



VILNIAUS UNIVERSITETAS

CHEMIJOS FAKULTETAS

Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra

Biochemijos studijų programos magistrantė

Sandra BAKŠYTĖ

**Karboanhidrazės XIV stabilumas bei slopiklių jungimosi
termodinamika**

Magistro darbas

Darbo vadovas

Prof. Daumantas MATULIS

Vilnius, 2014

Magistro darbas

**Karboanhidrazės XIV stabilumas bei slopiklių jungimosi
termodinamika**

Darbas atliktas Vilniaus Universiteto Biotechnologijos instituto Biotermodynamikos ir
vaistų tyrimų skyriuje

Studentas:

Sandra BAKŠYTĖ

Darbo vadovas:

Prof. Daumantas MATULIS

Vilnius, 2014

TURINYS

ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Karboanhidrazės	9
1.1.1. Karboanhidrazių klasifikacija, izoformos ir susijusios ligos.....	10
1.1.2. α -CA aktyvusis centras ir katalizuojamos reakcijos mechanizmas	14
1.1.3. Karboanhidrazės XIV funkcijos žmogaus audiniuose.....	16
1.1.4. Karboanhidrazės XIV struktūros ir kinetinių parametrų palyginimas su membraninėmis izoformomis (IV, IX, XII)	17
1.2. Biotermodinamika	20
1.2.1. Biofizikinių metodų taikymas vaistų kūrime.....	21
1.2.2. Ligandų-makromolekulių sąveikos giminingumas ir energetika	22
1.3. Rekombinantinių baltymų biosintezės <i>E. coli</i> problemos ir galimi jų sprendimo būdai	24
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	30
2.1. Medžiagos.....	30
2.2. Bakterijos ir plazmidės	31
2.3. Terpės ir tirpalai.....	33
2.4. Kompiuterinės programos	34
2.5. Metodai.....	35
2.5.1. Įterptinė mutagenezė.....	35
2.5.2. Rekombinantinės karboanhidrazės XIV ekspresija, tirpumo tikrinimas, gryninimas ir koncentracijos nustatymas	38
2.5.3. Izoterminė titravimo kalorimetrija.....	42
2.5.4. Fluorescencinis terminio poslinkio metodas	44
2.5.5. Fermentinio aktyvumo tyrimas sustabdytos srovės CO ₂ hidratacijos metodu ...	46
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	48
3.1. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės XIV ekspresijos sąlygų <i>E. coli</i> ląstelėse paieška ir gryninimas.....	48
3.2. Įvairių reagentų ir pH įtakos rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės XIV terminiam stabilumui tyrimas.....	57
3.3. Fermentinio aktyvumo ir slopinimo tyrimai.....	60

3.4. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės XIV aktyviajame centre esančios vandens molekulės pK_a reikšmės nustatymas	63
3.5. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės XIV sąveikos su sulfonamidiniais slopikliais tyrimas.....	66
IŠVADOS	71
SANTRAUKA	72
SUMMARY	73
PADĖKA	74
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	75

SUTRUMPINIMAI

- ΔG – laisvosios Gibso energijos pokytis;
- ΔH – entalpijos pokytis;
- ΔS – entropijos pokytis;
- ANS – 8-anilino-1-naftaleno sulfonatas;
- APS – amonio persulfatas;
- ar. – aminorūgštis;
- AZM – acetazolamidas (N-[5sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamidas);
- BHI – mitybinė terpė (angl. *Brain-Heart Infusion broth*);
- BSA – benzensulfonamidas;
- CA – karboanhidrazė (ang. *Carbonic Anhydrase*);
- CA XIV – žmogaus karboanhidrazės XIV katalizinį domeną atitinkantis rekombinantinis baltymas;
- hCA XIV – žmogaus karboanhidrazė XIV;
- CAZnH₂O – prie karboanhidrazės aktyviajame centre esančio cinko jono prisijungusi vandens molekulė;
- DMSO – dimetilsulfoksidai;
- EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;
- FTPM – fluorescencinis terminio poslinkio metodas;
- HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfoninė rūgštis;
- IC_{50} – slopiklio koncentracija, kuri sumažina fermento aktyvumą 50 %;
- IPTG – izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas;
- ITK – uzoterminio titravimo kalorimetrija;
- k_{kat} – katalizinė konstanta;
- K_b – jungimosi (angl. *binding*) pusiausvyros konstanta;
- K_d – disociacijos (angl. *dissociation*) pusiausvyros konstanta;
- K_i – slopinimo (angl. *inhibition*) pusiausvyros konstanta;
- LB – mitybinė terpė (angl. *Luria Broth*);
- MES – 2-(N-morfolino)etansulfoninė rūgštis;
- PGR – polimerazinė grandininė reakcija;
- Pi natrio fosfato buferinis tirpalas;
- PIPES – piperazino-N,N'-bis(2-etansulfoninė rūgštis);
- PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas;

- NDS – natrio dodecilsulfatas;
- SOC – optimali mitybinė terpė (*angl. Super Optimal broth with Catabolite repression*);
- T_m – baltymo lydymosi temperatūra (*angl. Melting Temperature*);
- TAE – DNR elektroforezės buferinis tirpalas (*angl. Tris–acetate–EDTA*);
- TEMED – tetrametiletilendiaminas;
- TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis;

IVADAS

Biomolekulių sąveikų tyrinėjimas, kaip ir baltymų struktūrų ir funkcijų, jų sąsajų su žmogaus patologijomis nustatymas yra vienos iš svarbiausių šių dienų biochemijos mokslo krypčių. Praktinis šių mokslinių tyrimų pritaikymas – tikslingas ir racionalus farmakologinių taikinių aktyvumą keičiančių vaistinių junginių kūrimas.

Ankstyvuosiuose vaistų kūrimo etapuose biofizikiniai metodai tapo veiksmingu įrankiu tirti biomolekulės-taikinio ir mažamolekulinių junginių sąveikas *in vitro* modelinėse sistemose naudojant rekombinantinius baltymus. Įvairios giminingumo nustatymu pagrįstos technologijos leidžia ne tik atrinkti potencialiausius vaistinių junginių pirmtakus (angl. *lead compound*), bet ir nustatyti tiriamų reakcijų metu vykstančius energetinius pokyčius apibūdinančius termodinaminius parametrus. Racionaliai kuriant pirmtakų analogus šie parametrai suteikia vertingos informacijos, siekiant gauti funkciškai efektyvesnius, biologiniui taikiniui atrankesnius cheminius junginius, pasižyminčius geresnėmis fizikinėmis ir farmakokinetinėmis savybėmis. Tačiau tokių junginių atranka negalima be rekombinantine DNR technologija sukurtų pakankamų kiekių stabilų, tirpių ir fiziologiškai aktyvių modelių baltymų. Jų gamybai plačiausiai naudojamas prokariotinis producentas - *Escherichia coli* ląstelės, ne visais atvejais yra idealiausia sistema eukariotinių baltymų biosintezei. Pakankamai dažnai susiduriama su įvairiomis problemomis, tokiomis kaip baltymų toksiškumas, neefektyvi baltymo sintezė ar jo agregacija susidarant intarpiniams kūneliams.

Metalofermentai karboanhidrazės (CA) yra patvirtinti terapiniai taikiniai – beveik 30 sulfonamidų ar sulfamatų klasei priklausančių vaistinių junginių naudojama su CA aktyvumo ar raiškos pokyčiais susijusioms ligoms gydyti, pavyzdžiui, glaukomai, epilepsijai. Penkiolika (CA I-XIV) struktūriškai panašių, bet skirtingo fermentinio aktyvumo ir ląstelinės lokalizacijos CA izofomų, plačiai pasiskirsčiusios žmogaus audiniuose, katalizuoja fiziologiškai svarbią CO₂ virsmo į hidrokarbonato jonus ir protonus reakciją. Šio darbo objektas yra metaboliškai aktyviuose audiniuose ekspresuojama ir aktyvųjų centrą ląstelės išorėje turinti karboanhidrazė XIV. Kadangi tai vienintelė su tinklainės pigmentinio epitelio apikaline ir bazolateraline membranomis susijusi izoforma, manoma, kad ji yra makulos edemos gydymui naudojamų slopiklių taikinytis. Deja, dauguma slopiklių veikia nespecifiškai visas CA izoformas, todėl atrankių, stipriai sąveikaujančių slopiklių sukūrimas šiai izoformai, galėtų ženkliai pagerinti gydymo efektyvumą.

Darbo tikslas:

Gauti žmogaus karboanhidrazės XIV katalizinį domeną atitinkantį rekombinantinį baltymą, įvertinti jo stabilumą, fermentinį aktyvumą ir jungimasi su sulfonamidiniais ligandais.

Darbo uždaviniai:

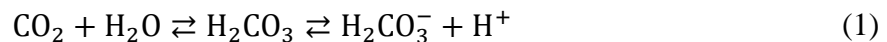
- Surasti optimalias žmogaus karboanhidrazės XIV geno raiškos *Escherichia coli* sąlygas, kad gauti tirpų ir aktyvų baltymą.
- Sustabdytos srovės metodu išmatuoti rekombinantinės CAXIV aktyvumą ir slopinimą ligandais.
- Nustatyti skirtingų buferių, reagentų ir pH įtaką rekombinantinės CA XIV stabilumui terminio poslinkio metodu.
- Išmatuoti rekombinantinės CA XIV jungimąsi su ligandais terminio poslinkio ir titravimo kalorimetrijos metodais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Karboanhidrazės

Rūgščių - šarmų pusiausvyros (pH) homeostazė – būtina sąlyga organizmo metabolizmui ir kitoms fiziologinėms funkcijoms. Ji lemia baltymų struktūrą ir funkcijas, ląstelių membranų pralaidumą ir elektrolitų pasiskirstymą, jungiamųjų audinių funkcionavimą ir nervinių impulsų perdavimą [1,2]. pH homeostazę organizme užtikrina fiziologiniai reguliacijos mechanizmai (inkstai, plaučiai) ir keturios tarpusavyje susijusios buferinės sistemos. Nors bikarbonato buferio pK_a reikšmė žema (~6,1), tai yra pagrindinė organizmo tarpląstelinio skysčio buferinė sistema (Hall, 2011).

Sparčius virsmus tarp bikarbonato buferinės sistemos komponentų (CO_2 ir HCO_3^-) katalizuoja metalofermentai karboanhidrazės (CA, angl. *carbonic anhydrases*, EC 4.2.1.1). Grįžtamos reakcijos metu anglies dioksidas verčiamas į angliarūgštę, kuri disocijuoja susidarant bikarbonato jonui ir protonui:



Katalizė būtina, nes biologiniu požiūriu savaiminė medžiagų apykaitos produkto CO_2 hidratacija 37 °C temperatūroje vyksta per lėtai. Žinduolių CA yra vieni iš efektyviausių ($k_{kat}/K_M \approx 10^8 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ir greičiausių ($k_{kat} \approx 10^6$) žinomų fermentų [3].

Tradiciskai, šie metalofermentai yra laikomi būtiniais rūgščių-šarmų pusiausvyros reguliavimui ir dujų / skysčių / jonų mainams pagrindiniuose fiziologiniuose procesuose: kvėpavimo, virškinimo, kaulų vystymosi, bei inkstų funkcijos palaikyme. Nustatyta, jog CA taip pat svarbios akių, raumenų ir centrinės nervų sistemos funkcijomis, ląstelių prisitaikymui prie streso, įvairių skysčių susidarymui (smegenų, akių skysčiai, seilės), dalyvauja biosintezės reakcijose metaboliškai aktyviuose audiniuose (gliukoneogenezė, lipogenezė, ureagenezė), rūgština terpę aplink hipoksines naviko ląsteles [4,5].

Karboanhidrazių slopinimas turi ilgametį taikymą medicinoje, gydant glaukomą ir kitus akių degeneracinius sutrikimus, epilepsiją, aukštumų ligą ir infekcijas (priešgrybeliniai ir antibakteriniai preparatai), taip pat kuriami potencialūs vaistai nuo nutukimo, osteoporozės, vėžinių susirgimų [3,6–8]. Nustačius žmogaus CA II ir I aktyvumo sumažėjimą senstant, sergant Alzheimeriu ar kitomis ligomis susijusiomis su mokymosi ir atminties sutrikimais [9,10], mokslininkus sudomino šių izoformų aktyvinimas kaip galimas terapijos metodas [11,12]. Nepaisant molekulės su CA sąveikos pobūdžio (slopinimo ar aktyvinimo), ne didelis

giminingumas, o selektyvumo trūkumas tarp žmogaus izoformų vis dar išlieka neišspręsta problema. Siekiant pagerinti gydymo efektyvumą, selektyvesni ligandai kuriami remiantis kristalografiniais tyrimais ir kompiuteriniu modeliavimu, optimizuojant baltymo-ligando sąveikos termodinamiką [13], taip pat pradėti tyrimai nanotechnologijų srityje [14]. Glaukomos gydymui pasitelkta RNR interferencija, kaip potencialus būdas selektyviai slopinti su liga susijusių baltymų, tarp jų CA II, IV, XII, ekspresiją [15].

Dėl erdvinės struktūros paprastumo, gana didelio stabilumo ir sąlyginai nebrangios gamybos, geriausiai ištyrinėtos žinduolių CA I ir II naudojamos kaip modeliniai baltymai tiriant baltymų stabilumą, baltymų-ligandų sąveiką, kuriant ir tobulinant biofizikinius metodus [16]. Būdamos vienas greičiausių katalizatorių, CA pradėtos naudoti ir biotechnologijoje [17,18]: kuriami dirbtiniai plaučiai, biosensoriai su imobilizuotu apofermentu cinko ir kitų metalų nustatymui jūros vandenyje ar nuotekose, naudojamos kaip biokatalizatoriai selektyviai atskirti racematus, ir mažinti CO₂ emisiją [19].

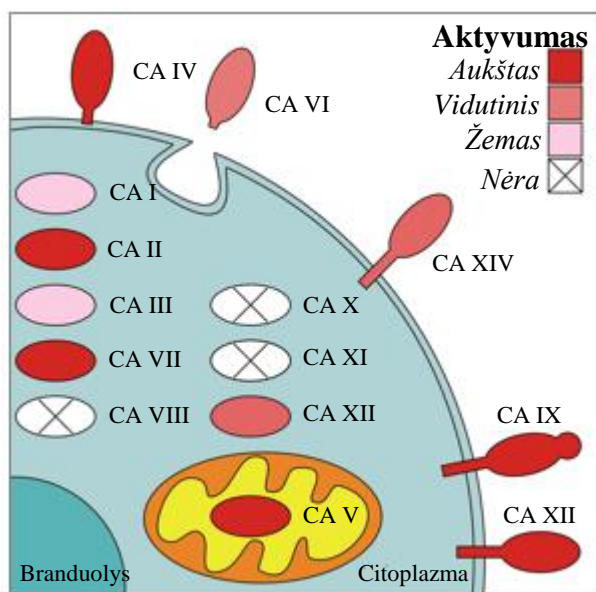
Intensyviai tyrinėjamos jau daugiau kaip 80 metų [20], karbonanhidrazės vis dar išlieka aktualiu biofizikinių, medicininių ir biologinių tyrimų objektu [16].

1.1.1. Karboanhidrazių klasifikacija, izoformos ir susijusios ligos

CO₂, bikarbonatas ir protonai yra būtini daugelyje svarbių fiziologinių procesų visose gyvosios gamtos karalystėse (bakterijose, archėjose, eukariotuose). Evoliuciškai susiformavo penkios atskiros, negiminingos karboanhidrazių genų šeimos (α , β , γ , δ ir ζ) besiskiriančios tarpusavyje aminorūgščių sekomis, erdvinėmis struktūromis (α , β , γ) ir aktyviajame centre koordinuojamu metalo jonu [21]. Visos izoformos iki šiol atrastos žinduoliuose priklauso α šeimai; fotosintezę vykdančiuose augaluose, bestuburiuose randamos β -CA; prokariotuose - α , β , γ šeimų fermentai, tačiau daugiausiai β , γ ; paskutinių identifikuotų δ ir ζ šeimų CA aptinkamos tik jūriniuose titnagdumbliuose. Augaluose CA svarbi CO₂ kaupimui fotosintezei [16]. Fermentinei katalizei esminis kofaktorius - divalentis metalo jonas, daugumoje CA yra cinkas (α , β , δ šeimos), tačiau vietoj jo gali būti geležies, kobalto (γ -CA) ir kadmio (ζ -CA) jonai [21].

Žmogaus organizme rasta net 15 α -CA izoformų. Visoms CA būdingas specifinis ir skirtingas pasiskirstymas audiniuose/organuose, o tai reiškia, kad vienų raiška aptinkama beveik visuose, kitų – tik tam tikruose. Audiniai skiriasi temperatūra, rūgščių-bazių pusiausvyra, medžiagų apykaitos intensyvumu, ir tai, iš dalies paaiškina CA izoformų katalizinio aktyvumo, lokalizacijos ląstelėje, oligomerinės būsenos ir atliekamų funkcijų

tarpusavio skirtumus [4]. Trys CA (VIII, X ir XI) ir receptoriaus tipo baltymas tirozino fosfatazė (RPTP β ir γ) yra kataliziškai neaktyvūs baltymai, nes neturi vieno ar dviejų histidinių koordinuojančių cinko joną aktyviame centre. Šių citozolinių su CA susijusių baltymų (CARP nuo angl. *CA-related proteins*) stipri raiška nustatyta centrinėje nervų sistemoje [22]. Likusias 12 aktyvių CA izoformų galima grupuoti pagal pasiskirstymą ląstelėje: transmembraninės (CA IX, XII, XIV), prikabintos prie membranos per glikozilfosfatidilinozitolį (CA IV), sekretuojamos (CA VI), citozolinės (CA I, II, III, VII, XIII) ir mitochondrinės (CA VA, VB) (1 pav.) [23].



1 pav. Žinduolių CA izoformų domenai, fermentinis aktyvumas ir vieta ląstelėje. Citozolinės ir mitochondrinės CA sudarytos tik iš CA katalizinio domeno, sekretuojama CA turi dar ir trumpą C-galinį domeną. Su membrana susijusios CA, išskyrus CA IV, turi transmembraninį domeną ir trumpą viduląstelinį peptidą. CA IV prikabinta prie membranos per glikozilfosfatidilinozitolio inkarą. CA IX vienintelė turi N-gale proteoglikaninį domeną [24].

CA randamos praktiškai visame žmogaus kūne. Intensyviausia raiška nustatyta raudonosiose kraujo ląstelėse ir pagrindiniuose žmogaus organuose: smegenyse, virškinimo trakte, plaučiuose, inkstuose, kepenyse ir sėklidėse. Kadangi CA dalyvauja daugelyje fiziologinių procesų, kai kurios CA izoformos siejamos su įvairiomis ligomis (Pastorekova, 2006).

Iš 13 aktyvių žinduolių izoformų, net 11 ekspresuojamos nerviniame audinyje [26]. Žmogaus nervų sistemoje CA randamos gyslinio rezginio epitelinėse ląstelėse, glijos ląstelėse (oligodendrocituose, astrocituose), neuronuose ir ant jų kūnelių bei aksonų membranų. Daug įvairių funkcijų priskiriama CA, pavyzdžiui, citoplazminės CA reguliuoja Na, Cl, HCO_3^- jonų ir vandens srautus smegenų glijos ląstelėse ir taip dalyvauja smegenų skysčio susidaryme,

tačiau jų aktyvumo pokyčiai gali sukelti smegenų edemą. CA II ir IV tiekia bikarbonato jonus biosintezės reakcijoms. CA IX ir XII stipresnė raiška nustatyta tik vėžiniuose audiniuose, tokiuose kaip gliomos/ependimomos, meningiomas ir gyslainės rezginio naviko, o CARP baltymai siejami su nervinių ląstelių vystymusi ir gali veikti kaip „protonus gaudančios antenos“ [27]. Svarbiausias CA vaidmuo yra dalyvavimas viduląstelinio ir užląstelinio pH reguliavime, nuo kurių svyravimų priklauso nervinių ląstelių aktyvinimas ar slopinimas, nervinio impulso perdavimas [26,28]. Membraninės CA IV ir XIV sinapsėse neutralizuoja neuronų iškrovos metu sukuriama staigų užląstelinės terpės užšarmėjimą [29,30]. Posinapsiniuose neuronuose padidėjus CA II ar VII aktyvumui susidaro pastovus intensyvus HCO_3^- jonų srautas, kuris iš ląstelės per GABA (γ amino butirinės rūgšties) jonotropinius receptorius plūsta į sinapsinį plyšį ir keičia jonų homeostazę, depoliarizuoja neuronų membraną. Toks staigus ir vietiškas dėl užsitęsusių jonų srautų ar pH pokyčių susidaręs ir išplitęs neuronų sužadinimas siejamas su epilepsijos traukuliais ir migrena. Taip pat, manoma, jog sulfonamidų/sulfamatų grupės vaistų (topiramato, acetazolamido, metazolamido, zonisamido) naudojamų epilepsijai gydyti farmakologinis veikimas yra ne tik per jonų kanalus, bet ir per citozolinių CA slopinimą [7,31]. Naujausiais duomenimis, acetazolamidu slopinant CA galima malšinti skausmą [32].

Citozolinė CA II yra labiausiai paplitusi ir ekspresuojama beveik visuose žmogaus audiniuose. Dėl tokios intensyvios raiškos, tikėtina, jog CA II, kartu su pagrindine eritrocitų CA I, yra neselektyvių vaistinių karboanhidrazių slopiklių taikiniai, kurių slopinimas sukelia nepageidaujamus šalutinius poveikius. CA VB ir CA VA vienintelės iš visų karboanhidrazių ekspresuojamos mitochondrijose, kur dalyvauja biosintezės procesuose (gliukoneogenezėje, ureagenezėje, lipogenezėje). Šios izoformos mokslininkų susidomėjimą patraukė po to, kai epilepsiją ir bipolinį sutrikimą gydant topiramatu, pastebėtas pacientų svorio kritimas. Manoma, jog toks netikėtas pašalinis poveikis susijęs su CA V slopinimu, dėl kurio netiesiogiai stabdomas riebalų rūgščių susidarymas [6].

Susijusių su membrana CA izoformų IV, IX, XII ir XIV aktyvusis centras yra ląstelės išorėje, todėl jos svarbiausios užląstelinio pH reguliavime, bet skatindamos jonų mainus per membraninius baltymus netiesiogiai gali reguliuoti ir viduląstelinį pH. CA IV randama įvairiuose organuose, pavyzdžiui, kepenyse, inkstuose, virškinimo trakte, raumenyse, akių kapiliaruose. Pagrindinė jos funkcija - pH reguliavimas ir bikarbonato reabsorbcija inkstuose [33]. Akių kapiliaruose ji dalyvauja vandeningo skysčio susidaryme, todėl yra glaukomos vystymąsi stabdančių vaistų taikiny (kartu su CA II ir CA XII) [3]. CA IX retai randama sveikuose žinduolių audiniuose/organuose, išskyrus kai kurias virškinimo trakto dalis, tačiau

intensyvi raiška nustatyta agresyviuose vėžio tipoose: gamtos kaklelio karcinomos, stemplės, inkstų, plaučių, krūties, smegenų. [25]. Šiuose navikuose hipoksijos atsiradimas ar von Hippel Lindau (VHL) geno mutacija lemia CA IX raiškos padidėjimą (iki 150 kartų) per transkripcijos faktorių HIF-1 (angl. *hypoxia inducible factor*) [34]. Hipoksinės vėžio ląstelės paprastai yra agresyvios, greitai formuojančios metastazes, nejautrios radioterapijai ir sunkiai gydomos chemoterapijos pagalba, todėl manoma, kad CA IX slopinimas yra potencialus būdas stabdyti navikų vystymąsi arba sumažinti jų radiorezistentiškumą [35]. Taip pat dėl išskirtinio raiškos pobūdžio CA IX gali būti traktuojama kaip endogeninis hipoksijos ir kai kurių vėžio formų žymuo [36]. Nors CA XII raiškos padidėjimas taip pat nustatytas inkstų ir plaučių vėžinėse ląstelėse, ji plačiai paplitusi ir sveikuose organuose, pavyzdžiui, inkstuose, žarnyne, dauginimosi organuose [25]. Priešingai nei CA IX ir CA XII, ketvirtoji membraninė izoforma XIV dalyvauja užląstelinės terpės pH ir jonų srautų reguliavime metaboliškai aktyviuose ir sveikuose audiniuose. Žinduoliuose didžiausia raiška nustatyta kepenyse, širdyje, skeleto raumenyse, žmogaus ir pelių neuronų membranose, tinklainėje [37–40], graužikų inkstuose [41] ir kauliniame audinyje (osteoklastų membranose) [42]. Tai vienintelė membraninė izoforma ekspresuojama tinklainėje ir dėl to, tikėtina, yra susijusi su geltonosios dėmės paburkimu ir kitais tinklainės pažeidimais [43].

Šiuo metu medicinoje naudojama daugiau nei 30 pirminių sulfonamidų, kurie neselektyviai (priklausomai nuo dozės) slopindami ne tik tiksline, bet ir kitas izoformas, 30-40 % visų pacientų sukelia lengvą šalutinį poveikį: galvos svaigimą ir nuovargį, įvairių kūno vietų dilgčiojimą, dispepsiją, metabolinę acidozę bei trumpalaikę trumparegystę. Kai kuriais atvejais, nepageidaujamą poveikį inkstams galima sumažinti papildomai vartojant bikarbonatą. Lyginant su sisteminiais, lokaliai vartojamų slopiklių (brinzolamido ir dorzolamido) sukiamas šalutinis poveikis ženkliai mažesnis, nes tik nedidelė dalis absorbuojama į sisteminę kraujotaką [7].

Selektyvesni slopikliai galėtų ne tik sušvelninti nepageidaujamas organizmo reakcijas, bet ir pagerintų gydymo efektyvumą. Tačiau jų kūrimą apsunkina tai, jog daugumoje audinių/organų yra bent po kelias izoformas, o visų jų aktyvieji centrai labai konservatyvūs. Tai mokslininkus skatina ieškoti naujų baltymo ir slopiklio sąveikos sričių, izoformų aktyviųjų centrų ir jų periferijos struktūrinių skirtumų, kuriuos būtų galima panaudoti tobulinant esamus slopiklius ar kuriant naujus [6,23].

Membraninių CA izoformų atveju, slopiklių atrankumą viduląstelinė izoformų atžvilgiu gali padidinti ląstelių plazminė membrana. Teigiamai įkrautas chemines grupes prijungus prie klasikinių kliniškai naudojamų slopiklių ar kitų sulfonamidinę grupę turinčių

ligandų, gaunami hidrofilingi membranai nelaidūs junginiai, kurių taikiniai tampa tik aktyvųjų centrą ląstelės išorėje turinčios izoformos [15].

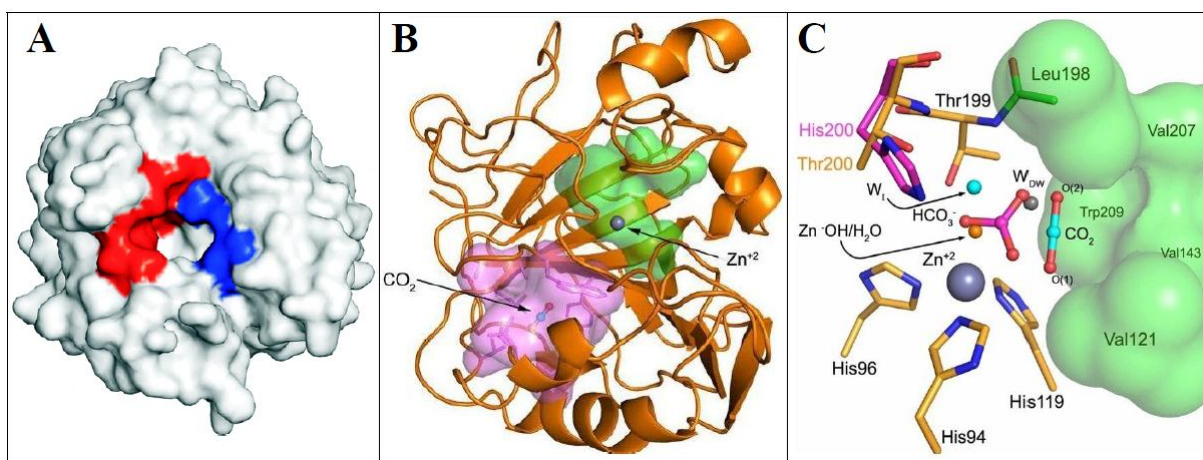
1.1.2. α -CA aktyvusis centras ir katalizuojamos reakcijos mechanizmas

Visos α -CA turi vieną aktyvųjų centrą, kuris yra baltymo paviršiaus kūginės formos įduboje, maždaug 15 Å gylio kišenėje. Įdubos dugne cinko jonas yra koordinuojamas trijų konservatyvių histidinių per jų šoninių grandinių azoto atomus (His94, His96 ir His119) ir kartu su vandens molekule arba hidroksido jonu sudaro tetraedrinį kompleksą. Nors visų CA aktyvieji centrai yra gana konservatyvūs, didesni skirtumai randami aktyvaus centro periferijoje – skiriasi šių vietų poliškumas ir hidrofobiškumas [23]. α -CA struktūrai ir fermentiniam mechanizmui tirti, kaip modelis daugiausiai naudota hCA II, todėl toliau bus naudojama jos aminorūgčių sekos numeracija (nebent nurodyta kitaip).

Aktyviame centre, kaip ir būdinga visiems fermentams, galima išskirti dvi sritis: substratą prijungiančią ir katalizinę. Šių sričių funkcijas atlieka amfifilinio aktyviojo centro ertmės vienoje pusėje esanti hidrofobinė kišenė ir kitoje – hidrofiliškas regionas (2 A pav.). Rentgeno spindulių difrakcijos kristalografiniai duomenys patvirtino, jog ši hidrofobinė kišenė (Val121, Val143, Leu198, Val207, Trp209), o ne Zn^{2+} jonas, silpna Van der Valso sąveika ($K_d \sim 100$ mM) fiksuoja substratą aktyviame centre [44,45]. Molekulinės dinamikos tyrimais nustatyta ir vėliau rentgenostruktūrine kristalografine analize pavirtinta, kad maždaug ~ 11 Å nuo aktyvaus centro yra dar viena substrato (CO_2) surišimo vieta (2 B pav.) [44]. Manoma, kad ji užtikrina greitą CO_2 difuziją aktyviame centre ir lemia kai kurių CA slopiklių selektyvumą [13].

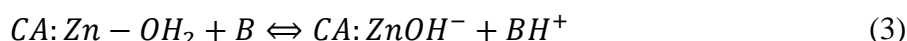
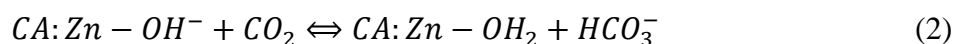
Kitoje pusėje išsidėsčiusios hidrofilingės aminorūgštys (Tyr7, Asn62, Asn67, Thr200) su aktyviojo vandens molekulėmis formuoja vientisą vandenilinių ryšių tinklą, per kurį vyksta greita protono pernaša nuo su cinko jonu susijungusios vandens molekulės link His64, esančios ties įėjimu į aktyvųjų centrą. Konservatyvus His64 daugelyje CA izoformų yra pagrindinė protonų pompos aminorūgštis, kuri manoma, perneša protoną tirpiklui keisdama konformaciją [23] arba imidazolo žiedo tautomerizacijos proceso metu [46]. Taip pat į šį vandenilinių ryšių tinklą, per sąveiką su Trp199 O γ atomu ir dviem aktyvaus centro vandens molekulėmis, įjungiamas prie cinko prisijungęs vanduo ar hidroksido jonas. Tai sustiprina hidroksido jono nukleofiliškumą. Hidrofilingė sritis turi ir kitą funkciją – orientuoja CO_2 . Konservatyvi Thr199 vandeniline jungtimi sąveikauja su CO_2 deguonies atomu, o anglies atomui priartėjus 2.8 Å atstumu iki komplekso $CA:Zn^{2+} - OH^-$ hidroksido jono gali vykti

efektyvi nukleofilinė ataka. Kartu šios dvi skirtingos aktyviojo centro aplinkos užtikrina nuolatinį ir intensyvų CO₂ vertimą į bikarbonatą [23,44].



2 pav. Žmogaus CA II katalizinio domeno struktūra (PDB kodas 3D92). **A** - mėlyna spalva pažymėta aktyviojo centro hidrofobinė kišenė, o raudona – hidrofilinė dalis. **B** - dvi CO₂ surišimo vietos: žalia spalva pavaizduotas aktyvusis centras su sferiniu cinko jonu jame, o violetine spalva - antroji hidrofobinė kišenė su CO₂ molekule. **C** - CA II aktyviojo centro kišenė iš arčiau. Substrato (CO₂) ir produkto (HCO₃⁻) jungimosi vietos aktyviajame centre panašios, tik substratas pasislinkęs arčiau žaliai pavaizduotos hidrofobinės kišenės (Val121, Val143, Leu198, Val207, Trp209), o produktas arčiau hidrofilinės srities [44].

Visos aktyvios karboanhidrazės katalizuoja grįžtamą anglies dioksido hidrataciją per metalo hidroksidą (CA:Zn²⁺ – OH⁻), dviejų stadijų nukleofilinės reakcijos (dar vadinamos „ping-pong“) mechanizmu. Metalo jonas sumažina prisijungusios vandens molekulės pK_a iki ~7, todėl neutralioje terpėje ji jonizuojasi ir susidaro aktyvi fermento forma. Vykstant hidratacijai, pirmosios stadijos metu hidroksido grupė atakuoja CO₂ molekulę susidarant HCO₃⁻ (2 C pav.). Kadangi bikarbonato anijonas sąveikauja su cinku silpnai, jis greitai pakeičiamas vandens molekule, susidarant neaktyviai rūgštinei baltymo formai (2). Antrosios stadijos metu, nuo CA:Zn – OH₂ atskilęs protonas (H⁺) vandenilinių ryšių tinklu pašalinamas iš aktyviojo centro ir fermentas vėl tampa aktyvus (CA:Zn – OH⁻), kaip parodyta (3) reakcijoje, kur B yra endogeninis H⁺ akceptorius, kuriuo gali būti aktyviojo centro liekanos arba aktyviojo centro „bendrasis vanduo“ (angl. *bulk water*):



Protono išnešimas iš aktyviojo centro (3) yra visos katalizuojamos reakcijos limituojanti stadija [6]. Kinetiniais tyrimais bei specifine mutageneze patvirtina, jog aktyviausiuose fermentuose His64 yra protonų donoras/akceptorius, kurio pK_a reikšmė ir kitų protonų pompą sudarančių histidinių kiekis aktyviame centre lemia katalizės greitį [47]. Taip pat pastebėta,

jog kinetiniams parametrms įtaką gali turėti prie cinko prisijungusio vandens pK_a , protonų perdavime dalyvaujančių vandens molekulių skaičius ir atstumas tarp protonų donoro ir akceptorius [4]. Dėl vykstančios jonizacijos, fermentų katalizinė konstanta k_{kat} ir efektyvumą apibūdinanti antrojo laipsnio greičio konstanta k_{kat}/K_M (K_M -Michaelio Menten konstanta) priklauso nuo pH. CA aktyviausios aukštame pH 8-9 [48].

CA katalizinis aktyvumas neapsiriboja tik grįžtama CO_2 hidratacija. Nors nėra įrodymų, kad kitos reakcijos turi fiziologinę reikšmę, CA *in vitro* gali katalizuoti arilo grupę turinčių bei alifatinių aldehidų hidrataciją, įvairių esterų hidrolizę. Žmogaus CA I ir CA II katalizuoja 1-fluor-2,4-dinitrobenzeno, sulfonilo chloridų ir cianamido (iki šlapalo) hidrolizę. Galvijų CA II atkiria raceminius N-acetilamino rūgščių mišinius selektyviai hidrolizuojant tik vieną enantiomerą. Remiantis slopiklių tyrimais, abiejų liazinio ir esterazinio aktyvumo centrai sutampa [16].

1.1.3. Karboanhidrazės XIV funkcijos žmogaus audiniuose

CA XIV pirmą kartą buvo identifikuota ir klonuota 1999 metais ir tapo paskutiniu atrastu membraniniu žmogaus karboanhidrazių izofermentu. Pirmiausiai CA XIV identifikuota pelių kepenyse [38] ir tais pačiais metais pasirodė straipsnis apie nustatytą raišką žmogaus audiniuose [37]. Hibridizacijos tyrimais nustatyta, kad *CA14* genas yra žmogaus pirmosios chromosomos ilgajame petyje, 1q21 padėtyje [37].

Tinklainė yra centrinės nervų sistemos audinys, kuris dėl labai intensyvios medžiagų ir deguonies apykaitos [49] yra laikomas vienu iš metaboliškai aktyviausių. Abi CA viduląstelinės ir ekstraląstelinės formos yra ekspresuojamos tinklainėje ir nustatyta, jog jų slopinimas smarkiai paveikia tinklainės pH *in vitro* [50] ir *in vivo* [51]. Tinklainėje citozolinė CA II ekspresuojama oligodendrocituose ir Miulerio ląstelėse, o hCA XIV raiška nustatyta praktiškai visuose tinklainės sluoksniuose: astrocitų, Miulerio ir tinklainės pigmentinio epitelio (TPE) ląstelių plazminėse membranose [43,52]. Iki hCA XIV nustatymo, ilgą laiką ji buvo painiojama su hCA IV. Vėliau išaiškėjo, jog ji ekspresuojama tik tinklainės pigmentinį epitelį dengiančio choriokapiliarinio sluoksnio endotelio ląstelių paviršiuje, bet ne tinklainėje [53]. Šis maistines medžiagas tinklainei tiekiantis sluoksnis yra susijęs su vandeningo skysčio gamyba priekinėje akies kameroje.

Tinklainėje hCA II ir hCA XIV funkciškai ir fiziškai sąveikaudamos su Cl^-/HCO_3^- jonų nešikliais (AE, angl. *anion exchanger*) [54,55] šalina fotoreceptoruose ir neuronuose aerobinio metabolizmo metu generuojamą anglies dvideginį, siekiant palaikyti viduląstelinio

ir užląstelinio pH homeostazę. hCA II tiekia HCO_3^- jonus kitiems AE ir kitiems transportiniams baltymams, o hCA XIV paspartina pernašą padidindama transmembraninį HCO_3^- jonų gradientą. Tiriant pelių tinklaines su inaktyvuotu hCA XIV baltymą koduojančiu genu, nustatytas ryškus elektroretinogramos (ERG) bangos amplitudės sumažėjimas ir tai patvirtina, jog hCA XIV reguliuodama rūgščių - šarmų pusiausvyrą atlieka svarbų vaidmenį formuojant normalų fotoreceptorių atsaką į šviesą [56].

Tokie hCA XIV ir AE metabolonai taip pat nustatyti ir kituose metaboliškai aktyviuose audiniuose: širdies raumenyse [54] ir centrinėje nervų sistemoje [30]. Kitaip nei tinklainėje, smegenyse hCA XIV ekspresuojama ant neuronų kūnelių ir aksonų plazminių membranų, bet ne ant neuroglijos ląstelių. hCA XIV dalyvauja nervinio impulso perdavimą lydinčio pH pokyčių neutralizavime [29,30].

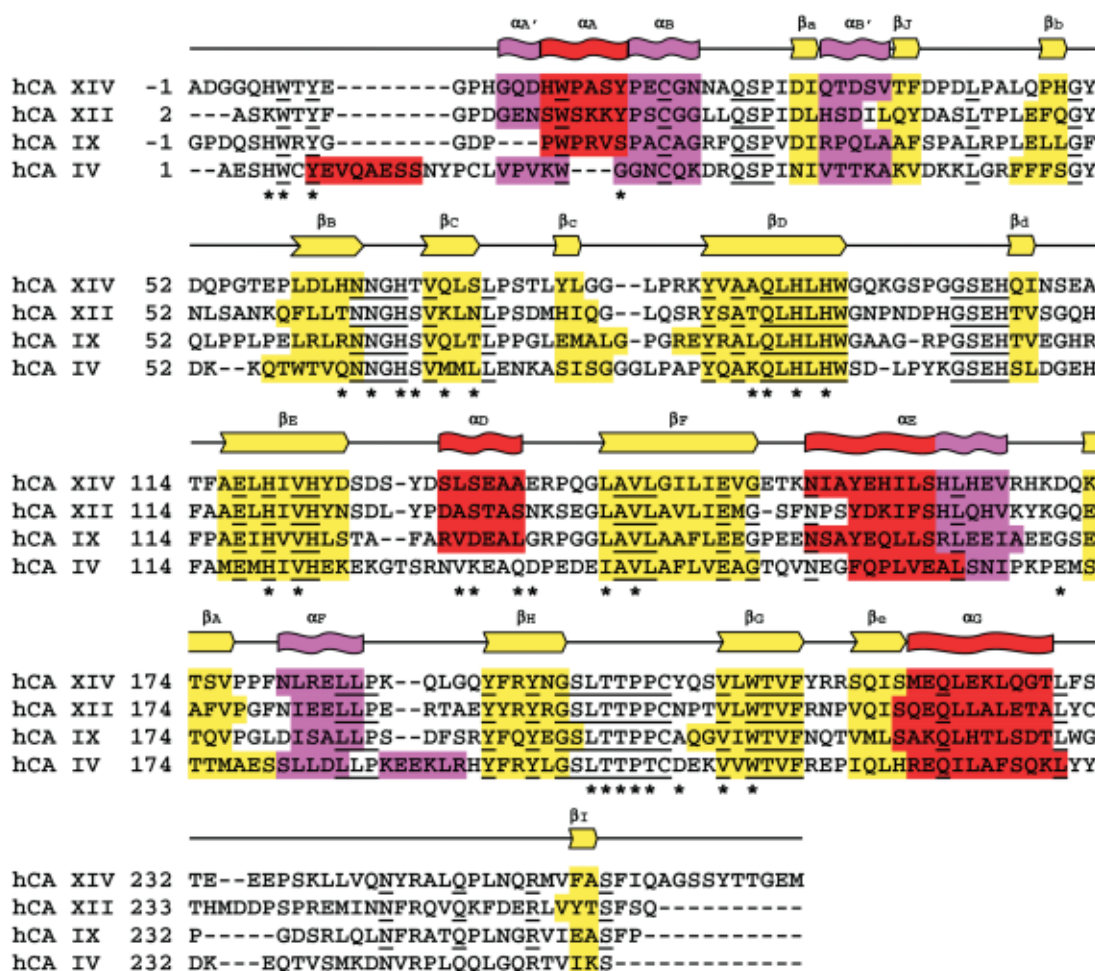
Sisteminiai ir lašiniai sulfonamidai jau daugiau kaip 20 metų naudojami gydyti ne tik glaukomą, bet kaip ir pagalbiniai vaistai gydant makulos edemą [3,57,58]. Makulos (geltonosios dėmės) paburkimas atsiranda sergant įvairiomis akių ligomis, kuomet susikaupia skysčiai tarp tinklainės sluoksnių. Įrodyta, jog CA slopikliai skatina jonų ir vandens transportą per tinklainės pigmentinį epitelį ir didina lipnumą tarp tinklainės sluoksnių [59,60]. Kadangi hCA XIV yra vienintelė su tinklainės pigmentinio epitelio apikaline ir bazolateraline membranomis susijusi karboanhidrazė, manoma, kad ji yra šio tinklainės pažeidimo gydymui naudojamų slopiklių taikinytis [43]. Tai įrodo ir tyrimai, kuriuose, naudojant tiek acetazolamidą, tiek per biologinę membraną beveik nepraeinantį hidrofilinį benzolamidą, nustatyti panašūs pH pokyčiai [59].

1.1.4. Karboanhidrazės XIV struktūros ir kinetinių parametru palyginimas su membraninėmis izoformomis (IV, IX, XII)

CA14 genas koduoja 55 kDa molekulinės masės baltymą sudarytą iš vienos 337 aminorūgščių polipeptidinės grandinės [29,39]. hCA XIV aminorūgščių seka (3 pav.) yra giminingiausia ir struktūriškai panašiausia (4 B pav.) su kitomis membraninėmis izoformomis (hCA XIV/hCA IV = 33 %, hCA XIV/hCA IX = 41 % ir hCA XIV/hCA XII = 44 %). hCA XIV, kaip hCA IX ir XII, yra globulinis integralinis baltymas, sudarytas iš trijų domenų: užląstelinio 275 ar., katalizinio N-galinio domeno su 15 ar. signaline seka, 21 ar. transmembraninės α -spiralinės ir trumpo 26 ar. viduląstelinio peptido. Vienintelė hCA IX turi 59 ar. proteoglikaninį domeną užląstelinio domeno sudėtyje, o hCA IV unikali tuo, jog su

ląstelės membrana susijusi per glikozilfosfatidilinozitolinį inkarą, kuris baltymo brendimo metu prijungiamas vietoje C-galinio viduląstelinio peptido [23,61].

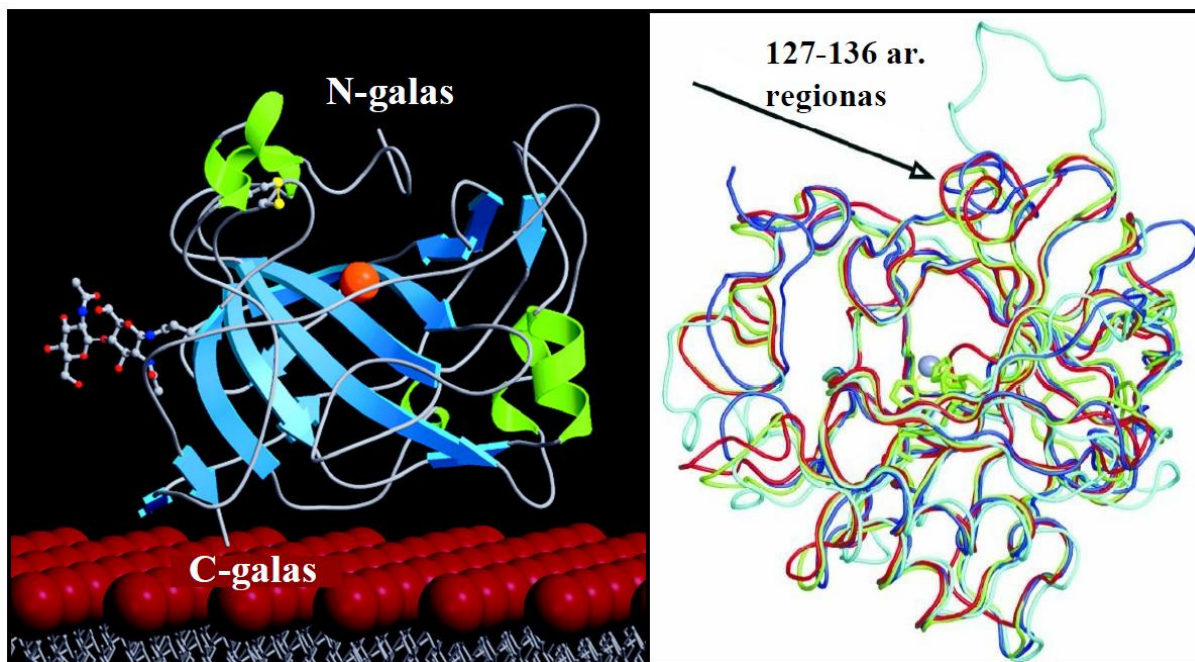
Šiuo metu rentgenostruktūrinės analizės metodu išspręstos žmogaus (PDB kodas 4LU3) [62] ir pelės (PDB kodas 1RJ5) [63] CA XIV katalizinio domeno apo bei komplekso su acetazolamidu (PDB kodas 1RJ6) kristalinės struktūros. Pelių CA XIV pasižymi 78 % homologija su žmogaus izoforma ir taip pat turi visas 36 konservatyvius aktyvaus centro aminorūgštis [62], todėl iki 2013 metų šio baltymo struktūra buvo vienintelis hCA XIV struktūrinis modelis. Visų α -CA kataliziniai domenai labai homologiški: globulinės formos aktyvųjį centrą formuoja centrinis 2 paralelių ir 8 antiparalelių β -klosčių lakštas, apsuptas α -spiralių bei papildomų β -klosčių (4A pav.).



3 pav. Membraninių CA aminorūgščių sekų ir antrinių struktūrų palyginimas. Schematiškai parodyti hCA XIV antrinės struktūros elementai: α ir 3_{10} spirales pavaizduotos atitinkamai raudonomis ir violetinėmis bangomis, o β -klostės – geltonomis rodyklėmis. Kitose izoformose šiuos elementus atitinkančios aminorūgštys paryškintos tokiomis pačiomis spalvomis. Brūkšniais pabrauktos konservatyvios aminorūgštys, o žvaigždutėmis - apribojančios aktyvųjį centrą [62].

Kristalinės struktūros patvirtina, jog hCA XIV yra glikoproteinas, turintis trumpų, šakotų oligosacharidų, kovalentiškai prijungtų prie asparagino (Asn195 - hCA I numeracija)

amino grupės [62,63]. Baltymo struktūrą sutvirtina vienas vidumolekulinis disulfidinis tiltelis tarp Cys23 ir Cys203. Analogiškas disulfidinis ryšys būdingas visoms su membrana susijusioms karboanhidrazėms (IV, IX ir XII) ir sekretuojamai hCA VI, o hCA IV turi ir antrąjį (Cys6-Cys180) [61]. Aktyviajame centre ryšys tarp Cys23 ir Cys203 stabilizuoja polipeptidinę kilpą su Thr-199, kuri, kaip jau buvo minėta, yra svarbi CA katalizei [23].



4 pav. Erdvinė pelių CA XIV katalitinio domeno struktūra (A) ir hCA XIV struktūros palyginimas su kitomis izoformomis (B). **A** - aktyviajame centre esantis cinko jonas pažymėtas oranžinės spalvos rutuliu. Žydra spalva yra pavaizduotas β -lakštas, šviesiai žalia – α -spiralės. Struktūroje pavaizduotas sacharidas ir geltonomis sferomis vaizduojamas disulfidinis tiltelis [63]. **B** - membraninių karboanhidrazių edvinių katalizinių domėnų struktūrų palyginimas: hCA XIV (žalia spalva) [62], hCA IV (1ZNC, žydra) [64], hCA IX (3IAI, mėlyna) [65], ir HCA XII (1JD0, raudona) [66]. Pavaizduotas cinko jonas ir jį koordinuojantys histidiniai.

Ryšciausias struktūrinis skirtumas tarp su membrana susijusių izoformų - oligomerinė būseną. Dvi membranines hCA – IX ir XII – bei sekretuojama hCA VI funkcionuoja kaip skirtingos konformacijos homodimerai. Žmogaus CA XIV transmembraninėje spiralyje taip pat identifikuotas dimerizacijos motyvas GXXXG, tačiau gelfiltracija ir rentgenostruktūrinė analizė nepatvirtino dimerų formavimosi nei tirpale nei kristaluose [62,63].

Baltymų sekų (3 pav.) ir struktūrų (4 B pav.) analizė atskleidė ir daugiau membraninių izoformų skirtumų: hCA IV turi ilgesnę kilpą N-gale, o hCA XII - 232-238 ar. regione. Nepaisant to, šie regionai yra toli nuo aktyviojo centro ir mažai tikėtina, jog gali turėti įtakos slopiklio ir baltymo sąveikai [62]. Svarbesni skirtumai rasti tik aktyviųjų centrų 127-136 ar. srityje, kuri hCA IX, hCA XII ir hCA XIV susisuka į α spiralę ir apriboja aktyviojo centro ertmės viršų, o hCA IV ši sritis keliomis aminorūgštimis ilgesnė, su nepastovia konformacija

ir gali išsidėstyti toliau nuo aktyviojo centro. Be to, net jei karboanhidrazėse IX, XII ir XIV šios spiralės konformacija sutampa, hCA IX ji pasislinkusi link ertmės išorinės dalies. Šie struktūriniai skirtumai atsispindi ir sekoje, nes membraninių izofermentų konservatyvūs aktyvieji centrai skiriasi tik 8 ar. ir 4 iš jų (131, 132, 135 ir 136) išsidėsčiusios būtent šiame regione [65]. Kristalografiniai tyrimai patvirtina, jog kai kurie sulfonamidai sąveikauja būtent su šiuo 127-136 ar. regionu [67]. Alterio ir jo kolegų teigimu, ši sritis gali būti naudinga selektyvių ligandų kūrimui su membrana susijusioms CA.

Visų membraninių CA aktyvieji centrai yra tarpląsteliniame užpilde, kuriam būdingos agresyvesnės, intensyviau kintančios sąlygos: pH svyravimai 6,0-7,8 intervale (smegenys, inkstai, vėžiniai audiniai), didelės druskų koncentracijos (inkstai). Nors dar nėra išsamiai ištyrinėta, tačiau manoma, jog šių CA stabilumas turėtų skirtis nuo viduląstelių hCA (I, II, III, V, VII), o to priežastis gali būti visoms membraninėms hCA būdingi disulfidiniai tilteliai [23]. Pelių CA XIV išsiskiria iš kitų CA izoformų neįprastu fermentinio aktyvumo atsparumu didelėse druskų koncentracijose (iki 1,5 M NaCl). Tai iš dalies paaiškina CA XIV raišką graužikų inkstų proksimalinių kanalėlių membranose [68]. Lyginant kinetinius parametrus nustatytus standartinėmis sąlygomis (25 °C, pH 7,5) (1 lentelė), visoms žmogaus membraninėms CA, išskyrus hCA XII, būdingas aukštas-vidutinis katalizinis aktyvumas ir didelis giminingumas CA slopikliams.

1 lentelė. Membraninių (IV, IX, XII, XIV) ir citozolinių (I, II) CA izoformų kinetiniai parametrai. Vertės iš [69] šaltinio.

Izoforma	Kcat (s-1)	Km(mM)	Kcat/Km (M-1s-1)	Giminingumas slopikliams
hCA I	$2,0 \times 10^5$	4,0	$5,0 \times 10^7$	Vidutinis
hCA II	$1,4 \times 10^6$	9,3	$1,5 \times 10^8$	Didelis
hCA IV	$1,1 \times 10^6$	21,5	$5,1 \times 10^7$	Didelis
hCA IX (CA domenas)	$3,8 \times 10^5$	7,0	$5,4 \times 10^7$	Didelis
hCA IX (CA domenas + PG)	$1,1 \times 10^6$	7,5	$1,5 \times 10^8$	Didelis
hCA XII	$4,2 \times 10^5$	12,0	$3,5 \times 10^7$	Mažas
hCA XIV	$3,1 \times 10^5$	7,9	$3,9 \times 10^7$	Didelis

PG – proteoglikaninis domenas; h – žmogaus.

1.2. Biotermodinamika

Biologinėse sistemose molekulinis atpažinimas vyksta dėl struktūrinio dviejų molekulių atitikimo ir tarp jų susidarančių tarpmolekulinių sąveikos jėgų. Jungimosi reakcijų metu dėl nekovalentinių ryšių persitvarkymo, susidarymo ar iširimo, vykstančius sistemos energetinius

pokyčius apibūdina biotermodinamika. Šių sąveikų supratimas ir galimybė kryptingai jas modeliuoti yra vienas iš pagrindinių šių dienų vaistus kuriančių mokslininkų siekių.

1.2.1. Biofizikinių metodų taikymas vaistų kūrime

Naujo vaistinio preparato sukūrimas ir pateikimas į rinką yra ilgas, sudėtingas ir brangus daugiastadijinis procesas. Tam reikalingi tarpdisciplininiai tyrimai neretai užtrunka iki 15 metų, o jų kaina skaičiuojama dešimtimis milijardų. Daugybė įvairių strategijų ir metodų naudojama taikinio identifikavimui, vaistinių junginių pirmtakų (angl. *lead compound*) atrankai, modeliavimui ir junginio fizikocheminių savybių įvertinimui. Tarp jų yra kompiuterinis modeliavimas, baltymų kristalografija, biologiniai tyrimai *in vivo* ir biofizikiniai tyrimai *in vitro*, farmokokinetinių parametrų skaičiavimai bei junginių pristatymo iki taikinio ir formulavimo technologijos [70].

Ankstyvuosiuose vaistų kūrime etapuose biofizikiniai metodai tapo veiksmingu įrankiu nustatyti, stebėti ir apibūdinti biomolekulės taikinio ir cheminio junginio (ligando) sąveiką naudojant rekombinantinius baltymus. Fluorescentinis terminio poslinkio metodas, branduolių magnetinis rezonansas, izoterminė titravimo kalorimetrija, paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija ir baltymų kristalografija yra pagrindiniai biofizikiniai metodai naudojami vaistinių junginių atrankai ir tyrimams. Išskyrus baltymų kristalografiją, visais jais galima nustatyti sąveikų pusiausvyros konstantas (K_d , K_i) ir taip kiekybiškai įvertinti ligandų jungimąsi, o keletu iš jų, įvertinti ir šiuos molekulinio atpažinimo procesus kontroliuojančius kinetinius ir termodinaminius parametrus, taip pat stochiometriją, jungimosi būdą ir su tiriamą sąveiką susijusius makromolekulės konformacinius pokyčius. Toks visapusiškas jungimosi proceso charakterizavimas, leidžia ne tik identifikuoti potencialiausias molekules iš didelių cheminių junginių bibliotekų, bet ir suteikia žinių apie sąveikos ypatumus, varomųjų jėgų pusiausvyrą ir gali būti naudojama baltymo-ligando komplekso struktūrinėje analizėje (Ciulli, 2013; G. A. Holdgate, 2010).

Pradinis naujų vaistų kūrime etapas grindžiamas taikinio molekulės aktyviajam centrai struktūriškai komplementarių junginių ar mažamolekulinių fragmentų konstravimu ir sudaromų kontaktų modeliavimu, remiantis rentgeno spindulių difrakcija ir magnetiniu branduolių rezonansu nustatytomis erdvinėmis struktūromis. Tačiau vien struktūriniai duomenys, net kartu su pačiais sudėtingiausiais kompiuterinio modeliavimo metodais, negali tiksliai apibūdinti sąveiką nulemiančių jėgų, todėl baltymo-ligando sistemos termodinaminė analizė padeda nustatyti modifikuojamų atskirų cheminių grupių indėlį į junginio

giminingumo ar selektyvumo pokyčius. Taip pat tai naudinga lyginant tarpusavyje vienodu giminingumu (K_d) su makromolekule sąveikaujančius ligandus – potencialesniais tradiciškai laikomi besijungiantys su neigiamės entalpija (ΔH) [73]. Remiantis šiuo principu subalansavus laisvosios Gibso energijos (ΔG) sudedamąsias, galima sumažinti ar išvengti molekulių dydžio ir lipofiliškumo (paprastai siejamų su tradicinėmis molekulių vystymo strategijomis) didėjimo. Taigi pastaruoju metu, dėl technologinės kalorimetrų pažangos ir termodinamiškai optimizuotų geresnių vaistų pavyzdžių [74], vis didėja susidomėjimas biotermodinamikos naudojimu vaistinių molekulių kūrimo ir vystymo etapuose.

Ne tik sąveikos termodinamikos, bet ir jungimosi kinetiniai parametrai, leidžia išsamiau tyrinėti struktūros ir aktyvumo ryšius, turinčius įtakos farmakokinetinėms ir farmakodinaminėms vaistų pirmtakų savybėms, greta tradiciškai nustatomų ADMET (absorbicija, distribucija, metabolizmas, toksiškumas) parametrų. Pavyzdžiui, lėtai besijungiančių ligandų reikės didesnių dozių tam pačiam fiziologiniam poveikiui pasiekti, ir priešingai, lėtai disocijuojantys ligandai dėl ilgesnės veikimo trukmės yra selektyvesni ir saugesni. Paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija šiuo metu yra populiariausias metodas naudojamas jungimosi giminingumu ir kinetiniams parametrams nustatyti. Juo galima ištirti ligandus, kurie dėl jiems būdingų lėtų susijungimo (k_{on}) ar disociacijos (k_{off}) greičių, nevisapusiškai įvertinami fiksuoto laiko giminingumo nustatymo metodais. Tiesiogiai *in vitro* matuojamas baltymo-ligando komplekso gyvavimo laikas yra kaip ligando veiksmingumą *in vivo* apibūdinantis parametras [75].

1.2.2. Ligandų-makromolekulių sąveikos giminingumas ir energetika

Paprasčiausios grįžtamosios nekovalentinės sąveikos tarp baltymo ir ligando jungimosi giminingumą arba K_d galima apibūdinti termodinaminiais ir kinetiniais parametrais:

$$K_d = e^{(\Delta G/RT)} = e^{(\Delta H/RT - \Delta S/R)} = k_{off}/k_{on} \quad (4)$$

kur ΔG - jungimosi laisvosios Gibso energijos pokytis, ΔH – jungimosi entalpijos pokytis, ΔS – jungimosi entropijos pokytis, R – universalioji dujų konstanta, T – temperatūra Kelvinais, o k_{on} ir k_{off} , atitinkamai, susijungimo ir disociacijos greičių konstantos.

Biologinės sistemos nagrinėjimas abiem šiais aspektais, leidžia geriau suprasti molekulinės sąveikas. Tos pačios bimolekulinės reakcijos termodinamika, apibūdina jos pusiausvyrą ir savaiminio vyksmo kryptį, bet nieko nenurodo apie proceso trukmę, tuo tarpu

kinetika – kaip greitai vyks reakcija, bet neteikia jokios informacijos apie reakcijos eigą ir galutinę būseną.

Termodinaminiu požiūriu, bet kurią biomolekulių sąveiką galima charakterizuoti keturiais pagrindiniais parametrais: laisvąja Gibso energija (ΔG), entalpija (ΔH) ir entropija (ΔS) esant tam tikrai temperatūrai bei šiluminės talpos pokyčiu, kuomet entalpija kinta priklausomai nuo temperatūros. Visų biocheminių reakcijų metu tam tikrai būsenai pasiekti sunaudojama arba išskiriama šiluma, kurią kiekybiškai apibūdina entalpijos pokytis. ΔH gali būti tiesiogiai matuojama kalorimetrais arba netiesiogiai įvertinama, eksperimentiškai tiriant jungimosi konstantos K_b priklausomybę nuo temperatūros, kuri aprašoma van't Hoofo lygtimi (ΔH_{VH}):

$$\frac{d \ln K_d}{d T} = \frac{\Delta H_{VH}}{RT^2} \quad (5)$$

ΔH priklausomybė nuo temperatūros esant pastoviam slėgiui (6) apibūdinama šiluminės talpos pokyčiu (ΔC_p) ir nustatoma tik kalorimetrais.

$$\Delta C_p = \frac{d\Delta H}{dT} \quad (6)$$

Nustačius sąveikos pusiausvyros konstantas ($K_b = 1/K_d$), galima apskaičiuoti esminį termodinaminį parametą - ΔG :

$$\Delta G = -RT \ln K_b = RT \ln K_d \sim RT \ln K_i \quad (7)$$

Jo dydis apibūdina sąveikos stiprumą, o ženklas – spontaniškumą. Reakcijos, kurių metu laisvoji Gibso energija mažėja (išsiskiria šiluma) vadinamos egzergoninėmis reakcijomis (ΔG ir $\Delta H < 0$), jos nagrinėjamos sąlygomis vyksta savaime, tuo tarpu, reakcijos, kurių metu laisvoji energija didėja, vadinamos endergoninėmis (ΔG ir $\Delta H > 0$) ir jos vykti savaime negali, nes komplekso vidinė energija yra didesnė nei reaguojančių komponentų atskirai. Jei sistema pusiausvyros būsenos, $\Delta G = 0$. Iš kitos ΔG išraiškos (8) matome, jog jungimosi laisvosios Gibso energijos pokytis yra funkcija dviejų skirtingos prigimties komponentų, todėl įvairios ΔH ir ΔS verčių kombinacijos gali lemti tokį patį jungimosi giminingumą.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

Entropija nurodo kiekį būdų kaip termodinaminė sistema gali būti pertvarkoma ir dažniausiai suprantama kaip sistemos chaotiškumo matas. Teigiamas entropijos pokytis siejamas su tvarkos sistemoje sumažėjimu ir atvirksčiai. Sąveikaujant baltymui ir ligandui toks palankus entropijos pokytis gali atsirasti dėl sąveikaujančių paviršių desolvatacijos, kuomet tirpiklio molekulės išstumiamos iš aktyviojo centro ertmės – tai hidrofobinės sąveikos

varomoji jėga. Priešingas jam yra konformacinis entropijos pokytis, nes susidarantis baltymo – ligando kompleksas yra tvaresnė struktūra, apribojanti tiek ligando, tiek baltymo įgyjamas konformacijas ir turinti mažiau judėjimo laisvės laipsnių.

Molekulių jungimosi entropija taip pat gali būti skirtingo pobūdžio: palankus entalpijos pokytis parodo tarp baltymo ir ligando susidarančių tarpmolekulinių sąveikų, tokių kaip Van der Valso, elektrostatinės sąveikos ar vandenilinis ryšių, stiprumo ar skaičiaus padidėjimą, o nepalankus pokytis atsiranda dėl polinių/įkrautų grupių desolvatacijos susidarant aukščiau minėtoms sąveikoms [76,77].

Dauguma vaistų kūrimo strategijų koncentruojasi ties jungimosi giminingumo didinimu, tačiau vien šis parametras neatspindi jėgų, lemiančių molekulių elgesį ir sąveikos specifiškumą. Neretai vaistų vystymo metu, komplementarumą aktyviojo centro ertmei didinančių struktūrinių pakaitų įvedimas į vaistų pirmtakų struktūras nesukelia ryškių giminingumo pokyčių. Taip nutinka dėl sąveikos metu vykstančius skirtingus procesus apibūdinančių ΔG sudedamųjų, entalpijos ir entropijos, kompensacijos (8). Termodinamine ligandų optimizacija siekiama padidinti ligandų jungimosi giminingumą ir/ar selektyvumą subalansavus kiekvieno iš termodinaminio parametro indėlį, jog jie būtų maksimaliai palankūs. Tam padaryti yra trys alternatyvos: siekiama, kad baltymo-vaisto komplekso energetikoje dominuotų neigiamas ΔH ; teigiamas ΔS ; arba kuo neigiamesnė ΔH ir $-T\Delta S$ kombinacija [73]. Tačiau šie apibendrinimai yra tik supaprastintas sistemos energetikos vaizdas, nes ligando jungimasis yra daugiastadijinis procesas, kurio kiekvieną etapą įvertinti ir pakreipti norima linkme yra vis dar sunkus uždavinys.

1.3. Rekombinantinių baltymų biosintezės *E. coli* problemos ir galimi jų sprendimo būdai

Rekombinantinės DNR technologija gauti baltymai naudojami tiek struktūriniais, funkciniais, biocheminiais baltymų tyrimams, tiek pramoniniams ir biomedicininiais tikslams (pvz.: diagnostika, vakcinos). Tačiau rekombinantinių baltymų sintezei sukurtos įvairios heterologinių genų raiškos sistemos nėra universalios, turi savo trūkumų ir privalumų, todėl reikalingas tinkamų ląstelių auginimo ir biosintezės sąlygų parinkimas individualiai kiekvienam baltymui. Plačiausiai šiuo metu naudojamos raiškos sistemos yra prokariotų ląstelės (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), mielės, augalai, žinduolių ląstelių kultūros ir bakuloviruso sistema vabzdžių ląstelėse. Tinkamiausios raiškos sistemos pasirinkimas priklauso nuo baltymo prigimties (tirpus ar membraninis, oligomerizacinė būseną, dydis,

disulfidiniai tilteliai, potransliacinės modifikacijos ir t.t.), taip pat ir tikslo, kuriam jis bus naudojamas [78,79].

Per pastaruosius 40 metų *E. coli* ląstelės išliko populiariausias ir plačiausiai naudojamas prokariotinės kilmės producentas tiek prokariotinių, tiek eukariotinių baltymų biosintezei. Remiantis bibliografinės duomenų bazės Pubmed statistika net 60 % visų moksliniuose straipsniuose minimų rekombinantinių baltymų ekspresuoti *E. coli* ląstelėse ir 17 % mielėse *Pichia pastoris*. Taigi tai labai patogi baltymų ekspresijos sistema, nes šie mikroorganizmai labai greitai auga pigiose ir nesudėtingose auginimo terpėse, pasiekia didelį ląstelių tankį, o genų transliacija 4-10 kartų greitesnė negu eukariotuose. Taip pat juose gerai ištyrinėti transkripcijos ir transliacijos mechanizmai bei kiti veiksniai, lemiantys heterologinių genų raišką. Nepaisant to, šioje ekspresijos sistemoje pakankamai dažnai susiduriama su problemomis (2 lentelė), tokiomis kaip baltymų toksiškumas, neefektyvi baltymo sintezė, proteolitinė degradacija, susintetinti baltymai netirpūs arba funkciškai neaktyvūs (lentelė) [78,80].

Mokslinėje literatūroje aprašyta daug būdų leidžiančių padidinti tirpaus baltymo išeigą ir pagerinti sintezės efektyvumą *E. coli* ląstelėse [78,81,82] (2 lentelė). Siūloma optimizuoti rekombinantinio baltymo sintezę keičiant arba genetinius veiksnius (vektorių, kamieną, klonuojamo geno ilgį ir t.t.) ir/arba ląstelių auginimo ir baltymo ekspresijos sąlygas (temperatūrą, induktoriaus koncentraciją ir t.t.). Tačiau ne visuomet tai padeda ir, kai kuriais atvejais, sėkminga ir efektyvi biologiškai aktyvių rekombinantinių baltymų gamyba priklauso nuo sunkiau optimizuojamų veiksnių, susijusių su paties baltymo bei jį koduojančio geno savybėmis.

E. coli raiškos sistema yra labai produktyvi ir, atskirais atvejais, rekombinantinio baltymo išeiga gali pasiekti net 50% nuo visų ląstelės baltymų. Tačiau kartais taip nutinka, jog sintetinio baltymo gaunama labai mažai, nors jį koduojantis genas yra ekspresuojamas nuo daugiakopijinės plazmidės su griežtai reguliuojamu, stipriu promotoriumi (pvz. T7lac, fago λ , tetA) ir efektyvia ribosomos susirišimo sritimi (RSS) [83]. Produktyvi genų raiška priklauso nuo transkripcijos dažnumo ir informacinės RNR (iRNR) transliacijos efektyvumo. Daug įvairių veiksnių kiekviename biosintezės etape gali nulemti neintensyvią geno ekspresiją. Tačiau, jei geno seka ir genetinė konstrukcija optimizuota, stabili, o raiškai naudojamas tinkamas kamienas, potencialios mažos ekspresijos priežastys gali būti iRNR nestabilumas, stabilių antrinių struktūrų sudarymas, tripletų naudojimo dažnio skirtumai tarp organizmų ir proteolizės suaktyvėjimą.

2 lentelė. Rekombinantinių baltymų ekspresijos *E. coli* problemos ir galimi jų sprendimo būdai. Sudaryta pagal [83,84].

Požymis	Galima problema	Sprendimo būdai
Nėra kolonijų arba ląstelių žūtis ekspresijos metu	Baltymas toksiškas ląstelei	<ul style="list-style-type: none"> – Lėtinti baltymo sintezę mažinant augimo temperatūrą ir/ar induktoriaus kiekį, naudoti mažakopijinius genų raiškos vektorius; – Sumažinti bazinę ekspresiją naudojant griežtai reguliuojamus promotorius, katabolinę represiją; – Nukreipti sintetinamus baltymus į periplazmą arba auginimo terpę; – Intarpinių kūnelių formavimas;
Disulfidinių tiltelių turintis baltymas netirpus (IK)	Nesusidaro disulfidinės jungtys	<ul style="list-style-type: none"> – Naudoti kamienus su mutuotais reduktazių <i>gor</i> ir <i>trxB</i> genais; – Nukreipti sintetinamus baltymus į periplazmą; – Į producento kamieną įvesti plazmidės su papildomomis foldazių genų kopijomis;
Baltymas netirpus (IK)	Per daug intensyvi sintezė	<ul style="list-style-type: none"> – Sulėtinti baltymo sintezę, keisti auginimo terpę, kamienus; – Į producento kamieną įvesti plazmidės su papildomomis molekulinį šaperonų genų kopijomis; – Sulieti su tirpiaisiais baltymais; – IK renatūracija ir baltymo pervyniojimas <i>in vitro</i>;
Baltymo mažai arba kelios baltymo formos	Proteolizė Kodonų nesuderinamumas Neintensyvi sintezė	<ul style="list-style-type: none"> – Naudoti kamienus su inaktyvuotais proteazių genais – Nukreipti sintetinamą baltymą į periplazmą; – Intarpinių kūnelių formavimas; – Baltymo C ir N galų optimizavimas; – Naudoti kamienus su papildomomis retų tRNR genų kopijomis; – Naudoti daugiakopijinius genų raiškos vektorius su griežtai reguliuojamais promotoriais; – Optimizuoti ląstelių auginimo ir baltymo sintezės sąlygas; – Patikrinti ir/arba keisti geno transliacijos ir transkripcijos procesams svarbias vektoriaus sekas, galimas skaitymo rėmelio poslinkis, mutacijos; – Patikrinti naudojamos plazmidės stabilumą;
Baltymas neaktyvus	Neteisingai susivyniojęs baltymas, gryninimo inkaras ar tirpumą didinantis baltymas gali sumažinti aktyvumą	<ul style="list-style-type: none"> – Jei aktyvumui reikalingos potransliacinės modifikacijos, rinktis kitą organizmą geno raiškai; – Sulėtinti baltymo sintezę; – Nukreipti sintetinamą baltymą į periplazmą; – Pakeisti gryninimo inkarą ar prikabinti mažesnę papildomą baltymą;

Transliacijos iniciacijoje vienintelis kintamasis yra iRNR, kurios seka ir struktūra lemia sąveiką su ribosomomis ir kartu transliacijos efektyvumą, o kiekis – dažnumą. Siekiant apsaugoti iRNR nuo degradacijos rekomenduojama įterpti apsaugines sekas, sumažinti GC nukleotidų kiekį jos galuose arba naudoti kamienus (pvz. Invitrogen BL21, „star“) su mutacijomis endonukleazę RNazę E koduojančiame gene (*rne131*) [79].

Transliacijos efektyvumą taip pat lemia ir aminorūgštis koduojantys tripletai, kurių naudojimo dažnis tarp įvairių organizmų skiriasi. Konstruojant genetines konstrukcijas rekomenduojama atsižvelgti į baltymo pirmąsias 11 aminorūgščių (įskaitant ir iniciacijos metioniną) koduojančius tripletus, t. y. N-galą. Naudojant vienodo stiprumo promotorius ir ribosomos susirišimo sritis nustatyta, kad reti kodonai N-gale lyginant su dažniais padidina transliacijos efektyvumą iki 14 kartų. Reti tripletai, kuriuose dominuoja A ir T nukleotidai, padeda išvengti stabilių antrinių iRNR struktūrų susidarymo šalia RSS ir taip paskatina elongacijos iniciaciją (transliacijos greitį limituojanti stadija) [85]. Tačiau reti kodonai kitose iRNR vietose gali ne tik sumažinti baltymo sintezės greitį, bet ir padidinti transliacijos klaidų tikimybę. Tokių iRNR retus kodonus galima pakeisti dažniau naudojamais mutagenezės būdu (jei jų kiekis nedidelis) arba padidinti retų transportinių RNR (tRNR) viduląstelinę koncentraciją įvedus į ląsteles pagalbines plazmidės su jas koduojančiais genais (pvz., kamienas Rosetta(DE3) arba BL21(DE3)CodonPlus–RIL). [84]. Tai galėtų padėti išspręsti producento ir baltymo kodonų nesuderinamumą ir padidinti baltymo išeigą ar net tirpumą [86].

Dažniausiai įvairios tikslinio rekombinantinio baltymo formos ar mažesnis jo kiekis susidaro dėl suaktyvėjusios proteolitinės degradacijos. Proteazių kiekis gali padidėti ląstelėms patiriant stresą dėl intensyvios rekombinantinių baltymų sintezės (metabolinė perkrova). Siekiant to išvengti reikia vengti baltymo galuose aminorūgščių sekų, kurios mažina baltymų stabilumą ir potencialiai gali tapti ląstelės proteazių taikiniu (pvz., C-gale nepolinių ar. sritis ar N-gale iniciatorinio metionino destabilizuojančios ar.). Šią problemą taip pat galima spręsti privertus tikslinį baltymą formuoti intarpinius kūnelius, nukreipus jį į periplazmą ar auginimo terpę, kur mažiau proteazių, bei naudojant kamienus su mutacijomis proteazės koduojančiuose *Lon* ir *OmpT* genuose (pvz., BL21 ir jo išvestiniai kamienai) [84].

Intensyvios rekombinantinių baltymų sintezės metu ne tik *E. coli* ląstelėse, bet ir *Bacillus sp.*, *Saccharomyces sp.*, vabzdžių ir gyvūnų ląstelių kultūrose, dėl nevisiškai susivyniojusių baltymo formų pasyvios agregacijos, dažnai susiformuoja netirpios ir neaktyvios baltymų struktūros, vadinamos intarpiniais kūneliais (IK). Taip pat cisteiniais turtingi baltymai bakterijų redukuojančioje citoplazmoje neįgauna tinkamos konformacijos ir gali būti linkę agreguotis. Kita potenciali agregacijos priežastis - nepakankama molekulių šaperonų ir foldazių koncentracija ląstelėje. Tačiau IK turi ir privalumų: intarpiniuose kūneliuose kompaktiškai supakuotos baltymo molekulės yra neprieinamos proteazėms *in vivo*, IK centrifuguojant labai lengvai atskiriami nuo ląstelių lizato, o toksiški baltymai tokioje struktūroje tampa mažiau žalingi ląstelei. Kuomet negaunama tirpaus baltymo arba jis

tikslingai ekspresuojamas IK pavidalu, atliekamas intarpinių kūnelių tirpinimas ir baltymo perlankstymas *in vitro*. Deja, neretai tokių procedūrų išeiga nėra didelė, o gaunamas baltymas gali būti nestabilus ar funkciškai neaktyvus [87].

Tirpų ir biologiškai aktyvų baltymą *E. coli* citoplazmoje galima gauti ir be intarpinių kūnelių renatūracijos. Nekeičiant rekombinantinio baltymo aminorūgčių sekos, jo tirpumą galima padidinti dviem būdais: lėtinant baltymo biosintezę ir/arba sudarant palankesnes sąlygas baltymo susivyniojimui. Pirmuoju atveju, mažinama induktoriaus koncentracija (iki 1μM), po indukcijos mažinama ląstelių auginimo temperatūra (15-30 °C) ir atitinkamai ilginamas indukcijos laikas (nuo 4 val. iki kelių parų). Teigiamas poveikis baltymų tirpumui aiškinamas tuo, jog sulėtėjus biosintzei, besiformuojantys polipeptidai turi daugiau laiko teisingai susivynioti. Be to, yra keletas sėkmingos rekombinantinių baltymų sintezės pavyzdžių ir ekstremaliai žemose (4–10 °C) temperatūrose įprastuose kamieniuose [88] arba specialiai tam sukurtuose (ArcticExpress), kuriuose ekspresuojami šalčiui atsparūs molekuliniai šaperonai iš psichrofilinės bakterijos *Oleispira antarctica* [89]. Tokiomis sąlygomis, drastiškai sumažėjus ląstelių augimo greičiui, indukcija gali būti tęsiama net iki 10 dienų.

Baltymo sintezės intensyvumas tiesiogiai priklauso nuo iRNR kiekio, kurį lemia promotoriaus funkcionalumas ir plazmidės kopijų skaičius. Silpniems promotoriams (pvz., *lac*, *lacUV5*, *hibridiniam tac* ir *trc*) būdinga gana didelė tikslinio baltymo sintezė neindukuotose sąlygose ir netokia intensyvi pridėjus induktoriaus, lyginant su vienu iš stipriausių *T7* promotoriumi [79,83]. Suderinus tokius promotorius su mažakopijinėmis plazmidėmis galima gauti daugiau teisingai susivyniojusio, tirpaus baltymo, nes vykstant nuolatinei ir lėtesnei baltymo sintzei transliacijos produktai kaupiasi po truputį. Eksperimentiniai duomenys patvirtina, kad su silpniausiais *lac*, *lacUV5* promotoriais procentaliai gaunama daugiausiai tirpaus baltymo nuo viso susintetinto baltymo kiekio, tačiau dėl neintensyvios sintezės, bendra tirpaus baltymo išeiga gaunama visgi mažesnė nei naudojant stiprų promotorių [86].

Teigiamą poveikį baltymo tirpumui gali turėti ir auginimo terpės keitimas: pH kontrolė, pridėjimas gliukozės (0,8-1,0%) katabolitei *lac* promotoriaus represijai, būtinųjų aminorūgščių ir kofaktorių, padidintas osmosinis slėgis (pridėjus, pvz., sorbitolio, betaino, sacharozės) [78].

Natyvios baltymo konformacijos susidaryme *in vivo* aktyviai dalyvauja įvairūs molekuliniai šaperonai ir foldazės. Kai kurių baltymų sintezės metu, padidinus kompleksiskai veikiančių šaperonų (pvz. DnaK-DnaJ-GrpE, GroEL-GroES sistemų ar ClpB) kiekį, nustatyta

ženkliai didesnė tirpaus baltymo išeiga [90]. Siekiant pagerinti cisteiniais turtingų baltymų susivyniojimą ir tirpumą, sukurti mutantiniai *E. coli* kamieniai (pvz., origami, Rosetta-gami), kuriuose dėl inaktyvuotų tioredoksino (*trx*B) ir glutationo (*gor*) reduktazių genų, citoplazmoje gali formuotis disulfidiniai tilteliai. Šios mutacijos kartu su padidinta periplazmos izomerazės (DsbC) sinteze citoplazmoje, dar labiau pagerina disulfidinių jungčių susidarymą (pvz., „NEB“ kompanijos kamienas SHuffle T7). Tačiau kiekvieno individualaus baltymo atveju gali tekti išbandyti įvairias šaperonų/foldazių sistemas ir jų kombinacijas bei rasti optimalias jų raiškos sąlygas, kad pernelyg intensyvi papildomų baltymų sintezė nesukeltų streso ląstelėms ir neapsunkintų tikslinio baltymo atskyrimo [79,89].

Kitas šios problemos sprendimo būdas - tikslinio baltymo lokalizacijos *E. coli* ląstelėje keitimas. Po sintezės citoplazmoje, N-galinį signalinį peptidą turintys baltymai, pernašos mechanizmais transportuojami į periplazmą, o toliau gali būti pasyviai sekretuojami į auginimo terpę. Nors citoplazminių baltymų išeiga daug didesnė lyginant su periplazminiais, periplazmoje dažniausiai formuojasi tirpūs ir teisingai susisukę baltymai. Dėka oksiduojančių periplazmos savybių gali natūraliai formuotis disulfidinės jungtys, ten yra tik 4 % visų šeimininkės ląstelės baltymų ir tik dalis jų proteazės, o baltymai formuojami su autentiškais N-galais. Sekretacija į auginimo terpę taip pat turi pranašumų: dar mažiau proteazių ir lengvesnis tikslinio baltymo atskyrimas. Tačiau eukariotinių baltymų sekretacija į terpę nėra lengvai pasiekama (sėkminga tik atskirais atvejais), priklauso nuo daugelio veiksnių ir dažniausiai gaunamo baltymo kiekis daug mažesnis lyginant su IK reatūracija ar pernaša į periplazmą [79].

Kai kurios paties baltymo savybės taip pat lemia tirpaus baltymo ekspresijos išėigą, tarp jų yra molekulinė masė, hidrofobinių sekų kiekis ir erdvinės struktūros sudėtingumas. *E. coli* sunkiai ekspresuoja didelius baltymus (>70 kDa), todėl tirpumą ir ekspresiją galima padidinti pasirenkant mažesnę jo fragmentą, išbandant įvairaus dydžio baltymo variantus. Membraninių baltymų sintezė *E. coli* ląstelėse vis dar išlieka iššūkis, todėl rekomenduojama ekspresuoti tik tirpų baltymo domeną be transmembraninių segmentų ar hidrofobinių regionų, žinoma, jei tai nedaro įtakos jo biologiniam aktyvumui. Tikslinio baltymo N arba C gale galima prijungti papildomus tirpius baltymus: glutationo S-transferazę (GST), maltozę surišantį baltymą (MBP), tioredoksiną (Trx) ir kitus. Toks baltymų suliejimas ne tik padidina baltymo tirpumą citoplazmoje, bet ir apsaugo nuo proteazių, palengvina gryninimą [89].

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

Naudoti reagentai ir rinkiniai pateikti pagal gamintoją:

- *BioRad*: TEMED, glicinas;
- *Ferak Berlin*: Tritonas–X100;
- *Fluka*: bisakrilamidas, Coomassie Brilliant Blue R-250, etidžio bromidas, guanidino hidrochloridas, HCl, NaOH, Na₂B₄O₇, Na₃PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄·12H₂O, PIPES;
- *GE Healthcare*: sefarozė, p-aminometilbenzeno sulfonamidais modifikuota agarozė;
- *Labochema*: karbamidas;
- *Matheson Coleman & Bell*: bromfenolio mëlis;
- *Roche*: chloramfenikolis, glicerolis, peptidazių slopiklių kokteilis tabletėmis, PMSF;
- *Roth*: agar-agaras, akrilamidas, ampicilinas, APS, CaCl₂, DMSO, HEPES, LB mitybinė terpė, MgCl₂, mielių ekstraktas, NaCl, triptonas;
- *Sigma Aldrich*: ANS, AZM, CH₃COOH, EDTA, EZA, 80 % H₃PO₄, imidazolas, KCl, MES, MgSO₄, NaBr, NaF, NaI, Na₂SO₄, NiCl₂, TRIS, topiramatas;
- *Thermo Fisher Scientific*: agarozė, IPTG, baltymų dydžio žymuo (*Protein Molecular Weight Marker*), DNR dydžio žymuo (O'GeneRuler 50bp DNA Ladder), dažas DNR mėginių užnešimui ant agarozės gelio (6X Orange Loading Dye), dNTP mišinys, *Pfu* natyvi ir *Phusion* DNR polimerazės ir jų buferiniai tirpalai, DNR gryninimo rinkiniai: „GeneJET™ Gel Extraction Kit“, „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“.

Karboanhidrazių ligandai

Komerciniai CA ligandai (EZA, AZM) pirkti iš „Sigma-Aldrich“, „Alfa Aesar“ kompanijų. Kiti naudoti junginiai sintetinti VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje (dr. V. Dudutienė).

2.2. Bakterijos ir plazmidės

E. coli kamienai

DNR padauginimui naudotas *E. coli* bakterijų kamienas XL1-blue (*Stratagene*), o CA XIV raiškai - *E. coli* BL21 (DE3) ir jo pagrindu sukontruoti kamienai (3 lentelė). Kamienas BL21 Star (DE3) One Shot įsigytas iš „Invitrogen“ kompanijos, o visi kiti - iš „Novagen“.

3 lentelė. Baltymo ekspresijai naudoti *E. coli* kamienai ir jų pagrindinės savybės.

<i>E. coli</i> kamienas	Atsparumas antibiotikams	Savybės
BL21(DE3)	-	Neturi Lon ir OmpT proteazių;
BL21(DE3)pLysS	Cm	Įvesta pagalbinė plazmidė su pLysS genu, koduojančiu T7 lizocimą;
BL21(DE3)CodonPlus–RIL	Cm	Įvestos plazmidės su papildomomis, retus kodonus (AGA, AGG, AUA, CUA) atpažįstančių tRNR genų kopijomis; neturi Lon ir OmpT proteazių;
BL21 Star (DE3) One Shot	-	Neaktyvi ribonukleazė E (rne131 mutacija), neturi Lon ir OmpT proteazių;
Origami B(DE3)	Kan + Tet	Mutuoti reduktazių <i>gor</i> ir <i>trxB</i> genai; <i>lacZY</i> genų delecija suteikia tikslesnę induktoriaus kontrolę; neturi Lon ir OmpT proteazių;
Rosetta 2(DE3)	Cm	Įvestos plazmidės su papildomomis retus kodonus (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, CGG) atpažįstančių tRNR genų kopijomis; neturi Lon ir OmpT proteazių;
Rosetta-gami 2(DE3)	Cm + Str + Tet	Įvestos plazmidės su papildomomis, retus kodonus (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, CGG) atpažįstančių tRNR genų kopijomis; mutuoti reduktazių <i>gor</i> ir <i>trxB</i> genai; neturi Lon ir OmpT proteazių;

DE3 žymėjimas reiškia, jog kamienai tinkami genų raiškai naudojant pET vektorius, nes į ląstelių chromosomą įterptas T7 RNR polimerazės genas. Cm – chloramfenikolis, Kan – kanamicinas, Tet – tetraciklinas, Str – streptomocinas.

Genetinės konstrukcijos

- 1. pGEX-5x-3-CAXIV (16-285)** - plazmidė su tac promotoriumi ir *CA14* genu, kuris koduoja CA XIV baltymą nuo 16 iki 285 aminorūgštis, o N' – gale gliutatio S-transferazę (GST) koduojanti seka.
- 2. pET15b-CAXIV (16-285)** - plazmidė su T7 bakteriofago promotoriumi ir *CA14* genu, kuris koduoja CA XIV baltymą nuo 16 iki 285 aminorūgštis, o N' gale prijungta šešis histidinus koduojanti seka.
- 3. pSUMO-CAXIV (16-279)** - plazmidė su T7 bakteriofago promotoriumi ir *CA14* genu, kuris koduoja CA XIV baltymą nuo 16 iki 279 aminorūgštis, o N' gale prijungta SUMO baltymą ir šešis histidinus koduojanti seka.
- 4. pET15b-CAXIV (20-280)** - plazmidė su T7 bakteriofago promotoriumi ir *CA14* genu, kuris koduoja CA XIV baltymą nuo 20 iki 280 aminorūgštis, o N' gale prijungta šešis histidinus koduojanti seka.

Visos šios genetinės konstrukcijos sukurtos VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje (Jolanta Vanagel, dr. Jurga Matulienė, dr. Vaida Jogaitė). Transformantų atrankai (selekcijai) visos konstrukcijos turi geną, lemiantį atsparumą ampicilinui.

- 5. pET15b-tac-CAXIV (16-285)** – modifikuota pET15b-CAXIV (16-285) plazmidė, kurioje T7 bakteriofago promotorius pakeistas tac promotoriumi.
- 6. pG-KJE8** („Clontech Laboratories”) – plazmidė skirta DnaK-DnaJ-GrpE ir GroES-GroEl šaperonų sistemų raiškai. Šių baltymų ekspresija indukuojama L-arabinoze ir tetraciklinu. Turi pACYC vektoriaus replikacijos pradžios seką ir yra suderinama su pMB1 ar ColE1 replikatorių turinčiomis plazmidėmis (pvz. pET serijos vektoriai). Transformantų atrankai turi geną, lemiantį atsparumą chloramfenikolui.

pET15b-tac-6xHis-CAXIV (16-285) genetinės konstrukcijos kūrimui naudoti pradmenys:

HD1 (A+C): (5'-CGGCGTAGAGGATCAGCTGTTGACAATTAATCA-3') - tiesioginis pradmuo. T_m= 64 °C, 33 nt.

HD2 (B+D): (5'-TCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGA-3') - atvirkštinis pradmuo. T_m= 66 °C, 33 nt.

2.3. Terpės ir tirpalai

Terpės:

Autoindukcinė ZYM-5052 terpė ruošiama vandenyje ištirpinus 1% triptono, 0.5% mielių ekstrakto, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 2 mM MgSO₄ ir atskirai ištirpinus 0,5% glicerolio, 0,05% dekstrozės, 0,2% laktozės. Abu tirpalai autoklavuojami 20 min 121°C temperatūroje 1 papildomos atm slėgyje ir prieš naudojant sumaišomi iki reikiamo tūrio [91].

BHI (Brain Heart Infusion), LB (Luria/Miller) mitybinės terpės ruošiamos pagal gamintojų nurodymus ir autoklavuojamos 20 min +121 °C temperatūroje esant 1 atm slėgiui.

Agarizuota LB mitybine terpė: į skystą LB terpę pridedama 1,5 % agar-agaro. Autoklavuojama 20 min +121 °C temperatūroje 1 papildomos atm slėgyje.

SOC mitybinė terpė: 2 % triptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 10 mM NaCl ir 3,5 mM KCl. Autoklavuojama 20 min +121 °C temperatūroje 1 papildomos atm slėgyje.

Tirpalai:

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

Baltymų denatūravimo (pavyzdžio) buferis (6x): 0,6 % bromfenolio melynjo, 600 mM DTT, 60 % glicerolio, 12 % NDS, 300 mM TRIS, pH 6,8. Išpilstoma po 1 ml ir laikoma -20 °C temperatūroje.

Kompetentinių lastelių transformacijos buferis: 15 mM CaCl₂×2H₂O, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂×4H₂O, 10 mM PIPES. Tirpalas be PIPES filtruojamas ir laikomas -20°C temperatūroje. PIPES į bendrą kompetentinių lastelių ruošimo tirpalą dedamas prieš pat naudojimą.

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

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

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

Universalus plataus pH intervalo buferis: 50 mM fosfato, 50 mM acetato, 25 mM borato, 50 mM NaCl.

Gryninimo buferiniai tirpalai:

- *Biomasės ardymui:* 50 mM TRIS, 150 mM Na₂SO₄, 50 mM imidazolo, 1 % tritono, 1 mM PMSF, pH 8,0. 100 mL tokio tirpalo ištirpinama 1 tabletė peptidazių slopiklių kokteilio.
- *Buferinis tirpalas A:* 25 mM TRIS, 150 mM Na₂SO₄, 50 mM imidazolo, pH 8,0.
- *Buferinis tirpalas B:* 25 mM TRIS, 100 mM Na₂SO₄, 0,6 M imidazolo, pH 8,0.
- *Buferinis tirpalas C:* 20 mM HEPES, 150 mM Na₂SO₄, pH 8,0.
- *Buferinis tirpalas D:* 0,1 M CH₃COONa, 0,5 M Na₂SO₄, pH 5,6.
- *Saugojimo buferinis tirpalas:* 20 mM HEPES, 0,1 M Na₂SO₄, pH 8,0.

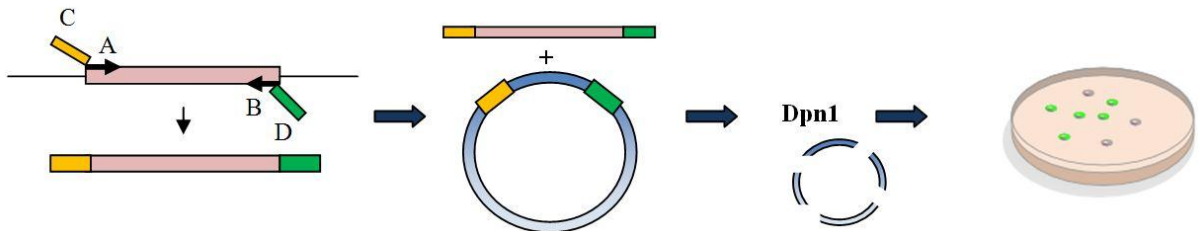
2.4. Kompiuterinės programos

- *A plasmid Editor v1.17* (ApE) ir *SnapGene Viewer* – programos, naudotos teoriniam konstrukto sukūrimui ir pradmenų kūrimui;
- *RF-Cloning* (<http://www.rf-cloning.org>) – internetinė programa, skirta kurti pradmenis įterptinei mutagenezei;
- *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) – programa, naudota nukleorūgščių ar aminorūgščių sekų palyginimui;
- *pDRAW32* – programa, naudota genetinėje konstrukcijoje nustatyti atviro skaitymo rėmelius;
- *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>) – programa, skirta baltymo parametrus sužinoti;
- *ThermoFluor++1.4.2* - programa, terminio poslinkio metodu gautiems rezultatams apdoroti;
- *Microcal™Origin™v5,0* – programa, izoterminė titravimo kalorimetrijos metodu gautiems rezultatams apdoroti.

2.5. Metodai

2.5.1. Įterptinė mutagenezė

Šia taikiniui specifine mutageneze galima įterpti norimą seką į bet kurią vietą ir į bet kokią plazmidę, net jei vektoriuje ir įterpiamoje sekoje nėra restrikcijos endonukleazių taikinių ar homologinės rekombinacijos sekų. Tam naudojami hibridiniai pradmenys, turintys komplementarias sekas tiek intarpui, tiek ir modifikuojamai plazmidei. Pirmosios polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metu (5 pav.) su šiais pradmenimis gaunamas oligonukleotidas su visa įterpiama nukleotidų seka apribota modifikuojamai plazmidei komplementariomis sekomis. Oligonukleotidas išgryninamas frakcionuojant agaroziniame gelyje ir naudojamas kaip „megapradmuo“ antrojoje PGR, kurioje DNR matrica - modifikuojama plazmidė. Visa plazmidė yra amplifikuojama abiejomis kryptimis įterpiant naująją seką, o po PGR gaunama dvigrandė žiedinė DNR su viengrandžiais trūkiais (po vieną kiekvienoje gijoje), kuriuos ištaiso bakterijų DNR reparacijos sistemos. Toliau PGR reakcijos mišinys inkubuojamas su restrikcijos endonukleaze Dpn1, kuri selektyviai sukarmo tik metilintą matricinę DNR, o nepažeista, *in vitro* susintetinta ir modifikuota plazmidė naudojama transformuoti kompetentines *E. coli* ląsteles [92].



5 pav. Įterpinės mutagenezės etapai.

Šis metodas naudotas **pET15b-CAXIV (20-280) plazmidės T7 bakteriofago promotorių pakeisti tac promotoriumi**. Megapradmenys gauti hibridiniais pradmenimis amplifikuojant *tac* promotoriaus seką nuo pGEX-5x-3-GST-CAXIV. Plazmidės pET15b-tac-CAXIV seka ir pradmenys kurti kompiuterinėmis programomis, o procedūra atlikta remiantis [92] rekomendacijomis.

Hibridiniai pradmenys (A+C ir B+D) kiekvienos PGR metu veikia kaip atskiri pradmenys: **A – (5'-AGCTGTTGACAATTAATCA-3')** - tiesioginis pradmuo skirtas įterpiamos sekos pagausinimui. $T_m = 49\text{ }^\circ\text{C}$, 19 nt.

B – (5'-ACACATTATACGAGCCGA-3') - atvirkštinis pradmuo skirtas įterpiamos sekos pagausinimui. T_m= 51 °C, 18 nt.

C – (5'-CGGCGTAGAGGATC-3') - tiesioginis pradmuo skirtas sekos įterpimui į plazmidę. T_m= 49 °C, 14 nt.

D – (5'-TCCGCTCACAATTCC-3') - atvirkštinis pradmuo skirtas sekos įterpimui į plazmidę. T_m= 49 °C, 15 nt.

I polimerazės grandininė reakcija. Amplifikuojama tac promotoriaus seka. Gautas oligonukleotidas su visa įterpiama seka vadinamas „megapradmeniu“.

20 µl tūrio PGR mišinį sudaro:

- 1 fermento aktyvumo vienetas *Phusion* rekombinantinės DNR polimerazės;
- 7 ng **pGEX-5x-3-GST-CAXIV** plazmidės;
- 10 µM tiesioginio pradmens HD1;
- 10 µM atvirkštinio pradmens HD2;
- 0,2 mM dNTP mišinio;
- 1x *Phusion* DNR polimerazės buferio;
- dejonizuotas vanduo.

Reakcija vykdoma termocikleryje pagal šią programą: pradinė denatūracija +95 °C 2 min; po to, reakcija kartojama 25 kartus: DNR grandinių atskyrimas +95°C 30 s, pradmenų prilydymas +49 °C 30 s, DNR sintezė +72 °C 30 s; DNR grandinės galų prisintetinimas +72 °C 7 min.

Gauti **PGR produktai frakcionuojami 2,5 % agarozės gelyje** su DNR ilgio žymenimis (O'GeneRuler 50bp DNA Ladder), o 66 nt ilgio megapradmenys iškerpami iš agarozės gelio ir **gryninami naudojant** „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ rinkinį pagal gamintojų pateiktus nurodymus. Išskirtos DNR koncentracija matuojama „NanoDrop“ spektrofotometru ($\lambda = 260$ nm).

Megapradmens amplifikacija. Pirmosios PGR metu susidarius nepakankamam megapradmenų kiekiui, atliekama amplifikacija su pradiniais hibridiniais pradmenimis.

20 µl tūrio PGR mišinį sudaro:

- 1 fermento aktyvumo vienetas *Pfu* rekombinantinės DNR polimerazės;
- 20 ng megapradmens;
- 10 µM tiesioginio pradmens HD1;

- 10 μ M atvirkštinio pradmens HD2;
- 0,2 mM dNTP mišinio;
- 1x *Pfu* DNR polimerazės buferio;
- dejonizuotas vanduo.

Reakcija vykdoma termocikleryje pagal šią programą: pradinė denatūracija +95 °C 1 min; po to, reakcija kartojama 25 kartus: DNR grandinių atskyrimas +95°C 30 s, pradmenų prilydymas +60 °C 30 s, DNR sintezė +72 °C 30 s; DNR grandinės galų prisintetinimas +72 °C 2 min.

II polimerazės grandininė reakcija. DNR sintezei pasirinkta *Phusion* polimerazė. Naudojama 5 kartų daugiau megapradmens nei matricinės DNR.

20 μ l tūrio PGR mišinį sudaro:

- 1 fermento aktyvumo vienetas *Phusion* rekombinantinės DNR polimerazės;
- 15 ng **pET15b-CAXIV (20-280) plazmidės**;
- 75 ng megapradmens;
- 0,2 mM dNTP mišinio;
- 1x *Phusion* DNR polimerazės buferio;
- dejonizuotas vanduo.

Reakcija vykdoma termocikleryje pagal šią programą: pradinė denatūracija +95 °C 5 min; po to, reakcija kartojama 18 kartų: DNR grandinių atskyrimas +95°C 30 s, pradmenų prilydymas +47 °C 1 min, DNR sintezė +72 °C 8 min (*Phusion* polimerazės greitis - 90s/kb); DNR grandinės galų prisintetinimas +72 °C 10 min.

II PGR produkto restrikcija. Po PGR paimami 5 μ L mišinio DNR elektroforezei 1,5 % agarozės gelyje, o likęs mišinys 1 val. inkubuojamas 37 °C su 1 fermento aktyvumo vienetu restrikcijos endonukleazės DpnI, o likusiu mišiniu transformuojamos *E. coli* XLI–blue kamieno lastelės. Plazmidė gryninama iš šių ląstelių naudojant „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį pagal gamintojų pateiktą protokolą. DNR koncentracija nustatoma „NanoDrop“ spektrofotometru ($\lambda = 260$ nm), o nukleotidų seka - VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre.

DNR elektroforetinis frakcionavimas atliekamas horizontaliame 1 % arba 2,5 % agarozės gelyje TAE buferyje su etidžio bromidu (galutinė koncentracija 0,25 μ g/ml). Gelyje

analizuojami mėginiai praskiedžiami 6x DNR mėginių dažu (6x Orange Loading Dye). Pasibaigus elektroforezei gelis analizuojamas ultravioletinėje šviesoje.

2.5.2. Rekombinantinės karboanhidrazės XIV ekspresija, tirpumo tikrinimas, gryninimas ir koncentracijos nustatymas

Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas

1. *E. coli* ląstelės išsėjamos ant agarizuotos LB mitybinės terpės su atitinkamais antibiotikais ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje 16-20 val., kol susiformuoja pavienės kolonijos.
2. Viena *E. coli* bakterijų kolonija nuo agarizuotos terpės užsėjama į 10 ml LB terpę, auginama per naktį 37°C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu.
3. Į kolbą su LB mitybine terpe ir selektyviu kiekvienam kamienui antibiotiku perkeliama pradinė kultūra, skiedžiant santykiu 1:100. Toliau auginama purtant (220 aps./min) 37°C temperatūroje, kol kultūra pasiekia apie 0,55 optinio vieneto tankį, matuojamą spektrofotometru esant 600 nm bangos ilgiui.
4. Auginimas nutraukiamas kolbą perkeliant 10 min į ledo vonią.
5. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min 2500×g greičiu +4 °C temperatūroje.
6. Supernatantas nupilamas ir ląstelės atsargiai resuspenduojamos 80 ml šalto bendro transformacijos buferio. Centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis, kaip nurodyta 5-ame punkte.
7. Nupylus supernatantą, ląstelės resuspenduojamos 20 ml šalto bendro transformacijos buferio ir centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis.
8. Pridedama 1,5 ml DMSO. Bakterijų suspensija pamaišoma ir inkubuojama ant ledo 10 min.
9. Ląstelės išpilstomos į 1,5 ml talpos mėgintuvėlius, užšaldomos skystame azote ir laikomos -80 °C temperatūroje.

Kompetentinių *E. coli* ląstelių transformacija

1. Kompetentinės ląstelės atšildomos lede. Petri lėkštelė su agarizuota LB terpe ir atitinkamu antibiotiku šildoma kambario temperatūroje arba 1 val. 37°C temperatūros termostate.
2. 1-5 µl DNR (dažniausiai nuo 10 pg iki 100 ng) atsargiai sumaišoma su 20-50 µl kompetentinių ląstelių.
3. Mišinys inkubuojamas lede 30 min.
4. Vykdomas temperatūrinis šokas 90 s 42 °C temperatūroje.

5. Mėgintuvėlis su mišiniu perkeliamas ant ledo ir ten laikomas 2 min.
6. DNR ir ląstelių mišinys skiedžiamas 400 μl kambario temperatūros SOC terpe (be antibiotikų) ir purtant 220 aps./min greičiu inkubuojamas 1 val. 37 °C temperatūroje.
7. 50 μl transformuotų kompetentinių ląstelių steriliai išsėjama ant Petri lėkštelės.
8. Lėkštelė inkubuojama termostate 37 °C temperatūroje 16-20 val.

Kompetentinių *E. coli* ląstelių kotransformacija

Kotransformacijos metu į ląsteles įvedamos dvi plazmidinės DNR: plazmidė su tikslinio baltymo genu ir pG-KJE8 su DnaK-DnaJ-GrpE ir GroES-GroEL šaperonų genais. Naudojamos BL21(DE3) kompetentinės ląstelės, nes tai atsparumo antibiotikams neturintis kamienas. Kotransformacijos efektyvumas yra mažesnis nei transformacijos atskiromis plazmidėmis, todėl naudojami didesni plazmidinių DNR kiekiai (po 1 μg kiekvienos plazmidės).

CA XIV baltymo raiška *E. coli* kamienuose

Transformuotų ląstelių auginimas LB arba BHI mitybinėse terpėse:

1. Vakare viena kolonija nuo agarizuotos terpės užsėjama į kolbutę su mitybine terpe ir atitinkamais antibiotikais ir auginama per naktį 37 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu. Transformantų atrankai, priklausomai nuo kamieno, naudojamos antibiotikų koncentracijos augimo terpėje: 100 μg/ml ampicilino, 30 μg/ml chloramfenikolio, 50 μg/ml kanamicino, 12 μg/ml tetraciklino, 50 μg/ml streptomicino.
2. Ryte naktinė kultūra persėjama į naują terpę su atitinkamais antibiotikais ir 0,1 mM ZnCl₂ santykiu 1:50.
3. Bakterijos auginamos 37 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu ir kultūrai pasiekus 0,6-0,7 optinių vienetų tankį, matuojamą esant 600 nm bangos ilgiui, geno raiška indukuojama pridendant atitinkamą kiekį IPTG ir ZnCl₂ tirpalų. Po indukcijos mažinama kultūros auginimo temperatūra (30-16 °C) ir atitinkamai ilginamas auginimo laikas (4-16 val.). Kuomet baltymo sintezei pasirenkama temperatūra žemesnė nei 25 °C, prieš indukciją terpė atvėsinama purtyklėje arba ledo vonioje.
4. Rekombinantinio baltymo sintezės lygiui nustatyti ruošiami ląstelių lizatų mėginiai, kurie analizuojami atliekant elektroforezę 12% NSD–poliakrilamido gelyje. Ląstelių auginimo metu joms pasiekus optinį tankį ($\lambda = 600$ nm) 0,8 paimamas 300 μl ląstelių mėginys prieš tikslinio

baltymo indukciją. Po indukcijos, pasibaigus ląstelių auginimo laikui, vėl imama ląstelių suspensija (1 ml) ir matuojamas jos optinis tankis ($\lambda = 600$ nm). Po tikslinio baltymo raiškos indukcijos paimamas tokio tūrio ląstelių mėginys, kad prieš ir po baltymo raiškos indukciją paimtuose mėginiuose ląstelių kiekis būtų toks pats. Mėginiai centrifuguojami 2 min $3300\times g$ greičiu. Skystis nusiurbiamas. Mėginiai suspenduojami 30 μ l 1x pavyzdžio buferiniame tirpale ir 5 min kaitinami $+95$ °C temperatūroje.

5. Ląstelių biomasė 20 min centrifuguojama $4000\times g$ greičiu $+4$ °C temperatūroje. Skystis nupilamas. Biomasė laikoma -20 °C temperatūroje.

Transformuotų ląstelių auginimas autoindukcinėje (ZYM-5052) mitybinėje terpėje:

Kultūros auginimas vyksta beveik taip pat kaip ir auginant kitose mitybinėse terpėse pagal prieš tai aprašytą metodiką, tačiau nereikia periodiškai matuoti optinio tankio, t. y. sekti kuomet ląstelės pasiekia eksponentinio augimo fazės vidurį, ir naudoti cheminio induktoriaus – ląstelėse tikslinio baltymo raiška indukuojasi savaime. Naktinė kultūra užsėjama į LB terpę, o ryte persėjama į autoindukcinę terpę su atitinkamais antibiotikais ir 0,1 mM $ZnCl_2$ santykiu 1:50. Toliau ląstelės auginamos purtant 250 aps./min greičiu pasirinktoje temperatūroje ($37-16$ °C) 24 val. Tikslinio baltymo sintezės pradžia ir intensyvumui nustatyti matuojamas kultūros optinis tankis ir imami mėginiai kas 2 val., kurie vėliau analizuojami baltymų elektroforezės būdu. Elektroforeziškai nustatčius indukcijos pradžią, galima ląsteles pradžioje auginti 37 °C temperatūroje, kol kultūra pasiekia reikiamą optinį tankį (apytiksliai 4 val.), ir tada sumažinti auginimo temperatūrą ($30-16$ °C).

CA XIV tirpumo tikrinimas

Norint nustatyti, ar gautas rekombinantinis baltymas yra tirpus, reikia atskirti tirpių baltymų frakciją nuo netirpių ir abi jas išfrakcionuoti baltymų poliakrilamidiniame gelyje (NSD-PAGE).

1. 1 g biomasės resuspenduojama 6 ml biomasės ardymo buferio ir maišoma 1 val. 4 °C temperatūroje ant magnetinės maišyklės.
2. Taip paruoštos ląstelės ledo vonelėje ardomos ultragarsu (dezintegratorius - „Bandolin Sonopuls“, VS 70T angalis) 7 min kas 30 s darant 30 s pertraukas esant 50 % vibracijos amplitude.
3. Suardyta biomasė centrifuguojama 20 min $16000\times g$ greičiu 4 °C temperatūroje.

4. Supernatantas (tirpių baltymų frakcija) atskiriamas ir laikomas šaltai, nuosėdos (netirpių baltymų frakcija) tirpinamos 4 ml 8 M karbamido tirpalo.
5. Tirpių ir netirpių baltymų frakcijų koncentracijos nustatomos Bradfordo metodu [93].
6. Baltymų elektroforezei imama po 10 µg baltymo. Tirpalai sumaišoma su 6x pavyzdžio buferiniu tirpalu ir kaitinami 5 min 95 °C temperatūroje.
7. Mėginiai analizuojami baltymų poliakrilamido gelyje (NSD-PAGE).

Jei tirpaus tikslinio baltymo ekspresuojama nedaug, jo kiekį vizualiai įvertinti iš elektroforegramos tarp visų ląstelės tirpių baltymų yra sunku. Tuomet tirpioji frakcija gali būti gryninama metalo chelatinės chromatografijos būdu pagal žemiau aprašytą metodiką, naudojant mažą plastikinę kolonėlę PD-10 („GE Healthcare Life Sciences“) su 2 ml sorbento. Sąveikaujantys baltymai eliuojami 4 frakcijomis po 2 ml gryninimo buferinio tirpalo B. Vienodi frakcijų mėginių tūriai (25 µl) įnešami į gelio (NSD-PAGE) šulinėlius, kad būtų galima lengviau vizualiai lyginti skirtingomis ląstelių auginimo ir baltymo indukcijos sąlygomis gautus tirpaus baltymo kiekius.

CA XIV gryninimas

Biomasė suspenduojama ardymo buferiniame tirpale su 1 mM PMSF ir maišoma 1 val. 4 °C temperatūroje. Toliau ardoma 15 min ultragarsiniu dezintegratoriumi („Bandolin Sonopuls“, VS 70T angalis) kas 60 s darant 60 s pertrauką, esant 70 % vibracijos amplitudei. Suardytų ląstelių suspensija centrifuguojama 20 min 4 °C temperatūroje 16000×g greičiu. Tikslinis baltymas sulietas su šešių histidinių seka, todėl gryninamas metalo chelatine chromatografija, naudojant chromatografinę kolonėlę pakrautą sorbentu (Sephacrose 6B-CL IDA) su imobilizuotais Ni⁺² jonais. Naudojama „LKB BROMMA“ gryninimo sistema ir C 10/100 ir C 16/200 chromatografinės kolonėlės („GE Healthcare Life Sciences“), kai gryninama per, atitinkamai, 5 arba 10 ml sorbento. Kolonėlė lygsvarinama buferiniu tirpalu A. Supernatantą perleidus per kolonėlę, nesisorbavę priemaišiniai baltymai atplaunami tuo pačiu buferiniu tirpalu A. Prisijungtosios baltymo molekulės eliuojamos nuo sorbento didinant konkurentinio ligando (imidazolo) koncentraciją iki 0,6 M (maišomi gryninimo buferiniai tirpalai A ir B). Eliuato frakcijos tikrinamos NDS-PAGE. Remiantis elektroforegrama ir chromatograma sujungiamos tikslinį baltymą turinčios frakcijos. Baltymo tirpalas koncentruojamas ir dializuojamas gryninimo buferiniame tirpale C.

Toliau baltymas gryninamas per C 10/100 chromatografinę kolonėlę, užpildytą 3 ml p-aminometilbenzeno sulfonamidais modifikuota agaroze. Atplaunamos tik teisingos tretinės struktūros, su karboanhidrazių ligandais besijungiančios baltymo molekulės. Kolonėlė pusiausvyrinama ir nesąveikaujantys su nejudriąja faze baltymai pašalinami gryninimo buferiniu tirpalu C. Sąveikaujantys – eliuojami su gryninimo buferiniu tirpalu D. Chromatografijos frakcijos tikrinamos elektroforeziškai, turinčios tikslinę baltymą sujungiamos ir koncentruojamos, po to dializuojamos saugojimo buferiniame tirpale. Baltymo koncentracija nustatoma Bradfordo metodu arba spektrofotometriškai.

Baltymų elektroforezė

Baltymai frakcionuojami vienkrypte tradicine Lemli [94] poliakrilamidine gelelektroforeze denatūruojančiomis sąlygomis (PAGE-NDS). Naudojami 4 % koncentruojantis ir 12 % frakcionuojantis geliai. Gelis dažomas 20 min su Kumasi Briliantinio mėlio (Coomassie Brilliant Blue R-250) tirpalu 25 °C temperatūroje purtant 70 aps./min greičiu ir 10 min blukinamas verdančiame vandenyje.

Kiekybinis baltymų nustatymas

Baltymų koncentracija mėginiuose nustatoma Bradfordo metodu (Bradford, 1976), matuojant tirpalų ultravioletinių spindulių sugertį ($\lambda = 595 \text{ nm}$) ir naudojantis jaučio serumo albumino gradavimo grafikais. Taip pat naudotas ir spektrofotometrinis baltymų kiekio nustatymo metodas. Šiuo metodu matuojamos baltymo tirpalo sugertys, esant 280 nm ir 340 nm bangų ilgiams, kaip kontrolę naudojant tokios pačios sudėties buferį tirpalą. Baltymo tirpalo sugertis lygi šių sugerčių skirtumui, o koncentracija apskaičiuojama pagal Bero ir Lamberto dėsnį [95]. Skaičiavimams naudoti „ProtParam“ programa gauti moliniai ekstinkcijos koeficientai.

2.5.3. Izoterminė titravimo kalorimetrija

Izoterminė titravimo kalorimetrija (ITK) yra analitinis metodas, leidžiantis išmatuoti reakcijų metu vykstančius šilumos pokyčius vandeniniame tirpale. Iš visų metodų, kurie šiuo metu naudojami tirti sąveikas biologinėse sistemose, ITK galima įvertinti ne tik jungimosi giminingumą (jungimosi konstantą K_b) ir stochiometriją (n), bet nustatyti ir tris pagrindinius termodinaminius parametrus: jungimosi entalpijos pokytį (ΔH), laisvąją Gibso energiją (ΔG)

ir entropiją (ΔS). Kalorimetrais ΔH yra tiksliai eksperimentiškai pamatuojama, o ΔG ir ΔS apskaičiuojami taikant (7) ir (8) termodinamines lygtis. Atliekant vienodus ITC eksperimentus skirtingose temperatūrose, galima gauti tiriamos sistemos šiluminės talpos pokytį (ΔC_p) [96]. Tačiau šis metodas turi ir keletą trūkumų. Titravimo kalorimetrijos būdu nustatyta K_b laikoma patikima tik tuomet, jei ligandui jungiantis 1:1 santykiu, K_b sandauga su makromolekulės moline koncentracija yra tarp 5 ir 500. Praktiškai, K_b nustatymo ribos yra nuo 10^5 iki 10^9 M^{-1} . Labai silpnai ar stipriai besijungiančių ligandų atveju, K_b galima įvertinti ITC metodu titruojant su konkurenciniu ligandu arba kitais metodais, pvz. terminio poslinkio [97,98]. Taip pat, lyginant su pastaruoju metodu, vienam ITC eksperimentui reikia pakankamai daug tiriamos medžiagos (~0,2 mg baltymo).

Izoterminio titravimo kalorimetruose viso eksperimento metu, tiek mėginio kiuvetėje su makromolekulės tirpalu, tiek lyginamojoje kiuvetėje pripildytoje vandens ar buferio tirpalo, temperatūra palaikoma pastovi. Tiriamasis tirpalas pasirinktais intervalais titruojamas vienodais ligando tirpalo tūriais ir smailėmis registruojamas galios pokytis sunaudotas šiluminei pusiausvyrai atstatyti: tiriant egzergoninį procesą kiuvetė vėsinama, endergoninį – šildoma. Šilumos pokytis atsiranda ne tik dėl jungimosi reakcijos, bet ir dėl ligando skiedimosi, makromolekulės skiedimosi, dėl reagentų maišymosi, protonizacijos reakcijų ir kt. Suintegravus visų smailių plotus, atidėjus juos atskirame grafike ir priderinus vienos vietos jungimosi modelį [99], gaunama ITC izotermė. Iš gaunamos izotermės statumo ir aukščio galima spręsti ar tinkamai parinktos eksperimento sąlygos (ligando ir baltymo koncentracijos). Titravimo pradžioje gauti taškai (arba smailės aukštis) apibūdina suminę entalpiją (ΔH), nuožulnioji izotermės dalis – stochiometriją ir ligando giminingumą (kuo stipresnis jungimasis, tuo statesnė), o tirpalų skiedimosi ir maišymosi indėlį apibūdina taškai atitinkantys titravimo pabaigą [100].

Eksperimentinės sąlygos. CA XIV ir slopiklių sąveikos tyrimams naudotas MicroCal™ iTC200 System („GE Healthcare Life Sciences“) kalorimetras, kurį naudojant, skirtingai nuo įprastų, reikia daug mažiau baltymo ir slopiklio: mėginio kiuvetės užpildomui reikia 300 μl 16 μM baltymo tirpalo, o švirkštui - 100 μl . Eksperimentai atliekami 25 °C, daroma 20 ligando injekcijų po 2 μl su 2 minučių pertraukomis tarp jų. Tirpalus ruošiant naudojami buferiai ir pagalbinės medžiagos: 50 mM Tris buferinio tirpalo, 50 mM NaCl ir 1 % DMSO.

2.5.4. Fluorescencinis terminio poslinkio metodas

Fluorescencinis terminio poslinkio metodas (FTPM), ThermoFluor® arba diferencinio skenavimo fluorimetrijos metodas yra greitas, našus ir taupus: per kelias valandas galima iširti 72 ir daugiau (naudojant mikroplokšteles net 384) skirtingų mėginių, o kiekvienam iš jų naudojant 0,10–0,25 mg/ml koncentracijos 5-20 μ l baltymo tirpalo (t. y. \sim 3 μ g 30 kDa baltymo). Tai svarbiausi kriterijai, kodėl jis tapo vienu iš pagrindinių metodų biomolekulių stabilumo ir sąveikų tyrimams bei didelių cheminių junginių bibliotekų atrankai. FTPM universalumas leidžia matuoti įvairių makromolekulių (baltymų, nukleorūgščių) jungimąsi su ligandais ar tarpusavyje be jungimosi konstantų K_b nustatymo intervalo apribojimų [101]. Taip pat juo galima nustatyti ir baltymų potencialias biologines funkcijas [102].

Įvairūs terminio poslinkio metodai remiasi pripažinta termodinamine savybe - baltymo išsivyniojimo laisvosios energijos pokytis ($\Delta U_{G(T)}$) yra temperatūros funkcija. Tai reiškia, jog baltymo stabilumas tiesiogiai priklauso nuo temperatūros ir gali kisti dėl ligandų jungimosi. Eksperimentiškai nustatoma baltymo terminį stabilumą kiekybiškai apibūdinanti lydymosi temperatūra (T_m), kurios pokytis priklauso nuo ligando koncentracijos ir jungimosi giminingumo, kuomet kiti veiksniai yra nekintantys. Ligandais, šiuo atveju, vadinami įvairūs mažos molekulinės masės junginiai: substratai, kofaktoriai, slopikliai ir kt. Fluorescencinis terminio poslinkio metodas leidžia tirti baltymų terminį denatūracijos procesą ir ligando jungimąsi matuojant solvatochrominių dažų (pvz., ANS) arba aromatinių aminorūgščių (pvz., triptofano, tirozino ir fenilalanino) fluorescencijos intensyvumo pokyčius keliant temperatūrą [99,101].

Baltymų dviejų stadijų denatūracijos modelis ir denatūracijos kreivių analizė yra išsamiai aprašyti [99,103] šaltiniuose. FTPM fiksuojama fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo temperatūros yra aprašoma lygtimi (9) ir vaizduojama baltymo denatūracijos kreivėmis. Eksperimentiškai gautos kreivės yra modeliuojamos mažiausių kvadratų metodu derinant šešis nuo temperatūros priklausomus lygties (9) parametrus ($y_{N,T_m}, m_N, y_{U,T_m}, m_U, \Delta_U H_{T_m}, T_m$). Taip, su standartiniu nuokrypiu mažesniu nei 1 °C [71], nustatomas denatūracijos kreivių vidurio tašką atitikantis parametras T_m , t. y. temperatūra, kurioje denatūravusių ir natyvių baltymų koncentracijos yra lygios.

$$y = y_{N,T_m} + m_N(T - T_m) + \frac{y_{U,T_m} - y_{N,T_m} + (m_U - m_N)(T - T_m)}{1 + e^{\frac{\Delta_U H T_m \Delta_U C_p (T - T_m) - T \left(\Delta_U S T_m + \Delta_U C_p \left(\ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right) \right)}{RT}}} \quad (9)$$

Čia y – fluorescencija, y_{N,T_m} – dažo prisijungusio prie natyvaus baltymo prieš denatūraciją fluorescencija, esant denatūracijos temperatūrai T_m , y_{U,T_m} – dažo-išsivyniojusio baltymo komplekso fluorescencija, esant T_m temperatūrai, m_N ir m_U – atitinkamai, natyvaus ir išsivyniojusio baltymo fluorescencijos tiesių pokrypio kampai, baltymo denatūracijos termodinaminiai parametrai: $\Delta_U H$ - entalpija, $\Delta_U S$ - entropija, $\Delta_U C_p$ - šiluminė talpa, kuri laikoma pastovia ir nustatoma kitais metodais, T – absoliuti temperatūra Kelvinais.

Denatūracijos temperatūros pokytis apibūdina ligando poveikį baltymo stabilumui: ligandui stipriau jungiantis prie natyvos būsenos, baltymo T_m padidėja, o jungiantis prie denatūruotos - baltymas destabilizuojamas ir sumažėja T_m . Baltymą stabilizuojančių junginių (daugumos CA slopiklių) giminingumą (K_b) baltymui įvertinti, tiriama T_m priklausomybė nuo pridėto ligando koncentracijos, kuri aprašoma lygtimi:

$$L_t = (1 - K_U) \left(\frac{P_t}{2} + \frac{1}{K_b K_U} \right) \quad (10)$$

Čia L_t ir P_t – bendros ligando ir baltymo koncentracijos, K_U ir K_b – denatūracijos ir jungimosi konstantos. Baltymo denatūracijos ir jungimosi pusiausvyros konstantų priklausomybės nuo temperatūros išraiškas įrašius į lygtį (10), gaunamas modelis, kurį derinant prie eksperimentiškai su skirtingomis ligando koncentracijomis nustatytų T_m verčių, apskaičiuojama ligando jungimosi konstanta K_b [104,105].

Eksperimentinės sąlygos. Baltymo ir ligando sąveikai tirti ruošiami mėginiai (10-20 μ l) vienodais tūriais maišant baltymo tirpalą su serijiniu būdu praskiestais įvairių koncentracijų ligando tirpalais. Galutinės koncentracijos mėginyje: 5 μ M baltymo, 50 μ M ANS, 0–200 μ M ligando, iki 2 % DMSO (v/v), 50 mM fosfatinio buferio su 50 mM NaCl (pH 7,0). Visi eksperimentai kartoti 2-3 kartus. Tiriant CA XIV ir komercinio slopiklio EZA sąveikos priklausomybę nuo pH, baltymo ir ligandų skiedimui naudotas universalus buferis (Britton-Robinson), kuris dėl rūgštinių (H_3BO_3 , H_3PO_4 , CH_3COOH) ir bazinių (NaOH) komponentų apima platų pH intervalą. Įvairių buferių ir reagentų įtakos baltymo stabilumui nustatymui 2x įvairių reagentų tirpalais maišomi vienodais tūriais su 2 μ M baltymo tirpalu, kuriame mažos druskų ir buferio koncentracijos (5 mM TRIS, 2 mM NaCl, pH 7).

Mėginiai analizuojami realaus laiko PGR sistema „Rotor-Gene 6000“ („QIAGEN Rotor-Gene Q“). Sužadinama 365 nm bangos ilgio šviesa, o fluorescencija registruojama ties

460 nm bangos ilgiu. Temperatūra keliama nuolatiniu 1 °C / min greičiu nuo 25 °C iki 99 °C temperatūros. Gauti rezultatai apdorojami *ThermoFluor++ 1.4.2* ir *Microsoft Office Excel* programomis.

2.5.5. Fermentinio aktyvumo tyrimas sustabdytos srovės CO₂ hidratacijos metodu

Fermento aktyvumas tirtas sustabdyto srovės (tėkmės) CO₂ hidratacijos metodu (angl. *stopped-flow*). Tai tokia srauto įpurškimo analizės rūšis, kuomet du reagentų tirpalai vienu metu išvirkščiami į maišymo kamerą ir toliau teka iki spektrofotometro kiuvetės, kur periodiškai stabdomas srautas ir registruojami reagentų ar produktų absorbcijos pokyčiai. Su šio metodo įranga, laikas nuo tirpalų sumaišymo iki matavimų pradžios siekia milisekundes, todėl galima tirti itin greitas reakcijas.

Karboanhidrazių kinetiniams eksperimentams naudojami du tirpalai: pirmąjį sudaro karboanhidrazė, buferinis tirpalas ir indikatorius, o antrąjį - CO₂ dujomis prisotintas dejonizuotas (18,2 MΩ·cm) vanduo. Sumaišius šiuos tirpalus fiksuojama indikatoriaus sugerties spektro priklausomybė nuo laiko, esant pastovaus bangos ilgio šviesai. Jeigu karboanhidrazė aktyvi ir katalizuoja CO₂ hidrataciją, susidarantys vandenilio jonai rūgština tirpalo pH ir stebimas indikatoriaus šviesos sugerties mažėjimas iki kol nusistovi pusiausvyra. Kaip kontrolė tiriama CO₂ savaiminė hidratacijos reakcija, kuri atliekama tokiomis pačiomis sąlygomis, tik į pirmąjį tirpalą nededama fermento. Pagal indikatoriaus šviesos sugerties pokytį per laiko vienetą apskaičiuojami fermento kinetiniai parametrai. Reakcijos greitis v yra lygus susidariusių protonų $[H^+]$ kiekiui per laiko vienetą ir kiekvienam buferiniam tirpalui apskaičiuojamo faktoriaus Q_{buf} sandaugai [106]:

$$v = \left(\frac{d[H^+]}{dt} \right) \times Q_{buf} \quad (11)$$

Fermentinio aktyvumo slopinimo parametrai (IC_{50} , K_i) gaunami tiriant fermento aktyvumą su skirtingomis slopinklio koncentracijomis ir prie eksperimentinių duomenų mažiausių kvadratų metodu derinant dozavimo kreivę pagal pasirinktą modelį.

Didžiausią greitį prilyginus 100 % CA aktyvumui ir eksperimentinius duomenis aproksimavus lygtimi (12), nustatoma slopinklio koncentracija, sumažinanti CA aktyvumą 50 % (IC_{50}).

$$\% \text{ Aktyvumas} = 1 - \frac{100}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{[I]}\right)^h} \quad (12)$$

Čia [I] - slopiklio koncentracija, h - Hilo koeficientas, apibūdinantis jungimosi stochiometriją ir dozavimo kreivės nuolydį.

Kadangi CA slopikliai jungdamiesi prie laisvo fermento aktyviojo centro ir užimdami substrato vietą, yra konkurenciniai, slopinimo arba slopiklio-fermento komplekso disociacijos konstanta (K_i) apskaičiuojama taikant Cheng-Prusoff lygtį:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[CO_2]}{K_M}} \quad (13)$$

Kur $[CO_2]$ – CO_2 koncentracija, K_M - Michaelis-Menten konstanta. Stipriai besijungiančių slopiklių K_i (arba apskritai ligandų K_d) vertes galima nustatyti derinant Morisono modelį [107], kuris aprašo prisijungusios frakcijos f_b priklausomybę nuo jungimosi konstantos (K_b), bendros pridėto ligando (L_t) ir baltymo (P_t) koncentracijų:

$$f_b = \frac{P_t + K_b L_t P_t + K_b P_t^2 - \sqrt{(P_t + K_b L_t P_t + K_b P_t^2)^2 - 4K_b^2 P_t^3 L_t}}{2K_b P_t^2} \quad (14)$$

Eksperimentinės sąlygos: Tyrimams naudotas sustabdytos tėkmės spektrofotometras („Applied Photophysics SX.18MV-R“). Reakcijos buferinį tirpalą sudarė 20 mM Hepes (pH 8), 100 mM NaCl ir 40 μ M indikatoriaus bromtimolio mėlynojo. Fermentinio aktyvumo matavimuose naudota 0–200 nM CA XIV, o slopinimo tyrimuose – 200 nM fermento ir 0.01–10000 nM slopiklio. Slopiklio ir baltymo tirpalai prieš matavimą inkubuojami 15 min 25 °C temperatūroje, kad galėtų susidaryti fermento-slopiklio kompleksas. Matavimai pakartojami po du kartus. Gauti duomenys apdorojami ir skaičiavimai atliekami *Microsoft Office Excel* programa

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

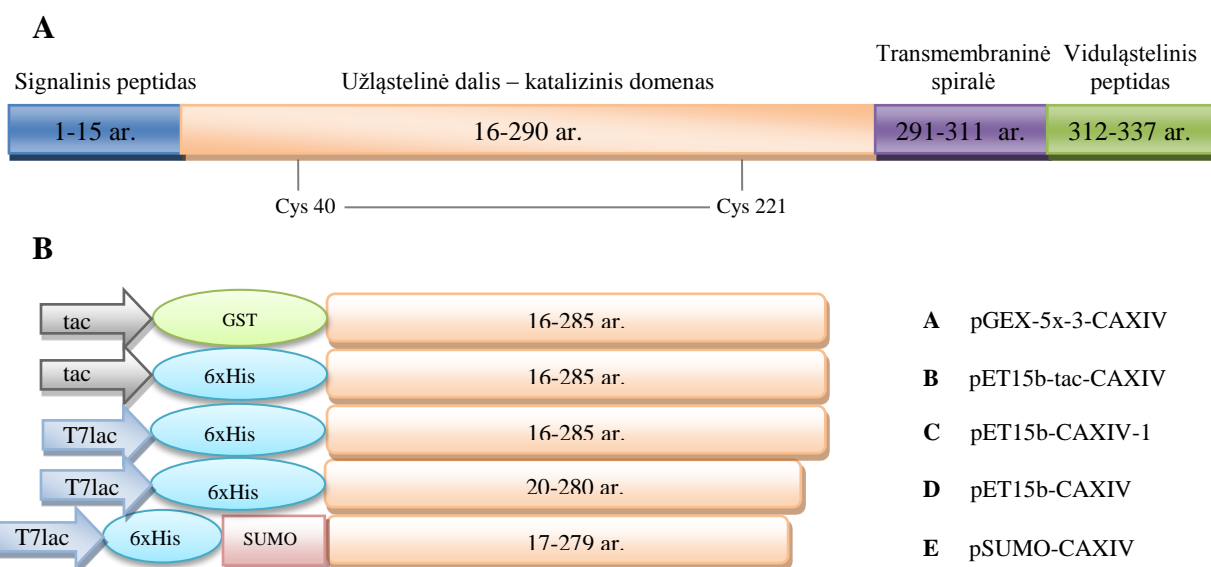
3.1. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės XIV ekspresijos sąlygų *E. coli* ląstelėse paieška ir gryninimas

Nuo Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriaus susikūrimo pradžios 2005 m., buvo bandoma gauti rekombinantinę žmogaus karboanhidrazę XIV *E. coli* ląstelėse. Per šį laikotarpį sukurta iš viso 10 genetinių konstrukcijų su visą baltymą ar tik užląstelinį katalizinį domeną koduojančiu CA XIV genu, išbandyti įvairūs rekombinantinių baltymų raiškos kamieniai, taip pat kelerius metus laboratorijoje buvo bandomos įvairios CA XIV renatūracijos iš intarpinių kūnelių sąlygos, tačiau tirpaus ir aktyvaus baltymo nepavyko gauti.

Savo mokslinį tiriamąjį darbą šiame skyriuje pradėjau nuo CA XIV užląstelinį domeną koduojančio geno raiškos ir *E. coli* ląstelių augimo sąlygų paieškos, naudojant 2012 m. David Bolanos sukurtą rekombinantinę plazmidę pET15b-CAXIV (20-280 ar.) (6 pav.). Taip pat tomis pačiomis sąlygomis išbandytos ir kitos, anksčiau skyriuje sukurtos, plazmidės (6 B pav.). Nors Nishimori su kolegomis [108] aprašė viso ilgio CA XIV koduojančio geno sėkmingą raišką *E. coli* ląstelėse, tačiau atkartojus visas nurodytas sąlygas, tirpaus baltymo gauti nepavyko. Iš dalies, tai nekelia nuostabos, nes heterologinių membraninių baltymų biosintezė *E. coli* ląstelėse retai kada būna efektyvi ir mokslininkai rekomenduoja ekspresuoti tokius baltymus be hidrofobinių segmentų, žinoma, jei tai nekeičia jų aktyvumo [84]. CA XIV kataliziniam aktyvumui įtakos neturi jos sudėtyje esantys signalinis, viduląstelinis peptidai ir transmembraninė spiralė (6 pav. A), todėl raiškos tyrimams pasirinktos genetinės konstrukcijos koduojančios sutrumpintą baltymą. CA XIV katalizinis domenai yra globulinis, monomerinis (~30 kDa dydžio), sąlyginai nesudėtingos tretinės struktūros ir turi tik vieną disulfininį tiltelį, tačiau didžioji dalis baltymo, nepriklausomai nuo naudojamo raiškos vektoriaus, ekspresuojama intarpinių kūnelių pavidalu. Modifikuojant ląstelių auginimo ir biosintezės indukcijos sąlygas, pavyko gauti, nors ir nedidelius kiekius, tirpaus ir aktyvios CA XIV.

Rekombinantinė CA XIV gryninta 16 kartų iš 6-25 g biomasės metalo chelatine chromatografija, o esant daug pašalinių baltymų, ir per antrą chromatografinę kolonėlę su p-aminometilbenzeno sulfonamidais modifikuota agaroze. Geriausiomis raiškos sąlygomis gaunama baltymo išeiga yra ~0,4 mg iš 1 l terpės. Lyginant su kitomis CA, citozolinių CA išeiga iš *E. coli* ląstelių siekia mažiausiai 5 mg iš 1 l terpės, o kitos membraninės CA IV ir CA

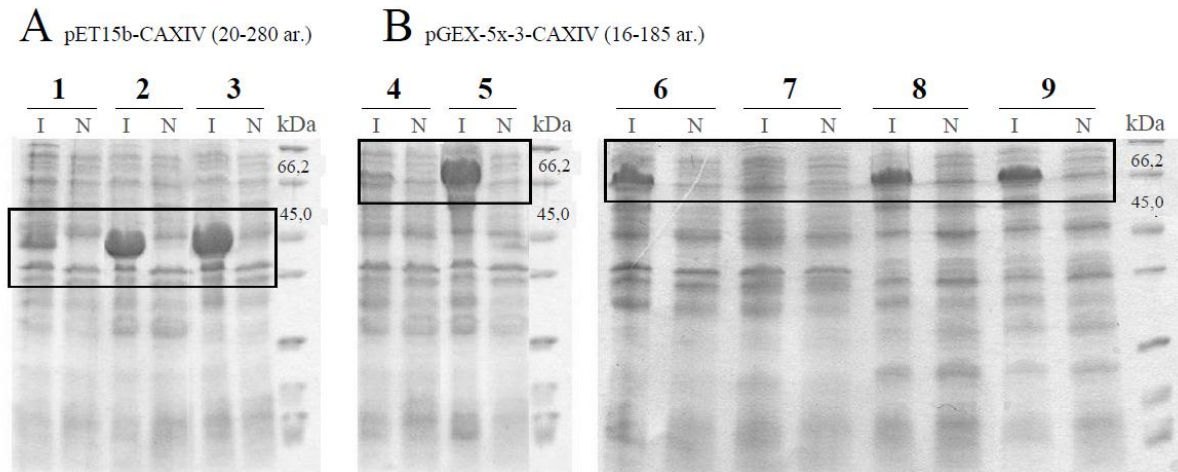
IX mūsų skyriuje gaunamos tik žinduolių ląstelių kultūrose. Įvairios auginimo ir raiškos sąlygos išbandytos auginant ląsteles mažesniuose terpės tūriuose, todėl apie baltymo tirpumo pokyčius spręsta vizualiai iš poliakrilamido gelių, kuriuose frakcionuotos iš 1 g biomasės lizato atskirtos tirpių ir netirpių baltymų frakcijos ar eliuato frakcijos po gryninimo metalo chelatine chromatografija (žr. skyriuje „Medžiagos ir metodai“). Gautų baltymų molekulinės masės nustatytos masių spektroskopijos metodu (atliko dr. V. Smirnovas) ir atitiko programa „ProtParam“ apskaičiuotas teorines mases.



6 pav. CA XIV domeninės struktūros schema (UniProtKB nr. Q9ULX7) (A) ir tiriamajame darbe naudotos genetinės konstrukcijos (B), besiskiriančios tarpusavyje katalizinį domeną koduojančio geno ilgiu ir raiškos vektoriumi. A, C, D, E plazmidės sukurtos anksčiau su tiksliniu baltymu dirbusių kolegų, o B plazmidė buvo sukurta tiriamojo darbo metu, įterptine mutageneze pakeitus C plazmidės promotorių.

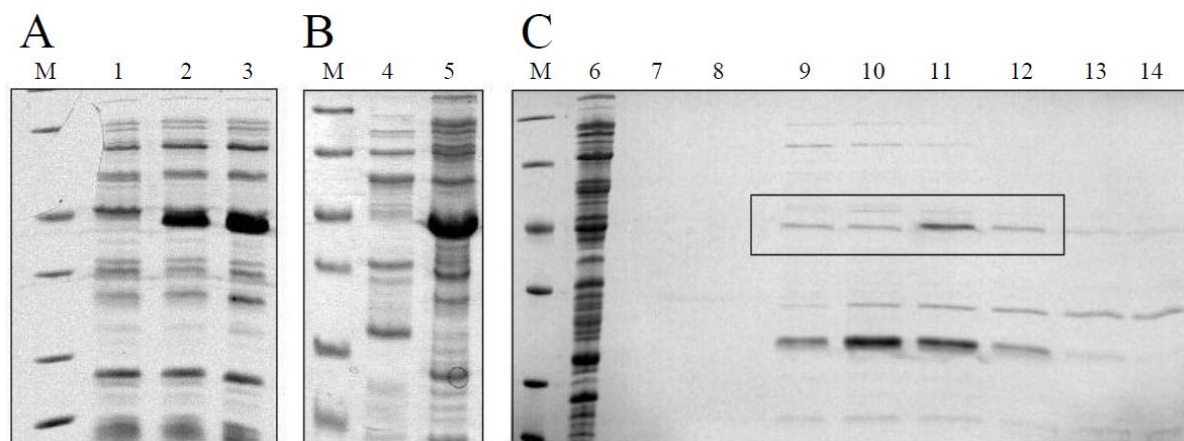
3.1.1. CA XIV geno raiškos sąlygų optimizavimas, *E. coli* kamienų, raiškos vektorių parinkimas

Pasirinktomis rekombinantinėmis plazmidėmis transformuoti BL21(DE3) ir jo išvestiniai kamienai: BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)CodonPlus–RIL, BL21 „Star“ (DE3) One Shot, Rosetta 2(DE3). Baltymo sintezė indukuota 1 mM IPTG, papildomai į terpę pridedama CA kofaktoriaus - 0,5 mM ZnCl₂. Ląstelės po indukcijos augintos 20 °C temperatūroje per naktį (16 val.). CA XIV sintezės lygis įvertintas poliakrilamido gelyje (NSD-PAGE) (7 pav.).



7 pav. CA XIV sintezės lygio įvertinimas poliakrilamido gelyje, kai genetinėmis konstrukcijomis transformuojami įvairūs *E. coli* kamienai. Baltymų dydžio nustatymui greta frakcionuojami baltymų dydžio standartai. **A:** 1 –pET15b-CAXIV (20-280 ar.) transformuotų BL21(DE3)pLysS ląstelių mėginiai po ir prieš baltymo sintezės indukciją; 2 – BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių mėginiai po ir prieš baltymo sintezės indukciją; 3 – BL21(DE3) ląstelių mėginiai po ir prieš baltymo sintezės indukciją; **B:** 4 –pGEX-5x-3-CAXIV (16-285 ar.) transformuotų BL21(DE3)pLysS ląstelių mėginiai po ir prieš baltymo sintezės indukciją; 5 –BL21(DE3)CodonPlus–RIL ląstelių mėginiai po ir prieš baltymo sintezės indukciją; 6 – BL21(DE3) ląstelių mėginiai po ir prieš baltymo sintezės indukciją; BL21 Star (DE3)One Shot ląstelių mėginiai po ir prieš baltymo sintezės indukciją; 8 – Rosetta 2(DE3) ląstelių (augintų LB terpėje) mėginiai po ir prieš baltymo sintezės indukciją; 9 – Rosetta 2(DE3) ląstelių (augintų BHI terpėje) mėginiai po ir prieš baltymo sintezės indukciją.

Matyti, jog beveik visuose kamienuose vyko intensyvi arba vidutinė CA XIV biosintezė, išskyrus BL21(DE3)pLysS ir BL21 Star (DE3)One Shot kamienus, kurių nuspręsta nenaudoti tolimesniuose raiškos sąlygų optimizavimo etapuose. CA XIV (16-279 ar.) N-galu sulietos su 11 kDa SUMO (angl. *Small Ubiquitin-like Modifier*) baltymu (koduojamu pSUMO-CAXIV plazmidės), ekspresija buvo itin maža visuose kamienuose ir tirpaus baltymo gauti nepavyko. Deja, ir intensyvi ekspresija negarantuoja baltymų tirpumo (8 pav.) - visa CA XIV buvo netirpioje ląstelės baltymų frakcijoje nepriklausomai nuo baltymų raiškos kamieno ar naudojamos rekombinantinės plazmidės. Šiek tiek daugiau tirpaus baltymo buvo gauta ekspresuojant CA XIV (16-285 ar.) kartu su 26 kDa glutationo S-transferaze (GST). Sulietas baltymas gryninamas afinine chromatografija per sefarozę su imobilizuotu glutationu, bet dalis jo prarasta GST fermentinio atskėlimo metu. Dėl papildomos procedūros, ši raiškos sistema nebuvo toliau naudojama, bet tolimesniems tyrimams pasirinktas genetinis konstruktas su tokio paties ilgio CA XIV geno seka.



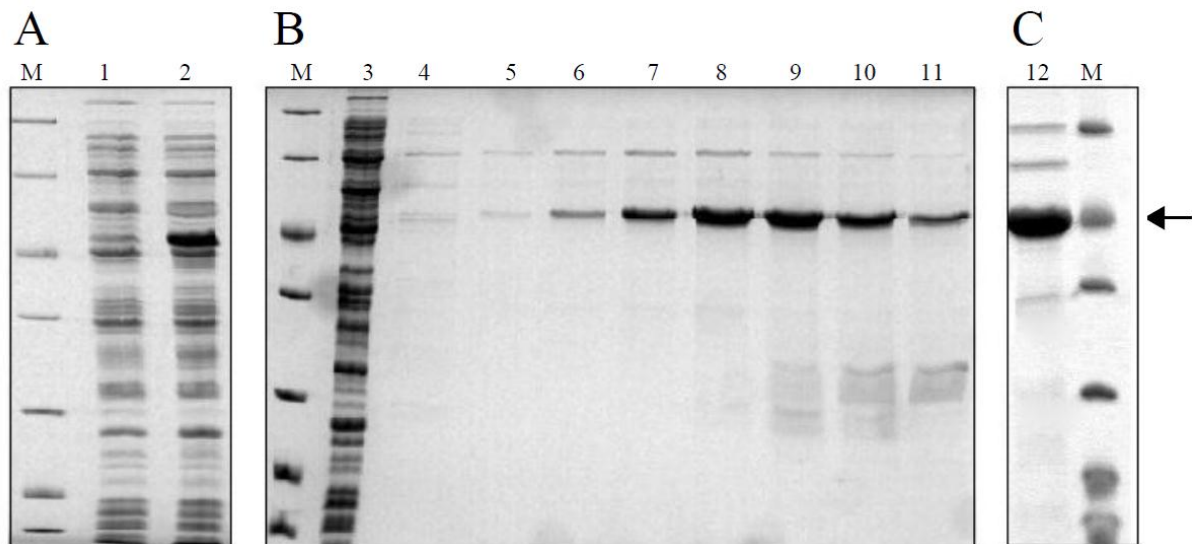
8 pav. CA XIV sintezės lygio (A), tirpumo (B) ir frakcijų po gryninimo metalo chelatinės chromatografijos metodu (C) įvertinimas elektroforetiškai poliakrilamidiniuose geliuose. pET15b-CAXIV (20-280 ar.) transformuotos Rosetta 2(DE3) ląstelės po baltymo sintezės indukcijos, pridėjus 1 mM IPTG, 0,5 mM ZnCl₂, augintos 20 °C 16 val. Gryninta iš 10 g biomasės. Takeliai: M – baltymų dydžio žymuo; 1 – mėginiai paruošti iš ląstelių, surinktų prieš tikslinio baltymo sintezės indukciją; 2,3 – ląstelių mėginiai po 4 val. ir 16 val. nuo indukcijos pradžios; 4, 5– tirpių ir netirpių baltymų frakcijos; 6 – tirpių baltymų frakcija prieš gryninimą; 7-14 - frakcijos su rekombinatine CA XIV, kuri desorbuota didinančiomis imidazolo koncentracijomis.

Kaip jau minėta 1.3. skyriuje, pagrindine baltymų netirpumo priežastimi gali būti per daug efektyvi baltymo sintezė, dėl kurios nespėję tinkamai susivynioti polipeptidai ima jungtis į amorfines baltymų sankaupas. Paprastai, baltymų sintezės lygis sumažinamas pažeminant ląstelių auginimo temperatūrą (iki 16 °C ar žemesnės) ir / arba pridėdant mažiau induktoriaus bei ląstelių auginimui naudojant nesudėtingas mitybines terpes (pvz., LB). Žemoje temperatūroje sulėtėja ląstelių biocheminiai procesai, o plazminė membrana tampa mažiau laidi IPTG. Šiems tyrimams pasirinktos pET15b-CAXIV-1 (16-285 ar.) ir pET15b-CAXIV (20-280 ar.) rekombinantinės plazmidės, kurios koduoja skirtingo ilgio CA XIV. Remiantis laboratorijos praktika dirbant su kitomis CA, pasirinkti du kamienai: BL21(DE3) ir eukariotinių baltymų ekspresijai pritaikytas Rosetta 2(DE3). 4 lentelėje pateiktos išbandytos indukcijos sąlygos, keičiant IPTG ir ZnCl₂ koncentraciją kas 0,2 mM, kultūrų auginimo temperatūra ir trukmė po indukcijos.

4 lentelė. Indukcijos sąlygos bei kultūrų auginimo temperatūra ir trukmė po indukcijos.

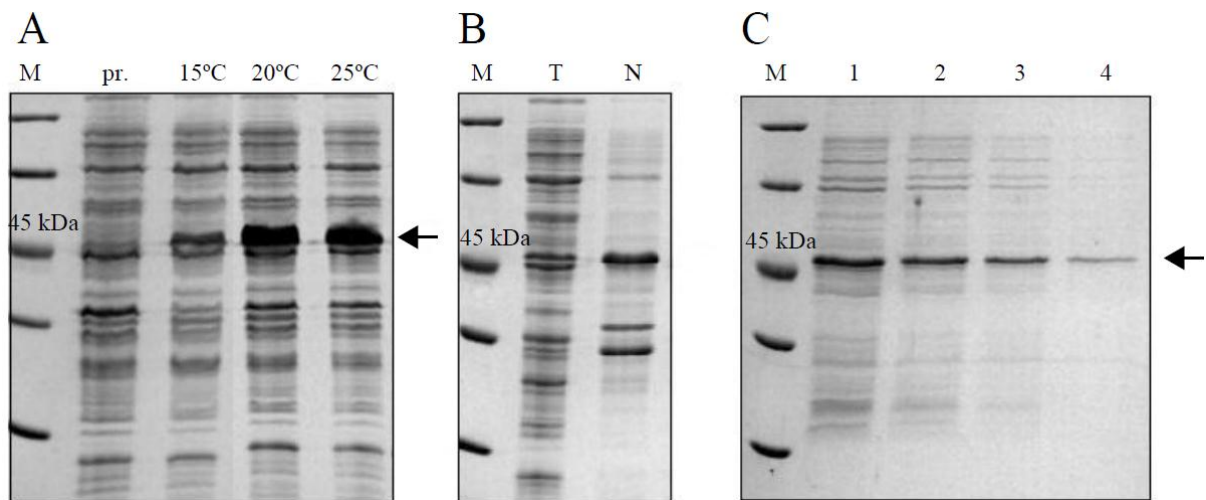
Temperatūra (°C)	Laikas (val.)	IPTG, mM	ZnCl ₂ , mM
16-18	16-20		
20	16		
25	16	0,1 – 1,0	0,1 – 0,6
30	5-6		
37	3		

Daugiausia tirpaus baltymo gauta, naudojant pET15b-CAXIV-1 (16-285 ar.) konstrukta, sintezę indukuojant 0,5 mM IPTG, taip pat papildomai pridedama 0,5 mM ZnCl₂ ir po indukcijos ląsteles auginant 16 °C, 20 val. (9 pav.). Tokioje temperatūroje ląstelės auga itin lėtai ir iš to paties terpės tūrio gaunama dvigubai mažiau biomasės.



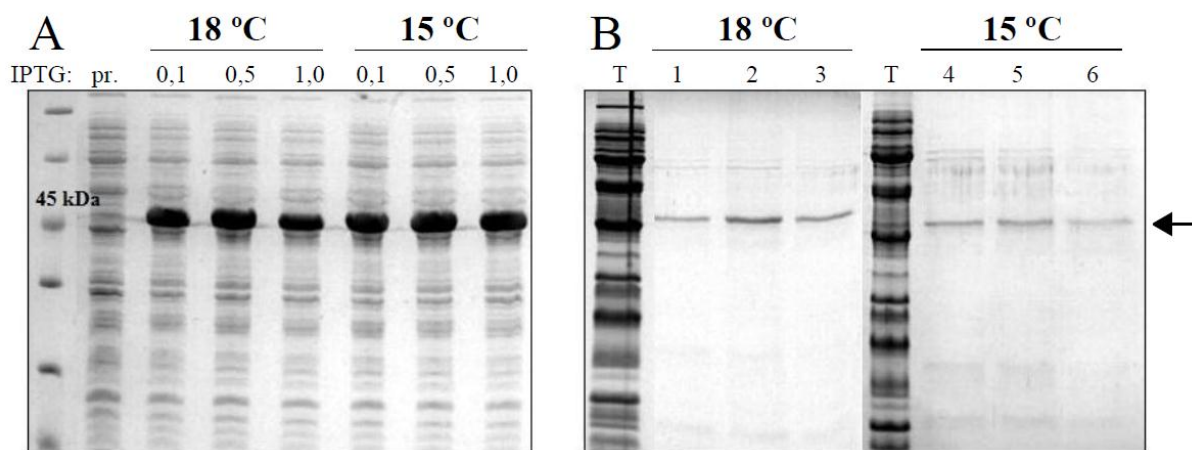
9 pav. CA XIV sintezės lygio (A), frakcijų po gryninimo metalo chelatinės chromatografijos metodu (B) ir baltymo tirpalo po dializės bei koncentravimo (C) įvertinimas elektroforetiškai poliakrilamidiniuose geliuose. C-pET15b-CAXIV-1 (16-285 ar.) transformuotos Rosetta 2(DE3) ląstelės po baltymo sintezės indukcijos, pridėjus 0,5 mM IPTG, 0,5 mM ZnCl₂, augintos 16 °C 20 val. Gryninta iš 6 g biomasės. Takeliai: M – baltymų dydžio žymuo; 1, 2 – mėginiai paruošti iš ląstelių, surinktų prieš baltymo sintezės indukciją ir po jos; 3 – tirpių baltymų frakcija prieš gryninimą; 4-11 – frakcijos su rekombinatine CA XIV, kuri desorbuota didinant imidazolo koncentraciją; 12 – baltymo tirpalas prieš šaldymą. Baltymų juostos virš CA XIV gali būti šaperonai, kurių nedidelis kiekis likdavo ir po antros afininės chromatografijos kolonėlės.

CA XIV agregacijos ar netinkamo susivyniojimo priežastimi gali būti ir disulfidinio tiltelio (Cys40-Cys221) nesusiformavimas redukuojančiomis savybėmis pasižyminčioje *E. coli* citoplazmoje. Vienas iš šios problemos sprendimų būdų – mutantinių *E. coli* kamienų naudojimas. Origami B(DE3) ir Rosetta-gami 2(DE3) kamienų citoplazmoje, dėl inaktyvuotų pagrindinių *E. coli* reduktazių *gor* ir *trxB* genų, sukuriama palankesnė aplinka disulfidinių tiltelių susidarymui. pET15b-CAXIV-1 (16-285 ar.) rekombinantine plazmide transformuotose Origami B(DE3) ląstelėse baltymo sintezė indukuota naudojant 0,1, 0,5 ir 1,0 mM IPTG koncentracijas ir po indukcijos ląsteles auginant žemesnėje temperatūroje (10 A pav.). Sprendžiant iš baltymų poliakrilamidinių gelių, daugiausia tirpaus baltymo gauta sintezę indukuojant 0,5 mM IPTG ir ląsteles auginant 15 °C temperatūroje (10 pav. B, C). Tokiomis pačiomis sąlygomis ekspresuojant CA XIV baltymą Rosetta-gami 2(DE3) kamiene, tirpaus baltymo negauta, nors sintezės lygis aukštas.



10 pav. CA XIV sintezės lygio ir tirpumo Origami B(DE3) kamiene įvertinimas NSD-PAGE metodu. A – po indukcijos skirtingose temperatūrose auginų *E.coli* lizatai. Baltymo sintezės indukcijai naudota 0,5 mM IPTG, 0,5 mM ZnCl₂. M – baltymų dydžio standartai; pr – ląstelių mėginys prieš indukciją. B – ląstelių, po indukcijos auginų 15 °C temperatūroje, tirpių (T) ir netirpių (N) baltymų frakcijų analizė. C – tirpios frakcijos gryninimas metalo chelatine chromatografija. 1-4 – eliuato frakcijos.

Įterptine mutageneze C-pET15b-CAXIV-1 (16-285 ar.) plazmidėje buvo pakeistas *T7lac* promotorius silpnesniu indukuojamu promotoriumi *tac*. Tai hibridinis promotorius, nes jį sudaro –35 sritis iš triptofano operono promotoriaus ir –10 sritis bei lac operatorius lacO iš mutantinio lacUV5 promotoriaus. *tac* ir *T7lac* promotoriai skiriasi savo stiprumu ir reguliacijos griežtumu. Tikėtasi, jog dėl gana didelio *tac* promotoriaus bazinio aktyvumo neindukuojančiose sąlygose ir mažesnio indukcijos lygio lyginant su *T7* promotoriumi, vyks ne tokia intensyvi biosintezė, transliacijos produktai kaupsis po truputį ir sumažėjus agregacijai bus gaunama daugiau tirpaus baltymo. Deja, gautas priešingas efektas – po indukcijos Rosetta 2(DE3) ląsteles auginant žemoje temperatūroje, nepriklausomai nuo pridėdama IPTG kiekio, pasiekiamas išskirtinai aukštas sintezės lygis (11 pav. A). Įvertinus tirpumą (12 pav. B), galime teigti, jog dėl tokios intensyvios ekspresijos, beveik visas CA XIV baltymas sintetinamas intarpiniuose kūneliuose.



11 pav. Modifikuotos rekombinantinės plazmidės su *tac* promotoriumi koduojamos CA XIV (16-285 ar.) sintezės lygio (A) ir tirpumo (B) įvertinimas NSD-PAGE metodu. **A** takeliai: pr - ląstelių mėginys prieš indukciją; kituose takeliuose ląstelių lizatai po indukcijos, o virš jų nurodyta indukcijai naudojama IPTG koncentracija (mM). **B** takeliai: T – tirpių baltymų frakcija; 1-3 – eliuato frakcijos po gryninimo metalo chelatine chromatografija (indukcijai naudota 0,5 mM IPTG, 18 °C), 4-6 – eliuato frakcijos po gryninimo metalo chelatine chromatografija (indukcijai naudota 0,5 mM IPTG, 15 °C).

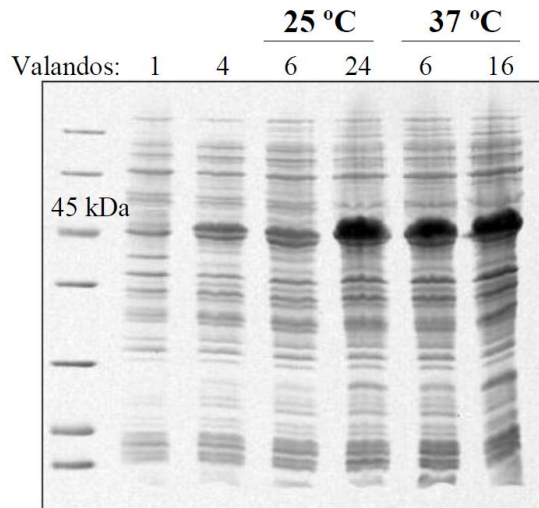
3.1.2. *E. coli* ląstelių auginimas autoindukcinėje ZYM-5052 mitybinėje terpėje

Tikslinio baltymo sintezės savaiminę indukciją užtikrina autoindukcinės terpės komponentai – gliukozė, laktozė ir antriniai anglies šaltiniai (pvz. glicerolis). Tokio terpėje auginamos ląstelės, pirmiausiai kaip pagrindinį energijos ir anglies šaltinį naudoja gliukozę. Vyksta katabolinė tikslinio geno raiškos represija. Ląstelėms sunaudojus gliukozę ir jos koncentracijai pasiekus slenkstinę ribą, ląstelės ima terpėje naudoti kitus anglies šaltinius. Tuomet, vykstant laktozės metabolizmui, susidariusi alolaktozė tampa natūraliu *lac* ir *lacUV5* promotorių induktoriumi. Taigi, ląstelių augimo greitis ir gliukozės koncentracija pradinėje terpėje lemia indukcijos pradžią.

Autoindukcinė mitybinė terpė turi keletą privalumų, lyginant su įprastomis: nereikia sekėti ląstelių augimo, nereikia naudoti induktoriaus ir ląstelių kultūros pasiekia daug didesnę optinį tankį. Remiantis moksline literatūra, naudojant šią terpę galima padidinti ne tik baltymo išėigą, bet ir tirpumą, kuomet ląstelės auginamos žemesnėje nei 37 °C temperatūroje [109]. Savaiminė indukcija galima su visomis *lac* promotoriaus pagrindu sukurtomis raiškos sistemomis (pvz., pET raiškos vektoriai) bei naudojami kamienai turi turėti veiklią laktozės transporto sistemą, t.y. turi būti *lacY*⁺.

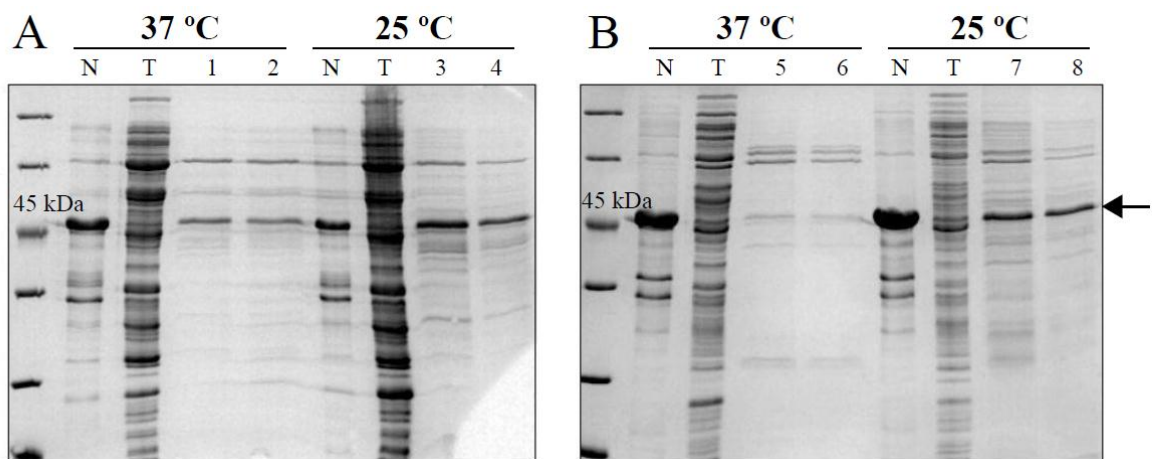
Šioje mitybinėje terpėje augintos Rosetta 2(DE3) ir BL21(DE3) ląstelės transformuotos pET15b-CAXIV (20-280 ar.) rekombinantine plazmide. *E. coli* ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje 4 val., po to gali būti keičiama temperatūra: 25 °C temperatūroje ląstelės toliau auginamos 24 val., o 37 °C temperatūroje - 16 val. Auginimo metu kas tam tikrą laiką

ruošiami biomasių mėginiai, kuriuos išfrakcionavus poliakrilamidiniame gelyje (12 pav.), CA XIV baltymo sintezės pradžią vizualiai stebime pagal jam būdingo dydžio baltymo zonos (~45 kDa) atsiradimą. Tikslinio baltymo sintezė prasidėjo kultūrai pasiekus maždaug 0,8-1,0 optinių vienetų tankį. Abiejuose kamieniuose, augintuose tiek 25 °C, tiek 37 °C temperatūrose, po indukcijai skirtu laiku nustatytas didelis tikslinio baltymo kiekis.



12 pav. CA XIV sintezės lygio autoindukcinėje terpėje augintose Rosetta 2(DE3) ląstelėse įvertinimas NSD-PAGE metodu. Baltymų dydžio nustatymui greta frakcionuojami baltymų dydžio standartai. Virš gelio nurodytas nuo ląstelių auginimo pradžios, kuomet buvo ruošiami mėginiai.

Baltymo tirpumas, tarp skirtingomis sąlygomis užaugintų biomasių, palygintas 13 paveiksle, kuriame matome, jog nepriklausomai nuo kamieno, gaunamas didesnis tirpaus baltymo kiekis *E. coli* ląsteles auginant žemesnėje temperatūroje.



13 pav. Tirpios CA XIV kiekio Rosetta 2(DE3) (A) ir BL21(DE3) (B) ląstelių lizatuose įvertinimas NSD-PAGE metodu. Analizei naudojama po 1 g biomasės. N – netirpių, T – tirpių ląstelių baltymų frakcijos. Skaičiais pažymėtos gautos frakcijos po gryninimo metalo chelatinės chromatografijos metodu.

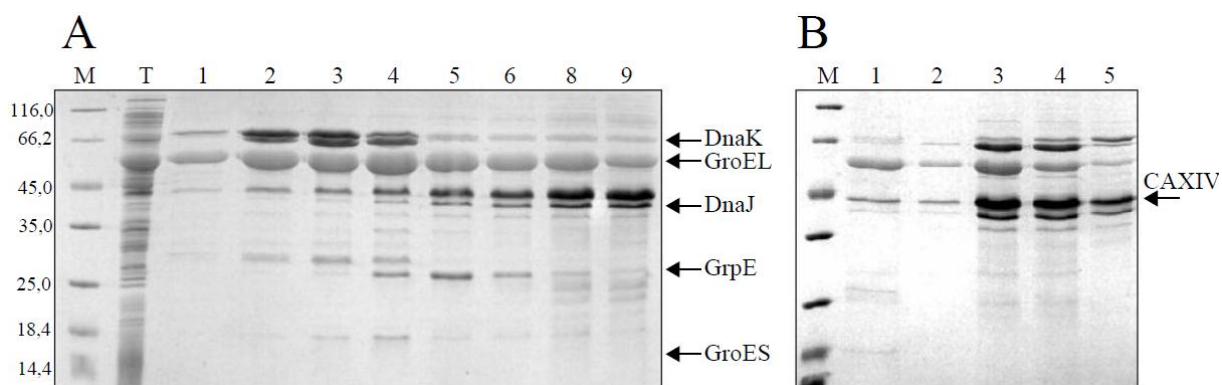
Autoindukcinės mitybinės terpės teigiama įtaka akivaizdi, nes tirpaus baltymo negaunama LB ar BHI terpėse po indukcijos ląsteles auginant 25 °C temperatūroje. Tačiau

vistiek autoindukcinėje terpėje didžioji dalis CA XIV ekspresuojama intarpinių kūnelių pavidalu.

3.1.3. CA XIV ir DnaK, GroES šaperonų šeimas koduojančių genų raiška BL21(DE3) kamienoje

Molekuliniai šaperonai aktyviai dalyvauja baltymų susivyniojimo procese, todėl manoma, jog tikslinio baltymo sintezės metu didesnis jų kiekis leistų išvengti netaisyklingo susivyniojimo ir agregacijos. Į BL21(DE3) kamieną buvo įvesta pG-KJE8 plazmidė su papildomomis DnaK-DnaJ-GrpE ir GroES-GroEL šaperonų šeimų genų kopijomis. Tik šis kamienas, neturintis atsparumo jokiems antibiotikams, buvo suderinamas su dvejomis rekombinantinėmis plazmidėmis, turinčiomis atsparumą ampicilinui ir chloramfenikoliui užtikrinančius genus. Remiantis naudojamos šaperonų plazmidės gamintojų rekomendacijomis ir moksliniuose straipsniuose aprašytais eksperimentais, DnaK-DnaJ-GrpE sintezės indukcijai naudota 3 mg/ml arabinozės, GroES-GroEL – 5 ng/ml tetraciklino, CA XIV – 0,5 mM IPTG, o po indukcijos ląstelės augintos 17 °C temperatūroje 16 valandų.

Molekulinių šaperonų naudojimas šiek tiek padidino CA XIV tirpumą (14 pav.), tačiau jų nepavyko pašalinti nuo tikslinio baltymo ir antro gryninimo etapo metu, naudojant p-aminometilbenzeno sulfonamidais modifikuota agaroze užpildytą kolonėlę. Tai šio metodo trūkumas, nes baltymo grynumas yra būtina sąlyga tiksliems baltymo-ligando sąveikos tyrimams biofizikiniais metodais.



14 pav. CA XIV frakcijų elektroforetinis vaizdas NDS-PAGE geliuose po gryninimo metalo chelatine (A) ir afinine (B) chromatografijomis. M - baltymų dydžio standartai. A takeliuose: T – tirpių baltymų frakcija prieš gryninimą; 1-9 – frakcijos po gryninimo metalų chelatine chromatografija; B takeliuose: 1-5 – frakcijos po gryninimo afinine chromatografija. Geliuose rodyklėmis pažymėtos šaperonų ir CA XIV dydžius atitinkančios baltymų juostos.

Apibendrinant, didžiausia poveikį tikslinio baltymo tirpumui turėjo biosintezės lėtinimas – tirpus ir aktyvus baltymas gautas indukuojant 0,5 mM IPTG ir ląsteles po

indukcijos auginant 16 °C temperatūroje. Tolesnio CA XIV raiškos *E. coli* ląstelėse optimizavimo metu, kuomet raiškai pasirinktas konstruktas koduojantis baltymą nuo 18 iki 285 aminorūgšties, Origami B(DE3) kamienas ir autoindukcinė terpė, išauga padidinta ~5 kartais. Tai yra geras rezultatas, kadangi kitų membraninių izoformų (CA IV ir CA IX) šioje laboratorijoje nėra pavykę gauti *E. coli* ląstelėse. Deja, slopiklių atrankai biofizikiniais metodais reikia didelių kiekių rekombinantinių baltymų, todėl toliau planuojama CA XIV raiškai išbandyti žinduolių ląstelių kultūras.

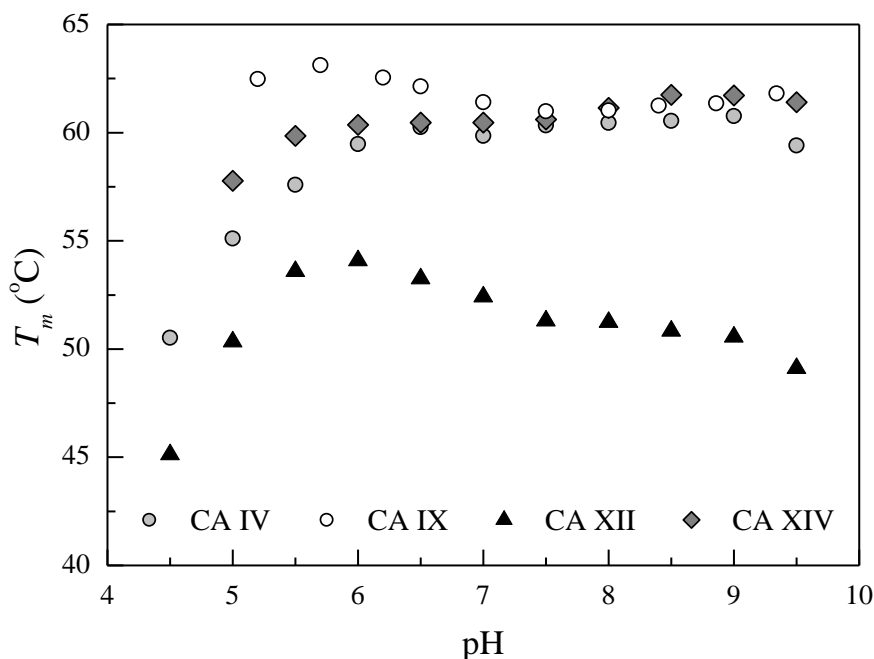
3.2. Įvairių reagentų ir pH įtakos rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės XIV terminiam stabilumui tyrimas

Natyvi baltymo struktūra yra jautri įvairiems išorės poveikiams: temperatūrai, *pH*, druskoms, mechaniniams stresams ir kitiems faktoriams. Fluorescenciniu terminio poslinkio (FTP) metodu galima įvertinti šių parametrų įtaką, siekiant identifikuoti labiausiai stabilizuojančius tirpalų komponentus arba kurių reikėtų vengti dirbant su konkrečiu baltymu. Tai gali būti naudinga renkantis saugojimo ir gryninimo buferinį tirpalą [110,111], siekiant sumažinti baltymų agregaciją, taip pat ieškant tinkamų sąlygų kristalinimo [112] ar kitiems eksperimentams [77].

Karboanhidrazės XIV stabilumas ištirtas įvairios sudėties ir pH buferinėse sistemose, o gauti stabilumo profiliai palyginti su kitomis membraninėmis karboanhidrazėmis (15-17 pav.). Naudojant FTP metodą, mėginiuose be baltymo ir tiriamų reagentų yra ir solvatochrominio dažo ANS, tačiau laikome, jog naudojama pastovi ir galutinė 50 μM ANS koncentracija neturi įtakos CA XIV stabilumui. Apie padidėjusį baltymo stabilumą sprendžiama iš lydymosi temperatūros T_m poslinkio į didesnių reikšmių sritį, kuomet baltymo išsivyniojimo reakcijos pusiausvyra pasislenka link natyvaus baltymo.

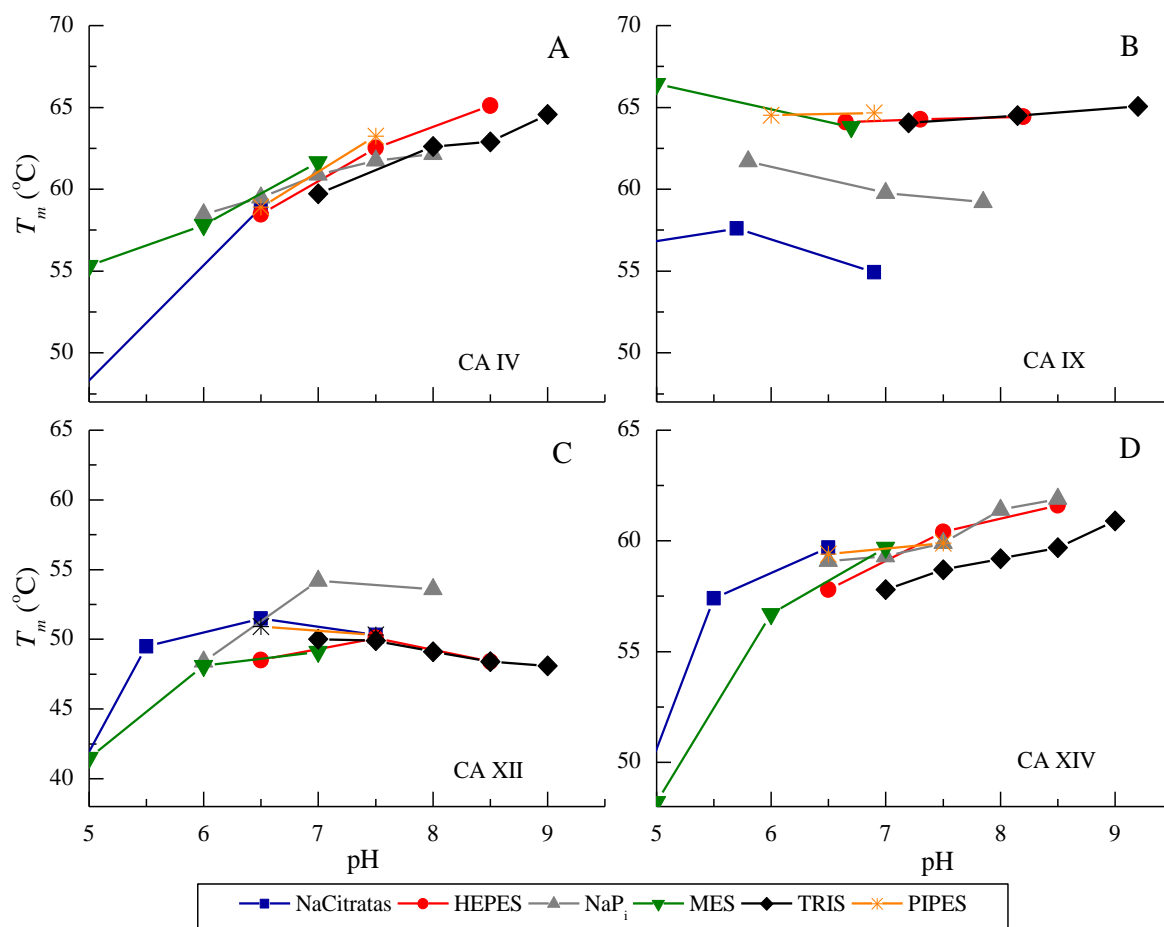
Tiriant pH įtaką stabilumui naudotas plataus pH intervalo universalus buferinis tirpalas (15 pav.). Nustatyta, jog visos membraninės karboanhidrazės, išskyrus CA XII, yra labai stabilios ir T_m praktiškai nekinta plačiame pH intervale nuo 5,5 iki 9,0. CA XII stabiliausia silpnai rūgštiniuose tirpaluose (pH 5,5 – 7,0), o T_m didžiausia vertė panaši į CA II ir mažesnė vidutiniškai 7,7 °C ± 1 °C nei stabiliausių CA IV, CA IX (monomero) ir CA XIV. Didžiausias stabilumas būdingas CA IX (dimeru T_m siekia net 80 °C) ir ši izoforma, skirtingai nuo kitų, išlieka stabili rūgštinėje terpėje (*pH* 3,5-6,5) – taip fermentas prisitaikęs aktyviai katalizuoti CO₂ hidrataciją hipoksinėmis sąlygomis [69]. CA IV ir CA XIV atveju, stabilumas plačiame pH intervale reikalingas jų fiziologinei funkcijai, nes sinapsėse nervinio impulso sukiamas

užšarmėjimas yra lydimas lėto pH mažėjimo ir smegenų užląstelinės terpės pH kinta 6,5-7,5 intervale (lokalūs svyravimai gali būti didesni) [1,113].



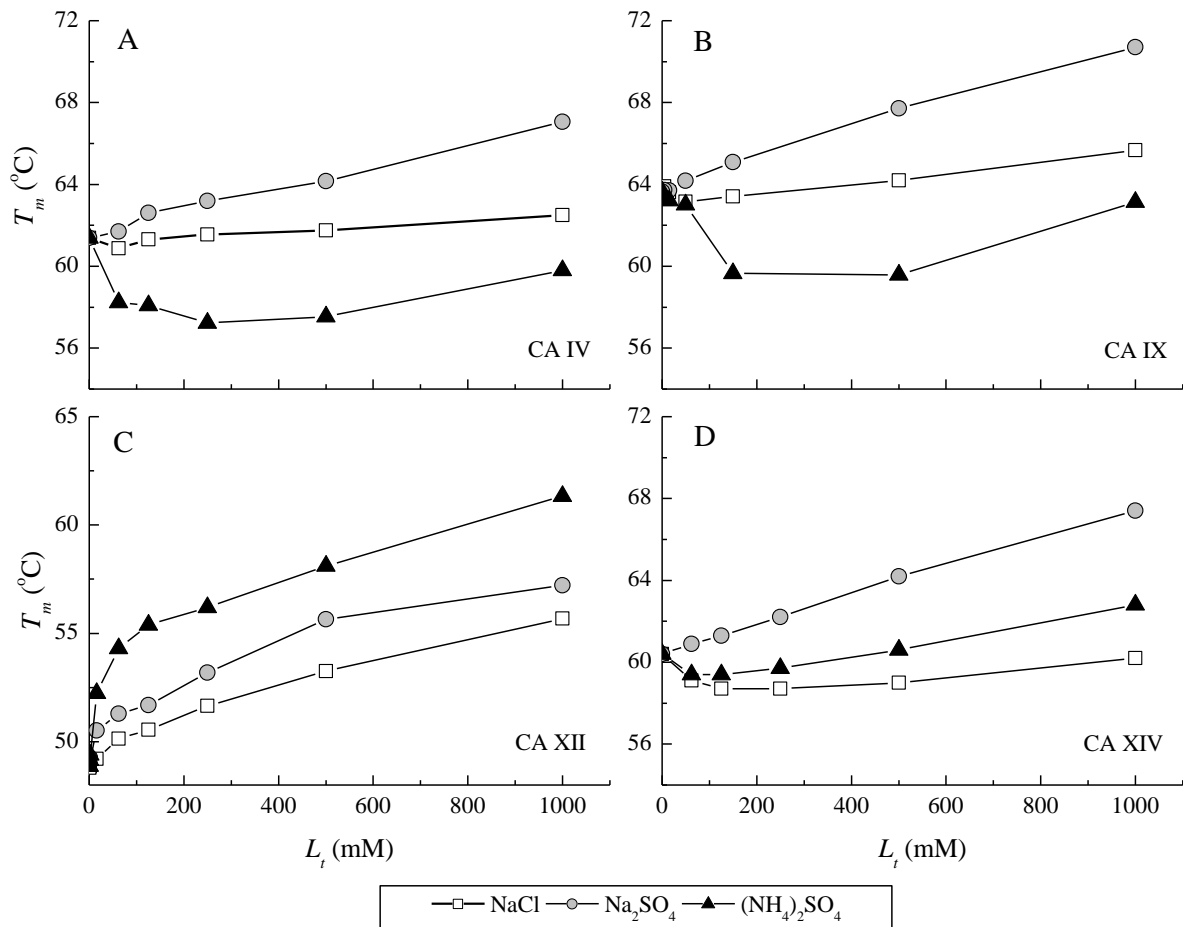
15 pav. Rekombinantinių žmogaus karboanhidrazių izoformų (IV^a, IX^b monomero, XII^c, XIV) stabilumo (T_m) priklausomybė nuo universalios buferio pH reikšmės. ^a dr. L. Baranauskienės nepublikuoti duomenys; ^b V. Morkūnaitės nepublikuoti duomenys; ^c vertės iš [114] šaltinio.

Taip pat įvertinta darbu su biologinėmis sistemomis dažniausi pasirenkamų įvairių buferinių tirpalų, kurie tinkami naudoti 5-9 pH intervale, įtaka (8 pav.). Matome, kad daugelis buferinių tirpalų neturi ypatingos įtakos stabilumui, išskyrus fosfatinį buferinį tirpalą, kuris, lyginant su kitais esant tam pačiam pH, stabilizuoja CA XII keturiais laipsniais, bet destabilizuoja CA IX. CA IX stabilumą mažina ir citratas, o kituose buferiniuose tirpaluose ji išlieka vienodai stabili visame tirtame pH intervale. CA XIV stabiliausia fosfatinio ir HEPES buferinių tirpalų 7,5-8,5 pH reikšmėse. Palyginus membraninių izoformų stabilumo profilius (15 ir 16 pav.), galime išvelgti panašumų tarp CA IV ir CA XIV (kai kuriuose audiniuose ekspresuojamos kartu) ir tarp vėžinių audinių izoformų CA IX ir CA XII, nors CA XIV pagal aminorūgščių sekų homologiją ir erdvinę struktūrą panašiausia į CA XII.



16 pav. Rekombinantinių žmogaus karboanhidrazių izoformų CA IV^a (A), CA IX^b (B), CA XII^c (C), CA XIV (D) stabilumo (T_m) priklausomybė nuo skirtingų 100 mM buferinių tirpalų pH reikšmių. Legendoje nurodytos tirtos buferinės medžiagos. ^a dr. L. Baranauskienės nepublikuoti duomenys; ^b V. Morkūnaitės nepublikuoti duomenys; ^c vertės iš [114] šaltinio.

Į baltymų tirpalų sudėtį be buferinių medžiagų dažnai įtraukiami papildomi komponentai, kurie reikalingi optimalių sąlygų palaikymui. Druskos naudojamos didinti baltymų tirpumą ir imituoti fiziologinę aplinką. Kai kurių iš jų poveikis parodytas 9 pav. Natrio sulfatas stabilizuoja visas membranines izoformas (stabilumas didėja, didėjant koncentracijai), o natrio chloridas praktiškai neturi įtakos arba didesnės koncentracijos šiek tiek destabilizuoja. Su CA XIV tirti ir kiti tirpalų priedai: įvairios chlorido druskos (100 mM: KCl, LiCl; 5 mM: MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂; 10 μM: NiCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, CoCl₂); 5 mM metalų chelatoriai EDTA; denatūrantai (60-1000 mM guanidino chlorido ir karbamido); baltymų stabilizavimui naudojamos medžiagos: 25-50 mM L-argininas ir 2-10 % glicerolis; 25-50 mM gliukozė ir 2-10 % DMSO (organinis tirpiklis, kuriame tirpinti tiriami ligandai). Tačiau potencialių stabilizatorių nenustatyta – tirti reagentai silpnai destabilizavo CA XIV arba neturėjo poveikio.



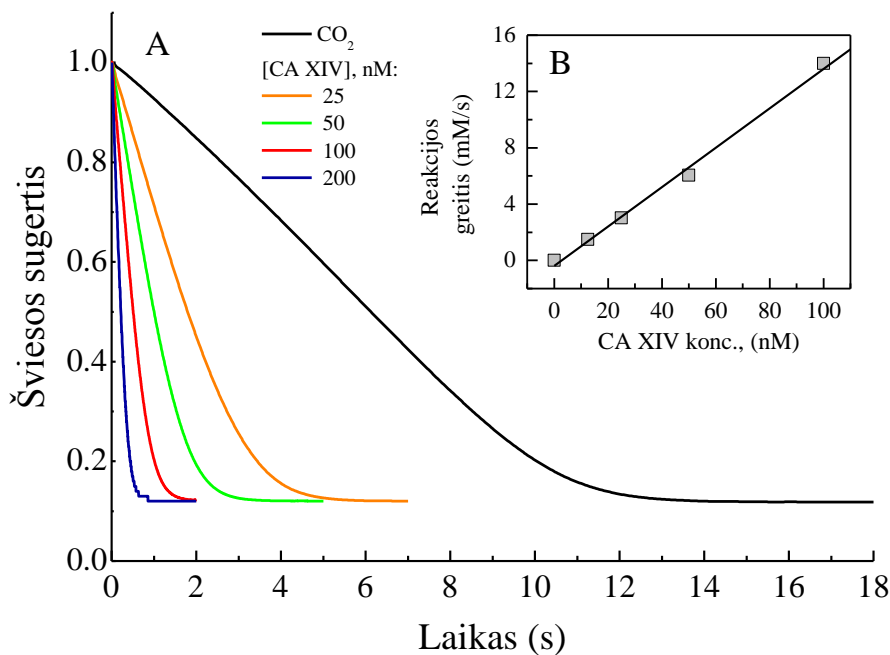
17 pav. Rekombinantinių žmogaus karboanhidrazių izoformų CA IV^a (a), CA IX^b (b), CA XII^c (c), CA XIV (d) T_m reikšmių priklausomybė nuo įvairių NaCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ druskų koncentracijų. ^a dr. L. Baranauskienės nepublikuoti duomenys; ^b V. Morkūnaitės nepublikuoti duomenys; ^c vertės iš [114] šaltinio.

Atsižvelgus į gautus rezultatus ir „ProtParam“ programa apskaičiuotą CA XIV teorinį izoelektrinį tašką ($pI = 6$), pasirinktas saugojimo buferis: 20 mM HEPES (pH 8), 100 mM Na₂SO₄, o grynimui vietoj 150 mM NaCl, pradėta naudoti tokia pati koncentracija Na₂SO₄.

3.3. Fermentinio aktyvumo ir slopinimo tyrimai

Spektrofotometriniu sustabdytos srovės CO₂ hidratacijos metodu patvirtinta, jog sukurtas žmogaus CA XIV katalizinį domeną atitinkantis rekombinantinis baltymas yra fermentiškai aktyvus ir gali būti tiriamo baltymo modeliu tolesniuose tyrimuose. Tirta CO₂ hidratacijos reakcijos greičio priklausomybė nuo skirtingų CA XIV koncentracijų (10 pav.) ir apskaičiuota katalizinė konstanta ($k_{kat} = 1,25 \times 10^5 s^{-1}$, sąlygos: 25 °C, pH 8,0), kuri

praktiškai atitinka literatūros duomenis ($k_{kat} = 3,12 \times 10^5 s^{-1}$, sąlygos: 20 °C, pH 7,5) [108]. Lyginant su efektyviausiai CO₂ hidrataciją katalizuojančią CA II ($k_{kat} = 1,4 \times 10^6 s^{-1}$), žmogaus CA XIV yra vidutinio/žemo katalizinio aktyvumo izoforma ir kinetiniais parametrais panaši į filogenetiškai artimiausią CA XII.



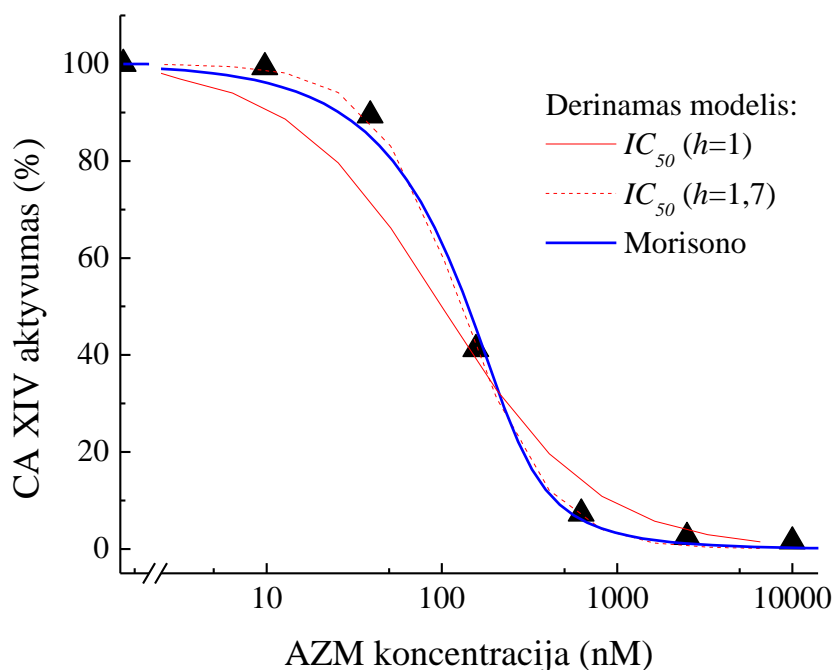
18 pav. CA XIV fermentinio aktyvumo nustatymas. Paveiksle A pateiktos pirminės eksperimentinės kreivės, vaizduojančios indikatoriaus sugerties pokyčius laike didėjant CA XIV koncentracijai. Juoda linija pažymėta savaiminė CO₂ hidratacijos reakcija. Paveiksle B – apdoroti duomenys, vaizduojantys tiesinę reakcijos greičio priklausomybę nuo CA XIV koncentracijos (25 °C, pH 8,0).

Šiuo metodu, nustatant IC_{50} ir K_i parametrus, galima kiekybiškai įvertinti slopiklio poveikio stiprumą. Didinant slopiklio koncentraciją, reakcijos greitis mažėja, kol susilygina su CO₂ savaiminės reakcijos greičiu - fermentas praranda aktyvumą. Šis metodas, lyginant su terminio poslinkio metodu turi trūkumų, kadangi eksperimentų atlikimas užtrunka ilgiau, o slopinimo parametrų nustatymą riboja fermento aktyvumas, jo koncentracija bei slopiklio su fermentu sąveikos stiprumas. Slopiklio giminingumą fermentui parodo IC_{50} vertė. Kuo ji mažesnė, tuo giminingumas didesnis. Stipriai besijungiančių slopiklių atveju, tirpale baltymo koncentracijai esant didesnei nei tikroji IC_{50} vertė, nustatoma stebimoji IC_{50} vertė būna lygi pusei naudojamo baltymo koncentracijos. Reaguojančių medžiagų stochiometriją ir baltymo perteklių tirpale parodo Hilo koeficientas h . Slopinimo pusiausvyra (arba slopiklio-fermento komplekso disociacijos) konstanta K_i apibūdina tikrąjį giminingumą ir apskaičiuojama taikant

IC_{50} ir K_i vertės susiejančias lygtis, priklausomai nuo slopinimo tipo. Karboanhidrazių slopiklių atveju, naudojama Cheng-Prusoff lygtis (13).

Stipriai besijungiančių slopiklių atveju, IC_{50} priklausomybė nuo eksperimento sąlygų (substrato, fermento, slopiklio koncentracijos), riboja tikslų IC_{50} nustatymą. Tokių slopiklių tyrimų eksperimentinius duomenis ne visuomet tiksliai apibūdina tradicinis IC_{50} modelis derinamas pagal (12) lygtį – gaunamos stačios dozavimo kreivės su panašiomis IC_{50} reikšmėmis (kreivės vidurio taškas), o Hilo koeficiento h vertės – didesnės už 1.

Tai patvirtina, vidutiniškai aktyvios CA XIV slopinimo tyrimas su dideliu giminingumu pasižyminčiu acetazolamidu (AZM) (19 pav.), naudojamu glaukomos ir kalnų ligos gydyme. Dozavimo kreivę prie eksperimentinių duomenų modeliuojant (12) lygties parametrus galima priderinti tik pasirinkus h reikšmę 1,7, tačiau, kuomet vyksta 1:1 jungimasis, ji turėtų būti $h \leq 1$, ir pagal IC_{50} modelį tiksliai giminingumo įvertinti negalime. AZM giminingumas CA XIV įvertintas Morisono modeliu ($K_d = 22,2 \text{ nM}$) pagal (14) lygtį ir yra artimas nustatytam terminio poslinkio metodu ($K_d = 11,1 \text{ nM}$).



19 pav. AZM sąveikos su žmogaus rekombinantine CA XIV giminingumo nustatymas pagal IC_{50} ir Morisono modelius. Atidėję fermento aktyvumo (tiesinė skalė) priklausomybę nuo pridėtos ligando koncentracijos (logaritminė skalė), gauname pusiau logaritminį grafiką su sigmoidine kreive, kurios vidurio taškas lygus IC_{50} vertei.

3.4. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės XIV aktyviajame centre esančios vandens molekulės pK_a reikšmės nustatymas

Visi darbe tirti CA slopikliai benzonsulfonamidai sulfonamidine grupe tiesiogiai jungiasi prie cinko jono aktyviame centre, o likusi ligando dalis (turinti įtakos slopiklio pK_a), sąveikauja su fermento aktyviojo centro hidrofobine kišene (CO_2 surišimo vieta) ar hidrofiline sritimi. Tačiau tik deprotonizuota sulfonamidinė grupė (RSO_2NH^-) gali sąveikauti su baltymo aktyviajame centre Zn^{2+} koordinuojamu protonizuotu hidroksido jonu (vandens molekule). Kiekvienas iš šių, nuo buferinio tirpalo pH priklausomų, jonizacijos procesų, kartu su buferio protonizacija ar deprotonizacija, turi indėlį į eksperimentiškai nustatomas (stebimąsias) K_b , K_i reikšmes (toliau K_{b_steb}). Pastarųjų parametrų užtenka įvertinti ligando giminingumą, tačiau tik nuo eksperimentinių sąlygų nepriklausomą tiesioginę jungimosi reakciją apibūdinantys tikriniai parametrai (toliau K_{b_tikr} , ΔH_{tikr}), gali būti naudojami struktūros-aktyvumo priklausomybės (SAR, angl. *structure-activity relationships*) nustatyme vaistinių junginių pirmtako (angl. *lead compound*) paieškoje ar modifikavime [115,116].

Tikrinė jungimosi konstanta yra susijusi su stebimąja jungimosi konstanta ir sąveikauti galinčių deprotonizuoto sulfonamido ($f_{\text{RSO}_2\text{NH}}$) ir protonizuotos CA ($f_{\text{CAZnH}_2\text{O}}$) frakcijomis:

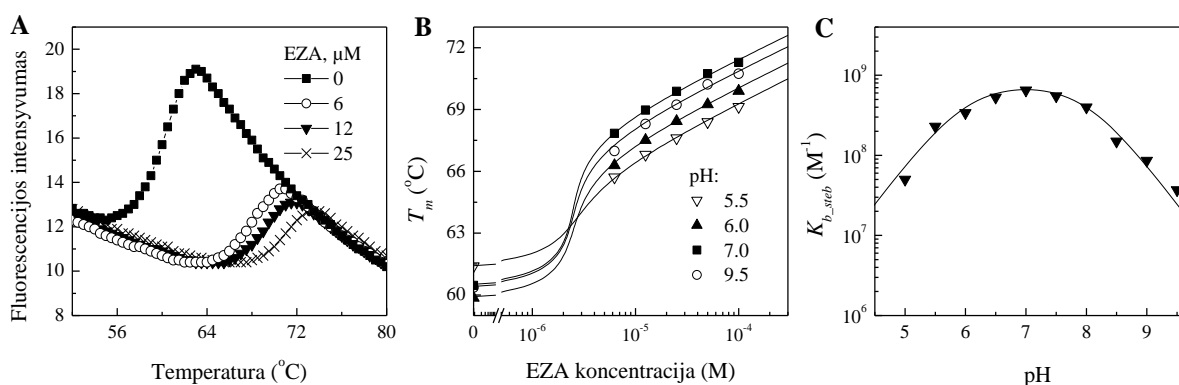
$$K_{b_tikr} = \frac{K_{b_steb}}{f_{\text{RSO}_2\text{NH}} - f_{\text{CAZnH}_2\text{O}}} \quad (15)$$

Kur jų kiekis, pasirinktame buferio pH, priklauso nuo tiriamo junginio sulfonamidinės grupės pK_a ir baltymo aktyviajame centre esančio Zn^{2+} koordinuojamos vandens molekulės (CAZnH_2O) pK_a :

$$f_{\text{RSO}_2\text{NH}^-} = \frac{10^{\text{pH}-pK_{a-\text{sulfonamido}}}}{1 + 10^{\text{pH}-pK_{a-\text{sulfonamido}}}} \quad (16)$$

$$f_{\text{CAZnH}_2\text{O}} = 1 - \frac{10^{\text{pH}-pK_{a-\text{CAZnH}_2\text{O}}}}{1 + 10^{\text{pH}-pK_{a-\text{CAZnH}_2\text{O}}}} \quad (17)$$

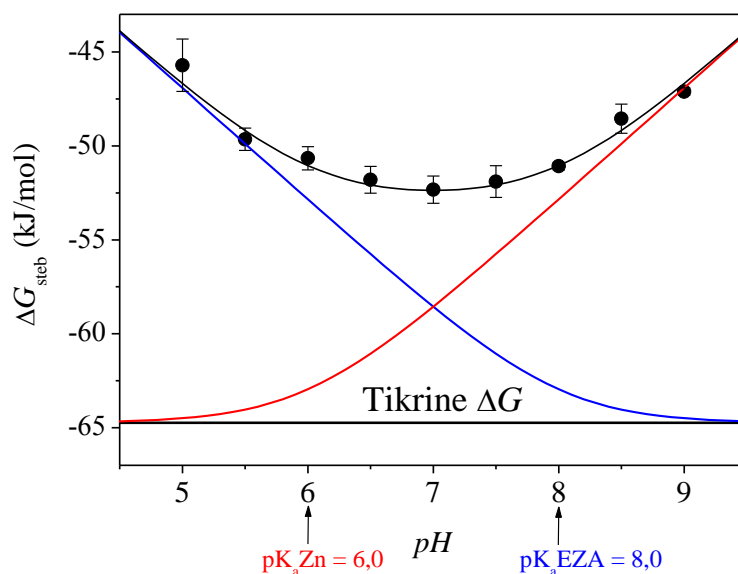
Junginių sulfonamidinės grupės deprotonizacijos entalpijos vertės nustatomos izotermine titravimo kalorimetrija (ITK), junginį titruojant rūgštimi ar šarmu, ir priklausomai nuo greta esančių funkcinių grupių, dažniausiai yra apie 6 kcal/mol [116]. Junginių pK_a vertės nustatomos spektrofotometriškai arba apskaičiuojamos kompiuterinėmis programomis. Žmogaus rekombinantinės CA XIV vandens molekulės pK_a buvo netiesiogiai nustatyta fluorescenciniu terminio poslinkio metodu (FTPM), tiriant vaisto etokzalamido (EZA), kurio pK_a lygi 8 [117], jungimosi konstantos (laisvosios Gibso energijos) priklausomybę nuo pH (12 pav.) ir yra lygi 6. Eksperimentams naudotas plataus pH intervalo universalus buferis.



20 pav. CA XIV ir EZA sąveikos stebimųjų jungimosi konstantų (K_{b_steb}) nustatymas plačiame pH intervale. A - pirminės FTP kreivės, vaizduojančios fluorescencijos nuo temperatūros pokyčių esant skirtingoms EZA koncentracijoms. B – EZA dozavimo kreivės, gautos atidėjus A grafiko kreivių vidurio taškų (T_m) priklausomybę nuo ligando koncentracijos. K_{b_steb} vertės nustatytos prie T_m verčių derinant matematinį modelį (10). C – K_{b_steb} (\blacktriangledown) priklausomybė nuo pH.

21 paveiksle palygintos CA XIV ir EZA sąveikos stebimosios laisvosios Gibso energijos (ΔG_{steb}) su apskaičiuota tikrine reikšme (ΔG_{tikr}). Dėl sulfonamido ir CAXIV – $Zn^{2+} - H_2O$ pK_a verčių skirtumo, eksperimentiniai duomenys (esant pH 7, $K_{b_steb} = 6,5 \times 10^8 M^{-1}$, $\Delta G_{steb} = -53 kJ/mol \pm 0,9 kJ/mol$) yra gerokai nutolę nuo tikrinių parametrų ($K_{b_tikr} = 9,5 \times 10^{10} M^{-1}$, $\Delta G_{tikr} = -65 kJ/mol \pm 0,36 kJ/mol$). Taip pat stebimosioms ΔG vertėms būdinga plačios U formos priklausomybė nuo pH: stipriausias jungimasis (neigiamiausios ΔG_{steb}) yra pH esant arti neutralaus, kuriame deprotonizuoto ligando ir protonizuotos CA frakcijų koncentracijos viena kitos atžvilgiu yra didžiausios. Didėjant pH mažėja protonizuotos CA – $Zn^{2+} - H_2O$ frakcija, o mažėjant pH, mažėja deprotonizuotos EZA formos frakcija ir todėl, atitinkamai, didėja jonizacijai sunaudojamas energijos kiekis (ΔG_{steb}). Šiuo atveju, kuo mažesnė ligando sulfonamidinės grupės pK_a reikšmė, tuo daugiau buferiniame tirpale, kurio pH 7, būtų deprotonizuotos, sąveikauti su CA galinčios, junginio formos, o skirtumas tarp stebimųjų ir tikrinių jungimosi parametrų būtų mažesnis.

Daugumoje literatūros šaltinių, vertinant ligandų giminingumą lyginami jų jungimosi stebimieji parametrai, kurie ne visada koreliuoja su tikriniais, nuo eksperimentinių sąlygų nepriklausomais parametrais. Tačiau tikriniai parametrai, leidžia susieti jungimosi giminingumo pokyčius su ligando struktūros pakitimais, funkcinių grupių įtaka. Šio tyrimo metu nustatyta, jog CA XIV ir EZA sąveikos tikrinė disociacijos konstantos (K_d) yra 132 kartus didesnė už stebimąją (esant pH 7). Be to, vieno eksperimento metu nustačius K_{b_steb} ir žinant $CAZnH_2O$ ir ligando pK_a vertes, tikrinius parametrus (K_{b_tikr} , ΔG_{tikr}) paprasta apskaičiuoti taikant (15) lygtį.



21 pav. CA XIV ir EZA sąveikos stebimųjų laisvųjų Gibso energijų (G_{steb}) priklausomybė nuo pH. Tikriniai jungimosi parametrai ir CA XIV-Zn-H₂O pK_a nustatomi ΔG_{steb} vertės (●) aproksimuojant lygtimi $\Delta G_{steb} = -RT \ln K_{p_tikr}$. Horizontalia linija pažymėta nuo pH nepriklausoma jungimosi tikrinė laisvoji Gibso energija (ΔG_{tikr}), mėlyna – EZA sulfonamidinės grupės deprotonizacijos ΔG_{steb} , o raudona - hidroksido jono, esančio CA XIV aktyviajame centre, protonizacijos ΔG_{steb} .

Palyginus visų membraninių ir citozolinių (I ir II) CA izoformų cinko jono prisijungusių vandens molekulių pK_a reikšmes (4 lentelė), matome, jog panašumų yra tarp CA IV, XIV ir tarp CA IX, XII. CAZnH₂O pK_a reikšmės vaidina svarbų vaidmenį ne tik jungiantis su ligandais, bet ir fermentinėje katalizėje. Dėl mažesnės pK_a , CO₂ hidratacija gali vykti mažesniame pH, o kataliziškai aktyviausių CA II ir CA IX atveju, vienodų fermento ir protonų akceptorius, His64, pK_a verčių dėka, vyksta greitas termoneutralus protono perdavimas [4].

4 lentelė. Membraninių ir citozolinių (I, II) CA izoformų aktyviame centre prie cinko prisijungusių vandens molekulių pK_a palyginimas.

Izoforma	pK_a
hCA I ^a	8,1
hCA II ^a	6,9
hCA IV ^b	5,5
hCA IX (CA domenas) ^c	7,0
hCA IX (CA domenas + PG) ^c	6,5
hCA XII ^d	6,8
hCA XIV	6,0

^a – vertės iš [118] šaltinio;

^b – dr. L. Baranauskienės nepublikuoti duomenys;

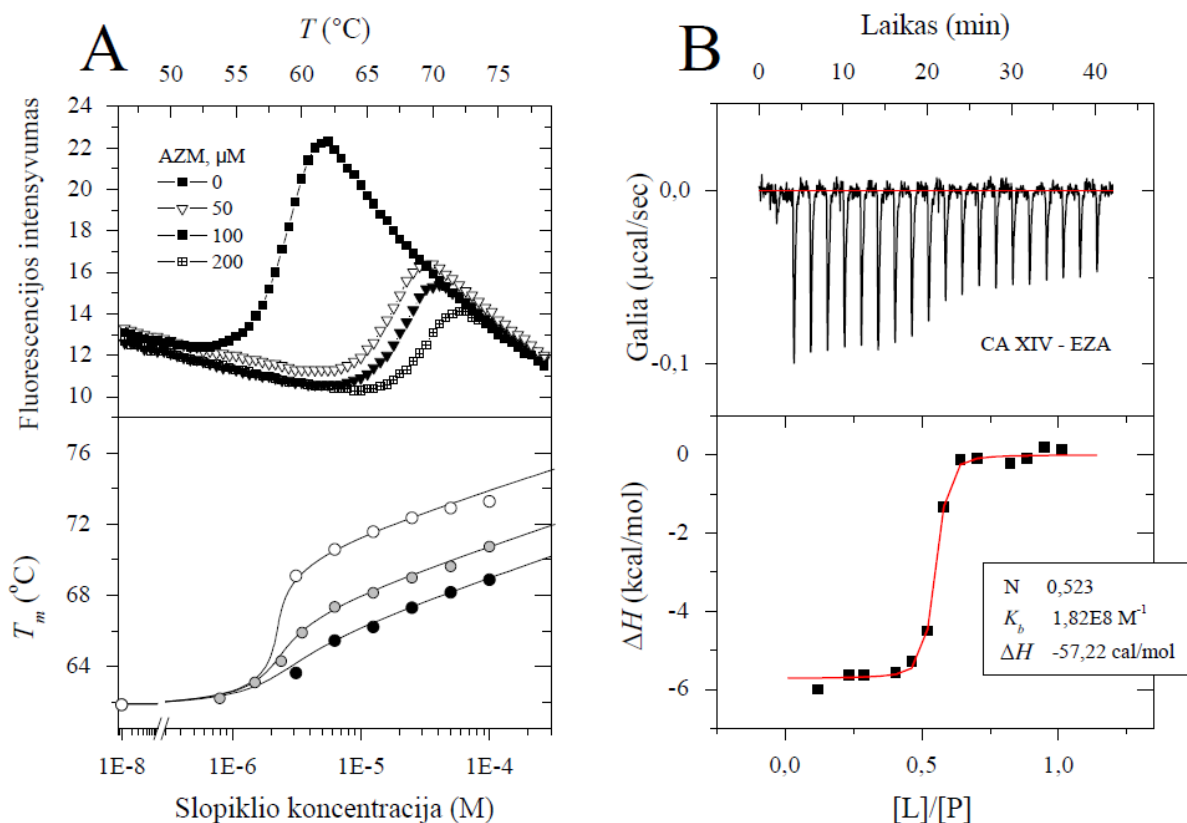
^c – vertės iš [4] šaltinio;

^d – vertės iš [114] šaltinio.

3.5. Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės XIV sąveikos su sulfonamidiniais slopikliais tyrimas

Fluorescenciniu terminio poslinkio metodu (FTPM) išmatuota 85 benzensulfonamidinių ligandų, susintetintų VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje (dr. V. Dudutienė), ir 5 medicinoje naudojamų CA slopiklių jungimasis su CA XIV. Sisteminiai slopikliai etokzolamidas (EZA), acetazolamidas (AZM) yra efektyvūs vaistai nuo glaukomos, topiramatas naudojamas epilepsijos ir nutukimo gydymui. Vandenyje tirpūs dorzolamidas (DZM) ir brinzolamidas (BZM) išrasti kaip sisteminių glaukomos gydymui naudojamų slopiklių pakaitalas, nes tiesiogiai lašinant į akis veikia vietiskai ir sukelia mažiau nepageidaujamų pašalinių poveikių. EZA ir AZM jungimosi stiprumas patikrintas izotermine titravimo kalorimetrija (ITK), o gautos K_b vertės koreliuoja su nustatytais FTPM.


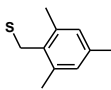

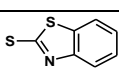
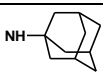
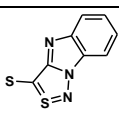
FTPM metodu matuojant baltymo lydymosi temperatūros (T_m) pokytį tiriamas ligando poveikis baltymo terminiam stabilumui. Kuo ligandas stipriau jungiasi, tuo labiau jis stabilizuoja baltymą, t. y. tuo labiau pakelia baltymo T_m . Terminio poslinkio (22 A pav.) grafike matome ANS fluorescencijos kreivių poslinkį į aukštesnių temperatūrų pusę didėjant pridedamo slopiklio koncentracijai. Lydymosi temperatūros nustatymo paklaida ~0,2. Su visomis CA eksperimentai atliekami naudojant 50 mM fosfatinį buferį, pH 7,0, esant 50 mM NaCl, ir stebimosios jungimosi konstantos (K_b) yra ekstrapoliuojamos į 37 °C temperatūrą. Šiuo metodu galima tirti sąveikas be K_b nustatymo apribojimų, o eksperimentams reikalingi maži baltymų kiekiai, todėl jis plačiai naudojamas ir farmacijos įmonių, kaip pirminis metodas atrankti stipriausiai besijungiančius ligandus. ITK metodu (22 B pav.) tiesiogiai tiriant jungimosi reakcijos metu vykstančius šilumos pokyčius galima nustatyti visus pagrindinius termodinaminius parametrus ($\Delta G, \Delta H, \Delta S$), K_b ir susijungiančių medžiagų stochiometriją, pagal kurią galima įvertinti tiriamo mėginio kokybę ir aktyvaus baltymo kiekį jame. Nepaisant visų šių ITK privalumų, vienam eksperimentui sunaudojama daug baltymo, priklausomai nuo kalorimetro ~0,2-0,3 mg CA, todėl nėra tinkamas rutininiams ligandų sąveikos su CA XIV tyrimams.

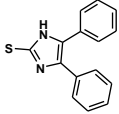


22 pav. CA XIV sąveikos su suldonamidiniais junginiais duomenys gauti FTPM (A) ir ITK (B) metodais. **A** – viršutiniame paveikslėlyje parodyti FTPM pirminiai duomenys – baltymo-ligando komplekso denatūracijos kreivės, gautos pridėjus įvairias ligando koncentracijas (0-200 μM); apačioje – skirtingą ligandų jungimasi rodančios dozavimo kreivės. **B** viršutinis paveikslėlyje - ITK metodu gauti pirminiai duomenys jungiantis CA XIV ir EZA; apačioje – integruotos kreivės. $[\text{L}]/[\text{P}]$ – ligando ir baltymo molinis santykis.

5 lentelėje palygintos darbe tirtų 2,3,5,6-tetrafluorobenzensulfonamidų, turinčių įvairias grupes *para* padėtyje, jungimosi su CA XIV ir kitomis žmogaus karboanhidrazių izoformomis (CA I, II, VII ir XIII) disociacijos konstantos (K_d). Junginių struktūros yra publikuotos [119] šaltinyje. Kaip jau minėta, sulfonamidinių slopiklių jungimosi stiprumui įtakos turi ligando sulfonamidinės grupės ir baltymo aktyviajame centre esančios vandens molekulės, koordinuojamos Zn^{2+} , pK_a reikšmės. Kadangi daugumos CA vandens molekulių $pK_a \sim 7$, kuo slopiklio pK_a vertė artimesnė fiziologiniam pH, tuo didesnė deprotonizuotos formos koncentracija tirpale ir stebimas stipresnis jungimasis. Benzensulfonamidų (BSA) $pK_a = 10$, tačiau ji sumažėja įvedus į benzeno žiedą viena ar kelis elektroneigiamus pakaitus, pavyzdžiui halogenus [6]. Nustatyta, jog fluoro atomų įvedimas ne tik sumažina sulfonamidinės grupės pK_a , bet ir pagerina junginių farmakologines savybes (padidėja lipofiliškumas) [120]. Kaip matome iš lentelės ir iš 23 pav. 2,3,5,6-tetrafluorinti benzensulfonamidai stipriausiai jungiasi ne tik su CA I, bet ir su CA XIV.

5 lentelė. Fluorescentiniu terminio poslinkio metodu nustatytos CA XIV ir kitų izoformų (CA I, II, VII, XIII) sąveikos su 4-pakeistų-2,3,5,6-tetrafluorobenzensulfonamidų disociacijos konstantos (K_d) (pH 7, 37 °C).

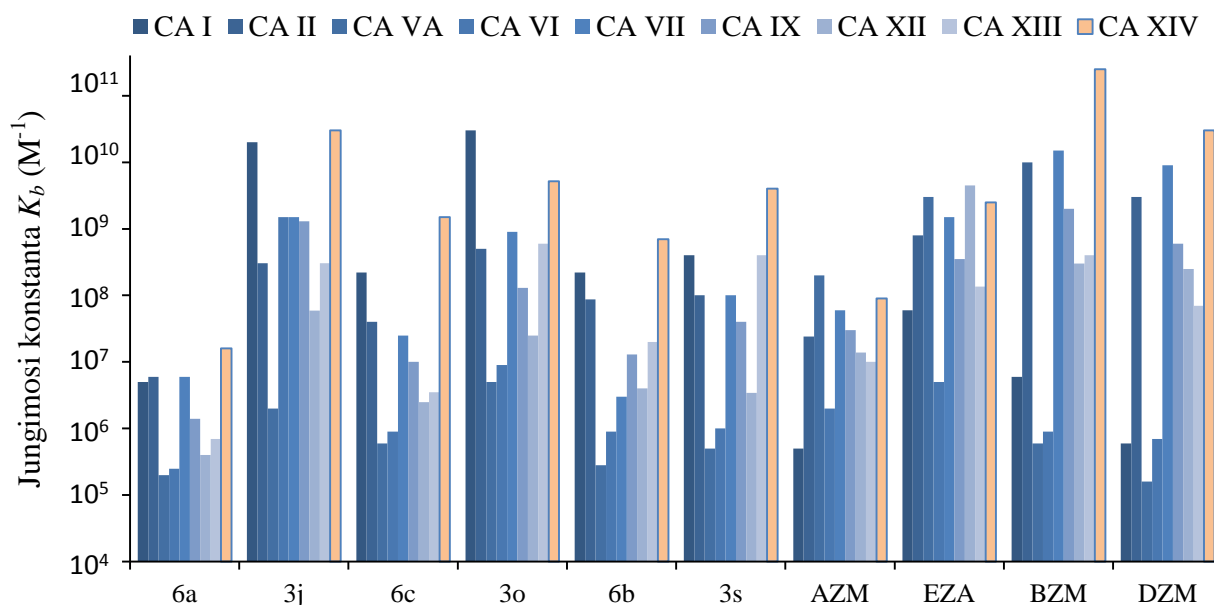
Junginys	Pakaitas <i>para</i> padėtyje	Disociacijos konstantos K_d (nM), CA izoformos:					
		CA I ^a	CA II ^a	CA VII ^a	CA XII ^a	CA XIII ^a	CA XIV
1	H	2,4	29	11	333	20	6,7
2	F	2,2	27	25	500	40	10
3a	NHNH ₂	8,3	91	465	769	140	33
3b	NHN=CHPh	4,0	2,9	43	667	2,2	3,3
3c	SCH ₂ CH ₂ OH	0,11	6,7	46	220	8,3	1,3
3d	SO ₂ CH ₂ CH ₂ OH	0,20	17	7,1	250	29	5,0
3e	SCH ₂ CH ₂ CH ₃	0,033	2,0	1,1	40	1,7	0,50
3f	SCH ₂ COOH	0,20	11	5,0	50	6,7	14
3g	SCH ₂ CH ₂ COOH	0,40	20	10	91	20	3,3
3h	NH(CH ₂) ₅ COOH	0,10	67	147	200	14	20000
3i	SPh	0,13	4,0	12	20	1,5	20000
3j	SO ₂ Ph	0,050	3,3	0,67	17	3,3	0,033
3k	OPh	0,10	2,5	1,0	50	1,0	0,20
3l	SCH ₂ Ph	0,25	1,3	1,3	6,7	0,40	0,33
3m	NHCH ₂ Ph	0,20	9,1	133	333	5,0	0,50
3n	NHCH ₂ CH ₂ PhpOH	0,17	1,7	0,50	154	0,40	0,67
3o	SCH ₂ CH ₂ Ph	0,20	1,7	0,83	110	0,22	0,14
3p	SO ₂ CH ₂ CH ₂ Ph	0,25	1,3	1,3	77	0,40	1,0
3q		0,13	18	83	500	25	1,4
3r		0,067	3,3	2,5	100	3,3	1300
3s		2,5	10	10	290	2,5	0,25
3t		1,1	1,1	0,22	200	0,25	0,050
3u		0,050	5,0	1,0	17	0,5	0,060
3v		0,40	6,7	13	110	2,5	0,30

3w		14	6,7	1,7	670	2,0	5,0
6a	SCH ₂ CH ₂ OH	200	130	170	2500	1400	40
6b	SCH ₂ CH ₂ CH ₃	4,5	13	17	400	50	11
6c	SCH ₂ CH ₂ Ph	5,0	25	40	330	290	1,4
BSA		7140	1790	6670	12500	10000	1000
EZA		14	1,1	0,71	36	13	1,0
AZM		1400	38	17	133	50	11

^a – vertės iš [119] šaltinio.

Išskirtinai stiprus CA XIV junginiais nustatytas su BZM ir DZM (23 pav.). Šie vaistiniai junginiai slopindami akies obuolio kraujagyslėse esančias CA II, IV, XII efektyviai mažina intraokuliarinį spaudimą [121], o jų teigiamas poveikis tinklainės edema serganties pacientams [122,123] galėtų būti paaiškintas tinklainės pigmentinio epitelio CA II ir XIV slopinimu.

Lyginant su kitomis izoformomis, CA XIV būdinga labai stipri sąveika su sulfonamidiniais ligandais - 70 % visų tirtų ligandų jungimosi disociacijos konstantos (K_d) mažesnės nei 50 nM. Tokį didelį giminingumą galėtų paaiškinti aktyviojo centro ypatumai ar atskirų aminorūgščių-ligando sąveikoje dalyvaujančių atomų nustatymas, tačiau tam šiuo metu nepakanka kristalografinių duomenų.



23 pav. 2,3,5,6-tetrafluorintų benzonsulfonamidų ir vaistinių junginių sąveikos su CA I, II, Va, VI, VII, IX, XII, XIII ir XIV jungimosi konstantos K_d , nustatytos Biotermodynamikos ir vaistų tyrimo skyriuje. CA XIV junginiais su BZM ir DZM nustatė dr. L. Baranauskienė.

Fermentiniu ir biofizikiniais metodais patvirtinta, jog gautas žmogaus CA XIV katalizinį domeną atitinkantis rekombinantinis baltymas yra stabilus, fermentiškai aktyvus ir dėl to yra tinkamas modelinis baltymas tolesniuose tyrimuose. CA XIV būdinga išskirtinai stipri sąveika su dauguma tirtų sulfonamidinių junginių, ne tik didina tikimybę atrasti iš turimos ligandų bibliotekos ar sukurti labai giminingą ir net atrankų ligandą, bet taip pat kelia ir daug klausimų: kokių jėgų dėka vyksta tokios sąveikos, kokie baltymo ar ligando struktūriniai ypatumai turi tam įtakos. Tam išsiaiškinti reikalinga CA XIV sąveikos su pasirinktais ligandais išsami termodinaminė analizė izoterminės titravimo kalorimetrijos metodu, kadangi vienodą jungimosi giminingumą (ΔG) gali lemti skirtingi entalpijos ir entropijos indėliai, bei baltymo-ligando kompleksų rentgenostruktūrinė kristalografinė analizė. Didesniam baltymo kiekiui gauti, planuojama baltymo raiškai išbandyti žinduolių ląstelių kultūras.

IŠVADOS

1. Didžiausią poveikį baltymo tirpumui turėjo biosintezės lėtinimas – tirpus baltymas gautas ląsteles po indukcijos auginant 16 °C temperatūroje. Keičiant ekspresuojamo baltymo ilgį, kamieną ir mitybinę terpę, CA XIV išeiga padidinta ~5 kartais.
2. Žmogaus CA XIV užląstelinį domeną atitinkantis rekombinantinis baltymas yra gautas kataliziškai aktyvus, savitasis aktyvumas panašus į literatūroje aprašytą. Fermentiniu ir biofizikiniais metodais nustatytos acetazolamido giminingumo konstantos panašios.
3. Su membrana susijusios CA IV, IX ir XIV yra vienos iš stabiliausių CA, kurių stabilumas nekinta plačiame pH intervale (5,5-9,0).
4. Nustatyta CA XIV aktyviajame centre esančio cinko koordinuoto hidroksido jono protonizacijos pK_a (6,0). Dėl etokzolamido ir CAXIV – $Zn^{2+} - H_2O$ pK_a verčių skirtumo, eksperimentiniai duomenys (esant pH 7, $K_{b_steb} = 6,5 \times 10^8 M^{-1}$, $\Delta G_{steb} = -53 kJ/mol \pm 0,9 kJ/mol$) yra gerokai nutolę nuo tikrinių parametrų ($K_{b_tikr} = 9,5 \times 10^{10} M^{-1}$, $\Delta G_{tikr} = -65 kJ/mol \pm 0,36 kJ/mol$).
5. CA XIV būdinga labai stipri sąveika su sulfonamidiniais ligandais – 70 % visų tirtų ligandų K_d mažesnės nei 50 nM.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
BIOCHEMIJOS IR MOLEKULINĖS BIOLOGIJOS KATEDRA

Sandra Bakšytė

**KARBOANHIDRAZĖS XIV STABILUMAS BEI SLOPIKLIŲ JUNGIMOSI
TERMODINAMIKA**

Magistro baigiamasis darbas
Vilniaus universitetas, Biotechnologijos Institutas
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyrius

SANTRAUKA

Karboanhidrazės (CA; E.C.4.2.1.1) yra cinko metalofermentai, kurie ekspresuojami žmogaus audiniuose kaip penkiolika (CA I-XIV) genetiškai atskirų izofermentų, iš kurių dvylika katalizuoja grįžtamą anglies dioksido hidrataciją. CA intensyviai tyrinėjamos dėl jų fiziologinės svarbos visose gyvosios gamtos karalystės ir dėl medicininio pritaikymo, kaip vaistų taikiniai gydant įvairias ligas. Transmembraninės CA XIV raiška nustatyta daugelyje metaboliškai aktyvių audinių, pavyzdžiui, smegenyse ir tinklainėje, inkstuose, kepenyse, širdyje ir raumenyse, kuriuose reguliuoja užląstelinės terpės pH. Be to, CA XIV atlieka svarbų vaidmenį formuojant normalų fotoreceptorių atsaką į šviesą.

Baigiamajame magistro darbe, suradus optimalias žmogaus karboanhidrazės XIV geno raiškos *Escherichia coli* sąlygas, gautas tirpus ir aktyvus rekombinantinis baltymas, nustatyta skirtingų buferių, reagentų ir pH įtaka šio baltymo stabilumui, taip pat įvertinta klasikinių ir Biotechnologijos institute susintetintų ligandų sąveikos su rekombinantine CA XIV termodinamika. Tirtos stabilumo savybės panaudotos renkantis saugojimo ir gryninimo sąlygas. Slopiklių jungimosi giminingumas tirtas fluorescentiniu terminio poslinkio, izoterminės titravimo kalorimetrijos ir sustabdytos srovės CO₂ hidratacijos metodais. Be to, apskaičiuotos rekombinantinės CA XIV sąveikos su etokzolidu tikrosios, nuo pH nepriklausomos jungimosi laisvosios Gibso energijos (jungimosi konstantos) ir įvertinta aktyviajame centre esančio cinko jono koordinuojamos vandens molekulės pK_a .

VILNIUS UNIVERSITY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

Sandra Bakšytė

**CHARACTERIZATION OF CARBONIC ANHYDRASE XIV STABILITY AND
THERMODYNAMICS OF INHIBITOR BINDING**

Master thesis

Vilnius University, Institute of Biochemistry
Department of Bioelectrochemistry and Biospectroscopy

SUMMARY

Carbonic anhydrase (CA; E.C.4.2.1.1) are zinc metalloenzymes that occur in human tissues as fifteen (CA I-XIV) genetically distinct isozymes, twelve of which catalyze the reversible hydration of carbon dioxide. The CAs are being extensively studied because of their broad physiological importance in all kingdoms of life and clinical relevance as drug targets for the treatment of various human diseases. CA XIV is a membrane-bound enzyme that is expressed in numerous metabolically active tissues such as the brain and retina, kidney, liver, heart and skeletal muscle, where its activity figures prominently in the regulation of extracellular pH. In addition, CA XIV participates in producing the normal retinal light response.

In this master thesis, the expression conditions for the production of soluble and catalytically active human recombinant CA XIV catalytic domain in bacterial cells were worked out, its stability at various pH and in the presence of buffers and salts was determined, and the binding thermodynamics for the classical inhibitors and new compounds, synthesized at the Institute of Biotechnology, were also evaluated. The stability profiles were exploited to find optimal purification and storage conditions. The interaction between sulfonamide derivatives and human recombinant CA XIV was studied by the fluorescent thermal shift assay, isothermal titration calorimetry and the stopped-flow CO₂ hydration assay. Moreover, the intrinsic pH-independent binding Gibbs free energies (binding constants) of etoxzolamide binding were calculated and the protein pK_a was estimated.

PADĖKA

Esu labai dėkinga Prof. Daumantui Matuliui už galimybę atlikti magistro darbą VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje, už jo neblėstantį optimizmą, skirtą laiką, pagalbą ir patarimus. Taip pat širdingai norėčiau padėkoti Dr. Vaidai Juozapaitienei už jos kantrybę ir suteiktas žinias genų inžinerijos srityje, j. m. d. Vilmai Michailovienei už precizišką baltymų gryninimo metodų mokymą, Dr. Astai Zubienei ir Dr. Linai Baranauskienei, Joanai Smirnovienei už patarimus ir pasidalinta patirtimi biofizikinių tyrimų taikyme.

Dėkoju kolegoms, visam gausiam laboratorijos kolektyvui už darbingą ir kūrybišką aplinką. Linkiu toliau nenustoti tobulėti ir siekti pačių geriausių rezultatų.

Mokslinių pranešimų tezės, kuriose paskelbta dalis magistrinio darbo rezultatų:

1. Bakšytė, S., Matulis, D. Characterization of membrane-bound carbonic anhydrase isoforms IV and XIV, 57th Scientific Conference for Young Students of Physics and Natural Sciences „Open Readings”. 2014, Vilnius, Lietuva. (*stendinis pranešimas*);
2. Bakšytė, S., Matulis, D. Slopiklių sąveikos su karboanhidraze XIV tyrimai „Gyvybės mokslų veiksmo laboratorija/Life Sciences Action lab“, Vilnius, Lietuva, 2013. (*žodinis pranešimas*);
3. Bakšytė, S.. Slopiklių sąveikos su karboanhidraze XIV tyrimas terminio poslinkio metodu. LMT studentų mokslinės praktikos konferencija, Vilnius, Lietuva, 2013. (*žodinis pranešimas*);
4. Bakšytė, S., Timm, D., Zubrienė, A., Gylytė, J., Dudutienė, V., Matulis, D. Thermodynamics of inhibitor binding to difficult to purify recombinant carbonic anhydrases VA and XIV with 4-substituted-2,3,5,6-tetrafluorobenzenesulfonamides. COST action 0804 meeting. 2013. Izmiras, Turkija. (*stendinis pranešimas*).

LITERATŪROS SARAŠAS

- 1 Chesler, M. (2003) Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol. Rev.* **83**, 1183–221.
- 2 Hall, J. (2011) *Guyton and Hall textbook of medical physiology*, Saunders/Elsevier, Philadelphia Pa.
- 3 Supuran, C. T. (2008) Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 168–81.
- 4 Frost, S. C. and McKenna, R. (2014) *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications.*, Springer.
- 5 Chegwiddden, W. R., Carter, D. N. and Edwards, H. Y. (2000) *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*, Springer.
- 6 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.*, American Chemical Society **112**, 4421–68.
- 7 Swenson, E. R. (2014) Safety of carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opin. Drug Saf.*, Informa UK, Ltd. London **13**, 459–72.
- 8 Supuran, C. T. (2011) Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics? *Front. Pharmacol.* **2**, 34.
- 9 Maseguin, C., LePanse, S., Corman, B., Verbavatz, J. M. and Gabrion, J. (2005) Aging affects choroidal proteins involved in CSF production in Sprague-Dawley rats. *Neurobiol. Aging* **26**, 917–27.
- 10 Meier-Ruge, W., Iwangoff, P. and Reichlmeier, K. (1984) Neurochemical enzyme changes in Alzheimer's and Pick's disease. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **3**, 161–165.
- 11 Sun, M. K. and Alkon, D. L. (2001) Pharmacological enhancement of synaptic efficacy, spatial learning, and memory through carbonic anhydrase activation in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 961–7.
- 12 Temperini, C., Scozzafava, A. and Supuran, C. T. (2008) Carbonic anhydrase activation and the drug design. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 708–15.
- 13 Aggarwal, M., Kondeti, B. and McKenna, R. (2013) Insights towards sulfonamide drug specificity in α -carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 1526–33.
- 14 Patil, S., Reshetnikov, S., Haldar, M. K., Seal, S. and Mallik, S. (2007) Surface-Derivatized Nanoceria with Human Carbonic Anhydrase II Inhibitors and Fluorophores: A Potential Drug Delivery Device. *J. Phys. Chem. C*, American Chemical Society **111**, 8437–8442.

- 15 Aggarwal, M. and McKenna, R. (2012) Update on carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008 - 2011). *Expert Opin. Ther. Pat.* **22**, 903–15.
- 16 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. *Chem. Rev.* **108**, 946–1051.
- 17 Boone, C., Habibzadegan, A., Gill, S. and McKenna, R. (2013) Carbonic Anhydrases and Their Biotechnological Applications. *Biomolecules, Multidisciplinary Digital Publishing Institute* **3**, 553–562.
- 18 Boone, C. D., Gill, S., Habibzadegan, A. and McKenna, R. (2013) Carbonic Anhydrase: An Efficient Enzyme with Possible Global Implications. *Int. J. Chem. Eng.* **2013**, 1–6.
- 19 Liu, Z., Bartlow, P., Dilmore, R. M., Soong, Y., Pan, Z., Koepsel, R. and Ataai, M. (2009) Production, purification, and characterization of a fusion protein of carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae* and cellulose binding domain from *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol. Prog.* **25**, 68–74.
- 20 Meldrum, N. U. and Roughton, F. J. (1933) Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J. Physiol.* **80**, 113–42.
- 21 Tripp, B. C., Smith, K. and Ferry, J. G. (2001) Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *J. Biol. Chem.* **276**, 48615–8.
- 22 Aspatwar, A., Tolvanen, M. E. and Parkkila, S. (2010) Phylogeny and expression of carbonic anhydrase-related proteins. *BMC Mol. Biol.* **11**, 25.
- 23 Aggarwal, M., Boone, C. D., Kondeti, B. and McKenna, R. (2013) Structural annotation of human carbonic anhydrases. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **28**, 267–77.
- 24 Pastorekova, S. and Zavada, J. (2004) Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a potential target for cancer therapy. *Cancer Ther* **2**, 245–262.
- 25 Pastorekova, S., Parkkila, S. and Zavada, J. (2006) Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. *Adv. Clin. Chem.* **42**, 167–216.
- 26 Ruusuvoori, E. and Kaila, K. (2014) Carbonic Anhydrases and Brain pH in the Control of Neuronal Excitability. *Subcell. Biochem.* **75**, 271–90.
- 27 Thiry, A., Dogné, J.-M., Supuran, C. T. and Masereel, B. (2007) Carbonic anhydrase inhibitors as anticonvulsant agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 855–64.
- 28 Makani, S., Chen, H.-Y., Esquenazi, S., Shah, G. N., Waheed, A., Sly, W. S. and Chesler, M. (2012) NMDA receptor-dependent afterdepolarizations are curtailed by carbonic anhydrase 14: regulation of a short-term postsynaptic potentiation. *J. Neurosci.* **32**, 16754–62.

- 29 Shah, G. N., Ulmasov, B., Waheed, A., Becker, T., Makani, S., Svichar, N., Chesler, M. and Sly, W. S. (2005) Carbonic anhydrase IV and XIV knockout mice: roles of the respective carbonic anhydrases in buffering the extracellular space in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 16771–6.
- 30 Svichar, N., Waheed, A., Sly, W. S., Hennings, J. C., Hübner, C. A. and Chesler, M. (2009) Carbonic anhydrases CA4 and CA14 both enhance AE3-mediated Cl⁻-HCO₃⁻-exchange in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **29**, 3252–8.
- 31 Ruusuvuori, E., Huebner, A. K., Kirilkin, I., Yukin, A. Y., Blaesse, P., Helmy, M., Kang, H. J., El Muayed, M., Hennings, J. C., Voipio, J., et al. (2013) Neuronal carbonic anhydrase VII provides GABAergic excitatory drive to exacerbate febrile seizures. *EMBO J.* **32**, 2275–86.
- 32 Asiedu, M. N., Mejia, G. L., Hübner, C. A., Kaila, K. and Price, T. J. (2014) Inhibition of Carbonic Anhydrase Augments GABAA Receptor-Mediated Analgesia via a Spinal Mechanism of Action. *J. Pain* **15**, 395–406.
- 33 Purkerson, J. M. and Schwartz, G. J. (2007) The role of carbonic anhydrases in renal physiology. *Kidney Int.* **71**, 103–15.
- 34 Thiry, A., Dogné, J.-M., Masereel, B. and Supuran, C. T. (2006) Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 566–73.
- 35 Cianchi, F., Vinci, M. C., Supuran, C. T., Peruzzi, B., De Giuli, P., Fasolis, G., Perigli, G., Pastorekova, S., Papucci, L., Pini, A., et al. (2010) Selective inhibition of carbonic anhydrase IX decreases cell proliferation and induces ceramide-mediated apoptosis in human cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **334**, 710–9.
- 36 Takacova, M., Barathova, M., Hulikova, A., Ohradanova, A., Kopacek, J., Parkkila, S., Pastorek, J., Pastorekova, S. and Zatovicova, M. (2007) Hypoxia-inducible expression of the mouse carbonic anhydrase IX demonstrated by new monoclonal antibodies. *Int. J. Oncol.* **31**, 1103–10.
- 37 Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T. and Onishi, S. (1999) Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1. *Genomics* **61**, 74–81.
- 38 Mori, K. (1999) Isolation and Characterization of CA XIV, a Novel Membrane-bound Carbonic Anhydrase from Mouse Kidney. *J. Biol. Chem.* **274**, 15701–15705.
- 39 Parkkila, S., Parkkila, A. K., Rajaniemi, H., Shah, G. N., Grubb, J. H., Waheed, A. and Sly, W. S. (2001) Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1918–23.
- 40 Purkerson, J. M. and Schwartz, G. J. (2005) Expression of membrane-associated carbonic anhydrase isoforms IV, IX, XII, and XIV in the rabbit: induction of CA IV

- and IX during maturation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**, R1256–63.
- 41 Kaunisto, K., Parkkila, S., Rajaniemi, H., Waheed, A., Grubb, J. and Sly, W. S. (2002) Carbonic anhydrase XIV: luminal expression suggests key role in renal acidification. *Kidney Int.* **61**, 2111–8.
- 42 Riihonen, R., Supuran, C. T., Parkkila, S., Pastorekova, S., Väänänen, H. K. and Laitala-Leinonen, T. (2007) Membrane-bound carbonic anhydrases in osteoclasts. *Bone* **40**, 1021–31.
- 43 Nagelhus, E. A., Mathiisen, T. M., Bateman, A. C., Haug, F.-M., Ottersen, O. P., Grubb, J. H., Waheed, A. and Sly, W. S. (2005) Carbonic anhydrase XIV is enriched in specific membrane domains of retinal pigment epithelium, Muller cells, and astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8030–5.
- 44 Domsic, J. F., Avvaru, B. S., Kim, C. U., Gruner, S. M., Agbandje-McKenna, M., Silverman, D. N. and McKenna, R. (2008) Entrapment of carbon dioxide in the active site of carbonic anhydrase II. *J. Biol. Chem.* **283**, 30766–71.
- 45 Domsic, J. F. and McKenna, R. (2010) Sequestration of carbon dioxide by the hydrophobic pocket of the carbonic anhydrases. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 326–31.
- 46 Shimahara, H., Yoshida, T., Shibata, Y., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Sakiyama, F., Nakazawa, T., Tate, S., Ohki, S., Kato, T., et al. (2007) Tautomerism of histidine 64 associated with proton transfer in catalysis of carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* **282**, 9646–56.
- 47 Maupin, C. M., Castillo, N., Taraphder, S., Tu, C., McKenna, R., Silverman, D. N. and Voth, G. A. (2011) Chemical rescue of enzymes: proton transfer in mutants of human carbonic anhydrase II. *J. Am. Chem. Soc., American Chemical Society* **133**, 6223–34.
- 48 Lindskog, S. and Silverman, D. N. (2000) The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases. *EXS* 175–95.
- 49 Kolb H, Fernandez E, N. R. (2012, January 31) Simple Anatomy of the Retina, University of Utah Health Sciences Center.
- 50 Wolfensberger, T. J., Dmitriev, A. V and Govardovskii, V. I. (1999) Inhibition of membrane-bound carbonic anhydrase decreases subretinal pH and volume. *Doc. Ophthalmol.* **97**, 261–71.
- 51 Yamamoto, F. and Steinberg, R. H. (1992) Effects of intravenous acetazolamide on retinal pH in the cat. *Exp. Eye Res.* **54**, 711–8.
- 52 Ochrietor, J. D., Clamp, M. F., Moroz, T. P., Grubb, J. H., Shah, G. N., Waheed, A., Sly, W. S. and Linser, P. J. (2005) Carbonic anhydrase XIV identified as the membrane CA in mouse retina: strong expression in Müller cells and the RPE. *Exp. Eye Res.* **81**, 492–500.

- 53 Hageman, G. S., Zhu, X. L., Waheed, A. and Sly, W. S. (1991) Localization of carbonic anhydrase IV in a specific capillary bed of the human eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2716–20.
- 54 Casey, J. R., Sly, W. S., Shah, G. N. and Alvarez, B. V. (2009) Bicarbonate homeostasis in excitable tissues: role of AE3 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger and carbonic anhydrase XIV interaction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **297**, C1091–102.
- 55 Alvarez, B. V., Gilmour, G. S., Mema, S. C., Martin, B. T., Shull, G. E., Casey, J. R. and Sauvé, Y. (2007) Blindness caused by deficiency in AE3 chloride/bicarbonate exchanger. *PLoS One* **2**, e839.
- 56 Ogilvie, J. M., Ohlemiller, K. K., Shah, G. N., Ulmasov, B., Becker, T. A., Waheed, A., Hennig, A. K., Lukasiewicz, P. D. and Sly, W. S. (2007) Carbonic anhydrase XIV deficiency produces a functional defect in the retinal light response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8514–9.
- 57 Thobani, A. and Fishman, G. A. (2011) The use of carbonic anhydrase inhibitors in the retreatment of cystic macular lesions in retinitis pigmentosa and X-linked retinoschisis. *Retina* **31**, 312–5.
- 58 Genead, M. A., McAnany, J. J. and Fishman, G. A. (2012) Topical dorzolamide for treatment of cystoid macular edema in patients with choroideremia. *Retina* **32**, 826–33.
- 59 Wolfensberger, T. J., Chiang, R. K., Takeuchi, A. and Marmor, M. F. (2000) Inhibition of membrane-bound carbonic anhydrase enhances subretinal fluid absorption and retinal adhesiveness. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **238**, 76–80.
- 60 Moldow, B., Sander, B., Larsen, M. and Lund-Andersen, H. (1999) Effects of acetazolamide on passive and active transport of fluorescein across the normal BRB. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 1770–5.
- 61 Imtaiyaz Hassan, M., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F. and Sly, W. S. (2013) Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 1570–82.
- 62 Alterio, V., Pan, P., Parkkila, S., Buonanno, M., Supuran, C. T., Monti, S. M. and De Simone, G. (2013) The structural comparison between membrane-associated human carbonic anhydrases provides insights into drug design of selective inhibitors. *Biopolymers*.
- 63 Whittington, D. A., Grubb, J. H., Waheed, A., Shah, G. N., Sly, W. S. and Christianson, D. W. (2004) Expression, assay, and structure of the extracellular domain of murine carbonic anhydrase XIV: implications for selective inhibition of membrane-associated isozymes. *J. Biol. Chem.* **279**, 7223–8.
- 64 Stams, T., Chen, Y., Boriack-Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis, P., Silverman, D. N. and Christianson, D. W. (1998) Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide: molecular basis of isozyme-drug discrimination. *Protein Sci.* **7**, 556–63.

- 65 Alterio, V., Hilvo, M., Di Fiore, A., Supuran, C. T., Pan, P., Parkkila, S., Scaloni, A., Pastorek, J., Pastorekova, S., Pedone, C., et al. (2009) Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16233–8.
- 66 Whittington, D. A., Waheed, A., Ulmasov, B., Shah, G. N., Grubb, J. H., Sly, W. S. and Christianson, D. W. (2001) Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9545–50.
- 67 Alterio, V., Vitale, R. M., Monti, S. M., Pedone, C., Scozzafava, A., Cecchi, A., De Simone, G. and Supuran, C. T. (2006) Carbonic anhydrase inhibitors: X-ray and molecular modeling study for the interaction of a fluorescent antitumor sulfonamide with isozyme II and IX. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 8329–35.
- 68 Premkumar, L., Greenblatt, H. M., Bageshwar, U. K., Savchenko, T., Gokhman, I., Sussman, J. L. and Zamir, A. (2005) Three-dimensional structure of a halotolerant algal carbonic anhydrase predicts halotolerance of a mammalian homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7493–8.
- 69 Hilvo, M., Baranauskiene, L., Salzano, A. M., Scaloni, A., Matulis, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Monti, S. M., Di Fiore, A., De Simone, G., et al. (2008) Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J. Biol. Chem.* **283**, 27799–809.
- 70 Holdgate, G., Geschwindner, S., Breeze, A., Davies, G., Colclough, N., Temesi, D. and Ward, L. (2013) Biophysical methods in drug discovery from small molecule to pharmaceutical. *Methods Mol. Biol.* **1008**, 327–55.
- 71 Holdgate, G. A., Anderson, M., Edfeldt, F. and Geschwindner, S. (2010) Affinity-based, biophysical methods to detect and analyze ligand binding to recombinant proteins: matching high information content with high throughput. *J. Struct. Biol.* **172**, 142–57.
- 72 Ciulli, A. (2013) Biophysical screening for the discovery of small-molecule ligands. In *Protein-Ligand Interactions.*, pp 357–388, Humana Press.
- 73 Ferenczy, G. G. and Keserü, G. M. (2010) Thermodynamics guided lead discovery and optimization. *Drug Discov. Today* **15**, 919–32.
- 74 Freire, E. (2008) Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? *Drug Discov. Today* **13**, 869–74.
- 75 Copeland, R. A., Pompliano, D. L. and Meek, T. D. (2006) Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 730–9.
- 76 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.*, Nature Publishing Group **9**, 23–7.

- 77 Garbett, N. C. and Chaires, J. B. (2012) Thermodynamic studies for drug design and screening. *Expert Opin. Drug Discov.* **7**, 299–314.
- 78 Sahdev, S., Khattar, S. K. and Saini, K. S. (2008) Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* **307**, 249–64.
- 79 Huang, C.-J., Lin, H. and Yang, X. (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 383–99.
- 80 Sørensen, H. P. (2010) Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microb. Cell Fact.* **9**, 27.
- 81 Sørensen, H. P. and Mortensen, K. K. (2005) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **4**, 1.
- 82 Vernet, E., Kotzsch, A., Voldborg, B. and Sundström, M. (2011) Screening of genetic parameters for soluble protein expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **77**, 104–11.
- 83 Terpe, K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 211–22.
- 84 Sørensen, H. P. and Mortensen, K. K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **115**, 113–28.
- 85 Goodman, D. B., Church, G. M. and Kosuri, S. (2013) Causes and effects of N-terminal codon bias in bacterial genes. *Science* **342**, 475–9.
- 86 Tegel, H., Ottosson, J. and Hober, S. (2011) Enhancing the protein production levels in *Escherichia coli* with a strong promoter. *FEBS J.* **278**, 729–39.
- 87 Basu, A., Li, X. and Leong, S. S. J. (2011) Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 241–51.
- 88 Song, J. M., An, Y. J., Kang, M. H., Lee, Y.-H. and Cha, S.-S. (2012) Cultivation at 6–10°C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **82**, 297–301.
- 89 Gopal, G. J. and Kumar, A. (2013) Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* **32**, 419–25.
- 90 De Marco, A., Deuerling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T. and Bukau, B. (2007) Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnol.* **7**, 32.
- 91 Studier, F. W. (2014) Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. *Methods Mol. Biol.* **1091**, 17–32.

- 92 Bryksin, A. V and Matsumura, I. (2010) Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques* **48**, 463–5.
- 93 Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- 94 LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 95 Bagdonienė, L., Bendikienė, V., Kadziauskas, J., et al. (2006) *Biochemijos laboratoriniai darbai*, p 148—151, Vilnius: VU leidykla.
- 96 Damian, L. (2013) Isothermal titration calorimetry for studying protein-ligand interactions. *Methods Mol. Biol.* **1008**, 103–18.
- 97 Zubriene, A., Matuliene, J., Baranauskiene, L., Jachno, J., Torresan, J., Michailoviene, V., Cimperman, P. and Matulis, D. (2009) Measurement of nanomolar dissociation constants by titration calorimetry and thermal shift assay - radicicol binding to Hsp90 and ethoxzolamide binding to CAII. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2662–80.
- 98 Leavitt, S. and Freire, E. (2001) Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 560–6.
- 99 Matulis, D. (2008) *Baltymų fizikinė chemija*, Technologija.
- 100 Ladbury, J. E. (2010) Calorimetry as a tool for understanding biomolecular interactions and an aid to drug design. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 888–93.
- 101 Zhang, R. and Monsma, F. (2010) Fluorescence-based thermal shift assays. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **13**, 389–402.
- 102 Todd, M. J., Cummings, M. D. and Nelen, M. I. (2005) Affinity assays for decrypting protein targets of unknown function. *Drug Discov. Today Technol.* **2**, 267–273.
- 103 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. *J. Biomol. Screen.* **6**, 429–40.
- 104 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**, 5258–66.
- 105 Cimperman, 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**, 3222–31.

- 106 Khalifah, R. G. and Edsall, J. T. (1972) Carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase: kinetics of alkylated anhydrases B and C from humans (metalloenzymes-isoenzymes-active sites-mechanism). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 172–6.
- 107 Williams, J. W. and Morrison, J. F. (1979) The kinetics of reversible tight-binding inhibition. *Methods Enzymol.* **63**, 437–67.
- 108 Nishimori, I., Vullo, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A. and Supuran, C. T. (2005) Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the transmembrane isozyme XIV with sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 3828–33.
- 109 Chen, X., Wu, J., Liu, H., He, Z., Gu, M., Wang, N., Ma, J., Hu, J., Xia, L., He, H., et al. (2010) Approaches to efficient production of recombinant angiogenesis inhibitor rhVEGI-192 and characterization of its structure and antiangiogenic function. *Protein Sci.* **19**, 449–57.
- 110 Mezzasalma, T. M., Kranz, J. K., Chan, W., Struble, G. T., Schalk-hihi, C., Deckman, I. C., Springer, A. and Todd, M. J. (2007) Enhancing Recombinant Protein Quality and Yield by Protein Stability Profiling.
- 111 Richard, A. J., Liu, C., Klinger, A. L., Todd, M. J., Mezzasalma, T. M. and Licata, V. J. (2006) Thermal stability landscape for Klenow DNA polymerase as a function of pH and salt concentration **1764**, 1546–1552.
- 112 Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., Detitta, G. T., Dekker, N. and Nordlund, P. (2006) Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal. Biochem.* **357**, 289–98.
- 113 Chen, J. C. and Chesler, M. (1992) pH transients evoked by excitatory synaptic transmission are increased by inhibition of extracellular carbonic anhydrase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 7786–7790.
- 114 Jogaite, V., Zubriene, A., Michailoviene, V., Gylyte, J. and Morkubaite, V. (2013) Characterization of human carbonic anhydrase XII stability and inhibitor binding. *Bioorg. Med. Chem.* **21.6**, 1431–1436.
- 115 Ladbury, J. E. and Doyle, M. L. (Eds.). (2004) *Biocalorimetry 2*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- 116 Baranauskienė, L. and Matulis, D. (2012) Intrinsic thermodynamics of ethoxzolamide inhibitor binding to human carbonic anhydrase XIII. *BMC Biophys.* **5**, 12.
- 117 Remko, M. and von der Lieth, C.-W. (2004) Theoretical study of gas-phase acidity, pKa, lipophilicity, and solubility of some biologically active sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 5395–403.
- 118 Morkūnaitė, V., Gylytė, J., Zubrienė, A., Baranauskienė, L., Kišonaitė, M., Michailovienė, V., Juozapaitienė, V., Todd, M. J. and Matulis, D. (2014) Intrinsic thermodynamics of sulfonamide inhibitor binding to human carbonic anhydrases I and II. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*

- 119 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**, 2093–106.
- 120 Krishnamurthy, V. M., Bohall, B. R., Kim, C.-Y., Moustakas, D. T., Christianson, D. W. and Whitesides, G. M. (2007) Thermodynamic parameters for the association of fluorinated benzenesulfonamides with bovine carbonic anhydrase II. *Chem. Asian J.* **2**, 94–105.
- 121 Supuran, C. T. (2008) Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Discov.*, Nature Publishing Group **7**, 168–81.
- 122 Wolfensberger, T. J. and Gregor, Z. J. (2010) Macular edema--rationale for therapy. *Dev. Ophthalmol.* **47**, 49–58.
- 123 Weiwei, Z. and Hu, R. (2009) Targeting carbonic anhydrase to treat diabetic retinopathy: emerging evidences and encouraging results. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 368–71.