VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Vilma Pilipuitytė

REKOMBINANTINĖS ŽMOGAUS KARBOANHIDRAZĖS VII GAVIMAS, JUNGIMOSI SU SLOPIKLIAIS MATAVIMAS BEI STABILUMO CHARAKTERIZAVIMAS

PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN CARBONIC ANHYDRASE VII, MEASUREMENT OF ITS BINDING WITH INHIBITORS AND CHARACTERIZATION OF ITS STABILITY

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 62405T201

Bioinžinerijos mokslo kryptis

Vilnius, 2010

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

_____

(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

_____

(Data)

Vilma Pilipuitytė

REKOMBINANTINĖS ŽMOGAUS KARBOANHIDRAZĖS VII GAVIMAS, JUNGIMOSI SU SLOPIKLIAIS MATAVIMAS BEI STABILUMO CHARAKTERIZAVIMAS

PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN CARBONIC ANHYDRASE VII, MEASUREMENT OF ITS BINDING WITH INHIBITORS AND CHARACTERIZATION OF ITS STABILITY

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 62405T201

Bioinžinerijos mokslo kryptis

Vadovas dr. Daumantas Matulis _____ _____
(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Konsultantas prof. habil. dr. Juozas Kulys _____ _____
(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Konsultantas dr. doc. Angelė Kaulakienė _____ _____
(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Vilnius, 2010

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas
_____
(Parašas)
Juozas Kulys
(Vardas, pavardė)
_____
(Data)

Technologijos mokslo sritis
Bioinžinerijos mokslo kryptis
Bioinžinerijos studijų kryptis
Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 62405T201
Bioinžinerijos specializacija

BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO UŽDUOTIS

…….....Nr. .....
Vilnius

Studentei **Vilmai Pilipuitytei**

Baigiamojo darbo tema:

Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VII gavimas, jungimosi su slopikliais matavimas bei stabilumo charakterizavimas

patvirtinta 2010 m. ..... d. dekano potvarkiu Nr. .....

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2010 m. ..... d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Žmogaus karboanhidrazės VII klonavimas, gryninimas, jungimosi su slopikliais matavimas izoterminiu titravimo kalorimetrijos bei terminio poslinkio metodais ir baltymo stabilumo esant skirtingoms pH reikšmėms įvertinimas.

Baigiamojo darbo rengimo konsultantai:
prof. habil. dr. Juozas Kulys
dr. doc. Angelė Kaulakienė

Vadovas ..... dr. Daumantas Matulis
(Parašas)

Užduotį gavau

…….. Vilma Pilipuitytė
(Parašas)

……..…....
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių moklų fakultetas
Chemijos ir boinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk. ……..
Data ….-….-….

Bioinžinerijos studijų programos baigiamasis magistro darbas

Pavadinimas: **Rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VII gavimas, jungimosi su slopikliais matavimas bei stabilumo charakterizavimas**

Autorius **Vilma Pilipuitytė** Vadovas **dr. Daumantas Matulis**

Kalba
[X] lietuvių
[ ] užsienio

Anotacija

Karboanhidrazės – tai plačiai paplitę cinko metalofermentai, katalizuojantys fiziologiškai esminę reakciją – grįžtamąją anglies dioksido hidrataciją. Sutrikusi šių baltymų veikla siejama su tokiomis ligomis kaip vėžys, glaukoma ir epilepsija. Pastebėta, kad slopinant tam tikras karboanhidrazes, stebimas ligų simptomų sumažėjimas. Baltymo sąveikos su slopikliu supratimui svarbu nustatyti jungimosi termodinamiką.

Darbo metu sukonstruotos dvi ekspresinės plazmidės, pasižyminčios rekombinantinio hCA VII raiška *E. coli* ląstelėse. Gautas aktyvus fermentas, visiškai atitinkantis UniProtKB/Swiss-Prot duomenų bazėje pateiktą hCA VII seką (P43166). Izoterminio titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodais ištirta šio fermento jungimosi su EZA ir TFMSA termodinamika. Pagal gautus stebimuosius jungimosi parametrus, apskaičiuota baltymo pK_a reikšmė, nustatyti „tikrieji“ jungimosi parametrai, nepriklausomi nuo pH ir buferinio tirpalo. Terminio poslinkio metodu įvertintas žmogaus karboanhidrazės VII terminis stabilumas esant skirtingoms pH.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, tyrimo rezultatai ir jų aptarimas, išvados ir literatūros sąrašas.

Darbo apimtis 68 p. teksto be priedų, 24 paveikslai, 5 lentelės, 42 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: žmogaus karboanhidrazė VII, genų ekspresija, izoterminio titravimo kalorimetrija, terminio poslinkio metodas, EZA, TFMSA, termodinamika, jungimosi konstanta, Gibso laisvoji energija, entalpija, entropija, stabilumas.

Vilnius Gediminas Technical University
Fundamental Sciences faculty
Chemistry and Bioengineering department

ISBN ISSN
Copies No. ……
Date ….-….-….

Bioengineering study programme master thesis.

Title: **Production of recombinant human carbonic anhydrase VII, measurement of its binding with inhibitors and characterization of its stability**

Author **Vilma Pilipuitytė** Academic supervisor **dr. Daumantas Matulis**

Thesis language

[X] Lithuanian

[ ] Foreign (English)

Annotation

Carbonic anhydrases are widely-spread zinc metalloenzymes. These enzymes catalyze physiologically important reaction – reversible carbon dioxide hydration. Unbalanced activity of carbonic anhydrases is related to a variety of disorders like glaucoma, cancer and epilepsy. It was noticed that inhibition of these enzymes reduces symptoms of these disorders. It is important to determine binding thermodynamics to know interactions between protein and inhibitor.

In this study two expression plasmids were created, and all of them showed expression of recombinant hCA VII in *E. coli* cells. The active enzyme was made, that completely correspond to hCA VII sequence (P43166) in UniProtKB/Swiss-Prot database. Thermodynamics of enzyme's binding with EZA and TFMSA was determined by isothermal titration calorimetry and thermal shift assay. The observed thermodynamic parameters were evaluated, protonation pK_a and the "intrinsic" binding parameters, independent of pH and buffer, were calculated. Thermal hCA VII stability in different pH was evaluated by thermal shift assay.

Structure: introduction, literature part, materials and methods, results and discussion, conclusions, and references.

Thesis consists of: 68 p. of text without appendixes, 24 pictures, 5 tables, and 42 bibliographical entries.

Keywords: human carbonic anhydrase VII, gene expression, isothermal titration calorimetry, thermal shift assay, EZA, TFMSA, thermodynamics, binding constant, Gibbs free energy, enthalpy, entropy, stability.

TURINYS

ĮVADAS 11
1. LITERATŪROS APŽVALGA 12
1.1. KARBOANHIDRAZIŲ APŽVALGA 12
1.1.1. α-karboanhidrazių struktūra ir katalizuojamos reakcijos 13
1.1.2. Ligos, susijusios su α-karboanhidrazių sutrikusia veikla 15
1.1.3. Žmogaus karboanhidrazės VII apžvalga 16
1.2. KARBOANHIDRAZIŲ SULFONAMIDINIAI SLOPIKLIAI 16
1.3. BALTYMO IR LIGANDO JUNGIMOSI TERMODINAMIKA IR TYRIMO METODAI 19
1.3.1. Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodo apžvalga 20
1.3.2. Terminio poslinkio metodo apžvalga 23
2. MEDŽIAGOS IR METODAI 26
2.1. DARBE NAUDOTI PRIETAISAI, MEDŽIAGOS IR TIRPALAI 26
2.1.1. Naudoti prietaisai 26
2.1.2. Naudotos medžiagos ir rinkiniai 26
2.1.3. Naudotos terpės ir tirpalai 28
2.2. METODAI 30
2.2.1. Geno klonavimas 30
2.2.2. hCA VII ekspresija, tirpumo patikrinimas ir gryninimas 33
2.2.3. hCA VII jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais matavimas 35
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS 37
3.1. hCA VII KLONAVIMAS 37
3.1.1. hCAVII/pET-15b (3 – 264 a. r.) klonavimas 37
3.1.2. hCAVII/pET-15b (1 – 264 a. r.) klonavimas 39
3.2. hCA VII BALTYMŲ EKSPRESIJA IR GRYNINIMAS 41
3.2.1. hCA VII baltymų ekspresija 41
3.2.2. hCA VII baltymų gryninimas 42
3.3. hCA VII JUNGIMOSI SU SULFONAMIDINIU LIGANDU TERMODINAMIKA 45
3.3.1. hCA VII ir sulfonamidinio ligando jungimosi metu vykstančios reakcijos 45
3.3.2. hCA VII jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais matavimas taikant izoterminio titravimo kalorimetriją 51
3.3.3. hCA VII jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais matavimas taikant terminio poslinkio metodą 54
3.3.4. hCA VII aktyviajame centre esančio hidroksido jono protonizacijos pK_a reikšmės nustatymas 57

3.3.5. hCA VII ir TFMSA jungimosi reakcijos protonizacijos skaičiaus nustatymas bei „tikrųjų“ jungimosi parametrų skaičiavimas 59
3.4. hCA VII STABILUMO ESANT SKIRTINGOMS pH REIKŠMĖMS ĮVERTINIMAS ..62
4. IŠVADOS 64
LITERATŪROS SĄRAŠAS 65

PAVEIKSLŲ IR LENTELIŲ SĄRAŠAS

Paveikslų sąrašas

1 pav. Schematinis CO_2 hidratacijos mechanizmas, katalizuojamas α-CA baltymų (psl. 14)

2 pav. Schematinis hCA VII slopinimas sulfonamidu (psl. 17)

3 pav. Kliniškai naudojamų sulfonamidinių vaistų struktūrinės formulės: 1 – acetazolamidas, 2 – metazolamidas, 3 – etokzolamidas, 4 – dichlorofenamidas, 5 – dorzolamidas ir 6 – brinzolamidas. Me atitinka CH_3 radikalą, o Et – C_2H_5 (psl. 18)

4 pav. Trifluormetansulfonamido struktūrinė formulė (psl. 18)

5 pav. Teorinės ITK kreivės, esant įvairiems C faktoriams (psl. 22)

6 pav. Principinė hCAVII/pET-15b (3 – 264 a. r.) plazmidės konstravimo bei hCA VII (3 – 264 a. r.) geno klonavimo schema (psl. 38)

7 pav. Principinė hCAVII/pET-15b (1 – 264 a. r.) plazmidės konstravimo bei hCA VII (1 – 264 a. r.) geno klonavimo schema (psl. 39)

8 pav. hCAVII/pET-15b baltymų ekspresijos ir tirpumo patikrinimas NDS-PAAG, auginant *E. coli* BL21 (DE3) kamiene 4 val. (psl. 42)

9 pav. hCA VII (1-264 a.r.) (29,66 kDa) gryninimo Q-sefarozės jonų mainų chromotografijos metodu rezultatai NDS-PAAG (psl. 43)

10 pav. hCA VII (1-264 a.r.) (29,66 kDa) gryninimo, naudojant LRY-2KT-sefarozės chromotografijos kolonėlę, rezultatai NDS-PAAG (psl. 44)

11 pav. hCA VII (1-264 a.r.) (29,66 kDa) gryninimo SP-sefarozės jonų mainų chromotografijos metodu rezultatai NDS-PAAG (psl. 45)

12 pav. Deprotonizuoto ir protonizuoto sulfonamidinio slopiklio frakcijų priklausomybė nuo pH ir pK_a reikšmių (modeliuotas grafikas) (psl. 48)

13 pav. Karboanhidrazės su prie cinko jono prisijungusiu protonizuotu hidroksido jonu frakcijos priklausomybė nuo pH ir pK_a reikšmių (modeliuotas grafikas) (psl. 48)

14 pav. Sulfonamidinio ligando ir karboanhidrazės stebimosios ΔG priklausomybė nuo pH (modeliuotas grafikas), kai $pK_{a\text{-}sulf} < pK_{a\text{-}CAZnH2O}$ ir $K_b = 10^7\ M^{-1}$ (psl. 49)

15 pav. Sulfonamidinio ligando ir karboanhidrazės stebimosios Δ*G* priklausomybė nuo pH (modelinis grafikas), kai $pK_{a\text{-}CAZnH2O} < pK_{a\text{-}sulf}$ ir $K_b = 10^7\ M^{-1}$ (psl. 50)

16 pav. ITK metodu gautos būdingos hCA VII jungimosi su TFMSA fosfatiniame buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms (psl. 51)

17 pav. ITK metodu gautos būdingos hCA VII jungimosi su TFMSA TRIS buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms (psl. 52)

18 pav. ITK metodu gautos būdingos hCA VII jungimosi su EZA fosfatiniame buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms (psl. 53)
19 pav. Tipinis fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas esant skirtingoms TFMSA (paveikslo A dalis) ir EZA (paveikslo B dalis) koncentracijoms, kai pH 6 (psl. 55)
20 pav. hCA VII T_m priklausomybės nuo ligando koncentracijos grafikas esant skirtingoms pH reikšmėms (psl. 56)
21 pav. Sulfonamidinių ligandų – TFMSA (A paveikslas) bei EZA (B paveikslas) – ir hCA VII stebimosios ΔG priklausomybės nuo pH grafikas (psl. 58)
22 pav. hCA VII ir TFMSA jungimosi reakcijos $\Delta_{steb}H$ priklausomybės nuo pH grafikas, tris ir fosfatiniame buferiniuose tirpaluose (psl. 60)
23 pav. Entalpijos (ΔH) ir entropijos ($T\Delta S$) indėlis hCA VII ir TFMSA jungimosi laisvajai Gibso energijai (psl. 61)
24 pav. hCA VII temperatūrinio stabilumo priklausomybės nuo pH grafikas (psl. 63)

Lentelių sąrašas

1 lentelė. Apskaičiuotos hCA VII baltymų molekulinės masės, teoriniai pI taškai ir ekstinkcijos koeficientai (psl. 41)
2 lentelė. hCA VII jungimosi su TFMSA ir EZA esant skirtingoms pH parametrai, gauti ITK metodu 25°C temperatūroje: jungimosi konstanta, laisvoji Gibso energija, jungimosi entalpija bei apskaičiuotas protonų skaičius (psl. 53)
3 lentelė. hCA VII jungimosi su TFMSA ir EZA esant skirtingoms pH terminio poslinkio metodu gauti parametrai: jungimosi konstanta ir laisvoji Gibso energija, kai $\Delta_U H_{(T)}$ = 543,92 kJ/mol (psl. 57)
4 lentelė. hCA VII aminorūgščių, turinčių joninę grupę, sąrašas ir jų pK_a reikšmės (psl. 62)
5 lentelė. hCA VII lydymosi temperatūros T_m reikšmės esant skirtingiems pH (psl. 62)

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AA – akrilamidas

Amp – ampicilinas

AmpR – atsparumo ampicilinui genas

APS – amonio persulfatas

aps. – apsisukimai

BAA – bis-akrilamidas

BL21 (DE3) – išvestinis *E. coli* kamienas

CA – karboanhidrazė

CARP – į α-CA panašūs baltymai

DMSO – dimetilsulfoksidas

dNTP – deoksiribonukleotidai

DTT – ditiotrietolis

E. coli – *Escherichia coli* bakterija

EDTA – etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska

EZA – etokzolamidas

GABA – gama-aminosviesto rūgštis

$GABA_A$ – gama-aminosviesto rūgšties A receptorius

hCA – žmogaus karboanhidrazė

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas

ITK – izoterminio titravimo kalorimetrija

NDS – natrio dodecilsulfatas

NDS-PAAG – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė

pET-15b – plazmidė

Pfu – DNR polimerazė iš *Pyrococcus furiosus*

PMSF – fenilmetilsulfonilchloridas

TEMED – N,N,N‘N‘-tetrametiletilendiaminas

TFMSA – trifluormetansulfonamidas

TPM – terminio poslinkio metodas

TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

XL1 blue – išvestinis *E. coli* kamienas

β-ME – β-merkapto etanolis

ĮVADAS

Karboanhidrazės – tai visose gyvosios gamtos karalystėse paplitę cinko metalofermentai, katalizuojantys fiziologiškai esminę reakciją – grįžtamąją anglies dioksido hidrataciją. Žinduoliuose aptinkta 16 karboanhidrazių izoformų, kurios skiriasi tarpusavyje pasiskirstymu audiniuose, ląsteline lokalizacija, savo funkcijomis bei aktyvumais. Sutrikusi šių baltymų veikla siejama su tokiomis ligomis kaip vėžys, glaukoma ir epilepsija. Pastebėta, kad slopinant tam tikras karboanhidrazes, stebimas ligų simptomų sumažėjimas. Tam tikri sulfonamidiniai slopikliai jau naudojami kaip vaistai, tačiau pastebėta, kad jie nespecifiškai slopina karboanhidrazes. Šiuo metu mokslininkai koncentruojasi į specifinių slopiklių paiešką, kad būtų slopinamos tik tam tikros karboanhidrazių izoformos ir nepakenktų organizmui.

Baltymo sąveikos su slopikliu supratimui svarbu nustatyti jungimosi termodinamiką. Nustačius karboanhidrazės jungimosi su slopikliu „tikruosius“ entalpijos bei laisvosios Gibso energijos pokyčius ir jas koreliuojant su kristalografijos metodu nustatytomis struktūromis, galima geriau suprasti, kas vyksta kiekvienos karboanhidrazės izoformos aktyviajame centre, jungiantis slopikliui, kuo jos skiriasi tarpusavyje. Tuomet bus galima konstruoti tam tikrai izoformai specifinius slopiklius.

Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje konstruojamos ekspresinės plazmidės, gryninama bei atliekami žmogaus karboanhidrazių termodinaminiai tyrimai.

Darbo tikslas - rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VII klonavimas, gryninimas, jungimosi su slopikliais matavimas izoterminiu titravimo kalorimetrijos bei terminio poslinkio metodais ir baltymo stabilumo esant skirtingoms pH reikšmėms įvertinimas.

Darbo uždaviniai:

- rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VII klonavimas, bei tinkamiausių ekspresijos sąlygų parinkimas;
- rekombinantinės žmogaus karboanhidrazės VII gryninimas;
- hCA VII jungimosi su TFMSA matavimas izoterminiu titravimo kalorimetrijos metodu;
- hCA VII jungimosi su TFMSA ir EZA matavimas terminio poslinkio metodu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. KARBOANHIDRAZIŲ APŽVALGA

Karboanhidrazės (CA, EC 4.2.1.1) yra vieni iš geriausiai tinkamų baltymų modelių, naudojamų įvairiose biofizikos, bioanalizės, fizikinės-organinės chemijos tyrimuose, kuriant naujus vaistus, bei medicinos chemijoje (Krishnamurthy 2008). Šie metalofermentai yra plačiai paplitę gamtoje – ekspresuojami eukariotuose (gyvūnuose ir augaluose), prokariotuose ir archėjose. Karboanhidrazės katalizuoja grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+. \quad (1)$$

Grįžtama CO_2 hidratacijos reakcija yra svarbi daugeliui biologinių procesų: a) kvėpavimo reguliacijai ir dujų apykaitai; b) pH reguliacijai ir palaikymui; c) regėjimui; d) kaulų vystymuisi ir jų funkcijai; e) kalcifikacijai; f) kai kuriems signaliniams keliams ir atminčiai; g) sielių gamybai; h) kasos sulčių gamybai; i) jonų transportui žarnyne; j) raumenų funkcijai ir nervų sistemai; k) prisitaikymui esant ląsteliniam stresui; l) auglių formavimuisi, užrūgštinant terpę aplink hipoksines auglio ląsteles; m) bei kai kuriems metaboliniams keliams, tokiems kaip gliukoneogenezė, lipogenezė, ureagenezė ir kt. (Krishnamurthy 2008, Pastorekova 2004). Taigi karboanhidrazės dalyvauja daugelyje esminių fiziologinių procesų, todėl jų aktyvumo pokyčiai lemia įvairias patalogijas.

Pagal aminorūgščių sekos homologiją skiriamos trys karboanhidrazių baltymų klasės: α-CA, β-CA ir γ-CA (Hewett-Emmett 1996). α-CA aptinkamos stuburiniuose, bakterijose, dumbliuose bei augalų citaplazmoje, β-CA randamos augaluose, dumbliuose ir bakterijose, o γ-CA – daugiausiai archėjose bei keliose bakterijose (Supuran 2008). α-CA klasės genai koduoja ne tik aktyvias karboanhidrazių izoformas, bet ir katalitinio aktyvumo neturinčius baltymus (Pastorekova 2004). Kai kurie autoriai dar skiria δ-CA, randamų jūrinių dumblių diatomuose, ir ε-CA, randamų bakterijose, baltymų klases. Manoma, kad δ-CA klasės baltymas TWCA1, aptinkamas iš *Thalassiosira weissflogii,* yra α-CA homologas, o ε-CA baltymai atstovauja β-CA poklasį (Krishnamurthy 2008, Lane 2000, Morel 2002, So 2004).

α-CA, δ-CA ir ε-CA baltymai yra monomerai, γ-CA – trimerai, o β-CA klasę sudaro dimerai, tetramerai, heksamerai ir oktamerai (Kimber 2000). Šių klasių baltymų tretinės ir ketvirtinės struktūros nepanašios, tačiau jie visi aktyviajame centre turi cinko joną (Zn^{2+}).

Nustatyta, kad α-karboanhidrazės katalizuoja ne tik grįžtamą angies dioksido hidrataciją, bet ir kitas reakcijas: cianato hidrataciją į karbamo rūgštį, cianamido hidrataciją į karbamidą,

aldehidų hidratacijąį gem-diolius, karboksilinių arba sulfanilinių esterių hidrolizę ir kt. Iki šiol neaišku, kurios kitos α-karboanhidrazių katalizuojamos reakcijos, išskyrus CO_2 hidratacijąturi fiziologinę reikšmę (Supuran 2008).

Toliau bus aptariama α-CA baltymų klasė, nes tai vieninteliai žmoguje aptinkami baltymai ir todėl vaistų kūrime dažniausiai naudojami kaip modeliai.

1.1.1. α-karboanhidrazių struktūra ir katalizuojamos reakcijos

Šiuo metu α-karboanhidrazių klasei priskiriama 16 baltymų. Jų pasiskirstymas ląstelėje yra įvairus: citozolinės (CA I, II, III, VII ir XIII), susijusios su membrana (CA IV, IX, XII, XIV ir XV), mitochondrinės (CA VA ir VB), sekretuojamos (CA VI) ir į CA panašūs baltymai (CARP VIII, CARP X ir CARP XI) (Krishnamurthy 2008, Supuran 2008).

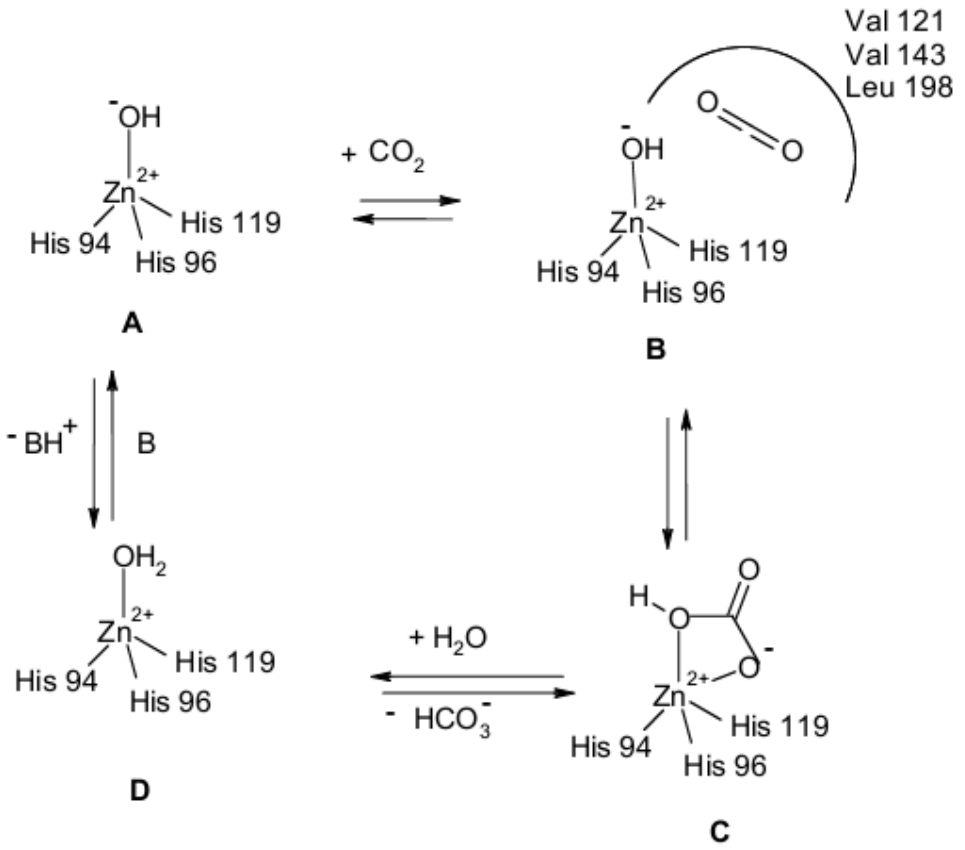
α-CA būdinga itin panaši erdvinė struktūra, nors jos neturi ryškaus sekų panašumo. α-CA priskiriami baltymai, turintys iš dešimties β-klosčių sudarytą β-lakštą (pagal SCOP duomenų bazėje pateikiamą klasifikaciją). Katalizei būtinas metalo jonas Zn^{2+} yra ~15Å gylio aktyvaus centro kišenės dugne, kurį koordinuoja trys histidino aminorūgšties liekanos (His 94, His 96 ir His 119) ir vandens molekulė arba hidroksido jonas, kaip rodo Rentgeno spindulių difrakcijos kristalografijos duomenys (Supuran 2008). Cinko jonas, trys histidinų azoto atomai bei bikarbonato jono deguonies atomas išsidėstę šiek tiek deformuoto tetraedro forma. Prie cinko prisijungusi vandens molekulė taip pat vandeniliniais ryšiais sąveikauja su Thr 199 hidroksilo grupe, kuri sudaro ryšius su Glu 106 karboksilo grupe. Šios sąveikos padidina vandens molekulės nukleofiliškumą ir orientuoja substratą (CO_2), kad šis būtų lengviau prieinamas nukleofilinės atakos metu (Supuran 2007, Supuran 2008).

α-karboanhidrazių katalizuojama grįžtama CO_2 hidratacija vyksta pagal „Ping-Pong“ reakcijos mechanizmą (Kimber 2000, Krishnamurthy 2008). Šį procesą galima aprašyti schematinėmis lygtimis:

$$EZn^{2+}OH^- + CO_2 \leftrightarrow EZn^{2+}HCO_3^- \overset{+H_2O}{\longleftrightarrow} EZn^{2+}OH_2 + HCO_3^-; \quad (2)$$

$$EZn^{2+}OH_2 \leftrightarrow EZn^{2+}OH^- + H^+. \quad (3)$$

Kai fermento aktyviajame centre Zn^{2+} koordinuoja hidroksido jonas (1A pav.), jis atakuoja CO_2, esantį hidrofobinėje kišenėje, kurią suformuoja Val 121, Val 143 ir Leu 198 žmogaus karboanhidrazės II atveju (1B pav.). Tokiu būdu susidaro bikarbonatas, koordinuojamas cinko jono (1C pav.).



1 pav. Schematinis CO_2 hidratacijos mechanizmas, katalizuojamas α-CA baltymų (Supuran 2008).

Susidaręs bikarbonato jonas atpalaiduojamas į tirpalą, o jį pakeičia vandens molekulė. 1 paveikslo A, B ir C dalis aprašo (2) lygtis. Taip susidaro rūgštinė fermento forma, aktyviajame centre turinti cinko joną, koordinuojamą vandens molekule (1D pav.). Kai protonas pernešamas į terpę nuo baltymo aktyvaus centre esančios aminorūgšties liekanos, pavyzdžiui, karboanhidrazėse I, II, IV, VII, IX ir XII-XIV – nuo His 64, arba buferinio tirpalo, fermentas regeneruojamas į aktyvią bazinę formą (3) (Kimber 2000, Krishnamurthy 2008, Supuran 2008).

Reakcijos greitį ribojanti stadija yra protono pernešimas, kai regeneruojamas fermentas (3). Šį procesą efektyviai pagreitina aukščiau minėta histidino aminorūgšties liekana (His 64), kuri tiesiogiai perduodama protoną nuo vandens į išorę veikia kaip protonų šaudyklė (Fisher 2005, Kimber 2000, Krishnamurthy 2008, Temperini 2008). Tuo galima paaiškinti, kodėl CA II yra viena iš aktyviausių karboanhidrazių ($k_{cat}/K_m = 1{,}5 \cdot 10^8\ M^{-1}s^{-1}$).

1.1.2. Ligos, susijusios su α-karboanhidrazių sutrikusia veikla

Kaip jau minėta anksčiau, karboanhidrazės katalizuoja fiziologiškai esminę reakciją – grįžtamą CO_2 hidrataciją. Nustatyta, kad kai kurių karboanhidrazės izoformų pakitusi ekspresija lemia tam tikras ligas.

Sergant glaukoma akies audinyje esančios karboanhidrazės gamina per daug bikarbonato jonų, dėl kurių skatinama akies skysčio sekrecija ir padidėja akispūdis, dėl kurio sumažėja kraujo patekimas į tinklainę. Laiku nepradėjus gydyti ligos, galima apakti. Glaukomos gydymui naudojami CA II inhibitoriai (Krishnamurthy 2008). Su šia ligos progresavimu taip pat siejamos CA XII, CA III ir CA IV, kurios pasiūlytos kaip potencialūs taikiniai vaistų kūrime (Pastorekova 2004).

Pirmoji karboanhidrazė susieta su vėžio vystymusi buvo CA IX. Tai aprašė 1992 metais Pastorekova su bendradarbiais. Antroji karboanhidrazė – CA XII, kaip vėliau nustatyta, koekspresuojama kartu su CA IX kai kuriuose vėžiniuose audiniuose bei taip pat randama daugelyje normalių audinių (Thiry 2008). Normaliuose audiniuose CA IX ekspresija labai silpna, tačiau ji labai efektyviai indukuojama augliuose hipoksijos metu. CA IX laikomas vienu patikimiausiu hipoksijos žymenų audiniuose, nes tai yra membraninis baltymas, turintis ląstelės išorėje išsidėsčiusį aktyvųjį centrą (Thiry 2008). CA IX slopinimui naudojami ligandai hipoksijos atveju lemia ląstelės žūtį (Potter and Harris, 2004).

Nervų sistemos ligų gydymui naudojami slopikliai yra potencialūs CA II, CA IV, CA V, CA VII ir CA XIV taikiniai. Šie baltymai aptinkami nerviniuose audiniuose, todėl manoma, kad jie yra susiję su epilepsija, migrena ir kitomis nervų sistemos ligomis.

Epilepsijos gydymui naudojamas sulfamatas topiramatas (TPM). Kaip pastebėta, jis ne tik reguliuoja smegenų veiklą, bet ir mažina kūno svorį. Zonisamidas (ZNS), taip pat naudojamas kaip antiepilepsinis vaistas, efektyviai mažina svorį nutukusiems žmonės ir gydo valgymo sutrikimus, tokius kaip bulimiją ir anokreksiją. Manoma, kad TPM ir ZNS sukeliamas šalutinis poveikis, svorio mažėjimas, yra susijęs su lipogenezėje dalyvaujančių korboanhidrazių izoformų CA II ir CA VA slopinimu (Simone 2008).

Tokiose didelėse baltymų klasėse kaip CA svarbu gerai ištirti aktyvaus centro struktūrą ir sąveiką su slopikliais. Tuomet bus galima sukurti vaistus, kurie slopintų tik tam tikrus CA izofermentus, bet neslopintų nespecifinių baltymo formų, kurios paplitusios visame organizme ir kurių slopinimas sukeltų žalingų šalutinių poveikių.

1.1.3. Žmogaus karboanhidrazės VII apžvalga

Biotechnologijos instituto biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje tiriamos aktyvios α-karboanhidrazių formos. Jau susintetinti ir charakterizuoti jaučio CA II (Linos Mištinaitės baigiamasis magistro darbas), žmogaus CA I ir žmogaus CA III baltymai. Šio darbo metu termodinamškai apibūdinta žmogaus CA VII, kuri yra viena iš geriausių anglies dvideginio grįžtamos hidratacijos katalizatorių, lyginant su kitomis karboanhidrazėmis. Šio baltymo katalizinis aktyvumas sudaro ~ 50 – 70 % CA II aktyvumo.

CA VII aminorūgščių sekos yra labai konservatyvios (~ 95 %) tarp žmogaus ir pelės homologų, todėl nuspręsta, kad šių baltymų genai atlieką svarbią biologinę funkciją. In situ hibridizacijos būdu nustatyta, kad CA VII ekspresuojama žiurkės smegenyse (Halmi 2006, Lakkis 1997, Ruusuvuori 2004). Didžiausia CA VII ekspresija nustatyta žiurkių smegenų žievėje, hipokampe ir gumbure. Norterno bloto analizės metu nustatytos dvi CA VII juostelės (1,0 ir 2,2 kb). Sukėlus epilepsijos priepuolius kainine rūgštimi, nepastebėti jokie CA VII mRNR pokyčiai, tik po 12 val. (iki 7 dienų) stebimas nežymus 2,2 kb CA VII juostelės sumažėjimas (Halmi 2006). Šiais tyrimais nustatyta, kad kaininė rūgštis indukavo CA II ir CA XII baltymų ekspresiją.

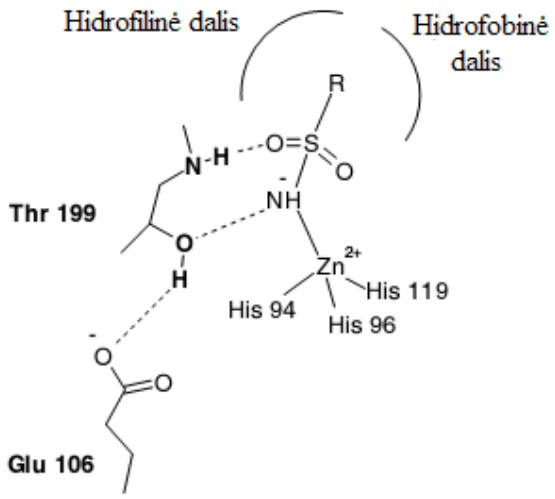
Ruusuvuori su bendradarbiais 2004 metais atliko tyrimus, kad identifikuotų molekulinius mechanizmus, sukeliančius sinchroninius CA1 piramidinių neuronų sužadinimus. Dirginant smegenis aukštu dažniu hipokampo piramidiniuose neuronuose sukeliamas $GABA_A$ receptoriaus atsakas, kuris nepastebimas iki postnatalinės 12 dienos. Taip pat tą pačią dieną stebimas ir CA VII pagausėjimas. Taigi manoma, kad padidėjusi CA VII ekspresija sukelia GABA-erginį sužadinimą, ir šio baltymo slopikliai galėtų būti naudojami kaip vaistai gydant epilepsiją (Ruusuvuori 2004).

1.2. KARBOANHIDRAZIŲ SULFONAMIDINIAI SLOPIKLIAI

Sulfonamidinių ligandų sugebėjimą slopinti karboanhidrazes pirmieji pastebėjo Mannas ir Keilin 1940 metais. Taip prasidėjo naujas vaistų kūrimo etapas, kai sulfonamidoniai slopikliai naudojami glaukomos, hipoglikemijos, vėžinių ir nervų sistemos ligų bei nutukimo gydymui.

Sulfonamidai jungiasi prie aktyviajame centre deprotonizuotoje formoje esančio cinko jono, sudarydami tetraedrinę geometriją: ligando azoto atomas prisijungia prie Zn^{2+} bei suformuojami vandeniliniai ryšiai su baltymo Thr 199 aminorūgšties liekana, kuri vandeniliniais

ryšiais susijungusi su Glu 106 (hCA II atveju) (Pastorekova 2004, Supuran ir Scozzafava 2007) (2 pav.).

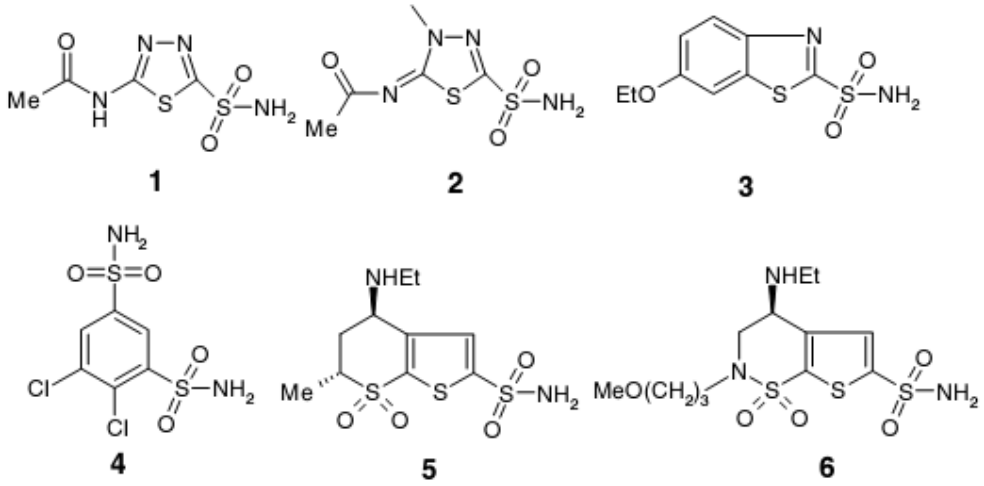


2 pav. Schematinis hCA VII slopinimas sulfonamidu (Supuran ir Scozzafava 2007).

Kaip matyti iš 2 paveikslo, aromatinė sulfonamidinio slopiklio dalis, pažymėta R, sąveikauja su hidrofilinėmis ir hidrofobinėmis baltymo aktyvaus centro aminorūgščių liekanomis. Šią baltymo ir ligando galima aprašyti supaprastinta lygtimi, kur S raide pažymėtas sulfonamidas:

$$EZn^{2+}OH_2 + S \leftrightarrow EZn^{2+}S + H_2O. \quad (4)$$

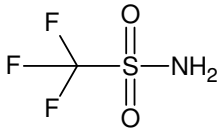
Šiuo metu kliniškai naudojami šie sulfonamidai: acetazolamidas, metazolamidas, etokzolamidas, dichlorofenamidas, dorzolamidas ir brinzolamidas. Jų struktūrinės formulės pateiktos 3 paveiksle.



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

Acetazolamidas yra diuretikas, kuris naudojamas glaukomai, epilepsijos priepuoliams, idiopatinei intrakranijinei hipertenzijai, kalnų ligai, cistinurijai bei Marfano sindromui gydyti. Etokzolamidas taip pat yra diuretikas. Jis naudojamas glaukomai, dvylikapirštės žarnos opoms ir kartais kai kurioms epilepsijos formoms gydyti. Metazolamidas, dichlorofenamidas, dorzolamidas bei brinzolamidas naudojami glaukomai gydyti.

Visi aukščiau pateikti sulfonamidiniai slopikliai yra heterocikliniai, tačiau buvo kuriami ir paprasti halo-alifatiniai ligandai, kaip pavyzdžiui trifluormetansulfonamidas (TFMSA) (4 pav.).



4 pav. Trifluormetansulfonamido struktūrinė formulė.

Paprasti halo-alifatiniai ligandai yra pakankamai stiprūs sulfonamidiniai karboanhidrazių slopikliai. Į slopiklio struktūrą įvedami fluoro arba chloro atomai, kad pK_a reikšmė būtų mažesnė. Maren ir Conroy (1993 m.) savo darbuose pastebėjo, kad tarp ligando pKa reikšmės ir CA II disociacijos konstantos yra tiesioginė priklausomybė. Taip buvo sukurtas stiprus karboanhidrazių slopiklis TFMSA (4 pav.), tačiau šis ligandas neparodė išskirtinio poveikio gydant glaukomą (Maren 1993).

Kuriant efektyvius sulfonamidinius vaistus glaukomai gydyti buvo taikyti du metodai: „žiedo“ ir „uodegos“. Dorzolamidas ir brinzolamidas buvo sukurti taikant „žiedo“ metodą, kurio esmė – didelė žiedinių sistemų įvairovė, prie kurių prijungiamos sulfonamidinės ir kitos grupės. Tokiu būdu buvo gauta daug neefektyvių ligandų ir alergenų bei tik du kliniškai taikomi

slopikliai. „Uodegos“ metodas pradėtas taikyti visai neseniai. Jo esmė yra įvairių tirpumą gerinančių šoninių grandinių prijungimas prie gerai žinomų heterociklinių sulfonamidų. Kol kas nėra kliniškai naudojamų sulfonamidų, sukurtų tokiu būdu, tačiau pastebėtas kai kurių junginių didesnis efektyvumas gydant glaukomą gyvūnų modeliuose, lyginant su šiuo metu gydymui naudojamais slopikliais (Supuran 2003).

Didžiausia problema kuriant vaistus yra ta, kad sulfonamidai nespecifiškai slopina svarbią fiziologinę funkciją turinčias karboanhidrazių izoformas (Supuran ir Scozzafava 2007) ir taip gali pakenkti organizmui. Todėl kuriant slopiklius pradėtas taikyti naujas metodas, kai prie žinomų heterociklinių sulfonamidų prijungiami pakaitai – polimerai, piridinai, karbohidratai – neleidžiantys ligandui pereiti per ląstelės membraną. Tokiu būdu gauta junginių, kurie specifiškai slopina tik membranines karboanhidrazes, ląstelės išorėje turinčias aktyvųjį centrą (Lopez 2010, Supuran 2003). Taigi šis metodas taikomas su vėžiu susijusių karboanhidrazių slopinimui.

1.3. BALTYMO IR LIGANDO JUNGIMOSI TERMODINAMIKA IR TYRIMO METODAI

Karboanhidrazės dažnai naudojamos kaip modeliai baltymo jungimosi su ligandu termodinamikos ir kinetikos tyrimams. Dauguma metodų remiasi makromolekulės ir ligando jungimosi pusiausvyrinės konstantos nustatymu:

$$K_b = \frac{[ML]}{[M][L]}; \quad (5)$$

[*M*] – makromolekulės, [*L*] – ligando ir [*ML*] – jų komplekso pusiausvyrinės koncentracijos.

Slopiklio disociacijos pusiausvyros konstanta (K_d) yra atvirkščiai proporcinga jungimosi konstantai:

$$K_d = \frac{1}{K_b}. \quad (6)$$

Baltymo jungimosi su ligandu termodinamikai tirti taikomi fluorescenciniai, liuminescenciniai, įvairūs spektroskopiniai, masių spektrometrijos, magnetinio rezonanso,

cirkuliarinio dichroizmo, paviršiaus plazmonų rezonanso, kapiliarinės elektrofozės, įvairūs kalorimetrijos ir kt. metodai.

Fluorescencinės spektroskopijos metoda yra labai jautrus. Pagrindinis jo trūkumas yra tai, kad reikalinga fluorescuojanti molekulė. Afiniškumo kapiliarinės elektroforezės esmė – skirtingas laisvo baltymo ir baltymo, susijungusio su makromolekule, judėjimas elektriniame lauke (Krishnamurthy 2008). Dauguma metodų nustatomos jungimosi pusiausvyrinės konstantos, o jungimosi termodinaminiai parametrai apskaičiuojami pagal teorines priklausomybes. Izoterminio titravimo kalorimetrija (ITK) yra vienintelis metodas, kuriuo tiesiogiai išmatuojama ne tik reakcijos jungimosi konstantą, bet ir entalpiją.

1.3.1. Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodo apžvalga

Izoterminio titravimo kalorimetrija yra tikslus metodas, kuriuo tiesiogiai išmatuojama reakcijos jungimosi entalpija esant izoterminėms ir izobarinėms sąlygoms. Vieno eksperimento metu nustatoma baltymo ir ligando jungimosi reakcijos entalpijos ir entropijos pokyčiai, jungimosi konstanta (26), iš kurios apskaičiuojama laisvoji Gibso energija (27), bei susijungusių medžiagų stechiometrija (Baranauskiene 2009, Jelesarov 1999, Matulis 2008, Perozzo 2004). ITK eksperimento metu ligandas titruojamas į kiuvetėje esantį baltymo tirpalą (gali būti ir atvirkščiai). Po kiekvienos ligando (arba baltymo) injekcijos matuojamas išsiskyrusios arba sugertos šilumos pokytis:

$$q = V_0 \Delta H \Delta[ML]; \quad (7)$$

kur q – šilumos kiekis, V_0 – reakcijos tūris kiuvetėje, ΔH – jungimosi entalpijos pokytis ir Δ[ML] – makromolekulės-ligando komplekso koncentracijos pokytis.

ITK eksperimetuose kiekvienos pridėtos ligando injekcijos sukeltas šilumos pokytis priklauso nuo reakcijos tūrio, koncentracijų, jungimosi entalpijos pokyčio, jungimosi konstantos, skiedimosi šilumos, stechiometrijos ir nuo prieš tai pridėto ligando kiekio. Po kiekvienos injekcijos sumažėja neužimtų ligando prisijungimo centrų ir todėl mažėja šilumos pokytis (Perozzo 2004). Bendras šilumos kiekis po i-tosios injekcijos apskaičiuojamas:

$$Q = V_0 \Delta H \sum \Delta[ML]_i = V_0 \Delta H [ML]_i; \quad (8)$$

kur $[ML]_i$ – makromolekulės-ligando komplekso koncentracija po i-tosios injekcijos.

Manoma, kad karboanhidrazė turi vieną sulfonamido surišimo centrą. Tai pati paprasčiausia jungimosi reakcijos sistema. Tokiu atveju jungimosi konstanta apskaičiuojama:

$$K_b = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[L]}; \quad (9)$$

kur Θ – įsotinimo frakcija, [L] – laisvo ligando koncentracija, kuris priklauso nuo bendros ligando [L_T] ir bendros makromolekulių [M_T] koncentracjų:

$$[L] = [L_T] - n\Theta[M_T]. \quad (10)$$

Gaunama kvadratinė lygtis, įstačius (9) ir (10). Šios lygties vienintelis prasmingas sprendinys:

$$\Theta = \frac{1}{2}\left(1 + \frac{1}{nK_b[M_T]} + \frac{[L_T]}{n[M_T]} - \sqrt{\left(1 + \frac{1}{nK_b[M_T]} + \frac{[L_T]}{n[M_T]}\right)^2 - \frac{4[L_T]}{n[M_T]}}\right). \quad (11)$$

Tuomet reakcijos intergralinis šilumos kiekis po *i*-tosios injekcijos lygus:

$$Q = n[M_T]V_0\Delta H\Theta_i, \quad (12)$$

ir diferencialinis *i*-tosios injekcijos šilumos kiekis lygus (Perozzo 2004):

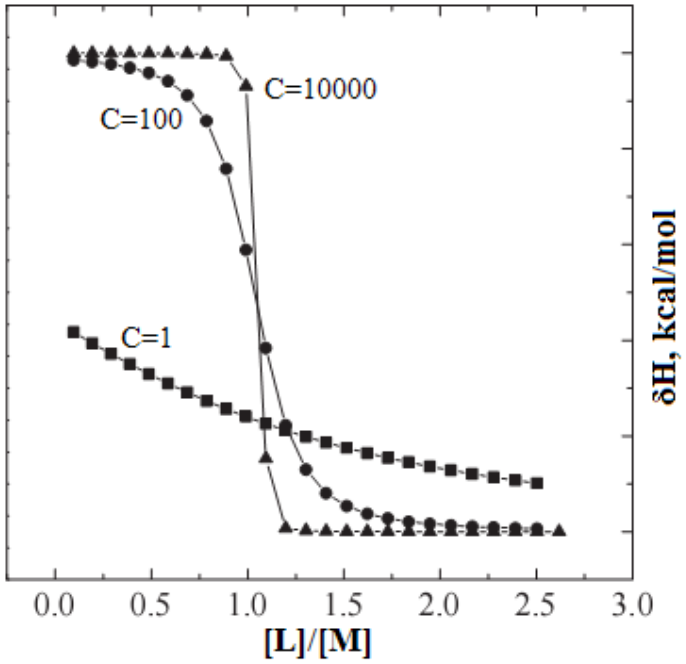
$$q_i = n[M_T]V_0\Delta H(\Theta_i - \Theta_{i-1}). \quad (13)$$

Atliekant eksperimentą baltymas (arba ligandas) titruojamas 20-50 ligando (arba baltymo) injekcijų ir suplanuojamas taip, kad jungimosi reakcijos vyktų tik pusės injekcijų metu. Gaunamos elektrinės galios, kurios reikia šaldyti arba kaitinti mėginio kiuvetę iki nustatytos temperatūros, kitimo laike kreivės. Integruodami gautų pikų plotus gauname išssiskyrusios arba sugertos šilumos pokytį (Jelesarov 1999, Matulis 2008). Tipinės ITK kreivės parodytos 3.3.2. skyriuje.

Kad ITK eksperimetų metu būtų gauta tiksli jungimosi konstanta, labai svarbi yra kreivės forma, kuri priklauso nuo C faktoriaus. Faktorius C yra lygus titruojamo baltymo koncentracijos ir jungimosi konstantos sandaugai, jei ji yra žinoma:

$$C = [M_T]K_b. \quad (14)$$

Kokybiškos titravimo kreivės gaunamos, kai parametras C yra tarp 10 ir 100 (Perozzo 2004). Kai C faktorius labai didelis (C > 1000), gaunamos stačios kreivės, iš kurių pakankamai gerai nustatoma jungimosi entalpija bei susijungusių medžiagų stechiometrija, tačiau gauta jungimosi konstanta nėra tiksli, kaip pavaizduota 5 paveiksle (Campoy 2005).



5 pav. Teorinės ITK kreivės, esant įvairiems C faktoriams (Campoy 2005).

Kai C faktorius labai mažas (C ≤ 1), gaunamos gulsčios kreivės, iš kurių nei vienas nustatytas parametras nėra tikslus. ITK eksperimentais tiksliausiai nustatoma jungimosi konstanta, kai 10^4 M^{-1} < K_b < 10^8 M^{-1} (Campoy 2005). 10^4 M^{-1} – mažiausia jungimosi konstanta, kurią galima nustatyti ITK metodu (Perozzo 2004).

Daugelio mokslininkų pagrindinis uždavinys – izoterminio titravimo kalorimetrijos duomenų bazės sukūrimas ir jungimosi termodinamikos koreliavimas su besijungiančių kompleksų struktūromis (Baranauskienė 2009). Pirmąją ITK duomenų saugyklą 2001 metais sukūrė Gilson su bendradarbiais. Ladbury sudarytoje „SCORPIO“ duomenų bazėje pateikta 29 skirtingų baltymų, 176 ligandų ir 90 unikalių baltymo-ligando kompleksų termodinamikos bei struktūros duomenys. Visų svarbiausių biologinių procesų metu vyksta baltymo jungimasis su ligandu, pavyzdžiui fermentinės, antikūno-antigeno, receptorių jungimosi reakcijos, todėl svarbu suprasti reakcijas, vykstančias tarp baltymo ir ligando.

1.3.2. Terminio poslinkio metodo apžvalga

Terminio poslinkio metodo (TPM) metodo esmė – fluorescencinis baltymo temperatūrinio stabilumo tyrimas, esant skirtingoms baltymo ir ligando koncentracijoms. TPM matuojamas baltymo temperatūrinis stabilumas, stebint su baltymu susijungusio dažo 8-anilino-1-naftaleno sulfonato (ANS) fluorescenciją. Kai temperatūra nedidelė ir baltymas natyvus, ANS fluorescencija yra labai nežymi. Baltymui pradėjus išsivynioti, atsiveria jo hidrofobinės sritys, prie kurių jungiasi fluorescencinis dažas. Tuomet stebima intensyvesnė ANS fluorescencija, nes dažas intensyviau fluorescuoja hidrofobinėje aplinkoje. Pasiekus tam tikrą temperatūrą, baltymas denatūruoja, atitinkamai mažėja ir dažo fluorescencija (Matulis 1998, Matulis 2005). Stebimą fluorescenciją galima aprašyti lygtimi:

$$y(T) = y_U P_U + y_N(1 - P_U); \quad (15)$$

kur y_U – išsivyniojusio baltymo, y_N – natyvaus baltymo fluorescencijos intensyvumai, o P_U – baltymo išsivyniojimo tikimybė, kuri apskaičiuojama:

$$P_U = \frac{1}{1+e^{\Delta_U G/RT}}; \quad (16)$$

kur $\Delta_U G$ – baltymo išsivyniojimo laisvosios Gibso energijos pokytis, R – universalioji dujų konstanta ir T – absoliuti temperatūra kelvinais (Zubrienė 2009). Baltymo išsivyniojimo laisvoji Gibso energija gali būti išreikšta per baltymo išsivyniojimo entalpijos ($\Delta_U H$), entropijos ($\Delta_U S$) ir šiluminės talpos pokyčius ($\Delta_U C_p$):

$$\Delta_U G = \Delta_U H_T + \Delta_U C_p(T - T_r) - T\left(\Delta_U S_T + \Delta_U C_p ln(T/T_r)\right); \quad (17)$$

kai T_r yra baltymo lydimosi temperatūra (T_m), kurioje yra žinomi entalpijos ir entropijos pokyčiai, o šiluminės talpos pokytis nepriklauso nuo temperatūros.

Natyvaus bei išsivyniojusio baltymo fluorescencijų priklausomybės aprašomos lygtimis:

$$y_N = y_{N,Tm} + m_N(T - T_m);$$
$$y_U = y_{U,Tm} + m_U(T - T_m); \quad (18)$$

kur $y_{N,Tm}$ ir $y_{U,Tm}$ – natyvaus ir išsivyniojusio baltymo fluorescencija lydymosi temperatūros taške, m_N ir m_U – natyvaus ir išsivyniojusio baltymo fluorescencijos koeficientai priklausantys nuo tiesinės temperatūros.

Iš (15) – (18) lygčių sudaroma fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo temperatūros funkcija:

$$y = y_{N,Tm} + m_N(T - T_m) + \frac{y_{U,Tm} - y_{N,Tm} + (m_U - m_N)(T - T_m)}{1 + e^{\frac{\Delta_U H_{Tm} + \Delta_U C_p(T - T_m) - T\left(\Delta_U S_{Tm} + \Delta_U C_p(lnT/T_m)\right)}{RT}}}. \quad (19)$$

Didinant temperatūrą baltymas denatūruoja, tačiau baltymą gali stabilizuoti prie jo natyvios būsenos besijungiantis ligandas. Jei ligandas stipriau jungiasi prie išsivyniojusio baltymo, tuomet baltymas destabilizuojamas. Šias jungimosi reakcijas galima pavaizduoti schemomis:

$$[UL] \underset{K_{bU}}{\longleftrightarrow} [U] + [L] \underset{K_U}{\leftrightarrow} [N] + [L] \overset{K_{bN}}{\longleftrightarrow} [NL]; \quad (20)$$

kur [UL] – išsivyniojusio baltymo-ligando komplekso koncentracija, [U] – laisvo išsivyniojusio baltymo koncentracija, [L] – laisvo ligando koncentracija, [N] – laisvo natyvaus baltymo koncentracija ir [NL] – natyvaus baltymo-ligando komplekso koncentracija (Cimmperman 2008).

Suminius reakcijose dalyvaujančius baltymo (P_t) ir ligando (L_t) kiekius galima išreikšti lygybėmis :

$$P_t = [N] + [U] + [NL] + [UL];$$
$$L_t = [L] + [NL] + [UL]. \quad (21)$$

Pusiausvyros konstantas, kurios nusako baltymo stabilumą ir ligando jungimąsi (20), galima išreikšti laisvosiomis energijomis:

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = e^{-\Delta_U G_T/RT} = e^{-(\Delta_U H_T - T\Delta_U S_T)/RT} =$$

$$e^{-\left(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p(T - T_r) - T\left(\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p ln(T/T_r)\right)\right)/RT}; \quad (22)$$

kur $\Delta_U G_T$, $\Delta_U H_T$, $\Delta_U S_T$ ir $\Delta_U C_p$ – išsivyniojusio baltymo laisvosios Gibso energijos, entalpijos, entropijos ir šiluminės talpos pokyčiai. T_r – baltymo lydymosi temperatūra, kei nėra ligando.

$$K_{bN} = \frac{[NL]}{[N][L]} = e^{-\Delta_{bN}G_T/RT} = e^{-(\Delta_{bN}H_T - T\Delta_{bN}S_T)/RT} =$$

$$e^{-\left(\Delta_{bN}H_{T0} + \Delta_{bN}C_p(T-T_0) - T\left(\Delta_{bN}S_{T0} + \Delta_U C_p ln(T/T_0)\right)\right)/RT}; \quad (23)$$

kur $\Delta_{bN}G_T$, $\Delta_{bN}H_T$, $\Delta_{bN}S_T$ ir $\Delta_{bN}C_p$ – ligando jungimosi su natyviu baltymu laisvosios Gibso energijos, entalpijos, entropijos ir šiluminės talpos pokyčiai. T_0 lygi 37°C.

$$K_{bU} = \frac{[UL]}{[U][L]} = e^{-\Delta_{bU}G_T/RT} = e^{-(\Delta_{bU}H_T - T\Delta_{bU}S_T)/RT} =$$

$$e^{-\left(\Delta_{bU}H_{T0} + \Delta_{bU}C_p(T-T_0) - T\left(\Delta_{bU}S_{T0} + \Delta_U C_p ln(T/T_0)\right)\right)/RT}; \quad (24)$$

kur $\Delta_{bU}G_T$, $\Delta_{bU}H_T$, $\Delta_{bU}S_T$ ir $\Delta_{bU}C_p$ – ligando jungimosi su išsivyniojusiu baltymu laisvosios Gibso energijos, entalpijos, entropijos ir šiluminės talpos pokyčiai (Cimmperman 2008).

Daroma prielaida, kad ligandas nesijungia su išsivyniojusiu baltymu ($K_{bU} \rightarrow 0$) arba jungiasi žymiai silpniau nei su natyviu baltymu ($K_{bU} << K_{bN}$ ir $K_U K_{bU} << K_{bN}$), tuomet gaunama bendra ligando koncentracija L_t, reikalinga pakelti baltymo lydymosi temperatūrą nuo T_r (kai tirpale nėra ligando) iki T_m (kai yra ligando) (Cimmperman 2008):

$$L_t = \left(K_{U_Tm} - 1\right)\left(\frac{P_t}{2K_{U_Tm}} + \frac{1}{K_{bN_Tm}}\right). \quad (25)$$

Taikant (25) lygtį ir modeliuojant T_m priklausomybę nuo ligando koncentracijos nustatomi baltymo jungimosi su ligandu parametrai. Kad būtų galima tiksliai nustatyti reakcijos jungimosi konstantą terminio poslinkio metodu, reikia žinoti baltymo išsivyniojimo entalpijos pokytį $\Delta_U H_{(T)}$, kuris nepriklauso nuo tiriamo slopiklio.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. DARBE NAUDOTI PRIETAISAI, MEDŽIAGOS IR TIRPALAI

2.1.1. Naudoti prietaisai

Darbe naudoti **prietaisai**:

- analitinės svarstyklės;
- autoklavas;
- elektrinė plytelė;
- fluorimetras „R-Corbet“;
- gryninimo sistema „AKTA explorer“;
- horizontalios elektroforezės aparatas „Sigma-Aldrich“ ir jo priedai;
- kaitinamoji vonelė „Kleinfeld Labortechnik MBT250“;
- kalorimetras „Microcal VP-ITC“;
- laminarinis boksas;
- magnetinė maišyklė „BIOSAN“;
- maišyklė „BIOSAN“;
- pH-metras „LaboChema“;
- poliakrilamidinio gelio elektroforezės aparatas „BIO-RAD“ ir jo priedai;
- polimerazinės grandininės reakcijos aparatas „Eppendorf Mastercycler personal“;
- purtyklė „BIOSAN Multi-vortex V-32“;
- spektrofotometras „Jenway 6305“;
- spektrofotometras „NanoDrop“;
- šaldoma centrifuga „Beckmann“;
- šaldoma mikrocentrifuga „Eppendorf Centrifuge 5415 R“;
- termostatas „Eppendorf TermoStat plus“;
- termostatuojama purtyklė „LaboChema“;
- transiliuminatorius „ULTRA-LUM“;
- ultragarso šaltinis „Bandolin Sonopuls“.

2.1.2. Naudotos medžiagos ir rinkiniai

Darbe naudotos **medžiagos, reagentai ir rinkiniai** pateikti pagal gamintoją:

- Aldrich: etokzolamidas;

- Alfa Aesar: trifluormetansulfonamidas;
- BioRad: β-merkapto etanolis, glicinas, TEMED;
- Biotechnologijos institutas: LRY-2KT sefarozė;
- Boehringer Mannheim: ditiotrietolis;
- Ferak Berlin: Triton –X100;
- Fermentas: agarozė, IPTG, molekulinių masių standartai (GeneRuler™ DNA Ladder Mix ir Protein Molecular Weight Marker SM0431), fermentai klonavimui (NdeI, NcoI, PagI, Eco91I, EcoRV, Eco130I, Klenow, T4 DNR ligazė ir jų buferiniai tirpalai), fermentai PGR (*Pfu*, dNTP ir jų buferiniai tirpalai) bei GeneJET^{TM} Gel Extraction Kit, GeneJET^{TM} Plasmid Miniprep Kit, GeneJET^{TM} PCR Purification Kit rinkiniai;
- Fluka: Coomassie Brilliant Blue R-250, etidžio bromidas, HCl, N,N‘-metilen-Bis-akrilamidas, Na_2PO_4, $Na_2B_4O_7$, NaH_2PO_4, NaOH;
- GE Healthcare: Q-Sepharose Fast Flow, SP-Sepharose Fast Flow;
- Lachema: urėja;
- Matheson Coleman & Bell: bromfenolio mėlynasis;
- Roche: PMSF;
- Roth: agaras, akrilamidas, amonio persulfatas, ampicilinas, DMSO, LB medium (Luria/Miller) terpė, $MgCl_2$, mielių ekstraktas, NaCl, RnazėA, triptonas;
- Serva: CH_3COONa;
- Sigma: CH_3COOH, EDTA, H_3PO_4 85 %, imidazolas, KCl, $MgSO_4$, Na_2SO_4, NDS, TRIS;
- Реахим: $CuSO_4$, $ZnSO_4$.

Bakterijų kamienai:

hCAVII/pET-15b (3 – 264 a. r.) ir hCAVII/pET-15b (1 – 264 a. r.) genų klonavimams naudotas *E. coli* XL1-blue (Startagene) bakterijų kamienas (endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB$^+$ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K^- m_K^+)), kuris atsparus tetraciklinui bei nalidiksino rūgščiai.

Baltymų ekspresijai naudotas *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) bakterijų kamienas (F$^–$ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) λ(DE3)). Šis kamienas yra išvestas iš laukinio *E. coli* B kamieno, neturi F plazmidės, turi *dcm* mutaciją, nesintetina *Lon* ir *OmpT* proteazių. BL21 (DE3) kamieno ląstelės yra išvesto λ bakteriofago DE3 lizogenai.

Genetiniai konstruktai:

6H-hCAVII/pET-15b plazmidė, turinti žmogaus karboanhidrazės VII geną. Ji sukonstruota Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje (Jolanta Toressan, Jelena Jachno ir Jurgos Matulienė).

pET-15b vektorius (Novagen).

Pradmenys:

VPI1 (5‘-GATCTCATGACCGGCCACCACG-3‘) tiesioginis pradmuo hCA VII geno padauginimui, turintis PagI kirpimo vietą, pradžios kodoną ATG ir trūkstamus nukleotidus, visiškai teisingai hCA VII geno sekai gauti.

VPI2 (5‘-GTAGCATATGTCAGGCCCGGAAGGAGG-3‘) atvirkštinis pradmuo hCA VII geno padauginimui, turintis NdeI kirpimo vietą ir pabaigos kodoną TGA.

VPI3 (5‘-GGGCAAGAAGCACGATG-3‘) pradmuo hCAVII/pET-15b (3 – 264 a. r.) plazmidės koduojamo hCA VII baltymo sekoskaitai nustatyti. Jungiasi 300 bp žemiau starto taško.

T7-Prom (5‘-TAATACGACTCACTATAGGG-3‘) pradmuo hCAVII/pET-15b (3 – 264 a. r.) ir hCAVII/pET-15b (1 – 264 a. r.) plazmidžių kaduojamų hCA VII baltymų sekoskaitoms nustatyti. Jungiasi prie T7 promotariaus sekos.

T7-Term-2 (5‘-GGGGTTATGCTAGTTATTGC-3‘) pradmuo hCAVII/pET-15b (1 – 264 a. r.) plazmidės kaduojamo hCA VII baltymo sekoskaitai nustatyti. Jungiasi prie T7 terminatoriaus sekos.

2.1.3. Naudotos terpės ir tirpalai

Terpės:

Agarizuota LB (Miller) terpė: 10 g NaCl, 10 g triptono, 5 g mielių ekstrakto ir 15 g agaro ištirpinama viename litre dejonizuoto vandens, pH 7. Autoklavuojama 20 min 121°C temperatūroje.

LB medium (Luria/Miller) mitybinė terpė (sudėtis: 10 g/L triptono, 5 g/L mielių ekstrakto ir 10 g/L NaCl). 25 g terpės ištirpinami litre distiliuoto vandens, pH 7. Autoklavuojama 5 min 121°C temperatūroje.

S.O.C. mitybinė terpė: 2 g triptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM gliukozės. Triptonas, mielių ekstraktas, NaCl ir KCl tirpinami 97 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 20 min 121°C temperatūroje. Ataušinus

iki kambario temperatūros, pridedama Mg druskų ir gliukozės. Gautas tirpalas filtruojamas, pH 7.

Tirpalai ir buferiniai tirpalai:

Akrilamidas/Bis-akrilamidas 30 %: 29,2 g akrilamido ir 0,8 g N,N‘-metilen-bis-akrilamido ištirpinama nedideliame kiekyje dejonizuoto vandens, skiedžiama iki 100 mL ir filtruojama. Laikomas tamsiame inde 4°C temperatūroje ne ilgiau nei 30 dienų.

Amonio persulfato tirpalas 10 %: 100 mg APS tirpinama 1 mL dejonizuoto vandens.

Ampicilino tirapalas: 1 g ampicilino tirpinamas 10 mL dejonizuoto vandens, filtruojama. Tirpalo koncentracija 100 μg/μL.

Ardymo buferinis tirpalas: 25 mM TRIS, 1 mM β-ME ir 0,1 % Triton-X100, pH 8,5.

Bromfenolio mėlis: 0,05 %.

EDTA tirpalas: 37,22 g $Na_2EDTAx2H_2O$ tirpinama 140 mL dejonizuoto vandens, NaOH privedama tirpalo pH iki 8 ir pripildoma dejonizuoto vandens iki 200 mL. Gauta tirpalo koncentracija 0,5 M.

Elektroforezės buferinis tirpalas (10 kartų koncentruotas): 25 mM TRIS, 1,9 M glicino ir 35 mM NDS, pH 8,3 – 8,6 (nekoreguojamas).

IPTG tirpalas: 5 g IPTG tirpinama 21 mL dejonizuoto vandens, filtruojama. Tirpalo koncentracija 1 M.

Kumasi R-250 dažo tirpalas: 0,62 g R-250 ištirpinama 113 mL 95 % etonolio, pridedama 23 mL ledinės acto rūgšties. Praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 250 mL ir filtruojama.

Pavyzdžio buferinis tirpalas (6 kartus koncentruotas): 350 μL 0,5 M TRIS, 50 mg NDS, 46 mg DTT, 150 μL glicerolio, pH 6,8.

Šarminės lizės tirpalas P1: 50 mM TRIS-HCl (pH 8), 10 mM EDTA ir 100 μg/mL RnazėsA.

Šarminės lizės tirpalas P2: 200 mM NaOH ir 1 % NDS.

Šarminės lizės tirpalas P3: 3 M CH_3COOK, pH 5,5.

TAE buferinis tirpalas (50 kartų koncentruotas): 242 g TRIS , 100 mL 0,5 M EDTA, 57,1 mL ledinės acto rūgšties vienam litrui dejonizuoto vandens. Prieš naudojimą buferinis tirpalas skiedžiamas.

TE buferinis tirpalas: 10 mM TRIS ir 1 mM EDTA, pH 8 – 8,5.

TRIS-HCl buferinis tirpalas 1,5 M: 18,15 g TRIS ištirpinama 70 mL dejonizuoto vandens, pH koreguojamas iki 8,8 su du kartus paskiesta HCl rūgštimi. Skiedžiama iki 100 mL ir filtruojama. Laikomas tamsiame inde 4°C temperatūroje ne ilgiau nei 30 dienų.

TRIS-HCl buferinis tirpalas 1,0 M: 12,1 g TRIS ištirpinama 50 mL dejonizuoto vandens, pH koreguojamas iki 6,8 su du kartus paskiesta HCl rūgštimi. Skiedžiama iki 100 mL ir filtruojama. Laikomas tamsiame inde 4°C temperatūroje ne ilgiau nei 30 dienų.

2.2. METODAI

Metodikų sudarymui naudota Ausubel 1997, Coligan 2000, Laemmli 1970, Sambrook 2001 ir UAB „Fermentas“ internetiniame puslapyje pateiktos rekomendacijos.

2.2.1. Geno klonavimas

Polimerazinė grandininė reakcija:

Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) taikoma norint padauginti DNR fragmentus, jų galuose sukuriant restrikcijos endonukleazių taikinius. DNR fragmentų padauginimui naudojami 20 – 30 bazių porų ilgio pradmenys, komplementarūs tiksliniai plazmidei. Reakcijai panaudota *Pfu* DNR polimerazė, išskirta iš *Pyrococcus furiosus*. *Pfu* DNR polimerazė pasižymi 5‘→3‘ polimeraziniu aktyvumu bei stipriu 3‘→5‘ egzonukleaziniu aktyvumu. PGR mišinį sudaro:

- sterilus dejonizuotas vanduo;
- 10 kartų koncentruotas *PfuI* buferinis tirpalas su $MgSO_4$;
- 2 mM dNTP tirpalas, kurio galutinė koncentracija reakcijos mišinyje yra 0,2 mM;
- tiesioginis ir atvirkštinis pradmenys (kiekvieno po 100 ng);
- DNR tirpalas 0,5 ng;
- *Pfu* DNR polimerazės 2,5 vnt.

PGR atlikta termocikleryje pagal šią programą:

1. Pradinė DNR denatūracija 3 min 95°C temperatūroje.
2. DNR denatūracija 1 min 95°C temperatūroje.
3. Pradmenų prilydymas prie DNR 1 min 30 s 63°C temperatūroje (temperatūra priklauso nuo pradmenų ilgio bei G ir C nukleotidų sudėties).
4. DNR sintezė 1 min 72°C temperatūroje.
5. Galutinis išsikišusių DNR galų bukinimas 5 min 72°C temperatūroje.

2 – 4 stadijos kartojamos 25 kartus.

Plazmidinės DNR restrikcija:

Reakcijos mišinį sudaro:

- specifinė restrikcijos endonukleazė 10 vnt./μL;
- 10 kartų koncentruotas restrikcijos buferinis tirpalas;
- DNR tirpalas, ne daugiau kaip 30 % viso reakcijos mišinio tūrio;
- sterilus dejonizuotas vanduo.

Reakcijos mišinys inkubuojamas 0,5 -1,5 valandos 37°C temperatūroje. Fermentas inaktyvuojamas 65 – 80°C temperatūroje, priklausomai nuo restrikcijos endonukleazės.

DNR gryninimas iš PGR mišinio:

Atlikus PGR reakciją DNR gryninama naudojant „GeneJET^{TM} PCR Purification Kit“ rinkinį. Gryninimas atliekamas pagal standartinį protokolą.

DNR lipnių galų bukinimas:

Po skaldymo restrikcijos endonukleazėmis susidarę lipnūs DNR galai verčiami dvigrandžiais. NaudojamaKlenovo polimerazė, turinti 5‘→3‘ polimerazinį aktyvumą, kuri atstato DNR viengrandžio galo komplementarius nukleotidus. Reakcija vykdoma Klenovo polimerazės buferiniame tirpale 30 min 37°C temperatūroje, esant 0,2 – 0,05 mM dNTP koncentracijai bei 3 vnt./μg DNR. Fermentas inaktyvuojamas 70°C.

Elektroforezė 1 % agaroziniame gelyje:

Paruošiamas 1 % agarozinis gelis TAE buferiniame tirpale, turintis 0,1 – 0,2 μg/mL etidžio bromido. Elektroforezė vykdoma esant 100 V įtampai. Gelis analizuojamas ultravioletinėje šviesoje transiliuminatoriuje „ULTRA-LUM“.

DNR fragmentų gryninimas iš agarozinio gelio:

Norimas išgryninti DNR fragmentas išpjaunamas iš agarozinio gelio ir gryninamas naudojant „GeneJET^{TM} Gel Extraction Kit“ rinkinį. Gryninama pagal standartinį protokolą.

Ligavimas:

Ruošiamas 20 – 25 mL reakcijos mišinys, kurį sudaro:

- liguojamo geno fragmentas;
- linearizuota plazmidė (100 ng);
- 10 kartų koncentruotas ligavimo reakcijos buferinis tirpalas;
- T4 DNR ligazė (1 μL);
- Sterilus dejonizuotas vanduo.

Reakcija vykdoma 5 min 22°C temperatūroje. Fermentas inaktyvuojamas 10 min 65°C temperatūroje. Ligavimo mišinys naudojamas transformacijai.

Transformacija į kompetentines E. coli ląsteles:

1. Paruoštos Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe ir ampicilinu (100 μg/mL) pakaitinamos 37°C temperatūroje.
2. Į 100 μL kompetentinių ląstelių įdedama 5 – 7 μL ligavimo mišinio.
3. Transformacijos mišinys inkubuojamas 30 min ledo vonioje.
4. Vykdomas temperatūrinis šokas 90 s 42°C temperatūroje, tuomet mišinys greitai perkeliamas į ledo vonią ir ten laikomas 5 min.
5. Į reakcijos mišinį pridedama 400 μL skystos S.O.C. terpės ir auginama 45 min 37°C temperatūroje termostatuojamoje purtyklėje 220 aps./min.
6. Reikiamas tarnsformuotų kompetentinių ląstelių tūris steriliai užsėjamas ant pašildytos Petri lėkštelės. Lėkštelė inkubuojama termostate 37°C temperatūroje 16 val. (Tu 2005).

Analitinis plazmidinės DNR išskyrimas šarminės lizės būdu:

Į 2 mL LB terpės su antibiotikais (šiuo atveju – Amp) užsėjama transformuota *E. coli* XL1 blue kamieno bakterijų kolonija. Auginama per naktį 37°C temperatūroje purtatnt 270 aps./min. Atliekama pagal Sambrook (2001 m.) protokolą:

1. 1,5 mL „naktinės“ bakterijų kultūros centrifuguojama 30 s 4°C temperatūroje „Eppendorf“ centrifugoje 10000 aps./min. greičiu. Supernatantas nusiurbiamas.
2. Nuosėdos suspenduojamos 200 μL P1 buferinio tirpalo.
3. Įpilama 200 μL P2 buferinio tirpalo. Mėgintuvėlis paverčiamas kelis kartus, kol tirpalas tampa skaidrus. Laikoma ant ledo 5 min.
4. Įpilama 200 μL P3 šalto buferinio tirpalo, mėgintuvėlis paverčiamas 10 kartų. Laikoma ant ledo 5 min.
5. Centrifuguojama 5 min 4°C temperatūroje 13000 aps./min. greičiu.
6. Supernatantas perpilamas į švarų „Eppendorf“ mėgintuvėlį. Pripilami 2 tūriai 96 % etanolio ir mėgintuvėlis laikomas 1 val. -20°C temperatūroje.
7. Centrifiguojama 5 min 4°C temperatūroje 13000 aps./min. greičiu. Nusiurbiamas supernatantas.
8. Įpilama 0,5 mL 70 % etanolio, mėgintuvėlis paverčiamas kelis kartus ir centrifuguojama 2 min 4°C temperatūroje 13000 aps./min.
9. Supernatantas nusiurbiamas, nuosėdos džiovinamos kambario temperatūroje.

10. Išdžiuvusi DNR tirpinama 20 – 30 μL TE buferio. Mėginiai laikomi 4°C arba -20°C temperatūroje.

Plazmidinės DNR gryninimas sekoskaitai nustatyti:

Plazmidinės DNR išskyrimui iš *E. coli* XL1 blue kamieno bakterijų biomasės naudojamas „GeneJET^{TM} Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį. Gryninama pagal standartinį protokolą. DNR koncentracija nustatoma „NanoDrop“ spektrofotometru.

2.2.2. hCA VII ekspresija, tirpumo patikrinimas ir gryninimas

hCA VII ekspresija *E. coli* bakterijų BL21 (DE3) kamiene:

1. Į LB terpę su 50 μg/mL ampicilinu užsėjama viena kolonija iš transformuotos Petri lėkštelės ir auginama per naktį (16 val.) 37°C temperatūroje purtant 270 aps./min.
2. „Naktinė“ kultūra persėjama į didesnį terpės tūrį su ampicilinu (50 μg/mL) skiedžiant santykiu 1:50.
3. Auginama termostatuojamoje purtyklėje 37°C temperatūroje, kol optinis tankis (λ = 600 nm) pasiekia ~0,6.
4. Prieš indukciją paruošiamas kontrolinis visų ląstelės baltymų mėginys iš 300 μL ląstelių suspensijos.
5. Indukuojama pridedant 1 mM IPTG ir 0,5 mM $ZnSO_4$. Auginama 4 val. 30°C temperatūroje.
6. Paruošiamas visų ląstelės baltymų mėginys skiedžiant ląstelių suspensiją, kadjos optinis tankis būtų lygus kontrolinio ląstelės baltymų mėginio optiniam tankiui.
7. Bakterijų kultūra centrifuguojama 6000 aps./min. greičiu, supernatantas nusiurbiamas. Biomasė laikoma -20°C temperatūroje.
8. Mėginiai centrifuguojami 1 min. 10000 aps./min. greičiu, nuosėdos tirpinamos 30 μL pavyzdžio buferinio tirpalo ir mišinys pakaitinamas 5 min 100°C temperatūroje.
9. Mėginiai analizuojami NDS-PAAG būdu.

Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje:

Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis natrio dodecilsulfato poliakrilamidiniame gelyje (NDS-PAAG) atliekama pagal Laemmli metodiką (1970 m.). Ruošiami geliai:

Apatinis frakcionuojantis 12 % gelis		*Viršutinis koncentruojantis 4 % gelis*	
30 % AA/BAA	4 mL	30 % AA/BAA	0,67 mL
1,5 M TRIS, pH 8,8	2,5 mL	1,0 M TRIS, pH 6,8	1,25 mL
10 % SDS	0,1 mL	10 % SDS	0,05 mL
H_2O	3,17 mL	H_2O	3 mL
10 % APS	0,05 mL	10 % APS	0,025 mL
TEMED	0,005 mL	TEMED	0,005 mL

Gerai išmaišius, apatinis frakcionuojantis gelio tirpalas pilamas į gelio formą paliekant 2 cm nuo formos viršaus. Po to atsargiai užsluoksniuojama distiliuotu vandeniu. Polimerizacija kambario temperatūroje trunka apie 30 min, jos pabaiga gerai matoma fazių riboje tarp polimero ir vandens. Sustingusio gelio paviršius praplaunamas distiliuotu vandeniu ir nusausinamas filtriniu popieriumi. Pilamas viršutinio gelio tirpalas iki formos viršaus ir įstatomos „šukutės“. Polimerizacija kambario temperatūroje trunka apie 30 min. Viršutiniam geliui sustingus, plokštelės su geliu statomos į elektroforezės aparatą, aparoto blokas užpilamas elektroforezės buferiu ir išimamos „šukutės“. Į susidariusius gelio šulinėlius įpilami pavyzdžiai. Elektroforezė vykdoma 20 mA srovėje, kol dažo frontas pasiekia frakcionuojančio gelio apačią.

Gelis dažomas 15 min. Kumasi dažu ir virinamas distiliuotame vandenyje ~5 – 10 min. kol išblunka.

Tirpių ir netirpių baltymų nustatymas:

1. 0,1 g bakterijų biomasės tirpinama 6 mL ardymo buferiniame tirpale (25 mM TRIS pH 8,5, 0,1 % Triton-X100, 1 mM β-ME).
2. Įpilama 1 mM PMSF ir maišoma 1 val. 4°C temperatūroje.
3. Ardoma ultragarsu 5 min. kas 30 s darant 30 s pertraukas esant 20 % amplitudei.
4. Lizatas centrifuguojamas 20 min. 20000 aps./min. greičiu 4°C temperatūroje.
5. Matuojama supernatanto koncentracija Bredfordo metodu.
6. Nuosėdos tirpinamos 1 mL 8 M urėjos bei matuojama jų koncentracija Bredfordo metodu.
7. Ruošiami tirpios ir netirpios baltymų frakcijos mėginiai: į 30 µL baltymo tirpalo pilami 6 µL pavyzdžio buferio (6 kartus koncentruoto); mėginiai kaitinami 5 min. 100°C temperatūroje.
8. Tirpi ir netirpi baltymų frakcijos analizuojamos NDS-PAAG būdu.

hCA VII baltymų gryninimas:

hCA VII gryninimas atliktas padedant j. m. d. V. Michailovienei.

Bakterijų biomasė suspenduojama ardymo buferiniame tirpale (25 mM TRIS pH 8,5, 0,1 % Triton-X100, 1 mM β-ME). Įpilama 1 mM PMSF ir maišoma 1 val. 4°C temperatūroje. Ardoma ultragarsu ledo vonelėje 13 min. kas 60 s darant 60 s pertraukas esant 70 % amplitudei. Centrifuguojama 25 min. 6000 aps./min. greičiu.

Supernatantas leidžiamas per Q-Sepharose chromatografijos kolonėlę naudojant 25 mM TRIS buferinį tirpalą pH 8,5, 1 mM β-merkapto etanolio (β-ME). Tekėjimo greitis – 1 mL/min. Chromatografijos frakcijos tikrinamos NDS-PAAG ir sujungiamos tikslinį baltymą turinčios frakcijos (šiuo atveju – nesisorbavusios).

Leidžiama LRY-2KT chromatografijos kolonėlė, įkrauta Cu^{2+} jonais, naudojant 20 mM Hepes pH 7,5, 0,1 M NaCl buferinį tirpalą. Baltymo desorbcijai naudojamas linijinis imidazolo gradientas, pradedant 0 M ir baigiant 0,1 M per 10 kolonėlės tūrių. Frakcijos tikrinamos NDS-PAAG ir sujungiamos tikslinį baltymą turinčios frakcijos. Baltymo tirpalas dializuojamas 20 mM natrio acetatiniame buferiniame tirpale pH 5,8, 1 mM DTT ir 1 mM EDTA.

Leidžiama trečioji jonų mainų chromatografijos kolonėlė Sp-Sepharose. Chromatografija atliekama 20 mM acetatiniame buferiniame tirpale pH 5,8, pridedant 1 mM DTT. Baltymas desorbuojamas naudojant linijinį NaCl gradienatą, pradedant 0 M ir baigiant 0,8 M per 10 kolonėlės tūrių. Frakcijos tikrinamos NDS-PAAG. Sujungiamos tikslinį baltymą turinčios frakcijos, kurios dializuojamos 20 mM Hepes pH 7,5, 0,1 M NaCl buferiniame tirpale, kuriame ir laikomos -80°C temperatūroje.

2.2.3. hCA VII jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais matavimas

ITK matavimai:

Eksperimentas atliekamas Microcal VP-ITC kalorimetru. Ruošiami du mėginiai po 2 mL: baltymo tirpalas, kuris pilamas į kiuvetę, ir slopiklio tirpalas, kuriuo užpildomas švirkštas.

Naudojamas baltymo ir ligando koncentracijų santykis 1:10 ir 4 μM bei 6 μM koncentracijos baltymo tirpalas. Baltymo ir ligando tirpalus sudaro vienodos pagalbinių medžiagų koncentracijos: 0,1 M fosfatinio arba 0,1 M TRIS buferinio tirpalo, 50 mM NaCl ir 1 % DMSO.

Paruoštais mėginiais užpildoma kiuvetė ir švirkštas. Švirkštas įmerkiamas į kiuvetę. Prieš pradedant eksperimentą palaukiama, kol nusistovės tiesi bazinė linija. Eksperimentuose taikytas maišymo greitis 260 aps./min., iš viso – 25 injekcijos, vienos injekcijos tūris 10 μL ir tarpas tarp injekcijų – 200 s. Eksperimentai atlikti 25°C temperatūroje.

TPM matavimai:

Atskirai paruošiami baltymo ir ligando tirpalai.

Ruošiamas du kartus koncentruotas baltymo tirpalas (20 μM) universaliame buferiniame tirpale (50 mM natrio acetato, 50 mM natrio fosfato, 25 mM natrio borato ir 50 mM natrio chlorido, pH 4,5 – 10,5), turintis 100 μM ANS ir 200 μM NaCl.

Ruošiamas du kartus koncentruoti 800 μM, 400 μM, 200 μM, 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM ir 0 μM koncentracijų ligandų tirpalai, turintys 4 % DMSO.

Į mėgintuvėlius išpilstoma po 4 μL du kartus koncentruotų baltymo ir tam tikros koncentracijos ligando tirpalų. Gauti 10 μM baltymo tirpalai skirtingose pH, turintys 400 μM, 200 μM, 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM, 6,25 μM ir 0 μM ligando.

Matavimai atliekami R-Corbert fluorimetru, keliant temperatūrą 1°C per minutę intervale nuo 25°C iki 80°C.

Duomenų apdorojimas:

Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu gauti rezultatai apdoroti Microcal™Origin™v5,0 programa. Terminio poslonkio metodu gauti rezultatai apdoroti ThermoFluor++ 1.4.2 ir Microsoft Office Excel progrmomis.

Paklaidos apskaičiuotos Stjudento metodu, kai pasikliaujamoji tikimybė $P = 0,95$.

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. hCA VII KLONAVIMAS

Sukonstruoti du žmogaus karboanhidrazės VII konstruktai, skirti geno ekspresijai:

- hCAVII/pET-15b (hCA VII UniProtKB/Swiss-Prot P43166, 3 – 264 a. r.);
- hCAVII/pET-15b (hCA VII UniProtKB/Swiss-Prot P43166, 1 – 264 a. r.).

Pirmasis pateiktas žmogaus karboanhidrazės VII konstruktas atitinka UniProtKB/Swiss-Prot duomenų bazėje pateiktą P43166 seką nuo trečios iki paskutinės amino rūgšties ir dar turi pradžioje penkias papildomas aminorūgštis: metioniną, leuciną, glutamo rūgštį, asparto rūgštį bei proliną.

Antrasis pateiktas žmogaus karboninės anhidrazės VII konstruktas visiškai atitinka P43166 seką UniProtKB/Swiss-Prot duomenų bazėje.

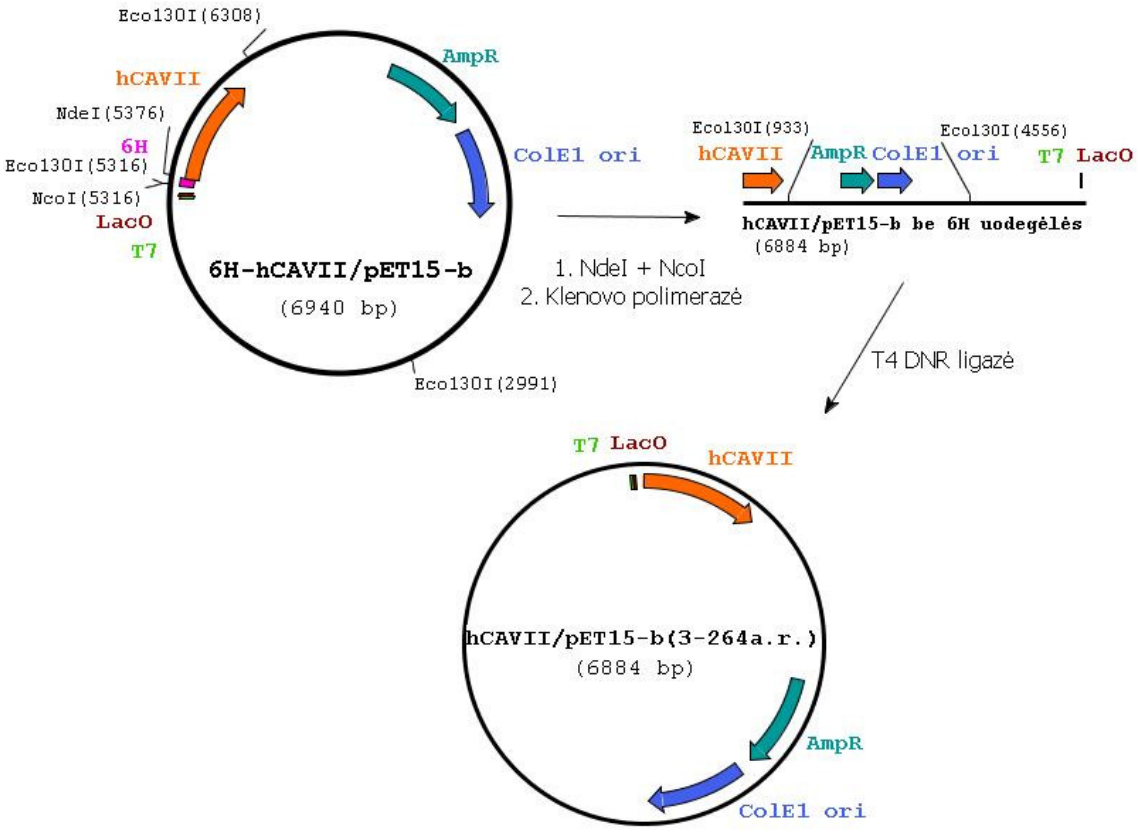
Abiejų konstruktų kūrimui naudotas Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje sukurtas 6H-hCAVII/pET-15b konstruktas, atitinkantis UniProtKB/Swiss-Prot P43166 seką nuo antros iki paskutinės amino rūgšties ir baltymo N-gale turintis inkarinę histidininę uodegėlę. Šis konstruktas buvo gautas iš RZPD kompanijos pirkto pCMV-SPORT6-CAVII konstrukto, klonuojant restriktazėmis.

hCA VII genas buvo įklonuotas į daugiakopijinį raiškos vektorių pET-15b, turintį atsparumo ampicilinui geną (AmpR), replikatorių ColE1 su plazmidės replikacijos pradžios tašku ori, IPTG indukuojamą T7 bakteriofago promotorių ir iškart už jo įterptą operatorių lacO (6 ir 7 pav.).

3.1.1. hCAVII/pET-15b (3 – 264 a. r.) klonavimas

Principinė hCAVII/pET-15b (3 – 264 a. r.) plazmidės konstravimo bei hCA VII (3 – 264 a. r.) geno klonavimo schema pateikta 6 paveiksle.

1) Iš 6H-hCAVII/pET-15b konstrukto per NdeI ir NcoI restrikcijos endonukleazių taikinius iškirpta seka, koduojanti histidininę uodegėlę. Atliktas gauto DNR fragmento lipnių galų bukinimas, panaudojant *E. coli* DNR I polimerazės Klenovo fragmentą be 3‘→5‘ egzonukleazinio aktyvumo.
2) Iš agarozinio gelio iškirptas 6884 b. p. dydžio DNR fragmentas. DNR išskirta iš agarozinio gelio panaudojant UAB „Fermentas“ „GeneJET^{TM} Gel Extraction Kit“ rinkinį.



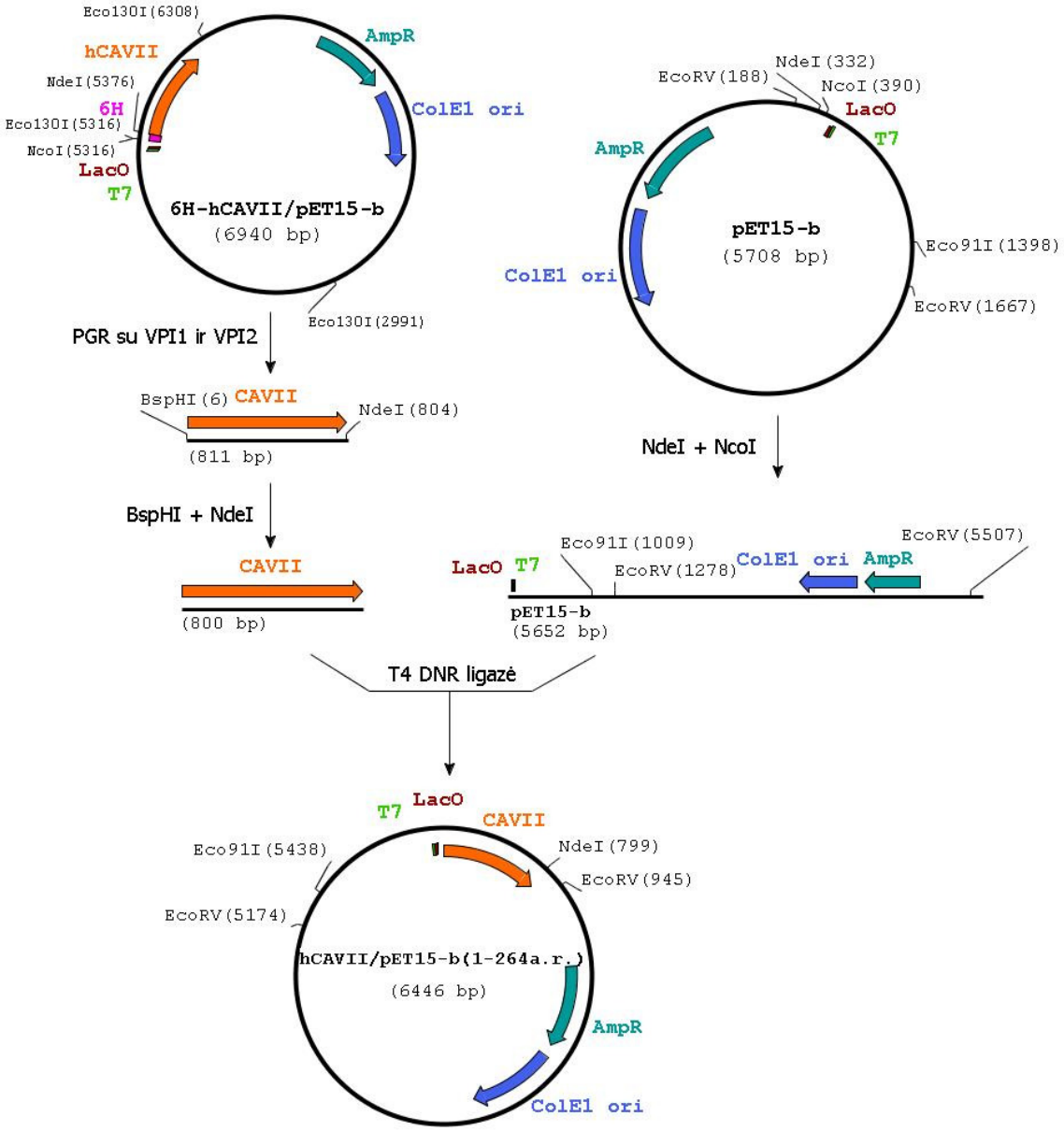
6 pav. Principinė hCAVII/pET-15b (3 – 264 a. r.) plazmidės konstravimo bei hCA VII (3 – 264 a. r.) geno klonavimo schema.

3) Gautas linijinis vektorius suliguotas panaudojant T4 DNR ligazę (6 pav.). Reakcija vykdyta 5 min 22°C temperatūroje, fermentas inaktyvuotas 10 min 65°C temperatūroje. Ligatas transformuotas į kompetentinę *E. coli* XL1 blue kultūrą, išsėtas ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu (100 µg/mL) ir augintas 37°C temperatūroje per naktį.
4) hCAVII/pET-15b (3 – 264 a. r.) plazmidė išskirta iš ampicilinui atsparių *E. coli* XL1 blue/pET-15b/hCAVII (3 – 264 a. r.) kolonijų šarminės lizės metodu. Transformantų kolonijų plazmidinės DNR analizuotos restrikcinės analizės būdu panaudojant Eco130I restrikcijos endonukleazę. Gauti trys 3623, 2325 ir 992 b. p. dydžio fragmentai, kai inkarinė histidininė uodegėlė neiškirpta, ir du 3623 ir 3261 b. p. dydžio fragmentai, kai histidininė uodegėlė iškirpta.
5) hCAVII/pET-15b (3 – 264 a. r.) plazmidės DNR išskirta iš *E. coli* XL1 blue/pET-15b/hCAVII (3 – 264 a. r.) kolonijų, patikrintų restrikcijos endonukleazėmis, panaudojant UAB „Fermentas“ „GeneJET^{TM} Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį. Tikslinio geno seka nustatyta „BTI Sekvenavimo Centre“ naudojant T7-Prom ir VPI3 pradmenis. Plačiau aprašyta 2.1.2. skyriuje.

6) Atlikta teisingos DNR plazmidės transformacija į kompetentinę *E. coli* BL21 (DE3) kultūrą ir patikrinta baltymo ekspresija bei tirpumas. Žiūrėti 3.2.1. skyrių.

3.1.2. hCAVII/pET-15b (1 – 264 a. r.) klonavimas

Principinė hCAVII/pET-15b (1 – 264 a. r.) plazmidės konstravimo bei hCA VII (1 – 264 a. r.) geno klonavimo schema pateikta 7 paveiksle.



7 pav. Principinė hCAVII/pET-15b (1 – 264 a. r.) plazmidės konstravimo bei hCA VII (1 – 264 a. r.) geno klonavimo schema.

1) hCA VII (1 – 264 a. r.) genas padaugintas PGR būdu nuo 6H-hCAVII/pET-15b plazmidės, panaudojus VPI1 ir VPI2 pradmenis (2.1.2. skyrius). Polimerazinė grandininė reakcija atlikta pagal programą, aprašytą metodų 2.2.1. skyriuje.
2) Patikrinta, ar pavyko padauginti norimą fragmentą, leidžiant elektroforezę agaroziniame gelyje. Gautas 811 b. p. dydžio hCA VII (1 – 264 a. r.) DNR fragmentas. DNR išgryninta iš PGR mišinio naudojant UAB „Fermentas“ „GeneJET^{TM} PCR Purification Kit“ rinkinį.
3) PGR būdu gauta DNR kirpta su NdeI, PagI ir Eco91I restrikcijos endonukleazėmis. Eco91I restrikcijos endonukleazė naudota tam, kad sukarpytų PGR metu padaugintą 6H-hCAVII/pET-15b plazmidę. Iš agarozinio gelio iškirptas ~800 b. p. dydžio DNR fragmentas. DNR išskirta iš agarozinio gelio panaudojant UAB „Fermentas“ „GeneJET^{TM} Gel Extraction Kit“ rinkinį.
4) Vektorius pET-15b, turintis IPTG indukuojamą promotorių, perkerpamas su NdeI ir NcoI restrikcijos endonukleazėmis. Iš agarozinio gelio iškirptas ~5652 b. p. dydžio DNR fragmentas. DNR išskirta iš agarozinio gelio panaudojant UAB „Fermentas“ „GeneJET^{TM} Gel Extraction Kit“ rinkinį.
5) hCA VII (1 – 264 a. r.) genas į ekspresinę pET-15b plazmidę įklonuotas per lipnius galus. Ligavimo reakcija vykdyta 5 min 22°C temperatūroje, fermentas inaktyvuotas 10 min 65°C temperatūroje. Ligatas iš karto transformuotas į kompetentinę *E. coli* XL1 blue kultūrą, išsėtas ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu (100 μg/mL) ir augintas 37°C temperatūroje per naktį.
6) hCAVII/pET-15b (1 – 264 a. r.) plazmidė išskirta iš ampicilinui atsparių *E. coli* XL1 blue/pET-15b/hCAVII (1 – 264 a. r.) kolonijų šarminės lizės metodu. Transformantų kolonijų plazmidinės DNR analizuotos restrikcinės analizės būdu panaudojant EcoRV ir Eco91I kartu su NdeI restrikcijos endonukleazes. Po analizės su EcoRV gauti du 4229 ir 2221 b. p. dydžio fragmentai, kai hCA VII (1 – 264 a. r.) DNR fragmentas įstatytas į pET-15b vektorių, ir du 4229 ir 1421 b. p. dydžio fragmentai, kai gautas pET-15b vektorius be tikslinio geno. Po analizės su Eco91I ir NdeI gauti du 4641 ir 1809 b. p. dydžio fragmentai, kai hCA VII (1 – 264 a. r.) DNR fragmentas įstatytas į pET-15b vektorių, ir du 4641 ir 1009 b. p. dydžio fragmentai, kai gautas pET-15b vektorius be tikslinio geno.
7) hCAVII/pET-15b (1 – 264 a. r.) plazmidės DNR išskirta iš *E. coli* XL1 blue/pET-15b/hCAVII (1 – 264 a. r.) kolonijų, patikrintų restrikcijos endonukleazėmis, panaudojant UAB „Fermentas“ „GeneJET^{TM} Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį. Tikslinio geno seka nustatyta „BTI Sekvenavimo Centre“ naudojant T7-Prom ir T7-Term-2 pradmenis. Plačiau aprašyta 2.1.2. skyriuje.

8) Atlikta teisingos DNR plazmidės transformacija į kompetentinę *E. coli* BL21 (DE3) kultūrą ir patikrinta baltymo ekspresija bei tirpumas. Plačiau žiūrėti 3.2.1. skyrių.

3.2. hCA VII BALTYMŲ EKSPRESIJA IR GRYNINIMAS

Apskaičiuotos molekulinės hCA VII baltymų masės, teoriniai izoelektriniai taškai (pI) bei ekstinkcijos koeficientai naudojant Šveicarijos bioinformatikos instituto internetiniame puslapyje pateiktu „ProtParam“ įrankiu. Rezultatai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Apskaičiuotos hCA VII baltymų molekulinės masės, teoriniai pI taškai ir ekstinkcijos koeficientai.

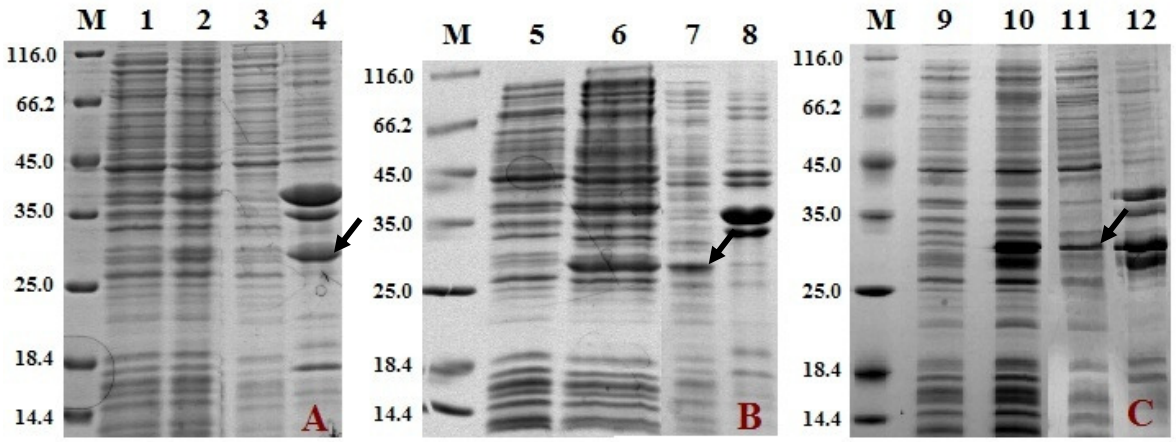
Baltymas	Molekulinė masė, kDa	Teorinis pI	Ekstinkcijos koeficientas, M^{-1} cm^{-1}
hCA VII (3 – 264 a. r.)	30,0117	6,53	46535
hCA VII (1 – 264 a. r.)	29,6584	6,92	46535

3.2.1. hCA VII baltymų ekspresija

Žmogaus karboninės anhidrazės VII baltymai ekspresuoti *E. coli* BL21 (DE3) kamiene. Ekspresuojant tikslinius baltymus 4 val. 37°C temperatūroje, pridėjus 0,5 mM $ZnSO_4$ ir 1 mM IPTG induktoriaus, gaunamas netirpus baltymas (8 pav.). Todėl keičiamos ekspresijos sąlygos – žeminama augimo temperatūra.

Ekspresuojant baltymus 4 val. 30°C temperatūroje, pridėjus 0,5 mM $ZnSO_4$ ir 1 mM IPTG, gaunama nedaug tirpaus baltymo (8 pav.). Kadangi temperatūros sumažinimas padidino tirpaus baltymo kiekį, dar kartą keičiamos ekspresijos sąlygos norint gauti daugiau tirpaus baltymo.

hCA VII baltymai ekspresuoti per naktį 20°C temperatūroje, pridėjus tą patį $ZnSO_4$ ir IPTG kiekį. Gautas beveik visas tirpus baltymas. hCA VII baltymų ekspresijos ir tirpumo NDS-PAA gelių nuotraukos pateiktos 8 paveiksle.

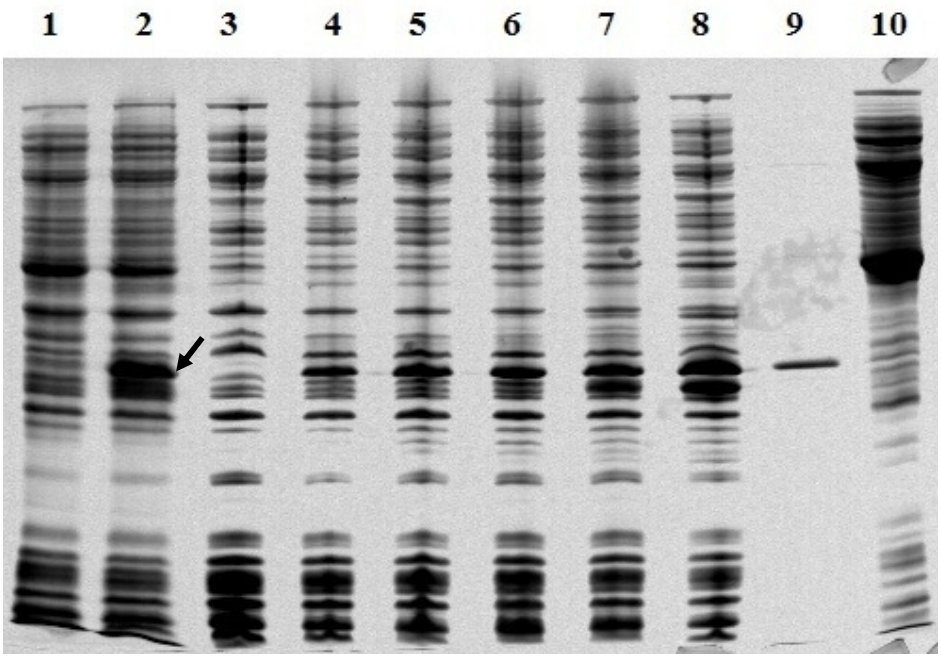


8 pav. hCAVII/pET-15b baltymų ekspresijos ir tirpumo patikrinimas NDS-PAAG, auginant *E. coli* BL21 (DE3) kamiene 4 val. 37°C (A), per naktį – 20°C (B) ir 4 val. – 30°C temperatūroje (C). M – baltymų dydžio sandartas SM0431; 1, 2, 5, 6 – hCAVII (3-264 a.r.) mėginiai prieš ir po indukcijos, 3, 4, 7, 8 - hCAVII (3-264 a.r.) tirpios ir netirpios frakcijos, 9, 10 – hCA VII (1-264 a.r.) mėginiai prieš ir po indukcijos, 11, 12 – hCA VII (1-264 a.r.) tirpios ir netirpios baltymų frakcijos.

Kaip matyti 8 paveiksle, daugiausiai tirpaus baltymo gauta ekspresuojant hCA VII baltymus, augintus 20°C temperatūroje per naktį, tačiau išgryninus tokiomis sąlygomis ekspresuotus baltymus ir patikrinus jų aktyvumą izoterminiu titravimo kalorimetru ir terminio poslinkio metodu, paaiškėjo, kad jie yra neaktyvūs. Todėl termodinamikos tyrimams naudoti baltymai yra ekspresuoti 4 val. 30°C temperatūroje, pridedant 0,5 mM $ZnSO_4$ ir 1 mM IPTG.

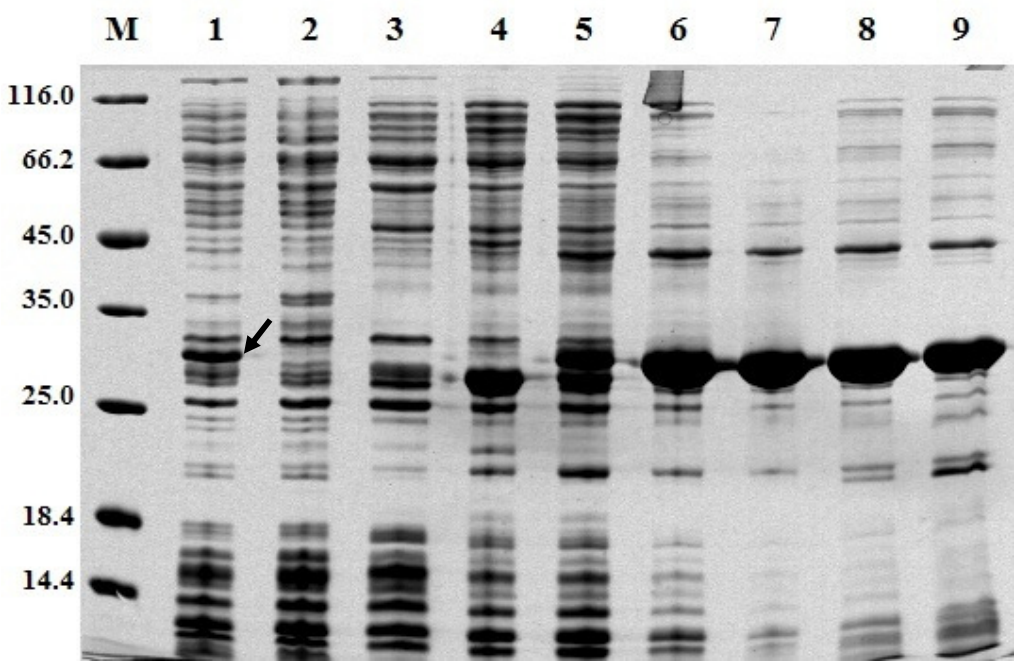
3.2.2. hCA VII baltymų gryninimas

Gryninimas atliktas leidžiant tris skirtingas skysčių chromatografijos kolonėles. Pirmiausiai atliekama anijoninio sorbento Q-sefarozės jonų mainų chromatografija. Deja, baltymai nesisorbuoja ant anijoninio sorbento. Sujungiamos frakcijos, turinčios tikslinį baltymą (9 paveikslas). Ši chromatografijos kolonėlė naudojama norint apvalyti tikslinį baltymą nuo priemaišų.



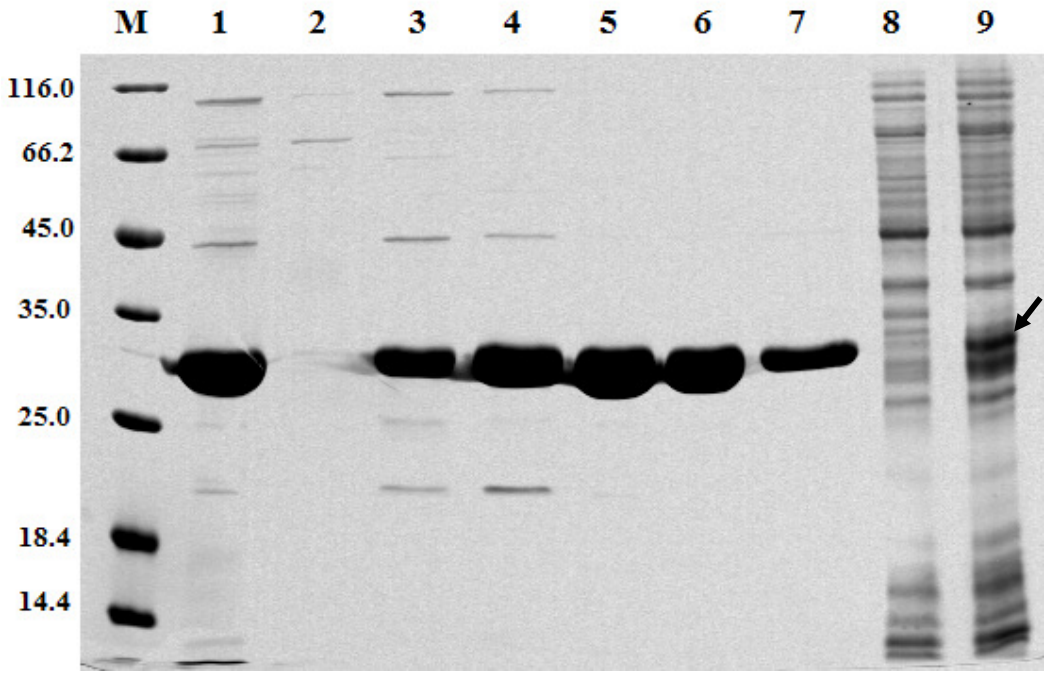
9 pav. hCA VII (1-264 a.r.) (29,66 kDa) gryninimo Q-sefarozės jonų mainų chromotografijos metodu rezultatai NDS-PAAG. 1, 2 – hCA VII ekspresija prieš ir po indukcijos, 3-9 – gryninimo metu nesisorbavusios frakcijos ir 10 – frakcija, po gradiento (1M NaCl).

Sujungus visas gryninimo metu nesisorbavusias frakcijas (9 pav.), leidžiama antra chromatografijos kolonėlė. Naudojamas chelatuojantis LRY-2KT sefarozės sorbentas, turintis Cu^{2+} jonų. hCA VII baltymas eliuojamas leidžiant imidazolo gradientą. Sujungiamos frakcijos, turinčios didžiausiasią tikslinio baltymo koncentraciją (10 paveikslas). Į dializės buferinį tirpalą papildomai dedamas nedidelis kiekis EDTA (1 mM), kad būtų pašalinti metalo jonai.



10 pav. hCA VII (1-264 a.r.) (29,66 kDa) gryninimo, naudojant LRY-2KT-sefarozės chromotografijos kolonėlę, rezultatai NDS-PAAG. M – baltymų dydžio standartas SM0431, 1 – tirpi baltymo frakcija, 2 – gryninimo metu nesisorbavusi frakcija ir 4-9 – frakcijos, po gradiento.

Norint pasiekti didesnį grynumą ir sukoncentruoti baltymą, apjungus frakcijas, turinčios didžiausią tikslinio baltymo koncentraciją (10 pav. 6-9 takeliai), leidžiama trečioji jonų mainų chromatografijos kolonėlė. Naudojamas katijoninis sulfopropil-sefarozės (SP-sefarozės) sorbentas. Desorbcijai leidžiamas pH gradientas. Kai pH pasiekia tikslinio baltymo izoelektrinį tašką, šis atsikabina. Sujungiamos frakcijos, turinčios didžiausią tikslinio baltymo koncentraciją (11 paveikslas 3-7 takeliai).



11 pav. hCA VII (1-264 a.r.) (29,66 kDa) gryninimo SP-sefarozės jonų mainų chromotografijos metodu rezultatai NDS-PAAG. M – baltymų dydžio standartas SM0431, 1 – tirpi baltymo frakcija, 2 – gryninimo metu nesisorbavusi frakcija, 3-7 – frakcijos, po gradiento ir 8, 9 – hCA VII ekspresija prieš ir po indukcijos.

Gaunamas ~95 % grynumo hCA VII baltymas. Grynumas nustatytas vizualiai pagal NDS-PAAG (11 pav.). Baltymas laikomas 20 mM Hepes pH 7,5, 0,1 M NaCl buferiniame tirpale -80°C temperatūroje.

3.3. hCA VII JUNGIMOSI SU SULFONAMIDINIU LIGANDU TERMODINAMIKA

Jungimosi termodinamikos tyrimams naudotas hCA VII (1 – 264 a. r.) baltymas, ekspresuotas 4 val. 30°C temperatūroje. Tomis pačiomis sąlygomis ekspresuotas hCA VII (3 – 264 a. r.) baltymas yra neaktyvus. Manoma, kad papildomos penkios amino rūgštys, esančios baltymo pradžioje, trukdo baltymui įgauti teisingą konformaciją arba nebuvo rastos tinkamos baltymo ekspresijos sąlygos. Tyrimai atlikti taikant izoterminio titravimo kalorimetrijos (ITK) ir terminio poslinkio metodus (TPM).

3.3.1. hCA VII ir sulfonamidinio ligando jungimosi metu vykstančios reakcijos

Karboninės anhidrazės yra paplitusios visuose organizmuose ir katalizuoja gyvybiškai svarbią reakciją. Žmogaus karboninės anhidrazės dalyvauja įvairiuose fiziologiniuose

procesuose. Sutrikusi jų veikla lemia tam tikras patalogijas, todėl yra labai svarbu rasti kiekvienai karboanhidrazės izoformai specifiškus slopiklius, kad būtų galima užslopinti tik norimą baltymo izoformą ir nepakenkti organizmui. Terminio poslinkio metodas yra patrauklus tuo, kad vienu metu galima matuoti 72 mėginius – patikrinti jungimąsi su daug slopiklių ir nustatyti jungimosi parametrus. Stebimosios jungimosi konstantos vertė nesuteikia informacijos apie baltymo ir ligando sąveikos termodinaminį mechanizmą, todėl šiame darbe naudojamas ir kitas metodas – izoterminio titravimo kalorimetrija (ITK). Šiuo metodu išmatuojamas reakcijos metu išsiskyręs šilumos kiekis, t.y. entalpijos pokytis (ΔH), esant tam tikrai temperatūrai, ir galima apskaičiuoti „tikruosius“ jungimosi reakcijos parametrus – jungimosi konstantą, entalpiją, entropiją bei laisvąją Gibso energiją.

Žmogaus karboninės anhidrazės VII ir sulfonamidinio ligando jungimosi metu turėtų vykti mažiausiai trys protonizacijos – deprotonizacijos reakcijos (R2, R3 ir R4). Pagal Matulį ir Todd (2004), kad įvyktų jungimasis, karboanhidrazės aktyviajame centre esantis hidroksido jonas turi būti protonizuotas, o ligando sulfonamidinė grupė – deprotonizuota. Šias reakcijas kompensuoja buferiniame tirpale esantys protonai. Žemiau pateikiamos apibendrintos ką tik aprašytos reakcijos:

$$RSO_2NH^- + \text{CA-Zn-}H_2O \leftrightarrow \text{CA-Zn-}NH^-SO_2R + H_2O \quad \text{(R1)}$$

$$\text{CA-Zn-}OH^- + H^+ \leftrightarrow \text{CA-Zn-}H_2O \quad \text{(R2)}$$

$$RSO_2NH_2 \leftrightarrow RSO_2NH^- + H^+ \quad \text{(R3)}$$

$$\text{Buferis} + H^+ \leftrightarrow \text{Buferis}H^+ \quad \text{(R4)}$$

$$RSO_2NH_2 + \text{CA-Zn-}OH^- + \text{Buferis} + \text{CA}H^+ \leftrightarrow \text{CA-Zn-}NH^-SO_2R + \text{Buferis}H^+ + \text{CA} + H_2O \quad \text{(R5)}$$

ITK eksperimentų metu išmatuoti termodinaminiai parametrai atspindi makromolekulės ir ligando jungimosi metu vykstančių visų susijusių reakcijų šiluminių efektų sumą (R5). R1 – tai „tikroji“ karboanhidrazės ir sulfonamidinio ligando jungimosi reakcija, nepriklausoma nuo protonizacijos – deprotonizacijos reakcijų, t.y. vandens molekulės pakeitimas deprotonizuota ligando molekule. R2 – hidroksido jono, kuris koordinuoja karboanhidrazės aktyviajame centre esantį cinko joną, protonizacijos reakcija, o R3 – sulfonamidinio ligando deprotonizacijos reakcija. R4 reakcija aprašo buferinio tirpalo protonizaciją arba deprotonizaciją.

Aprašius jungimosi metu vykstančias protonizacijos – deprotonizacijos reakcijas, prieinama prie išvados, kad sulfonamidinio ligando ir karboanhidrazės jungimasis yra stipriausias pH intervale, kuriame ligandas yra deprotonizuotas, o karboanhidrazės cinko joną koordinuoja vandens molekulė, t.y. hidroksido jonas yra protonuotas.

Stebimoji jungimosi konstanta ($K_{b\text{-}steb}$) yra lygi „tikrosios“ jungimosi konstantos (K_b), deprotonizuoto ligando ($f_{RSO2NH\text{-}}$) frakcijos bei baltymo, turinčio cinko joną koordinuojančią vandens molekulę, ($f_{CAZnH2O}$) frakcijų sandaugai:

$$K_{b-steb} = K_b f_{RSO2NH-} f_{CAZnH2O}. \quad (26)$$

Stebimoji laisvoji Gibso energija yra lygi:

$$\Delta_{b-steb}G = -RTln(K_b f_{RSO2NH-} f_{CAZnH2O}); \quad (27)$$

kur R – universalioji dujų konstanta (R = 1,987 calK^{-1}mol^{-1});
T – absoliuti temperatūra kelvinais (T = ˚C + 273,15).

Tikroji laisvoji Gibso energija apskaičiuojama tokiu pat principu:

$$\Delta G = -RTlnK_b; \quad (28)$$

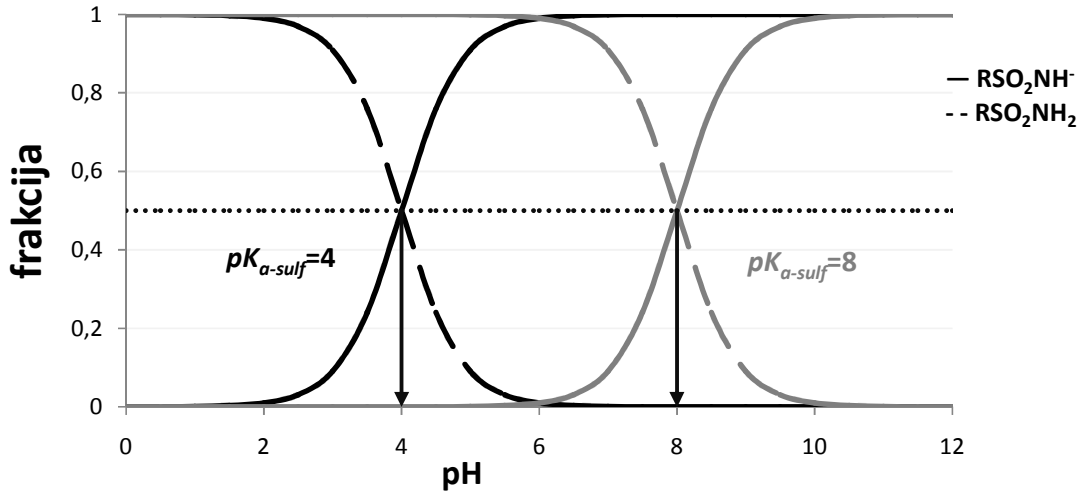
Kaip matyti iš pateiktų formulių, jungimosi konstanta ir laisvoji Gibso energija nepriklauso nuo buferinio tirpalo cheminės prigimties, nes buferinis tirpalas nedalyvauja jungimosi reakcijoje. Jis tik kompensuoja jungimosi metu vykstančias protonizacijos ir deprotonizacijos reakcijas.

Kai žinomos karboanhidrazės ir sulfonamidinio ligando protonizacijos pK_a reikšmės, galima apskaičiuoti deprotonizuoto slopiklio ir protonizuotą hidroksido joną turinčio baltymo frakcijų dalis tirpale:

$$f_{RSO2NH-} = \frac{10^{pH-pK_{a-sulf}}}{1+10^{pH-pK_{a-sulf}}}; \quad (29)$$

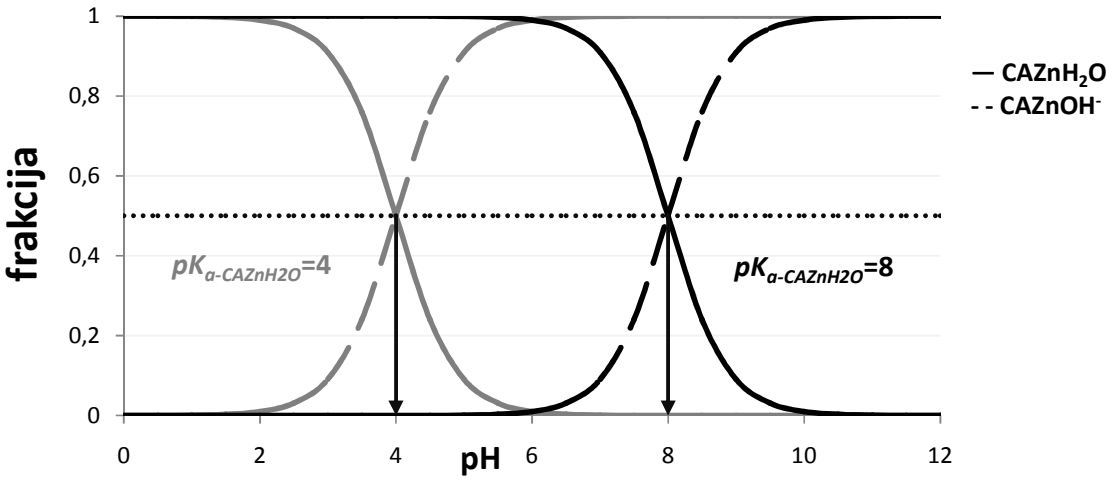
$$f_{CAZnH2O} = 1 - \frac{10^{pH-pK_{a-CAZnH2O}}}{1+10^{pH-pK_{a-CAZnH2O}}}. \quad (30)$$

Kokia sulfonamidinių junginių dalis tirpale bus deprotonizuota, esant tam tikram pH, priklauso nuo sulfonamidinės grupės pK_a reikšmės (29). Kai deprotonizuoti visi sulfonamidiniai junginiai, tai $f_{RSO2NH\text{-}}$ frakcijos dalis lygi 1. Tą patį galima pasakyti ir apie protonizuotą hidroksido joną turinčios karboanhidrazės frakcijos dalį $f_{CAZnH2O}$, esant tam tikram pH (30). 12 paveiksle pateikta deprotonizuoto ir protonizuoto sulfonamidinio ligando frakcijų priklausomybė nuo pH ir $pK_{a\text{-}sulf}$.



12 pav. Deprotonizuoto ir protonizuoto sulfonamidinio slopiklio frakcijų priklausomybė nuo pH ir pK_a reikšmių (modeliuotas grafikas). Rodyklėmis pažymėtos skaičiavimuose vartotos sulfonamidinės grupės pK_a reikšmės.

Kaip matyti 12 pav., didėjant pH, deprotonizuotų sulfonamidinių junginių dalis tirpale didėja, o protonizuotų – mažėja, esant tam tikrai $pK_{a\text{-}sulf}$ reikšmei. Kuo didesnė sulfonamidinio slopiklio $pK_{a\text{-}sulf}$, tuo mažesnė deprotonizuoto ligando frakcijos dalis, esant tai pačiai pH reikšmei. 13 paveiksle pateikta karboanhidrazės, kai aktyviajame centre esantį cinko joną koordinuoja vandens molekulė, frakcijos priklausomybė nuo pH ir $pK_{a\text{-}CAZnH2O}$ reikšmių.

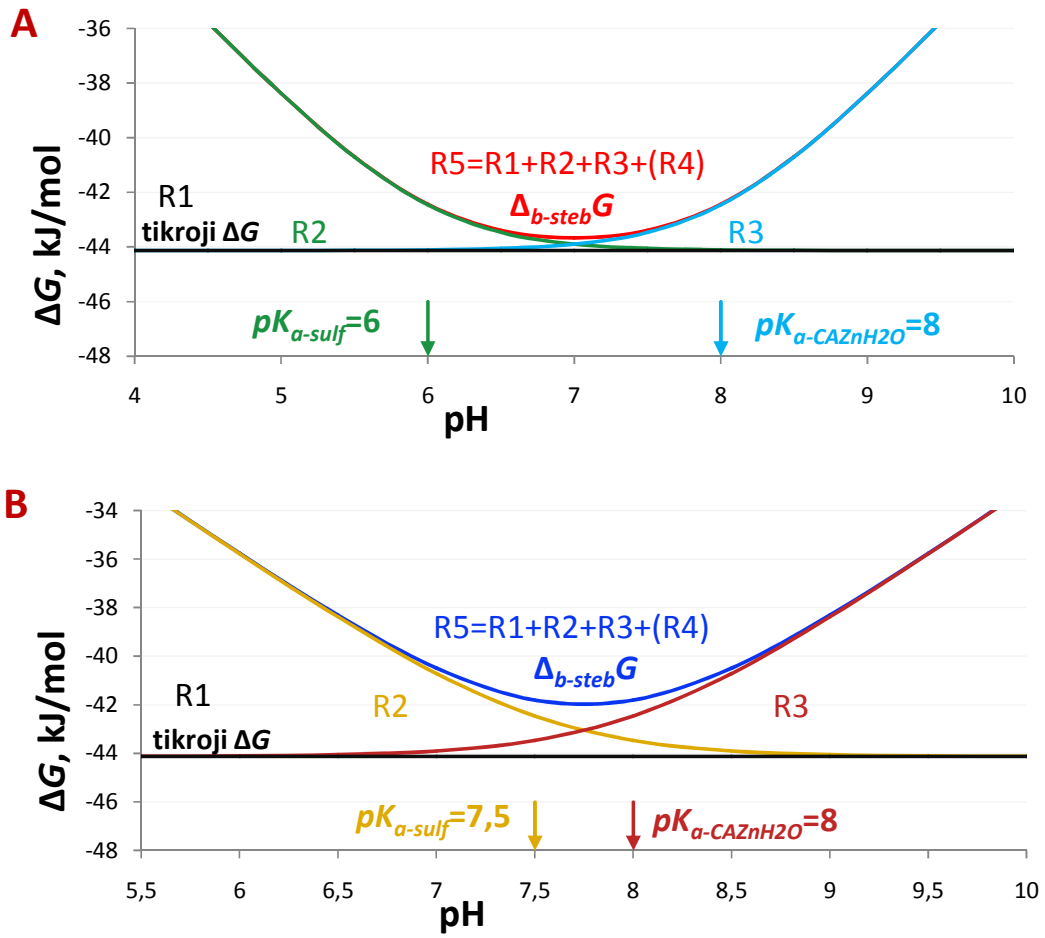


13 pav. Karboanhidrazės su prie cinko jono prisijungusiu protonizuotu hidroksido jonu frakcijos priklausomybė nuo pH ir pK_a reikšmių (modeliuotas grafikas). Rodyklėmis pažymėtos skaičiavimuose vartotos $pK_{a\text{-}CAZnH2O}$ reikšmės.

Kuo didesnis pH, tuo mažesnė karboanhidrazių su protonizuotu hidroksido jonu ir atitinkamai didesnė karboanhidrazių, turinčių deprotonizuotą hidroksido joną dalis tirpale, esant

tam tikrai pK_a reikšmei (13 pav.). Didėjant $pK_{a\text{-}CAZnH2O}$ reikšmei, didėja ir baltymo, turinčio cinko joną koordinuojantį protonizuotą hidroksido joną, frakcijos dalis, esant tam tikram pH.

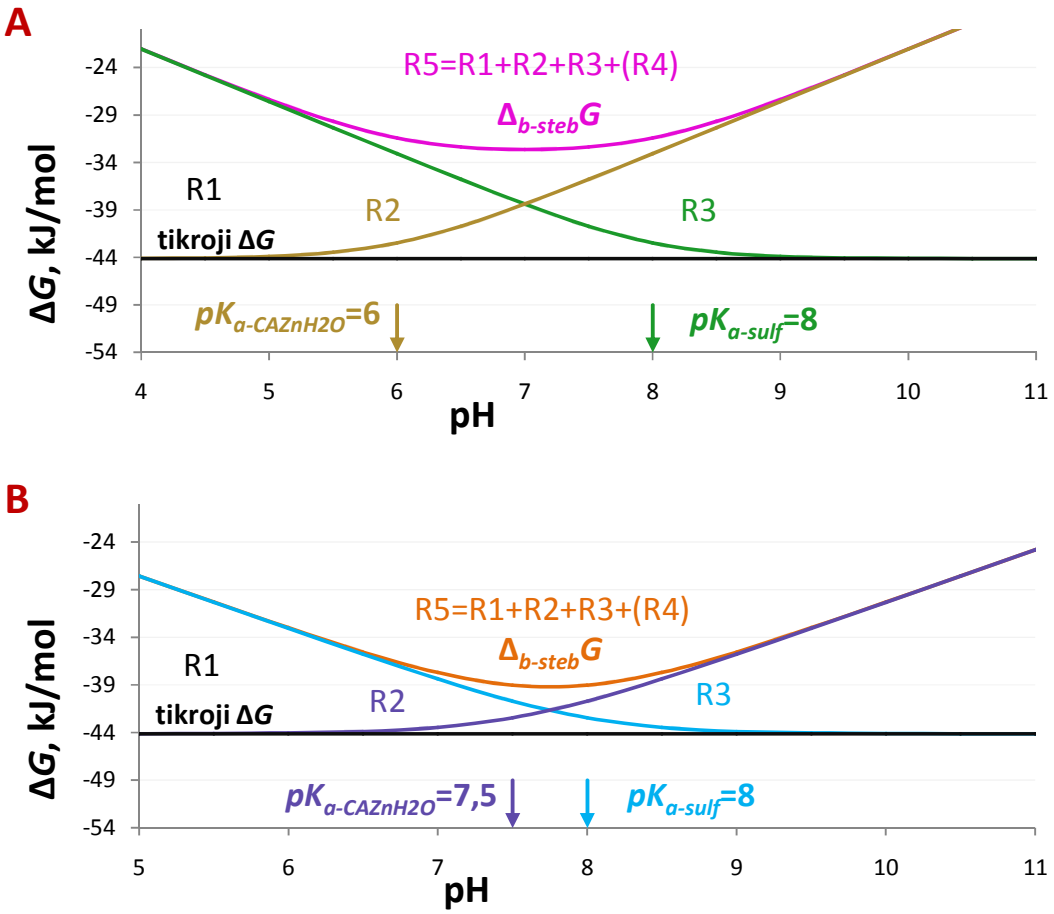
Taigi, esant žemoms pH reikšmėms, jungimasis yra žymiai silpnesnis, nes mažėja deprotonizuoto sulfonamido frakcijos dalis. Esant aukštoms pH reikšmėms jungimasis taip pat yra žymiai silpnesnis, nes mažėja baltymo, aktyviajame centre turinčio vandens molekulę, frakcijos dalis. Stipriausios jungimosi reakcijos vyksta pH intervale tarp ligando sulfonamidinės grupės ir baltymo hidroksido jono, koordinuojančio Zn^{2+}, protonizacijos pK_a reikšmių, kai $pK_{a\text{-}sulf} < pK_{a\text{-}CAZnH2O}$. Tai atspindi funkciškai aprašytos stebimosios laisvosios Gibso energijos (27) priklausomybė nuo pH. Ši priklausomybė yra gražios U raidės formos (14 pav.).



14 pav. Sulfonamidinio ligando ir karboanhidrazės stebimosios ΔG priklausomybė nuo pH (modeliuotas grafikas), kai $pK_{a\text{-}sulf} < pK_{a\text{-}CAZnH2O}$ ir $K_b = 10^7$ M^{-1}.

Kai skirtumas tarp $pK_{a\text{-}sulf}$ ir $pK_{a\text{-}CAZnH2O}$ reikšmių yra pakankamai didelis ir $pK_{a\text{-}sulf} < pK_{a\text{-}CAZnH2O}$ (14 pav. A), stebimoji ir „tikroji“ jungimosi Gibso laisvoji energijos beveik sutampa. Kai skirtumas tarp pK_a reikšmių yra mažesnis ir $pK_{a\text{-}sulf} < pK_{a\text{-}CAZnH2O}$ (14 pav. B), stebimoji laisvoji Gibso energija nepasiekia „tikrosios“ ΔG reikšmės. Karboanhidrazės ir sulfonamidinio

slopiklio stebimas jungimosi stiprumas žymiai sumažėja ir gerokai skiriasi nuo „tikrosios“ reikšmės, kai $pK_{a\text{-}sulf}$ ir $pK_{a\text{-}CAZnH2O}$ reikšmės apsikeičia vietomis, kaip pavaizduota 15 pav.



15 pav. Sulfonamidinio ligando ir karboanhidrazės stebimosios ΔG priklausomybė nuo pH (modelinis grafikas), kai $pK_{a\text{-}CAZnH2O} < pK_{a\text{-}sulf}$ ir $K_b = 10^7$ M^{-1}.

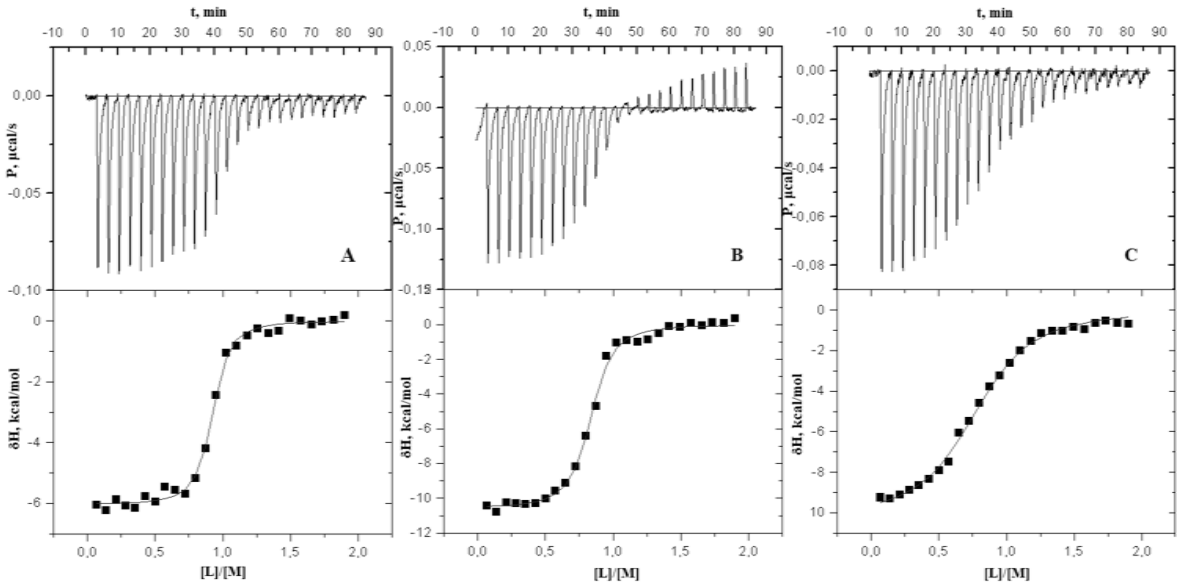
Kai skirtumas tarp $pK_{a\text{-}sulf}$ ir $pK_{a\text{-}CAZnH2O}$ reikšmių yra pakankamai didelis ir $pK_{a\text{-}CAZnH2O} < pK_{a\text{-}sulf}$ (15 pav. A), stebimoji laisvoji Gibso energija yra gerokai nutolusi nuo „tikrosios“ laisvosios Gibso energijos. Kai skirtumas tarp pK_a reikšmių yra mažesnis ir $pK_{a\text{-}CAZnH2O} < pK_{a\text{-}sulf}$ (15 pav. B), stebimoji laisvoji Gibso energija labiau priartėja prie „tikrosios“ ΔG reikšmės. Abiem atvejais, kai $pK_{a\text{-}CAZnH2O} < pK_{a\text{-}sulf}$, stebimoji laisvoji Gibso energija neatitinka „tikrosios“ laisvosios Gibso energijos.

14 pav. bei 15 pav. grafikų R2 ir R3 kreivės parodo, kokią įtaką daro kiekviena protonizacijos pK_a reikšmė laisvajai Gibso energijai. Kreivė R1 parodo „tikrąją“ karboanhidrazės ir sulfonamidinio ligando jungimosi reakcijos laisvąją Gibso energiją, nepriklausomą nuo protonizacijos – deprotonizacijos reakcijų. R5 – tai visų vykstančių šiluminių efektų suma.

Modeliuojant abu šiuos grafikus nebuvo atsižvelgta į buferinio tirpalo protonizaciją – deprotonizaciją (R4).

3.3.2. hCA VII jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais matavimas taikant izoterminio titravimo kalorimetriją

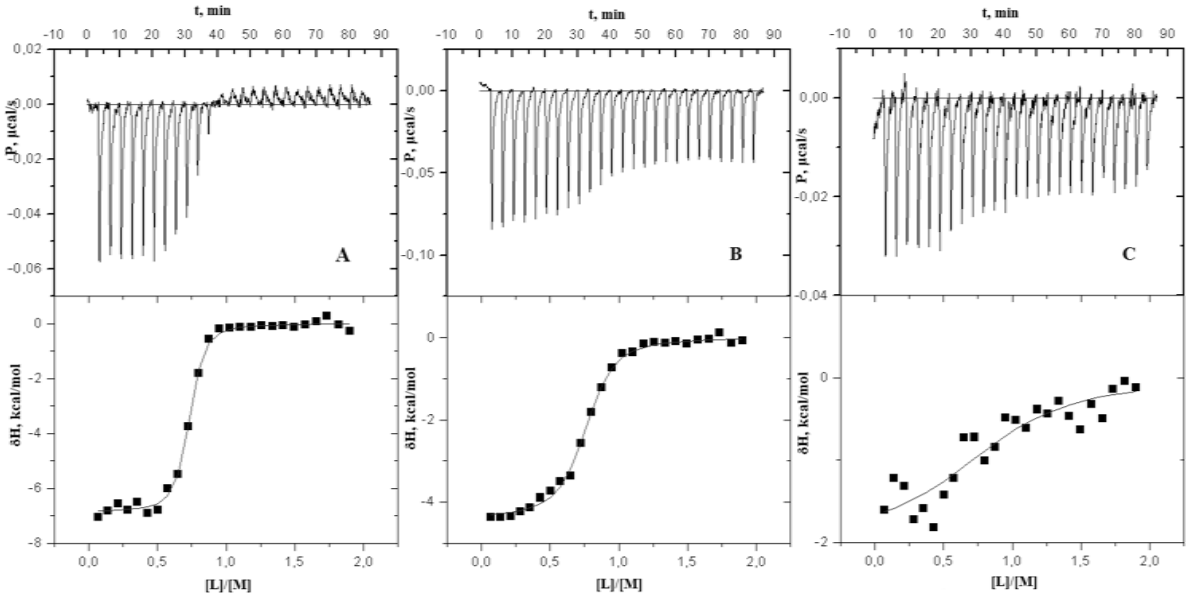
Žmogaus karboanhidrazės VII (hCA VII) jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais EZA ir TFMSA išskiriama šiluma buvo išmatuota esant skirtingoms pH reikšmėms izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu. Tiriant hCA VII ir TFMSA sąveikas ITK metodu, matavimai atlikti 0,1 M fosfatiniame ir 0,1 M TRIS buferiniuose tirpaluose, keičiant pH kas 0,5 reikšmės intervale nuo pH 5,5 iki pH 9,5 25°C laipsnių temperatūroje. Dėl baltymo trūkumo matavimai su EZA atlikti tik 0,1M fosfatiniame buferiniame tirpale, keičiant pH kas 0,5 reikšmės intervale nuo pH 6,5 iki pH 9. 16 paveiksle pavaizduotos būdingos ITK metodu gautos hCA VII jungimosi su TFMSA kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms fosfatiniame buferiniame tirpale.



16 pav. ITK metodu gautos būdingos hCA VII jungimosi su TFMSA fosfatiniame buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms. A paveikslas atitinka duomenis, gautus esant pH 6,5, B paveikslas – pH 7,5 ir C – pH 9. $K_{b\text{-}steb}$ (A) > $K_{b\text{-}steb}$ (B) > $K_{b\text{-}steb}$ (C). Viršuje pateikti pirminiai duomenys, o apačioje – integruotos kreivės. [L]/[M] – ligandų ir makromolekulių molinis santykis.

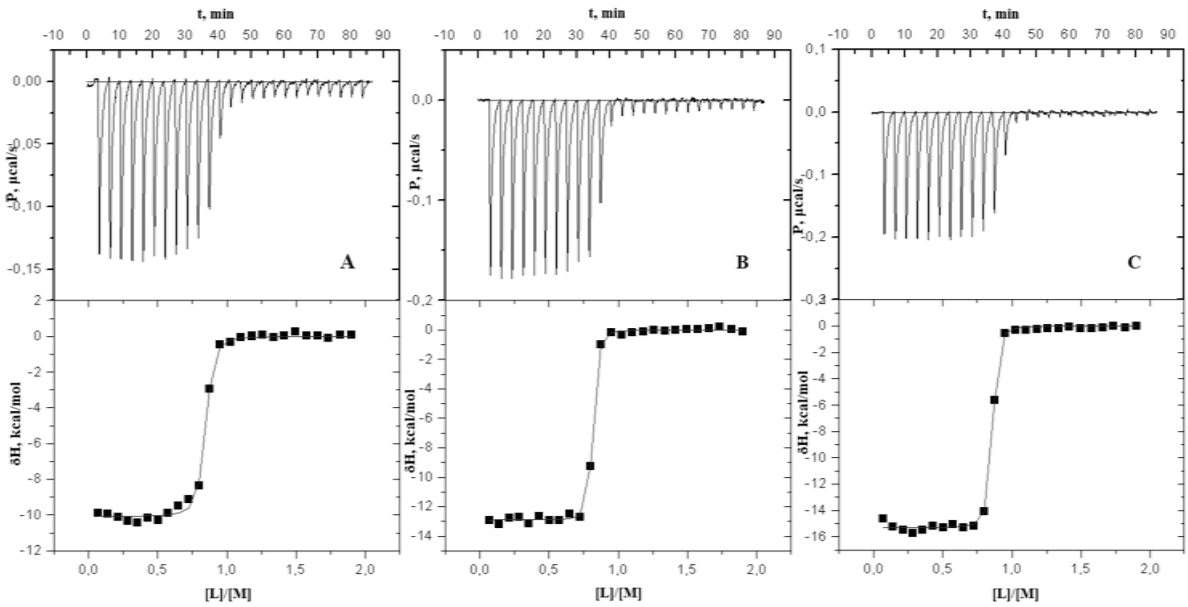
16 paveikslo viršuje pateikiami pirminiai ITK duomenys, kuriuose juoda linija pažymėta bazinė linija. Paveikslo apačioje – ITK eksperimento metu išmatuoti galios pokyčiai, perskaičiuoti į šilumos kiekio pokyčius. Taškai atitinka eksperimentinius duomenis, kurie aproksimuojami teorine kreive. Kitame paveiksle pateikiamos būdingas hCA VII jungimosi su

TFMSA kreivės, gautas ITK metodu esant skirtingoms pH reikšmėms TRIS buferiniame tirpale (17 pav.).



17 pav. ITK metodu gautos būdingos hCA VII jungimosi su TFMSA TRIS buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms. A paveikslas atitinka duomenis, gautus esant pH 6,5, B paveikslas – pH 7,5 ir C – pH 9. $K_{b\text{-}steb}$ (A) > $K_{b\text{-}steb}$ (B) > $K_{b\text{-}steb}$ (C). Viršuje pateikti pirminiai duomenys, o apačioje – integruotos kreivės. [L]/[M] – ligandų ir makromolekulių molinis santykis.

Kaip matyti iš grafikų (16 pav. ir 17 pav.), hCA VII ir TMFSA stebimosios jungimosi konstantos ($K_{b\text{-}steb}$) skirtingos, esant toms pačioms pH reikšmėms skirtinguose buferiniuose tirpaluose, tačiau tendencija išlieka ta pati. 18 paveiksle pavaizduotos būdingos ITK metodu gautos hCA VII jungimosi su EZA kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms fosfatiniame buferiniame tirpale.



18 pav. ITK metodu gautos būdingos hCA VII jungimosi su EZA fosfatiniame buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms. A paveikslas atitinka duomenis, gautus esant pH 6,5, B paveikslas – pH 7,5 ir C – pH 9. $K_{b\text{-}steb}$ (B) > $K_{b\text{-}steb}$ (C) > $K_{b\text{-}steb}$ (A). Viršuje pateikti pirminiai duomenys, o apačioje – integruotos kreivės. [L]/[M] – ligandų ir makromolekulių molinis santykis.

Palyginus 18 pav. su prieš tai pateiktais grafikais (16 pav ir 17 pav.), akivaizdžiai matyti, kad hCA VII stipriau jungiasi su sulfonamidiniu slopikliu EZA negu su TFMSA. Kaip matyti iš kreivių ligandų ir makromolekulių santykis n = ~0,8. Baltymo jungimosi su slopikliais ITK metodu gauti parametrai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. hCA VII jungimosi su TFMSA ir EZA esant skirtingoms pH parametrai, gauti ITK metodu 25°C temperatūroje: jungimosi konstanta, laisvoji Gibso energija, jungimosi entalpija bei apskaičiuotas protonų skaičius. Matavimų paklaida ~5 %.

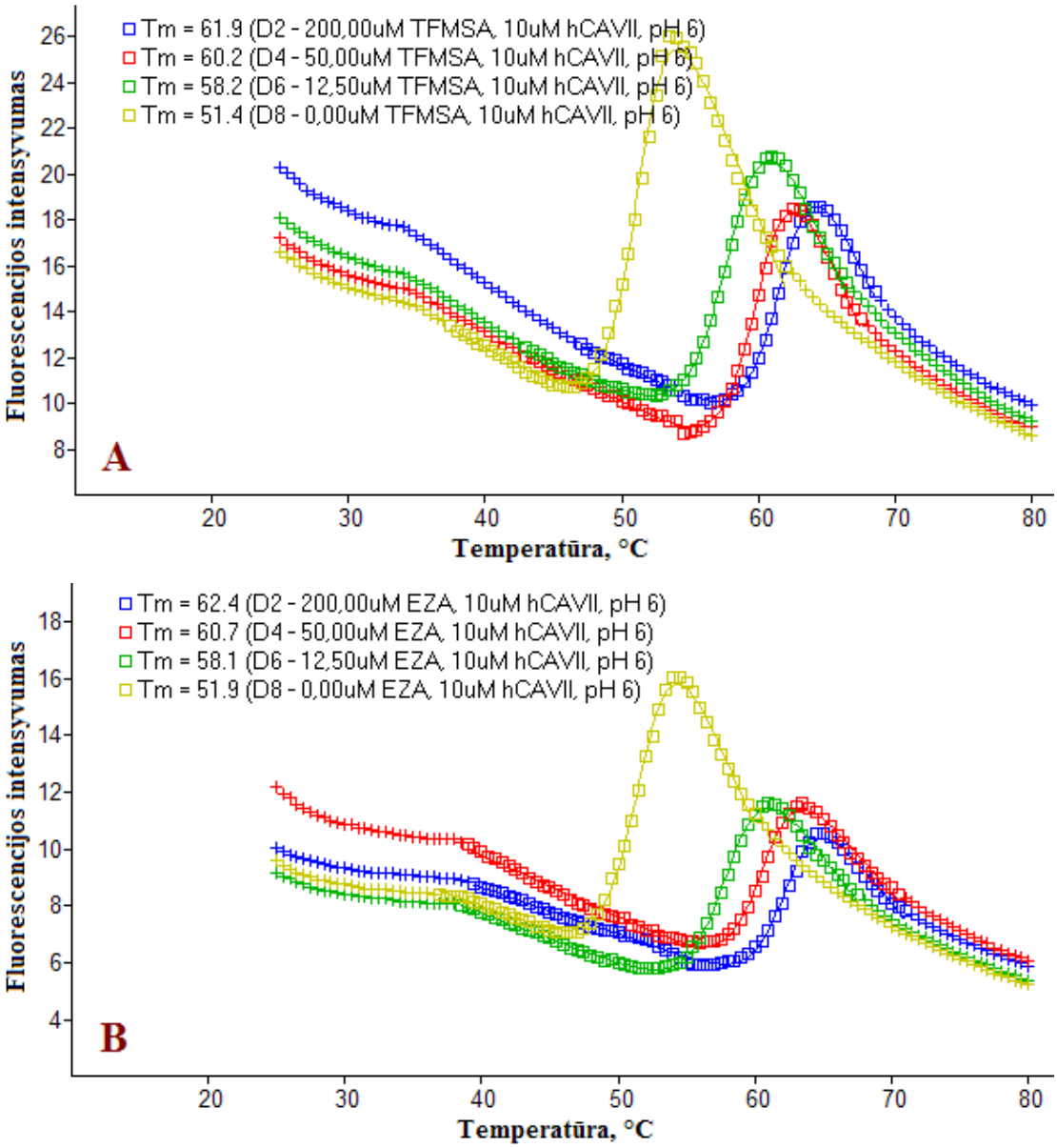
Slopiklis	**0,1 M TRIS buferinis tirpalas**				**0,1 M fosfatinis buferinis tirpalas**			***n***
TFMSA	**pH**	$K_{b\text{-}steb}$, M^{-1}	$\Delta_{b\text{-}steb}G$, kJ/mol	$\Delta_{b\text{-}steb}H$, kJ/mol	$K_{b\text{-}steb}$, M^{-1}	$\Delta_{b\text{-}steb}G$, kJ/mol	$\Delta_{b\text{-}steb}H$, kJ/mol	
	5,5	$5{,}09\cdot10^{7}$	-44	-36	$1{,}03\cdot10^{7}$	-40	-20,2	-0,372
	6	$9{,}61\cdot10^{7}$	-45,6	-30,5	$3{,}21\cdot10^{7}$	-42,8	-22,3	-0,194
	6,5	$6{,}78\cdot10^{7}$	-44,7	-28,7	$3{,}68\cdot10^{7}$	-43,2	-25,3	-0,08
	7	$4{,}70\cdot10^{7}$	-43,8	-18,6	$3{,}45\cdot10^{7}$	-43,	-37,2	0,437
	7,5	$1{,}73\cdot10^{7}$	-41,3	-18,4	$2{,}06\cdot10^{7}$	-41,8	-44,3	0,612
	8	$8{,}38\cdot10^{6}$	-39,5	-14,4	$1{,}14\cdot10^{7}$	-40,3	-49,4	0,828
	8,5	$2{,}65\cdot10^{6}$	-36,7	-9,5	$6{,}46\cdot10^{6}$	-38,9	-46,4	0,871
	9	$1{,}5\cdot10^{6}$	-35,3	-8,2	$4{,}65\cdot10^{6}$	-38,1	-43,4	0,832
	9,5	$1{,}28\cdot10^{6}$	-34,9	-9,4	$1{,}54\cdot10^{6}$	-35,3	-55,7	1,092

EZA	6,5	-	-	-	$2{,}14 \cdot 10^8$	-47,6	-42,2	-
	7	-	-	-	$3{,}61 \cdot 10^8$	-48,9	-43,8	-
	7,5	-	-	-	$7{,}08 \cdot 10^8$	-50,5	-54	-
	8	-	-	-	$1{,}01 \cdot 10^9$	-51,4	-58,8	-
	8,5	-	-	-	$5{,}95 \cdot 10^8$	-50,1	-63,9	-
	9	-	-	-	$5{,}12 \cdot 10^8$	-49,7	-64,1	-

Kaip matyti iš 2 lentelės, hCA VII geriausiai jungiasi su TFMSA, kai TRIS buferinio tirpalo pH 6 ($K_{b\text{-}steb}$ = $9{,}61 \cdot 10^7$ M^{-1}, ΔG = -45,6 kJ/mol), ir kai fosfatinio buferinio tirpalo pH 6,5 ($K_{b\text{-}steb}$ = $3{,}68 \cdot 10^7$ M^{-1}, ΔG = -43,2 kJ/mol). Gauti duomenys nėra vienodi atlikus matavimus skirtinguose buferiniuose tirpaluose, taip yra dėl netikslaus buferinio tirpalo pH bei matavimo paklaidų. Baltymas geriausiai jungiasi su EZA, kai fosfatinio buferinio tirpalo pH 8 ($K_{b\text{-}steb}$ = $1{,}01 \cdot 10^9$ M^{-1}, ΔG = -51,4 kJ/mol). Dėl hCA VII trūkumo neatlikti visi reikalingi matavimai. Lentelėje taip pat pateiktas apskaičiuotas protonų skaičius *n.* Plačiau apie tai parašyta 3.3.5. skyriuje.

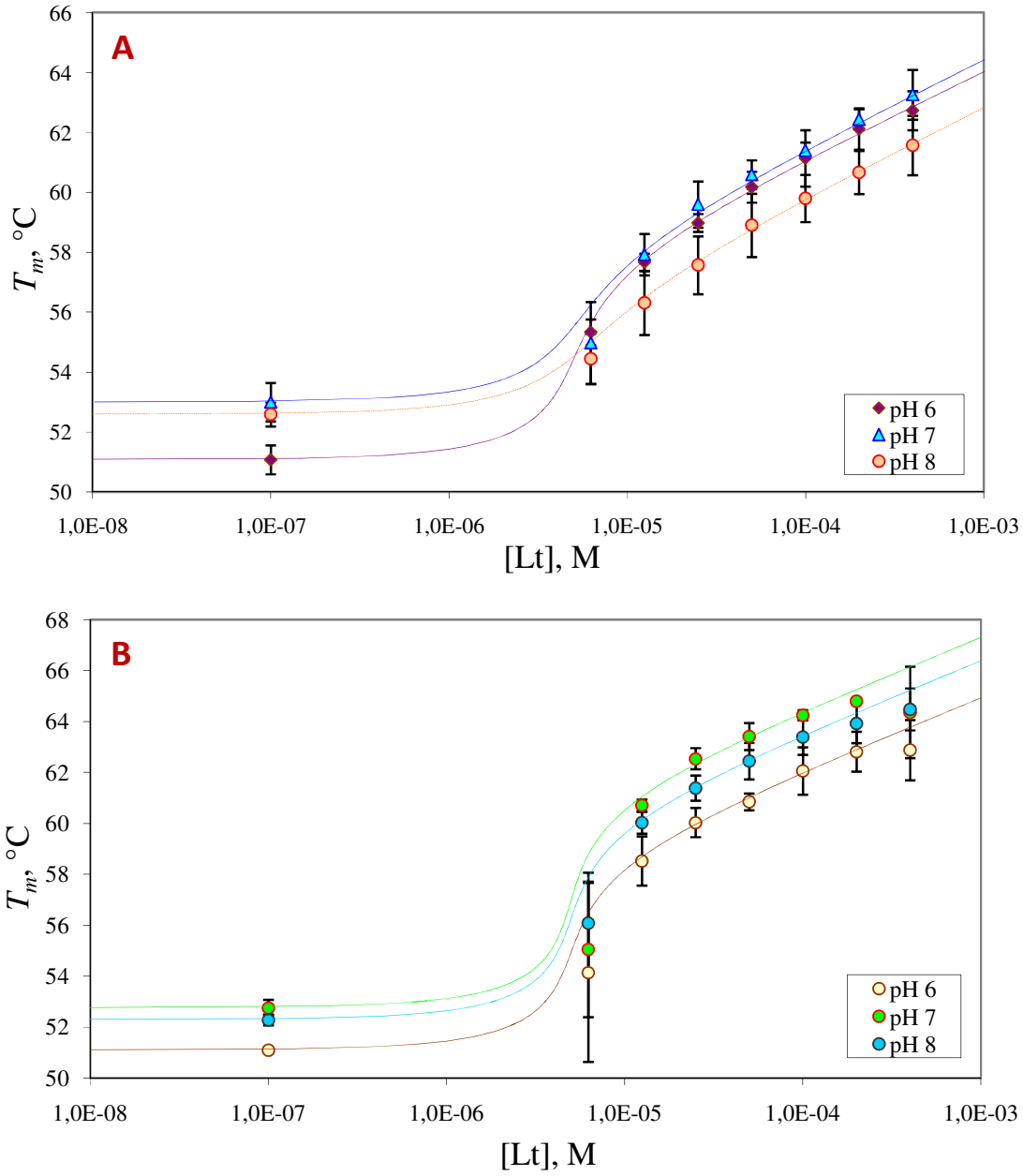
3.3.3. hCA VII jungimosi su sulfonamidiniais slopikliais matavimas taikant terminio poslinkio metodą

hCA VII jungimasis su sulfonamidiniais ligandais taip pat buvo išmatuotas taikant terminio poslinkio metodą (TPM). Matavimai su TFMSA ir EZA ligandais atlikti universaliame buferiniame tirpale, keičiant pH kas 0,5 reikšmės intervale nuo 4,5 iki 10,5. Naudojamas fluorescencinis dažas-žymė – 1-anilino-8-naftaleno sulfonatas (ANS), kuris intensyviai fluorescuoja hidrofobinėje aplinkoje. Atlikus eksperimentą gaunamos ANS fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros kreivės. Iš gautų TPM kreivių nustatoma baltymo denatūracijos temperatūra (T_m) esant skirtingoms ligando koncentracijoms (19 pav.).



19 pav. Tipinis fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas esant skirtingoms TFMSA (paveikslo A dalis) ir EZA (paveikslo B dalis) koncentracijoms, kai pH 6.

Kaip matyti iš 19 pav., kai vyksta baltymo ir ligando jungimasis, didinant slopiklio koncentraciją, didėja baltymo terminis stabilumas. Simuliuojant baltymo ir ligando jungimosi konstantas bei baltymo išsivyniojimo entalpiją, gaunamas karboanhidrazės lydymosi temperatūros priklausomybės nuo ligando koncentracijos grafikas, aproksimuotas teorine kreive (25) (20 pav.)



20 pav. hCA VII T_m priklausomybės nuo ligando koncentracijos grafikas esant skirtingoms pH reikšmėms. A – jungimasis esant skirtingoms TFMSA koncentracijoms, B – skirtingoms EZA koncentracijoms.

Kaip matyti 20 pav., kai vyksta baltymo ir ligando jungimasis, didinant slopiklio koncentraciją, didėja baltymo terminis stabilumas. Paklaidos apskaičiuotos Stjudento metodu, kai pasikliaujamoji tikimybė P = 0,95. Iš gautų kreivių nustatytos jungimosi konstantos, o iš jų apskaičiuota jungimosi laisvoji Gibso energija, kai baltymo išsivyniojimo entalpija lygi $\Delta_U H_{(T)}$ = 543,92 kJ/mol (3 lentelė). Iš grafikų bei 2 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad hCA VII geriau jungiasi su EZA (20A pav.), nei su TFMSA (20B pav.).

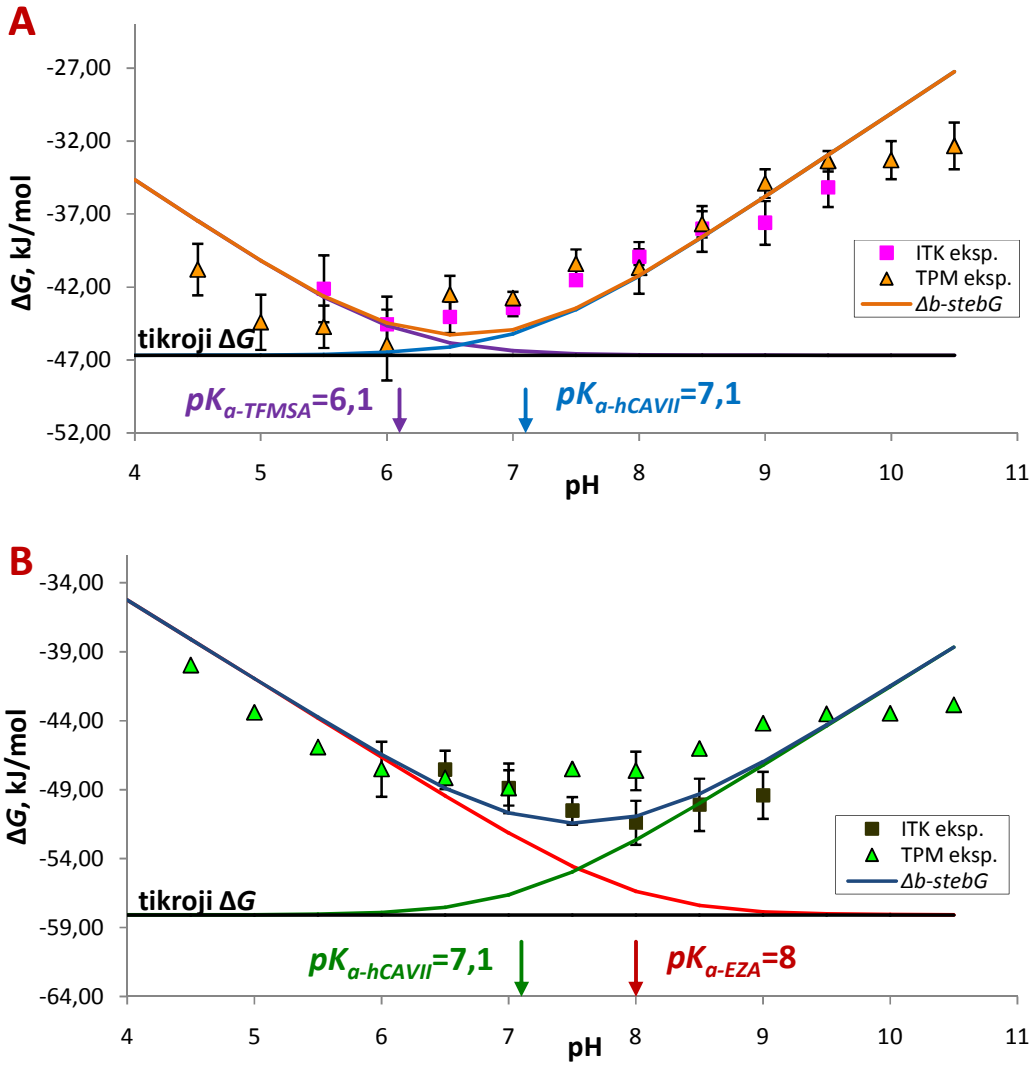
3 lentelė. hCA VII jungimosi su TFMSA ir EZA esant skirtingoms pH terminio poslinkio metodu gauti parametrai: jungimosi konstanta ir laisvoji Gibso energija, kai $\Delta_U H_{(T)}$ = 543,92 kJ/mol. Matavimų paklaida ~5 %.

pH	Jungimasis su TFMSA		Jungimasis su EZA	
	$K_{b\text{-}steb}$, M^{-1}	$\Delta_{b\text{-}steb}G$, kJ/mol	$K_{b\text{-}steb}$, M^{-1}	$\Delta_{b\text{-}steb}G$, kJ/mol
4,5	$1{,}6\cdot10^7$	-41,1	$1\cdot10^7$	-40
5	$6{,}5\cdot10^7$	-44,6	$4\cdot10^7$	-43,4
5,5	$7\cdot10^7$	-44,8	$1{,}1\cdot10^8$	-45,9
6	$8{,}8\cdot10^7$	-45,4	$1{,}8\cdot10^8$	-47,1
6,5	$2{,}8\cdot10^7$	-42,5	$2{,}7\cdot10^8$	-48,1
7	$2{,}8\cdot10^7$	-42,5	$3{,}3\cdot10^8$	-48,6
7,5	$1{,}2\cdot10^7$	-40,4	$2{,}1\cdot10^8$	-47,5
8	$1{,}1\cdot10^7$	-40,2	$2{,}3\cdot10^8$	-47,7
8,5	$4\cdot10^6$	-37,7	$1{,}15\cdot10^8$	-46
9	$1{,}3\cdot10^6$	-34,9	$5{,}5\cdot10^7$	-44,2
9,5	$7\cdot10^5$	-33,4	$4{,}2\cdot10^7$	-43,5
10	$6{,}8\cdot10^5$	-33,3	$4{,}1\cdot10^7$	-43,5
10,5	$4{,}6\cdot10^5$	-32,3	$3{,}2\cdot10^7$	-42,8

hCA VII geriausiai jungiasi su TFMSA, kai pH 6 (jungimosi $K_{b\text{-}steb} = 8{,}8\cdot10^7$ M^{-1} ir $\Delta_{b\text{-}steb}G$ = -45,4 kJ/mol), o su EZA – kai pH 7 (jungimosi $K_{b\text{-}steb} = 3{,}3\cdot10^8$ M^{-1} ir $\Delta_{b\text{-}steb}G$ = -48,6 kJ/mol) (3 lentelė). Šio eksperimento rezultatai skiriasi nuo ITK būdu gautų duomenų, tačiau tendencija išlieka. Baltymo ir tam tikro lingando jungimosi stiprumas skiriasi esant skirtingoms pH reikšmėms. Tai priklauso nuo karboanhidrazės bei sulfonamidinio slopiklio protonizacijos pK_a reikšmių. Baltymo bei tam tikro sulfonamidinio ligando jungimosi stiprumas priklauso nuo to, kaip ligandas užpildo aktyvų karboanhidrazės centrą.

3.3.4. hCA VII aktyviajame centre esančio hidroksido jono protonizacijos pK_a reikšmės nustatymas

ITK ir TPM eksperimentų metu gautos stebimosios ΔG reikšmės pavaizduotos 21 pav. Simuliuojant „tikrąją“ K_b ir $pK_{a\text{-}CAZnH2O}$, kai TFMSA pK_a yra lygi 6,1 (Matulis 2004), o EZA pK_a – 8,0 (Mištinaitė 2006), eksperimentiniai duomenys aproksimuoti teorine kreive, atitinkančia (27) lygtį. Pagal (28) formulę apskaičiuota „tikroji“ ΔG reikšmė.



21 pav. Sulfonamidinių ligandų – TFMSA (A paveikslas) bei EZA (B paveikslas) – ir hCA VII stebimosios Δ*G* priklausomybės nuo pH grafikas.

Kaip matyti iš aukščiau pateiktų grafikų, stebimoji karboanhidrzės ir TFMSA laisvoji Gibso energija nedaug skiriasi nuo „tikrosios“ Δ*G* reikšmės (21A pav.). Pagal (28) lygtį apskaičiuota „tikroji“ karboanhidrazės ir TFMSA ΔG **= -47,67 kJ/mol** ± 2,5 kJ/mol, K_b **= 1,5·10^8 M^{-1}** ± 1·10^7 M^{-1}. hCA VII ir EZA stebimoji laisvoji Gibso energija gerokai skiriasi nuo „tikrosios“ Δ*G* reikšmės, nes sulfonamido protonizacijos pK_a reikšmė yra mažesnė už baltymo protonizacijos pK_a (21B pav.). Apskaičiuota „tikroji“ baltymo ir EZA ΔG **= -58,08 kJ/mol** ± 2 kJ/mol, K_b **= 1,5·10^{10} M^{-1}** ± 2·10^8 M^{-1}. „Tikrųjų“ reikšmių paklaidomis nurodytos didžiausios stebimųjų reikšmių Stjudento metodu apskaičiuotos paklaidos. Nustatyta karboanhidrazės pK_a reikšmė, $pK_{a\text{-}hCAVII}$ **= 7,1**.

21 paveiksle matyti, kad eksperimentiniai duomenys ne visai atitinka teorinio modelio duomenis. Taip yra todėl, kad eksperimentais sunku išgauti tikslias jungimosi $K_{b\text{-}steb}$ esant

mažoms ir aukštoms pH reikšmėms. Taip pat stebimi nežymūs skirtumai tarp duomenų, gautų skirtingais metodais.

3.3.5. hCA VII ir TFMSA jungimosi reakcijos protonizacijos skaičiaus nustatymas bei „tikrųjų“ jungimosi parametrų skaičiavimas

Jungimosi reakcijos metu paimamą arba atiduodamą baltymo protonų skaičių (*n*) galima nustatyti eksperimentiškai bei apskaičiuoti iš žinomų baltymo ir ligando pK_a reikšmių, taikant lygtį (nepublikuoti D. Matulio duomenys):

$$n = \frac{K_{a1}K_{a2}-[H^+]^2}{[H^+]^2+K_{a1}[H^+]+K_{a1}K_{a2}} = \frac{10^{-pKa1}10^{-pKa2}-\left(10^{-pH}\right)^2}{(10^{-pH})^2+10^{-pKa1}10^{-pH}+10^{-pKa1}10^{-pKa2}}. \quad (31)$$

Šioje lygtyje $pK_{a1} = pK_{a\text{-}sulf}$, o $pK_{a2} = pK_{a\text{-}CAZnH2O}$, nes TFMSA pK_a reikšmė yra mažesnė už karboanhidrazės aktyviajame centre esančio cinko jono pK_a reikšmę. Priklausomai nuo pH, protonų skaičius *n* gali varijuoti nuo 1 iki -1. Kai pH < pK_{a1} < pK_{a2}, tai *n* artės prie -1, t.y. ligando ir baltymo jungimosi metu nuo slopiklio sulfonamidinės grupės bus atpalaiduotas protonas (R3) ir jį suriš buferinis tirpalas. Kai pH > pK_{a2} > pK_{a1}, tai *n* artės prie 1, t.y. iš buferinio tirpalo bus paimtas protonas, kurį suriš baltymo aktyviajame centre esantį cinko joną koordinuojantis hidroksido anijonas (R2). Iš ITK metodu gautų duomenų apskaičiuoti protonų skaičiai *n* esant skirtingiems pH pateikti 2 lentelėje 3.3.2. skyriuje.

Tokiu principu galima atskirai apskaičiuoti atpalaiduotų arba surištų protonų skaičių *n* abiejuose procesuose:

$$n_1 = \frac{-\left(10^{-pH}\right)^2}{(10^{-pH})^2+10^{-pKa1}10^{-pH}+10^{-pKa1}10^{-pKa2}}; \quad (32)$$

$$n_2 = \frac{10^{-pKa1}10^{-pKa2}}{(10^{-pH})^2+10^{-pKa1}10^{-pH}+10^{-pKa1}10^{-pKa2}}; \quad (33)$$

$$n = n_1 + n_2. \quad (34)$$

n_1 – protonų skaičius, surištas protonizuojantis baltymo hidroksido jonui, kai $pK_{a\text{-}sulf} < pK_{a\text{-}CAZnH2O}$;

n_2 – protonų skaičius, kurį atpalaiduoja slopiklio sulfonamidinė grupė deprotonizacijos metu;

n – bendras baltymo ir sulfonamidinio ligando jungimosi reakcijos protonų skaičius.

Stebimosios jungimosi konstantos vertė nesuteikia informacijos apie baltymo ir ligando sąveikos termodinaminį mechanizą, todėl reikia apskaičiuoti „tikruosius“ jungimosi reakcijos

parametrus, atitinkančius R1 lygtį. Apskaičiavus hCA VII aktyviajame centre esančios vandens molekulės protonizacijos (*n2*) ir sulfonamidinės slopiklio grupės deprotonizacijos (*n1*) protonų skaičių bei ITK metodu nustačius baltymo ir ligando jungimosi entalpijas skirtinguose buferiniuose tirpaluose, galime apskaičiuoti stebimąją entalpiją, atitinkančią R1 lygtį, bet kuriame pH:

$$\Delta_{steb}H = \Delta H_0 + n_1\Delta H_1 + n_2\Delta H_2 - n_{buferio}\Delta H_{buferio}. \quad (35)$$

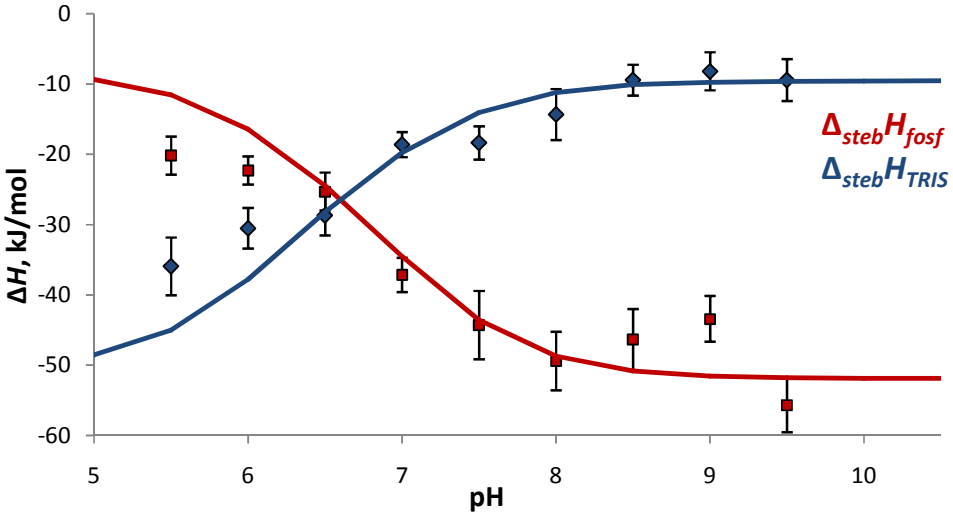
Kai $pK_{a\text{-}sulf} < pK_{a\text{-}CAZnH2O}$, tai ΔH_1 yra sulfonamido deprotonizacijos entalpija (25°C temperatūroje ΔH_{TFMSA} = 20,92 kJ/mol (Matulis 2004)) (R3);

ΔH_2 – baltymo hidroksido jono protonizacijos entalpija (R2);

ΔH_0 – jungimosi entalpijos pokytis (R1);

$\Delta H_{buferio}$ – buferinio tirpalo protonizacijos entalpija, kur 25°C temperatūroje ΔH_{TRIS} = -47,45 kJ/mol, o ΔH_{fosf} = -5,10 kJ/mol (Matulis 2004) (R4).

Simuliuojant „tikrąją“ jungimosi bei karboanhidrazės hidroksido jono protonizacijos entalpijas, gauname stebimos baltymo ir ligando jungimosi reakcijos entalpijos priklausomybės nuo pH dviejuose skirtinguose buferiniuose tirpaluose kreives, atitinkančias eksperimentinius duomenis (22 pav.).



22 pav. hCA VII ir TFMSA jungimosi reakcijos $\Delta_{steb}H$ priklausomybės nuo pH grafikas, tris ir fosfatiniame buferiniuose tirpaluose. Taškai atitinka eksperimentinius duomenis. Kreivės atitinka (35) lygtimi aprašytą modelį.

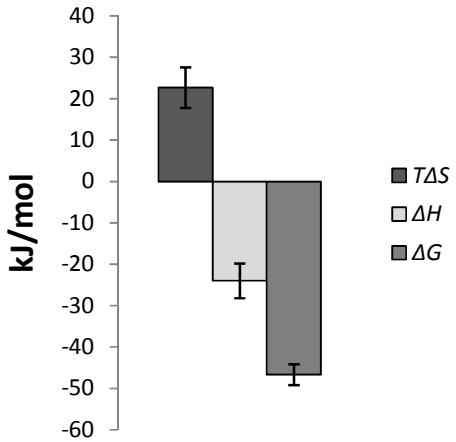
Pagal (35) lygtį apskaičiuotos entalpijos $\Delta H_{hCAVII\text{-}ZnH2O}$ **= ~-33 kJ/mol** ± 4,2 kJ/mol ir ΔH_0 **= ~-24 kJ/mol** ± 4,2 kJ/mol. „Tikrųjų“ reikšmių paklaidomis nurodytos didžiausios

stebimųjų reikšmių Stjudento metodu apskaičiuotos paklaidos. ΔH_0 nepriklauso nuo protonizacijos – deprotonizacijos reakcijų šiluminių efektų ir atitinka išsiskiriančią šilumą, kai vandens molekulė pakeičiama į deprotonizuotą slopiklio molekulę.

Jungimosi gimininguma lemia jungimosi reakcijos ΔG, kuris yra dviejų skirtingų dėmenų suma:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \tag{36}$$

Esant skirtingoms ΔH ir ΔS reikšmėms, apskaičiuota ΔG (arba K_b) gali būti tokia pati, todėl žinant „tikrąją“ K_b bei ΔG (3.3.4. skyrius) ir ką tik apskaičiuotą „tikrąją“ ΔH, naudinga įvertinti entalpijos ir entropijos indėlį jungimosi stiprumui (23 pav.). Norint pasiekti aukštą jungimosi gimininguma, entalpijos ir entropijos pokyčiai turi būti palankūs.



23 pav. Entalpijos (ΔH) ir entropijos ($T\Delta S$) indėlis hCA VII ir TFMSA jungimosi laisvajai Gibso energijai.

Kaip matyti 23 pav., entalpijos ir entropijos pokyčiai palankūs hCA VII ir TFMSA jungimuisi. Tai reiškia, kad vykstant jungimosi reakcijai sąveiką lemia tiek vandenilinių ir van der Waalso ryšių susidarymas, veikiant palankiam entalpiniam pokyčiui, tiek palankus solvatacijos entropijos pokytis, kai išlaisvinamos vandens molekulės. Palanki jungimosi entalpija rodo, kad ligando jungimosi su baltymu metu susidaro stiprios specifiškos sąveikos, o palanki entropija yra pagrindinė jėga susijusi su hidrofobinių grupių jungimosi energija.

Norint tiksliau įvertinti entropijos ir entalpijos indėlį hCA VII ir TFMSA jungimosi laisvajai Gibso energijai, reikia atlikti daugiau matavimų skirtingose temperatūrose, kad būtų gauta šiluminė talpa.

3.4. hCA VII STABILUMO ESANT SKIRTINGOMS pH REIKŠMĖMS ĮVERTINIMAS

Baltymas stabiliausias, kai jo paviršiaus krūvis lygus 0. Baltymo paviršiaus krūvis apskaičiuojamas įvertinant visų aminorūgščių joninių grupių pK_a reikšmes. 4 lentelėje pateiktos hCA VII joninę grupę turinčių aminorūgščių sąrašas, jų kiekis bei pK_a reikšmės.

4 lentelė. hCA VII aminorūgščių, turinčių joninę grupę, sąrašas ir jų pK_a reikšmės.

Aminorūgštis	pK_a	Kiekis
Asp	3,5	14
Glu	4,5	13
His	7	14
Lys	8,1	13
Arg	12,6	13

Iš 4 lentelės matyti, kad žemą pK_a reikšmę turinčių aminorūgščių yra truputį daugiau, dėl to ir manoma, kad baltymo pI ~7, kaip pateikta 1 lentelėje 3.2. skyriuje (teorinis pI = 6,92).

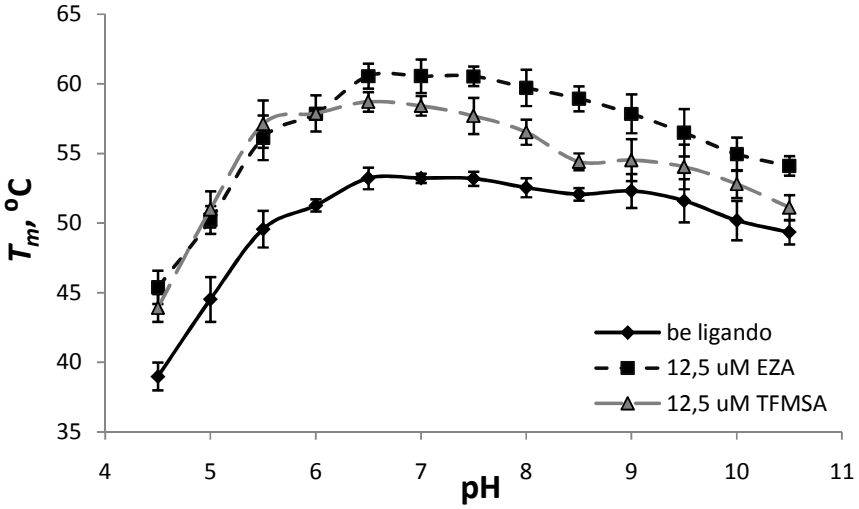
Terminio poslinkio metodu buvo įvertintas hCA VII stabilumas esant skirtingoms pH reikšmėms. Baltymas stabiliausias, kai jo lydymosi temperatūra didžiausia. 5 lentelėje pateiktos baltymo T_m reikšmės esant skirtingiems pH.

5 lentelė. hCA VII lydymosi temperatūros T_m reikšmės esant skirtingiems pH. Paklaidos ± 0,2°C.

pH	T_m	**pH**	T_m
4,5	39	8	52,5
5	44,5	8,5	52,1
5,5	49,6	9	52,2
6	51,3	9,5	51,6
6,5	53,2	10	50,2
7	53,2	10,5	49,3
7,5	53,2		

Kaip matyti 5 lentelėje, hCA VII baltymo lydymosi temperatūra didžiausia, kai tirpalo pH nuo ~6,5 iki ~7,5. Tai reiškia, kad esant pH tarp 6,5 ir 7,5, karboanhidrazė yra stabiliausia, nes jos paviršiaus krūvis lygus 0. Toliau pateikiamas lydymosi temperatūros T_m priklausomybės

nuo pH grafikas (24 paveikslas). Kaip matyti iš grafiko, mažose pH reikšmėse T_m esant skirtingiems ligandas beveik nesiskiria, o prie didelių pH – skiriasi dvigubai. Taip yra dėl skirtingų ligandų pKa reikšmių. Palyginus 21 paveiksle pavaizduotus ΔG priklausomybės nuo pH grafikus, pastebima, kad karboanhidrazės VII jungimosi su TFMSA ir EZA ΔG reikšmės mažose pH iš tikrųjų panašios.



24 pav. hCA VII temperatūrinio stabilumo priklausomybės nuo pH grafikas.

Pagal grafiką (24 pav.) galime spręsti, kad esant pH 4, baltymas nėra stabilus 37°C temperatūroje, nes tokiame pH paviršiaus krūvis yra per didelis (~ +20) ir neleidžia baltymui įgauti natyvios konformacijos. Daroma prielaida, kad baltymas nebus stabilus 37°C temperatūroje tokiame pH, kuriame paviršiaus krūvis yra ~ -20. Atsižvelgus į hCA VII aminorūgščių jonines grupes ir jų pK_a reikšmes, esant pH > 12,5 baltymo paviršius turės ~ -20 krūvį. Dėl duomenų trūkumo negalima tiksliai pasakyti, kokioje pH reikšmėje, kai pH > pI, baltymas nebus stabilus 37°C temperatūroje.

4. IŠVADOS

1. Sukonstruotos dvi plazmidės, skirtos hCA VII baltymo ekspresijai. Vienos iš jų genų transliacijos produktai atitinka žmogaus karboanhidrazės VII Uniprot/Swissprot duomenų bazėje pateiktą seką nuo 3 iki 264 aminorūgšties, o kita plazmidė ekspresuoja baltymus, visiškai atitinkančios žmogaus karboanhidrazės VII seką.
2. Parinktos tinkamiausios sąlygos baltymų ekspresijai, kai genų transliacijos produktai aktyvūs: 0,5 mM $ZnSO_4$, 1 mM IPTG ir auginama 4 val. 30°C.
3. Išgrynintas aktyvus rekombinantinis žmogaus karboanhidrazės VII baltymas, visiškai atitinkantis duomenų bazėje pateiktą seką. Baltymas, turintis pradžioje papildomas penkias aminorūgštis, nebuvo aktyvus.
4. Izoterminiu titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodais išmatuotas žmogaus karboanhidrazės VII jungimasis su etokzolamidu ir trifluormetansulfonamidu, apskaičiuoti „tikrieji“ laisvosios Gibso energijos pokyčiai (baltymo jungimosi su TFMSA ΔG = ~ -47,67 kJ/mol ir jungimosi su EZA ΔG = ~ -58,08 kJ/mol) bei nustatyta baltymo pK_a reikšmė (pK_a = 7,1).
5. Izoterminiu titravimo kalorimetrijos metodu atlikus eksperimentus skirtinguose TRIS ir fosfatiniame buferiniuose tirpaluose 25°C temperatūroje apskaičiuotas žmogaus karboanhidrazės VII aktyviajame centre esančio hidroksido jono, koordinuoto cinko jonu, protonizacijos entalpijos pokytis -33 kJ/mol bei apskaičiuotas baltymo jungimosi su TFMSA entalpijos pokytis -24 kJ/mol.
6. Terminio poslinkio metodu įvertintas žmogaus karboanhidrazės VII terminis stabilumas esant skirtingoms pH. Nustatyta, kad karboanhidrazė stabiliausia, kai pH tarp 6,5 ir 7,5, nes tokiame pH jos paviršiaus krūvis lygus 0.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1997. Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
2. Baranauskienė L, Petrikaitė V, Matulienė J, Matulis D. 2009. Titration Calorimetry Standarts and the Precision of Isothermal Titration Calorimetry Data. International Juornal of Molecular Sciences. 10, 2752-2762; doi:10.3390/ijms10062752.
3. Campoy AV, Freire E. 2005. ITC in the post-genomic era...?Priceless. Biophysical Chemistry. 115, 115-124; doi:10.1016/j.bpc.2004.12.015.
4. Certificate of Analysis. Klenow Fragment [Interaktyvus] [Žiūrėta 2010 m. gegužes 9 d.]. Prieiga per internetą: http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/coa_pdf/coa_ep0051.pdf.
5. Cimmperman P, Baranauskienė L, Jachimovičiūtė S, Jachno J, Torresan J, Michailovienė V, Matulienė J, Sereikaitė J, Bumelis V, Matulis D. 2008. A Quantitative Model of Thermal Stabilization and Destabilization of Proteins by Ligands. Biophysical Journal. Vol. 95, 3222-3231.
6. Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT. 2000. Current protocols in protein science. John Wiley & Sons, New York.
7. ExPASy ProtParam tool for computation of various physical and chemical parameters for a given protein [Interaktyvus] [Žiūrėta 2009 m. gruodžio 14 d.]. Prieiga per internetą: http://expasy.org/tools/protparam.html.
8. Fisher Z, Prada JAH, Tu C, Duda D, Yoshioka C, An H, Govindasamy L, Silverman DN, McKenna R. 2005. Structural and Kinetic Characterization of Active-Site Histidine as a Proton Shuttle in Catalysis by Human Carbonic Anhydrase II. Biochemistry 44, 1097-1105.
9. Halmi P, Parkkila S, Honkaniemi J. Expression of carbonic anhydrases II, IV, VII, VIII and XII in rat brain after kainic acid induced status epilepticus. 2006. Neurochemistry International. 48, 24-30.
10. Hewett-Emmett D, Tashian RE. 1996. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. Mol. Phylogenet. Evol. 5, 50-77.
11. Jelesarov I, Bosshard HR. 1999. Review: Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. Journal of Molecular Recognition. 12, 3-18.

12. Kimber MS, Pai EF. 2000. The active site architecture of *Pisum sativum* β-carbonic anhydrase is a mirror image of that of α-carbonic anhydrases. The EMBO Journal. Vol. 19, No. 7, 1407-1418.
13. Krishnamurthy VM, Kaufman GK, Urbach AR, Gitlin I, Gudiksen KL, Weibel DB, Whitesides GM. 2008. Carbonic Anhydrase as a Model for Biophysical and Physical-Organic Studies of Proteins and Protein-Ligand Binding. Chem. Rev. 108, 946-1051.
14. Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.
15. Lakkis MM, O'Shea KS, Tashian RE. 1997. Differential Expression of the Carbonic Anhydrase Genes for CA VII (Car7) and CA-RP VIII (Car8) in Mouse Brain. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. Vol. 45 (5), 657-662.
16. Lane TW, Morel FMM. 2000. Regulation of Carbonic Anhydrase Expression By Zinc, Cobalt, and Carbon Dioxide in the Marine Diatom *Thalassiosira weissflogii*. Plant Physiology. Vol. 123, 345-352.
17. Lopez M, Bornaghi LF, Innocenti A, Vullo D, Charman SA, Supuran CT, Poulsen S-A. 2010. Sulfonamide Linked Neoglycoconjugates – A New Class of Inhibitors for Cancer-Associated Carbonic Anhydrases. Journal of Medicinal Chemistry. 53, 2913-2926, doi:10.1021/jm901888x.
18. Maren TH, Conroy CW. 1993. A New Class of Carbonic Anhydrase Inhibitor. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 268, No. 35, 26233-26239.
19. Matulis D, Kranz JK, Salemme FR, Todd MJ. 2005. Thermodynamics Stability of Carbonic Anhydrase: Measurement of Binding Affinity and Stoichiometry Using ThermoFluor. Biochemistry. 44, 5258-5266.
20. Matulis D, Lovrien R. 1998. 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate Anion-Protein Binding Depends Primarily on Ion Pair Formation. Biophysical Journal. Vol. 74, 422-429.
21. Matulis D, Todd MJ. 2004. Thermodynamics – Structure Correlations of Sulfonamide Binding to Carbonic Anhydrase. Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences, edited by Ladbury JE, Doyle ML. John Wiley & Sons, Chichester. 107-132.
22. Matulis D. 2008. Baltymų fizikinė chemija. Technologija, Kaunas. ISBN 978-9955-25-428-7.
23. Mištinaitė L. 2006. Karboanhidrazių – sulfonamidinių slopiklių sąveikos termodinaminio mechanizmo tyrimas izoterminiu titravimo kalorimetrijos metodu. Magistrinis darbas. VU. p.60.

24. Morel FMM, Cox EH, Kraepiel AML, Lane TW, Milligan AJ, Schaperdoth I, Reinfelder JR, Tortell PD. 2002. Acquisition of inorganic carbon by the marine diatom Thalassiosira weissflogii. Funct. Plant. Biol. 29, 301-308.
25. Pastorekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran CT. 2004. Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. Vol. 19 (3), 199-229.
26. Perozzo R, Folkers G, Scapozza L. 2004. Review: Thermodynamics of Protein-Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects. Journal of Receptors and Signal Transduction. Vol. 24, No. 1 & 2, 1-52.
27. *Pfu* DNA Polymerase [Interaktyvus] [Žiūrėta 2010 m. gegužes 11 d.]. Prieiga per internetą: http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/coa_pdf/coa_ep0501.pdf.
28. Potter C, Harris AL. 2004. Hypoxia Inducible Carbonic Anhydrase IX, Marker of Tumour Hypoxia, Survival Pathway and Therapy Target. Cell Cycle. 3, 164-167.
29. Ruusuvuori E, Li H, Huttu K, Palva JM, Smirnov S, Rivera C, Kaila K, Voipio J. 2004. Carbonic Anhydrase Isoform VII Acts as a Molecular Switch in the Development of Synchronous Gamma-Frequency Firing of Hippocampal CA1 Pyramidal Cells. The Journal of Neuroscience. 24(11), 2699-2707.
30. Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. ISBN 0-87969-577-3.
31. SCORPIO – Structure-Calorimetry of Reported Protein Interactions [Interaktyvus] [Žiūrėta 2010 m. gegužes 15 d.]. Prieiga per internetą: http://scorpio.biophysics.ismb.lon.ac.uk/scorpio.html.
32. Simone GD, Fiore AD, Supuran CT. 2008. Are Carbonic Anhydrase Inhibitors Suitable for Obtaining Antiobesity Drugs? Current Pharmaceutical Design. Vol. 14, No. 7, 655-660.
33. So AK-C, Espie GS, Williams EB, Shively JM, Heinhorst S, Cannon GC. 2004. A Novel Evolutionary Lineage of Carbonic Anhydrase (ε Class) Is a Component of the Carboxysome Shell. Journal of Bacteriology. Vol. 186, No. 3, 623-630; doi:10.1128/JB.186.3.623-630.2004.
34. Supuran CT, Scozzafava A, Casini A. 2003. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Medicinal Research Reviews. Vol. 23, No. 2, 146-189.
35. Supuran CT, Scozzafava A. 2007. Review: Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 15, 4336-50, doi:10.1016/j.bmc.2007.04,020

36. Supuran CT. Carbonic Anhydrases – An Overview. 2008. Current Pharmaceutical Design. Vol. 14, No. 7, 603-614.
37. Supuran CT. Carbonic Anhydrases as Drug Targets – An Overview. 2007. Current Topics in Medicinal Chemistry. 7, 825-833.
38. Temperini C, Scozzafava A, Supuran CT. 2008. Carbonic Anhydrase Activation and the Drug Design. Current Pharmaceutical Design. Vol. 14, No. 7, 708-715.
39. Thiry A, Supuran CT, Masereel B, Dogne J-M. 2008. Recent Developments of Carbonic Anhydrase Inhibitors as Potential Anticancer Drugs. Journal of Medicinal Chemistry. Published on Web, doi:10.1021/jm701526d.
40. Tu Z, He G, Li KX, Chen MJ, Chang J *et al.*. 2005. An Improved System for Competent Cell Preparation and High Efficiency Plasmid Transformation Using Different *Escherichia coli* Strains. Electronic Journal of Biotechnology. No. 8, 114-120. ISBN 0717-3458.
41. UniProtKB/Swiss-Prot – protein knowlwdgebase, which is manually annotated and reviewed [Interaktyvus] [Žiūrėta 2010 m. vasario 25 d.]. Prieiga per internetą: http://www.uniprot.org/uniprot/P43166.
42. Zubrienė A, Matulienė J, Baranauskienė L, Jachno J, Torresan J, Michailovienė V, Cimmperman P, Matulis D. 2009. Measurement of Nanomolar Dissociation Constants by Titration Calorimetry and Thermal Shift Assay – Radicicol Binding to Hsp90 and Ethoxzolamide Binding to CA II. International Juornal of Molecular Sciences. 10, 2662-2680, doi:10.3390/ijms10062662.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju dr. Daumantui Matuliui už galimybę atlikti baigiamąjį magistro darbą Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje, už suteiktas žinias, naudingus patarimus ir pastabas. Taip pat dėkoju j. m. d. Vilmai Michailovienei, doktorantui Romanui Chaleckiui bei kitiems Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijos darbuotojams už pagalbą, patarimus bei draugišką atmosferą.