

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Keemia Instituut

Anna Zadorožnaja

**Proteiinkinaaside kvantifitseerimine immobiliseeritud
ARC-Lum(Fluo) sondidega**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia õppekava

Juhendaja: MSc Taavi Ivan

Tartu 2017

INFOLEHT/INFORMATION SHEET

Proteiinkinaaside kvantifitseerimine immobiliseeritud ARC-Lum(Fluo) sondidega

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja töötada aktiivse proteiinkinaasi kontsentratsiooni määramise meetod. Meetod põhineb PKA ja teiste AGC rühma kinaaside suhtes kõrge afiinsusega biotinüleeritud ARC-Lum(Fluo) sondide kasutamisel. Kompleksis sihtmärkvalguga muutuvad ligandi luminesentsomadused tugevalt, võimaldades aktiivse kinaasi kontsentratsiooni määramist. ARC-Lum(Fluo) sondide pikk eluiga võimaldab aeglahutusega luminesentssignaali mõõtmist, millega saavutatakse parem signaal-müra suhe ning kõrgem tundlikkus. Välja töötatud meetod on lihtne, kiire, madala reagentide kuluga ja lubab pikomolaarsete kinaasi kontsentratsioonide tuvastamist ja kvantifitseerimist.

Märksõnad: proteiinkinaasid, proteiinkinaaside inhibiitorid, proteiinkinaaside määramine, aeglahutusega luminesents, ARC-Lum(Fluo) sondid

CERCS eriala P310 Proteiinid, ensüümid

Time-resolved luminescence assay using immobilized ARC-Lum(Fluo) probes for determination of protein kinases

In this work, a novel method for quantification of active form of protein kinases was developed and optimized. The assay is based on biotinylated ARC-Lum(Fluo) probes with high affinities towards PKA and other kinases of AGC group. In complex with target protein kinase, a drastic change in luminescence properties of fluorescent ligand occurs, allowing determination of the concentration of active form of kinases. Due to long lifetime of ARC-Lum(Fluo) probes, time-resolved luminescence measurement can be applied which improves signal-to-noise ratio and higher sensitivity is achieved. A quick, simple and sensitive assay was developed allowing detection and quantification of picomolar concentrations of several kinases of AGC group.

Key words: protein kinases, protein kinase inhibitors, protein kinase determination, time-resolved luminescence, ARC-Lum(Fluo) probes

CERCS specialty P310 Proteins, enzymology

KASUTATUD LÜHENDID	4
1. SISSEJUHATUS	5
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
2.1 Proteiinkinaasid	6
2.2 Proteiinkinaaside inhibiitorid	7
2.3 ARC-tüüpi inhibiitorid	9
2.3.1 ARC-Lum(Fluo) sondid	10
2.4 Luminesstsents ja luminesstsentsmeetodid proteiinkinaaside uurimiseks.....	10
2.4.1 Fluorestsentsanisotroopia	11
2.4.2 Försteri resonantsenergia ülekanne	12
2.4.3 Luminesstsentsi aegviivitusega mõõtmine.....	13
2.4.1 ELISA	14
3. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	16
3.1 Kasutatud kemikaalid ja reagensid	16
3.2 Kasutatud puhvrid	17
3.2 Aparatuur ja töövahendid	17
3.3 Kinaaside aktiivsuse määramine	18
3.4 Biotinüleeritud ARC-Lum(Fluo) sondi afiinsuse määramine PKA suhtes	18
3.5 Streptavidiinipinna sidumismahu määramine	19
3.6 Inkubeerimisaja määramine.....	19
3.7 Kinaaside kvantifitseerimine pinnal	19
3.8 Meetodi tuvastuspiiri ja määramispiiri leidmine	20
3.9 Funktsionaliseeritud pinna säilivus.....	20
4. TULEMUSED JA ARUTELU.....	21
4.1 Töö eesmärk ja põhimõte	21
4.2 ARC-tüüpi inhibiitorite sidumine pinnale.....	22
4.3 Biotinüleeritud ARC-Lum(Fluo) sondi afiinsuse leidmine PKA suhtes	24
4.4 Kinaaside aktiivsuse määramine lahuses.....	26
4.5 Kinaaside aktiivsuse määramine ARC-Lum(Fluo) funktsionaliseeritud pinnal.....	27
4.6 Funktsionaliseeritud pinna püsivus ajas	29
5. KOKKUVÕTE	31
6. KASUTATUD KIRJANDUS.....	33
7. LISAD.....	37

KASUTATUD LÜHENDID

- Adc – adenosiin-4'-dehüdroksümetüül-4'-karboksüülhappe jääk
- Ahx – 6-aminoheksaanhappe jääk
- AMSE – 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)selenofeen-2-karboksüülhappe jääk
- AMTH – 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)tiofeen-2-karboksüülhappe jääk
- ARC – adensiini-analoogi ja oligoarginiini konjugaat
- Arg – arginiin
- ATP – adenosiin-5'-trifosfaat
- BSA – veiseseerumi albumiin
- DTT – ditiotreitol
- ELISA – immunoensüümmeetod
- EM – emissioon
- EX – ergastus
- FA – fluorestsentsi anisotroopia
- FI – fluorestsentsintensiivsus
- FITC – fluorestseini isotiotsüanaat
- FP – fluorestsentspolarisatsioon
- FRET – Försteri resonantsenergia ülekanne
- HEPES – 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhappe
- HTS – kiirsõeluuring
- IC₅₀ – inhibiitori kontsentratsioon, mille juures toimub pool maksimaalsest inhibeerimisest
- K_d – tasakaaluline dissotsiatsioonikonstant
- LOD – tuvastuspiir
- LOQ – määramispiir
- Lys – lüsiin
- PK - proteiinkinaas
- PKA – cAMP-sõltuv proteiinkinaas
- TRL – aeglahutusega luminesstsents
- TWEEN-20 – polüoksüetüleen (20) sorbitaan monolaureaat

1. SISSEJUHATUS

Valkude fosforüleerimine on rakus toimuv posttranslatoorne modifitseerimine, mis otseselt või kaudselt mõjutab praktiliselt kõiki rakus toimuvaid biokeemilisi protsesse. Fosforüleerimist teostavad rakkudes transferaaside rühma kuuluvad ensüümid proteiinkinaasid, mis kannavad üle fosforüülrühma ATP-lt valgu aminohappe jäägi hüdroksüülrühmale. Sellega reguleeritakse valkude aktiivsust, mis omakorda reguleerib palju olulisi rakuprotsesse, sealhulgas rakkude kasvu ja paljunemist.

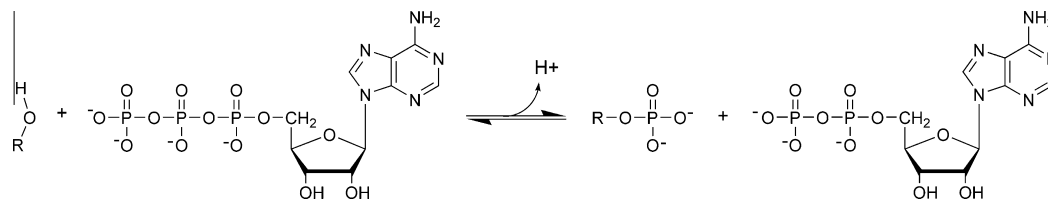
Mitmete raskete haiguste põhjuseks või tagajärjeks on ebanormaalne proteiinkinaaside aktiivsus. Seetõttu on ravimitena kasutatavad proteiinkinaaside inhibiitorid saanud ravimitööstuses oluliseks sihtmärgiks. Proteiinkinaaside väärtalitlusega seotud haiguste raviks ja diagnoosimiseks on vajalikud meetodid proteiinkinaaside aktiivsuse määramiseks. Tartu Ülikooli meditsiinilise keemia uurimiserühmas välja töötatud adenosüüli analoogist ja peptiidi konjugaadist koosnevad ARC-tüüpi bisubstraadsed inhibiitorid on sihtmärkvalkude suhtes erakordselt hea afiinsusega, keemiliselt ja bioloogiliselt stabiilsed ning läbivad raku plasmamembraani. Need omadused säilivad ka mitmete struktuurimodifikatsioonide läbiviimisel, mis võimaldab ARC-tüüpi ühenditele näiteks fluorofoori või mõne muu funktsionaalrühma lisamist. See loob erinevaid võimalusi ARC-ide rakendamiseks proteiinkinaaside uurimiseks ja diagnostilistes meetodites.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida ARC-Lum(Fluo) tüüpi sondide rakendatavust immobiliseeritud meetodi ülesehituses. Töö käigus optimeeriti katsetingimusi ja uuriti sellise meetodi võimekust määrata erinevate proteiinkinaaside aktiivset kontsentratsiooni proovist.

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1 Proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid on ensüümid, mis katalüüsivad ATP terminaalse fosforüülrühma ülekannet valgu aminohappe jäägi hüdroksüülrühmale. Selle reaktsiooniga reguleerivad proteiinkinaasid lugematut hulka rakuprotsesse, sealhulgas metabolismi, transkriptsiooni, rakutsükli, diferentseerumist ja apoptoosi. Samuti on valkude fosforüleerimisel oluline roll rakkudevahelises kommunikatsioonis, homöostaasis, närvi- ja immuunsüsteemi toimimises. [1][2]



Joonis 1. Proteiinkinaaside katalüüsitud reaktsioon: fosforüülrühma ülekanne ATP-lt valgu aminohappe jäägile (R). [3]

Proteiinkinaasid on üks suurimaid eukarüootide geeniperekondi, moodustades ligikaudu 2% inimgenoomist. Inimese proteiinkinaaside kogumis ehk kinoomis on 90 aminohappe türosiini jääki fosforüleerivat kinaasi, kuid suurem osa proteiinkinaasidest fosforüleerib seriini või treoniini jääke. Mõned proteiinkinaasid võivad fosforüleerida nii türosiini kui ka seriini/treoniini jääke. Proteiinkinaasid liigitatakse katalüütilise domeeni struktuuri ja biokeemilise funktsiooni järgi seitsmesse suuremasse rühma: TK (türosiinkinaasid), TKL (türosiinkinaasi sarnased), STE, CK1, AGC (PKA, PKG, PKC perekondadesse kuuluvad seriini/treoniini kinaasid), CAMK ja CMGC. Lisaks on 40 atüüpilist kinaasi, mille järjestus ei sarnane ühegi tüüpilise kinaasiga, kuid mille puhul eeldatakse või teatakse, et esineb ensümaatilist aktiivsust. [1]–[3]

Üks põhjalikult uuritud ja selge aktivatsioonimehhanismiga ja paremini kirjeldatud proteiinkinaaside perekonna liikmeid on AGC kinaaside rühma kuuluv basofiilne cAMP-sõltuv proteiinkinaas (PKA). PKA koosneb kahe reguleeriva alaühiku dimeerist ja kahest katalüütilisest alaühikust. Kahe cAMPi molekuli seondumisel kummagi reguleeriva alaühikuga muutub PKA katalüütiliselt aktiivseks. Seejärel saab toimuda gamma-

fosforüülrühma ülekannet nukleotiidilt (enamasti ATP) valksubstraadi seriini- või treoniini jäägile. Proteiinkinaaside substraatidel ei ole kindlat seostumise järjekorda, kuid kõrget rakusisest ATP kontsentratsiooni arvestades eeldatakse, et tüüpiliselt seostub ATP esimesena. [4][5]

Suure osaluse tõttu raku elutegevuse reguleerimises on proteiinkinaaside väärtalitus otseselt seotud väga paljude tõsiste haigustega, näiteks diabeedi, Alzheimeri tõve ning vähi erinevate vormidega, mistõttu on ravimitööstuse oluliseks sihtmärgiks saanud nende ensüümide inhibiitorite arendus potentsiaalsete ravimitena. Sellega on kaasnenud suurenenud vajadus proteiinkinaaside ja nende inhibiitorite uurimise ja iseloomustamise meetodite väljatöötamiseks ja täiustamiseks. [3][6]

2.2 Proteiinkinaaside inhibiitorid

Erinevate molekulide ja ionide seostumine proteiinkinaasidele võib pöörduvalt või pöördumatult inhibeerida nende ensüümide aktiivsust. Erinevalt pöördumatu inhibeerimise mehhanismist toimub pöörduva inhibeerimise puhul moodustuva ensüüm-inhibiitor kompleksi dissotsiatsioon. Lähtuvalt ensüümi ja inhibiitori vahelise interaktsiooni olemusest ja kineetikast jagatakse pöörduvad inhibiitorid konkurentseteks, ebakonkurentseteks, mittekonkurentseteks ja segatüüpi inhibiitoriteks. Proteiinkinaaside konkurentsed inhibiitorid jagunevad omakorda kinaasiga seostumise asukoha järgi ATP-konkurentseteks, valksubstraadi-konkurentseteks ning bisubstraatseteks inhibiitoriteks. [7]

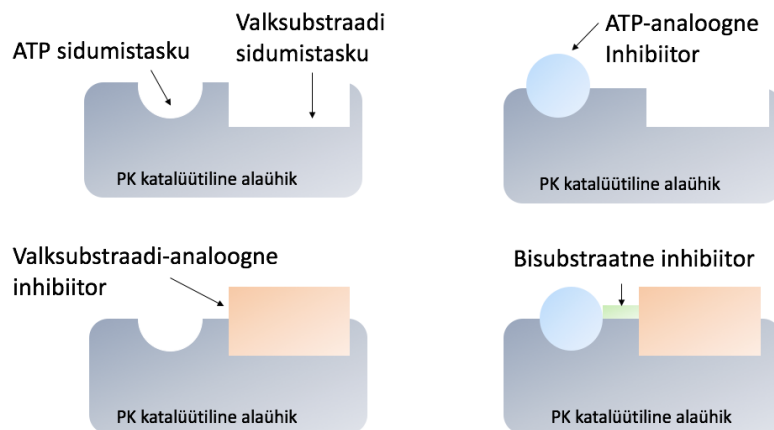
Proteiinkinaaside inhibiitoreid on potentsiaalselt võimalik kasutada vähktõve ja mitmete teiste raskete haiguste ravis ning diagnostikas. Ameerika Ühendriikide toidu- ja raviameti poolt on ravimina kinnitatud 28 väikese molekulmassiga kinaasi inhibiitorit, millest 27 on kasutusel vähiravis. Lisaks on suur vajadus mitteinvasiivsete molekulaarsete testide järele, mis võimaldaks diagnoosida haigusi juba varajases staadiumis või avastada nende tekkimise riski. [8]–[10]

Suurem osa proteiinkinaaside inhibiitorite arendusest on hetkel suunatud nukleotiidi taskusse seostuvatele ühenditele. Kuigi ATP-analoogsete inhibiitorite arendus on osutunud võrdlemisi edukaks, on vajalike omadustega inhibiitorite väljatöötamine mitmetel põhjustel raskendatud. Inhibiitorid peavad konkureerima kõrge rakusisese ATP kontsentratsiooniga, lisaks on vaja

saavutada väga kõrge selektiivsus sihtmärgi suhtes, et vältida inhibiitori seostumist teiste ATP-d siduvate valkudega. Sõltuvalt proteiinkinaasi struktuurist, võib selle ATP-tasku olla osaliselt blokeeritud või varjatud, mis võib muuta sellised kinaasid inhibeerimisele resistentseks. [11]-[13]

Peale ATP-konkurentsete inhibiitorite on arendatud valksubstraadiga konkurentseid inhibiitoreid. Valksubstraadi taskusse suunatud inhibiitoritega on võimalik saavutada kõrge selektiivsus, kuid inhibeerimisvõime on üldjuhul nõrgem võrreldes nukleotiidi analoogidega. Lisaks on sageli vajalikud pikad peptiidstruktuurid, mis vähendavad ühendi stabiilsust ja raskendavad transporti raku. [11][14]

Bisubstraatsed inhibiitorid on suunatud korraga nii nukleotiidi kui valksubstraadi sidumistaskusse, mis võimaldab oluliselt tõsta inhibeerimise võimekust ja selektiivsust. Bisubstraatsed inhibiitoreid on võimalik arendada ühe konkreetse kinaasi või kinaasi perekonna suhtes spetsiifiliseks, mis vähendab mittespetsiifilise sidumisega seotud kõrvalnähte. Bisubstraatsete inhibiitoritega on saavutatud väga hea afiinsus, selektiivsus ja keemiline stabiilsus, mis võimaldab nende edukat ja mitmekülgset kasutamist erinevates ensüümide uurimise meetodites. Raku- ja koetasandil läbi viidud katsed on näidanud ühendite potentsiaali rakkudes ja molekulaardiagnostilistes rakendustes. [11] [12] [15] [16]

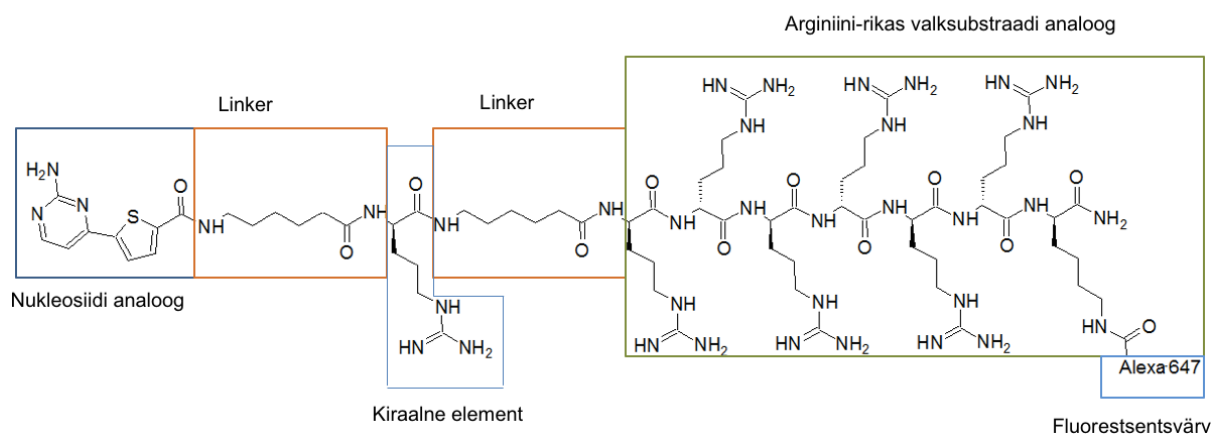


Joonis 2. Proteiinkinaasi katalüütilise alaühiku skemaatiline kujutis (A), ATP-konkurentne proteiinkinaasi inhibiitor (B), valksubstraadi-konkurentne proteiinkinaasi inhibiitor (C), bisubstraatne inhibiitor (D). Kui vähemalt üks proteiinkinaasi sidumistaskust on inhibiitoriga hõivatud, siis fosforüülrühma ülekannet ei toimu.

2.3 ARC-tüüpi inhibiitorid

Üheks proteiinkinaaside bisubstraatsete inhibiitorite tüübiks on substraatide analoogsed fragmendid, mida ühendab omavahel mittefosfaatne linker. ARC-tüüpi ühendid on adensiini või mõne teise ATP-ga konkurentse inhibiitori ja oligopeptiidi (sageli oligoarginiini) derivaadid, mis on ühendatud ühe või mitme linkeriga (Joonis 3).

Transportvalgu omadustega oligoarginiini kasutamine on oluliselt suurendanud ühendi plasmamembraani läbimisvõimet ja L-aminohapete asendamine D-aminohapetega proteolüütilist stabiilsust rakukeskkonnas. [15]



Joonis 3. ARC-1063 struktuur. Adensiini analoog ja arginiini-rikas peptiid on ühendatud ühe või mitme linkeriga. Konkreetsele ARC-tüüpi ühendile on lisatud fluorestsentsvärv Alexa Fluor 647

Suurem osa ARC-tüüpi inhibiitoritest on selektiivsed AGC ja CAMK gruppidesse kuuluvate basofiilsete kinaaside suhtes, aga arendatud on ka teiste basofiilsete ja atsidoofiilsete kinaaside suhtes selektiivseid ARC-tüüpi inhibiitoreid. [17] [18]

Mõne kinaasi suhtes on saavutatud erakordselt kõrge pikomolaarne afiinsus, mis ei vähene oluliselt ka erinevate struktuurimodifikatsioonide läbiviimisel. See võimaldab näiteks fluorestsentsmärgise (Fluo) või biotiini (BTN) lisamist ARC-tüüpi ühenditele, mis omakorda suurendab võimalusi ARC-sondide kasutamiseks erinevates biokeemilistes ja biofüüsikalistes katsetes ja meetodites. [6] [19] [20]

2.3.1 ARC-Lum(Fluo) sondid

ARC-Lum sondid on ARC-tüüpi inhibiitorid, mille adenosiini analoogi struktuuris sisaldub selenofeeni või tiofeeni fragment, ARC-Lum(Fluo) sondid sisaldavad lisaks fluorestsentsmärgist. Proteiinkinaasidega seostunult tekib pärast kompleksi ergastust FRET-i tagajärjel pika elueaga luminesentssignaal. Selenofeeni või tiofeeni sisaldav fragment (doonor) läheb ergastamisel üle tripletsesse olekusse ning relakseerumisel kandub energia mittekiiruslikult üle aktseptorile, milleks on konjugeeritud fluorestsentsvärv. Aktseptori relakseerumisel toimub kiirguse emissioon, mille intensiivsust mõõdetakse aktseptori iseloomulikus lainepikkuste vahemikus. Vabal sondil on tekkiv luminesentssignaal puhverlahuse taustaga võrreldav, samas kui sihtmärkvalguga seostumisel suureneb signaal 50-2500 korda. Kirjeldatud omadused võimaldavad ARC-Lum(Fluo) sondide kasutamist fluorestsentsmärgistamata konkurentsete inhibiitorite afiinsuste ja kinaasi aktiivse kontsentratsiooni määramiseks. ARC-Lum(Fluo) sondide kasutamisel põhinevad meetodid on kiired, tundlikud ja võimaldavad vältida antikehade, substraatide või muude kallite ja keerukate reagentide kasutamist. [19][21]

2.4 Luminesents ja luminesentsmeetodid proteiinkinaaside uurimiseks

Luminesents on ühendi emiteeritud valgus, mis kaasneb elektroni relakseerumisega kõrgemalt energianivoolt madalamale. Üks paljudest luminesentsi alaliikidest on fotoluminesents, mille korral ergastub ühend neelatud footonite toimel ning seejärel kiirgab osa energiast tagasi. Sõltuvalt ergastatud oleku iseloomust jagatakse fotoluminesentsi fluorestsentsiks ja fosforestsentsiks. Kui fluorestsentsi puhul toimub elektroni üleminek põhiolekust ergastatud singletsesse olekusse ja tagasi põhiolekusse, siis fosforestsentsi kirjeldatakse kui elektroni üleminekut singletsest olekust tripletsesse olekusse, kus elektroni spinn muutub põhioleku elektroniga samasuunaliseks. Tagasimineku põhiolekusse on seetõttu kineetiliselt pidurdatud, mis tingib võrdlemisi pika, mikro- või millisekundites mõõdetava fosforestsentsi eluea. [22][23]

Ühendit, mis spetsiifilisel lainepikkusel neelab energiat ning seejärel kiirgab valgust tagasi teises, kuid samuti kindlas lainepikkuste vahemikus, nimetatakse luminofooriks. Neelatud energia hulk ja lainepikkus sõltuvad nii luminofoori iseloomust kui ka keemilisest

keskkonnast, kuid valguskvandi neeldumine toimub alati lühematel lainepikkustel ja kõrgemal energial kui emissioon. Seda ergastus- ja emissioonimaksimumide erinevust nimetatakse Stokesi nihkeks. Sõltuvalt ergastatud olekust ja relakseerumise kiirusest on luminofoorid jagatud lühikese, 1-100 nanosekundi pikkuse eluaega fluorofoorideks ja pikema, mikrosekundites mõõdetava eluaega fosfoorideks. [22][24]

Luminofoori derivaadi kovalentne sidumine sihtmolekuli külge ehk luminesentsmäärgistamine võimaldab kasutada luminesentsmeetodeid huvipakkuvate bioloogiliste molekulide asukoha määramiseks, liikumise, struktuurimuutuste ja teiste molekulidega interakteerumise jälgimiseks nii *in vitro* kui *in vivo*. [23] [25] [26]

2.4.1 Fluorestsentsanisotroopia

Tavalise valgusallika kiiratavad valguslained on orienteeritud juhuslikult, valguse juhtimisel läbi optilise filtri (polarisaatori) muutub valgus polariseerituks ehk selekteeritakse välja valguslained kindla võnkumise suunaga.

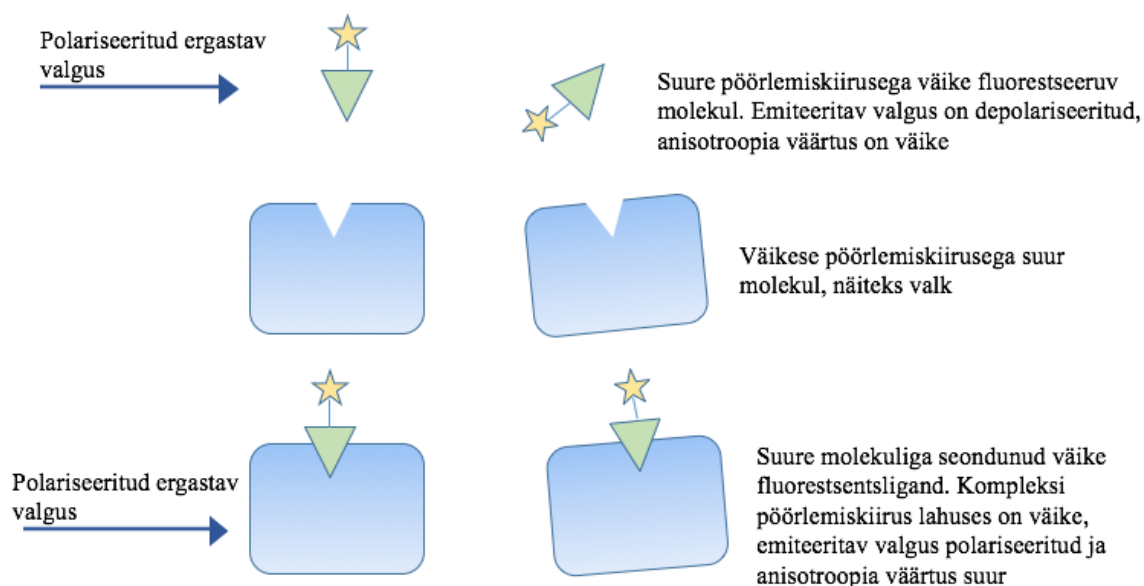
Fluorofooride ergastamisel polariseeritud valgusega on emiteeritav valgus osaliselt depolariseeritud. Kui rotatsiooniline korrelatsiooniaeg on palju väiksem fluorestsentsi elueast, on emiteeritav valgus täielikult depolariseeritud, aeglase rotatsiooni puhul on kiirataav valgus tugevalt polariseeritud.

Fluorestsentsi anisotroopia (FA) leitakse valemist

$$FA = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} + 2I_{\perp}} \quad (1),$$

kus FA on anisotroopia, I_{II} vertikaalselt ja I_{\perp} horisontaalselt polariseeritud valguse intensiivsus, kui proovi ergastatakse vertikaalselt polariseeritud valgusega.

Molekuli pöörlemise kiirus ja seega ka anisotroopia sõltuvad molekuli suurusest, temperatuurist ja lahuse viskoossusest. Seega pöörduvad väiksed fluorestsentsmäärgistatud molekulid lahuses kiiresti ning emiteeritav valgus on tugevalt depolariseeritud, samas kui suure biomolekuli või pinna külge seostunult muutub rotatsioon palju aeglasemaks ning kiirataav valgus on neelatud valgusega samasuunaline (Joonis 4). Seda omadust on võimalik kasutada erinevate biomolekulide vaheliste interaktsioonide uurimiseks. [23]



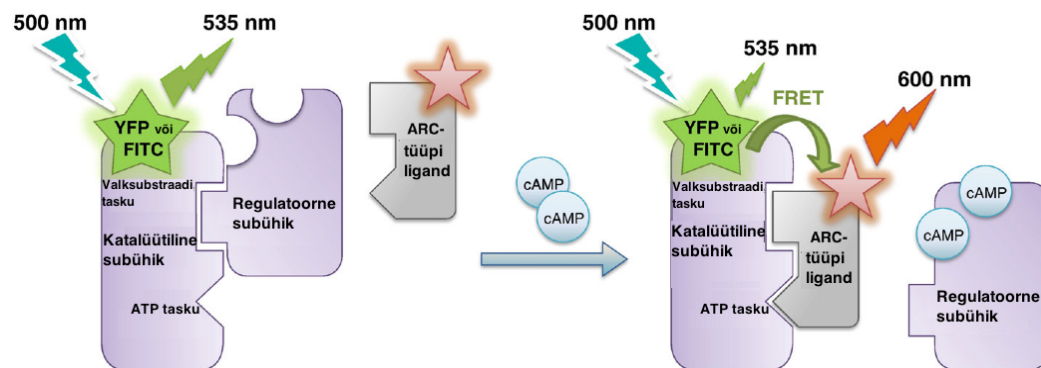
Joonis 4. Väikese vaba osakese pöörlemiskiirus lahuses on suur ja emiteeritav valgus tugevalt depolariseeritud. Suure molekuliga seondumisel anisotroopia väärtus kasvab märgatavalt, kuna kompleksi pöörlemiskiirus on väike ja emiteeritav valgus on polariseeritud.

FA meetod on kiire, tundlik ja lihtsasti automatiseeritav ning seetõttu hästi sobilik kiirsõeluuringu (HTS) meetodiks. Lisaks on see mittedestruktiivne ega nõua vaba ja seotud ligandi eraldamist. HTS meetodina kasutamiseks nõuab FA kõrget ligandi afiinsust kinaasi suhtes või kinaasi kõrget kontsentratsiooni. FA-põhised meetodid pole hästi kasutatavad bioloogilistes lahustes, mis sisaldavad suurel hulgal mittespetsiifilist sidumist põhjustavaid valke. [6][27]

2.4.2 Försteri resonantsenergia ülekanne

Försteri resonantsenergia ülekanne (FRET) tekib ergastatud olekus doonormolekuli ja tavaolekus aktseptormolekuli vahel. Kui doonormolekuli poolt emiteeritava valguse lainepikkus kattub vähemalt osaliselt aktseptormolekuli neeldumisspektriga, toimub energiaülekanne dipool-dipool interaktsiooni tulemusel ilma footoni tekketa. Energiaülekanne efektiivsus sõltub doonori kiirgusspektri ja aktseptori neeldumisspektri kattuvusest, dipoolide orienteeritusest ja doonori ning aktseptori vahelisest kaugusest. FRET on levinud fluorestsentsmeetod, mis leiab rakendust meditsiinidiagnostikas, DNA analüüsides ja muudes

valdkondades. Enim levinud on FRET-i kasutamine molekulidevahelise või makromolekuli erinevate osade vahelise kauguse mõõtmiseks. Kui molekulis on ainult üks doonor-aktseptor paar ning nende omavaheline kaugus jääb ergastatud oleku eluea jooksul muutumatuks, saab seda kaugust määrata energiaülekanne efektiivsuse põhjal. Molekulidevaheliste vastastikmõjude uurimiseks on võimalik märgistada individuaalsed molekulid kas doonori või aktseptoriga ning nende omavahelisi interaktsioone FRET-i abil jälgida. [22][28][29]



Joonis 5. Försteri resonantsenergia ülekanne YFP- või FITC-märgistatud proteiinkinaasi (doonor) ja fluorestsentsmärgistatud ARC-tüüpi sondi (aktseptor) vahel. Doonori ja aktseptori lähenemisel ja FRET-i toimumisel väheneb doonori ja suureneb aktseptori kiirguse intensiivsus. [5]

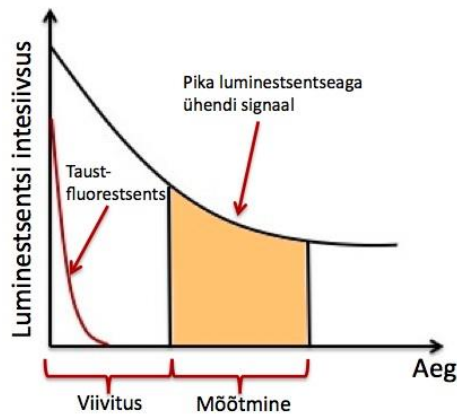
Resonantsenergia ülekannet on võimalik kasutada ka rohkem kui ühe doonor-aktseptorpaariga süsteemide puhul.

Kaugust, mille puhul resonantsenergia ülekande efektiivsus on 50%, nimetatakse Försteri raadiuseks, mis jääb üldjuhul 2-6 nm vahele. See on hästi sobiv biomolekulide uurimiseks, kuna on võrreldavas suurusjärgus bioloogiliste molekulide suurusega. [23][28]

2.4.3 Luminestsentsi aegviivitusega mõõtmine

Erinevates valdkondades laialdaselt kasutatavate fluorestsentsmeetodite puhul on oluline eraldada spetsiifiline signaal mittespetsiifilisest taustsignaalist ja sageli osutub taustamüra täielik eemaldamine praktiliselt võimatuks. Aeglahutusega luminestsentsi (TRL) puhul on võimalik kasutada proovi ja taustfluorestsentsi eluigade erinevust ning saavutada palju suurem tundlikkus, kui seda võimaldavad teised fluoromeetrilised meetodid. [30]

TRL mõõtmise käigus ergastatakse proov ning pärast mõningast viivitust kogutakse signaal luminofoori elueast sõltuva pikkusega mõõteaknas (Joonis 6). Kuna mõõtmist alustatakse ergastuse hetkest mõne aja möödudes, ei detekteerita ergastavat valgust ega palju kiiremini kustuvat taustsignaali, mis üldjuhul koosneb orgaaniliste ühendite lühikese elueaga fluorestsentsist või rakkude autofluorestsentsist. [19] [23] [29]



Joonis 6. TRL-i mõõtmisel järgneb ergastusele ajaline viivitus, mille jooksul jõuab kustuda taustfluorestsents. Signaal detekteeritakse valitud pikkusega mõõteaknas. [14]

Meetodi tundlikkus ja taustmüra vältimise võimalus teeb TRL-ist mugava meetodi ka bioloogilistes lahustes ja rakkudes kasutamiseks. [19]

2.4.1 ELISA

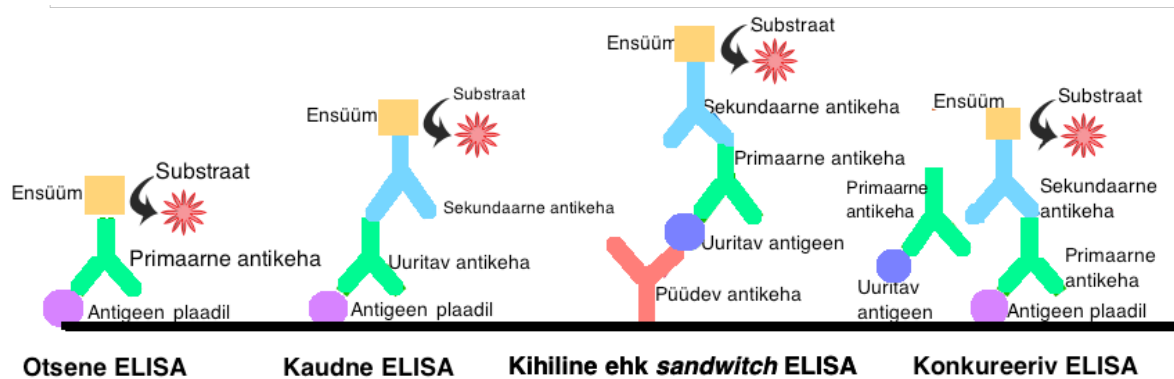
Immunoensüümmeetodit ehk ELISA-t kasutatakse valkude, antikehade, antigeenide, hormoonide jm avastamiseks ja kvantitatiivseks määramiseks bioloogilistest proovidest. Meetod baseerub immobiliseeritud ensüümi kasutamisel ja eristatakse nelja põhilist ELISA tüüpi: otsene, kaudne, konkureeriv ja kihiline ehk *sandwich* ELISA (Joonis 7). [32][33]

Antikeha tuvastamiseks on kasutatav kaudne ELISA. Plastaluse põhja kinnitatakse antigeen, mille suhtes kasutatakse selektiivset antikeha. Antikeha lisamisel seostub see antigeenile. Seejärel lisatakse ensüüm-seotud antikeha, mille antigeeniks on eelnevalt lisatud antikeha. Pesemisega eemaldatakse seostumata reagentid ja lisatakse substraat, mis ensüümi toimel muutub värviliseks produktiks või tekib fluorestsentsisignaal. Värvuse või signaali intensiivsus on võrdeline uuritava antikeha hulgaga. [7][32][34]

Otsese ELISA puhul puudub sekundaarse antikeha lisamise etapp. Plaadile seostunud antigeenile lisatakse otse ensüüm-aktikeha kompleks ja seejärel ensüümi substraat.

Kihiline ELISA on kasutusel antigeeni määramiseks. Alusele kinnitatakse antikeha, millele lisatakse uuritavat antigeeni sisaldavat lahust. Seejärel lisatakse teine antikeha, mis seondub antigeeniga paralleelselt esimese antikehaga ning edasi toimib test analoogselt kaudse ELISA-ga. [7][35]

Konkureeriva ELISA puhul kantakse primaarne märgistamata antikeha uuritava antigeeni juuresolekul sama antigeeniga funktsionaliseeritud pinnale. Mida enam sisaldab uuritav proov antigeeni, seda vähem antikeha seostub plaadi pinnale. Lisatakse ensüümseotud sekundaarne antikeha ja ensüümi substraat ning registreeritakse muutus signaalis. Konkureeriva ELISA puhul on muutus seda väiksem, mida rohkem on uuritavas proovis antigeeni. [33]



Joonis 7. ELISA tüübid: otsene, kaudne, kihiline ja konkureeriv ELISA

ELISA meetod on kasutusel nii kliinilises rakenduses kui ka teaduslaborites, samuti toiduainetööstuses ja toksikoloogias. Meetodi eelisteks on suur tundlikkus ja selektiivsus, suhteline lihtsus ja kiirus ning keeruka aparatuuri puudumine. Seda on võimalik kasutada keerukate bioloogiliste lahuste, näiteks vere ja uriini analüüsiks, kuigi fluoromeetrilise analüüsi puhul võib tugev taustfluorestsents mõõtmist segada. [21][32]

ELISA puudusteks on tugev sõltuvus antikehade kvaliteedist, mis teatud juhtudel võib anda valepositiivseid ja –negatiivseid tulemusi. Lisaks on meetod väga raskesti rakendatav süsteemides, kus soovitakse mõõta sadu valke samaaegselt, kuna sobivate antikehade arendus on kulukas ja keeruline ning meetod kaotab oma selektiivsuse. HTS uuringutes kasutamiseks on ELISA ka suhteliselt kalline. [33], [35]–[37]

3. EKSPERIMENTAALNE OSA

3.1 Kasutatud kemikaalid ja reagentid

Töös kasutati järgmisi kemikaale:

BSA, DTT, TWEEN-20 (Sigma-Aldrich);

HEPES (Santa Cruz Biotechnology);

NaCl (Lach-Ner);

Biotin-FITC (Biotin-AnaSpec, Lot nr AA25832, FITC-AnaSpec, Lot nr CM17-069, funktsionaliseeris Kaido Viht);

Streptavidiin (Invitrogen, Lot 1075743A)

Kasutatud ARC-tüüpi ühendid:

ARC-744, ARC-745, ARC-746, ARC-1063, ARC-1139, ARC-902 inhibiitorid sünteesiti Tartu Ülikooli keemia instituudi Asko Uri uurimisrühmas. ARC-tüüpi ühendite struktuurid on esitatud tabelis 1. Töös enim kasutatud ühendite struktuuride kujutised on toodud lisa 1.

Struktuuride kujutamiseks on kasutatud MarvinSketch 17.1.30 tarkvara.

Tabel 1. Töös kasutatud ARC-tüüpi ühendite koodid ja struktuurid.

ARC-sond	Struktuur
ARC-744	AMSE-Ahx-DArg-Ahx-(DArg) ₆ -DLys(PEG3000-biotin)-NH ₂
ARC-745	AMSE-Ahx-DArg-Ahx-(DArg) ₆ -DLys(PromoFluor-647)-DLys(PEG3000-biotin)-NH ₂ *
ARC-746	AMTH-Ahx-(DArg) ₆ -DLys(PromoFluor-647)-DLys(PEG3000-biotin)-NH ₂ *
ARC-902	Adc-Ahx-(DArg) ₆ -NH ₂
ARC-1063	AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg) ₆ -DLys(AlexaFluor-647)-NH ₂ *
ARC-1139	AMSE-Ahx-DArg-Ahx-(DArg) ₆ -DLys(PromoFluor-647)-NH ₂

* töös kasutatud ARC-tüüpi inhibiitorid, mille struktuuride kujutised on esitatud lisa 1.

Töös kasutatud ensüümid:

PKA (Biaffin GmbH&Co KG, Lot nr 260204);

MSK1 (Millipore, Lot nr 1582993);

ROCK2 (Carna Bioscience, Inc, Lot nr 09CBS-0956)

PKB γ (toodetud koostöölaboris NorStruct Taavi Ivani poolt)

3.2 Kasutatud puhvrid

Töös kasutati järgmisi puhverlahuseid:

NaHEP-T: 50mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20, pH 7.5;

NaHEP-T-BSA-DTT: 50mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20, 5mM DTT, 5% BSA, pH 7.5

3.2 Aparatuur ja töövahendid

Kasutatud aparatuur:

FI, FA ja TRL mõõtmised teostati PHERAstar mikroplaadi lugejal (BMG Labtech) kasutades optilisi mooduleid FP (EX 590 nm; EM 675 nm) ja HTRF (EX 337 nm; EM 675 nm). Aegviivitusega luminesentsi mõõtmise puhul kasutati viivitust 60 μ s, 200 ksenoonvälklambi sähvatust ja eluarea mõõtmisel 10 μ s pikkust intervalli.

UV-Vis spektrid mõõdeti spektrofotomeetriga NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), mille optiline teepikkus $l=0,1$ cm

Kasutatud ainete molaarsed neeldumiskoeffitsiendid:

$$\epsilon(\text{ARC-1063})=250000 \frac{1}{M \times cm};$$

$$\epsilon(\text{ARC-1139})=250000 \frac{1}{M \times cm};$$

$$\epsilon(\text{ARC-745})=250000 \frac{1}{M \times cm};$$

$$\epsilon(\text{ARC-746})=250000 \frac{1}{M \times cm}.$$

Lahuste inkubeerimiseks kasutati THERMOstar mikroplaadi inkubaatorit.

Kasutatud töövahendid:

384 pesaga mikrotiiterplaat (Corning, Cat. No 4514);

Streptavidiin 384 pesaga mikrotiiterplaat (Greiner Bio-One, Cat. No. 781997), mille streptavidiiniga kaetud ruumala on 90 μ l pesa kohta ja biotiini sidumisvõime > 6pmol/pesa.

Andmete analüüsimiseks kasutati GraphPad Prism 5.0 ja Microsoft Office Excel 2016 tarkvara

3.3 Kinaaside aktiivsuse määramine

Aktiivse kinaasi kontsentratsiooni määramiseks kasutati FA ja TRL meetodeid, mille teoreetilised alused on kirjeldatud vastavalt kirjanduse ülevaate punktides 2.4.1 ja 2.4.3. Corning 384 mikrotiiterplaadil lisati kinaasi (PKA, MSK1, ROCK2, PKB γ) kahekordsele lahjendusseeriale ARC-1063 lahus (ruumala kokku 20 μ l). Lahused inkubeeriti 15 minutit 30 °C juures.

Kõik lahjendused tehti Na-HEPES-T-BSA-DTT puhvis, sama puhvrit kasutati ka tühiproovina.

Mõõdetud FA ja TRL signaalide põhjal koostatud kõveratest leiti tegeliku ja oletatava aktiivse kinaasi kontsentratsioonide suhe k .

3.4 Biotinüleeritud ARC-Lum(Fluo) sondi afiinsuse määramine PKA suhtes

ARC-746 afiinsuse määramiseks PKA suhtes valmistati Corning 384 plaadil lahjendusseeriad fluorestsentsmärgistamata inhibiitorist ARC-902, ruumalaga 16 μ l pesa kohta. Kahele lahjendusseeriale lisati 4 μ l 10 nM ARC-746:PKA kompleksi ja kahele 4 μ l 10 nM ARC-1063:PKA kompleksi.

Mõõdeti proovide FA ja TRL signaalid PHERAstar mikrotiiterplaadilugejal. Saadud andmete põhjal leiti K_i ja IC_{50} väärtus ARC-902:PKA kompleksile ning arvutati K_d väärtus ARC-746:PKA kompleksile. K_i ja IC_{50} väärtuste vahelise seose teoreetilised alused on kirjeldatud viites [38].

3.5 Streptavidiinipinna sidumismahu määramine

Optimaalse biotinüleeritud ARC-Lum(Fluo) sondi pinnakontsentratsiooni määramiseks streptavidiiniga kaetud mikrotiiterplaadil kanti 10 µl 0,1-5 pmol ARC-745 ja ARC-746 Greiner-Streptavidin 384 süvendiga plaadile, inkubeeriti 20 minutit 30°C ja 300 RPM juures, pesti kolm korda Na-HEPES-T puhvriga ning mõõdeti TRL signaal PHERAStar mikroplaadi lugejal. Seejärel lisati igasse pessa 10 µl 2 nM PKA lahust ning mõõdeti uuesti TRL signaal. Kõik lahjendused tehti Na-HEPES-T-BSA-DTT puhvril. ARC-745 ja ARC-746 alglahuste kontsentratsiooni kindlakstegemiseks mõõdeti ainete neelduvused NanoDrop 2000c spektrofotomeetriga ning arvutati molaarne kontsentratsioon Lambert-Beer'i seadusest

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (2),$$

kus A on neelduvus, ε molaarne neeldumistegur ja c molaarne kontsentratsioon.

3.6 Inkubeerimisaja määramine

ARC-sondi pinnale sidumiseks vajaliku inkubatsiooniaja leidmiseks kanti 0,5 pmol ARC-tüüpi inhibiitorit Greiner-Streptavidin 384 mikrotiiterplaadile ning inkubeeriti 30 °C ja 300 RPM juures 1-60 minutit. Seejärel koguti lahused plaadilt, pesti kolm korda Na-HEPES-T puhvriga ja mõõdeti FI signaal kasutades optilist moodulit FP (EX 590 nm; EM 675 nm). Kõik lahjendused tehti Na-HEPES-T-BSA-DTT puhvril, plaadi pesemise jaoks kasutati Na-HEPES-T puhvrit.

3.7 Kinaaside kvantifitseerimine pinnal

Kinaaside määramiseks pinnal seoti biotinüleeritud ARC-tüüpi inhibiitor streptavidiiniga kaetud mikrotiiterplaadi pinnale, seejärel kanti pestud plaadile kinaaside lahjenduseeriad ning inkubeeriti 30 °C ning 300 RPM juures 20 minutit. Lahjenduste tegemiseks kasutati Na-HEPES-T-BSA-DTT, plaadi pesemiseks Na-HEPES-T puhvreid. TRL signaal mõõdeti PHERAStar mikrotiiterplaadi lugeja optilise mooduliga HTRF (EX 337, EM 675). Kinaasi kontsentratsiooniks arvestati samal päeval määratud aktiivse kinaasi kontsentratsioon. Kinaaside aktiivsed lõppkontsentratsioonid lahuses jäid vahemikku 0-120 nM.

3.8 Meetodi tuvastuspiiri ja määramispiiri leidmine

Meetodi tuvastuspiiri (LOD) ja määramispiiri (LOQ) leidmiseks iga uuritud kinaasi jaoks kasutati eelmises punktis kirjeldatud katses leitud aktiivse kinaasi kontsentratsiooni. Biotinüleeritud ARC-Lum(Fluo) inhibiitori ja kinaasi kompleksi TRL signaalide põhjal koostati kõverad ning nende lineaarsete alade põhjal arvutati LOD ja LOQ vastavalt valemite

$$LOD = \frac{3.3SD}{S} \quad (3)$$

$$LOQ = \frac{10SD}{S} \quad (4),$$

kus SD on tühiproovi standardhälve ja S on kalibreerimisgraafiku tõus. [39]

Tühiproovina kasutati pinnale kantud ARC-Lum(Fluo) sondi millele oli lisatud Na-HEPES-T-BSA-DTT puhver.

3.9 Funktsionaliseeritud pinna säilivus

Signaalide püsivust ajas kontrolliti kahe ajakatsesega. Esimeses katses kanti kahte pesasse 0,25 pmol ARC-745, inkubeeriti 20 minutit ja pesti puhvriga. Ühte pesasse kanti kinaasi lahus, teise puhver. TRL signaalid mõõdeti 3 tunni jooksul iga 30 minuti järel.

Teises katses kanti kahte pesasse 0,5 pmol ARC-745 ja inkubeeriti. Esimene pesa pesti ja eemaldati lahus, teine pesti ja lisati puhver. Nädal hiljem valmistati võrdluseks värske pinnaga pesa ning mõõdeti kolme pesa signaale puhvriga kaetult. Seejärel puhver eemaldati, lisati 2 nM PKA lahus ja mõõdeti uuesti TRL signaalid.

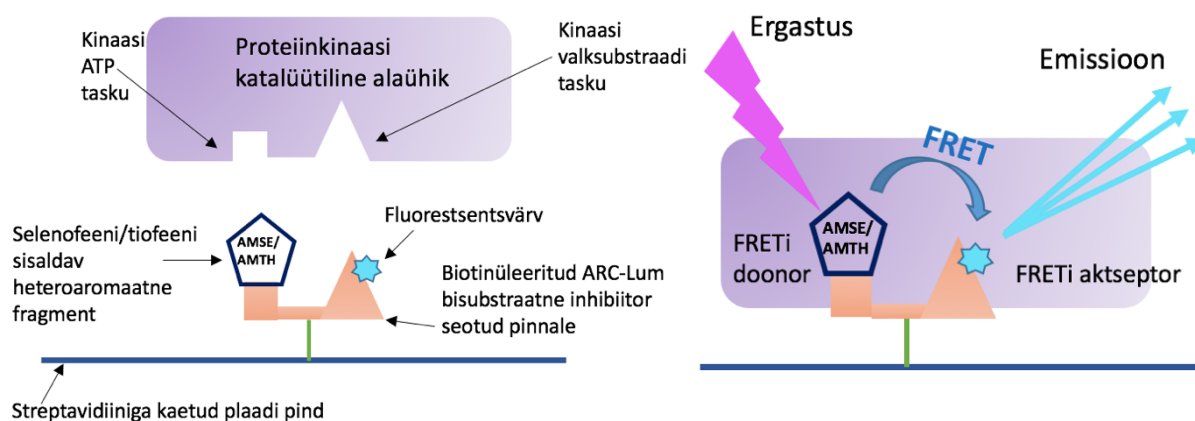
4. TULEMUSED JA ARUTELU

4.1 Töö eesmärk ja põhimõte

Töö eesmärgiks oli välja töötada meetod ARC-Lum(Fluo) sondiga funktsionaliseeritud streptavidiini pinnal aktiivse proteiinkinaasi hulga määramiseks. Luminestsentsomaduste tugev muutumine fluorestsentsmärgistatud ligandi seostumisel proteiinkinaasiga võimaldab kasutada meetodit proteiinkinaaside detekteerimiseks aegviivitusega luminestsentsi mõõtmise teel.

Fluorestsentsmärgistatud ja tiofeeni või selenofeeni fragmenti sisaldavate ARC-Lum(Fluo) sondide kasutamine võimaldab luminestsentsignaali võimendamist FRET-i mehhanismi kaudu. ARC-Lum(Fluo) tüüpi inhibiitori seostumisel kinaasi aktiivtsentrisse ja ergastamisel 337 nm juures käitub selenofeeni või tiofeeni sisaldav heteroaromaatne osa FRET paari doonorina ja aktseptoriks on fluorofoor, antud juhul PromoFluor 647 või AlexaFluor 647. Ergastamisel tekib doonoris pika eluea ja madala kvantsaagisega luminestsents, mis ergastab aktseptori ja detekteeritakse lühikese eluea ja kõrge kvantsaagisega fluorestsents (Joonis 8). FRET-i mehhanismi on täpsemalt kirjeldatud kirjanduse ülevaates (alapeatükis 2.4.2).

Vaba sond annab hapniku ligipääsul madala signaali, eelkõige molekulaarse hapniku fluorestsentsi kustutavate omaduste tõttu. Sihtmärkvalguga seondumisel on hapniku difusioon fluorofoorini takistatud ning signaal tõuseb mitusada korda. [19][40]

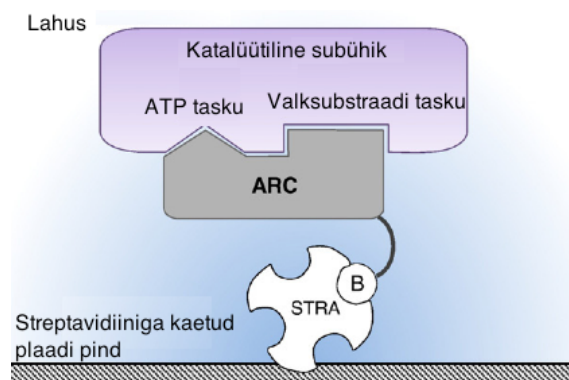


Joonis 8. Meetodi skemaatiline kujutis. Pinnale kinnitunud ARC-Lum(Fluo) sondile seostub lahusest proteiinkinaas. Ergastamisel tekib bisubstraatse inhibiitori ATP-analoogi selenofeeni või tiofeeni aromaatses süsteemis tripletne olek, seejärel toimub energiaülekanne fluorofoorile ning emiteeritav fluorestsents mõõdetakse.

ARC-Lum sondide kasutamine ja aegviivitusega luminesentsi intensiivsuse mõõtmine võimaldab saavutada kõrget signaali ja taustmüra suhet. ARC-Lum(Fluo) signaal on sõltuv kinaasi seostumisest, mis väldib teiste tuvastusreagentide kasutamise vajadust. Kuna ARC-tüüpi inhibiitoritega seostub vaid aktiivne kinaas, on võimalik antud meetodiga mõõta aktiivse ensüümi kontsentratsiooni, erinevalt näiteks antikehadel põhinevatest meetoditest, mida valdavalt kasutatakse proteiinkinaaside üldhulga määramiseks.

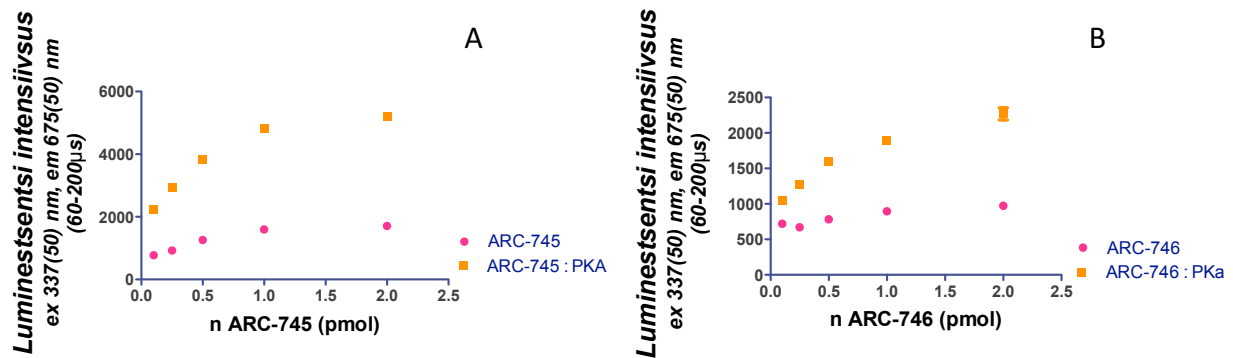
4.2 ARC-tüüpi inhibiitorite sidumine pinnale

ARC-tüüpi ühendite sidumiseks pinnale on kasutatud ühte tugevaimat mittekovalentset bioorgaanilist interaktsiooni, milleks on biotiini ja streptavidiini kompleks (Joonis 9).



Joonis 9. Biotinüleeritud ARC-tüüpi inhibiitor on seotud streptavidiiniga kaetud pinnale. [6]

Biotinüleeritud ARC-Lum(Fluo) sondide, ARC-745 ja ARC-746 optimaalse koguse määramiseks pinnal viidi läbi punktis 3.6 kirjeldatud katse. Streptavidiiniga kaetud plaadile kanti 0,1-2 pmol ARC-Lum(Fluo) inhibiitorit ja mõõdeti TRL signaal pärast kolmekordset pesemist. Seejärel lisati igasse pessa 10 µl 2 nM PKA-d, mõõdeti uuesti TRL signaal ja võrreldi signaalide intensiivsust (Joonis 10). Tulemuste põhjal arvatati protsentuaalsed erinevused kinaasita ja kinaasiga mõõdetud TRL signaalide vahel (Tabel 2).



Joonis 10. Sobiva ARC-Lum(Fluo) pinnakontsentratsiooni leidmiseks sooritatud katse. Pinnale kinnitatud biotinüleeritud vaba ARC-sondi ja ARC-sond:kinaas kompleksi TRL signaalide intensiivsus ARC-745 (A) ja ARC-746 (B) jaoks

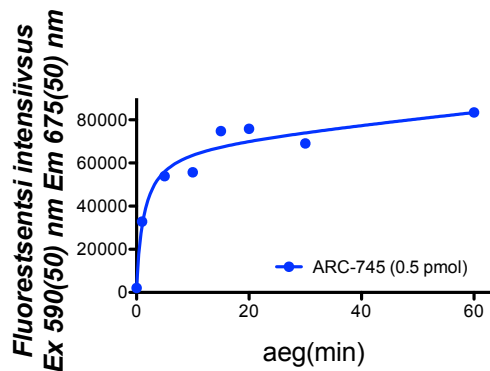
Tabel 2. Pinnakontsentratsiooni katses mõõdetud vaba sondi ja kinaasiga seostunud sondi signaalide protsentuaalne erinevus erinevate ARC-745 ja ARC-746 kontsentratsioonide juures.

Pinnale kantud sondi kogus (pmol)	Erinevus kinaasita ja kinaasiga mõõdetud TRL signaalide vahel (%)	
	ARC-745	ARC-746
0,1	65,0	31,3
0,25	68,5	47,4
0,5	67,2	51,1
1,0	66,9	52,5
2,0	67,3	57,1

Kuna protsentuaalne signaalide erinevus kasvas alates 0,5 pmol ARC-745 ja ARC-746 kogusest vähe, kasutati edasistes katsetes ARC-sondi 0,5 pmol süvendi kohta. ARC-745 ja ARC-745:PKA TRL signaalide erinevus oli võrreldes ARC-746 ja ARC-746:PKA signaalide erinevusega suurem, seetõttu kasutati katsetes valdavalt sondi ARC-745.

Ekspimentaalse osa punktis 3.6 kirjeldatud inkubeerimise ajakatse läbiviimisel selgus, et inkubeerides ARC-745 lahust streptavidiiniga kaetud mikrotiiterplaadil 30° C ja 300 RPM

juures kulub kogu ARC-sondi lahusest pinnale kinnitumiseks ligikaudu 20 minutit, kuna selle aja möödudes saavutab fluorestsentsintensiivsuse signaal platoo (Joonis 11). Edasistes katsetes inkubeeriti 20 minutit pärast ARC-tüüpi inhibiitorite lahuse kandmist plaadile.



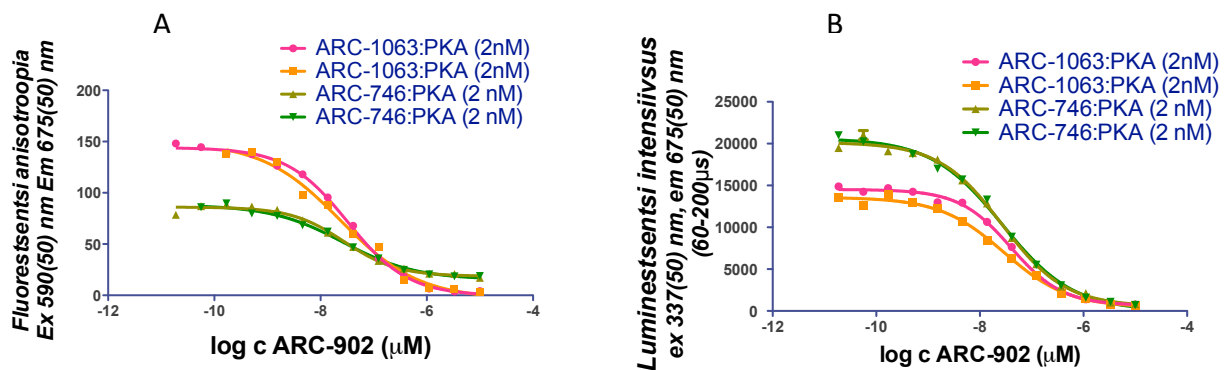
Joonis 11. Inkubeerimise ajakatse käigus mõõdetud fluorestsentsi intensiivsus 1-60 minutilise inkubeerimise aja juures

4.3 Biotinüleeritud ARC-Lum(Fluo) sondi afiinsuse leidmine PKA suhtes

ARC-1063 ja ARC-746 sondide struktuurid erinevad selle poolest, et ARC-746 korral on lisatud PEG3000-biotiin (Tabel 1 ja Lisa 1). Varasemalt on leitud ARC-1063 kõrge afiinsus PKA suhtes ($K_D = 15$ pM). [21]

Selleks, et määrata biotinüleeritud ARC-Lum(Fluo) inhibiitori ARC-746 afiinsust PKA suhtes, kasutati väljatõrjumise meetodit (kirjeldatud eksperimentaalse osa punktis 3.4).

Fluoresentsmärgistamata inhibiitori ARC-902 lahjendusseeriale lisati ARC-746:PKA või ARC-1063:PKA 2 nM kompleks. FA ja TRL mõõtmistest saadud andmete põhjal koostati väljatõrjumiskõverad (Joonis 12).



Joonis 12. ARC-746 afiinsuse määramine PKA suhtes. Fluorestsentsmärgistamata inhibiitori ARC-902 lisamisel saadud FA (A) ja TRL (B) signaalide põhjal koostatud väljatõrjumiskõverad

Väljatõrjumiskõverate alusel leiti IC_{50} väärtus, mille põhjal arvutati ja K_d väärtus ARC-902-PKA kompleksile. Fluorestsentsmärgistamata teadaoleva afiinsusega konkurentse inhibiitori kontsentratsiooni varieerimisel saab signaali muutuse põhjal iseloomustada ligandi ja kinaasi interaktsiooni ning arvutada K_d väärtuse uuritavale ligandi ja kinaasi kompleksile (Tabel 3).

Tabel 3. FA ja TRL meetodil leitud IC_{50} ja K_d väärtused ARC-902:PKA jaoks ning K_d väärtused ARC-746:PKA kompleksile

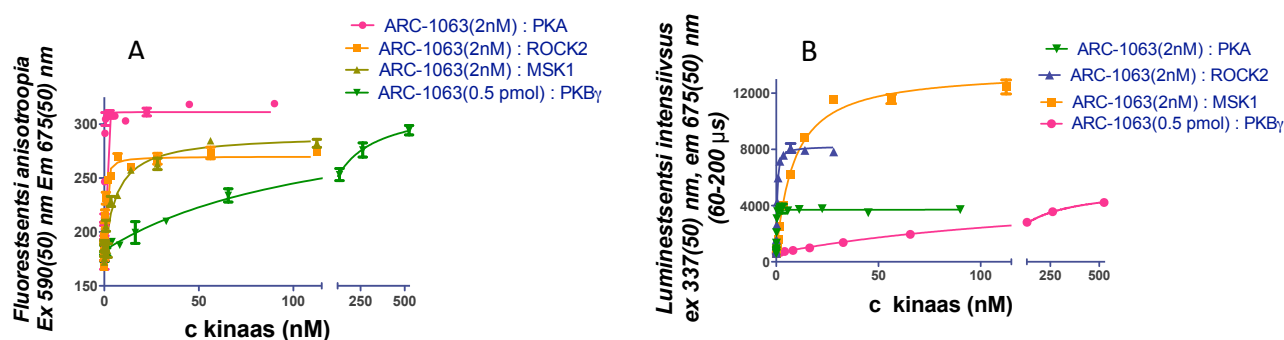
	FA	TRL
IC_{50} (ARC-902:PKA) (nM)	27,9	34,5
K_d (ARC-902:PKA) (nM)	0,32	0,4
K_d (ARC-746:PKA) (nM)	0,011	0,015

Leitud IC_{50} ja K_d väärtused langesid kokku varasemalt saadud andmetega. [20] ARC-1063 ja ARC-746 jaoks arvutatud afiinsused on PKA suhtes sarnased varasemalt leitud ARC-1063 afiinsusega PKA suhtes. Sellest võib järeldada, et PEG-biotiini lisamine ei ole avaldanud olulist mõju ligandi afiinsusele.

ARC-746 sondi afiinsused kinaaside MSK1, ROCK2 ja PKB γ suhtes määrati otsesidumise meetodil (Lisa 3).

4.4 Kinaaside aktiivsuse määramine lahuses

Kinaaside aktiivsus ajas reeglina langeb, mistõttu leiti aktiivse kinaasi kontsentratsioon lahuses enne kinaaside aktiivsuse määramise võimekust pinnal (alapeatükk 3.3). Corning 384 mikrotiiterplaadil lisati ARC-1063 lahusele lahendusseeriad kinaasidest MSK1, ROCK2, PKA ja PKB γ , mõõdeti kompleksite FA ja TRL signaalid ja koostati sidumiskõverad. (Joonis 13.)



Joonis 13. Fluorestsentsmärgistatud sondi ARC-1063 tiitrimine kinaasidega PKA, MSK1 ja ROCK2 ja PKB γ ning FA (A) ja TRL (B) signaalide põhjal saadud sidumiskõverad

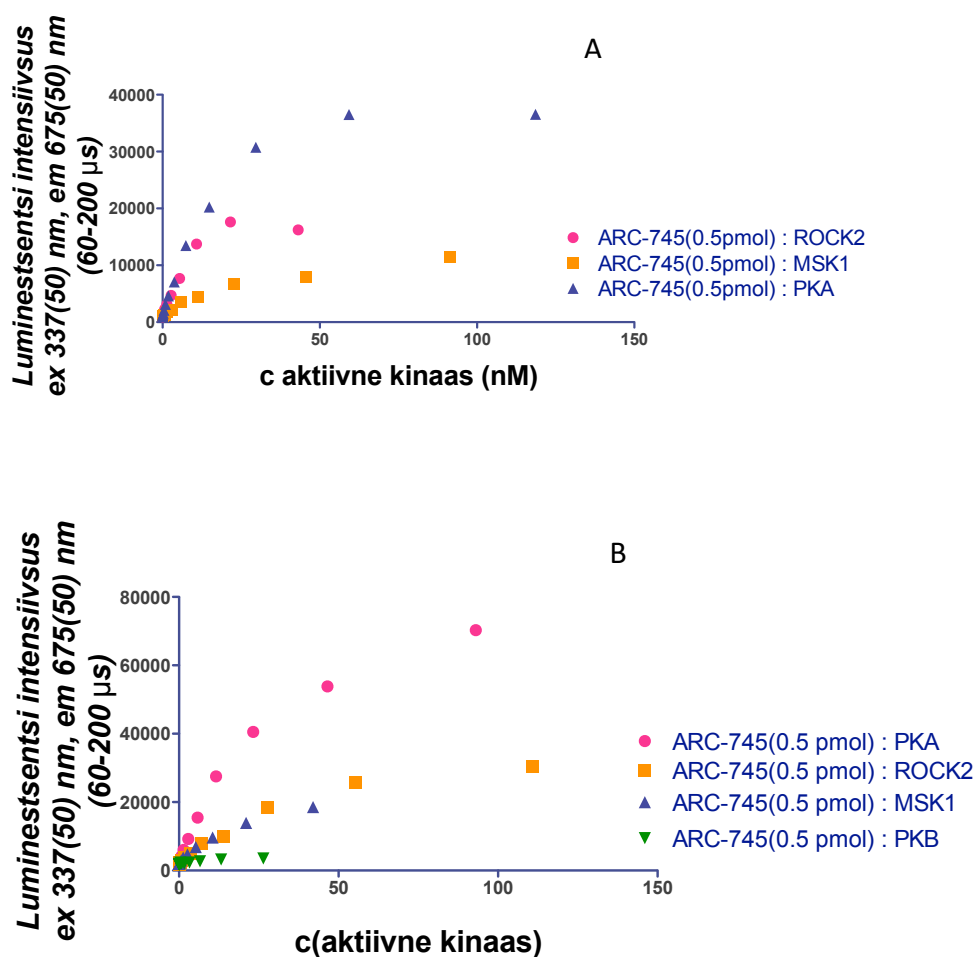
Sidumiskõverate põhjal arvutati uuritavate ensüümide jaoks tegeliku ja oletatava aktiivse kinaasi kontsentratsiooni suhe ehk k (Tabel 4), mida arvestati kinaaside aktiivsuse määramise katses immobiliseeritud ARC-sondiga. Katseid teostati kahel korral kinaasidega MSK1, ROCK2, ja PKA ning ühel korral PKB γ -ga.

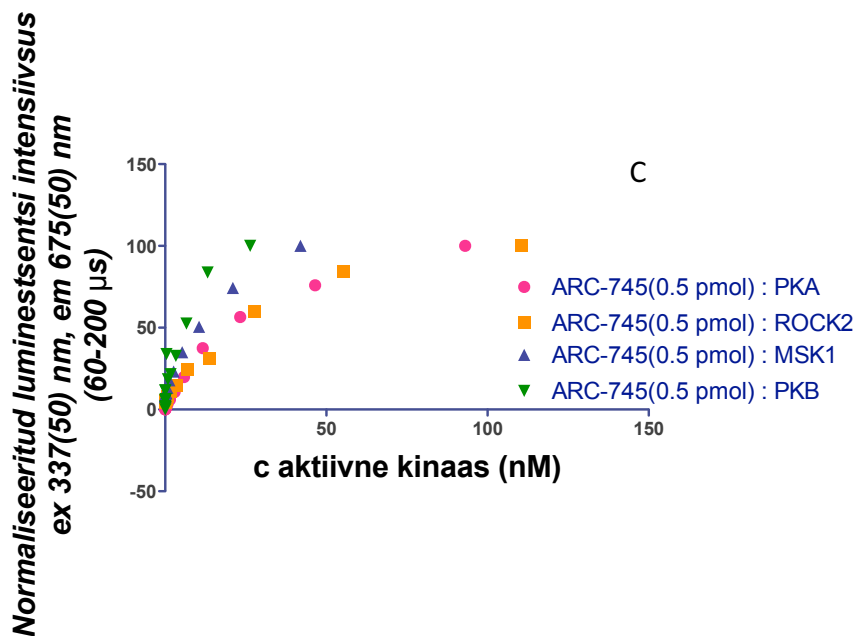
Tabel 4. Aktiivse kinaasi kontsentratsiooni määramisel saadud k väärtused kinaaside MSK1, ROCK2, PKA ja PKB γ jaoks esimesel (A) ning teisel (B) katsekorral. k =tegelik aktiivse kinaasi kontsentratsioon/oletatav aktiivse kinaasi kontsentratsioon.

kinaas	k	
	A	B
MSK1	0,31	0,28
ROCK2	0,14	0,73
PKA	0,30	0,78
PKB γ	-	0,04

4.5 Kinaaside aktiivsuse määramine ARC-Lum(Fluo) funktsionaliseeritud pinnal

Streptavidiiniga kaetud plaadile ARC-745 sidumise järel lisati eelnevalt valmistatud lahjendusseeriad kinaasidest MSK1, PKA, ROCK2 ja PKB γ . Pinnale seondunud ARC-Lum(Fluo) tüüpi inhibiitoriga seostub lahusest vaid aktiivne kinaas. Kuna ligand-ensüüm kompleksi fluorestsentsomadused erinevad oluliselt kinaasiga seostumata ligandist ja mõõdetav signaal on proportsionaalne seostunud kinaasi hulgaga, on seeläbi võimalik määrata kinaasi hulka. Proovide TRL signaalide mõõtmisest saadud andmetest koostati sidumiskõverad (Joonis 14). Kinaasi kontsentratsiooniks arvestati eelnevalt määratud aktiivse kinaasi kontsentratsioon. Katseid teostati kahel erineval päeval: esimesel korral kasutati kinaase PKA, MSK1 ja ROCK2, teisel korral kontrolliti meetodi rakendatavust lisaks kinaasi PKB γ jaoks.





Joonis 14. Kinaaside PKA, ROCK2, MSK1 ja PKB γ kvantifitseerimine ARC-Lum(Fluo)-funktsionaliseeritud pinnal. TRL signaalide sõltuvus kinaaside aktiivsest kontsentratsioonist plaadil esimesel mõõtmisel (A), korduskatsetel (B) ja korduskatsete tulemused normaliseeritud kujul (C).

Saadud kõverate lineaarsete alade (Lisa 2) tõusude (S) ja tühiproovide standardhälvete (SD) põhjal arvutati tuvastus- ja määramispiir iga kinaasi suhtes. Tühiprooviks arvestati 0,5 pmol ARC-745 pinnal, millele oli kinaasi lahuse asemel lisatud puhver. Meetodi tuvastus- ja määramispiirid on esitatud tabelis 5.

Tabel 5. Meetodi LOD ja LOQ väärtused esimesel (A) ja teisel katsel (B). Teisel korral lisati määratavate kinaaside hulka ka PKB γ .

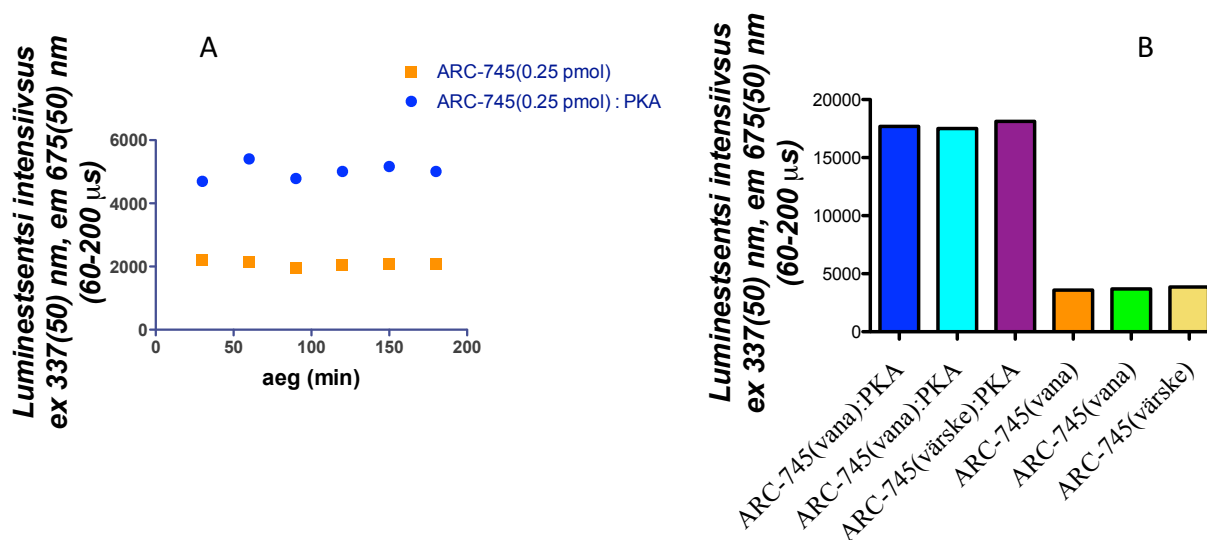
A				B			
	ROCK2	MSK1	PKA	ROCK2	MSK1	PKA	PKB γ
LOD							
pM	15	53	13	50	41	20	507
fmol	0,15	0,53	0,13	0,50	0,41	0,20	5,07
pg/ml	0,6	4,8	2,1	2,0	3,7	3,2	28,2
LOQ							
pM	44	160	37	153	124	61	1537
fmol	0,44	1,6	0,37	1,53	1,24	0,61	15,37
pg/ml	1,8	14,5	6,3	6,2	11,2	9,7	85,6

Tulemused näitavad meetodi madalat tuvastus-ja määramispiiri, eelkõige kinaaside PKA, ROCK2 ja MSK1 jaoks. PKB γ puhul on LOD ja LOQ väärtused kõrgemad, mis on tingitud koosmõjus ARC-745 väiksemast afiinsusest PKB γ suhtes ja PKB γ sidumisega kaasnevast madalamast TRL signaali intensiivsuse kasvust võrreldes teiste kinaasidega .

4.6 Funktsionaliseeritud pinna püsivus ajas

Selleks, et kontrollida pinnale seotud sondi omaduste ja signaali võimalikku muutumist ajas, teostati kaks ajakatset. Esmalt mõõdeti pinnale kantud vaba ARC-745 ning ARC-745:PKA kompleksi TRL signaalid 3 tunni jooksul iga 30 minuti järel. Mõõdetud signaalides kontrollitud ajavahemiku jooksul olulist erinevust ei esinenud (Joonis 15 A).

Teises katses võrreldi nädal varem pinnale kantud ARC-745 sondile ja värskelt pinnale kantud ARC-745 kindla kontsentratsiooniga kinaasi lisamisel mõõdetud TRL signaale. (Joonis 15 B) Tulemustest selgub, et varem ettevalmistatud pinnale puhvri või kinaasi lahuse lisamisel ei erine mõõdetavad TRL signaalid värskelt valmistatud pinnaga saadud tulemustest.



Joonis 15. Signaalide sõltuvus ajast. ARC-745 ja ARC-745:PKA 180 minuti jooksul iga 30 minuti tagant mõõdetud TRL signaalid (A) ning nädal enne mõõtmist(vana) ja mõõtmise päeval(värske) valmistatud pinnaga saadud ARC-745 ja ARC-745:PKA TRL signaalide võrdlus (B)

Kuna mõlemast katsest selgub, et kontrollitud ajavahemike jooksul märgatavat erinevust signaalides ei teki ning signaal ei sõltu proovi valmistamise ajast, võimaldab see mugavamalt meetodi kasutamist. Võimalik on pindade varasem ettevalmistus ARC-Lum(Fluo) sondi pealekandmisega ning nende hilisem kasutamine, mis lihtsustab ja kiirendab oluliselt antud meetodi rakendamist ja teostatavaid mõõtmisi, näiteks kinaaside aktiivsuse määramiseks.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja töötada aeglahutusega lumineestsentsi mõõtmisel põhinev proteiinkinaaside määramise meetod, kasutades biotinüleeritud ARC-Lum(Fluo) bisubstraatseid inhibiitoreid.

Töö teoreetilises osas anti ülevaade proteiinkinaaside ja nende inhibiitorite tähtsusest, sealhulgas ravimiarenduse seisukohast, samuti levinutest proteiinkinaaside määramise meetoditest.

Eksperimentaalses osas teostati katsed ARC-Lum(Fluo) sondiga funktsionaliseeritud streptavidiini pinnal aktiivse proteiinkinaasi hulga määramise meetodi arendamiseks ja optimeerimiseks. Kontrolliti meetodi rakendatavust kinaaside PKA, MSK1, ROCK2 ja PKBy jaoks ning leiti meetodi LOD ja LOQ väärtused nende kinaaside määramisel.

Välja töötatud meetod on lihtne, kiire, madala reagentide kuluga ning kõrge tundlikkus võimaldab pikomolaarsete kinaasi kontsentratsioonide tuvastamist ja kvantifitseerimist. Hästi kalibreeritud meetodi puhul on võimalik vältida lahjendusseriate tegemist ning määrata aktiivse kinaasi kontsentratsiooni mõne punkti järgi. Funktsionaliseeritud pinna hea püsivus võimaldab katsesüsteemi ettevalmistamist ning selle hilisemat kiiret ja mugavat kasutamist. Meetodil on mitmeid edasiarenduse võimalusi, millega on tõenäoliselt võimalik tundlikkust veelgi tõsta. Keerulisemate proovide analüüsiks on võimalik kasutada selektiivseid inhibiitoreid, mis vähendavad mõõdetava signaali intensiivsust proportsionaalselt (sarnaselt konkurentsele ELISA-le) pinnale seondunud proteiinkinaasi väljatõrjumisega. Kindla proteiinkinaasi suhtes selektiivse ARC-Lum(Fluo) kasutamine võimaldab sama põhimõtet rakendada vastava proteiinkinaasi kvantifitseerimiseks rakulüsaatidest ja kehavedelikest proovi kandmisega otse funktsionaliseeritud pinnale.

Time-resolved luminescence assay using immobilized ARC-Lum(Fluo) probes for determination of protein kinases

Anna Zadorožnaja

Summary

The aim of this thesis was the development and optimization of a novel method for quantification of active form of protein kinases based on immobilized ARC-Lum(Fluo) probes.

Abnormal activity of protein kinases is a cause or consequence of multiple diseases, therefore there is a strong need for new tools for determination and analysis of protein kinases. An overview of the importance of protein kinases, protein kinase inhibitors development and methods used for the assessment of concentration of proteins is presented in literature survey. Also, a review of properties and possible applications of adenosine analogues and arginine-rich peptides (ARCs) is given.

In the experimental part an assay with time-gated luminescence detection for the measurement of active concentration of protein kinases was developed. The method is based on biotinylated ARC-Lum(Fluo) probes with high affinities towards PKA and other kinases of AGC group. Free probes gave a low signal in non-deoxygenated environment, however in complex with protein kinase, long lifetime luminescence signal is induced and intensified through Förster resonance energy transfer. This drastic change in luminescence properties of the ligand is used for the determination of the concentration of the bound active form of kinases. Long luminescence lifetime of the ARC-Lum(Fluo) and kinase complex enables to minimize background noise and achieve higher sensitivity.

The applicability of the assay for determination of kinases PKA, MSK1, ROCK2 and PKB γ was demonstrated. The developed method allows detection and quantification of low picomolar kinase concentrations. Quickness, simplicity, lack of need for capricious substrates, high sensitivity and low sample consumption enable the application of the assay for protein kinase analysis in different research environments.

5. KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] G. Manning, "The Protein Kinase Complement of the Human Genome," *Science* (80-.), vol. 298, no. 5600, pp. 1912–1934, 2002.
- [2] J. A. Adams, "Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases," *Chem. Rev.*, vol. 101, no. 8, pp. 2271–2290, 2001.
- [3] P. A. Schwartz and B. W. Murray, "Protein kinase biochemistry and drug discovery," *Bioorg. Chem.*, vol. 39, no. 5–6, pp. 192–210, 2011.
- [4] S. S. Taylor, J. Yang, J. Wu, N. M. Haste, E. Radzio-Andzelm, and G. Anand, "PKA: A portrait of protein kinase dynamics," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1697, no. 1–2, pp. 259–269, 2004.
- [5] C. Kim, D. Vigil, G. Anand, and S. S. Taylor, "Structure and dynamics of PKA signaling proteins," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 85, no. 7, pp. 651–654, 2006.
- [6] A. Uri, M. Lust, A. Vaasa, D. Lavogina, K. Viht, and E. Enkvist, "Bisubstrate fluorescent probes and biosensors in binding assays for HTS of protein kinase inhibitors," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1804, no. 3, pp. 541–546, 2010.
- [7] L. Tymoczko, J. L. Berg, J. M., Stryer, *Biochemistry: a short course*, 2nd ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2011, pp 100-105, 684-685
- [8] P. Wu, T. E. Nielsen, and M. H. Clausen, "Small-molecule kinase inhibitors: An analysis of FDA-approved drugs," *Drug Discov. Today*, vol. 21, no. 1, pp. 5–10, 2016.
- [9] H. Wang *et al.*, "Extracellular activity of cyclic AMP-dependent protein kinase as a biomarker for human cancer detection: distribution characteristics in a normal population and cancer patients.," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 16, no. 4, pp. 789–795, 2007.
- [10] S. M. Hanash, C. S. Baik, and O. Kallioniemi, "Emerging molecular biomarkers-- blood-based strategies to detect and monitor cancer.," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 8, no. 3, pp. 142–150, 2011.
- [11] K. Parang and P. A. Cole, "Designing bisubstrate analog inhibitors for protein kinases," *Pharmacol. Ther.*, vol. 93, no. 2–3, pp. 145–157, 2002.
- [12] C. M. Gower, M. E. K. Chang, and D. J. Maly, "Bivalent Inhibitors of Protein

- Kinases,” vol. 8, no. 5, pp. 583–592, 2016.
- [13] O. Fedorov *et al.*, “A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 51, pp. 20523–20528, 2007.
- [14] M. A. Bogoyevitch, R. K. Barr, and A. J. Ketterman, “Peptide inhibitors of protein kinases - Discovery, characterisation and use,” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1754, no. 1–2, pp. 79–99, 2005.
- [15] D. Lavogina, E. Enkvist, and A. Uri, “Bisubstrate inhibitors of protein kinases: From principle to practical applications,” *ChemMedChem*, vol. 5, no. 1, pp. 23–34, 2010.
- [16] D. Lavogina *et al.*, “Adenosine analogue-oligo-arginine conjugates (ARCs) serve as high-affinity inhibitors and fluorescence probes of type I cGMP-dependent protein kinase (PKGI??),” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1804, no. 9, pp. 1857–1868, 2010.
- [17] E. Enkvist *et al.*, “Conjugation of adenosine and hexa-(D-arginine) leads to a nanomolar bisubstrate-analog inhibitor of basophilic protein kinases,” *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 24, pp. 7150–7159, 2006.
- [18] E. Enkvist *et al.*, “A subnanomolar fluorescent probe for protein kinase CK2 interaction studies,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 10, no. 43, pp. 8645–8653, 2012.
- [19] E. Enkvist *et al.*, “Protein-induced long lifetime luminescence of nonmetal probes,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 6, no. 10, pp. 1052–1062, 2011.
- [20] A. Vaasa *et al.*, “High-affinity bisubstrate probe for fluorescence anisotropy binding/displacement assays with protein kinases PKA and ROCK,” *Anal. Biochem.*, vol. 385, no. 1, pp. 85–93, 2009.
- [21] M. Kasari *et al.*, “Time-gated luminescence assay using nonmetal probes for determination of protein kinase activity-based disease markers,” *Anal. Biochem.*, vol. 422, no. 2, pp. 79–88, 2012.
- [22] M. A. Behlke, L. Huang, L. Bogh, S. Rose, and E. J. Devor, “Fluorescence and Fluorescence Applications,” *Integr. DNA Technol.*, no. Figure 2, pp. 1–13, 2005.
- [23] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2006, pp 2-10
- [24] E. J. Sauer Markus, Hofkens Johan, *Handook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*. Weinheim: Wiley-VCH, 2011, pp 20-22
- [25] T. Suzuki, T. Matsuzaki, H. Hagiwara, and T. Aoki, “Technical Advancement Recent Advances in Fluorescent Labeling Techniques for Fluorescence Microscopy,” vol. 40,

- no. 5, pp. 131–137, 2007.
- [26] F. W. B. van Leeuwen, J. C. H. Hardwick, and A. R. van Erkel, “Luminescence-based Imaging Approaches in the Field of Interventional Molecular Imaging.,” *Radiology*, vol. 276, no. 1, pp. 12–29, 2015.
- [27] A. M. Rossi and C. W. Taylor, “UKPMC Funders Group Analysis of protein-ligand interactions by fluorescence polarization,” vol. 6, no. 3, pp. 365–387, 2011.
- [28] P. Held, “An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Technology and its Application in Bioscience,” *Biotek Instruments White Pap.*, pp. 1–6, 2012.
- [29] L. Mátyus, J. Szöllosi, and A. Jenei, “Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 83, no. 3, pp. 223–236, 2006.
- [30] X. Song, “Time-Resolved Luminescence Detection and Imaging Promises a Bright Future,” *J. Biosens. Bioelectron.*, vol. 3, no. 5, pp. 10–12, 2012.
- [31] B. Condition, D. Jin, and J. A. Piper, “Time-Gated Luminescence Microscopy Allowing Direct,” pp. 2294–2300, 2011.
- [32] T. Zilmer, M., Karelson, E., Vihalemm, *Meditiiniline biokeemia I*, 2nd ed. Tartu: Avita, 2001, pp 162
- [33] Y. Li and V. M. Cassone, “A simple, specific high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative determination of melatonin in cell culture medium,” vol. 8, no. 5, pp. 583–592, 2016.
- [34] L. G. Mendoza, P. McQuary, A. Mongan, R. Gangadharan, S. Brignac, and M. Eggers, “High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).,” *Biotechniques*, vol. 27, no. 21811, pp. 778–788, 1999.
- [35] D. E. Tietz, N. W., Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, 6th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006, pp 155-166
- [36] E. N. Brody *et al.*, “protein biomarker discovery High-content affinity-based proteomics : unlocking protein biomarker discovery,” vol. 7159, no. January, 2017.
- [37] T. W. Kragstrup, T. Vorup-Jensen, B. Deleuran, and M. Hvid, “A simple set of validation steps identifies and removes false results in a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay caused by anti-animal IgG antibodies in plasma from arthritis patients,” *Springerplus*, vol. 2, no. 1, p. 263, 2013.
- [38] Y. Cheng and W. H. Prusoff, “Relation between the inhibition constant (K_i) and the

- concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 22, no. 23, pp. 3099–3108, 1973.
- [39] Ich, “ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology,” *Int. Conf. Harmon.*, vol. 1994, no. November 1996, p. 17, 2005.
- [40] J. R. Lakowicz and G. Weber, “Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules.,” *Biochemistry*, vol. 12, no. 21, pp. 4161–4170, 1973.

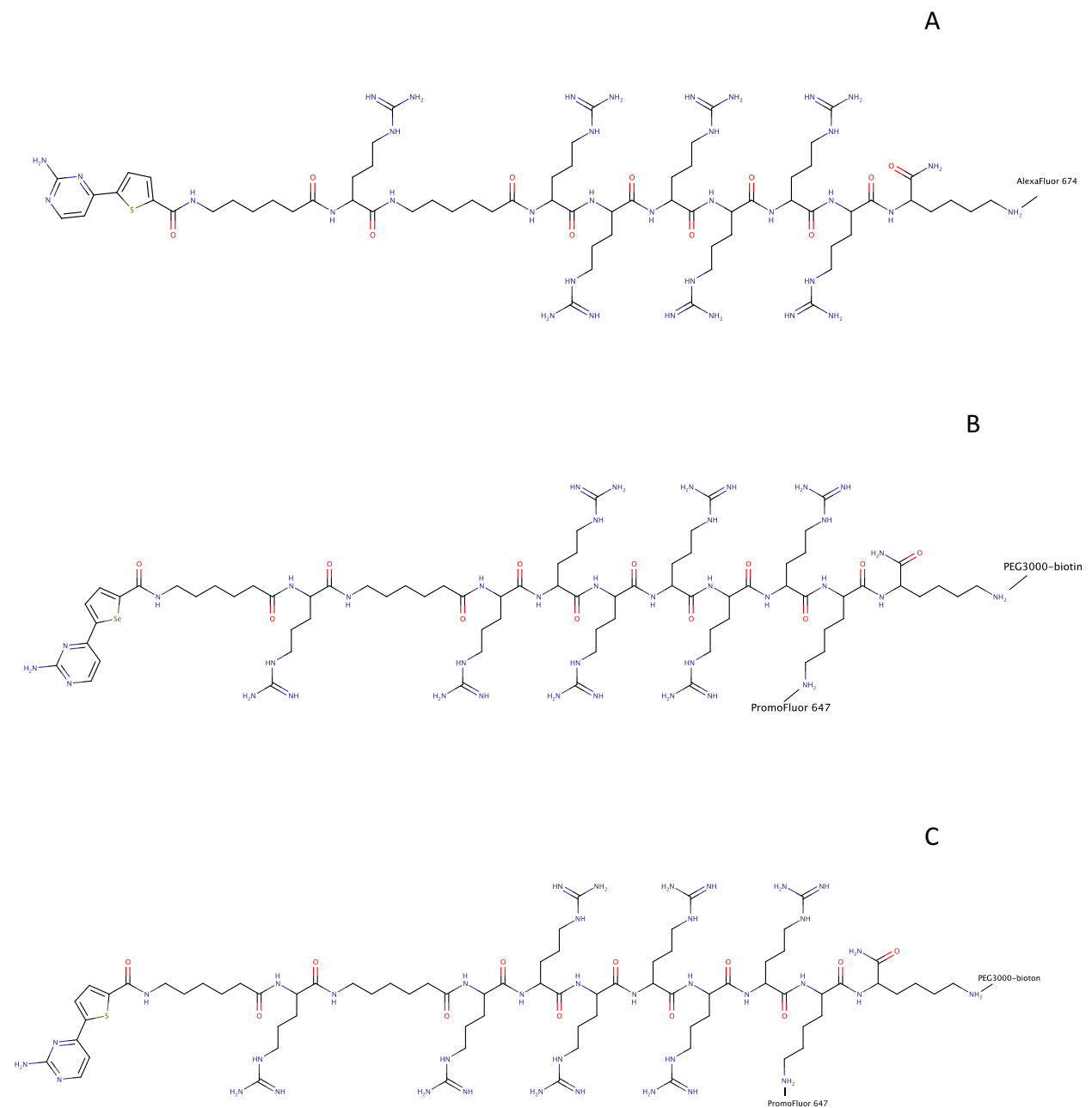
6. LISAD

LISA 1. Töös enim kasutatud ARC-Lum(Fluo) sondide struktuurid

LISA 2. LOD ja LOQ leidmiseks kasutatud lineaarsed alad

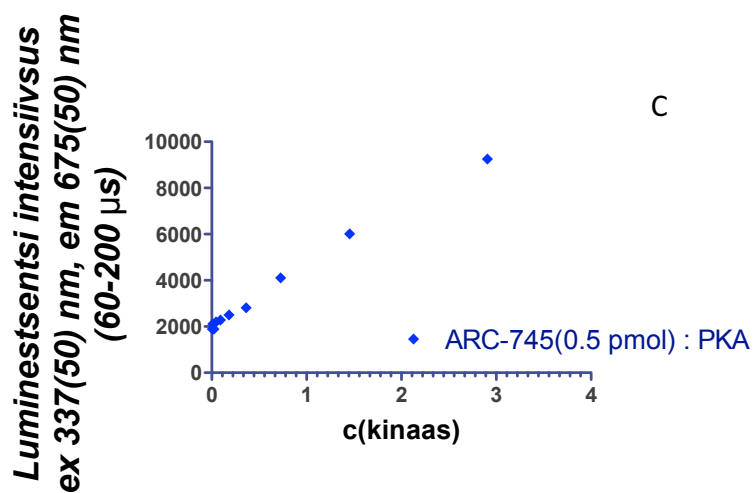
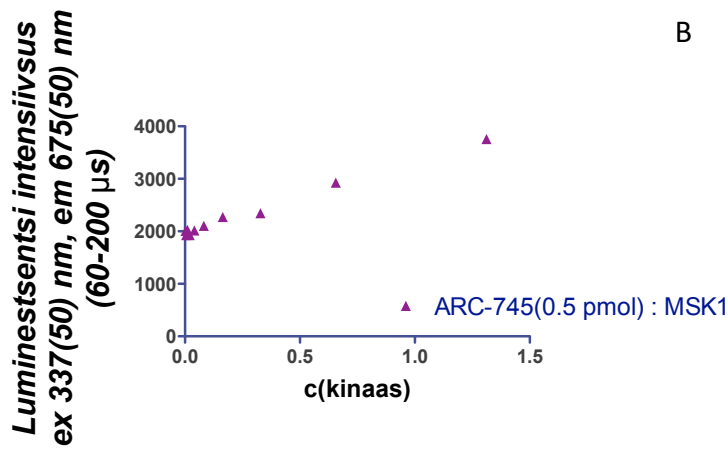
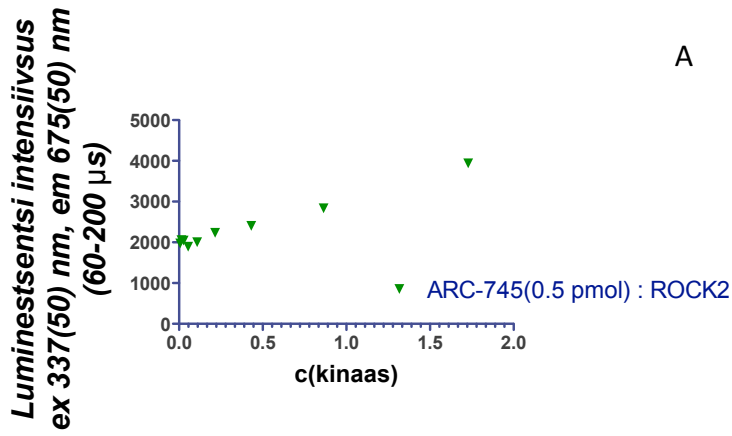
LISA 3. ARC-746 afiinsused kinaaside MSK1, ROCK2 ja PKB γ suhtes

LISA 1. Töös enim kasutatud ARC-Lum(Fluo) sondide struktuurid

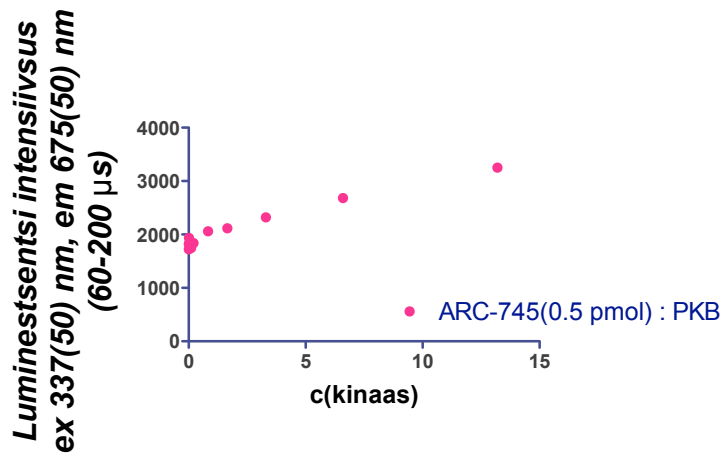


Joonis 16. Töös enim kasutatud ARC-Lum(Fluo) sondide struktuurid. ARC-1063(A), ARC-745(B) ja ARC-746(C)

LISA 2. Kinaaside kvantifitseerimine funktsionaliseeritud pinnal. LOD ja LOQ leidmiseks kasutatud linearsed alad.

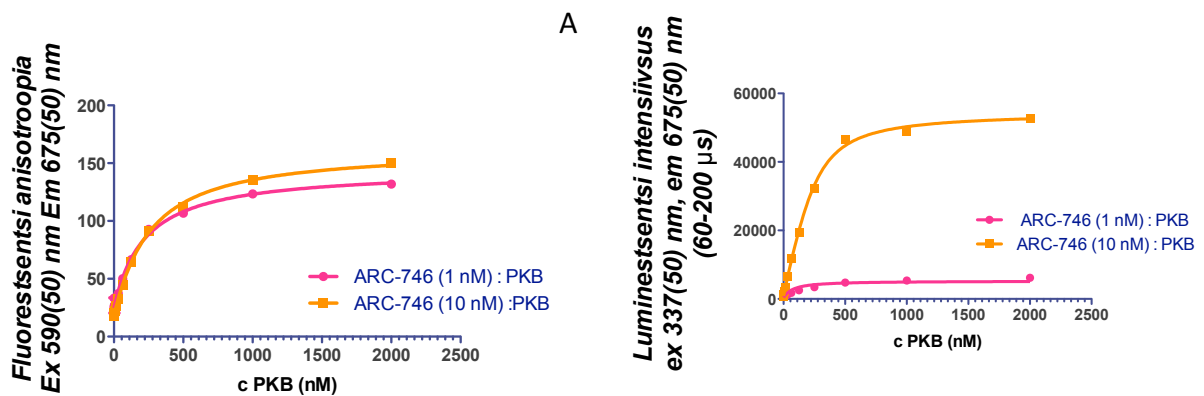


D

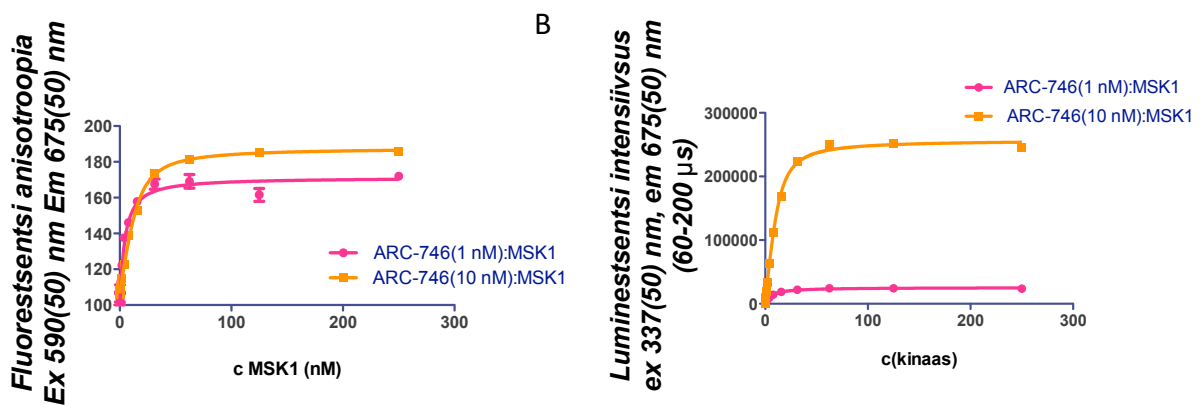


Joonis 17. Kinaaside ROCK2 (A), MSK (B), PKA (C) ja PKB γ (D) määramine pinnal. TRL signaalide kontsentratsioonist sõltuvused lineaarses alas.

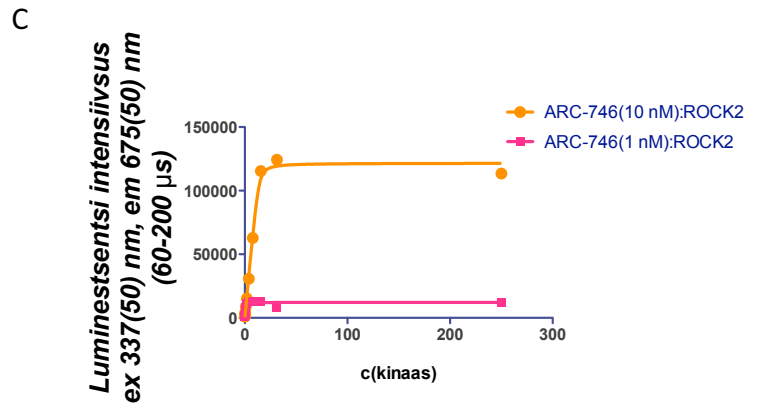
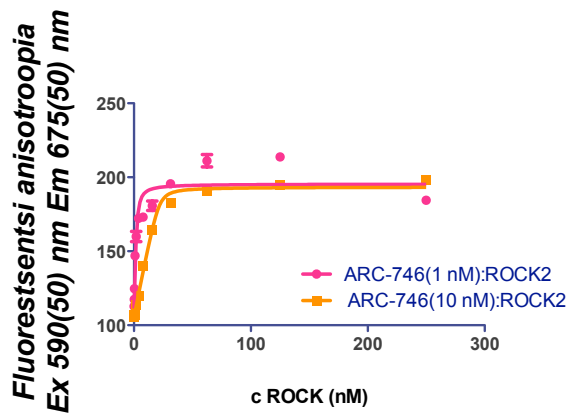
LISA 3. ARC-746 afiinsused kinaaside PKB γ , MSK1 ja ROCK2 suhtes



ARC-746:PKB γ kompleksi jaoks arvatud $K_d = 6,7$ nM



ARC-746:MSK1 kompleksi jaoks arvatud $K_d = 2,7$ nM



ARC-746:ROCK2 kompleksi jaoks arvatud $K_d=0,38$ nM

Joonis 18. Kinaaside $PKB\gamma$ (A), MSK (B) ja ROCK2 (C) afiinsuste leidmiseks FA ja TRL meetodil saadud sidumiskõverad ja nende põhjal arvatud K_d väärtused.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anna Zadorožnaja,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
“Proteiinkinaaside kvantifitseerimine immobiliseeritud ARC-Lum(Fluo) sondidega”,

mille juhendaja on Taavi Ivan,

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 alates **01.01.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni.

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

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

Tartus 24.05.2017