesnei nei 90 mM koncentracijai: NaCl – destabilizuoja, Na₂SO₄ – stabilizuoja baltymą. Pagal šiuos duomenis, rekombinantinės hCA VI gryninimui geriausia naudoti buferinius tirpalus su Na₂SO₄.



3.15 pav. Rekombinantinės hCA VI lydymosi temperatūros priklausomybė nuo organinių tirpiklių svorio dalies mėginyje. Matavimų paklaida 0,3°C.

Tiriant baltymo sąveiką su slopikliais svarbu žinoti, kaip baltymo lydymosi temperatūrą keičia DMSO, nes slopikliai tirpinami šiame organiniame tirpiklyje. DMSO smarkiai destabilizuoja rekombinantinę hCA VI, todėl mėginyje, kuriame tiriama rekombinantinės hCA VI ir slopiklio sąveika, DMSO koncentracija neturėtų viršyti 2 %. Glicerolio įtaka baltymo stabilumui nedidelė, jis silpnai stabilizuoja rekombinantinę hCA VI.

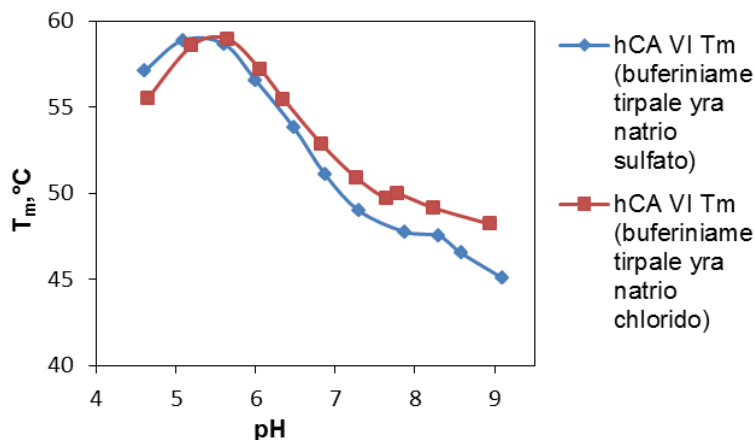
Dažnai EDTA yra sudedamoji dializės buferinių tirpalų dalis. Ji reikalinga metalų jonų surišimui (pavydžiui, Ni²⁺ surišimui po gryninimo metalų chelatinės chromatografijos metodu). Nustatyta EDTA įtaka rekombinantinės hCA VI stabilumui (3.16 pav.).



3.16 pav. Rekombinantinės hCA VI lydymosi temperatūros priklausomybė nuo EDTA koncentracijos. Matavimų paklaida 0,3°C.

Baltymo lydymosi temperatūra sumažėja 2,4°C, kai EDTA koncentracija tirpale yra vos 2 mM. EDTA stipriai destabilizuoja rekombinantinę hCA VI, todėl nereiktų dėti EDTA į šio baltymo dializės buferinius tirpalus.

Ištirta baltymo lydymosi temperatūros priklausomybė nuo pH dviejuose universaliuose buferiniuose tirpaluose, kurie skyrėsi druska, palaikančia joninę jėgą: viename – NaCl, kitame – Na₂SO₄ (3.17 pav.). Tokie tirpalai Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje dažnai naudojami jungimosi su slopikliais priklausomybei nuo pH tirti.



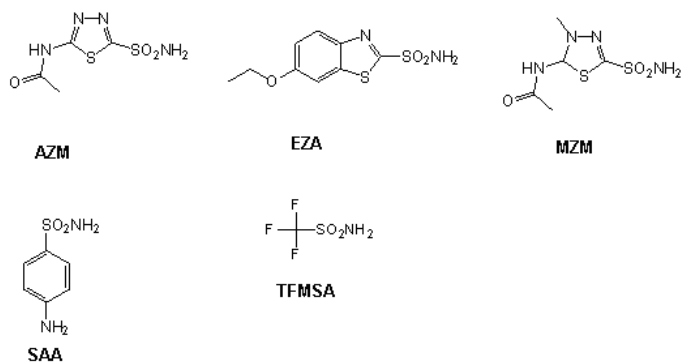
3.17 pav. Rekombinantinės hCA VI lydymosi temperatūros priklausomybė nuo pH. Matavimų paklaida 0,3°C.

Kai universalus buferinio tirpalo pH mažesnis nei 5,5, tai baltymas stabilesnis buferiniame tirpale su Na₂SO₄. Esant pH didesniai nei 5,5, baltymo lydymosi temperatūra aukštesnė buferiniame tirpale su NaCl. Duomenys panašūs į 3.10 paveiksle pateiktus rezultatus: rekombinantinė hCA VI stabiliausia buferiniame tirpale, kurio pH 5–6.

3.5. Rekombinantinės hCA VI jungimasis su sulfonamidiniais slopikliais

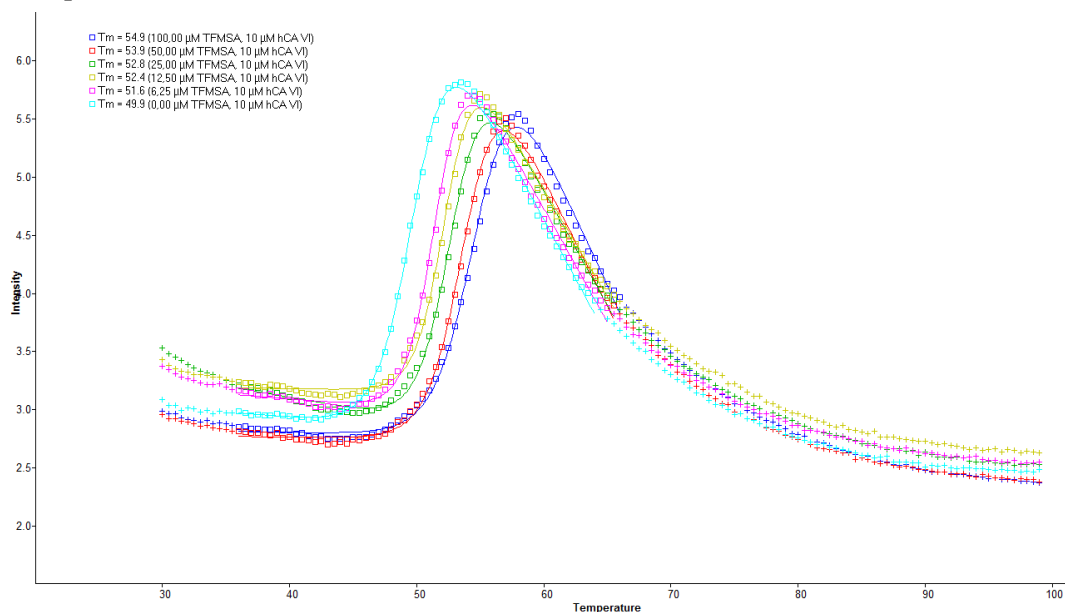
Daugelyje fiziologinių procesų dalyvaujančios CA gali sukelti įvairias ligas, kai sutrinka jų genų raiška. Siekiama sukurti tam tikrus vaistus sulfonamidų pagrindu, kurie selektyviai slopintų už susirgimą atsakingas CA izoformas, tačiau neturėtų įtakos reikalingų organizmui CA veiklai. AZM, EZA, MZM yra klasikiniai sulfonamidai naudojami klinikoje įvairių ligų, daugiausia glaukomos, gydymui.

Šiame darbe išmatuotas hCA VI jungimasis su penkiais slopikliais: AZM, EZM, MZM, SAA ir TFMSA. Jų struktūrinės formulės pateiktos 3.18 paveiksle.



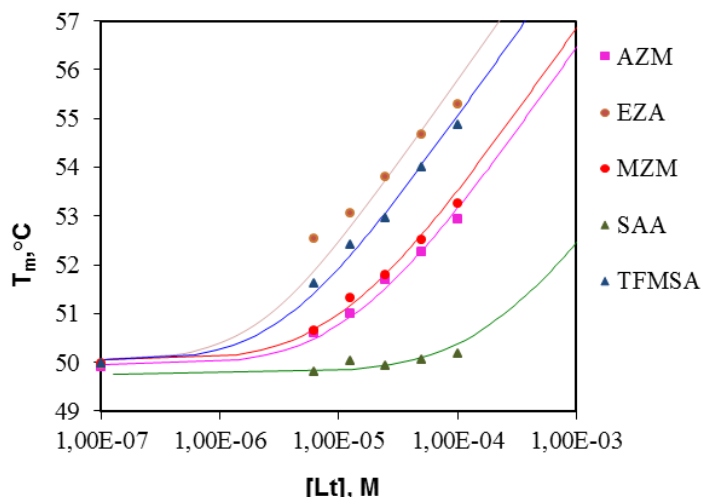
3.18 pav. Tirtų sulfonamidų struktūrinės formulės.

Terminio poslinkio metodu gaunamos ANS fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo temperatūros kreivės (3.19 pav.). Matavimai atlikti 200 mM Na₂SO₄, 100 mM TRIS, pH 8,5 buferiniame tirpale. Kai temperatūra žema, baltymas yra natyvios konformacijos. Tuomet ANS fluorescenciją gesina vanduo. Kylant temperatūrai, baltymas išsivynioja. Dažas prisijungia prie atsiveriančių baltymo hidrofobinių sričių ir jo fluorescencija intensyvėja. Pasiekus tam tikrą temperatūrą, baltymas denatūruoja. Toliau didėjant temperatūrai, dažo fluorescencija mažėja. Iš terminio poslinkio metodu gautų grafikų nustatoma baltymo lydymosi temperatūra (T_m) mėginiuose esant skirtingoms slopiklio koncentracijoms. Esant T_m , denatūravusio ir nedenatūravusio baltymų koncentracijos yra lygios. Slopiklis dažniausiai stabilizuoja baltymą: didėjant slopiklio koncentracijai, T_m slenkasi į didesnių verčių pusę (3.19 pav.).



3.19 pav. Fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo temperatūros esant skirtingoms TFMSA koncentracijoms.

3.20 paveiksle pateikta baltymo lydymosi temperatūros priklausomybė nuo keletu slopiklių koncentracijos. Taškai žymi eksperimentines T_m reikšmes, o linija – modelį, apskaičiuotą remiantis 10 lygtimi.



3.20 pav. Rekombinantinės hCA VI lydymosi temperatūros priklausomybė nuo AZM, EZA, MZM, SAA ir TFMSA koncentracijos. Matavimų paklaida 0,3°C.

Nustatytos jungimosi konstantos (K_b) pateiktos 3.1 lentelėje. Rekombinantinė hCA VI stipriausiai jungiasi su EZA ($\Delta G_b = -35,6$ kJ/mol), kiek silpniau – su TFMSA ($\Delta G_b = -34,3$ kJ/mol), o silpniausiai – su SAA ($\Delta G_b > -24$ kJ/mol). AZM ir MZM jungimasis su baltymu labai panašus ($\Delta G_b \sim -31,0$ kJ/mol). Jungimosi su SAA konstantos tiksliai nustatyti nepavyko, nes naudota didžiausia junginio koncentracija siekė 100 μ M (norint nustatyti labai mažas K_b , reikia naudoti iki 1 mM junginio koncentracijas).

3.1 lentelė. Rekombinantinės hCA VI jungimosi su AZM, EZA, MZM, SAA ir TFMSA gauti parametrai: išsivyniojimo entalpija (ΔUH), jungimosi pusiausvyros konstanta (K_b), disociacijos pusiausvyros konstanta (K_d) ir laisvoji Gibso energija (ΔG_b).

Slopiklis	$\Delta UH, \text{kJ/mol}$	K_b, M^{-1}	$K_b, \mu M$	$\Delta G_b, \text{kJ/mol}$
AZM	530	$1,6 \cdot 10^5$	6,3	-30,9
EZA	530	$1,0 \cdot 10^6$	1,0	-35,6
MZM	530	$2,0 \cdot 10^5$	5,0	-31,5
SAA	530	$<10^4$	>100	>24
TFMSA	530	$6,0 \cdot 10^5$	1,7	-34,3

Sergant glaukoma, hCA II ir hCA XII gamina per daug bikarbonato jonų. Vėžinėse ląstelėse padidėjusi hCA XII geno raiška. EZA pagrindu sukurti vaistai naudojami glaukomai gydyti. TFMSA yra nedidelė molekulė, galinti lengvai įlisti į visų CA aktyvų centrą, todėl TFMSA – stiprus visų CA slopiklis. Nuspręsta palyginti šių slopiklių jungimąsi su hCA II,

hCA XII, atsakingas už patologijų sukėlimą, ir hCA VI, reikalinga organizmui. K_d gautos universaliame buferiniame tirpale, kurio pH 7,5. Jungimosi su EZA K_d reikšmės, gautos terminio poslinkio metodu, palygintos su slopinimo konstantomis (K_i), nustatytomis sustabdytos srovės (*angl.* Stopped Flow) metodu (Supuran, 2008). Jos išmatuotos panašiomis sąlygomis (pH 7,5).

3.2 lentelė. Rekombinantinių hCA II, hCA VI ir hCA XII jungimosi su EZA ir TFMSA terminio poslinkio metodu gautų K_d palyginimas su K_i , nustatytomis Supuran laboratorijoje (Supuran, 2008). EZA ir TFMSA jungimasis su hCA II ir hCA XII išmatuotas Biotermodynamikos ir vaistų tyrimo skyriuje A. Zubrienės, V. Morkūnaitės.

	EZA	EZA	TFMSA
CA izoforma	K_i nM	K_d nM	K_d nM
hCA II	8	4	154
hCA VI	43	455	667
hCA XII	22	67	278

Pagal 3.2 lentelėje pateiktus duomenis hCA II ir hCA XII jungimosi su EZA K_d ir K_i reikšmės yra panašios nepaisant to, kad jų nustatymui naudoti skirtingi metodai. Tik hCA VI sąveikos su EZA K_d yra virš 10 kartų didesnė nei K_i . Tokie nesutapimai gali būti dėl skirtingų baltymo sintezės ir gryninimo būdų, matavimo netikslumų.

Remiantis gautais rezultatais (3.2 lentelė) galima teigti, jog TFMSA jungiasi prie visų tirtų hCA izoformų panašiai (K_d yra 100 – 700 nM ribose). Tuo tarpu, EZA jungiasi su hCA II apie 10 kartų stipriau nei su hCA XII ir apie 100 kartų stipriau nei su hCA VI. Toks K_d skirtumas nėra didelis, todėl nei EZA, nei TFMSA nėra selektyvūs slopikliai kuriai nors iš minėtų hCA izoformų. Reikia nepamiršti, kad baltymų sintezė vykdyta *E. coli* bakterijose, dėl to jie neglikozilinti. Tai gali lemti skirtingą baltymų susivyniojimą bakterijose ir žmogaus organizme, todėl galimi ir jų jungimosi su slopikliais skirtumai. Dėl šios priežasties griežtų išvadų, jog TFMSA ir EZA negali būti naudojami hCA aktyvumo pokyčių sukeltų ligų gydymui, nes bus slopinamos ir organizmui reikalingos CA, negalima daryti. Kitas būdas kaip gauti hCA VI tokią, kokia ji yra žmogaus organizme, yra išgryninti ją iš seilių. Taip pat laboratorijoje planuojama sintetinti hCA žinduolių ląstelėse. Tuomet bus išsiaiškinta, ar fermentai, sintetinami *E. coli* bakterijose, ir fermentai žmogaus organizme vienodai jungiasi su slopikliais bei kuris iš jų yra efektyvesnis hCA sukeltų ligų gydymui.

IŠVADOS

1. Baltymų raiškos konstruktui, kuriame yra hCA VI genas, koduojantis rekombinantinę hCA VI nuo 21 iki 280 aminorūgšties, transformavus *E. coli* RosettaTM 2 (DE3) kamieną, gauta tirpi rekombinantinė hCA VI.
2. Didžiausia išgrynintos rekombinantinės hCA VI išeiga gaunama jos raiškos *E. coli* ląstelėse indukcijos metu į auginimo terpę pridėjus 0,3 mM ZnSO₄.
3. Rekombinantinė hCA VI stabiliausia buferiniuose tirpaluose, kurių pH 5–6. Nuspręsta šį baltymą laikyti 25 mM MES buferiniame tirpale (pH 5,9).
4. Terminio poslinkio metodu įvertintas rekombinantinės hCA VI jungimasis su sulfonamidiniais slopikliais: AZM ($K_b = 1,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), EZA ($K_b = 1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$), MZM ($K_b = 2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) ir TFMSA ($K_b = 6,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$). Šie duomenys rodo, kad etokzolamidas yra stipriausias iš patikrintų rekombinantinės hCA VI slopiklių.

Production of Recombinant Human Carbonic Anhydrase VI, Characterization of its Stability and the Measurements of Inhibitor Binding

SUMMARY

Carbonic anhydrases are ubiquitous metallo-enzymes which catalyze the reversible hydration of carbon dioxide. Human carbonic anhydrases are widely distributed in many tissues and play a crucial role in physiological and pathological processes such as tumorigenicity and glaucoma. The design of isozyme-selective inhibitors is the current challenge in the development of new therapeutic agents.

Human carbonic anhydrase VI (hCA VI) is the only secreted isozyme of 15 human carbonic anhydrases. The aim of this work was to produce and purify recombinant hCA VI, determine its stability at different conditions and evaluate binding thermodynamics for the range of potential inhibitors. It was found that the best yield of soluble hCA VI (includes amino acids from 21 to 280) can be obtained when the protein is expressed in RosettaTM 2 (DE3) strain while growing cells for 16 hours at 20°C in LB medium with 0,3 mM ZnSO₄ and 1 mM IPTG. The procedure yielded 14 mg of recombinant hCA VI after purification. Thermal stability of the protein and thermodynamics of interaction between this enzyme and potential inhibitors were evaluated by thermal shift assay. Recombinant hCA VI was the most stable in buffers at pH 5 to 6 and ethoxzolamide was identified as the strongest hCA VI inhibitor of the several tested compounds.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities for Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
2. Christianson DW, Fierke CA. Carbonic anhydrase: evolution of the zinc binding site by nature and design. *Accts. Chem. Res.* 1996;29:331–9.
3. Daniel E, Weber G. Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I. The binding of 1-anilino-8-naphtalenesulfonate. Fluorimetric titration. *Biochemistry.* 1966;12(3):512–7.
4. Diwu Z, Lu Y, Zlang C, Klaubert DH, Huagland RP. Fluorescent Molecular Probes and Use of Fluorescent Solvatochromic Dapoxyl Dyes. *Photochem Photobiol Sci.* 1997;66:424–31.
5. Durdagi S, Senturk M, Ekinci D, Balaydin HT, Goksu S, Kufrevioglu OI, 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;19:1381–9.
6. Esbaugh AJ, Tufts BL. The structure and function of carbonic anhydrase isoenzymes in the respiratory system of vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol.* 2006;154:185–98.
7. Feldstein JB, Silverman DN. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *J Biol Chem.* 1984;259:5447–53.
8. Fernley RT, Wright RD, Coghlan JP. A novel carbonic anhydrase from the ovine parotid gland. *FEBS Lett.* 1979;105:299–302.
9. Ferry JG. The gamma class of carbonic anhydrases. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804(2):374–81.
10. Hooper LV, Beranek MC, Manzella SM, Baenziger JU. Differential Expression of GalNAc-4-sulfotransferase and GalNAc-transferase Results in Distinct Glycoforms of Carbonic Anhydrase VI in Parotid and Submaxillary Glands. *J Biol Chem.* 1995;270:5985–93.
11. Kane CD, Bernlohr DA. A simple assay for intracellular lipid-binding proteins using displacement of 1-anilinonaphtalene 8-sulfonic acid. *Anal Biochem.* 1996;233(2):197–204.

12. 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 USA*. 2001;98:11604–8.
13. 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;33:178–84.
14. Klengel T, Liang WJ, Chaloupka J, Ruoff C, Schröppel K, Naglik JR, Eckert SE, Mogensen EG, Haynes K, Tuite MF, Levin LR, Buck J, Mühlischlegel FA. Fungal adenyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol*. 2005;15:2021–6.
15. Krishnamurthy VM, Kaufman GK, Urbach AR, Gitlin I, Gudixsen KL, Weibel DB, Whitesides GM. Carbonic Anhydrase as a Model for Biophysical and Physical-Organic Studies of Proteins and Protein-Ligand Binding. *Chem Rev*. 2008;108:946–1051.
16. Kundu B, Guptasarma P. Hydrophobic dye inhibits aggregation of molten carbonic anhydrase during thermal unfolding and refolding. *Proteins*. 1999;37(3):321–4.
17. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–5.
18. Leinonen J. Carbonic anhydrase isoenzyme VI: distribution, catalytic properties and biological significance [The doctoral thesis]. Finland, Oulu: University of Oulu; 2008.
19. Lopez M, Bornaghi LF, Innocenti A, Vullo D, Charman SA, Supuran CT, Poulsen SA. Sulfonamide Linked Neoglycoconjugates – A New Class of Inhibitors for Cancer-Associated Carbonic Anhydrases. *J Med Chem*. 2010;53:2913–26.
20. Lu SH, Takeuchi T, Fujita J, Ishida T, Akisawa Y, Nishimori I, Kohsaki T, Onishi S, Sonobe H, Ohtsuki Y. Effect of carbonic anhydrase-related protein VIII expression on lung adenocarcinoma cell growth. *Lung Cancer*. 2004;44(3):273–80.
21. Ludwig M. The molecular evolution of β -carbonic anhydrase in *Flaveria*. *J. Exp. Bot*. 2011;62:3071–81.
22. Martin V, Villarreal F, Miras I, Navaza A, Haouz A, Gonzalez-Lebrero RM, Kaufman SB, Zabaleta E. Recombinant plant gamma carbonic anhydrase homotrimers bind inorganic carbon. *FEBS Lett*. 2009;583:3425–30.
23. Matulis D, Kranz JK, Salemme FR, Todd MJ. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. *Biochemistry*. 2005;44:5258–66.

24. Matulis D, Lovrien R. 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate Anion-Protein Binding Depends Primarily on Ion Pair Formation. *Biophys J*. 1998;74:422–9.
25. Matulis D. Baltymų fizikinė chemija. Kaunas: Technologija; 2008.
26. Meldrum NU, Roughton FJW. Carbonic anhydrase: Its preparation and properties. *J. Physiol*. 1933;80:113–42.
27. Mincione F, Scozzafava A, Supuran CT. Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors as ophthalmologic drugs. In: Supuran CT; Winum JY, editors. *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications*. Wiley: Hoboken; 2009. p. 139–54.
28. Mitsuhashi S, Ohnishi J, Hayashi M, Ikeda M. A gene homologous to β -type carbonic anhydrase is essential for the growth of *Corynebacterium glutamicum* under atmospheric conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;63:592–601.
29. Morimoto K, Nishimori I, Takeuchi T, Kohsaki T, Okamoto N, Taguchi T, Yunoki S, Watanabe R, Ohtsuki Y, Onishi S. Overexpression of carbonic anhydrase-related protein XI promotes proliferation and invasion of gastrointestinal stromal tumors. *Virchows Arch*. 2005;447(1):66–73.
30. Murakami H, Sly WS. Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. *J Bio Chem*. 1987;262:1382–8.
31. Neri D. New CAIX Ligands from DNA-Encoded Chemical Libraries: Isolation and Pharmaceutical Applications. The 9th International Carbonic Anhydrase conference; 2012 Apr 11–15; Antalya, Turkey.
32. Nishimori I, Minakuchi T, Kohsaki T, Onishi S, Takeuchi H, Vullo D, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: the beta-carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori* is a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17:3585–94.
33. Nishimori I, Minakuchi T, Onishi S, Vullo D, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. DNA cloning, characterization, and inhibition studies of the human secretory isoform VI, a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *J Med Chem*. 2007;50:381–8.
34. Parkkila S, Parkkila AK, Lehtola J, Reinila A, Sodervik HJ, Rannisto M, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase protects gastroesophageal mucosa from acid injury. *Dig Dis Sci*. 1997;42:1013–9.
35. Pastorekova S, Parkkila S, Zavada J. Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. *Adv Clin Chem*. 2006;42:167–216.

36. Pilka E, Kochan G, Oppermann U, Wyatt W Y. Crystal structure of the secretory isoenzyme of mammalian carbonic anhydrase CA VI: Implications for biological assembly and inhibitor development. *Biochem Biophys Res Commun*. Priimtas spaudai 2012.
37. Simone GD, Fiore AD, Supuran CT. Are Carbonic Anhydrase Inhibitors Suitable for Obtaining Antiobesity Drugs? *Curr Pharm Des*. 2008;14(7):655–60.
38. 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;19:495–504.
39. Stryer L. The interaction of a naphtalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J Mol Biol*. 1965;13(2):482–95.
40. Supuran CT, Scozzafava A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg Med Chem*. 2007;15:4336–50.
41. Supuran CT. Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics? *FPHAR*. 2011;2(34):1–6.
42. Supuran CT. Carbonic Anhydrases – An Overview. *Curr Pharm Des*. 2008;14:603–14.
43. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:168–81.
44. Thatcher BJ, Doherty AE, Orvisky E, Martin BM, Henkin RI. Gustin from human parotid saliva is carbonic anhydrase VI. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;250:635–41.
45. Turkmen 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):1–8.
46. UniProtKB [duomenų bazė internete]. Cambridge (United Kingdom): European Bioinformatics Institute. Sukurta 2002 [cituota 2012 02 20]. Adresas: <http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>
47. Xu Y, Feng L, Jeffrey PD, Shi Y, Morel FMM. Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*. 2008;452:56–61.
48. Zimmerman S, Innocenti A, Casini A, Ferry JG, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the prokaryotic beta and gamma-class enzymes from Archaea with sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14:6001–6.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju dr. Daumantui Matuliui už galimybę atlikti bakalauro darbą VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje. Taip pat dėkoju dr. Vaidai Jogaitei už suteiktas žinias genų klonavimo ir baltymų sintezės srityje, j. m. d. Vilmai Michailovienei už pagalbą atliekant baltymų gryninimo darbus, dr. Astai Zubienei už naudingus patarimus atliekant termodinaminius tyrimus bei visam kolektyvui už draugišką aplinką.