

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Keemia Instituut
Bioorgaanilise keemia õppetool

Mikk Teelahk

**RHO-SÕLTUVALE PROTEIINKINAASILE SUUNATUD
FLUORESTSENTSSONDIDE SÜNTEES JA BIOKEEMILINE
ISELOOMUSTAMINE**

Bakalaureusetöö (12 EAP)
Keemia õppekava (180 EAP)

Juhendajad: Katrin Kestav, *MSc*
Darja Lavõgina, *PhD*

Tartu 2017

SISUKORD

SISUKORD	2
LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Proteiinkinaasid	7
1.2 ROCK	7
1.3 PKA	9
1.4 Inhibiitorid	10
1.4.1 Ensüüminhibiitorite üldine kirjeldus	10
1.4.2 Proteiinkinaaside inhibiitoritest	10
1.4.2.1 Bisubstraatsete inhibiitorite üldine kirjeldus	11
1.4.2.1.1 ARC-tüüpi inhibiitorid	11
2. REAGENTIDE, APARATUURI JA MEETODITE KIRJELDUS	13
2.1 Kasutatud reagentid ja aparatuur	13
2.1.1 Reagentid	13
2.1.2 Aparatuur	13
2.2 Meetodid	14
2.2.1 Vedelik-kromatograafia	14
2.2.2 Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhinev meetod	14
2.2.3 Fotoluminestsentsi intensiivsuse mõõtmisel põhinev meetod	15
3. EKSPERIMENTAALNE OSA	17
3.1 TAMRA fluorestsentsvärvi lisamine	17
3.2 Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhinev sidumismeetod	17
3.3 Fotoluminestsentsi intensiivsuse mõõtmisel põhinev väljatõrjumismeetod	18
4. TULEMUSTE ARUTELU	19
4.1 Süntees	19
4.2 Biokeemiline iseloomustamine	19
KOKKUVÕTE	24
SUMMARY	25

KASUTATUD KIRJANDUS.....	27
INFOLEHT	29
LISAD	30
TÄNUAVALDUSED.....	35
LIHTLITSENTS.....	36

LÜHENDID

lühend	eestikeelne vaste	inglisekeelne vaste
ACN	atsetonitriil	<i>acetonitrile</i>
Adc	adenosiin-5'-karboksüülhape	<i>adenosine 5'-carboxylic acid</i>
ADP	adenosiin-5'-difosfaat	<i>adenosine 5'-diphosphate</i>
ARC	adenosiini ja oligoarginiini konjugaat	<i>adenosine and oligoarginine conjugate</i>
Arom8	3-(püridiin-4-üül)bensoehappe jääk	<i>3-(pyridin-4-yl) benzoic acid moiety</i>
ATP	adenosiin-5'-trifosfaat	<i>adenosine 5'-triphosphate</i>
BSA	veise seerumi albumiin	<i>bovine serum albumin</i>
cAMP	tsükliline adenosiin-3',5'-monofosfaat	<i>cyclic adenosine 3',5'-monophosphate</i>
DMSO	dimetüülsulfoksiid	<i>dimethylsulfoxide</i>
DTT	ditiotreitol	<i>dithiothreitol</i>
ESI-MS	elektropihustus-ionisatsiooni massispektromeetria	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
FA	fluorestsentsi anisotroopia	<i>fluorescence anisotropy</i>
Fasudil	5-(1,4-diasepaan-1-sulfonüül)isokinoliin	<i>5-(1,4-diazepane-1-sulfonyl) isoquinoline</i>
GDP	guanosiin-5'-difosfaat	<i>guanosine 5'-diphosphate</i>
GTP	guanosiin-5'-trifosfaat	<i>guanosine 5'-triphosphate</i>
HEPES	4-(2-hüdroksüületüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HPLC	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia	<i>high-performance liquid chromatography</i>
LUM	luminestsentsi intensiivsus	<i>luminescence intensity</i>
MLC	müosiini kerge ahel	<i>myosin light chain</i>
NHS	suktsiinimidüülester	<i>succinimidyl ester</i>
PK	proteiinkinaas	<i>protein kinase</i>
PKA	cAMP-sõltuv proteiinkinaas ehk proteiinkinaas A	<i>cAMP-dependent protein kinase (protein kinase A)</i>
PKAc	cAMP-sõltuva proteiinkinaasi	<i>cAMP-dependent protein kinase</i>

	katalüütiline alaühik	<i>catalytic subunit</i>
PKAr	cAMP-sõltuva proteiinkinaasi reguloorne alaühik	<i>cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit</i>
PKG	cGMP-sõltuv proteiinkinaas ehk proteiinkinaas G	<i>cGMP-dependent protein kinase (protein kinase G)</i>
ROCK	Rho-sõltuv proteiinkinaas	<i>Rho-associated protein kinase</i>
ROCK1	Rho-sõltuva proteiinkinaasi isovorm 1	<i>Rho-associated protein kinase isoform 1</i>
ROCK2	Rho-sõltuva proteiinkinaasi isovorm 2	<i>Rho-associated protein kinase isoform 2</i>
TAMRA	5-karboksütetrametüülrodamiin	<i>5-carboxytetramethylrhodamine</i>
TEA	trietüülamiin	<i>triethylamine</i>
TFA	trifluoroetaanhape	<i>trifluoroacetic acid</i>
UV-Vis	ultravioletse ja nähtava ala spektroskoopia	<i>ultraviolet-visible spectroscopy</i>

SISSEJUHATUS

Fosforüülimine on reaktsioon, mille käigus toimub fosforüülrühma ülekanne doonorilt (tüüpiliselt ATP) aktseptorile (valgumolekulis sisalduva aminohappe Ser, Thr või Tyr jäägi hüdroksüülrühmale). Elusrakus toimuva valguga fosforüülimise eelduseks on ensüümide proteiinkinaaside olemasolu, mis aitavad fosforüülrühmal liituda valguga. Valguga fosforüülimise käigus toimub valguga konformatsiooni muutus, mis omakorda mõjutab valguga paiknemist rakus, seostumisvõimet teiste biomolekulidega ning valguga aktiivsust.

Proteiinkinaaside poolt vahendatud fosforüülimine reguleerib paljusid raku eluks olulisi funktsioone ning seetõttu on proteiinkinaaside aktiivsuse muutus seotud mitmete erinevate ja raskete haigustega, näiteks vähkkasvajad, diabeet, südame- ja veresoonehaigused ning Alzheimeri tõbi. Sellest tulenevalt tegelevad nii farmaatsiatööstus kui ka akadeemilised uurimisrühmad pingsalt, et arendada proteiinkinaasi inhibiitoreid, mis võimaldaksid reguleerida kinaaside aktiivsust rakus ning uurida proteiinkinaaside poolt reguleeritud signaaliradasid. Üheks huvipakkuvaks proteiinkinaasiks on Rho-sõltuv kinaas ehk ROCK, mis vastutab raku kuju muutumise eest vastusena füsioloogilistele signaalidele ning on seepärast oluline näiteks silelihaste töö tagamiseks.

Tartu Ülikooli meditsiinilise keemia uurimisrühm tegeleb bisubstraatsete inhibiitorite arendamisega. Antud inhibiitorid on adensiini analoogi ja oligoarginiini konjugaadid ehk ARC-d. Nende ühendite eelisteks teiste proteiinkinaasidele suunatud inhibiitorite ees on võime luua rohkem interaktsioone sihtmärk-ensüümiga, mistõttu eduka arenduse korral on võimalik saavutada ARC-de parem afiinsus ehk seondumisvõime ja selektiivsus, võrreldes inhibiitori molekulis sisalduvate üksikute fragmentidega. ARC-tüüpi inhibiitoreid on võimalik derivatiseerida, ühendades nendega näiteks fluorestsentsvärvi. Sel viisil saadakse fluorestsentssondid, mille abil on võimalik efektiivselt määrata huvipakkuva kinaasi hulka ja/või asukohta teatud biokeemilises proovis või elusrakus.

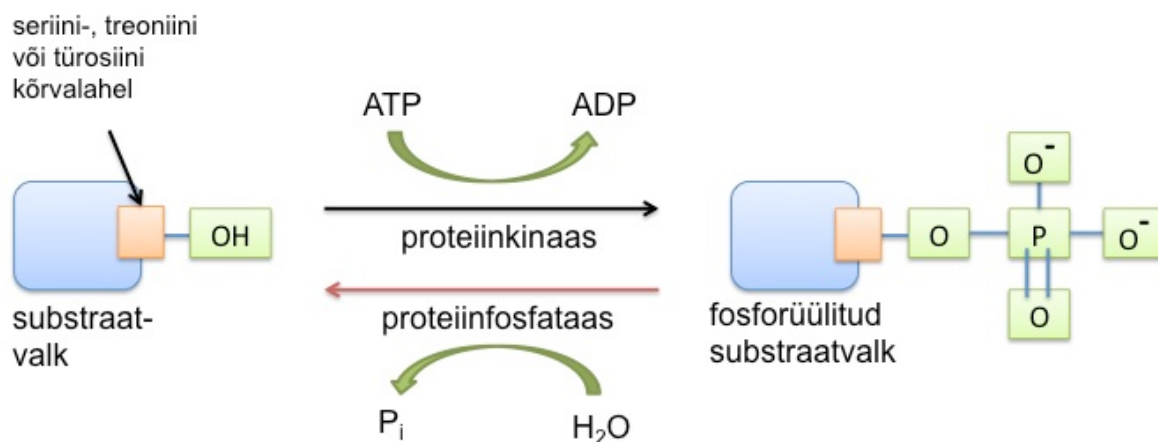
Käesoleva töö eesmärgiks on Rho-sõltuvale proteiinkinaasile suunatud selektiivsete ARC-tüüpi fluorestsentssondide arendamine ja biokeemiline iseloomustamine.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid (PK) on ensüümid, mis katalüüsivad fosforüülimist ehk reaktsiooni, mille käigus kantakse γ -fosforüülrühm üle doonormolekulilt (ATP) aktseptormolekulile, st valksubstraadi Ser/Thr/Tyr jäägi hüdroksüülrühmale. Fosforüülimise tulemusel substraatvalgud kaasatakse või lülitatakse välja rakule eluolulistest signaaliradadest. [1–3] Praeguseks on näidatud, et inimese PK geenipere koosneb 538 erinevast PK-st, mida kodeerib umbes 2% kõikidest geenidest [2]. Fosforüülimine on pöörduv. Fosforüülrühma eemaldamist ehk defosforüülimist viivad läbi ensüümid fosfataasid (Joonis 1).

Substraatvalgu aktiivsuse muutus fosforüülimise järel tuleneb negatiivselt laetud fosforüülrühma (PO_3^{2-}) liitumisest, mis muudab valgu lokaalset laengujaotust [1,2]. Ebanormaalselt suurenenud valkude fosforüülimise tase võib olla erinevate haiguste põhjuseks või tagajärjeks, nt vähkkasvajad, diabeet, HIV, Alzheimeri tõbi [3,4]. Sellest tulenevalt on PK-dest on saanud teine tähtis sihtmärk ravimite arendamisel G-valguga seotud retseptorite kõrval [3–5].



Joonis 1. Proteiinkinaaside poolt katalüüsitud valkude fosforüülimise üldskeem. Fosforüülrühm ($-\text{PO}_3^{2-}$) kantakse üle ATP-lt valksubstraadi aminohappejäägi hüdroksüülrühmale ($-\text{OH}$).

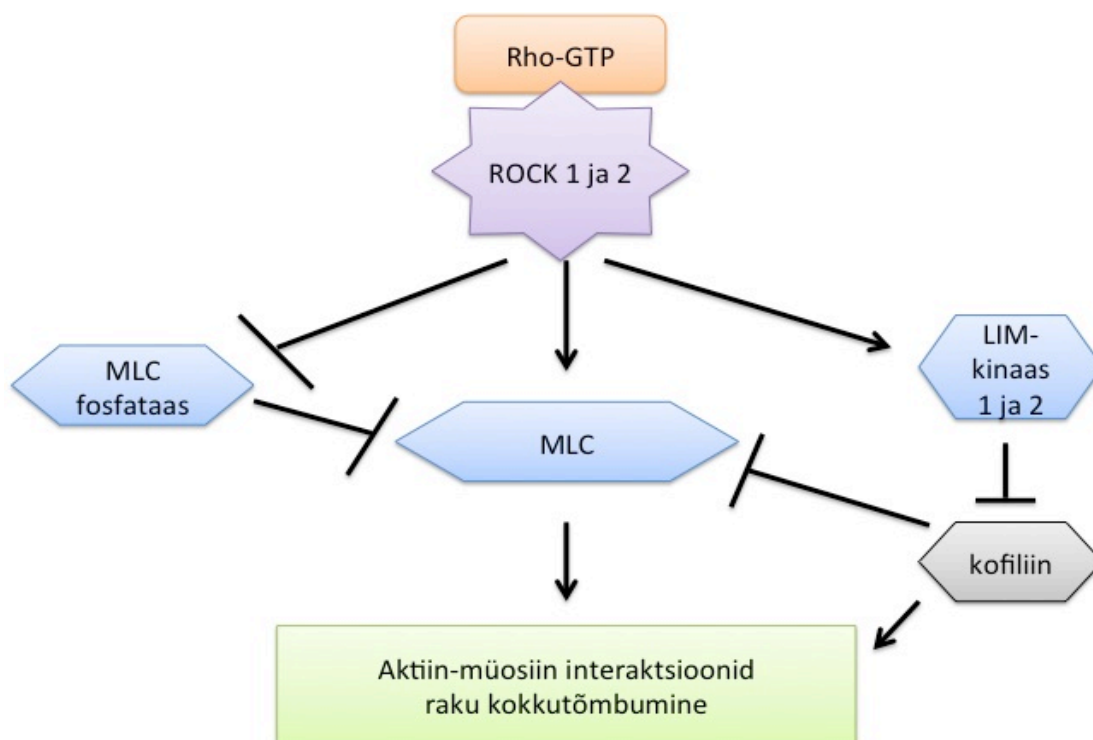
1.2 ROCK

Rho-sõltuv proteiinkinaas ehk ROCK kuulub Ser/Thr-kinaaside perekonda. ROCK-i aktiveerivad Rho perekonna väikesed GTPaasid, nt RhoA. RhoA seotuna GDP-ga on mitteaktiivne, kuid GTP-ga seostudes muutub aktiivseks Rho-GTP vormiks ning saab siis ROCKi aktiveerida. Aktiveerimine toimub raku plasmamembraani siseküljel ning selle

käigus leeveneb aktiveerumata ROCKile omane katalüütilise osa blokeerunud seisund (st aktiveerumata ROCKis katab valgumolekuli üks osa katalüütiliselt olulist ensüümiosa).

ROCK-il on kaks isovormi: ROCK1 (ROCK β) ja ROCK2 (ROCK α) [6]. Nendel on 65%-line aminohappelise järjestuse sarnasus, kusjuures katalüütiline kinaasidomään on sarnane 87% ulatuses. Seega eeldatakse, et osalisest erinevustest sõltumata on kahel isovormil rakus siiski sarnased funktsioonid [6].

ROCK-i signaalirajad soodustavad aktiin-müosiin interaktsioonide toimumist fosforüüldes mitmeid substraatvalke ning selle tulemusel võib toimuda raku kokkutõmbumine [5]. ROCK fosforüülib ja aktiveerib LIM-kinaasi, mis omakorda deaktiveerib valku kofiliini. Aktiivne kofiliin depolümeeriseerib aktiinifilamente¹; seega tingib ROCK-i aktiivsuse tõus kokkuvõttes raku kokkutõmbumist ehk kontraktsiooni [6]. Lisaks on ROCK-i olulised substraadid müosiini kerge ahel (MLC) ning müosiini kerge ahela fosfataas (MLCP). Kui ROCK fosforüülib MLC-d, muutub viimane aktiivseks ning jällegi soodustatakse raku kontraktsiooni (Joonis 2) [5,6]. MLCP tegevus tagab aga raku lõõgastumise; fosforüülimine ROCK-i poolt muudab MLCP-d mitteaktiivseks, mis samuti põhjustab raku kokkutõmbumise.



Joonis 2. Rho-kinaasi signaaliradade mõju tsütoskeleti regulatsioonile. Tähistus: tavaline nool – fosforüülimise tagajärjel muutub substraat aktiivseks; pärssiv nool – fosforüülimise tagajärjel muutub substraat mitteaktiivseks.

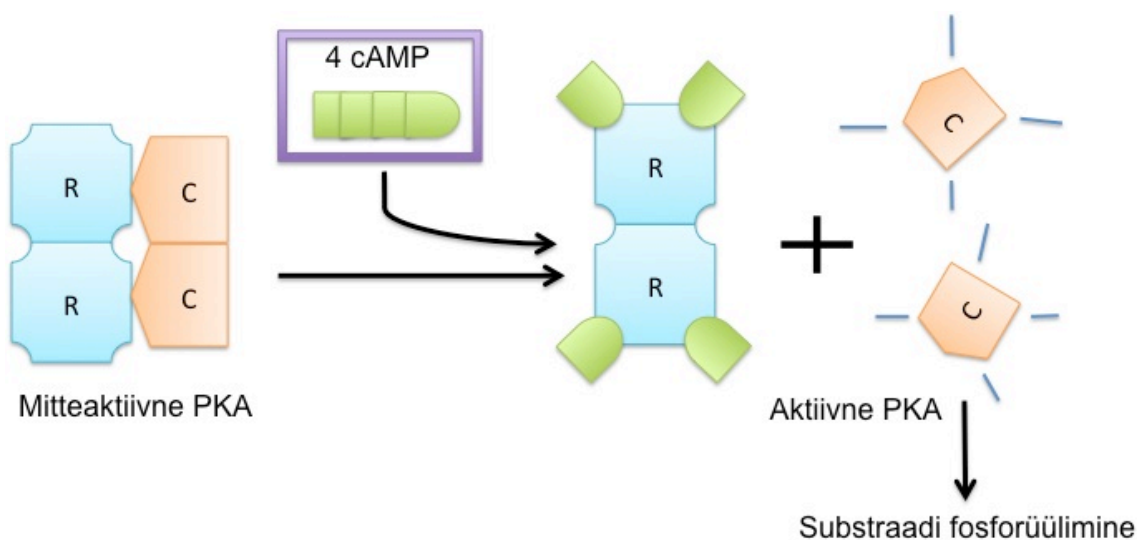
¹ Aktiinifilamendid on 6 – 7 nm suuruse läbimõõduga kiud, mis on raku tsütoskeleti osaks.

1.3 PKA

Käesolevas töös kasutati ühendite selektiivsuse iseloomustamiseks (vt allpool) võrdluskinaasina cAMP-sõltuvat proteiinkinaasi ehk PKA-d.

Tsükliline AMP (cAMP) on rakusisene sekundaarne signaalikandja ning cAMP-i kontsentratsiooni muutus rakus võib mõjutada väga erinevaid rakulisi protsesse. cAMP-i väga suur mõju raku elutegevusele on sageli seotud PK aktiveerimisega, milleks on proteiinkinaas A ehk cAMP-sõltuv proteiinkinaas (PKA). Mitteamaktiivses olekus koosneb PKA kahest katalüütilisest (PKAc) ja kahest reguleerivast alaühikust (PKAr; moodustavad dimeeri). 4 cAMP-i molekuli seostumisel reguleerivate alaühikute dimeerile toimub katalüütiliste alaühikute dissotsieerumine kompleksist ning katalüütilised alaühikud saavad seejärel fosforüülda oma substraate (Joonis 3). Kui ensüüm fosfodiesteras hüdrolüüsib cAMP-i AMP-ks, siis PKA aktiivsus rakus ajapikku kaob ning taastub esialgne olukord.

PKA kuulub AGC-kinaaside rühma ning on basofiilne PK nagu mitmed teised AGC rühma kinaasid (nt cGMP-sõltuv proteiinkinaas ehk proteiinkinaas G või siis eespool vaadeldud ROCK). PK basofiilsus tähendab seda, et selle poolt fosforüülitavas substraatvalgus on fosforüülitava Ser/Thr jäägi läheduses positiivselt laetud aminohappejäägid (Arg või Lys) [1].



Joonis 3. PKA aktiveerimine cAMP-i seostumisel. Mitteamaktiivses olekus on PKA neljast alaühikust koosnev kompleks, kus on kaks katalüütilist alaühikut (joonisel tähistatud siniste kujunditena ja märkega R) ja kaks reguleerivat alaühikut (joonisel tähistatud oranžide kujunditena ja märkega C). PKA aktiveerimiseks on vajalik 4 cAMP-i molekuli (joonisel rohelised kujundid) seostumine kinaasi reguleerivatele alaühikutele.

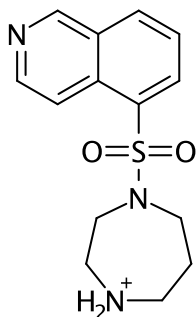
1.4 Inhibiitorid

1.4.1 Ensüüminhibiitorite üldine kirjeldus

Ensüümide inhibiitorid on ühendid, mis seonduvad ensüümiga ning seeläbi blokeerivad või vähendavad viimaste katalüütilist aktiivsust. Looduslikud ensüüminhibiitorid on bioloogiliste süsteemide regulatsioonimehhanismide oluliseks osaks; tänapäeval on aga arendatud mitmeid sünteetilisi inhibiitoreid, mida saab samuti kasutada looduslikes süsteemides ensüümide mõjutamiseks. Inhibiitorite seostumise mehhanism võib olla pöörduv, kui inhibiitor seostub sihtmärgile mittekovalentsete interaktsioonide kaudu ning dissotsieerumine on seega võimalik, või pöördumatu, kui inhibiitori ja sihtmärgi vahel moodustub kovalentne side ning inhibiitori dissotsieerumine ei ole enam võimalik.

1.4.2 Proteiinkinaaside inhibiitoritest

Viimase kahe kümnendi jooksul on proteiinkinaaside inhibiitoritest saanud ühed tähtsamad biotehnoloogia ja farmaatsiatööstuse sihtmärgid [1]. PK-de inhibiitorid pole tähtsad ainult raviks erinevatele haigustele, vaid aitavad tundma õppida erinevate PK-de signaaliradasid ning funktsioone [3]. PK-dele arendatakse eelkõige inhibiitoreid, mis on suunatud ATP-d siduvale taskule (nn ATP-saitsed inhibiitorid). Nendeks on näiteks ATP analoogid adensiin, adensiindifosfaat (ADP) ja adeniin. ATP-saitsete inhibiitorite eeliseks on suhteliselt madal molekulmass, mis tagab rakumembraani läbimise ja pääsemise sihtraku. Siiski vähendab ATP-saitsete inhibiitorite efektiivsust rakusisene ATP kõrge kontsentratsioon (2 – 10 mM) [3], mistõttu ATP-saitsed inhibiitorid peavad olema väga hea afiinsusega, et konkureerida ATP-ga. Antud inhibiitorite suurimaks puuduseks peetakse vähest selektiivsust, kuna ATP-sidumissait on erinevatel kinaasidel sarnane [3]. Siiski on tänaseks näidatud, et ATP-sidumistasku ümber on regioone (nt hüdrofoobsed alad), mis varieeruvad erinevatel kinaasidel ning antud alasid ära kasutades on arendatud väga kõrge selektiivsuse ja afiinsusega ATP-saitseid PK-de inhibiitoreid [7]. Käesolevas töös kasutatakse bisubstraatsete inhibiitorite koosseisus ATP-saitse fragmendina ROCK-selektiivset inhibiitorit Fasudil'i (Joonis 4). Varasemalt on näidatud Fasudil'i head afiinsust ROCK2 suhtes (inhibeerimiskonstandi K_i väärtus 0,33 μM [8,9]).



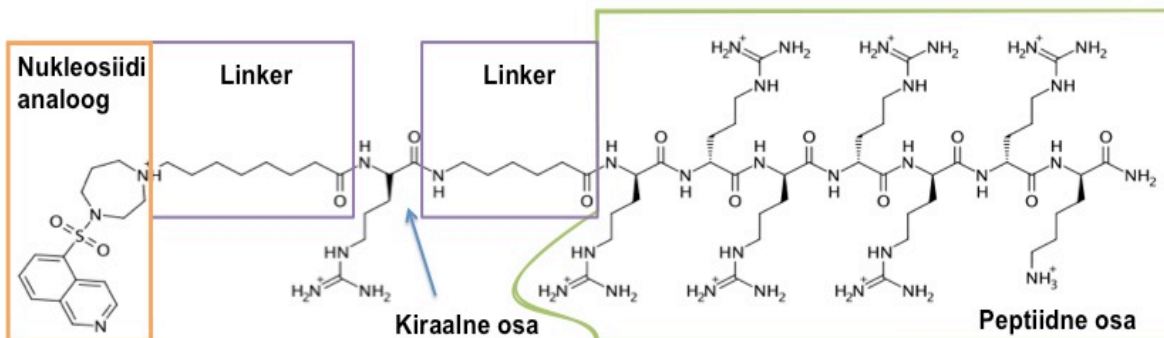
Joonis 4. Fasudil'i struktuur.

1.4.2.1 Bisubstraatsete inhibiitorite üldine kirjeldus

Bisubstraatsed inhibiitorid koosnevad kahest konjugeeritud fragmendist, mis peaksid seostuma ensüümi eri saitidesse. Bisubstraatsed inhibiitorid kategoriseeritakse erinevatesse rühmadesse fragmentide struktuuri alusel. Üheks suurimaks bisubstraatsete inhibiitorite eeliseks ATP- ja substraadi-saitsete inhibiitorite ees peetakse bisubstraatsete inhibiitorite võimet luua rohkem interaktsioone sihtmärk-ensüümiga, millega võib kaasneda nii parem afiinsus kui ka selektiivsus [10].

1.4.2.1.1 ARC-tüüpi inhibiitorid

ARC-tüüpi inhibiitorid koosnevad kahest osast, st adenosini analoogist ja oligoarginiini fragmendist, mis on omavahel ühendatud hüdrofoobse linkeriga. ARC-i seondumisel kinaasile seostub nukleosiidne fragment ATP-sidumistaskusse ja oligoarginiini fragment substraatvalgu sidumissaiti. Lisaks tagab oligoarginiin ühendi hea võime läbida raku plasmamembraani, mistõttu ARC-e saab põhimõtteliselt kasutada kinaaside aktiivsuse reguleerimiseks ja funktsioonide uurimiseks rakkudes. ARC-de afiinsust ja selektiivsust erinevate kinaaside suhtes reguleeritakse varieerides nukleosiidset analoogi, linkerit või linkereid (nt kiraalse elemendi lisamine) ja/või peptiidset osa (nt kasutades oligoarginiini asemel oligoaspartaati) [11,12]. ARC-i üldstruktuur on toodud allpool (Joonis 5) [10,13]. ARC-ide peptiidsetes osas kasutatakse enamasti *D*-aminohappeid, mitte *L*-aminohappeid, sest *D*-aminohapped on stabiilsed proteolüütilisele lagundamisele rakkudes [10].



Joonis 5. ARC-tüüpi inhibiitor ARC-3001 struktuuri näitel. ARC inhibiitor koosneb nukleosiidsest analoogist, linkerist või linkeritest ning peptiidsest osast. Selektiivsuse saavutamiseks on teatud juhtudel linkeri struktuuri lisatud kiraalne element.

2. REAGENTIDE, APARATUURI JA MEETODITE KIRJELDUS

2.1 Kasutatud reagensid ja aparatuur

2.1.1 Reagensid

Käesolevas töös kasutatud solvendid atsetonitriil (ACN) ja dimetüülsulfoksiid (DMSO) pärinesid Sigma Aldrichist ning trietüülamiin (TEA) Flukast. Setareh Biotechist pärines 5-karboksütetrametüülrodamiini suktsiinimidüülester (TAMRA-NHS). ARC-684 oli sünteesitud Erki Enkvist poolt ja ARC-3001 sünteesitud Darja Lavõgina poolt.

ROCK2 (GST-märgistatud rekombinantne inimese valk, katalüütiline domeen, AH 1...553; nominaalne kontsentratsioon 9,7 μM ehk 0,88 mg/ml) pärines firmast Carna Biosciences, Inc. PKAc tüüp α (rekombinantne inimese valk, täisjärjestus; nominaalne kontsentratsioon 4,5 μM) pärines firmast Biaffin GmbH & Co KG.

2.1.2 Aparatuur

Produktid puhastati vedelik-kromatograafiliselt Shimadzu LC Solution (Prominence) HPLC süsteemiga, kasutades Gemini C18 pöördfaasi kolonni (5 μm , 25 cm \times 0,46 cm), manuaalset injektorit ja diiodirea detektorit (SPD M20A). Elueerimine viidi läbi vesi-atsetonitriili gradiendiga (0,1% TFA nii vees kui atsetonitriilis) voolukiirusel 1 ml/min. Puhastatud produktide mass-spektrid mõõdeti positiivsete ionide režiimis, kasutades Shimadzu LCMS-2020 (ESI-MS) detektorit. LISA 2-s on välja toodud valmis produktide puhtused, retentsiooniajad, kromatogrammid ja mass-spektrid. Pärast elueerimist puhastatud produktid külmutati ja lüofiliseeriti.

Ühendite hulga kvantifitseerimiseks ja UV-Vis spektrite mõõtmiseks kasutati NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) spektrofotomeetrit. Ühendite kontsentratsioon määrati, kasutades Lambert-Beer'i seadust ja järgmisi molaarseid ekstinktsioonikoefitsente (ϵ): Fasudil 323 nm juures $\epsilon = 4400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ja püridiini derivaat Arom8 250 nm juures $\epsilon = 16870 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Fluorestsentsi anisotroopia ja luminesstsentsi intensiivsuse mõõtmised teostati PHERAstar mikroplaadi lugejaga (BMG Labtech), kus TAMRA optilisteks mooduliteks FP [ex. 540(20) nm, em. 590(20) nm ja 590(20) nm] ja Alexa647 korral HTRF [ex. 337(50) nm, em. 675(50) nm ja 620(20) nm; viivitusae (*delay time*) 80 μs , signaali kogumisaeg (*acquisition time*) 200 μs]. Proovide valmistamine teostati tumeda mittediduva pinnaga

384-süvendilisel mikroplaadil (Corning, kood 4514). Andmete töötlemiseks ja analüüsimiseks kasutati tarkvara GraphPad Prism versiooni 5.0 (GraphPad Software, Inc) ja Microsoft Excel (2011).

2.2 Meetodid

2.2.1 Vedelik-kromatograafia

Vedelik-kromatograafia on üks kromatograafia alaliikidest, milles viiakse läbi lahutatavate ainete elueerimine sorbendiga täidetud kolonnist orgaaniliste solventide või nende segude abil. Peamised vedelik-kromatograafia meetodid on: jaotus- (normaal- ja pöördfaas), adsorptsioon-, ioonvahetus- ja suuruseralduskromatograafia. Käesolevas töös kasutatakse jaotuskromatograafia pöördfaasi meetodit, kus sorbent (statsionaarne faas²) on mittepolaarne ja eluent (mobiilne faas³) polaarne. Ainete eraldamise efektiivsuse tagamiseks peab kolonn olema väga tihedalt täidetud statsionaarse faasiga. Seetõttu kasutatakse vedelik-kromatograafias kõrget rõhku, et eluent läbi kolonni suruda. Kõrgefektiivne vedelik-kromatograafia (HPLC) meetodit kasutades pole põhimõtteliselt analüüdi omadustele erilisi piire. Levinumad detektorid vedelik-kromatograafias on UV-Vis spektrofotomeetiline, fluorestsents-, elektrokeemiline või massispektromeetiline detektor.

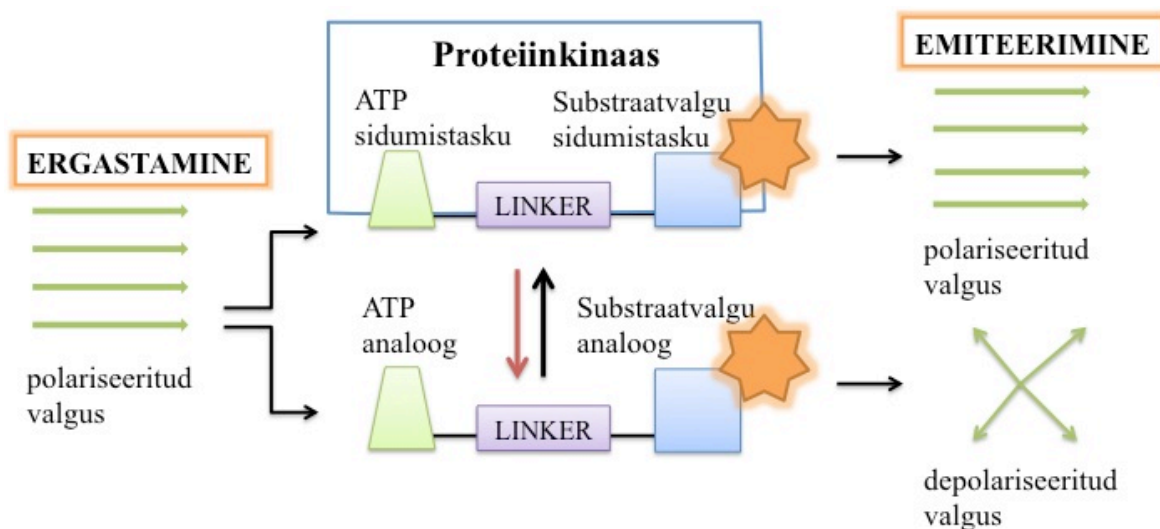
2.2.2 Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhinev meetod

Fluorestsents on valguse kiirgamine ainest, mis ergastatakse, kasutades UV-kiirgust või nähtavat valgust. Ergastamiseks peab molekul neelama ergastavat kiirgust, mille tulemusel molekul liigub kõrgemale energiatasemele. Seejärel toimub molekuli relakseerumine tagasi algsele energiatasemele, mille käigus emiteerub foton (valgusosake) pikemal lainepikkusel kui toimus ergastamine (madalama energiaga) fluorestsentskiirgusena. Fluorestsentsi anisotroopia (FA) mõõtmisel põhineva sidumis- või väljatõrjumismeetodi käigus kiiritatakse fluorestsentssondi sisaldavat lahust polariseeritud valgusega ning seejärel mõõdetakse emiteeritud kiirguse polarisatsiooni muutust (anisotroopiat). Kui fluorestsentssond seostub suurema molekuliga (nt PK), on sondi vaba pöörlemine fluorestsentsi emiteerimise jooksul takistatud ja lahuse polarisatsiooni määr suureneb. Kui

² Statsionaarne faas – kolonnis paiknev aine, kuhu kolonnist läbivad molekulid absorbeeruvad või mille küljest desorbeeruvad vastavalt statsionaarse faasi ja kõnealuste molekulide polaarsuse sarnasustele.

³ Mobiilne faas – vedelik, mis kolonnis voolates aineid edasi kannab.

fluorestsentssond on vabalt lahuses (nt mittefluorestseeruva ühendi poolt välja tõrjutud sond kompleksist PK-ga), on emiteeritud kiirguse polarisatsiooni määr väike, kuna sondil on võimalik lahuses vabalt roteeruda (Joonis 6). Fluorestsentsvärviga märgistatud PK inhibiitorite afiinsust (K_D väärtust) ja aktiivse ensüümi hulka iseloomustatakse FA sidumismeetodi abil, kus mõõdetakse inhibiitorite seostumist PK-le. Mittefluorestseeruvate ühendite afiinsust (K_d väärtus) määratakse FA väljatõrjumismeetodi abil.



Joonis 6. Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhineva sidumis- ja väljatõrjumismeetodi üldskeem. Skeemi kesksena on välja toodud ARC-inhibiitorist fluorestsentssond, mis koosneb nukleosiidsest analoogist (roheline), linkerist (lilla), peptiidsest osast (sinine) ning fluorofoorist (fluorestsentsvärv) (oranž). Fluorestsentssondi lahust kiiritatakse polariseeritud valgusega ja seejärel mõõdetakse emiteeritud kiirguse polarisatsiooni määra.

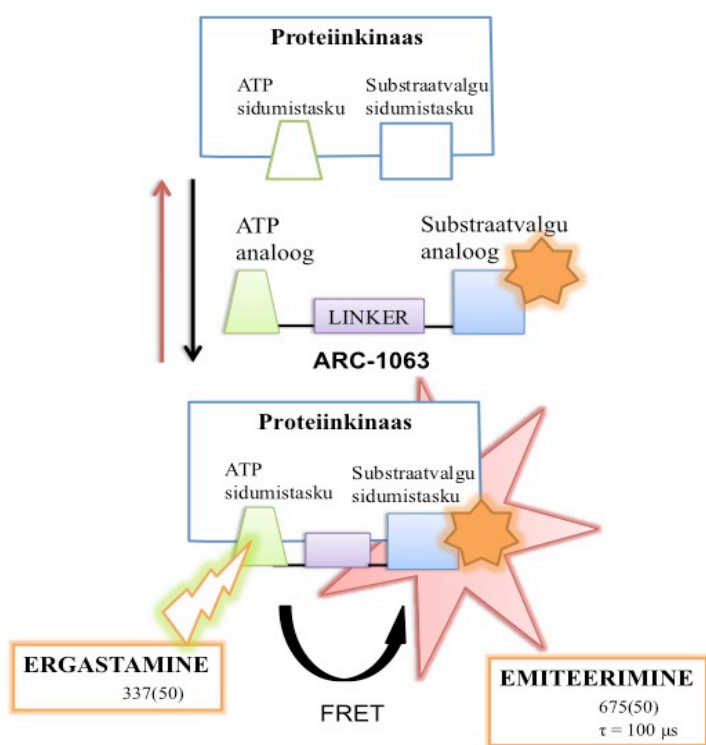
2.2.3 Fotoluminestsentsi intensiivsuse mõõtmisel põhinev meetod

Luminestsents on valguse kiirgumine ehk emiteerumine ainesest, mille põhjustab mittesoojuslik energia juhtimine ainesse. Fotoluminestsents on luminestsentsi alaliik, mille käigus toimub footoni kiirgumine ainesest pärast nähtava valguse ja/või UV-kiirguse neeldumist. Seejärel tekkinud valgus on suurema lainepikkusega kui neelatud valgus. Fotoluminestsentsi eristatakse kiirguse kestvuse ja kiirgumisprotsessi jooksul molekuli poolt läbitavate energeetiliste nivoo alusel fluorestsentsiks ja fosforestsentsiks. Lühikese elueaga fluorestsents on luminestsentsi alaliik, mis kestab kuni 10 nanosekundit. Pikema elueaga fotoluminestsentsi alaliik on fosforestsents, mis kestab kuni 10 millisekundit.

Käesolevas töös kasutatakse luminestsentsi intensiivsusel põhineva meetodi (LUM) korral ARC-tüüpi fotoluminestseeruvaid sonde (ARC-LUM sondid), mille puhul ergastatakse nukleosiidset analoogi (tiofeeni) neeldumisspektri alas 337 nm juures. Nukleosiidne

analoog võib emiteerida pika elueaga kiirgust, kui sond on seotud proteiinkinaasiga (viimane kaitseb sondi lahuses sisalduva hapniku eest, mis takistab fosforesentsi). Sondi koostises paikneb aga nukleosiidse analoogi suhtelises läheduses ka fluorestsentsvärv, kusjuures nukleosiidse analoogi kiirgusspekter kattub fluorestsentsvärvi neeldumisspektriga [14]. Nukleosiidselt analoogilt toimub sondi koostisse kuuluva fluorestsentsvärvi peale FRET tüüpi energia ülekanne (Försteri resonantsenergia ülekanne) ning seejärel detekteeritakse fluorestsentsvärvi emissioon (Joonis 7).

Töös kasutatakse ARC-LUM sondina pika elueaga luminesentssondi (ARC-1063), mille küljes on fluorestsentsvärv Alexa647 (sond ergastatakse lainepikkusel 337 nm ning detekteeritakse emissiooni lainepikkusel 675 nm pärast ajalisi viivitusi 80 mikrosekundit) [14]. Fotoluminesentsi intensiivsuse mõõtmisel põhineva väljatõrjumismeetodi korral määratakse kõrge seondumisvõimega mittefluorestseeruvate ühendite afiinsust (K_d väärtus). Käesolevas töös kasutatakse fotoluminesentsi intensiivsuse mõõtmisel põhinevat väljatõrjumismeetodit, kus väljatõrjujateks on fluorestseeruvad ühendid. See on võimalik, sest väljatõrjuvate ühendite koostisse kuuluv fluorestsentsvärv TAMRA ei sega sondi luminesentsi detekteerimist pärast ajalisi viivitusi.



Joonis 7. Fotoluminesentsi intensiivsuse mõõtmisel põhineva meetodi üldskeem. Skeemi keskel on välja toodud ARC-LUM sond (nt ARC-1063). Sondi küljes oranžina on lisatud fluorestsentsvärv (Alexa647). Punase tähemotiivina on toodud fluorestsentsvärvi emissioon, mis on tekkinud peale ARC-LUM sondi seostumist PK-ga, mille nukleosiidse analoogi (tiofeeni) ergastamisel toimus FRET tüüpi energia ülekanne fluorestsentsvärville.

3. EKSPERIMENTAALNE OSA

3.1 TAMRA fluorestsentsvärvilise lisamine

TAMRA-NHS estri külgepanek toimus lähteainetele ARC-684 ja ARC-3001. Lähteained lahustati vastavalt 100 µl ja 150 µl DMSO-s. ARC-de hulga kvantifitseerimiseks valmistati kõigepealt nende 20-kordsed lahjendused 50 mM HEPES (pH = 7,5) puhvrissse, mõõdeti NanoDrop spektrofotomeetriga ainete kontsentratsioonid ja arvutati välja hulgad, kasutades Lambert-Beer'i seadust (NanoDropi puhul $l = 0,1$ cm).

Arvutatud koguste alusel võeti DMSO lähtelahustest ruumalad, mis sisaldasid kummalgi juhul 300 nmol ARC-d ja lisati ühel juhul 970 nmol (3,2 ekv) ja teisel juhul 540 nmol (1,8 ekv) TAMRA-NHS estrit. Reaktsioonisegule lisati viimaks 10 ekv ARC suhtes TEA-d. Reaktsioonil lasti toimuda 3 h jooksul toatemperatuuril, seejärel lüofiliseeriti üleöö ja teostati puhastamine HPLC-ga.

3.2 Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhinev sidumismeetod

Ensüümi aktiivse kontsentratsiooni määramisel kasutati FA sidumismeetodit. Puhvri valmistamiseks võeti 5 ml FA puhvri lahust, mis sisaldas 50 mM HEPES pH = 7,5 (tagab ensüümi toimimiseks vajaliku lahuse pH), 150 mM NaCl (tagab ensüümi toimimiseks vajaliku ioonse jõu konstantsuse), 0,005% Tween (detergent, kaitseb aineid mittespetsiifilise seostumise eest plastiku külge), 2,5 mg BSA (samuti vähendab bioaktiivsete ainete adsorptsiooni pinnale ja kaitseb kinaasi keskkonnamõjude eest) ja 3,8 mg DTT (kaitseb ensüümi oksüdatsiooni eest).

Puhvri lahus jagati Eppendorfi tuubidesse ja tsentrifugeeriti ca 5000 rpm juures 2 minutit. Ensüümi aktiivse kontsentratsiooni määramiseks valmistati kas ROCK2 või PKAc kinaasist mittesiduva pinnaga Corning mikroplaadil kaks kahekordset lahjendusseeriat ja lisati fluorestsentssondi ARC-3423 (lõppkontsentratsiooniga ühes seerias 1 nM ja teises seerias 20 nM). Lisaks sellele tehti ROCK2 või PKAc kinaasist samasugused lahjendusseeriad, kuhu lisati kahes erinevas kontsentratsioonis fluorestsentssondi ARC-3424 (lõppkontsentratsioonidega 1 nM või 20 nM). Inkubeeriti mikroplaati 30 kraadi juures 60 minutit ja mõõdeti fluorestsentsi anisotroopia väärtused PHERAstar mikroplaadi lugejaga (BMG Labtech), kasutades TAMRA optilist moodulit FP [ex. 540(20) nm, em. 590(20) nm ja 590(20) nm]. Sidumiskõverad lähendati eelnevalt publitseeritud võrranditele [15] tarkvara GraphPad Prism abil. Suurema sondi kontsentratsiooniga kõverate baasil oli võimalik arvutada aktiivse kinaasi hulka lahuses (kuna sondi suurel kontsentratsioonil

muutub sondi ja kinaasi vahelise kompleksi moodustumisel limiteerivaks just kinaasi hulk, mitte sondi afiinsus). Väiksema sondi kontsentratsiooniga kõverate baasil arvutati sondide afiinsus, teades aktiivse kinaasi kontsentratsiooni lahuses.

3.3 Fotoluminestsentsi intensiivsuse mõõtmisel põhinev väljatõrjumismeetod

Puhvri valmistamiseks võeti 5 ml FA puhvri lahust (50 mM HEPES pH = 7,5, 150 mM NaCl, 0,005% Tween) ja lisati 3,8 mg DTT ning 2,5 mg BSA. Jagati lahus Eppendorfi tuubidesse ja tsentrifugiti ca 6000 rpm juures 2 minutit. Fluorestsentssondide ARC-3423 ja ARC-3424 dissotsiatsioonikonstantide (K_d väärtuste) määramine viidi läbi mittesiduva pinnaga Corning mikroplaadil. Ühenditest ARC-3423 ja ARC-3424 valmistati mikroplaadil kolmekordsed lahjendusseeriad (algkontsentratsioon esimeses süvendis 1 μ M) ja lisati kompleksi lahust (ROCK2 lõppkontsentratsiooniga 1,5 nM ja ARC-1063 lõppkontsentratsiooniga 80 nM) lahus. Mikroplaati inkubeeriti 30 kraadi juures 60 minutit ja seejärel mõõdeti luminestsentsi intensiivsuse väärtused PHERAstar mikroplaadi lugejaga (BMG Labtech), kasutades optilist moodulit HTRF [ex. 337(50) nm, em. 675(50) nm ja 620 (20) nm, viivitusaeg (*delay time*) 80 μ s, signaali kogumisaeg (*acquisition time*) 200 μ s]. Väljatõrjumiskõverad lähendati doos-vastus võrranditele tarkvara GraphPad Prism abil (*log inhibitor versus response*), saades sünteesitud ühendite IC_{50} väärtused. IC_{50} väärtustest arvutati modifitseeritud *Cheng-Prusoff* võrrandi abil (LISA 3) sünteesitud ühendite afiinsus ROCK2 suhtes (arvestades luminestsentssondi kontsentratsioonina 80 nM ning luminestsentssondi afiinsusena ROCK2 suhtes varasemalt publitseeritud väärtust 0,2 nM).

4. TULEMUSTE ARUTELU

Käesoleva töö käigus tegeleti PK-le ROCK suunatud fluorestsentssondide sünteesi ja sellele järgneva biokeemilise iseloomustamisega, mille tulemusena määrati nii ühendite dissotsiatsioonikonstandid kui ka esmane selektiivsusprofiil, kasutades referentskinaasina basofiilset PKAc-d. Töö teostamiseni puudusid ROCK-ile suunatud selektiivsed fluorestsentssondid.

4.1 Süntees

Töö esimeses osas teostati fluorestsentssondide süntees. Selleks kasutati lähteühenditena olemasolevaid ARC-tüüpi inhibiitoreid ARC-3001 ning ARC-684 (struktuurid toodud LISA 1). Mõlema ühendi struktuuris on peptiidse osana kasutatud oligoarginiini fragmenti, sest ROCK kuulub basofiilsete PK-de hulka, mis eelistavad substraadi sidumissaiti seostuva fragmendi puhul positiivselt laetud aminohappejääke (Arg või Lys). Lisaks annab oligoarginiini osa ühenditele hea raku plasmamembraani läbimisvõime. Siiski erines ühenditel ATP-saitne osa, kus ARC-3001-l kasutati ROCK-selektiivset inhibiitorit Fasudil'i ja ARC-684 puhul püridiini derivaati (Arom8). Mõlema ühendi linkeri struktuuri on hüdrofoobsete osade vahele lisatud kiraalne element *D*-Arg, et suurendada ROCK-suunalist selektiivsust, võrreldes teiste basofiilsete PK-dega.

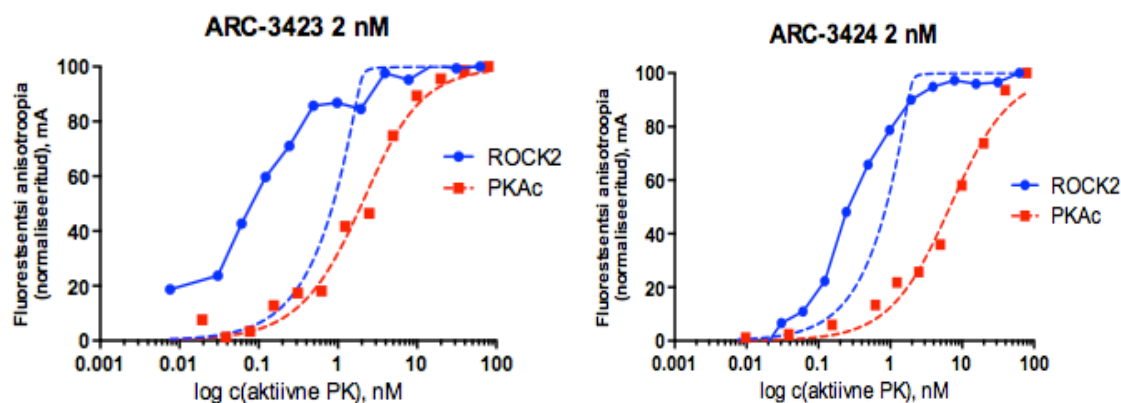
Konjugaatide struktuuri lisati läbi Lys kõrvalahela aminorühma fluorestsentsvärv TAMRA, saades lähteühenditest ARC-3001 ja ARC-684 vastavalt fluorestsentssondid ARC-3423 ja ARC-3424. Sünteesisaaduste puhastamisel preparatiivse HPLC meetodiga saadi nii ARC-3423 kui ARC-3424 puhtuseks üle 99%. Mass-spektrid ja UV-Vis spektrid kinnitasid ühendite õigsust (LISA 2): UV-Vis spektrites oli näha TAMRA-le ning ka ühendi nukleosiidse analoogi fragmendile omased neelduvused. Mass-spektrites olid näha eeldatavad *m/z* väärtused, mis vastasid sondide mitmekordselt protoneeritud ionidele (ARC-3423 arvutatud väärtused: 879, 841, 1375 *versus* leitud väärtused: 879, 841, 1375; ARC-3424 arvutatud väärtused: 838, 515, 629 *versus* leitud väärtused: 839, 515, 629).

4.2 Biokeemiline iseloomustamine

Töö teise osana viidi läbi fluorestsentssondide ARC-3423 ja ARC-3424 dissotsiatsioonikonstantide (K_d väärtuste) määramine ROCK2 suhtes, milleks esmalt kasutati fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhinevat sidumismeetodit. Selle meetodi eeliseks on kiirus ja sondi ning kinaasi väike kulu. Puuduseks on aga asjaolu, et mõõdetav

signaal sõltub nii seotud (kõrge anisotroopia) kui seostumata (madal anisotroopia) fluorestsentssondi hulgest, mistõttu fluorestsentssondi ei saa kasutada suures ülehulgas kinaasi suhtes.

Esialgsete mõõtmiste tulemused näitasid, et ühendite afiinsus ROCKi suhtes jääb subnanomolaarsesse alasse, mis muudab K_d väärtuste määramise ebatäpseks (Joonis 9).

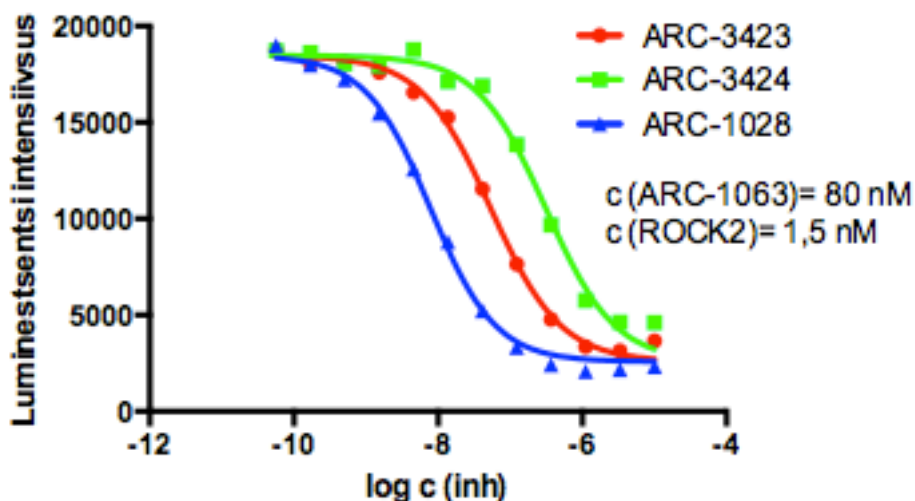


Joonis 8. ARC-3423 ja ARC-3424 sidumiskõverad PKAc ja ROCK2-ga sondide kontsentratsioonil 2 nM. Anisotroopia väärtuste võrreldavuseks on väärtused normaliseeritud nii, et ilma kinaasita punkti signaal = 0% ning kõige kangema kinaasi kontsentratsiooniga punkti signaal = 100%. Joonistel on punktiirina tähistatud programmi poolt vastavalt etteantud mudelile (Q-väärtusega FP võrrand, [15]) leitud kõver, mis kirjeldab hästi PKAc reaalseid kõveraid, kui mitte ROCK2 reaalseid kõveraid. Joonisel on toodud ühe mõõtmise tulemused. Kokku tehti kaks või enam mõõtmist.

Tekkinud probleemi lahendamiseks võeti kasutusele LUM väljatõrjumismeetod, mis lubab iseloomustada kõrge afiinsusega väljatõrjuvaid ühendeid, nihutades nende väljatõrjumiskõverat eemale piirkonnast, kus nende IC_{50} väärtus on väiksem kui pool aktiivse ensüümi kontsentratsioonist (nn tiheda sidumise ala, Joonis 9). Selle läbiviimiseks võeti kasutusele luminesentssondi ARC-1063 palju kõrgemas kontsentratsioonis kui kinaasi (80 nM *versus* 1,5 nM), kuna mitteseostunud sondi signaal on võrreldes PK-ga seotud sondi signaaliga tühine. Samal ajal on detekteeritav luminesentsi intensiivsus endiselt proportsionaalne kinaasiga seotud luminesentssondi kontsentratsiooniga. LUM väljatõrjumismeetodit on eelnevalt edukalt kasutatud kõrge afiinsusega mittefluorestseeruvate ühendite K_d väärtuste määramiseks [16], kuid käesolevas töös kasutati meetodit TAMRA-ga märgistatud ühendite afiinsuse määramiseks.

Võrdlusühenditena kasutati varasemalt publitseeritud ühendeid ARC-1028 ja ARC-3002 [16]. Fluorestsentssondi lähteainena kasutatud ARC-3001 erineb ühendist ARC-3002 vaid

peptiidse osa C-terminalis oleva *D*-Lys poolest. ARC-1028 erineb sünteesitud ühenditest aga oma nukleosiidse analoogi poolest, kus on adenosiin-5'-karboksüülhape (Adc).



Joonis 9. LUM-meetodi väljatõrjumise kõverad ühenditele ARC-3423, ARC-3424 ja ARC-1028 (võrdlusühend). Joonisel on toodud ühe mõõtmise tulemused. Kokku tehti kaks või enam mõõtmist.

Väljatõrjuva ühendina sai fluorestsentsvärviga sondi kasutada eeldusel, et TAMRA fluorestsents ei mõjuta luminesentssondi ARC-1063 signaali, sest luminesentssond (Alexa647) ergastub ja emiteerib teistel lainepikkustel (337 nm ja 675 nm) kui TAMRA (540 nm ja 590 nm) ning luminesentssondi emissioon kestab ajaliselt ka kauem. Saadud IC_{50} väärtustest arvutati välja K_d väärtused ROCK2-le, kasutades modifitseeritud *Cheng-Prusoff* võrrandit (LISA 3).

Võrrandi abil saadi ARC-3423 K_d väärtuseks 0,12 nM ja ARC-3424 K_d väärtuseks 0,68 nM. Fluorestsentsvärvita ARC-3002 K_d väärtus ROCK2 suhtes on eelnevalt publitseeritud andmete põhjal 0,020 nM. Võrdlusühendina kasutati ARC-1028, mille afiinsuseks ROCK2-le saadi 0,022 nM, see väärtus langes suurepäraselt kokku eelnevalt publitseeritud tulemusega 0,021 nM.

Tabel 1. Biokeemiliste mõõtmiste tulemused

<i>Aine kood</i>	<i>Struktuur</i>	<i>K_d (ROCK2)</i> <i>nM</i>	<i>K_d (PKAc)</i> <i>nM</i>	<i>Selektiivsuse</i> <i>indeks^e</i>
ARC-3423	Fas-Oct-(D-Arg)-Ahx-(D-Arg) ₆ -D-Lys(TAMRA)-CONH ₂	0,12 [0,02] ^{b,c}	2,3 [0,2] ^a	19
ARC-3424	Arom8-Ahx-(D-Arg)-Ahx-(D-Arg) ₆ -D-Lys(TAMRA)-CONH ₂	0,68 [0,07] ^{b,c}	8,0 [3,0] ^a	12
ARC-1028 ^d	Adc-Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) ₆ -CONH ₂	0,021 ^d 0,022 [0,003] b,c	0,26 ^d	12
ARC-3002 ^d	Fas-Ahx-(D-Lys)-Ahx-(D-Arg) ₆ -CONH ₂	0,020 ^d	3,3 ^d	165

Mõõtmiste arv $N \geq 3$. ^a Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhineva sidumismeetodiga mõõdetud K_d väärtused, kasutades 2 nM sondi kontsentratsiooni. ^b LUM-meetodiga mõõdetud väärtused luminescentssondi ARC-1063 (80 nM) väljatõrjumisel kompleksist ROCK2-ga (1,5 nM). ^c K_d arvutamiseks kasutati *Cheng-Prusoff* võrrandit:

$$K_d = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{c(ARC-1063)}{K_D(ARC-1063)}} \cdot d$$

Eelnevalt publitseeritud andmed [16], kasutades LUM-meetodit. ^e

Selektiivsuse indeks on defineeritud kui K_d väärtuste suhe PKAc ja ROCK2 suhtes ehk selektiivsuse indeks = $\frac{K_d(PKAc)}{K_d(ROCK2)}$.

Töö viimase osana määrati uute fluorestsentssondide esmased selektiivsusomadused, võrreldes basofiilse referentskinaasiga PKAc-ga. Selleks määrati sondide K_d väärtused PKAc-le, kasutades FA sidumismeetodit, kus kinaasi tiitriti 2 nM sondiga (kusjuures 20 nM ARC-3423-ga määrati PKAc aktiivne kontsentratsioon). Ülalpool (Joonis 8) on välja toodud vastavalt ARC-3423 ja ARC-3424 sidumiskõverad PKAc ja ROCK2-ga sondide kontsentratsioonil 2 nM.

Tabel 1-s on välja toodud nii fluorestsentssondide K_d väärtused PKAc-le kui ka selektiivsused, mis on defineeritud kui K_d väärtuste suhe PKAc ja ROCK2 suhtes. Tulemused näitasid, et TAMRA fluorestsentsvärvi lisamine Fasudil'i konjugaadi struktuuri (ARC-3423) vähendab afiinsust ROCK2-le umbes 10 korda, võrreldes mittefluorestseeruva ühendiga ARC-3002 (0,12 nM *versus* 0,020 nM). Seejuures sondi afiinsus PKAc-le jääb mittefluorestseeruva ühendiga samasse suurusjärku (2,3 nM *versus* 3,3 nM). Seega väheneb tunduvalt ka sondi ARC-3423 selektiivsus, võrreldes ilma fluorestsentsvärvita ühendiga ARC-3002 (selektiivsused indeks väheneb 165-lt 19-ni). Sellest tulenevalt võib öelda, et TAMRA lisamine mõjutab suurel määral sondi selektiivsust,

suurendades afiinsust PKAc-le, mida on raporteeritud ka mitootilisele kinaasile Haspin arendatud fluorestsentssondide puhul [17]. Kuna TAMRA on hüdrofoobsete omadustega, saab antud tendentsi seletada hüdrofoobse TAMRA interaktsiooniga PKAc substraadi sidumistaskus oleva hüdrofoobse alaga [nimetatakse (P+1) regiooniks] [18].

Püridiini derivaati sisaldava sondi ARC-3424 afiinsus PKAc-le jääb samasse suurusjärku Fasudil'i sisaldava ARC-3423-ga (8,0 nM *versus* 2,3 nM), kuid selektiivsus on veidike kehvem (selektiivsusindeksid vastavalt 12 ja 19). Seega sondide afiinsus PKAc-le on samas suurusjärgus, kuid selektiivsus on Fasudil'i sisaldaval ARC-3423-l parem.

Kokkuvõttes õnnestus käesoleva töö tulemusena saada kaks kõrge afiinsusega fluorestsentssondi proteiinkinaasi ROCK jaoks, kusjuures mõlema sondi afiinsus ROCK suhtes oli suurusjärk suurem kui struktuurselt sarnase proteiinkinaasi PKAc suhtes. Töö edasiarenduse käigus on alustatud rakukatsetega, millega uuritakse uute ROCK-le arendatud fluorestsentssondide ARC-3423 ja ARC-3424 lokaliseerimist elusrakkudes ning mõju ROCK-i signaaliradadele (aktiini depolümeriseeriv toime).

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös teostati fluorestsentssondide süntees, mille käigus kasutati ARC-tüüpi inhibiitoreid ARC-3001 ja ARC-684, mis on uurimisrühmas varasemalt näidatud kui kõrge afiinsuse ja selektiivsusega ühendid ROCK-le. Sünteesi käigus lisati konjugaatide struktuuri läbi Lys kõrvalahela aminorühma fluorestsentsvärv TAMRA, saades fluorestsentssondid ARC-3423 ja ARC-3424. Sünteesisaadused puhastati HPLC meetodiga ning saadi nii ARC-3423 kui ARC-3424 puhtuseks üle 99%. Mass-spektrid ja UV-Vis spektrid kinnitasid ühendite õigsust.

Järgnevalt viidi läbi fluorestsentssondide biokeemiline iseloomustamine proteiinkinaasiga ROCK dissotsiatsioonikonstantide (K_d väärtuste) määramise teel. Esmalt kasutati fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhinevat sidumismeetodit, kuid ühendite afiinsus jäi subnanomolaarsesse alasse, mis muutis K_d väärtuste määramise ebatäpseks. Tekkinud probleemi lahendamiseks võeti kasutusele LUM väljatõrjumismeetod, mis annab võimaluse iseloomustada kõrge afiinsusega väljatõrjuvaid ühendeid, nihutades nende väljatõrjumiskõverat eemale piirkonnast, kus nende IC_{50} väärtus on väiksem kui pool aktiivse ensüümi kontsentratsioonist (nn tiheda sidumise ala).

Töö viimase osana määrati FA sidumismeetodiga uute fluorestsentssondide esmased selektiivsused ja afiinsused, võrreldes basofiilse referentskinaasiga PKAc-ga. Tulemused näitasid, et TAMRA fluorestsentsvärvi lisamine Fasudil'i konjugaadi struktuuri (ARC-3423) vähendab afiinsust ROCK2-le umbes 10 korda, võrreldes mittefluorestseeruva ühendiga ARC-3002 (0,12 nM *versus* 0,020 nM). Seejuures sondi afiinsus PKAc-le jääb mittefluorestseeruva ühendiga samasse suurusjärku (2,3 nM *versus* 3,3 nM). Sellest tulenevalt võib öelda, et TAMRA lisamine mõjutab suurel määral sondi selektiivsust, suurendades afiinsust PKAc-le. ARC-3424 puhul mõõtmistulemused näitasid, et püridiini derivaati sisaldava sondi afiinsus PKAc-le jääb samasse suurusjärku Fasudil'i sisaldava ARC-3423-ga (8,0 nM *versus* 2,3 nM), kuid selektiivsus on veidi kehvem (selektiivsused vastavalt 12 ja 19). Seega sondide afiinsus PKAc-ga on samas suurusjärgus, kuid selektiivsus on Fasudil'i sisaldaval ARC-3423-l parem.

Töö edasiarendusena on alustatud rakukatsetega, millega uuritakse uute ROCK-le arendatud fluorestsentssondide ARC-3423 ja ARC-3424 lokaliseerumise elusrakkudes ning mõju ROCK-i signaaliradadele.

SUMMARY

Synthesis and biochemical characterization of fluorescent probes targeting Rho-associated protein kinase

Protein kinases are enzymes that catalyze phosphorylation. During this modification, the γ -phosphoryl group is transferred from the donor molecule (ATP) to acceptor, i.e., to a hydroxyl group of Ser/Thr/Tyr residue in the protein substrate. In a focus of this work is Rho-associated protein kinase (ROCK), which is responsible for triggering changes in cell shape as a response to physiological stimuli. The aberrant activity of ROCK is associated with several diseases. Protein kinase inhibitors are compounds that bind to the enzyme and block its catalytic function, and can hence be used as drugs. Fluorescent probes are compounds which are derived from inhibitors by attachment of a fluorescent dye; such probes can be used to analyze kinase quantity in a biochemical sample or identify its location in a living cell.

The aim of this bachelor thesis was to carry out synthesis of fluorescent probes based on the bisubstrate-analogue ARC-type inhibitors ARC-3001 and ARC-684, which were previously shown to possess high affinity and selectivity towards Rho-associated protein kinase (ROCK). During the synthesis, fluorescent dye TAMRA was added to the conjugates, yielding fluorescent probes ARC-3423 and ARC-3424. The synthesis products were purified by HPLC and mass spectrometry and UV-Vis spectroscopy were used to confirm the structures of the compounds.

The next step was to characterize affinity of fluorescent probes by establishing their dissociation constants K_d values towards ROCK2 and a reference kinase PKAc. Firstly, the binding assay with detection of fluorescent anisotropy (FA) was used. However, as the affinities of compounds towards ROCK2 were in subnanomolar area, no accurate fit of binding curves could be achieved. To solve this problem, the luminescence intensity method (LUM) was used, which enabled shifting of the displacement curves away from the tight-binding area.

The results showed that the addition of the fluorescent dye TAMRA to Fasudil conjugate structure (ARC-3423) reduced the affinity of ROCK2 nearly 10-fold if compared to the non-fluorescent compound ARC-3002 (0.12 nM *versus* 0.020 nM). On the other hand, the affinity for the PKAc remained in the same order of magnitude (2.3 nM *versus* 3.3 nM). Hence, the selectivity of the ARC-3423 probe decreased significantly compared to the non-fluorescent compound of the ARC-3002 (19 *versus* 165). The results of the measurements

with ARC-3424 showed that the affinity of probe containing pyridine derivate towards PKAc was in the same order of magnitude as in case of Fasudil-containing ARC-3423 (8.0 nM *versus* 2.3 nM), but the selectivity of ARC-3424 was even lower than that of ARC-3423 (selectivity ratio of 12 *versus* 19).

However, the subnanomolar affinities of the obtained fluorescent probes towards ROCK2, and the selectivity ratios of above 10 still make these compounds interesting for further studies.

We are now performing experiments with ARC-3423 and ARC-3424 in living cells to establish cell membrane-penetrative properties of probes, their localization inside the cells and their effect on the ROCK signaling pathways.

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] Roskoski, R. A Historical Overview of Protein Kinases and Their Targeted Small Molecule Inhibitors. *Pharmacol. Res.* **2015**, *100*, 1–23.
- [2] Schwartz, P. A.; Murray, B. W. Protein Kinase Biochemistry and Drug Discovery. *Bioorg. Chem.* **2011**, *39* (5-6), 192–210.
- [3] Cohen, P. Protein Kinases--the Major Drug Targets of the Twenty-First Century? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 309–315.
- [4] Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **2002**, *298* (5600), 1912–1934.
- [5] Olson, M. F. Applications for ROCK Kinase Inhibition. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20* (2), 242–248.
- [6] Kümper, S.; Mardakheh, F. K.; McCarthy, A.; Yeo, M.; Stamp, G. W.; Paul, A.; Worboys, J.; Sadok, A.; Jørgensen, C.; Guichard, S.; Marshall, C. J. Rho-Associated Kinase (ROCK) Function Is Essential for Cell Cycle Progression, Senescence and Tumorigenesis. *Elife* **2016**, *5*.
- [7] Knapp, S.; Sundström, M. Recently Targeted Kinases and Their Inhibitors - The Path to Clinical Trials. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2014**, *17* (1), 58–63.
- [8] LoGrasso, P. V.; Feng, Y. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Application to Inflammatory Disorders. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9* (8), 704–723.
- [9] Feng, Y.; Lograsso, P. V.; Defert, O.; Li, R. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (6), 2269–2300.
- [10] Lavogina, D.; Enkvist, E.; Uri, A. Bisubstrate Inhibitors of Protein Kinases: From Principle to Practical Applications. *ChemMedChem* **2010**, *5* (1), 23–34.
- [11] Kestav, K.; Lavogina, D.; Raidaru, G.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Uri, A. Bisubstrate Inhibitor Approach for Targeting Mitotic Kinase Haspin. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (2), 225–234.
- [12] Enkvist, E.; Viht, K.; Bischoff, N.; Vahter, J.; Saaver, S.; Raidaru, G.; Issinger, O.-G.; Niefind, K.; Uri, A. A Subnanomolar Fluorescent Probe for Protein Kinase CK2 Interaction Studies. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (43), 8645–8653.
- [13] Enkvist, E.; Kriisa, M.; Roben, M.; Kadak, G.; Raidaru, G.; Uri, A. Effect of the Structure of Adenosine Mimic of Bisubstrate-Analog Inhibitors on Their Activity towards Basophilic Protein Kinases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (21), 6098–6101.
- [14] Enkvist, E.; Vaasa, A.; Kasari, M.; Kriisa, M.; Ivan, T.; Ligi, K.; Raidaru, G.; Uri, A. Protein-Induced Long Lifetime Luminescence of Nonmetal Probes. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (10), 1052–1062.

- [15] Vaasa, A.; Viil, I.; Enkvist, E.; Viht, K.; Raidaru, G.; Lavogina, D.; Uri, A. High-Affinity Bisubstrate Probe for Fluorescence Anisotropy Binding/displacement Assays with Protein Kinases PKA and ROCK. *Anal. Biochem.* **2009**, *385* (1), 85–93.
- [16] Lavogina, D.; Kalind, K.; Bredihhina, J.; Hurt, M.; Vaasa, A.; Kasari, M.; Enkvist, E.; Raidaru, G.; Uri, A. Conjugates of 5-Isoquinolinesulfonylamides and Oligo-D-Arginine Possess High Affinity and Selectivity towards Rho Kinase (ROCK). *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (10), 3425–3430.
- [17] Kestav, K.; Viht, K.; Konovalov, A.; Enkvist, E.; Uri, A.; Lavogina, D. Slowly On, Slowly off: Bisubstrate-Analogue Conjugates of 5-Iodotubercidin and Histone H3 Peptide Targeting Protein Kinase Haspin. *Submitt. Publ.* **2017**.
- [18] Goldsmith, E. J.; Akella, R.; Min, X.; Zhou, T.; Humphreys, J. M. Substrate and Docking Interactions in Serine/threonine Protein Kinases. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 5065–5081.

INFOLEHT

Rho-sõltuvalle proteiinkinaasile suunatud fluorestsentssondid süntees ja biokeemiline iseloomustamine

Käesolevas töös teostati fluorestsentssondide süntees, mille käigus kasutati ARC-tüüpi inhibiitoreid ARC-3001 ja ARC-684. Sünteesi käigus lisati konjugaatide struktuuri läbi Lys kõrvalahela aminorühma fluorestsentsvärv TAMRA, saades fluorestsentssondid ARC-3423 ja ARC-3424. Viidi läbi fluorestsentssondide biokeemiline iseloomustamine proteiinkinaasiga ROCK dissotsiatsioonikonstantide (K_d väärtuste) määramise teel. Kasutati LUM väljatõrjumismeetod, mis annab võimaluse iseloomustada kõrge afiinsusega väljatõrjuvaid ühendeid. Töö viimase osana määrati FA sidumismeetodiga uute fluorestsentssondide esmased selektiivsusomadused ja afiinsused, võrreldes basofiilse referentskinaasiga PKAc-ga.

Märksõnad: fluorestsentssond, fluorestsentsi anisotroopia, fotoluminestsents, Rho-sõltuv proteiinkinaas, cAMP-sõltuv proteiinkinaas, ARC-tüüpi inhibiitor

CERCS koodid: P310 proteiinid, ensüümid; P390 orgaaniline keemia; B740 farmakoloogia

Synthesis and biochemical characterization of fluorescent probes targeting Rho-associated protein kinase

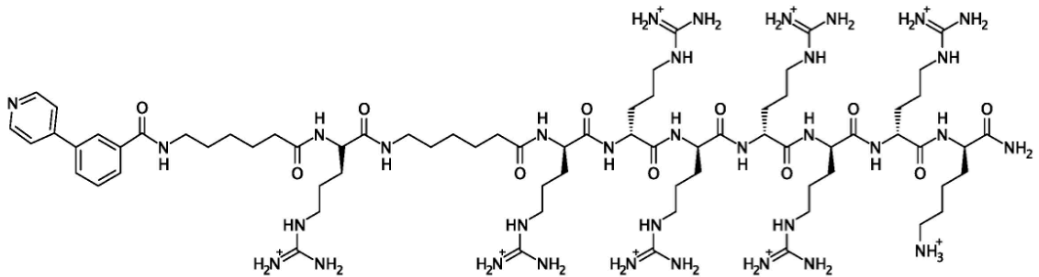
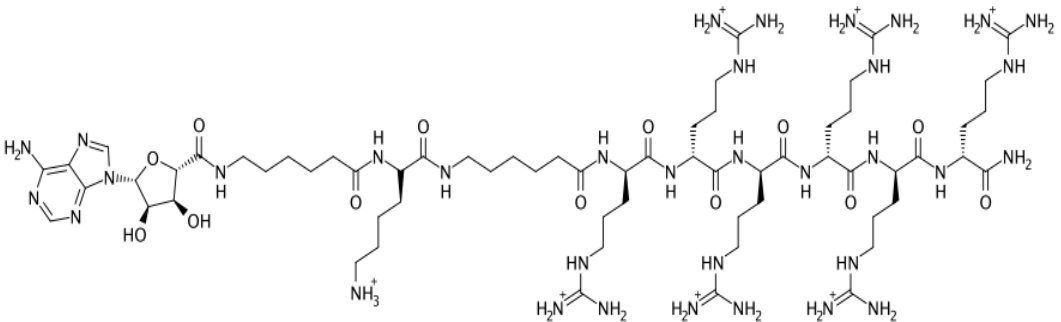
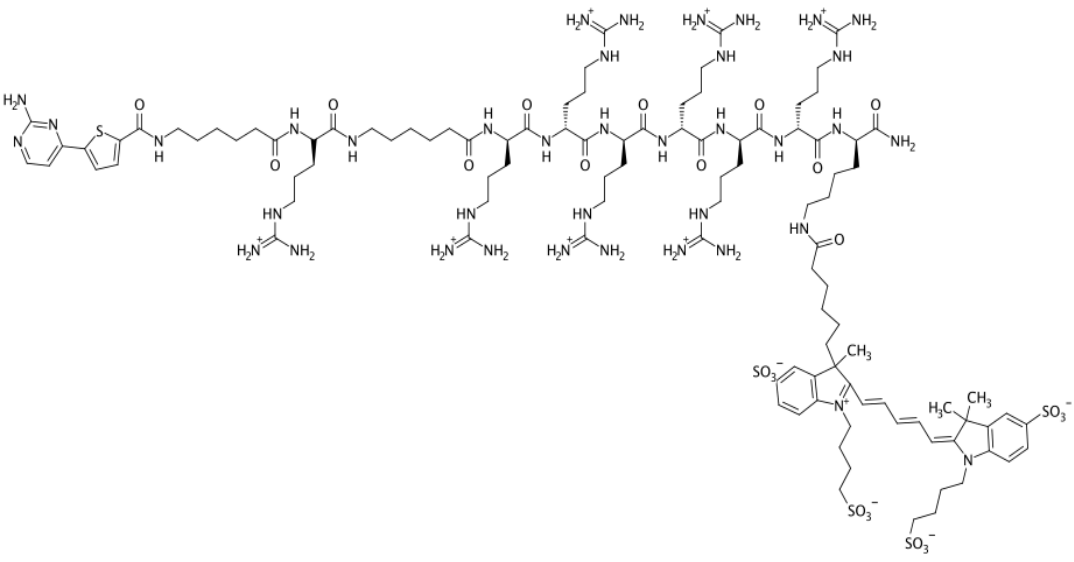
The aim of this bachelor thesis was to carry out synthesis of fluorescent probes based on the bisubstrate-analogue ARC-type inhibitors ARC-3001 and ARC-684. During the synthesis, fluorescent dye TAMRA was added to the conjugates, yielding fluorescent probes ARC-3423 and ARC-3424. The next step was to characterize affinity of fluorescent probes by establishing their dissociation constants K_d values towards ROCK2 and a reference kinase PKAc. Firstly, the binding assay with detection of fluorescent anisotropy (FA) was used. However, as the affinities of compounds towards ROCK2 were in subnanomolar area, no accurate fit of binding curves could be achieved. To solve this problem, the luminescence intensity method (LUM) was used, which enabled shifting of the displacement curves away from the tight-binding area.

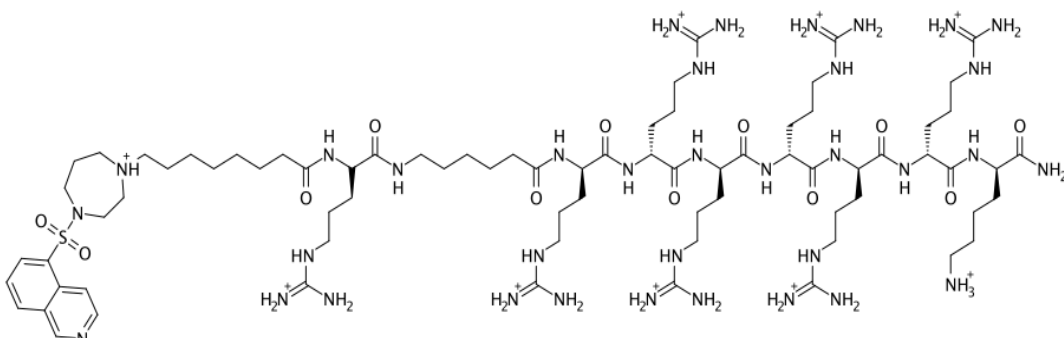
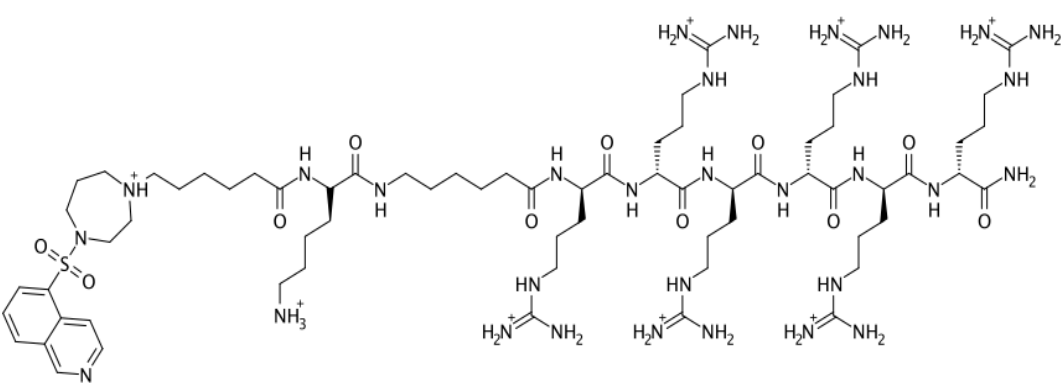
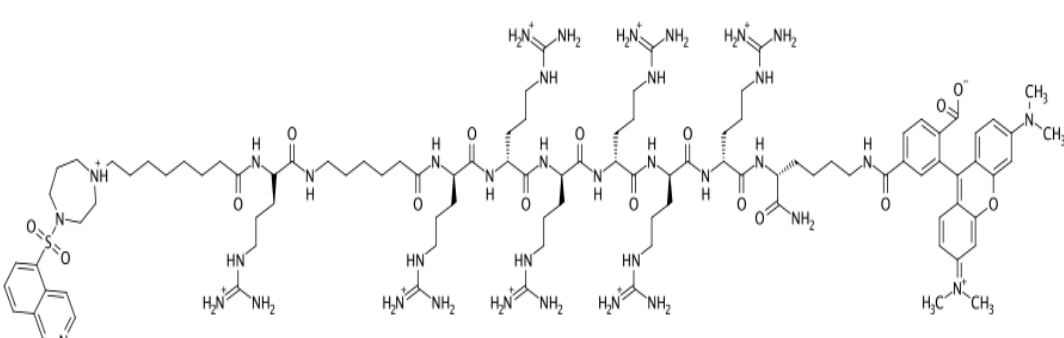
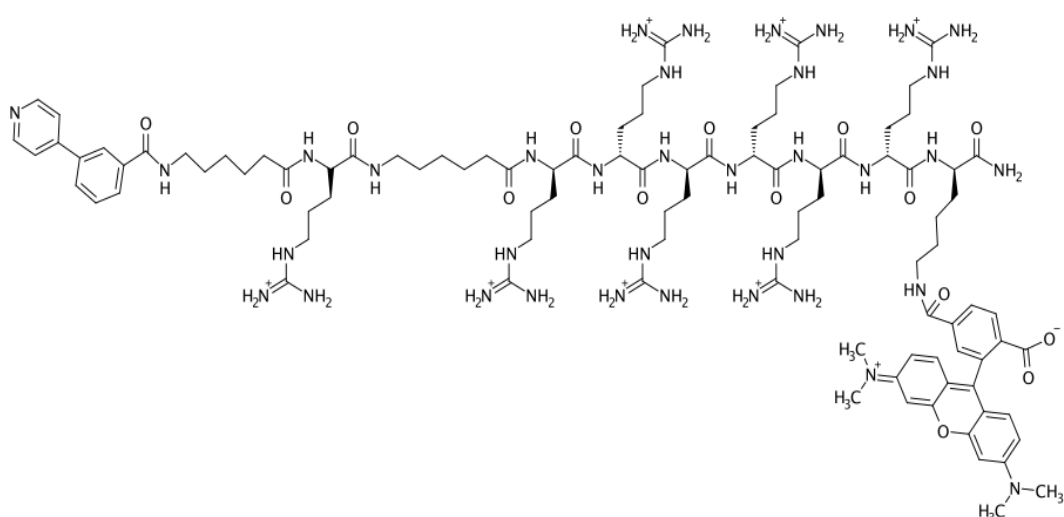
Keywords: fluorescent probe, fluorescence anisotropy, photoluminescence, Rho-associated protein kinase, cAMP-dependent protein kinase, ARC-type inhibitor

CERCS codes: P310 proteins, enzymology; P390 organic chemistry; B740 pharmacological sciences

LISAD

LISA 1. ARC-tüüpi inhibiitorite struktuurid

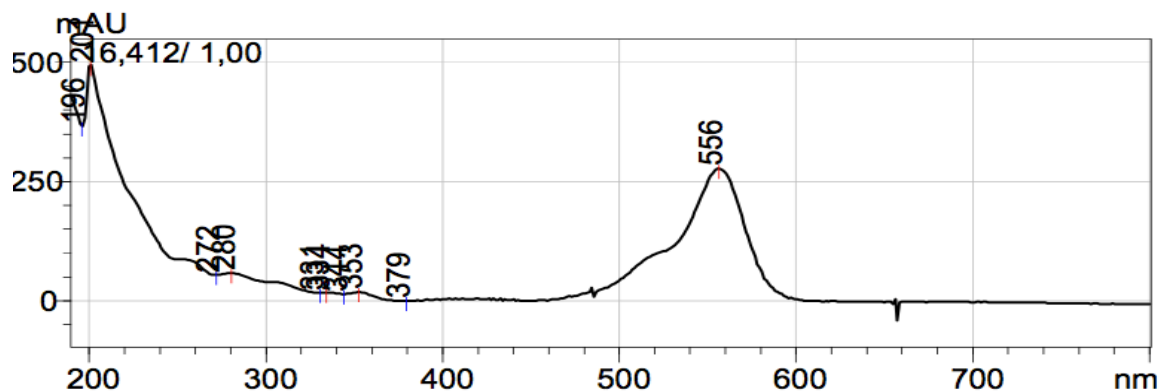
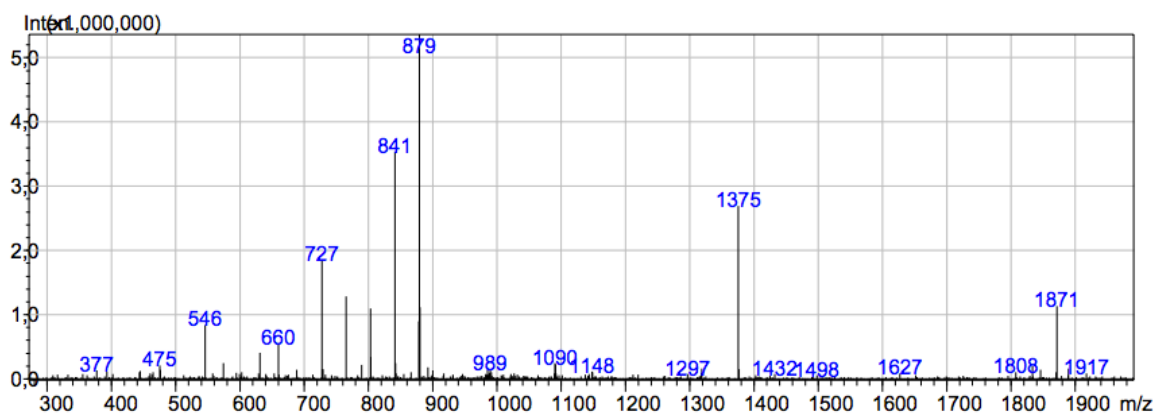
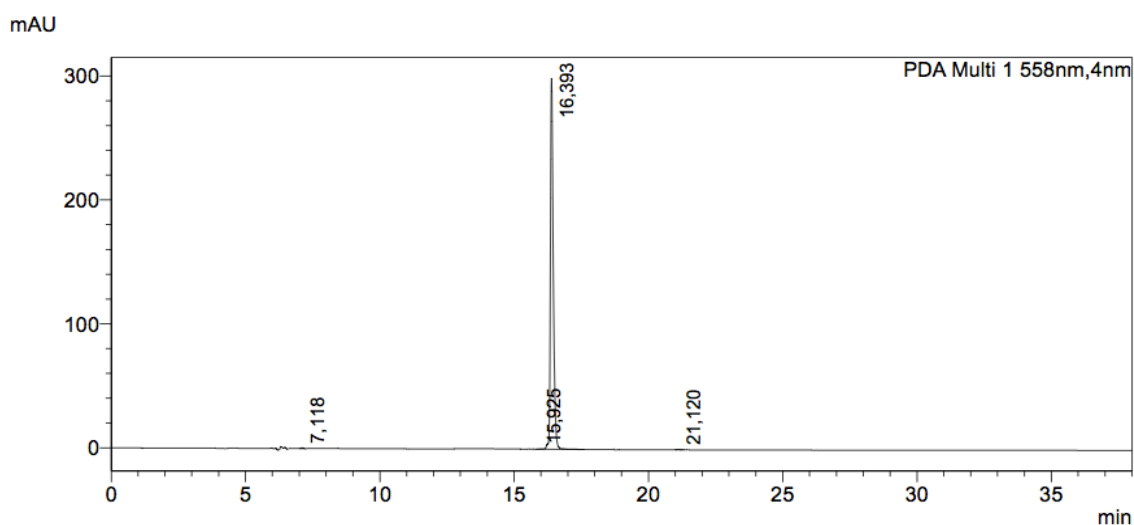
Aine kood	Struktuur
ARC-684	 <p>The structure of ARC-684 is a long-chain polyamine derivative. It features a 4-pyridylphenyl group at the N-terminus, followed by a series of lysine residues. The side chains of these lysines are modified with guanidinium groups, which are shown as protonated (NH₂⁺ NH₂). The C-terminus is a primary amide (NH₂).</p>
ARC-1028	 <p>The structure of ARC-1028 is a polyamine derivative with a complex N-terminal group. This group includes a purine-like ring system fused to a five-membered ring containing an oxygen atom and two hydroxyl groups. The main chain consists of lysine residues with guanidinium side chains (NH₂⁺ NH₂). The C-terminus is a primary amide (NH₂).</p>
ARC-1063	 <p>The structure of ARC-1063 is a polyamine derivative with a thienopyridine N-terminal group. The main chain consists of lysine residues with guanidinium side chains (NH₂⁺ NH₂). The C-terminus is a primary amide (NH₂). A large, complex side chain is attached to one of the lysines, featuring a central nitrogen atom bonded to a methyl group (CH₃), a propylsulfonate group (SO₃⁻), and a long chain ending in another propylsulfonate group (SO₃⁻). This side chain also includes a thiazole ring system with a methyl group (CH₃) and another propylsulfonate group (SO₃⁻).</p>

<p>ARC -3001</p>	
<p>ARC -3002</p>	
<p>ARC -3423</p>	
<p>ARC -3424</p>	

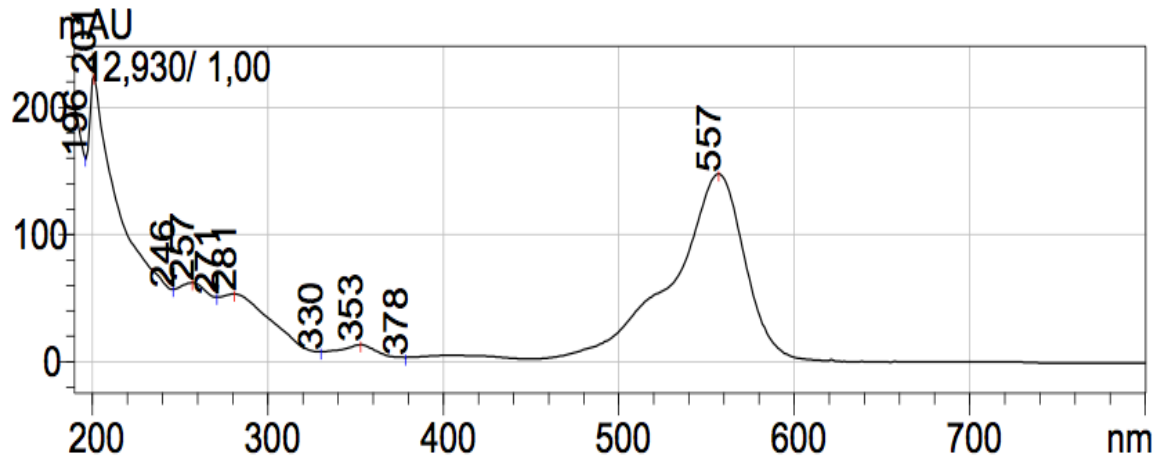
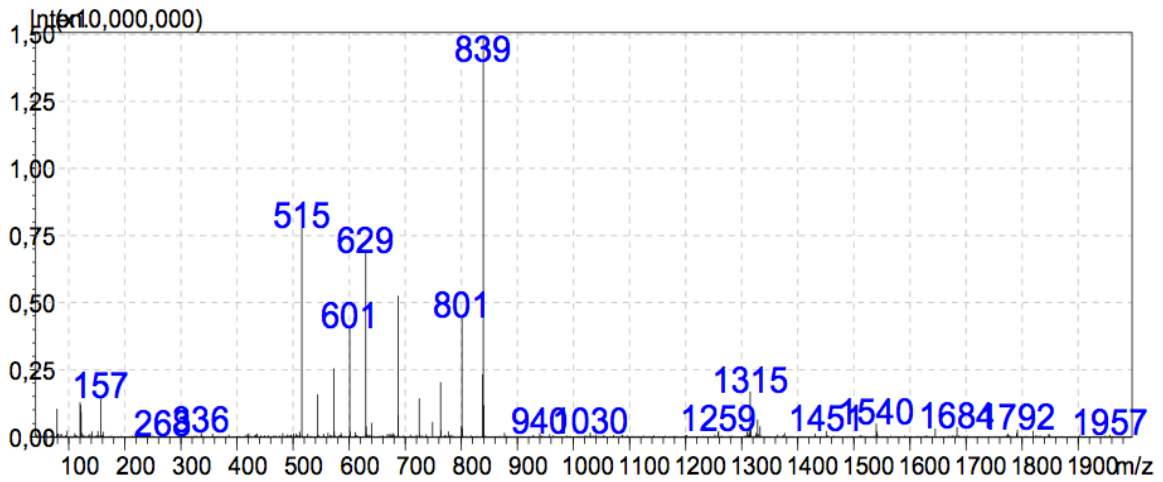
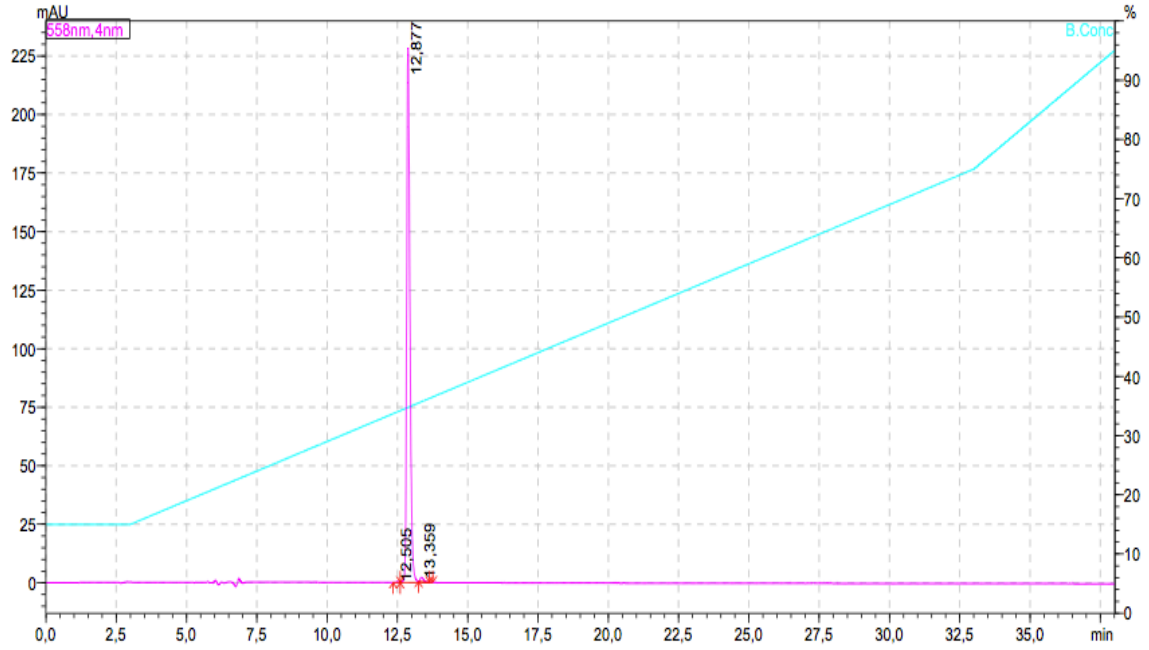
LISA 2. HPLC ainete puhtused, retentsiooniajad, kromatogrammid, mass-spektrid ja UV-spektrid

Aine kood	Retentsiooniaeg (min)	Puhtus (%)	Tingimused
ARC-3423	16,393	99,668	Lineaarne gradient kiirusega 2,00% ACN/min, alustades 15% ACN
ARC-3424	12,877	99,089	Lineaarne gradient kiirusega 2,00% ACN/min, alustades 15% ACN

ARC-3423 puhtuse kromatogramm, mass-spekter ja UV-spekter



ARC-3424 puhtuse kromatogramm, mass-spekter ja UV-spekter



LISA 3. Valemid

Modifitseeritud Cheng-Prusoff võrrand:

$$K_d = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_S}}$$

K_d – mittelumestseeruva inhibiitori afiinsus (inhibiitori ja ensüümi vahelise kompleksi dissotsiatsioonikonstant);

IC_{50} – inhibiitori kontsentratsioon, mille juures on kompleksisse inhibiitoriga seotud pool ensüümi kogusest lahuses;

$[S]$ – luminescentssondi kontsentratsioon;

K_S – luminescentssondi afiinsus antud ensüümi suhtes (luminescentssondi ja ensüümi vahelise kompleksi dissotsiatsioonikonstant).

Konkurentne inhibeerimine:

$$K_d = \frac{[E] [I]}{[EI]}$$

K_d – inhibiitori afiinsus (inhibiitori ja ensüümi vahelise kompleksi dissotsiatsioonikonstant);

$[E]$ – vaba ensüümi kontsentratsioon;

$[I]$ – vaba inhibiitori kontsentratsioon;

$[EI]$ – ensüüm-inhibiitori kompleksi kontsentratsioon.

TÄNUAVALDUSED

Täna oma juhendajaid Katrin Kestavit ja Darja Lavõginat suurepärase juhendamise ja toetuse ning konstruktiivse tagasiside andmise eest bakalaureusetöö kirjutamisel.

Avaldan tänu ka Asko Urile võimaluse eest sooritada bakalaureusetöö meditsiinilise keemia uurimisrühmas.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina,

Mikk Teelahk,
(*autori nimi*)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**RHO-SÕLTUVALE PROTEIINKINAASILE SUUNATUD
FLUORESTSENTSSONDIDE SÜNTEES JA BIOKEEMILINE
ISELOOMUSTAMINE,**
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on Katrin Kestav, MSc ja Darja Lavõgina, PhD,

(*juhendaja nimi*)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **21.04.2017**