

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS Fundamentinių mokslų fakultetas Chemijos ir bioinžinerijos katedra

Joana Gylytė

SLOPIKLIŲ JUNGIMOSI SU REKOMBINANTINĖMIS ŽMOGAUS KARBOANHIDRAZĖMIS TERMODINAMINĖ ANALIZĖ

THERMODYNAMIC ANALYSIS OF INHIBITOR BINDING TO RECOMBINANT HUMAN CARBONIC ANHYDRASES

Baigiamasis bakalauro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas $61205\mathrm{T}201$

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vilnius, 2013

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Fundamentinių mokslų fakultetas

Chemijos ir bioinžinerijos katedra

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas) Juozas Kulys (Vardas, Pavardė)

(Data)

Joana Gylytė

SLOPIKLIŲ JUNGIMOSI SU REKOMBINANTINĖMIS ŽMOGAUS KARBOANHIDRAZĖMIS TERMODINAMINĖ ANALIZĖ

THERMODYNAMIC ANALYSIS OF INHIBITOR BINDING TO RECOMBINANT HUMAN CARBONIC ANHYDRASES

Baigiamasis bakalauro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vadovas Dr. Daumantas Matulis	(Parašas)	(Data)
Konsultantas Dr. Asta Zubrienė	(Parašas)	(Data)
Konsultantas (VGTU dėstytojas) habil. dr. prof. Juozas Kulys	(Parašas)	(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universiteto egzaminų, sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei gynimo organizavimo tvarkos aprašo 2011–2012 m. m. 1 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma) VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Joana Gylytė, 20092788 Fundamentinių mokslų fakultetas Bioinžinerijos studijų programa, BIf-09 grupė

BAIGIAMOJO DARBO SĄŽININGUMO DEKLARACIJA 2013 m. birželio 1 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema "Slopiklių jungimosi su rekombinantinėmis žmogaus karboanhidrazėmis termodinaminė analizė" patvirtintas 2012 m. spalio 10 d. dekano potvarkiu Nr. 383fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Parenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai : Dr. Asta Zubrienė ir Dr. Vytautas Petrauskas. Mano darbo vadovas Dr. Daumantas Matulis.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatyme nenumatytų piniginių sumų už šį darbą nesu mokėjusi.

(Parašas)

Joana Gylytė (Vardas ir pavardė)

(Declarations of authorship in Final Degree Projects) VILNIAUS GEDIMINAS TECHNICAL UNIVERSITY Joana Gylytė, 20092788 Faculty of Fundamental Sciences Bioengineering, academic group BIf-09

DECLARATION OF AUTHORSHIP IN THE FINAL PAPER 1st of June, 2013

I declare that my Final Degree Paper entitled "Thermodynamic Analysis of Inhibitor Binding to Recombinant Human Carbonic Anhydrases" is entirely my own work. The title was confirmed on October 25, 2012 by Faculty Dean's order No. 383fm. I have clearly signalled the presence of quoted or paraphrased material and referenced all sources.

I have acknowledget appropriately any assistance I have received by the following professionals/advisers: Dr. Asta Zubrienė, Dr. Vytautas Petrauskas.

The academic supervisor of my Final Degree Paper is Dr. Daumantas Matulis.

No contribution of any other person was obtained, nor did I buy my Final Degree Paper.

(Signature)

Joana Gylytė (Given name, family name)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas Fundamentinių mokslų fakultetas Chemijos ir bioinžinerijos katedra

Technologijos mokslų sritis Bioinžinerijos studijų kryptis Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201 Bioinžinerijos specializacija

TVIRTINU			
Katedros	vedėjas		

(Parašas) Juozas Kulys (Vardas, Pavardė)

(Data)

BAIGIAMOJO BAKALAURO DARBO UŽDUOTIS

.....Nr.....

Vilnius

Studentei Joanai Gylytei

Baigiamojo darbo tema: Slopiklių jungimosi su rekombinantinėmis žmogaus karboanhidrazėmis termodinaminė analizė

Patvirtinta 2012 m. spalio 10 d. dekano potvarkiu Nr. 383fm Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2013 m. birželio 1 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Atlikti 4-pakeistų-benzensulfonamidų ir 4-pakeistų-2,3,5,6-tetrafluorbenzensulfonamidų jungimosi su rekombinantinėmis žmogaus karboanhidrazėmis I, II, VII, XII ir XIII termodinaminę analizę.

Konsultantas (VGTU dėstytojas) — Habil. dr. prof. Juozas Kulys

Konsultantas _____ Dr. Asta Zubrienė

Vadovas _____ Dr. Daumantas Matulis

UŽDUOTĮ GAVAU

(Parašas) Joana Gylytė (Vardas, Pavardė)

(Data)

Bioinžinerijos studijų programos baigiamasis bakalauro darbas Pavadinimas: Slopiklių jungimosi su rekombinantinėmis žmogaus karboanhidrazėmis termodinaminė analizė

Autorius Joana Gylytė

Vadovas Dr. Daumantas Matulis

Kalba **Lietuvių** Užsienio

Anotacija

Karboanhidrazės (CA) - patvirtinti terapiniai taikiniai. Šiuo metu farmacijos rinkoje yra apie 30 CA slopiklių, naudojamų glaukomos, epilepsijos, kalnų ir kitų ligų gydymui. Deja, dauguma šių slopiklių nėra atrankūs nė vienai iš 12 CA izoformų, todėl sukelia stiprius šalutinius poveikius.

Šiame darbe buvo tiriami 4-pakeisti-benzensulfonamidai ir 4-pakeisti-2,3,5,6tetrafluorobenzensulfonamidai, kaip karboanhidrazių slopikliai. Slopiklių jungimasis su CAI, II, VII, XII ir XIII buvo išmatuotas izoterminio titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodais, o slopinimas nustatytas sustabdytos srovės CO_2 hidratacijos metodu. Šių metodų panaudojimas buvo svarbus slopiklių giminingumui įvertinti. Eksperimentiniai duomenys dažnai priklauso nuo įvairių faktorių, įskaitant buferinio tirpalo sudėtį ir pH. Šiame tyrime pristatomi "tikriniai" jungimosi parametrai, kuriems šios eksperimentinės sąlygos neturi įtakos. Slopiklių struktūros-termodinamikos sąryšio tyrimas atliktas remiantis šiais "tikriniais" parametrais. Visi biofizikiniai metodai patvirtino, kad fluorinti benzensulfonamidai jungiasi su CA stipriau, nei nefluorinti junginiai. Elektroneigiamų pakaitų įvedimas į benzeno žiedą sumažina junginio sulfonamidinės grupės pK_a , o mažesnės pK_a vertės koreliuoja su didesniu slopiklio giminingumu karboanhidrazei. Taip pat nustatyta, kad fluorinti benzensulfonamidai su CA jungiasi nanomolinės eilės konstantomis ir yra atrankūs CAI. Vienas iš tirtų junginių pasižymi ypatingai dideliu giminingumu ir atrankumu CAI.

Darbą sudaro septynios dalys: įvadas; literatūros apžvalga; prietaisai, medžiagos ir metodai; rezultatai ir jų aptarimas; išvados; literatūros sąrašas; priedai. Darbo apimtis – 37 puslapiai teksto, 22 paveikslai, 3 lentelės, and 34 literatūros šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: karboanhidrazės, fluorinti benzensulfonamidai, inhibicija, termodinamika, izoterminio titravimo kalorimetrija, terminio poslinkio metodas, sustabdytos srovės CO_2 hidratacijos metodas.

Vilnius Gediminas Technical University Faculty of **Fundamental Sciences** Department of **Chemistry and Bioengineering**

Bioengineering study programme bachelor thesis

Title: Thermodynamic analysis of inhibitor binding to human carbonic anhydrases

Author Joana Gylytė Academic supervisor Dr. Daumantas Matulis

Thesis language **Lithuanian** Foreign

Annotation

The carbonic anhydrases (CA) are established as therapeutic targets. There are 12 catalytically active CA isozymes in human body. At least 30 CA sulfonamide inhibitors have been used as drugs to treat glaucoma, epileptic seizures, altitude sickness, and as diuretics. However, most of them exhibit poor selectivity towards target isozymes and result in various side effects.

In this work, a class of 4-substituted-benzensulfonamides and 4-substituted-2,3,5,6tetrafluorobenzensulfonamides as inhibitors of CA is reported. The binding affinity to carbonic anhydrases I, II, VII, XII and XIII was measured by isothermal titration calorimetry and thermal shift assay, and inhibition was determined by stopped-flow CO_2 hydration assay. The combined use of these methods has provided a detailed picture of protein-ligand interactions. Experimentally obtained binding data usually depends on various factors including buffer and pH. In this study, intrinsic parameters of binding that are independent of these experimental conditions are presented. Structure–thermodynamics correlations were studied using intrinsic parameters. All used biophysical methods have confirmed that fluorinated sulfonamides bound stronger to CA than non-fluorinated, because the presence of electronegative substituents decrease the pKa of sulfonamide group and this correlates with an increase in the CA inhibitory properties. Furthermore, fluorinated compounds possessed nanomolar affinity for selected CAs and were selective towards CAI. One of the studied compounds exhibited exceptionally high-affinity and was selective inhibitor of CAI.

The thesis consists of seven parts: introduction; literature review; instruments, materials and methods; results and discussion; conclusions; references; supplementary material. The thesis contains 37 pages without appendixes, 22 pictures, 3 tables, and 34 bibliographical entries.

Keywords: carbonic anhydrases, fluorinated benzensulfonamides, inhibition, thermodynamics, isotermal titration calorimetry, thermal shift assay, stopped-flow CO₂ hydration assay.

Vilniaus Gedimino technikos universitetas Fundamentinių mokslų fakultetas Chemijos ir bioinžinerijos katedra

Technologijos mokslų sritis Bioinžinerijos studijų kryptis Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201 Bioinžinerijos specializacija

PAŽYMA APIE BAIGIAMĄJĮ BAKALAURO DARBĄ

.....Nr.....

Vilnius

Studentė Joana Gylytė

Studentės svertinis įvertinimų vidurkis ${\bf 8,8}$ balo

Baigiamojo darbo tema: Slopiklių jungimosi su rekombinantinėmis žmogaus karboanhidrazėmis termodinaminė analizė

Baigiamasis darbas peržiūrėtas ir studentei **Joanai Gylytei** leidžiama ginti šį baigiamąjį darbą bakalauro laipsnio suteikimo komisijoje.

Katedros vedėjas ______ habil. dr. prof. Juozas Kulys

VADOVO ATSILIEPIMAS APIE BAIGIAMAJI BAKALAURO DARBA

.....

Studentė Joana Gylytė pradėjo dirbti Biotermodinamikos ir Vaistų Tyrimo skyriuje (Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas) pabaigusi studijų I kursą. Per šiuos trejus metus ji įsisavino keletą biofizikinių sąveikų tyrimų metodų, aprašytų darbe, išmoko ir kruopščiai atliko labai didelį kiekį eksperimentų. Jos eksperimentiniai rezultatai yra panaudoti 4 priimtose spausdinimui tarptautinėse publikacijose, o taip pat planuojamos kelios publikacijos. Ji yra ypatingai darbšti ir produktyvi laboratorijoje, o taip pat žingeidi ir aktyviai stengiasi spręsti mokslinius uždavinius. Mes esame ja labai patenkinti ir jos darbą vertinu puikiai.

Baigiamojo darbo įvertinimas: Puikiai (10)

Vadovas _____ Dr. Daumantas Matulis

PADĖKA

- Dr. Daumantui Matuliui už suteiktas žinias, visapusišką pagalbą ir palaikymą.
- Dr. Astai Zubrienei už praktinius biofizikinių metodų mokymus, pagalbą interpretuojant gautus duomenis ir daugybę svarbių patarimų.
- Dr. Vytautui Petrauskui už kompiuterinių programų "LATEX", "Origin" ir "Inkscape" mokymus, pagalbą ir patarimus rengiant ir redaguojant šį baigiamąjį darbą.
- Lietuvos mokslo tarybai už suteiktą paramą projekto "Studentų moksliniai tyrimai" metu (2010 m. rudens semestras).

Turinys

ĮV	'ADA	AS		14
1.	\mathbf{LIT}	ERAT	ŪROS APŽVALGA IR ANALIZĖ	16
	1.1.	Bioter	modinamika vaistų kūrime	16
		1.1.1.	Molekulių sąveikos termodinaminiai parametrai	16
		1.1.2.	Termodinaminio optimizavimo strategijos	17
		1.1.3.	Termodinaminių parametrų optimizavimo sunkumai	19
	1.2.	Karbo	panhidrazė – modelinis baltymas	20
		1.2.1.	Katalizinis mechanizmas	21
		1.2.2.	Sulfonamidiniai slopikliai ir jungimosi mechanizmas	22
2.	PR	ETAI	SAI, MEDŽIAGOS IR METODAI	25
	2.1.	Prieta	isai	25
	2.2.	Medži	agos	25
	2.3.	Metod	lai	25
		2.3.1.	Izoterminio titravimo kalorimetrija	26
		2.3.2.	Terminio poslinkio metodas	28
		2.3.3.	Sustab dytos srovės CO_2 hidratacijos metodas $\ \ldots \ $	30
3.	TY	RIMO	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	33
	3.1.	Aktyv	rumo ir slopinimo tyrimai	33
	3.2.	Stebin	noji termodinamika	36
	3.3.	Tikrin	ė termodinamika	39
		3.3.1.	Slopiklių pK_a ir deprotonizacijos entalpijos nustatymas	40
		3.3.2.	Karboanhidrazės II aktyviajame centre esančios vandens molekulės	
			pK_a ir protonizacijos entalpijos nustatymas	41
		3.3.3.	Tikrinių parametrų skaičiavimai	44
	3.4.	Biofizi	ikinių ir fermentinio metodų duomenų palyginimas	48
IŠ	VAD	OS		50
\mathbf{M}	OKS	LINIŲ	J DARBŲ SĄRAŠAS	51
\mathbf{LI}	TER	ATŪF	ROS SĄRAŠAS	55
PI	RIEI	DAI		56

PAVEIKSLŲ IR LENTELIŲ SĄRAŠAS

Paveikslų sąrašas:

1 pav. Entalpinis "piltuvėlis" (18 psl.);

2 pav. Termodinaminio optimizavimo kreivės pavyzdys (19 psl.);

3 pav. CAII katalizinio mechanizmo schema (22 psl.);

4 pav. Sulfonamidinių slopiklių jungimosi su karboanhidraze mechanizmo schema (23 psl.);

5 pav. Izoterminio titravimo kalorimetrijos principinė schema (26 psl.);

6 pav. Terminio poslinkio metodo principinė schema (29 psl.);

7 pav. Darbe tirtų junginių cheminės struktūros (33 psl.);

8 pav. Reakcijos greičio priklausomybė nuo CAXII koncentracijos (34 psl.);

9 pav. Karboanhidrazių aktyvumo palyginimas tarpusavyje ir su literatūros duomenimis (34 psl.);

10 pav. Karboanhidrazių slopinimo acetazolamidu SFA duomenys (35 psl.);

11 pav. IC_{50} priklausomybė nuo CAII koncentracijos. (35 psl.);

12 pav. A(1-3), B(1-3) ir vaistinių preparatų AZM ir EZA jungimosi su CAI, II, VII, XII, XIII stebimosios jungimosi konstantos K_b (*pH*7, 37 °C). (36 psl.);

13 pav. A1 ir B1 slopiklių jungimosi su CAI TSA duomenys. (37 psl.);

14 pav. A1 ir B1 slopiklių jungimosi su CAII ITC duomenys. (38 psl.);

15 pav. Nefluorintų slopiklių A(1-3) jungimosi su CAI, CAII, CAVII, CAXII ir CAXIII Gibso energijų, išmatuotų TSA ir ITC metodais, palyginimas. (39 psl.);

16 pav. EZA jungimosi su CAII $\Delta H_{steb.}$ ITC integruotos kreivės, esant skirtingam pH ir buferiniui tirpalui.(40 psl.);

17 pav. B3 junginio titravimo rūgštimi ITC duomenys (41 psl.);

18 pav. EZA jungimosi su CAII $\Delta H_{steb.}$ priklausomybė nuo buferinio tirpalo sudėties ir pH. (42 psl.);

19 pav. EZA jungimosi su CAII $\Delta G_{steb.}$ priklausomybė nuo buferinio tirpalo sudėties ir pH.(43 psl.);

20 pav. B2 slopiklio jungimosi su CAII schema (44 psl.);

21 pav. Slopiklių struktūros-termodinamikos sąryšio žemėlapis (47 psl.);

22 pav. Slopiklių termodinaminio optimizavimo kreivė (48 psl.);

Lentelių sąrašas:

1 lent. EZA jungimosi su CAII, CAXII ir CAXIII tikrinių parametrų palyginimas (44 psl.); 2 lent. Karboanhidrazių aktyviajame centre esančios, prie cinko prisijungusios vandens molekulės CAZnH₂O ir slopiklių sulfonamidinės grupės pK_a ir protonizacijos entalpijos $\Delta H_{prot.}$ vertės 25 °C ir 37 °C temperatūrose. (45 psl.);

3 lent. Slopiklių jungimosi su CAII duomenų, gautų SFA, TSA ir ITC metodais palyginimas. (48 psl.);

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- ANS 1,8-anilino naftaleno sulfonatas;
- AZM acetazolamidas;
 - A1 4-[(2-hidroksietil)tio]benzensulfonamidas;
 - A2 4-propiltiobenzensulfonamidas;
 - A3 4-[(2-feniletil)tio]benzensulfonamidas;
- [Buf] buferinio tirpalo koncentracija;
 - B1 2,3,5,6-tetrafluor-4-[(2-hidroksietil)tio]benzensulfonamidas;
 - B2 2,3,5,6-tetrafluor-4-propiltiobenzensulfonamidas;
 - B3 2,3,5,6-tetrafluor-4-[(2-feniletil)tio]benzensulfonamidas;
- CA karboanhidrazė;

 $\rm CAZnH_2O~-~$ prie karboanhidrazės aktyviajame centre esančio cinko jono prisijungusi vandens molekulė;

 C_p – šiluminė talpa;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

- $\Delta H_{prot.}$ protonizacijos/deprotonizacijos entalpijos pokytis;
- $\Delta X_{steb.}$ stebimasis termodinaminis parametras;
- $\Delta X_{tikr.}$ tikrinis termodinaminis parametras;
 - $\Delta_b X$ baltymo jungimosi (angl. *binding*) termodinaminis parametras;
 - $\Delta_u X$ baltymo išsivyniojimo (angl. *unfolding*) termodinaminis parametras;

EZA – etokzolamidas;

- EE entalpijos efektyvumas;
 - F ligando užimtų vietų frakcija;
 - h Hilo koeficientas;

[H⁺] – protonų koncentracija;

Hepes – 4-(2-hidroksietil)-1-piperaziniletano sulfoninė rūgštis;

 IC_{50} – slopiklio koncentracija, kuri sumažina fermento aktyvumą 50 %;

ITC – izoterminio titravimo kalorimetrija (angl. isothermal titration calorimetry);

k – indikatoriaus koncentracijos pataisos koeficientas;

 $k_{\rm CO_2}$ – tiesioginės $\rm CO_2$ hidratacijos reakcijos greičio konstanta ;

 K_b – jungimosi (angl. *binding*) pusiausvyros konstanta;

 K_d – disociacijos (angl. dissociation) pusiausvyros konstanta;

- K_i inhibicijos (angl. *inhibition*) pusiausvyros konstanta;
- K_M Michaelis-Menten konstanta;

 M_t – bendra (angl. total) makromolekulės koncentracija;

n – stechiometrija;

N~-nevandenilinių atomų skaičius arba molekulinė masė;

Pi – natrio fosfato buferinis tirpalas;

 pK_a – rūgšties disociacijos konstantos neigiamas logaritmas;

 P_t – bendra (angl. *total*) baltymo koncentracija;

- Q šilumos kiekis;
- R universalioji dujų konstanta;
- SFA sustab
dytos srovės CO_2 hidratacijos metodas (angl.
 stopped-flow CO_2 hydration assay);
 - T temperatūra;
 - T_m baltymo lydymosi temperatūra;
 - T_r baltymo lydymosi temperatūra, kai nėra pridėto ligando;
 - T_0 palyginamoji temperatūra;
- Tris 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolio buferinis tirpalas;
- Tris bazė 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis;
 - TrisHCl 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolio hidrochloridas;
 - TSA terminio poslinkio metodas (angl. *thermal shift assay*);
 - V kalorimetro celės tūris;

ĮVADAS

Termodinamikos taikymas vaistų kūrime įgauna vis svarbesnį vaidmenį akademinėse ir pramoninėse laboratorijose. Susidomėjimas termodinamika šioje srityje išaugo pradėjus suprasti biomolekulių sąveikos energijas, atsiradus ypač jautriems mikrokalorimetrams, bei įrodžius praktinę termodinamikos panaudojimo naudą. Nors termodinaminių duomenų pritaikymas didėja, dar nėra iki galo suprasta, kodėl ir kaip iš tikrųjų molekulės sąveikauja ir kaip interpretuoti sąveikos termodinaminius duomenis. Svarbiausia, kad susidomėjimas šiuo mokslu auga ir termodinamika įgauna vis didesnę svarbą vaistų kūrime ir vystyme (Garbett and Chaires, 2012).

Istoriškai vaistų kūrimas rėmėsi struktūriniu komplementarumu tarp kuriamos cheminio junginio struktūros ir makromolekulės-taikinio aktyvaus centro. Struktūriniai jungimosi duomenys buvo gaunami rentgenostruktūrinės kristalografijos arba branduolių magnetinio rezonanso metodais. Deja, struktūrinė informacija nieko nepasako apie energetines jėgas, kurios varo komplekso susidarymą. Būtina molekulių erdvinę struktūrą susieti su termodinamika ir kinetika, norint išsamiai suprasti biochemines reakcijas ir bandyti reguliuoti ląstelės komponentų aktyvumą (Ladbury and Doyle, 2005). Šiame darbe didžiausias dėmesys kreipiamas į termodinamiką, tačiau taip pat aptariama kinetika.

Vaisto kūrime labai svarbu identifikuoti tinkamą makromolekulę–taikinį. Didžiąją dalį taikinių sudaro su G baltymu susiję receptoriai (angl. *G Protein related receptors, GPCR*), jonų kanalai ir fermentai, įskaitant proteazes, kinazes, ATPazes ir kt. Šiame darbe tirtos karboanhidrazės, kurios taip pat yra pripažinti terapiniai taikiniai (Alterio et al., 2012). Karboanhidrazės (CA) yra fermentai, katalizuojantys fiziologiškai esminę grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją. Sutrikusi CA veikla siejama su glaukomos, epilepsijos, vėžio ir kitomis ligomis. Šiuo metu farmacijos rinkoje yra apie 30 CA slopiklių, tačiau jie nėra atrankūs nė vienai iš 12 CA izoformų ir sukelia įvairius pašalinius poveikius. Dėl šios priežasties aktualu kurti naujus, didesniu atrankumu pasižyminčius CA slopiklius.

Viena iš tyrimų krypčių Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje (Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute) yra naujų priešvėžinių taikinių - karboanhidrazių ir karščio šoko baltymų - slopiklių kūrimas. Kūrimas apima slopiklių sintezę, rekombinantinių fermentų gamybą, baltymų-ligandų biofizikinius jungimosi tyrimus ir kompiuterinį modeliavimą. Bakalauro studijų metu atlikau baltymų-ligandų jungimosi matavimus ir tapau 4 mokslinių publikacijų (Dudutienė et al., 2013; Jogaitė et al., 2013; Petrauskas et al., 2013; Zubrienė et al., 2013) bendraautore. Straipsnių kopijos pridedamos priede. Baigiamajame bakalauro darbe aprašomi dalis mokslinio projekto "4-pakeisti-2,3,5,6-tetrafluorbenzensulfonamidai – karboanhidrazių I, II, VII, XII, XIII slopikliai" rezultatai. Projektą vykdė aštuoni autoriai – Dr. V. Dudutienė (slopiklių sintezė), A. Smirnov, Dr. E. Manakova, Dr. S. Gražulis (rentgenostruktūrinė kristalografinė analizė), Dr. A. Zubrienė, dokt. D. Timm (slopiklių jungimosi tyrimai), J. Gylytė (benzensulfonamidų jungimosi ir slopinimo tyrimai) ir Dr. D. Matulis (vadovas). Į projektą įnešiau naujumo pirmoji pradedama vykdyti karboanhidrazių aktyvumo ir slopinimo tyrimus sustabdytos srovės CO₂ hidratacijos metodu. Metodą išmokau stažuotės metu Florencijos universitete, kur mane mokė dr. D. Vulo ir prof. dr. C. Supuranas. Šie tyrimai papildė skyriaus veiklą, kadangi buvo charakterizuotas karboanhidrazių fermentinis aktyvumas ir parodyta, kaip junginiai slopina fermentą esant substratui. Iki tol skyriuje buvo vykdomi tik biofizikiniai matavimai, kuriuose substratas nebuvo naudojamas. Fermentiniu ir biofizikiniais metodais gauti duomenys sutapo, todėl buvo patvirtinta, kad biofizikiniai metodai nustato teisingas jungimosi konstantas.

Baigiamajame darbe pristatau šešių slopiklių, turinčių labai panašią cheminę struktūrą, struktūros-termodinamikos sąryšio tyrimą, kuris leidžia įvertinti junginio atomo ar funkcinės grupės indėlį į jungimosi stiprumą su biomolekule-taikiniu. Eksperimentiniai jungimosi termodinaminiai parametrai priklauso nuo buferinio tirpalo sudėties ir pH, todėl struktūros-termodinamikos sąryšis neturi prasmės, jei atsižvelgiama tik į vieno eksperimento, atlikto tam tikrose sąlygose, duomenis. Tyrime sąryšis nustatytas remiantis "tikriniais" termodinaminiai parametrais, kuriems šioms eksperimentinės sąlygos neturi įtakos. Taip pat junginių slopiklinis efektyvumas įvertintas fermentiniu metodu. Struktūros-termodinamikos sąryšio tyrimais remiasi racionalus vaistų kūrimas, kadangi tik vieno atomo ar funkcinės grupės prijungimas prie vaisto-kandidato gali turėti didelę įtaką sąveikos su makromolekule-taikiniu stiprumui. Šiame baigiamajame bakalauro darbe parodoma, kad fluoro atomų įvedimas į benzensulfonamidų žiedą gali padidinti jungimosi stiprumą net 1000 ir daugiau kartų, bei lemti atrankumą karboanhidrazių izoformoms.

Baigiamojo bakalauro darbo tikslas – 4-pakeistų-benzensulfonamidų ir 4-pakeistų-2,3,5,6tetrafluoro-benzensulfonamidų, kaip rekombinantinių žmogaus karboanhidrazių I, II, VII, XII, XIII slopiklių, struktūros-termodinamikos sąryšio tyrimas. Tikslui įgyvendinti buvo iškelti šie uždaviniai:

- 1. Sustabdytos srovės CO_2 hidratacijos metodu išmatuoti karboanhidrazių aktyvumą ir patikrinti, ar benzensulfonamidai slopina šių fermentų veiklą.
- 2. Izoterminio titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodais išmatuoti benzensulfonamidų jungimosi su karboanhidrazėmis svarbiausius termodinaminius parametrus: entalpiją ΔH , entropiją ΔS , ir laisvąją Gibso energiją ΔG ;
- 3. Nustatyti prie CAII aktyviajame centre esančio cinko jono prisijungusios vandens molekulės ir benzensulfonamidų pK_a ir jonizacijos entalpiją $\Delta H_{prot.}$;
- 4. Įvertinti karboanhidrazių, slopiklių ir buferinio tirpalo protonizacijos/deprotonizacijos įtaką stebimiesiems termodinaminiams parametrams ir apskaičiuoti tikrinius jungimosi parametrus, kurie nepriklauso nuo buferinio tirpalo sudėties ir pH;

1. LITERATŪROS APŽVALGA IR ANALIZĖ

1.1. Biotermodinamika vaistų kūrime

Vaistų kūrimas apima ko gero visas biomokslų sritis, kadangi vaistinė molekulė privalo pasižymėti geromis ADMET (absorbcija, distribucija, metabolizmas, toksiškumas), farmakokinetinėmis/farmakodinaminėmis savybėmis, bei būti tirpi ir atranki taikiniui. Ieškoma būdų, padedančių identifikuoti potencialų vaistą-kandidatą ankstyvajame vaistų kūrimo etape, tam kad sutaupyti laiko ir lėšų atliekant daugybę vaisto savybių tyrimų. Prieš kelis dešimtmečius mokslinėse ir pramoninėse vaistų kūrimo laboratorijose išaugo susidomėjimas biotermodinamikos mokslu, kadangi biotermodinamika apibūdina energetines jėgas, varančias vaisto jungimąsi su makromolekule-taikiniu.

1.1.1. Molekulių sąveikos termodinaminiai parametrai

Svarbiausias molekulių sąveiką apibūdinantis termodinaminis dydis yra laisvoji Gibso energija ΔG . Tiek dydžio vertė, tiek ir ženklas apibūdina reakcijos eigą. Neigiama ΔG vertė (egzergoninis procesas) nurodo, kad molekulių jungimasis yra energetiškai palankus, o teigiama ΔG vertė (endergoninis procesas) – priešingai. ΔG dydis apibūdina sąveikos stiprumą. Kai $\Delta G = 0$, tai sistema yra pusiausvyrinėse sąlygose ir jokie pokyčiai nevyksta. ΔG gali būti lengvai perskaičiuojama iš jungimosi konstantos K_b pagal sąryšį:

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

Medicininės chemijos specialistai slopiklio–baltymo sąveikos stiprumui įvertinti dažnai vartoja dydį - disociacijos konstantą K_d , kurios skaitinė vertė gali būti lyginama su inhibicijos konstanta K_i . K_d yra atvirkštinis K_b dydis:

1

$$K_d = 1/K_b \tag{2}$$

Laisvoji Gibso energija susideda iš entalpinio ΔH ir entropinio ΔS komponentų ir tik dalinai apibūdina molekulių sąveiką. Entalpijos pokyčiai susiję ryšių nutrūkimu arba naujų ryšių formavimusi. Jungimosi entalpija susideda iš polinių grupių desolvatacijos ir nekovalentinių ryšių (Garbett and Chaires, 2012). Molekulių jungimosi entalpija ΔH gali būti tiesiogiai matuojama naudojant kalorimetrą arba netiesiogiai apskaičiuojama pagal van't Hofo lygtį, kuri aprašo jungimosi konstantos K_b priklausomybę nuo temperatūros:

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

Šios diferencialinės lygties sprendinys turi kelias išraiškas:

$$\ln(K_b) = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \tag{4}$$

arba

$$\frac{K_{b2}}{K_{b1}} = -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) \tag{5}$$

Daugeliu atvejų van't Hofo lygtis neteisingai prognozuoja entalpijas plačiame temperatūrų intervale, kadangi lygtyje neatsižvelgiama į šiluminę talpą C_p , priklausančią nuo temperatūros:

$$\Delta C_p = \frac{\mathrm{d}\Delta H}{\mathrm{d}T} \tag{6}$$

Šiluminę talpą C_p galima nustatyti kalorimetriškai atlikus keletą eksperimentų skirtingose temperatūrose.

Entropija ΔS yra ne mažiau svarbus už entalpiją dydis, kuris apibūdina sistemos tvarką. Neigiama ΔS vertė parodo, kad tvarka sistemoje didėja ir priešingai. Jungimosi entropija susideda iš dviejų dalių – desolvatacijos entropijos, susijusios su slėpimusi nuo tirpiklio hibrofobinių grupių, ir konformacinės entropijos, apibūdinančios molekulės konformacinių laisvės laipsnių skaičių (Ruben et al., 2006). Entropija nėra tiesiogiai matuojama, tačiau lengvai apskaičiuojama žinant ΔG ir ΔH vertes:

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T \tag{7}$$

Dažnai kelių molekulių sąveikos su viena biomolekule-taikiniu $\Delta G (K_b \text{ ar } K_d)$ vertės būna labai panašios ar netgi vienodos, tačiau ΔH ir ΔS labai skiriasi. Šis fenomenas vadinamas entropijos-entalpijos kompensavimu. Siekiant detaliai apibūdinti jungimosi reakciją labai svarbu išskirti kiekvieno termodinaminio parametro indėlį.

1.1.2. Termodinaminio optimizavimo strategijos

Termodinamika apibūdina jėgas, varančias biomolekulių susijungimą ir suteikia informacijos apie sąveikos prigimtį. Nemažai tyrimų įrodė, kad termodinaminiai jungimosi duomenys, apibūdinantys potencialios vaistinės molekulės ir makromolekulės taikinio sąveiką, gali palengvinti naujų vaistų kūrimo procesą. Pasiūlytos bent kelios vaisto termodinaminio optimizavimo strategijos.

Entalpijos optimizavimo strategiją aprašė Ernestas Freiris. Mokslininkas ištyrė JAV maisto ir vaistų administracijos patvirtintas dvi vaistų grupes – ŽIV-1 proteazių slopiklius ir statinus, kurie mažina cholesterolio kiekį. Tyrimai parodė, kad pirmosios rinkoje pasirodžiusios molekulės (angl. *first-in-class*) buvo termodinamiškai nesubalansuotos. Disociacijos konstantos K_d buvo nanomolinės eilės, o entalpijos buvo nepalankios. Geriausių klasės (angl. *best-in-class*) molekulių K_d buvo jau pikomolinės eilės, o dominuojantis faktorius buvo entalpija (Freire, 2008). Vaistų vystymas užtruko apie 10 metų, siekiant pagerinti preparato jungimosi stiprumą, atrankumą taikiniui, farmakokinetines savybes, o galiausiai paaiškėjo, kad geriausi vaistai pasižymi palankiausia jungimosi entalpija. Vyrauja bendra nuomonė, kad palanki entalpija parodo nekovalentinių ryšių komplementarumą tarp baltymo ir slopiklio (Ladbury et al., 2010). Šis pavyzdys parodo, kad entalpijos optimizavimas yra efektyvi strategija naujų vaistų kūrimo ankstyvuosiuose etapuose.

Junginių optimizavimui taip pat buvo pasiūlyta "entalpinio piltuvėlio" (angl. enthalpic funnel) koncepcija. Termodinaminių duomenų taškai, pavaizduoti paveiksle, kaip entalpijos ir Gibso energijos santykio ($\Delta H/\Delta G$) priklausomybė nuo asociacijos/jungimosi konstantos (K_a arba K_b) dešimtainio logaritmo, sudaro piltuvėlio formą (1 pav.). Piltuvėlio viršuje išsidėsto silpnu giminingumu pasižymintys junginiai, kadangi egzistuoja daugybė entalpijos/entropijos kombinacijų. Silpnas jungimasis atsiranda dėl įvairių hidrofobinių ir polinių grupių tarpusavio sąveikų. Jungimosi giminingumui stiprėjant, entalpijos/entropijos kombinacijų mažėja, todėl piltuvėlio forma siaurėja.



1 pav. Entalpinis "piltuvėlis". 71 slopiklio jungimosi su plasmepsinu termodinaminiai duomenys (Ruben et al., 2006).

Ernestas Freiris papildė termodinaminio optimizavimo strategiją, taip pat pasiūlydamas "termodinaminio optimizavimo kreivę" (angl. thermodynamic optimization plot, TOP)(Freire, 2009). Vaistų-kandidatų grupė charakterizuojama kalorimetriškai ir tuomet termodinaminiai duomenys pavaizduojami termodinaminio optimizavimo kreivėje y ašyje atidedant jungimosi entalpiją, o x ašyje – jungimosi entropiją ($-T\Delta S$ išraiškoje)(2 pav.). Visų taškų, esančių vienoje tiesėje, jungimosi Gibso energija ΔG (arba K_b, K_d) vienoda. Aukščiau kreivės esančių taškų giminingumas yra mažesnis (labiau teigiama ΔG), o žemiau kreivės – didesnis (labiau neigiama ΔG). Termodinaminio optimizavimo tikslas – pasiekti didžiausią giminingumą, esant palankios entalpijos ir palankios entropijos sumai. Didžiausia suma ne visada reiškia stipriausią jungimąsi, kadangi šie dydžiai kompensuoja vienas kitą.



2 pav. Termodinaminio optimizavimo kreivės pavyzdys.

Kitą termodinaminio optimizavimo strategiją apibūdina entalpijos efektyvumo (EE) parametras, kuris sieja nekovalentinių ryšių susidarymą su molekulės dydžiu (Ladbury et al., 2010):

$$EE = \frac{\Delta H}{N} \tag{8}$$

Čia N - nevandenilinių atomų skaičius arba molekulinė masė. Dažnai vaistų kūrime siekiant padidinti junginio giminingumą prijungiamos hidrofobinės grupės, kurios padidina molekulinę masę ir lemia didesnę entropiją. Svarbu optimizuoti ne sąveikos kiekybę, o kokybę, kurią apibūdina *EE* parametras (Garbett and Chaires, 2012). Šis dydis ypač svarbus fragmentiniame (angl. *fragment-based*) vaistų kūrime, kurio metu ieškoma stipriai su taikiniu sąveikaujančių funkcinių grupių. Mažesnės molekulinės masės junginiai įprastai pasižymi mažesniu giminingumu, tačiau *EE* yra tinkamas parametras jų efektyvumui vertinimui. Entalpijos efektyvumas padeda iš vienos junginių klasės išskirti geriausius vaistinius kandidatus.

Aptartos optimizavimo strategijos akcentuoja, kad svarbiausia palanki jungimosi entalpija. Entalpija yra tiesiogiai susijusi su entropija, todėl keičiant vieną dydį, kinta ir kitas. Entalpijos ir entropijos optimizavimas yra ypatingai sunkus uždavinys, neturintis paprasto sprendimo būdo.

1.1.3. Termodinaminių parametrų optimizavimo sunkumai

Vaisto-kandidato funkcinių grupių modifikavimas gali lemti atsiradusį didesnį palankios entalpijos indėlį, tačiau tuo pačiu padidinti nepalankią entropiją, arba atvirkščiai. Paprastai tokiais atvejais grupių modifikavimas turi mažą įtaką arba visai neturi įtakos jungimosi ΔG (arba K_b , K_d).

Kai vaistas sąveikauja su makromolekule veikia dviejų tipų jėgos – procesą varančios jėgos, kurių pagrindas yra van der Valso ir vandeniliniai ryšiai, ir procesą stabdančios jė-

gos, tokios kaip hidrofobinis efektas, kuris stengiasi išstumti vaistą iš vandeninės aplinkos į hidrofobinę kišenę (Freire, 2008). Vienas jungimosi jėgas pakankamai lengva konstruoti ir optimizuoti, o kitas nepaprastai sunku. Tradiciškai sintetiniai vaistai buvo kuriami remiantis komplementarumu tarp ligando ir taikinio aktyvaus centro, ir didinant giminingumą hidrofobiškumo sąskaita (Ruben et al., 2006). Pradinis junginio "skeletas" (angl. *scaffold*) buvo konformaciškai "įkalinamas" aktyviajame centre ir jo funkcinės grupės modifikuojamas, kol pasiekiamas didžiausias giminingumas per entropijos optimizavimą. Hidrofobinių grupių prijungimas didina palankią desolvatacijos entropiją, kuri siejama su struktūrizuotų vandens molekulių persitvarkymu susidarant ligando-biomolekulės kompleksui (Garbett and Chaires, 2012). Kita vertus, hidrofobiškumo optimizavimą limituoja junginio tirpumas, kadangi vaistinės molekulės privalo būti tirpios (Ruben et al., 2006).

Entalpiją optimizuoti žymiau sunkiau, nei entropiją. Jungimosi entalpiją sudaro du priešingi veiksniai – palanki entalpija, kurios šaltinis yra nekovalentiniai vandeniliniai ir van der Valso ryšiai, ir nepalanki entalpija, ateinanti iš polinių grupių desolvatacijos, būtinos jungimosi reakcijose (Garbett and Chaires, 2012). Van der Valso sąveika didžiausia, kai yra idealus geometrinis atitikimas tarp vaisto ir taikinio, o vandeniliniai ryšiai stipriausi, kai atstumai ir kampai tarp akceptorių ir donorų yra optimalūs. Jei kampai ir atstumai yra pusiau optimalūs, tai vandenilinių ryšių stiprumas sumažėja tampa nepalankus. Šio reiškinio priežastis – ligando vandenilinių ryšių donorai ir akceptoriai prieš jungimąsi būna suformavę ryšius su vandens molekulėmis. Stiprus vaisto jungimasis su taikiniu vyksta tik tada, kai palanki van der Valso sąveikų ir vandenilinių ryšių entalpija yra pakankamai didelė ir gali kompensuoti nepalankią desolvatacijos entalpiją. Nepalanki entalpija rodo, kad polinės junginio grupės nesudaro stiprių ryšių su taikiniu ir vyrauja desolvatacijos efektas (Freire, 2008).

Struktūra paremtame vaistų kūrime dar nepavyksta sukonstruoti erdvinio vaisto-taikinio modelio, kuris leistų vieno angstremo tikslumu suplanuoti vandenilinių ryšių susidarymo poras ir išlošti palankios entalpijos įnašą. Kita vertus, struktūros–termodinamikos sąryšio analizė padeda atpažinti ir optimizuoti funkcines grupes, atsakingas už stiprų jungimąsi.

1.2. Karboanhidrazė – modelinis baltymas

Šiame tyrime nagrinėta slopiklių jungimosi su terapiniais taikiniais–karboanhidrazėmis termodinamika. Karboanhidrazė (CA) yra patrauklus modelinis baltymas biofizikiniuose ir biocheminiuose tyrimuose. CA turi daugybę privalumų, lyginant su kitais modeliniais baltymais. Tai stabilūs ir labai aktyvūs fermentai, kuriuos pakankamai lengva išgryninti iš E.coli bakterijų dideliais kiekiais. Karboanhidrazių slopiklius taip pat nesunku sintetinti ir jie jungdamiesi drastiškai nekeičia CA struktūros. Didelis privalumas, kad yra daugybė metodų CA–slopiklio sąveikai tirti. Taip pat nesudėtinga išspręsti komplekso kristalinę struktūrą (Krishnamurthy et al., 2008).

Karboanhidrazės dalyvauja svarbiuose fiziologiniuose ir patologiniuose procesuose – kvėpavime, pH ir CO₂ homeostazėje, elektrolitų sekrecijoje, kaulų rezorpcijoje, kalcifikacijoje, biosintetinėse reakcijose, auglių vystymesi ir kt. Iš viso žmogaus organizme yra 12 aktyvių CA izoformų, pasižyminčių skirtingu aktyvumu, pasiskirstymu ląstelėje ir organuose. Taip pat yra trys į karboanhidrazes panašūs baltymai (angl. *carbonic anhydrase related proteins*, CARP VIII, CARP X, CARP XI), kurie neatlieka katalizinės funkcijos. Šie baltymai įtraukiami į karboanhidrazių numeraciją, todėl tarp 12 aktyvių izoformų sutinkamos ir CAXIII, CAXIV, CAXV. Sutrikusi karboanhidrazių veikla sukelia rimtus susirgimus. Šiuo metu farmacijos rinkoje yra apie 30 karboanhidrazių slopiklių, naudojamų glaukomos, Alzheimerio, nutukimo ir kt. ligų gydymui. Nė vienas šių slopiklių nėra atrankus kuriai nors izoformai, todėl pacientams pasireiškia šalutiniai poveikiai. Dėl šios priežasties aktualu kurti naujus, didesniu atrankumu pasižyminčius CA slopiklius.

Šiame darbe tyrimai atlikti su penkiomis karboanhidrazių izoformomis – I, II, VII, XII ir XIII. Izoformos pasirinktos dėl praktinių priežasčių – skyriuje jos gaminamos dideliais kiekiais, pakankamais izoterminio titravimo kalorimetrijos eksperimentams. CAI, II, VII, XIII yra aptinkamos citozolyje, o CAXII – prikibusi prie membranos (Supuran, 2008). CAI dalyvauja renalinės ir celebrinės edemos, CAII – glaukomos, edemos, epilepsijos, kalnų ligos, CAVII – epilepsijos, CAXII – vėžio, glaukomos, CAXIII – sterilumo ligų vystymesi (Alterio et al., 2012). Atrankūs šių karboanhidrazių slopikliai galėtų gydyti paminėtas ligas.

1.2.1. Katalizinis mechanizmas

Karboanhidrazės katalizuoja grįžtamąją anglies dioksido hidratacijos reakciją:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

Karboanhidrazių aktyviajame centre esantis cinko jonas – esminis katalizės elementas. Rentgenostruktūrinė kristalografinė analizė parodė, jog cinko jonas yra 15 Å gylio kišenėje ir jį koordinuoja trys histidinų grupės (His94, His96 ir His119), dalyvaujančios protonų pernašos procese. Prie cinko jono taip pat yra prisijungusi vandens/hidroksido jono molekulė, kuri sudaro vandenilinius ryšius su Thr199 hidroksido grupe, sąveikaujančia su Glu106 karboksilo grupe. Šios sąveikos didina vandens molekulės, prisijungusios prie cinko jono, nukleofiliškumą ir orientuoja substratą (CO₂) į tinkamą poziciją nukleofilinei atakai. Fermentas aktyvus bazinėje formoje, kai prie cinko prisijungęs hidroksido jonas (3a pav.). Šis stiprus nukleofilas atakuoja CO₂ molekulę, esančią hidrofobinėje kišenėjė (CAII atveju substratą suriša Val121, Val143 ir Leu198 liekanos)(3b pav.)ir leidžia susidaryti bikarbonato–cinko kompleksui (3c pav.). Tuomet bikarbonato jonas pakeičiamas vandens molekule ir atpalaiduojamas į tirpalą. Susiformuoja rūgštinė fermento forma, kuri yra kataliziškai neaktyvi (3d pav.).



3 pav. CAII katalizinio mechanizmo schema (Smith and Simons, 2004).

Karboanhidrazė vėl tampa aktyvi, kai protoną iš aktyvaus centro pasiima aminorūgščių liekanos (pavyzdžiui His64 karboanhidrazių izoformose I, II, IV, VII, IX, XII-XIV) arba buferinis tirpalas. Protonų pernaša, verčiant fermentą iš neaktyvios rūgštinės formos į bazinę aktyvią formą, limituoja reakcijos greitį. Šis mechanizmas gali paaiškinti, kodėl CAII yra vienas aktyviausių žinomų fermentų $(k_{kat}/K_M = 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1})$ (Supuran, 2008).

1.2.2. Sulfonamidiniai slopikliai ir jungimosi mechanizmas

Sulfonamidai yra klasikiniai karboanhidraziu slopikliai. 1940 m. pirma karta buvo nustatyta, kad sulfanilamidas slopina karboanhidrazių aktyvumą (Mann and Keilin, 1940). Sio slopiklio pagrindu buvo sukurti keturi, iki šiol glaukomos gydymui vartojami vaistai – acetazolamidas, metazolamidas, etokzolamidas ir dichlorofenamidas. Pirmoji CA slopiklių kūrimo strategija buvo aromatinės sistemos, prijungtos prie sulfonamidinės grupės, modifikavimas. Ši strategija buvo pavadinta "žiedo modifikavimu" (angl. "ring approach")(Smith and Simons, 2004). Sukurta daugiau nei 500 CA slopikliu, kuriu žieda sudaro furanas, tiofenas, tiadiazolas, indolas, benzofuranas, benzotiofenas, benzotiazolas, tienofuranas, tienotiofenas, tienopiranas arba tienotiazolas (Krishnamurthy et al., 2008). Vėliau pateikta "uodegos modifikavimo" (angl. *"tail approach"*) strategija (Smith and Simons, 2004). Šios taktikos tikslas - parinkti "uodegą", kuri didintų junginio tirpumą, atrankumą izoformai ir gerintų kitas vaistinei molekulei būdingas savybes. Pavyzdžiui, CA slopiklis dorzolamidas tirpsta tik rūgštinėje aplinkoje (Krishnamurthy et al., 2008). Dažnai "uodegoje" būna galinti jonizuotis cheminė grupė - karboksi arba amino, nes jos didina tirpumą. Slopiklių atrankuma daugeliu atveju didina hidrofobinės grupės, tačiau jos mažina junginio tirpuma ir negali būti pagrindiniu junginio elementu.

Sulfonamidai labai stipriai rišasi su karboanhidrazėmis, nes yra substrato CO_2 hidratacijos nuostoviosios būsenos (angl. *transition state*) analogai. Karboanhidrazių struktūra aktyviajame centre su prisijungusiu sulfonamidu atkartoja struktūrą komplekse su natyviomis substrato formomis - hidroksidu ir CO_2 (atskirai) arba HCO_3^- (Krishnamurthy et al., 2008). Sulfonamidai yra konkurentiniai CA slopikliai.



4 pav. Sulfonamidinių slopiklių jungimosi su karboanhidraze mechanizmo schema. (Smith and Simons, 2004).

Slopiklis jungiasi su karboanhidraze deprotonizuotoje formoje, pakeisdamas vandens molekulę ir sudarydamas ryšį su Zn(II) jonu, esančiu aktyviajame centre (4 pav.). Kompleksui būdinga tetraedro forma. Slopiklio NH grupė sudaro vandenilinį ryšį su Thr199 O γ atomu, kuris taip pat sąveikauja su Glu106 karboksiline grupe. Taip pat vienas iš SO₂NH₂ grupės deguonies atomų sudaro vandenilinį ryšį su Thr199 NH grupe. Sulfonamido benzeno žiedas sąveikauja su hidrofobine kišene. Šie struktūriniai elementai apsprendžia stiprų sulfonamidinės grupės jungimąsi su cinko jonu karboanhidrazės aktyviajame centre (Smith and Simons, 2004).

Benzensulfonamidų jungimosi stiprumą su CA lemia sulfonamidinės grupės pK_a . Nuo pK_a vertės priklauso slopiklio deprotonizuotos formos frakcija tirpale ir Levis baziškumas (Krishnamurthy et al., 2008). Kuo didesnė deprotonizuotos formos koncentracija tirpale tuo stipresnis stebimas jungimasis. Didžiausias vaisto giminingumas stebimas, kai slopiklio pK_a vertė artima fiziologiniam pH. Benzensulfonamidų $pK_a \approx 10$, todėl ieškoma būdų šiai vertei sumažinti. Vienas iš jų – elektroneigiamų pakaitų įvedimas į benzeno žiedą (Smith and Simons, 2004).

Didelę perspektyvą turi fluorų įvedimas į benzeno žiedą. Fluoro atomai vaistui suteikia unikalias savybes, kurių negalima išgauti panaudojant kitus elementus. Du geriausi fluorintų vaistinių molekulių pavyzdžiai yra 1950 m. susintetinti 9α -fluorohidrokortisonas (priešuždegiminis) ir 5-fluorouracilas (priešvėžinis). Vieno fluoro atomo įvedimas į natūralaus junginio struktūrą labai stipriai pagerino šių vaistų farmakologines savybes. Per pastarąjį penkiasdešimtmetį fluoro įvedimas į vaistinį junginį tapo standartu, siekiant pagerinti farmakologines savybes (Ojima and Taguchi, 2009). Vertinant junginių slopiklinį efektyvumą labai svarbu pasirinkti tinkamą tyrimo metodą ir atidžiai analizuoti gautus rezultatus. Kai naudojami du ir daugiau metodų, mažėja tikimybė klaidingai interpretuoti rezultatus. Slopiklių jungimosi ir slopinimo su karboanhidrazėmis tyrimuose naudojama daugybė metodų, įskaitant kapiliarinę elektroforezę, magnetinį branduolių rezonansą, apskritiminį dichroizmą, masių spektrometriją ir kt. Šiame darbe taikyti metodai, aparatūra ir medžiagos aprašomi sekančiame skyriuje.

2. PRIETAISAI, MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Prietaisai

Darbe naudoti prietaisai:

- 1. analitinės svarstyklės "AND GR-200";
- 2. realaus laiko termocikleris "Corbett Rotor-Gene 6000";
- 3. kalorimetras "ITC-200";
- 4. kalorimetras "VP-ITC";
- 5. maišyklė "BIOSAN";
- 6. pH-metras "LaboChema"
- 7. sustabdytos srovės spektrofotometras "Applied Photophysics SX.18MV-R";
- 8. spektrofotometras "Agilent 89090A".

2.2. Medžiagos

Darbe naudotos medžiagos:

- rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės I, II, VII, XII ir XIII. Fermentai rekombinantinės DNR technologijos būdu išskirti iš *Escherichia coli* bakterijų. Baltymai pagaminti Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje pagal mokslinėse publikacijose nurodytą metodiką: CAI - (Baranauskienė et al., 2010), CAII - (Cimmperman et al., 2008) CAVII ir CAXIII - (Sūdžius et al., 2010), CAXII - (Jogaitė et al., 2013);
- nekomerciniai CA slopikliai: A(1-3) ir B(1-3). Junginiai buvo susintetinti Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje (Dr. V. Dudutienė). Slopiklių sintezė aprašyta (Dudutienė et al., 2013) šaltinyje;
- komerciniai CA slopikliai (gamintojas): acetazolamidas (Sigma-Aldrich), etokzolamidas (Sigma-Aldrich);
- 4. indikatorius (gamintojas): bromtimolio mėlynasis (Allied chemical);
- 5. fluorescentinis dažas (gamintojas): 1,8-anilino naftaleno sulfonatas (Sigma-Aldrich);
- 6. tirpiklis (gamintojas): DMSO (ROTH).
- 7. druskos (gamintojas): Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich), NaH₂PO₄(Sigma-Aldrich), Na₃PO₄ (Sigma-Aldrich), Hepes (ROTH), NaCl (Sigma-Aldrich), TrisHCl (Sigma-Aldrich), Tris bazė (Sigma-Aldrich);
- 8. šarmai ir rūgštys (gamintojas): NaOH (Sigma-Aldrich), HNO_3 (Sigma-Aldrich);

2.3. Metodai

Šiame tyrime eksperimentai atlikti naudojant biofizikinius ir fermentinį metodus – izoterminio titravimo kalorimetrijos, terminio poslinkio ir sustabdytos srovės CO_2 hidratacijos.

Visų matavimų paklaidos apskaičiuotos pagal Stjudento metodą, kai pasikliaujamoji tikimybė yra 0,95.

2.3.1. Izoterminio titravimo kalorimetrija

Izoterminio titravimo kalorimetrija (ITC, angl. isothermal titration calorimetry) yra efektyvus metodas biomolekulių sąveikai tirti. Kalorimetras fiksuoja šilumos pokyčius pastovioje temperatūroje, kai vyksta bimolekulinis jungimasis. Atlikus 1–2 valandų trukmės eksperimentą iš karto galima nustatyti jungimosi laisvąją Gibso energiją ΔG , entalpiją ΔH , entropiją ΔS ir stechiometriją n. ITC metodu galima tirti beveik visų biomolekulių sąveiką, kadangi jungimosi energijos pokytis yra universali visų biocheminių reakcijų savybė. Kalorimetrijos metodu tiriamų biomolekulių nereikia nei žymėti, nei chemiškai modifikuoti, nei imobilizuoti. Naudojami vandeniniai reagentų tirpalai. Tai pagrindinis ITC privalumas lyginant su fermentiniais, ląstelių ar kitais biologiniais metodais.

Kalorimetrą sudaro 2 celės (palyginamoji ir darbinė) ir švirkštas (5 pav.) . Palyginamoji celė užpildoma vandeniu ir termostatuojama eksperimentinėje temperatūroje. Darbinė celė užpildoma reagentu A, o švirkštas reagentu B. Reagentas B iš švirkšto titruojamas į darbinę celę su reagentu A. Po kiekvienos injekcijos išsiskiriamas arba sugeriamas šilumos kiekis, kadangi susidaro A–B kompleksas. Reikalingas galios pokytis (µcal/s) tam, kad suvienodinti temperatūras abiejose celėse. Ligandui jungiantis su baltymu išsiskiria egzoterminė šiluma ir galia sumažėja. Eksperimento eigoje smailės mažėja, kadangi baltymas sotinasi ligandu. Kai baltymas visiškai prisisotina, ligandas nebegali prisijungti ir eksperimento pabaigoje matomos mažos smailės dėl skiedimosi šilumos. Suintegravus smailių plotus nustatoma reakcijos suminė jungimosi entalpija.



5 pav. ITC veikimo principinė schema. Modifikuota pagal (Ladbury, 2004).

Jungimosi termodinaminiams parametrams apskaičiuoti šiame darbe buvo naudojami

vienos ir dviejų jungimosi vietų modeliai. Vienos jungimosi vietos modelis:

$$Q = nFM_t \Delta HV \tag{9}$$

Dviejų jungimosi vietų modelis:

$$Q = M_t V (n_1 F_1 \Delta H_1 - n_2 F_2 \Delta H_2) \tag{10}$$

Abiejuose modeliuose F išraiška:

$$F = \frac{1}{2} \left(1 + \frac{L_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_bM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{L_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_bM_t}\right)^2 - \frac{4L_t}{nM_t}}\right)$$

Čia Q - bendras šilumos kiekis, n - stechiometrija, F - ligando užimtų vietų frakcija, M_t - bendra (angl. *total*) makromolekulės koncentracija, L_t - bendra (angl. *total*) ligando koncentracija, ΔH - entalpija, K_b - jungimosi konstanta, V - celės tūris. Lygties išvedimas ir detalesnis paaiškinimas pateikiamas (ITC, 2004) šaltinyje. Duomenims apdoroti naudojama Origin programos 5.0 arba 7.0 versija.

Jungimosi konstantos K_b nustatymą riboja bendra makromolekulės koncentracija M_t . Šį sąryšį apibūdina Wiseman *c*-faktorius (Wiseman et al., 1989):

$$c = nM_t K_b \tag{11}$$

Kokybiškai nustatyti reakcijos K_b galima tik tada, kai 1 < c < 1000. Kai c faktorius nepatenka į šį intervalą iš eksperimentinės kreivės galima įvertinti tik entalpiją.

Labai silpnai ar stipriai besijungiančių ligandų K_b ITC metodu galima įvertinti konkurencinės titracijos būdu (Krainer et al., 2012). Deja, šiame darbe konkurentinės titracijos eksperimentai nebuvo atlikti. Jungimosi konstantoms nustatyti naudotas terminio poslinkio metodas, kuris aprašomas sekančiame skyriuje.

2.3.1.1. Eksperimentinės sąlygos. Eksperimentai atlikti naudojant "VP-ITC" ir "ITC-200" kalorimetrus. "VP-ITC" celės tūris yra 1,4 ml, švirkšto – 300 µl. "ITC-200" celės tūris yra 200 µl, o švirkšto – 40 µl. Atrodytų, kad "ITC-200" kalorimetras yra ekonomiškesnis, nes reikalingi mažesni reagentų tūriai. Deja, jo jautrumas mažesnis, todėl reikalingos didesnės reagentų koncentracijos. "VP-ITC" kalorimetru gaunami kokybiški rezultatai naudojant 5–10 µM koncentracijos tirpalą celėje, o "ITC-200" atveju analogiškam signalui sužadinti reikalingas 15–20 µM baltymo tirpalas. Karboanhidrazių titravimo slopikliu eksperimentuose "VP-ITC" prietaisu buvo darytos 25 injekcijos, kas 200 s, o "ITC-200" prietaisu – 19 injekcijų, kas 120 s. Eksperimentai atlikti fiziologinėje 37 °C temperatūroje, išskyrus modelinius vaistinio preparato etokszolamido (EZA) jungimosi su CAII skirtinguose buferiniuose tirpaluose eksperimentus, kurie daryti 25 °C.

2.3.1.1.1. Karboanhidrazių jungimosi su slopikliais tyrimas. Kalorimetro celė buvo užpildyta 5–20 μ M CA tirpalu, o švirkštas 50–200 μ M slopiklio tirpalu. Slopiklio koncentracija švirkšte buvo 10 kartų didesnė, nei CA koncentracija celėje. Reakcijos buferinis tirpalas – 50 mM Pi (*pH* 7,0), 100 mM NaCl ir 2% DMSO. Prieš titravimą atlikta fermentų dializė reakcijos buferiniame tirpale. Matavimai pakartoti 2–3 kartus. Termodinaminiai parametrai nustatyti prie eksperimentinių duomenų derinant vienos jungimosi vietos modelį (Lyg. 9).

2.3.1.1.2. CAII jungimosi su EZA priklausomybės nuo pH tyrimas. CAII jungimasis su EZA tirtas Pi ir Tris buferiniuose tirpaluose, pH 5,5–9,5 intervale, 25 °C. Skirtingų pH verčių tirpalai paruošti tarpusavyje maišant NaH₂PO₄ su Na₂HPO₄, Na₂HPO₄ su Na₃PO₄, ir TrisHCl su Tris baze. Tirpalų pH pamatuoti po titravimo eksperimento. Celė buvo užpildyta 5–20 µM CAII, o švirkštas – 50–200 µM EZA. Reakcijos buferinis tirpalas - 50 mM Pi arba Tris, 100 mM NaCl ir 2% DMSO. Prieš titravimus atlikta CAII dializė 2 mM Pi (pH 7,0), 10 mM NaCl tirpale. Matavimai buvo daryti vieną kartą, tačiau įvertintos duomenų apdorojimo paklaidos. Buvo atlikta 17 matavimų, kurių rezultatai atitinka matematinį modelį, todėl matavimų kartojimas nebuvo būtinas. Termodinaminiai parametrai apskaičiuoti prie eksperimentinių duomenų vienos jungimosi vietos modelį (Lyg. 9).

2.3.1.1.3. Slopiklių deprotonizacijos entalpijos nustatymas. Kalorimetro celė buvo užpildyta 250 μ M slopiklio, sumaišyto su 1,5 ekvivalento NaOH tirpalu, o švirkštas užpildytas 2,5 mM HNO₃. Švirkšto ir celės tirpaluose buvo po 2% DMSO. Atliktos 56 injekcijos kas 200 s. Matavimai pakartoti 3 kartus. Slopiklio protonizacijos entalpija nustatyta taikant dviejų jungimosi vietų modelį (Lyg. 10).

2.3.2. Terminio poslinkio metodas

Termino poslinkio metodu (TSA, angl. *thermal shift assay*) netiesiogiai matuojamas makromolekulės terminis stabilumas. Terminio poslinkio metodais galima vadinti visus metodus, kuriuose temperatūros pokytis sukelia šviesos sugerties, fluorescensijos ar cirkuliacinio dichroizmo signalus (Pantoliano et al., 2001). Šiame darbe buvo naudotas fluorescentinis TSA metodas, sukurtas 1998–2001 m. "3-Dimensional Pharmaceuticals" kompanijoje (dabar "Janssen Pharmaceuticals, Inc.") ir pavadintas ThermoFluorTM. ThermoFluorTM išvystytas kaip greitas, "miniatiūrizuotas", universaliai pritaikomas 384-šulinėlių mikroplokštelės formato terminio poslinkio metodas (Pantoliano et al., 2001). ThermoFluorTM gali būti atliekamas ne tik naudojant plokštelių skaitytuvus, bet ir realaus laiko PGR termociklerius. Metodas kasmet vis plačiau naudojamas daugelyje farmacijos kompanijų ir mokslinėse laboratorijose visame pasaulyje.

Baltymų stabilumo tyrimai ypatingai svarbūs optimizuojant kristalinimo, gryninimo ir saugojimo sąlygas. Kitas svarbus panaudojimas – dviejų molekulių jungimosi konstantos K_b nustatymas, kadangi terminis poslinkis tarp laisvos ir prisijungusios molekulės yra proporcin-

gas jungimosi stiprumui. Baltymų–ligandų sąveikos tyrimuose pagrindinis TSA privalumas, kaip ir ITC yra tas, kad metodas yra nepriklausomas nuo biomolekulės–taikinio (Garbett and Chaires, 2012). TSA metodu galima tirti įvairias makromolekules, neturint apie jas jokios išankstinės informacijos. Šis privalumas ypatingai aktualus atliekant junginių bibliotekų patikrinimą (angl. *screening*) prieš makromolekules-taikinius.

Tyrimuose dažniausiai naudojami fluorescentiniai dažai - Sypro oranžinis (King et al., 2011; Layton and Hellinga, 2011) arba 1,8-anilino naftaleno sulfonatas (ANS) (Matulis et al., 1999; Matulis and Lovrien, 1998). Taip pat baltymo stabilumą galima įvertinti pagal triptofano indolo grupės fluorescenciją kintant temperatūrai, nenaudojant išorinių žymių. Fluoroforo fluorescencijos pokyčiai kylant temperatūrai atspindi baltymo denatūracijos profilį (6 pav.) Šiame darbe eksperimentai atlikti su ANS dažu, kadangi jo efektyvumas didžiausias. ANS yra stiprus anijonas, kurio sulfoninė grupė sudaro joninius ryšius su tirpių baltymų katijoninėmis grupėmis. ANS-baltymo sąveikos stiprumas priklauso nuo baltymo katijoninio krūvio ir tirpalo pH (Matulis and Lovrien, 1998). ANS molekulė nefluorescuoja vandeninėje fazėje, tačiau stipriai fluorescuoja hidrofobinėje aplinkoje, pavyzdžiui organiniuose tirpikliuose ar baltymo hidrofobinėse kišenėje. Atlikus ANS jungimosi su jaučio serumo albuminu tyrimus nustatyta, kad kai tirpalo pH yra 4,0 iš 100 prisijungusių ANS molekulių fluorescuoja tik 5, esančios baltymo hibrofobinėje srityje, o kitos 95, esančios baltymo išorėje, nefluorescuoja (Matulis et al., 1999).



6 pav. Terminio poslinkio metodo principinė schema. Modifikuota pagal (Pantoliano et al., 2001).

Baltymo denatūracijos kreivės vidurio taškas yra baltymo lydymosi temperatūra T_m (6 pav.). Ji nustatoma prie eksperimentinių duomenų mažiausių kvadratų metodu derinant modelį:

$$y = y_{N,T_m} + m_N(T - T_m) + \frac{y_{U,T_m} - y_{N,T_m} + (m_U - m_N)(T - T_m)}{1 + e^{\frac{\Delta_U H_{T_m} \Delta_U C_p(T - T_m) - T\left(\Delta_U S_{T_m} + \Delta_U C_p\left(\ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right)\right)}{RT}}}$$
(12)

Čia y - fluorescencija, y_{N,T_m} - natyvaus (angl. *native*) baltymo mažiausia fluorescencija, y_{U,T_m} - išsivyniojusio (angl. *unfolded*) baltymo didžiausia fluorescencija, m_N ir m_U - natyvaus ir išsivyniojusio baltymo fluorescencijos pokrypio kampai, T_m - baltymo lydymosi temperatūra, $\Delta_U H$, $\Delta_U S$, $\Delta_U C_p$ - baltymo išsivyniojimo (angl. *unfolding*) entalpija, entropija ir šiluminė talpa. Lygties išvedimas aprašomas (Matulis, 2008) šaltinyje.

Slopikliui prisijungus prie baltymo padidėja lydymosi temperatūra T_m . Kuo didesnė slopiklio koncentracija L_t , tuo didesnė T_m . Slopiklio jungimosi konstanta K_b nustatoma grafiko x ašyje atidėjus T_m , y ašyje - L_t , ir prie eksperimentinių duomenų priderinus modelį:

$$L_t = \left(1 - e^{\frac{\Delta_U H_{T_r} \Delta_U C_p (T - T_r) - T\left(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \left(\ln\left(\frac{T}{T_r}\right)\right)\right)}{RT}}\right) \times$$

$$\times \left(\frac{P_t}{2} + \frac{1}{e^{\frac{\Delta_U H_{T_r} \Delta_U C_p (T-T_r) - T\left(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \left(\ln\left(\frac{T}{T_r}\right)\right)\right)}{RT}} e^{-\frac{\Delta_b H_{T_0} \Delta_b C_p (T-T_0) - T\left(\Delta_b S_{T_0} + \Delta_b C_p \left(\ln\left(\frac{T}{T_0}\right)\right)\right)}{RT}}\right)}\right)$$
(13)

Čia L_t - bendra (angl. total) slopiklio koncentracija, P_t – bendra (angl. total) baltymo koncentracija, T_r – baltymo lydymosi temperatūra, kai nėra pridėto ligando, T_0 – palyginamoji temperatūra, šiame tyrime – 37 °C, R - universalioji dujų konstanta, $\Delta_b H$, $\Delta_b S$, $\Delta_b C_p$ – baltymo jungimosi (angl. binding) entalpija, entropija ir šiluminė talpa atitinkamai. Lygties išvedimas aprašomas (Matulis, 2008) šaltinyje. Jungimosi konstanta K_b gali būti perskaičiuojama į laisvąją Gibso energiją ΔG pagal 1 lygtį arba disociacijos konstantą K_d pagal 2 lygtį.

2.3.2.1. Eksperimentinės sąlygos. Terminio poslinkio eksperimentams naudota realaus laiko PGR sistema "Corbett Rotor-Gene 6000" (sužadinimas - 365 nm, detekcija - 460 nm). Mėginių tirpalus sudarė 5 μ M CA, 0–200 μ M slopiklio (12 skirtingų koncentracijų, serijinis skiedimas - 1,5 karto), 50 μ M ANS, 50 mM Pi (pH 7,0), 100 mM NaCl ir 2% DMSO. Bendras tirpalo tūris - 20 μ l. Mėginiai buvo kaitinami 1°C/min greičiu keliant temperatūrą nuo 25 °C iki 99 °C. Matavimai pakartoti 2–3 kartus.

2.3.3. Sustabdytos srovės CO_2 hidratacijos metodas

Karboanhidrazėms katalizuojant CO_2 hidratacijos reakciją tirpale generuojasi H⁺ jonai ir mažėja tirpalo pH. Esant neutraliam pH, H_2CO_3 skyla į ekvivalentiškus H⁺ ir HCO_3^- kiekius. Dėl šios priežastes reakcijos metu matuojant pH pokytį galima apskaičiuoti, kiek produkto (HCO_{3}^{-}) fermentas pagamino. Kadangi karboanhidrazės yra vieni efektyviausių biologinių katalizatorių ($k_{kat} = 10^6 \text{ s}^{-1}$), reakcijos greičiui matuoti reikalinga speciali įranga, leidžianti fiksuoti kelių sekundžių trukmės reakcijas.

Šiame tyrime buvo naudota sustabdytos srovės įranga (angl. stopped-flow). Eksperimento metu labai greitai sumaišomi A ir B tirpalai. A tirpalą sudarė karboanhidrazė, buferinis tirpalas ir indikatorius, o B tirpalą – CO_2 dujomis prisotintas dejonizuotas vanduo. A ir B tirpalų mišinyje matuojama indikatoriaus šviesos sugerties priklausomybė nuo laiko. Bėgant laikui H₂CO₃ rūgštis mažina tirpalo pH, todėl indikatoriaus šviesos sugertis mažėja iki pastovios vertės. Pagal indikatoriaus šviesos sugerties pokytį per laiko vienetą apskaičiuojami karboanhidrazės kinetiniai parametrai. Tiriant savaiminę CO_2 hidratacijos reakciją į A tirpalą nededama karboanhidrazės. Nustatant junginių slopiklinį efektą į tirpalą A dedamos skirtingos slopiklio koncentracijos. Slopiklis mažina katalizės greitį, kol jis susilygina su CO_2 savaiminės hidratacijos reakcijos greičiu.

Katalizuojamos reakcijos greitis yra lygus susidariusių protonų [H⁺] kiekiui per laiko vienetą:

$$d[H^+] = \frac{d[H^+]}{dt}$$
(14)

Protonų H^+ kiekis apskaičiuojamas pagal Dr. D. Matulio išvestą lygtį:

$$[\mathrm{H}^{+}] = [\mathrm{buf}] \left(1 - \frac{1}{10^{\mathrm{lg}\left(\left(\frac{k}{k-A} - 1\right) + pK_{a-ind.} - pK_{a-buf.}\right) + 1}} \right)$$
(15)

Čia [buf] - buferinio tirpalo koncentracija, $pK_{a-ind.}$ ir $pK_{a-buf.}$ - indikatoriaus ir buferinio tirpalo druskos pK_a , A - optinis tankis (angl. *absorbance*), k - indikatoriaus koncentracijos pataisos koeficientas, kuris yra lygus pradinio optinio tankio A ir deprotonizuotos indikatoriaus formos santykiui:

$$k = \frac{A}{1 - \frac{1}{10^{(pH-pK_{a-ind.})} + 1}} \tag{16}$$

Didžiausias greitis prilyginamas 100 % CA aktyvumui. Didinant slopiklio koncentraciją, CA aktyvumas mažėja. Slopiklio koncentracija, kuri sumažina CA aktyvumą 50 %, kitaip IC_{50} , nustatoma prie eksperimentinių duomenų mažiausių kvadratų metodu derinant dozavimo kreivę:

CA aktyvumas,
$$\% = 1 - \frac{100}{1 + (\frac{IC_{50}}{|I|})^h}$$
 (17)

Čia [I] - slopiklio koncentracija, h - Hilo koeficientas, apibūdinantis dozavimo kreivės pokrypio kampą. Hilo koeficientas yra susijęs su stechiometrija, todėl kai vyksta 1 : 1 jungimasis Hilo koeficientas turėtų būti 1.

Sulfonamidai yra konkurentiniai karboanhidrazių slopikliai, todėl inhibicijos konstantai K_i apskaičiuoti naudojama Cheng-Prusoff lygtis (Cheng and Prusoff, 1973):

$$K_{i} = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[CO_{2}]}{K_{M}}}$$
(18)

Čia $[\mathrm{CO}_2]-\mathrm{CO}_2$ koncentracija, K_M - Michaelis-Menten konstanta.

2.3.3.1. Eksperimentinės sąlygos. Karboanhidrazių hidratacinis aktyvumas buvo matuotas naudojant Applied Photophysics SX.18MV-R sustabdytos srovės spektrofotometrą 25 °C temperatūroje. Reakcijos buferinį tirpalą sudarė 10 mM Hepes (pH 7,4), 10 mM NaCl ir 40 µM indikatoriaus bromtimolio mėlynojo. Prisotintas CO₂ tirpalas buvo paruoštas 1 val. leidžiant dujas į milli-Q vandenį 25 °C temperatūroje. Šioje temperatūroje CO₂ tirpumas yra 34 mM. CA koncentracija buvo 5–400 nM, priklausomai nuo CA aktyvumo. Slopiklių koncentracijos buvo 0.01–10000 nM, priklausomai nuo giminingumo karboanhidrazei. DMSO kiekis tirpale buvo mažesnis nei 0.04%, todėl CA aktyvumui neturėjo įtakos. Matavimai pakartoti 2 kartus.

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo tirti p-pakeisti-benzensulfonamidai ir p-pakeisti-2,3,5,6-tetrafluorbenzensulfonamidai. Jų cheminės struktūros pateiktos 7 paveiksle. Junginiai tarpusavyje skiriasi [2-hidroksietil]tio, propiltio arba [2-feniletil]tio pakaitu para- padėtyje.



7 pav. Darbe tirtų junginių cheminės struktūros.

Slopiklių jungimasis su karoanhidrazėmis buvo ištirtas biofizikiniais metodais, o slopiklinis efektyvumas – fermentiniu metodu. Šiame darbe didžiausias dėmesys skiriamas termodinaminiams tyrimams, o fermentinis metodas buvo naudojamas siekiant įsitikinti, kad naudojamos karboanhidrazės yra aktyvios ir tiriami junginiai slopina jų aktyvumą.

3.1. Aktyvumo ir slopinimo tyrimai

Sustabdytos srovės CO_2 hidratacijos metodu (SFA) buvo išmatuotos CAI, II, VII, XII ir XIII reakcijos greičių priklausomybės nuo skirtingų fermento ir slopiklių koncentracijų. Taip pat tirta savaiminė CO_2 hidratacijos reakcija. Nustatyta, jog tiesioginės CO_2 hidratacijos reakcijos greičio konstanta $k_{CO_2} = 0,038 \ (\pm 0,005) \ s^{-1}$, o karboanhidrazės šią reakciją pagreitina apie 10⁶ kartų. Greičio konstantos vertė sutapo su literatūros duomenimis – k_{CO_2} = 0,037 (±0,002) s⁻¹ (Khalifah, 1971). Karboanhidrazės katalizuojamos reakcijos greitis tiesiškai priklauso nuo fermento koncentracijos (8 pav.).



8 pav. Reakcijos greičio priklausomybė nuo CAXII koncentracijos. Paveiksle a pateiktos pirminės kreivės, o b – apdoroti duomenys.

Tyrimo metu buvo apskaičiuotos karboanhidrazių izoformų katalizinės konstantos k_{cat} ir palygintos tarpusavyje bei su literatūros duomenimis (9 pav.). Lyginant su prof. C. Supurano duomenimis, tirtos CA pasižymi apie 10 kartų mažesniu fermentiniu aktyvumu. Viena iš priežasčių – nevienodas reakcijos tirpalo pH. Tyrimai atlikti pradiniame pH 7,4, o literatūroje nurodomas CA aktyvumas optimaliame pH, tačiau jo vertė nepateikta. Kita galima priežastis – ląstelių prigimtis, iš kurių išskirti fermentai. Įprastai žinduolių ląstelėse ekspresuojami fermentai yra aktyvesni, nei ekspresuojami bakterijose. Tyrime naudoti fermentai gauti iš $E. \ coli$, o literatūros šaltinyje fermentų prigimtis nenurodoma. Pagal aktyvumą nuo didžiausio iki mažiausio tirtos CA išsidėsto į tokią pačią eilę, kaip ir nurodyta literatūros šaltinyje – CAII, CAVII, CAXII, CAI ir CAXIII.



9 pav. Karboanhidrazių aktyvumo palyginimas tarpusavyje ir su literatūros duomenimis (Supuran, 2008).

Benzensulfonamidai slopina karboanhidrazių aktyvumą. Kuo didesnė slopiklio koncentracija, tuo reakcijos greitis mažėja, kol susilygina su CO_2 savaiminės reakcijos greičiu ir

fermentas praranda 100% aktyvumo (10 pav.).



10 pav. Karboanhidrazių slopinimo acetazolamidu SFA duomenys. Paveiksle a pavaizduoti CAXII slopinimo pirminiai duomenys, o b - CAII (\blacktriangle), CAVII (\bullet), CAXII (\blacklozenge) dozavimo AZM kreivės.

SFA, kaip ir kituose fermentiniuose metoduose, IC_{50} arba K_i verčių nustatymą riboja fermento aktyvumas ir koncentracija tirpale. Buvo ištirtas CAII slopinimas B1 junginiu esant skirtingoms CAII koncentracijoms ir nustatyta, kad IC_{50} tiesiškai priklauso nuo CAII koncentracijos, $IC_{50} = P_t/2$ (11 pav.). Apie fermento perteklių byloja Hilo koeficiento hvertė. Kai h>1, tirpale baltymo koncentracija yra per didelė, o nustatoma IC_{50} – neteisinga. 11 pav. pateiktame pavyzdyje, kai CAII koncentracija [CAII] = 80 nM, tai h = 2 ir IC_{50} = 40 nM. Taip pat, kai [CAII] = 20 nM, tai h = 1,5 ir $IC_{50} = 10$ nM. Teisingai nustatyta $IC_{50} = 4$ nM, kadangi [CAII] = 5 nM, o h = 1. Teisingos IC_{50} vertės nustatomos tik tada, kai tirpale esančio aktyvaus fermento koncentracija $P_t < IC_{50}$. CAII yra aktyviausia karboanhidrazė (9 pav.), todėl pavyko nustatyti šio slopiklio IC_{50} . Kitų karboanhidrazių sąveikos su stipriais junginiais IC_{50} nustatymą riboja jų mažesnis fermentinis aktyvumas.



11 pav. IC_{50} priklausomybė nuo CAII koncentracijos. Paveiksle a pavaizduotos dozavimo B1 slopikliu kreivės, o b – tiesinė IC_{50} priklausomybė nuo CAII konc.

Karboanhidrazių aktyvumo ir slopinimo tyrimai patvirtino, kad naudojamos karboan-

hidrazės yra aktyvios ir benzensulfonamidai slopina jų aktyvumą. Slopinimo konstantos nustatymą riboja fermento aktyvumas ir koncentracija tirpale.

3.2. Stebimoji termodinamika

Šiame darbe naudojami du terminai termodinamikai apibūdinti – "Stebimoji" (angl. *observed*) ir "Tikrinė" (angl. *intrinsic*). Stebimaisiais parametrais vadinami tie, kurie nustatyti atliktus eksperimentus tam tikrose sąlygose – žinomos sudėties ir pH buferiniame tirpale bei temperatūroje. Tikriniais parametrais vadinami nuo buferinio tirpalo sudėties ir pH nepriklausantys parametrai.

Terminio poslinkio (TSA) ir izoterminio titravimo kalorimetrijos (ITC) metodais buvo išmatuoti A(1-3), B(1-3) ir vaistinių preparatų acetazolamido (AZM) ir etokzolamido (EZA), naudojamų glaukomai gydyti, sąveikos su rekombinantinėmis žmogaus karboanhidrazėmis I, II, VII, XII, XIII stebimieji termodinaminiai parametrai sąlygose, artimose fiziologinėms (50 mM Pi, 100 mM NaCl, pH 7, 37 °C). TSA metodu nustatytos jungimosi konstantos K_b vertės pateiktos 12 paveiksle.



12 pav. A(1-3), B(1-3) ir vaistinių preparatų AZM ir EZA jungimosi su CAI, II, VII, XII, XIII stebimosios jungimosi konstantos K_b (*pH* 7, 37 °C)

Nustatyta, kad fluorinti benzensulfonamidai (B(1-3)) su visomis karboanhidrazėmis jungiasi 10–1000 kartų stipriau, nei nefluorinti slopikliai (A(1-3)), o jungimosi konstantos siekia 10^{10} eilę. Taip pat šie slopikliai su CAI, CAII, CAVII, CAXIII jungiasi stipriau nei acetazolamidas, o su CAI ir CAXIII stipriau nei etokzolamidas. Etokzolamidas yra stipresnis CA slopiklis nei acetazolamidas, nes jungimosi konstanta su visomis CA yra didesnė. B1 ir B2 junginiai yra atrankūs CAI, kadangi jų K_b su CAI yra apie 100 kartų didesnė, nei su kitomis CA. 13a paveiksle pateiktos CAI denatūracijos kreivės, esant skirtingoms B1 junginio koncentracijoms. Laisvo baltymo lydymosi temperatūra $T_m = 58,0$ °C, o prisijungus slopikliui T_m pakyla. Pridėjus 200 µM slopiklio stebimas 13,6 °C terminis poslinkis. 13b paveiksle pavaizduotos A1 ir B1 slopiklių dozavimo kreivės. Didžiausia junginio A1 koncentracija (200 µM) pakelia T_m iki 65,0 °C, o B1 - net iki 72,1 °C. Lydymosi temperatūros nustatymo paklaida yra 0,2 °C. Baltymo terminis poslinkis yra proporcingas jungimosi konstantai K_b . Kuo didesnis terminis poslinkis, tuo didesnė K_b . A1 ir B1 slopiklių jungimosi konstantos skiriasi daugiau nei 1800 kartų.



13 pav. A1 ir B1 slopiklių jungimosi su CAI TSA duomenys. Paveiksle a pavaizduotos CAI–B1 komplekso denatūracijos kreivės, esant skirtingoms slopiklio koncentracijoms - 0 μ M (\blacklozenge), 11 μ M (\blacktriangle), 39 μ M (\blacksquare), 200 μ M (\bullet), o paveiksle b - A1 (\bigstar) ir B1 (\blacklozenge) junginių dozavimo kreivės.

Izoterminio titravimo kalorimetrijos eksperimentiniai duomenys patvirtino TSA rezultatus, kad fluorinti slopikliai jungiasi stipriau, nei nefluorinti. Deja, ITC metodu kokybiškai galima išmatuoti tik tuos K_b dydžius, kurie patenka į Wiseman c-faktoriaus ribas 1 < c < 1000(Lyg. 11). 14 paveiksle pateikti B1 ir A1 slopiklių jungimosi su CAII ITC duomenys. A1 jungimosi su CAII eksperimentai atlikti su "VP-ITC", o B2 - su "ITC200" kalorimetru. A1 junginio atveju c = 23, o B1 - c = 2250. A1 slopiklio jungimosi konstantą galima nustatyti tiksliai, $K_b = 3.4 \times 10^6$, nes c-faktorius patenka į ribas, tačiau B1 junginio c > 1000, todėl žinoma, kad $K_b > 1 \times 10^8$, o tikslios vertės iš šios kreivės nustatyti neįmanoma. Kadangi tiesioginis ITC metodas labai riboja stiprių sąveikų K_b nustatymą, tai tolimesniuose skaičiavimuose buvo naudotos TSA metodu nustatytos K_b vertės.



14 pav. A1 (a) ir B1 (b) slopiklių jungimosi su CAII ITC duomenys. Paveikslo viršuje pateikti pirminiai, o apačioje - integruoti duomenys.

TSA ir ITC metodu nustatytos K_b pakankamai gerai koreliuoja tarpusavyje. 15 paveiksle pavaizduoti nefluorintų benzensulfonamidų, kurių jungimasis silpnesnis, ΔG duomenys, gauti TSA (x ašis) ir ITC (y ašis) metodais. Eksperimentinių taškų determinacijos koeficientas $R^2 = 0.77$. Didžiausias neatitikimas tarp TSA ir ITC duomenų buvo išmatavus A2 ir A3 jungimąsi su CAI. Priežastys, dėl kurių skiriasi rezultatai, nėra žinomos, tačiau įdomu tai, kad šie junginiai yra atrankūs CAI slopikliai.



15 pav. Nefluorintų slopiklių A(1-3) jungimosi su CAI (\blacksquare), CAII (\blacktriangle), CAVII (\bullet), CAXII (\blacklozenge) ir CAXIII(\blacktriangledown) Gibso energijų, išmatuotų TSA ir ITC metodais, palyginimas. Punktyrinė linija žymi 1:1 modelį, o tiesi - eksperimentinių taškų tendencijos liniją, kurios determinacijos koeficientas $R^2 = 0.77$.

Šie stebimieji parametrai nustatyti sąlygose, artimoms fiziologinėms, todėl galima tikėtis, kad žmogaus organizme junginiai su karboanhidrazėmis sąveikaus tokiu pačiu giminingumu. Žinoma, įdomu išsiaiškinti, kodėl vieni slopikliai jungiasi stipriau, nei kiti. Nustatyti giminingumo priežastis padeda tikrinės termodinamikos analizė.

3.3. Tikrinė termodinamika

Labai svarbu atkreipti dėmesį į tai, kad kalorimetrija matuoja tirpale vykstančių procesų suminius termodinaminius parametrus, įskaitant tirpiklio reorganizaciją ir protonizacijos reiškinius (Garbett and Chaires, 2012). Šie procesai privalo būti atskirti nuo bendros jų sumos tam, kad teisingai įvertinti tik slopiklio jungimosi su taikiniu reakciją. Tirpiklio reorganizacija dar kol kas yra mažai suprastas ir ištirtas procesas. Šiame darbe toliau nagrinėjami protonizacijos reiškiniai, kurie turi didelę įtaką stebimiesiems termodinaminiams parametrams. Kaip pavyzdys pateikiami etokzolamido jungimosi su CAII stebimieji termodinaminiai duomenys, gauti izoterminio titravimo kalorimetrijos (ITC) metodu eksperimentus atlikus skirtinguose buferiniuose tirpaluose ir pH.



16 pav. EZA jungimosi su CAII ITC integruotos kreivės, esant skirtingam pH ir buferiniui tirpalui. Taškai žymi eksperimentinius duomenis, o linija – vienos vietos jungimosi modelį (Lyg. 9). Paveiksle a pateikti duomenys, gauti Tris buferiniame tirpale, kai pH 6,0 (\blacktriangle) ir pH 9,4 (\blacksquare), o paveiksle b – pH 8,6 arba pH 9,0, kai buferinis tirpalas - Pi (\blacklozenge) ir Tris (\bullet).

Atlikus eksperimentus Tris buferiniame tirpale, kai pH 6,0 ir 9,4, išmatuotos entalpijos reikšmės skyrėsi 1,8 kartus dėl to, kad skirtinguose pH yra skirtingos reaguojančių medžiagų frakcijos protonizuotoje/deprotonizuotoje formoje (16a pav.). Eksperimentus atlikus tame pačiame ar panašaus pH tirpale, tačiau skirtinguose buferiniuose tirpaluose ΔH skyrėsi 1,6 kartus (16b pav.). Šiuo atveju reakcijos šilumos pokytis priklauso nuo buferinio tirpalo deprotonizacijos entalpijos.

Sulfonamidinis slopiklis jungiasi su karboanhidraze tik būdamas deprotonizuotoje formoje, o CA aktyviajame centre esanti vandens molekulė privalo būti protonizuotoje formoje. Priklausomai nuo molekulės pK_a ir buferinio tirpalo pH šių formų frakcija tirpale keičiasi. Siekiant įvertinti tik CA–slopiklio jungimosi reakcijos tikrinius termodinaminius parametrus, būtina prieš tai nustatyti buferinio tirpalo, slopiklio ir prie CA aktyviajame centre esančio cinko jono prisijungusios vandens molekulės pK_a ir jonizacijos entalpiją $\Delta H_{prot.}$. Buferinių tirpalų parametrai skelbiami žinynuose ir internete. Naujai susintetintų junginių parametrai nustatomi atlikus titravimo rūgštimi/šarmu eksperimentus arba naudojantis kompiuterinėmis skaičiavimų programomis. Karboanhidrazių pK_a ir $\Delta H_{prot.}$ nustatymas sudėtingiausias, nes reikia atlikti CA jungimosi su gerai charakterizuotu slopikliu izoterminio titravimo kalorimetrijos eksperimentus keliuose buferiniuose tirpaluose ir plačiame pH intervale. Slopiklių ir CAII jonizacijos parametrų nustatymas aprašomas sekančiuose skyreliuose.

3.3.1. Slopiklių pK_a ir deprotonizacijos entalpijos nustatymas

Slopiklių protonizacijos parametrams nustatyti naudojami keli būdai. Junginio pK_a vertę galima suskaičiuoti naudojant programas Marvin, Maestro ir kt. arba įvertinti eksperimentiškai atlikus titravimo šarmu/rūgštimi eksperimentus. Šiame tyrime tokie eksperimentai nebuvo atlikti, todėl remtasi darbo konsultantės Dr. A. Zubrienės nustatytais duomenimis: fluorintų junginių $pK_a = 8,1$, o nefluorintų – $pK_a = 9,9$ (25 °C). Junginių protonizacijos entalpijai H_{prot} nustatyti atlikti ITC eksperimentai. Junginys buvo maišomas su 1,5 ekvivalento

natrio šarmo tirpalu, siekiant visiškai deprotonizuoti sulfonamidinę grupę, ir titruojamas azoto rūgštimi. B3 junginio titravimo kreivė pavaizduota 17 paveiksle. Pirmasis perėjimas reiškia natrio šarmo pertekliaus titravimą, o antrasis - junginio titravimą.



17 pav. B3 junginio titravimo rūgštimi ITC duomenys. Paveiksle a pavaizduoti pirminiai duomenys, o b - integruoti duomenys.

Nustatyta, kad 37 °C temperatūroje visų tirtų fluorintų benzensulfonamidų deprotonizacijos entalpija yra vienoda, $H_{prot.} = -26,1 \pm 1,1 \text{ kJ/mol} (6,2 \pm 0,3 \text{ kcal/mol})$. Šios vertės yra panašios, kaip ir klasikinių CA slopiklių, $H_{prot.}$ (AZM) = -18,8 kJ/mol (Baranauskienė and Matulis, 2012), $H_{prot.}$ (EZA) = -27,6 kJ/mol (Matulis et al., 2005). Nefluorintų benzensulfonamidų $H_{prot.}$ nepavyko nustatyti, nes nesimato antrojo perėjimo dėl jų aukštos pK_a vertės ($pK_a = 9,7 (37 \text{ °C})$). Daryta prielaida, kad nefluorintų slopiklių $H_{prot.}$ yra tokia pati, kaip ir fluorintų junginių, nes visi benzensulfonamidai pasižymi panašia deprotonizacijos entalpija.

3.3.2. Karboanhidrazės II aktyviajame centre esančios vandens molekulės pK_a ir protonizacijos entalpijos nustatymas

Prie karboanhidrazės II aktyviajame centre esančio cinko jono prisijungusios vandens molekulės (CAZnH₂O) pK_a ir protonizacijos entalpija $H_{prot.}$ nustatyta atlikus jungimosi su etokzolamidu ITC eksperimentus dviejuose stipriai protonizacijos entalpija besiskiriančiuose buferiniuose tirpaluose – Tris ($\Delta H_{prot.} = 47,5$ kJ/mol, 25 °C (Matulis, 2008)) ir Pi (($\Delta H_{prot.} = 5,1$ kJ/mol, 25 °C (Matulis, 2008)), pH 5–10 intervale. Stebimosios jungimosi entalpijos $\Delta H_{steb.}$ priklausomybė nuo pH pateikta 18 paveiksle.



18 pav. EZA jungimosi su CAII $\Delta H_{steb.}$ priklausomybė nuo buferinio tirpalo sudėties ir pH. Taškai žymi eksperimentinius taškus skirtinguose buferiniuose tirpaluose – Tris (\blacklozenge) ir Pi(\blacktriangledown), linijos žymi matematinį modelį (Lyg. 19), o punktyrinė linija – tikrinę jungimosi entalpiją.

Stebimoji jungimosi entalpija $\Delta H_{steb.}$ yra bent kelių entalpijų suma - tikrinės $\Delta H_{tikr.}$, sulfonamidinio slopiklio deprotonizacijos $\Delta H_{RSO_2NH_2}$, vandens molekulės, prisijungusios prie cinko, protonizacijos ΔH_{CAZnH_2O} ir buferinio tirpalo protonizacijos/deprotonizacijos $\Delta H_{buf.}$:

$$\Delta H_{steb.} = \Delta H_{tikr.} + n_1 \Delta H_{\rm RSO_2NH^-} + n_2 \Delta H_{\rm CAZnH_2O} + (n_1 + n_2) \Delta H_{\rm buf.}$$
(19)

Čia n_1 , n_2 - protonų skaičius, kuris apskaičiuojamas pagal lygtis: $n_1 = 1 - f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-}$, $n_2 = f_{\text{CAZnH}_2\text{O}} + 1$. Slopiklio deprotonizuotos formos ir CA protonizuotos formos frakcija tirpale apskaičiuojama pagal modifikuotą Hendersono ir Haselbacho lygtį:

$$f_{\rm RSO_2NH^-} = \frac{10^{pH-pK_{\rm a-RSO_2NH_2}}}{1+10^{pH-pK_{\rm a-RSO_2NH_2}}}$$
(20)

$$f_{\rm CAZnH_2O} = \frac{10^{pH - pK_{\rm a-CAZnH_2O}}}{1 + 10^{pH - pK_{\rm a-CAZnH_2O}}}$$
(21)

CAII jungimosi su EZA stebimoji jungimosi entalpija $\Delta H_{steb.}$ tame pačiame pH, tačiau skirtinguose (Tris ir Pi) buferiniuose tirpaluose gali skirtis net 40 kJ/mol. Tikrinė jungimosi entalpija $\Delta H_{tikr.}$ gali skirtis net 20 kJ/mol nuo $\Delta H_{steb.}$. Stebimoji entalpija Tris ir Pi buferiniuose tirpaluose sutampa, kai pH 7,5 ir šiame taške $\Delta H_{steb.}$ vertė yra artimiausia $\Delta H_{tikr.}$ vertei. Tikrinė jungimosi entalpija, bei fermento pK_a ir $\Delta H_{prot.}$ nustatoma prie šių eksperimentinių duomenų derinant 19 lygties modelį. Šiame tyrime nustatyta, kad CAII jungimosi su EZA $\Delta H_{tikr.} = -73,0$ kJ/mol $\pm 2,1$ kJ/mol, CAII aktyviajame centre esančios, prie cinko jono prisijungusios vandens molekulės $pK_a = 7,1 \pm 0,2$, $\Delta H_{prot.} = -26,0$ kJ/mol $\pm 2,8$ kJ/mol (25 °C). Jungimoji laisvoji Gibso energija, kaip ir entalpija, taip pat priklauso nuo tirpalo pH, tačiau nepriklauso nuo buferinio tirpalo sudėties. $\Delta G_{steb.}$ priklausomybė nuo pHpateikta 19 paveiksle. Jame pavaizduoti ITC metodu gauti duomenys Pi ir Tris buferiniuose tirpaluose, kai c-faktorius patenka į ribas tarp 1 ir 1000, bei palyginimui parodyti TSA rezultatai, gauti universaliame buferiniame tirpale. TSA matavimus atliko Dr. A. Zubrienė, Dr. L. Baranauskienė ir M. Kišonaitė. Gibso energijos priklausomybę nuo pH apibūdina "U" formos modelis, kurio lygtis:

$$\Delta G_{steb.} = -RT \ln(K_{b-tikr.} f_{\rm RSO_2NH^-} f_{\rm CAZnH_2O}) \tag{22}$$

Stebimoji ΔG didžiausia neutraliame pH, dėl didelių deprotonizuotos EZA ir protonizuotos CAZnH₂O formų frakcijų. Didėjant pH mažėja protonizuotos CAZnH₂O frakcija, o mažėjant pH mažėja deprotonizuotos EZA formos koncentracija, todėl abiem atvejais stebimas silpnesnis jungimasis. ITC metodu nepavyko tiksliai išmatuoti K_b (arba ΔG) pH intervale 6,5–8,5 dėl pernelyg stipraus jungimosi. TSA metodu nėra ribų K_b nustatymui, todėl vertės nustatytos plačiame pH intervale. Tuose pačiuose pH TSA metodu nustatytos ΔG yra šiek tiek didesnės, nei ITC nustatytos. Derinant matematinį modelį (Lyg. 22) prie eksperimentinių duomenų nustatoma fermento pK_a ir jungimosi su slopikliu tikrinė jungimosi laisvoji Gibso energija $\Delta G_{tikr.}$. Šiame tyrime patvirtinta, kad CAZnH₂O $pK_a = 7,1 \pm 0,2$ ir nustatyta, kad $\Delta G_{tikr.} = -58,2$ kJ/mol $\pm 3,2$ kJ/mol. Nei viename pH taške $\Delta G_{steb.}$ nėra lygi $\Delta G_{tikr.}$, o skirtumas tarp šių dydžių yra mažiausiai 7,1 kJ/mol.



19 pav. EZA jungimosi su CAII $\Delta G_{steb.}$ priklausomybė nuo buferinio tirpalo ir pH. Rezultatai gauti TSA (•) ir ITC, dviejuose buferiniuose tirpaluose : Pi($\mathbf{\nabla}$) ir Tris ($\mathbf{\diamond}$), metodais.

CAII–EZA jungimosi tikriniai parametrai buvo palyginti su publikuotais EZA jungimosi su CAXII ir CAXIII duomenimis (1 lent.). EZA jungimosi su CAXII ir CAXIII K_b (arba ΔG) beveik nesiskiria, tačiau junginys stipriau sąveikauja su CAXII, nes entalpinis indėlis yra didesnis. EZA su CAII jungiasi apie 10 kartų stipriau nei su CAXII ir CAXIII. Be to entalpija yra 22,4 kJ/mol ir 30,9 kJ/mol didesnė nei jungimosi su CAXII ir CAXIII atitinkamai ir entropija yra stipriai neigiama. Šie duomenys parodo, kad vaistas yra labiau atrankus CAII, nei CAXII ir CAXIII.

CA	K_b, M^{-1}	$\Delta G, \mathrm{kJ/mol}$	$\Delta H, \mathrm{kJ/mol}$	$T\Delta S, \mathrm{kJ/mol}$
CAI	1.6×10^{10}	-58,2	-73,0	-14,8

-53,5

-52.8

-50,6

-42,1

2,9

10.7

1 lentelė. EZA jungimosi su CAII, CAXII ir CAXIII tikrinių parametrų palyginimas.

 a Vertės paimtos iš (Jogaitė et al., 2013) šaltinio;

 $CAXII^{a}$

 $CAXIII^{b}$

^b Vertės paimtos iš (Baranauskienė and Matulis, 2012) šaltinio;

 $2,3 \times 10^{9}$

 1.8×10^{9}

3.3.3. Tikrinių parametrų skaičiavimai

Karboanhidrazių sąveikos su sulfonamidiniais slopikliais tikrinių termodinaminių parametrų nustatymui nėra būtina atlikti eksperimentus skirtinguose buferiniuose tirpaluose ir plačiame pH intervale. Juos galima apskaičiuoti prieš tai nustačius slopiklių ir baltymų pK_a ir $\Delta H_{prot.}$, ir taikant 19, 22 lygtis. Skaičiavimų pavyzdys grafiškai pavaizduotas 20 paveiksle. Pirmiausia apskaičiuojamas protonų skaičius n_1 ir n_2 pagal tirpalo pH ir slopiklių bei CAZnH₂O pK_a vertes (Lyg. 20, 21). Tuomet nustatoma kiekvienos tirpale vykstančios protonizacijos reakcijos entalpija $\Delta H_{prot.}$ (schemoje $\Delta H_{prot.}$ skaičiavimai parodyti po rodyklėmis). Kalorimetriškai išmatuota stebimoji entalpija yra visų tirpale vykstančių protonizacijos entalpijų suma (Lyg. 19). Tikroji slopiklio jungimosi su fermentu entalpija nustatoma iš tikrinės jungimosi entalpijos atėmus kiekvienos protonizacijos reakcijos entalpijas. Šiuo atveju stebimoji $\Delta H_{steb.} = -36,2$ kJ/mol, o tikrinė $\Delta H_{tikr.} = -45,3$ kJ/mol. Šių entalpijų skirtumas (9,1 kJ/mol) nėra labai didelis, nes B2 ir CAII pK_a vertės yra artimos pH.



20 pav. B2 slopiklio jungimosi su CAII schema (pH 7, 37 °C).

Šiame tyrime eksperimentiškai nustatyti tik CAII ir naujai susintetintų junginių pK_a ir jonizacijos $\Delta H_{prot.}$, tačiau termodinaminė analizė atlikta ir su karboanhidrazių I, VII, XII, XIII izoformomis bei klasikiniais slopikliais. Šių CA ir slopiklių minėtus parametrus anksčiau buvo nustatę kolegos. Parametrų vertės pateikiamos 2 lentelėje.

2 lentelė. Karboanhidrazių aktyviajame centre esančios, prie cinko prisijungusios vandens molekulės $CAZnH_2O$ ir slopiklių sulfonamidinės grupės pK_a ir protonizacijos entalpijos $\Delta H_{prot.}$ vertės 25 °C ir 37 °C temperatūrose. Pajuodintu šriftu pažymėti darbe nustatyti parametrai, o pasvirusiu – apskaičiuoti. Kiti parametrai paimti iš literatūros šaltinių.

CA/slopiklis	$pK_a (25 \ ^{\circ}\mathrm{C})$	pK_a (37 °C)	$\Delta H_{prot.}$ (25 °C)	$\Delta H_{prot.}$ (37 °C)
$\rm CAI\text{-}Zn\text{-}H_2O$	$8,5^{a}$	8,3	-33^{a}	-30,5
$\rm CAII\text{-}Zn\text{-}H_2O$	7,1	6,9	-26	-23,5
$\rm CAVII\text{-}Zn\text{-}H_2O$	$7,1^b$	6,9	-33^{b}	-30,5
$\rm CAXII\text{-}Zn\text{-}H_2O$	$7,0^{c}$	6,8	-28^{c}	-25, 5
$\rm CAXIII\text{-}Zn\text{-}H_2O$	$^{8,3^d}$	8,1	-26^d	-23,5
A(1-3)	$9,9^e$	9,7	—	$-26,\!1$
B(1-3)	$^{8,1^{e}}$	7,9	—	$-26,\!1$
EZA	$^{8,0^d}$	7,8	$-29,5^d$	$-27,\!6^d$
AZM	$7,3^f$	7,1	$-23,0^{f}$	$-18,\!8^f$

^{*a*} Dr. D. Matulio nepublikuoti duomenys;

^b Vertės paimtos iš (Pilipuitytė, 2010) šaltinio;

^c Vertės paimtos iš (Jogaitė et al., 2013) šaltinio;

^d Vertės paimtos iš (Baranauskienė and Matulis, 2012) šaltinio;

 e Dr. A. Zubrienės nepublikuoti duomenys.

^f Vertės paimtos iš (Ladbury and Doyle, 2005) šaltinio;

Karboanhidrazių ir slopiklių protonizacijos parametrai buvo nustatyti 25 °C temperatūroje, o jungimosi tyrimai atlikti fiziologinėje 37 °C temperatūroje. Dėl šios priežasties reikėjo perskaičiuoti parametrus 37 °C temperatūroje. pK_a vertė skirtingose temperatūroje apskaičiuojamos pagal modifikuotą van't Hofo lygtį:

$$pK_{a2} = -\lg(e^{\frac{-H(T_2 - T_1)}{RT^2} + \ln(10^{-pK_{a1}})})$$
(23)

Protonizacijos entalpija $H_{prot.}$ skirtingose temperatūrose apskaičiuojama pagal Kirchhofo dėsnį:

$$H_{prot.2} = H_{prot.1} + C_p(T_2 - T_1) \tag{24}$$

Vandens deprotonizacjos šiluminė talpa $C_p = -206,7$ J/mol (37 °C) (Olofsson and Hepler, 1975). Daryta prielaida, kad prie cinko prisijungusios vandens molekulės C_p yra tokia pati kaip ir laisvos vandens molekulės. Beto C_p labai mažai keičia termodinaminius parametrus,

todėl netiksli jos reikšmė beveik nekeistų duomenų.

Remiantis aprašytais dydžiais buvo apskaičiuoti 4-pakeistų-benzensulfonamidų ir 4-pakeistų-2,3,5,6-tetrafluorobenzensulfonamidų tikriniai jungimosi parametrai. Gauti rezultatai pateikti struktūros–termodinamikos sąryšio žemėlapio (21 pav.) ir termodinaminio optimizavimo kreivės (22 pav.) išraiškose.

Struktūros-termodinamikos sąryšio žemėlapyje matyti tendencija, kad prie hidrofilinį pakaitą para- padėtyje turinčio junginio prijungus fluoro atomus padidėja palanki entalpija su visomis CA (išskyrus CAVII, tačiau jos ΔH pokytis patenka į paklaidų ribas), o prie hidrofobinius pakaitus para- padėtyje turinčių junginių prijungus fluoro atomus CAI, CAXIII atveju palanki entalpija padidėja, o CAII, CAVII, CAXII atveju – sumažėja. Fluoro atomų prijungimas didžiausią įtaką daro CAI, kadangi palanki entalpija išskirtinai padidėja 18,7 kJ/mol (A3 \rightarrow B3), 32,5 kJ/mol (A2 \rightarrow B2) ir net 41,1 kJ/mol (A1 \rightarrow B1). Stipriausiai jungiasi hidrofilinį pakaitą para- padėtyje turintis junginys. Daugeliu atveju laisvoji Gibso energija beveik nekinta, didžiausias skirtumas yra -8,9 kJ/mol.

Stebimieji termodinaminiai parametrai rodo, kad fluorinti slopikliai jungiasi 10–1000 kartų stipriau, nei nefluorinti (12 pav.). Tai būtų 5,9–17,8 kJ/mol skirtumas ΔG atžvilgiu. Remiantis tikriniais parametrais, didžiausias skirtumas buvo 8,9 kJ/mol ($\Delta\Delta G$). Vadinasi K_b skiriasi tik 32 kartus (Lyg. 1). Kadangi 37 °C temperatūroje fluorintų junginių $pK_a =$ 7,9, o nefluorintų – $pK_a = 9,7$ (2 lent.), neutralaus pH tirpale fluorintų slopiklių deprotonizuotos formos frakcija yra žymiai didesnė nei nefluorintų junginių, ir stebimas iki 1000 kartų jungimosi konstantų skirtumas. Tikriniai termodinaminiai parametrai nepriklauso nuo tirpalo pH ir leidžia atpažinti svarbius slopiklio struktūrinius pokyčius, kurie lemia stipresnį jungimąsi.

Termodinaminio optimizavimo kreivė vaizdžiai parodo kiekvieno CA–slopiklio jungimosi entalpijos (ΔH) ir entropijos ($T\Delta S$) indėlį į laisvąją Gibso energija (22 pav.). Ši kreivė aprašyta literatūros apžvalgoje. Rezultatai rodo, kad tirti junginiai silpniausia sąveikauja su CAXII, nes ΔG mažiausia ($\Delta G \approx -50$ kJ/mol) ir susideda iš nedidelio palankios entalpijos ir palankios entropijos indėlio. Junginiai šiek tiek stipriau jungiasi su CAVII (K_d apie 10 kartų mažesnė), nes vyrauja didesnis entropijos indėlis, nei CAXII atveju, tačiau entalpija yra panaši kaip ir CAXII ($\Delta H \approx -30$ kJ/mol). Slopikliai pasižymi didesniu giminingumu CAII ir CAXIII. Nors jų K_d yra tos pačios eilės kaip ir CAVII, tačiau entalpinis indėlis yra palankesnis daugiau nei 10 kJ/mol. Fluorinti slopikliai yra atrankūs CAI, nes jų K_d yra bent 10 kartų mažesnė, nei su kitomis CA, ir siekia 10 pM eilę. B1 slopiklis pasižymi ypatingai dideliu gimingumu ir atrankumu CAI, nes išsiskiria iš kitų ypač palankia entalpija ($\Delta H =$ -86,7 kJ/mol), kuri yra dalinai kompensuojama nepalankios entropijos įnašu ($-T\Delta S = 21,9$ kJ/mol).



21 pav. Struktūros–termodinamikos sąryšio žemėlapis. Prie junginio yra pateikti tikriniai jungimosi parametrai, kJ/mol. Matavimų paklaida iki 5,3 kJ/mol. Virš rodyklių esantys parametrai reiškia "išloštos" (žali) / "pralaimėtos" (raudoni) energijos kiekį, prie slopiklio prijungus fluoro atomus. $\Delta\Delta X$ parodo skirtumą tarp dviejų ΔX dydžių.



22 pav. Slopiklių termodinaminio optimizavimo kreivė.

Dalis mokslininkų yra linkę netikėti biofizikinių metodų duomenimis. Dėl šios priežasties svarbu gautus rezultatus palyginti su fermentinio metodo rezultatais, siekiant patvirtinti biofizikinių metodų patikimumą. Taip pat kelių metodų naudojimas sumažina klaidingo duomenų interpretavimo tikimybę.

3.4. Biofizikinių ir fermentinio metodų duomenų palyginimas

TSA ir ITC metodais nustatytos disociacijos konstantomis K_d buvo palygintos su SFA metodu nustatytomis slopinimo konstantomis $(IC_{50}, K_i)(3 \text{ lent.})$.

3 lentelė. Slopiklių jungimosi su CAII duomenų, gautų SFA, TSA, ITC metodais palyginimas

Slopiklis	K_i , nM (SFA)	IC_{50} , nM (SFA)	K_d , nM (TSA)	K_d , nM (ITC)
A1	$21,2 \pm 5,0$	60 ± 14	125 ± 29	330 ± 45
B1	$1,41 \pm 0,50$	$4,0 \pm 1,4$	$11,1 \pm 3,1$	<12
AZM	$10,6 \pm 1,2$	$30 \pm 3,5$	$41,7\pm2,6$	$52,4 \pm 8.4$
EZA	<0,88	$<\!\!2,\!\!5$	$1{,}43\pm0{,}19$	<12

SFA rezultatai patvirtino, kad fluorinti junginiai su CA jungiasi stipriau nei nefluorinti. Parodyta, kad fluorintas benzensulfonamidas B1 su CAII jungiasi bent 10 kartų stipriau, nei nefluorintas junginys A1. IC_{50} ir K_d vertės skiriasi iki 5,5 kartų. Kadangi CAII atveju $K_i = IC_{50}/2,8$ (Lyg. 16), tai skirtumas tarp K_i ir K_d verčių yra iki 15,4 kartų. Šiuos skirtumus gali lemti temperatūros įtaka, kadangi SFA eksperimentai atlikti 25 °C, o TSA ir ITC – 37 °C temperatūroje. Fermentinio metodo rezultatai patvirtino, kad biofizikiniais metodais nustatomos teisingos giminingumo konstantos.

IŠVADOS

- 1. Tirtas karboanhidrazių izoformas pagal aktyvumą galima išdėstyti tokia aktyvumo mažėjimo tvarka: CAII, CAVII, CAXII, CAI, CAXIII.
- 2. 4-pakeisti-benzensulfonamidai ir 4-pakeisti-2,3,5,6-tetrafluorobenzensulfonamidai slopina karboanhidrazių aktyvumą. Slopinimo konstantos yra nanomolinės eilės, jų nustatymą riboja CA aktyvumas ir koncentracija tirpale.
- 3. Fermentinis metodas patvirtino, kad biofizikiniais metodais nustatomos teisingos giminingumo konstantos.
- 4. Dėl mažesnės pK_a vertės fiziologinėse sąlygose fluorinti benzensulfonamidai jungiasi su karboanhidrazėmis stipriau, nei nefluorinti slopikliai. Taip pat fluorinti slopikliai su karboanhidrazėmis I, II, VII, XIII jungiasi stipriau nei vaistinis preparatas acetazolamidas, o su karboanhidrazėmis I ir XIII stipriau nei vaistas etokzolamidas.
- 5. Nustatyti prie CAII aktyviajame centre esančio cinko jono prisijungusios vandens molekulės bei slopiklių parametrai (pK_a ir jonizacijos entalpija), kurie leidžia apskaičiuoti sąveikos tikrinius termodinaminius parametrus.
- 6. Remiantis tikriniais termodinaminiais parametrais fluorinti benzensulfonamidai yra atrankūs karboanhidrazei I, o vienas iš tirtų slopiklių 2,3,5,6-tetrafluor-4-[(2-hidrok-sietil)tio]benzensulfonamidas pasižymi ypatingai dideliu giminingumu ir atrankumu.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Mokslinės publikacijos, kuriose paskelbta dalis baigiamojo darbo rezultatų:

- Dudutiene, V., Zubriene, A., Smirnov, A., Gylyte, J., Timm, D., Manakova, E., Grazulis, S., Matulis, D. 4-Substituted-2,3,5,6-Tetrafluorobenzenesulfonamides as Inhibitors of Carbonic Anhydrases I, II, VII, XII, and XIII. *Bioorg. Med. Chem.*, 21 (2013) 2093–2106;
- Jogaite, V., Zubriene, A., Michailoviene, V., Gylyte, J., Morkunaite, V., Matulis, D. 2012. Characterization of Human Carbonic Anhydrase XII Stability and Inhibitor Binding. *Bioorg. Med. Chem.*, 21 (2013) 1431–1436;

Kitos mokslinės publikacijos:

- Petrauskas, V., Gylyte, J., Toleikis, Z., Cimmperman, P., Matulis, D. Volume of Hsp90 ligand binding and the unfolding phase diagram as a function of pressure and temperature. *Eur. Biophys. J.*, 42 (2013) 355–362;
- Zubriene, A., Capkauskaite, E., Gylyte, J., Kisonaite, M., Tumkevicius, S., Matulis, D. Benzenesulfonamides with benzimidazole moiety as inhibitors of carbonic anhydrases I, II, VII, XII and XIII. J. Enz. Inhib. Med. Chem. (2013).

Mokslinių pranešimų tezės, kuriose paskelbta dalis baigiamojo darbo rezultatų:

- Bakšytė, S., Timm, D., Zubrienė, A., Gylyte, J., Dudutienė, V., Matulis, D. Thermodynamics of inhibitor binding to difficult to purify recombinant carbonic anhydrases VA and XIV with 4-subtituted-2,3,5,6-tetrafluorobenzenesulfonamides. COST action 0804 meeting. 2013-05-06. Izmiras, Turkija;
- Gylyte, J., Zubriene, A., Matulis, D. Evaluation of linked protonation effects upon inhibitor binding to human carbonic anhydrases. 56th Scientific Conference for Young Students of Physics and Natural Sciences "Open Readings". 2012-03-21, Vilnius, Lietuva;
- Gylyte, J., Zubriene, A., Jogaite, V., Morkunaite, V., Michailoviene V., Matulis D. Protonation linked equilibria and intrinsic binding constants: the thermodynamics of inhibitor binding to carbonic anhydrase. XVII International Society of Biological Calorimetry (ISBC) Conference. 2012-06-03, Leipcigas, Vokietija;
- Jogaite V., Zubriene, A., Morkunaite, V., Kazokaite, J., Gylyte, J., Baranauskiene, L., Michailoviene, V., Matulienė J., Matulis, D. Thermodynamics of inhibitor binding to recombinant human CAXII. *The 9th international conference on carbonic anhydra*ses. 2012-04-11, Antalija, Turkija.

 Jogaite, V., Zubriene, A., Gylyte, J., Michailoviene, V., Matulis, D. Inhibitors binding to Recombinant Human CAXII. *FEBS satellite CA meeting*. 2011-06-22. Montekatinis, Italija.

Kitos mokslinių pranešimų tezės:

- Capkauskaitė, E., Zubriene, A., Baranauskiene, B., Tamulaitiene, G., Manakova, E., Kairys, V., Gražulis, S., Tumkevičius, S., Kišonaitė, M., Gylyte, J., Morkunaite, V., Matulis, D. Design, synthesis, binding, crystallography, and docking of [(2-pyrimidinylthio)acetyl] benzenesulfonamides as inhibitors of human carbonic anhydrases. *Biophysical Society 57th Annual meeting.* 2013-02-02, Filadelfija, Pensilvanija, JAV;
- Gylyte, J., Petrauskas, V., Zubriene, A., Toleikis, Z., Cimmperman, P., Matulis D. Thermodynamic characterization of inhibitor binding to Hsp90. *Meeting of the COST action. Epigenetics: Bench to Bedside.* 2012-11-04, Salernas, Italija;
- Gylyte, J. Volume of HSP90 ligand binding and unfolding phase diagram as function of pressure and temperature. The 8th international student conference "The Coins". 2012-09-14, Vilnius, Lietuva;

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- (2004). Itc data analysis in origin®, tutorial guide, version 7.0.
- Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C. T., and De Simone, G. (2012). Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem Rev*, 112(8):4421–4468.
- Baranauskienė, L., Hilvo, M., Matulienė, J., Golovenko, D., Manakova, E., Dudutienė, V., Michailovienė, V., Torresan, J., Jachno, J., Parkkila, S., Maresca, A., Supuran, C. T., Gražulis, S., and Matulis, D. (2010). Inhibition and binding studies of carbonic anhydrase isozymes i, ii and ix with benzimidazo[1,2-c][1,2,3]thiadiazole-7-sulphonamides. J Enzyme Inhib Med Chem, 25(6):863–870.
- Baranauskienė, L. and Matulis, D. (2012). Intrinsic thermodynamics of ethoxzolamide inhibitor binding to human carbonic anhydrase xiii. *BMC Biophys*, 5(1):12.
- Cheng, Y. and Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (k1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (i50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*, 22(23):3099–3108.
- Cimmperman, P., Baranauskiene, L., Jachimoviciūte, S., Jachno, J., Torresan, J., Michailoviene, V., Matuliene, J., Sereikaite, J., Bumelis, V., and Matulis, D. (2008). A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. *Biophys J*, 95(7):3222–3231.
- Dudutienė, V., Zubrienė, A., Smirnov, A., Gylytė, J., Timm, D., Manakova, E., Gražulis, S., and Matulis, D. (2013). 4-substituted-2,3,5,6-tetrafluorobenzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrases i, ii, vii, xii, and xiii. *Bioorg Med Chem*, 21(7):2093–2106.
- Freire, E. (2008). Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? Drug Discov Today, 13(19-20):869–874.
- Freire, E. (2009). A thermodynamic approach to the affinity optimization of drug candidates. Chem Biol Drug Des, 74(5):468–472.
- Garbett, N. C. and Chaires, J. B. (2012). Thermodynamic studies for drug design and screening. *Expert Opin Drug Discov*, 7(4):299–314.
- Jogaitė, V., Zubrienė, A., Michailovienė, V., Gylytė, J., Morkūnaitė, V., and Matulis, D. (2013). Characterization of human carbonic anhydrase xii stability and inhibitor binding. *Bioorg Med Chem*, 21(6):1431–1436.
- Khalifah, R. G. (1971). The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. i. stopflow kinetic studies on the native human isoenzymes b and c. J Biol Chem, 246(8):2561– 2573.

- King, A. C., Woods, M., Liu, W., Lu, Z., Gill, D., and Krebs, M. R. H. (2011). Highthroughput measurement, correlation analysis, and machine-learning predictions for ph and thermal stabilities of pfizer-generated antibodies. *Protein Sci*, 20(9):1546–1557.
- Krainer, G., Broecker, J., Vargas, C., Fanghänel, J., and Keller, S. (2012). Quantifying highaffinity binding of hydrophobic ligands by isothermal titration calorimetry. *Anal Chem*, 84(24):10715–10722.
- Krishnamurthy, V. M., Kaufman, G. K., Urbach, A. R., Gitlin, I., Gudiksen, K. L., Weibel, D. B., and Whitesides, G. M. (2008). Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein–ligand binding. *Chemical reviews*, 108(3):946.
- Ladbury, J. E. (2004). Application of isothermal titration calorimetry in the biological sciences: things are heating up! *Biotechniques*, 37(6):885–887.
- Ladbury, J. E. and Doyle, M. L. (2005). *Biocalorimetry 2: applications of calorimetry in the biological science*. Wiley.
- Ladbury, J. E., Klebe, G., and Freire, E. (2010). Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. *Nat Rev Drug Discov*, 9(1):23–27.
- Layton, C. J. and Hellinga, H. W. (2011). Quantitation of protein-protein interactions by thermal stability shift analysis. *Protein Sci*, 20(8):1439–1450.
- Mann, T. and Keilin, D. (1940). Sulphanilamide as a specific inhibitor of carbonic anhydrase. *Nature*, 146(3692):164–165.
- Matulis, D. (2008). Baltymų fizikinė chemija. Technologija.
- Matulis, D., Baumann, C. G., Bloomfield, V. A., and Lovrien, R. E. (1999). 1-anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent. *Biopolymers*, 49(6):451–458.
- Matulis, D., Kranz, J. K., Salemme, F. R., and Todd, M. J. (2005). Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using thermofluor. *Biochemistry*, 44(13):5258–5266.
- Matulis, D. and Lovrien, R. (1998). 1-anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. *Biophys J*, 74(1):422–429.
- Ojima, I. and Taguchi, T. (2009). Fluorine in medicinal chemistry and chemical biology. Wiley Online Library.
- Olofsson, G. and Hepler, L. G. (1975). Thermodynamics of ionization of water over wide ranges of temperature and pressure. *Journal of Solution Chemistry*, 4(2):127–143.

- Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B. A., Lane, P., et al. (2001). High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *Journal of biomolecular screening*, 6(6):429–440.
- Petrauskas, V., Gylytė, J., Toleikis, Z., Cimmperman, P., and Matulis, D. (2013). Volume of hsp90 ligand binding and the unfolding phase diagram as a function of pressure and temperature. *European Biophysics Journal*, pages 1–8.
- Pilipuitytė, V. (2010). Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės vii gavimas, jungimosi su slopikliais matavimas bei stabilumo charakterizavimas. *VGTU Baigiamasis magistro* darbas.
- Ruben, A. J., Kiso, Y., and Freire, E. (2006). Overcoming roadblocks in lead optimization: a thermodynamic perspective. *Chem Biol Drug Des*, 67(1):2–4.
- Sūdžius, J., Baranauskienė, L., Golovenko, D., Matulienė, J., Michailovienė, V., Torresan, J., Jachno, J., Sukackaitė, R., Manakova, E., Gražulis, S., Tumkevičius, S., and Matulis, D. (2010). 4-[n-(substituted 4-pyrimidinyl)amino]benzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrase isozymes i, ii, vii, and xiii. *Bioorg Med Chem*, 18(21):7413–7421.
- Smith, H. J. and Simons, C. (2004). Carbonic Anhydrase Its Inhibitors and Activators. CRC Press.
- Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov*, 7(2):168–181.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L.-N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical biochemistry*, 179(1):131–137.
- Zubrienė, A., Capkauskaitė, E., Gylytė, J., Kišonaitė, M., Tumkevičius, S., and Matulis, D. (2013). Benzenesulfonamides with benzimidazole moieties as inhibitors of carbonic anhydrases i, ii, vii, xii and xiii. J Enzyme Inhib Med Chem.

PRIEDAI

Prieduose pateikiamos bakalauro studijų metu išleistos mokslinės publikacijos.