

TALLINNA REALKOOL

LAIMA ŠUSTA

11. KLASS

ERINEVA α -AMINORÜHMA KONFIGURATSIOONIGA LÜSIINI SISALDAVATE INHIBIITORITE SÜNTEES JA NENDE TOIME UURIMINE PROTEIINKINAASILE A

JUHENDAJAD MARTIN SAAR JA ERKI ENKVIST

SISSEJUHATUS

Arenev meditsiin ja aina kasvav uudishimu inimkeha ehituse ja talitluse vastu on viinud teadlased proteiinkinaaside (edaspidi PK) avastamiseni. Need ensüümid on ühed tähtsaimatest biokeemiliste reaktsioonide reguleerijatest, sest valke aktiveerides, moduleerides või inhibeerides võimaldavad just nemad täita proteiinidel oma funktsiooni. Nii on PK-de toimel võimalikud sellised rakuprotsessid nagu apoptoos, raku jagunemine, ainete lagundamine jpm ehk tänu neile ensüümidele on tagatud raku normaalne elutegevus. Paraku on igas süsteemis võimalikud vead, seda ka meis endis. Üsna sage on olukord, kus teatud ensüüm on muteerunud ja seega kaotanud funktsioneerimisvõime või täidab oma ülesannet vääralt. Selliste molekulide kõrge aktiivsuse tõttu on häiritud raku talitus, süsteem ei ole kontrollitav ja tekivad väga tõsised haigused, sh erinevad pahaloomulised kasvaja, sisenõrenäärmete töö häired, immuunsüsteemi nõrgenemine.

Bioorgaaniliste ainete väärtalitus ja eelkõige sellega kaasnevad haigused on leidnud väljundi tänapäeva meditsiinis, kus spetsialiseerutakse aina rohkem bioaktiivsete ainete, näiteks mitmesuguste inhibiitorite, ensüümi aktiivsust pärssivate ainete arendamisele. Püütakse leida inhibiitorid, mis võivad olla tundlikud muteerunud PK-de suhtes, need n-ö tuvastada ja inaktiveerida, hoides niiviisi ära haiguste sümptomite avaldumise. Selliseid bioaktiivseid aineid on võimalik kasutada ravimitena. Maailmaturul on juba laialdaselt kasutatud erinevaid PK-de inhibiitoreid, kuid kindlasti pole leitud lahendusi kõikidele meditsiinilistele muredele. Nii pakub teaduse kirjeldatud suunitlus palju arenguvõimalusi.

Uurimistöös keskendutakse võimalikult selektiivsete ja efektiivsete proteiinkinaas A (edaspidi PKA) inhibiitorite sünteesile. Töö eesmärk on valmistada kaks erineva lüsiini konfiguratsiooniga inhibiitorit ja võrrelda nende toimet PKA-le. Huvipakkuv on teema seetõttu,

et esimest korda viiakse töös käsitletud inhibiitortüübi keskmisesse osasse sisse aminorühm. Esimene uurimisküsimus on: kuidas mõjutab inhibiitori keskmises osas olev aminorühm selle PK-ga seostumist? Uurimistöös püstitatakse hüpotees, et linkeris paiknev aminorühm muudab inhibiitori sidumisomadusi, kuna võib mõjuda PK-le tõmbavalt või tõrjuvalt. Teine uuritav aspekt puudutab lüsiinivaba aminorühma konfiguratsiooni mõju inhibiitori seostumiseefektiivsusele. Sellega seoses püstitati teine uurimisküsimus: kuidas mõjutab aminorühma erinev konfiguratsioon inhibiitori seostumist PK-ga? Viimasele probleemile püstitatakse hüpotees, et L-lüsiini sisaldav aine on efektiivsem, sest looduses esinevad valdavalt L-aminohapped.

Uurimistöö praktiline osa tehakse Tartu Ülikooli keemia instituudi bioorgaanilise keemia laboratooriumis. Töö eksperimentaalse osa esimeseks meetodiks valiti juba peptiidide sünteesis tavaliseks kujunenud Fmoc-tahkefaassüntees, mida kohandati vastavalt TÜ laboratooriumi võimalustele. Sünteesi etappide vahel kontrolliti reaktsioonide kulgemist kvalitatiivselt Kaiseri testiga. Sünteesitud ühendite sisaldumine lõppsaaduste segus määrati kromatograafia ja massispektromeetria ühissüsteemiga, kus oli rakendatud ka ultraviolettkiirguse ja nähtava valguse neelduvuse detektorid. Saadused puhastati kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga ning puhaste inhibiitorite seostumist PKA-ga uuriti biokeemilistes katsetes, mis seisnesid ensüümilt fluorestsentsmärgisega aine inhibiitoritepoolses väljatõrjumises. Katsete tulemuste analüüsimiseks kasutati fluorestsentsanisotroopia mõõtmisi.

Uurimistöö jaguneb neljaks peatükiks. Esimesena antakse ülevaade PK-de toimimisest organismis, sh fosforüülimisest, nende inhibiitoritest ning stereokeemiast, avades spetsiifilisi teemasid, nagu PKA-d, PKA-de inhibiitorid ning diastereomeersed kiraalsed ühendid. Esimeses peatükis toetuti eelkõige Darja Lavõgina (2010) doktoritööle „Development of protein kinase inhibitors based on adenosine analogue-oligoarginine conjugates“. Teises peatükis tutvustatakse töös kasutatud meetodeid: Fmoc-tahkefaassüntees, pööratud faasi kõrgefektiivne vedelikkromatograafia, massispektromeetria ning fluorestsentsanisotroopia. Nende iseloomustamiseks toetuti esmajoones Wilsoni ja Walkeri (2010) välja antud teosele „Principles and techniques of biochemistry and molecular biology“. Kolmandas peatükis kirjeldatakse uurimistöö praktilist osa ning neljandas esitatakse tulemused, analüüsides iga eksperimendi väljundit ja arenguvaldkondi.

Uurimistöö autor on tänulik Tartu Ülikoolile ja Erki Enkvistile, kes võimaldas ligipääsu TÜ laboratooriumisse ning andis töö valmimise käigus pidevalt nõu nii teoreetiliste kui praktiliste küsimuste osas. Soovitakse tänada ka Kaido Vihti, kes abistas biokeemiliste katsete tegemisel. Eriline tänu kuulub Martin Saarele, kes oli alati valmis tööalaste teemadega tutvuma, tööd parendama ja andma põhjalikku tagasisidet.

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	1
KASUTATUD LÜHENDITE LOETELU	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Valkude fosforüülimisreaktsioon	7
1.2. Proteiinkinaasid	8
1.3. Proteiinkinaas A ja selle aktiveerimine	9
1.4. Proteiinkinaaside inhibiitorid.....	10
1.5. Proteiinkinaas A inhibiitorid.....	11
1.6. Optiline isomeeria	11
2. METOODIKA	13
2.1. Fmoc-tahkefaassüntees.....	13
2.2. HPLC.....	15
2.3. Spektrofotomeetrilised uurimismeetodid	16
2.3.1. Ultraviolettkiirguse ja nähtava valguse spektroskoopia	16
2.3.2. Fluorestsentspektroskoopia kui mitteradioaktiivne uurimismeetod	16
2.3.3. Fluorestsentsanisotroopia.....	18
3. EKSPERIMENTAALNE OSA	19
3.1. Inhibiitorite süntees Fmoc-tahkefaassünteesi meetodil	19
3.2. Biokeemilised katsed	20
3.2.1. Aktiivse PKAc kontsentratsiooni määramine	21
3.2.2. Väljatõrjumiskatse.....	22
4. TULEMUSTE ANALÜÜS JA ARUTELU	24
4.1. Inhibiitorite süntees ja iseloomustamine.....	24
4.2. Saadusainete kontrollimine ja puhastamine	25
4.3. Biokeemilised katsed	27
4.3.1. PKAc kontsentratsiooni määramine	27
4.3.2. Väljatõrjumiskatse kolme inhibiitoriga	28
4.4. Järeldused	29
KOKKUVÕTE	30
RESÜMEE	31
ABSTRACT.....	32
KASUTATUD KIRJANDUS	33
Lisa 1. ARC-1464 sünteesiskeem	37

Lisa 2. ARC-1465 sünteesiskeem	38
Lisa 3. Fluorestsentsligandi ARC-583 struktuurivalem	39

KASUTATUD LÜHENDITE LOETELU

Lühend	Ingliskeelne nimetus	Eestikeelne vaste
AC	<i>adenylate cyclase</i>	adenülaattsüklaas
ACN	<i>Acetonitrile</i>	atsetonitriil
ADP	<i>adenosine-5'-diphosphate</i>	adenosiin-5'-difosfaat
Ala	<i>Alanine</i>	alaniin
ARC	<i>adenosine analogue- oligoarginine conjugate</i>	adenosiini analoogi ja oligoarginiini konjugaat
Arg	<i>Arginine</i>	arginiin
ATP	<i>adenosine-5'-triphosphate</i>	adenosiin-5'-trifosfaat
Boc	<i>tert-butoxycarbonyl</i>	tert-butoksükarbonüül
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	veise seerumi albumiin
cAMP	<i>adenosine cyclic- 3',5'-monophosphate</i>	3',5'-tsükliiline adenosiinmonofosfaat
cGMP	<i>guanosine cyclic-3',5'-monophosphate</i>	3',5'-tsükliiline guanosiinmonofosfaat
DCC	<i>N,N'-dicyclohexylcarbodiimide</i>	<i>N,N'</i> -ditsükloheksüülcarbodiimiid
DCM	<i>dichloromethane</i>	diklorometaan
DMF	<i>Dimethylformamide</i>	dimetüülformamiid
DTT	<i>Dithiothreitol</i>	ditiotreitol
EtOH	<i>Ethanol</i>	etanool
FA	<i>fluorescence anisotropy</i>	fluorestsentsanisotroopia
FI	<i>fluorescence intensity</i>	fluorestsentsintensiivsus
Fmoc	<i>9-fluorenylmethoxycarbonyl</i>	9-fluorenüülmetoksükarbonüülrühm
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i>	G-valguga seotud retseptor
GTP	<i>guanine-5'-triphosphate</i>	guanosiin-5'-trifosfaat
HBTU	<i>O-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate</i>	O-bensotriasool- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametüülurooniumheksafluorofosfaat

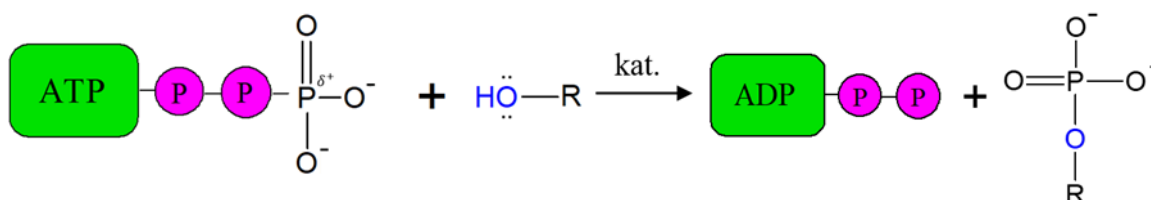
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>	4-(2-hüdroksüetüül)piperasiin-1-etüülsulfoonhape
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
Lys	<i>Lysine</i>	Lüsiin
MQ	<i>Milli-Q®</i>	deioniseeritud (ultrapuhas) vesi
MS	<i>mass spectrometry</i>	massispektromeetria
MS-ESI	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>	massispektromeetria-elektropihustusionisatsioon
NMM	<i>N-methylmorpholine</i>	<i>N</i> -metüülmorfoliin
P20	<i>polysorbate 20</i>	polüsorbaat 20
PK	<i>protein kinase</i>	proteiinkinaas
PKA	<i>protein kinase A</i>	proteiinkinaas A
PKAc	<i>protein kinase A catalytic subunit</i>	proteiinkinaas A katalüütiline alaühik
PKAr	<i>protein kinase A regulatory subunit</i>	proteiinkinaas A regulatoorne alaühik
PKB	<i>protein kinase B</i>	proteiinkinaas B
PKC	<i>protein kinase C</i>	proteiinkinaas C
PKI	<i>protein kinase inhibitor</i>	proteiinkinaasi inhibiitor
RP-HPLC	<i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>	pöördfaas-kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
Ser	<i>Serine</i>	Seriin
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>	peptiidi tahkefaassüntees
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i>	trifluoroetaanhape
Thr	<i>Threonine</i>	treoniin
TIPS	<i>triisopropylsilane</i>	triisopropüülsilaan
Tyr	<i>Tyrosine</i>	türosiin
UV/Vis	<i>ultraviolet and visible light</i>	ultraviolettkiirgus ja nähtav valgus

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Valkude fosforüülimisreaktsioon

Valgud reguleerivad organismis paljusid protsesse. Suur osa kinaasipoolse katalüüsiga fosforüülitud ehk selle kaudu reguleeritud proteiinidest (ensüümid, struktuurvalgud, membraankanaliid jne) vallandavad näiteks iseenesliku rakusurma, insuliini sünteesi ja jääkainete transpordi ühest rakuosast teise. Imetajarakkudes on fosforüülitavad üle ühe kolmandiku valkudest, seega on antud reaktsioon märkimisväärne nii raku- kui ka üldisemalt organismitalitluses (Roberts, Kruchten, 2016, lk 107).

Fosforüülimist katalüüsivad proteiinkinaasid, pöördreaktsiooni defosforüülimist teevad aga proteiinfosfataasid. Proteiinide fosforüülimine reaktsioonina tähendab fosforüülrühma (PO_3^{2-}) lisamist valkude Ser, Thr või Tyr hüdroksüülrühmale (vt joonis 1) (Nestler, Greengard, 1999). Selle tulemusena muutub viimaste struktuur ja aktiivsus (Knight, Shokat, 2005, lk 621). Fosforüülimisreaktsioonis osaleb alati fosforüülrühma doonormolekul, mis loovutab fosforüülrühma aktseptorile ehk Ser, Thr või Tyr jääkide hüdroksüülrühmale. Aktseptoritena saavad käituda eespool nimetatud aminohappejäägid, sest viimastel on kõrvalahelas hüdroksüülrühm ($-\text{OH}$). Fosforüülrühma doonorina kasutatakse organismides nukleotiide, milleks enamasti on adenosiin-5'-trifosfaat ehk ATP ning vähemal määral ka guanosiin-5'-trifosfaat ehk GTP.



Joonis 1. Fosforüülimisreaktsioon. Rohelisena on tähistatud ATP-d või ADP-d vastavalt kolme või kahe lilla fosforüülrühmaga, sinine on nukleofiilne hüdroksüülrühm. Katalüsaatorina toimivad organismides PK-d.

Fosforüülimismehhanism toimib nukleofiili (ld *nucleus* – tuum; kr *philia* – armastus) rünnaku tõttu, kus hüdroksüülrühma hapnik kahe vaba elektronpaariga atakeerib kolmanda (γ) fosforüülrühma fosfori aatomit (Soderberg, 2014). Viimasel on küll nõrgalt positiivne osalaeng, kuid tänu $\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ionidele ja kinaasipoolsele katalüüsile on nukleofiilse hapniku rünnak võimalik (Scott, Lecomte, 2007, lk 182). Reaktsiooni tulemusena tekivad aminohappe – Ser, Thr või Tyr – jäägile kinnitunud fosforüülrühmaga valk ja ADP ehk adenosiin-5'-difosfaat.

1.2. Proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid on ensüümid, mis katalüüsivad valkude fosforüülimist (Lavõgina, 2010, lk 12). Ilma katalüsaatoriteta on reaktsiooni aktiveerimisenergiabarjäär kõrgem, seega looduslikud katalüsaatorid ehk ensüümid võimaldavad teha sama protsessi soodsamatel tingimustel. PK-de teine positiivne efekt väljendub nende selektiivsuses fosforüülitava substraatmolekuli suhtes. PK-i üldine toimemehhanism koosneb kolmest etapist: ATP ja substraatvalguga seostumine, fosforüülülekanne ning nii fosforüülrühmaga valgu kui γ -fosforüülrühma võrra vaesemaks jäänud nukleotiidi lahkumine PK-i seostumissaitidelt (Mesila, 2017, lk 9–10). PK-de detailsem toimimine toetub peamiselt tertsiaarse kompleksi mehhanismile. Tertsiaarses kompleksis on kolm omavahel seotud molekuli; PK-de perspektiivist võimaldavad antud tüüpi ensüümid fosforüülülekannde otse doonorilt aktseptorile. (Wang, Cole, 2014)

PK-d leidub nii eukarüootsetes kui prokarüootsetes rakkudes. Inimese genoomis kodeeritud PK-de arv on osa klassifikatsioonide järgi 518, mis moodustab ligikaudu 2% meie geenidest (Duong-Ly, Peterson, 2014). PK-de võrdlemisi suur kogus võimaldab koostada fülogeneesipuid, kus antud ensüümid on jaotatud rühmadeks, peredeks ja alamperedeks. Üks liigitust mõjutavatest teguritest on PK-de selektiivsus aminohappejääkidega seostumisel. Selle alusel jagunevad PK-d Ser/Thr- ning Tyr-kinaasideks. (Cell Signaling Technology kodulehekülg)

Esimesse rühma kuuluvad ensüümid, mis fosforüülivad seriini, treoniini või mõlema hüdroksüülrühmasid. Ser/Thr-kinaasid on seotud tavaliselt metabolismi toimimisega ning on sageli aktiveeritud hormonaalsete protsesside tagajärjel tekkinud sekundaarsete virgatsainete (nt cAMP, cGMP) poolt. Tyr-kinaasid fosforüülivad vaid türosiinijääke. Enamasti tagavad sellised kinaasid rakukasvu regulatsiooni. (Campbell *et al.*, 2005, lk 91–92)

Et PK-d suudaksid avaldada mõju valkudele, peab neid enamasti samuti aktiveerima. Antud eesmärgi saavutamiseks on organismis olemas mitu võimalust, millest osa on järgnevalt nimetatud:

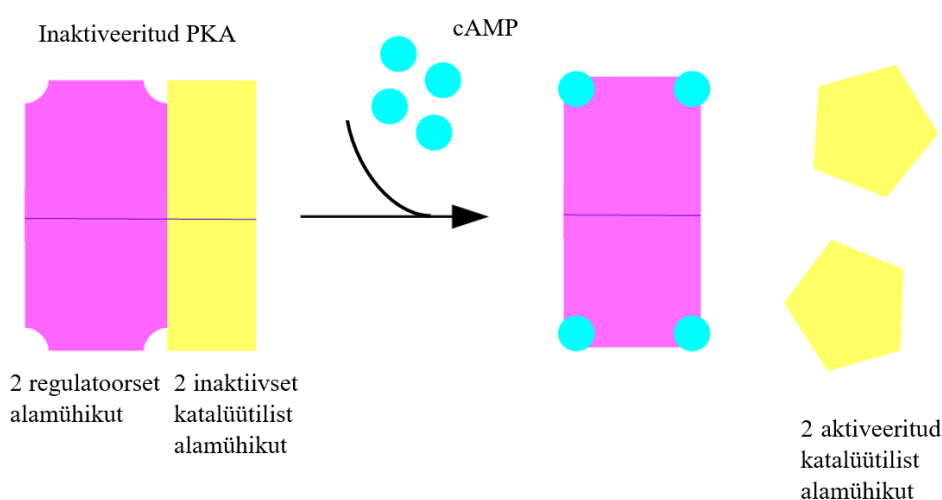
1. autofosforüülimine;
2. seostumine väikese molekulmassiga molekulidega (nt sekundaarsed virgatsained, fosfolipiidid);
3. seostumine ligandiga;
4. nn proteolüütiline lagundamine (ingl *proteolytic cleavage*) jpm. (Lavõgina, 2010, lk 14; Lodish *et al.*, 2007, lk 91)

1.3. Proteiinkinaas A ja selle aktiveerimine

Biokeemikud Steven Hanks ja Tom Hunter kirjeldasid 1995. aastal PK-de AGC rühma, kuhu kuuluvad tänapäeval proteiinkinaas A koos PK-dega B ja C (vastavalt PKA, PKB ning PKC) (Lavõgina, 2010, lk 13). Need on ühed enim uuritud PK-dest, sest AGC rühma ensüümid on rakus laia esinemisdiapasooniga. PKA vastutab glükagooni, epinefriini (adrenaliini) ja muude metabolismi jaoks vajalike ainete sekretsiooni aktiveerimise eest (Clark, Pazdernik, 2013, lk 647–652, 698). Onkogeenina avastatud PKB reguleerib transkriptsiooni, raku apoptoosi, jagunemist ning võtab aktiivselt osa veel glükogeeni sünteesi protsessist (Fayard *et al.*, 2005, lk 5675–5676). PKC koos teiste ensüümidega viib läbi lipiidide hüdrolyüsi, kuid enamjaolt täidab ka PKA-le sarnaseid ülesandeid (Campbell *et al.*, 2005, lk 91). Viimaste eriline mõju avaldub neuromuskulaarses sünapsis, kus nii PKA kui PKC osalevad närviimpulsside edasikandumisel. Nii mängivad nad olulist rolli organismide mälu mõjutamises. (Perkins *et al.*, 2001)

PKA-s nagu igas valgulise ehitusega molekulis on võimalikud mutatsioonid, üleekspressioon, nende aktiivsust mõjutavate ainete vääraltitlus, mis põhjustavad erinevaid tõsiseid haigusi, sh ka pahaloomulisi kasvaja. Nii võivad oma õige funktsiooni kaotanud PKA toimimise tagajärjel tekkida kopsu-, rinna-, aju-, naha- jm vähid, arteriaalne fibrillatsioon, teratoomid (nt tsüstiline teratoom) jpm (PhosphoSitePlus koduleheküljel).

PKA on cAMP-sõltuv kinaas, st et tema aktiveerimist võimaldab tsükliline adenosiin-5'-monofosfaat (vt joonis 2) (Byrne *et al.*, 2016, lk 3160). Passiivses olekus esineb PKA tetrameerina, koosnedes kahest reguloorsest (r) ning kahest katalüütilisest (c) alamühikust. PKA aktiivsuseks on vajalik MgATP ning substraatvalgus Ser/Thr hüdroksüülrühma olemasolu. (Matte, Delbaere, 2007, lk 115)



Joonis 2. PKA aktiveerimismehhanism. Lillaga on värvitud reguloorsed alamühikud (PKAr), kollasega katalüütilised alamühikud (PKAc) ning sinisega kinaasi aktiveeriv cAMP.

PKA aktiveerimine algab membraanvalgu G_s retseptori (ingl *G protein-coupled receptor*, GPCR) rakuvälisele osale ligandi kinnitumisest, mis viib adenülaattsüklaasi (ingl *adenylate cyclase*, AC) aktiveerimiseni. Viimane n-ö valmistab ATP-st tsüklilise nukleotiidi cAMP. Tsüklilise nukleotiidi sidumisel PKA holoensüümile laguneb passiivsena olnud tetrameer PKA kolmeks alamühikuks (kaks PKAc-d ja kahest PKAr alamühikust koosnev dimeer). cAMP seostub reguleerivate alamühikutega nii, et ühe PKAr küljes on kaks nukleotiidi molekuli. Aktiivne PKAc saab nüüd täita oma ülesannet. Fosforüülimise eesmärgil saab aktiveeritud PKA ära tunda järgnevat aminohappelist järjestust: Arg-Arg-X-Ser/Thr-Hüd, kus X on mistahes aminohape, Ser/Thr on järjestuse fosforüülitav osa ning Hüd on hüdrofoobse külghelaga aminohape. (Lavõgina, 2010, lk 14, 15–17)

1.4. Proteiinkinaaside inhibiitorid

PK-de toimimine õiges järjekorras ja oma funktsioonile vastavalt on eelduseks normaalsele raku elutegevusele. Nad moodustavad erinevaid signaalradu raku tsütosoolis. Iga väiksemgi häire sellistel signaalradadel võib viia ränkade haigusteni. Ravimitööstuses arendatakse tänapäeval muteerunud PK-dega seonduvaid sünteetilisi aineid, mis pärsiksid PK-de aktiivsust bioloogilistes reaktsioonides. Inhibiitorid suudaksid ensüümiga seostumisel tagada selle passiivsuse biokeemilistes reaktsioonides. (Noble *et al.*, 2004, lk 1800)

Uute ravimite genereerimisel tuleb arvestada nende ohutusega ravimit manustava organismi suhtes, sünteesi realistlikkusega, bioloogilise ja keemilise stabiilsusega jne. Kindlasti peavad olema uuel inhibiitoril täidetud võimalikult kõrged efektiivsus (suur afiinsus PK-ga seostumisel) ja selektiivsus (ideaalis ühe kindla PK-ga seostumine). Antud kriteeriumide täitmiseks saab inhibiitorite sünteesil arvestada:

1. selle seostumisvõimalusi ATP-sidumissaidiga PK-l;
2. selle seostumisvõimalusi substraatvalgu sidumissaidiga PK-l;
3. selle seostumisvõimalusi nii ATP- kui substraatvalgu sidumissaidiga PK-l;
4. selle seostumisvõimalusi allosteeriliste sidumiskohtadega. (Knight, Shokat, 2005, lk 621–627)

Inhibiitoreid, mis seostuvad ühe PK-i n-ö sidumistaskuga, nimetatakse monosubstraatseteks ning neid, mis kinnituvad ühe PK-i kahele sidumissaidile, bisubstraatseteks ehk biligandseteks inhibiitoriteks (Mesila, 2017, lk 15–16). Inhibiitorravimitena on reaalset kasutust leidnud nt imatiniib (monosubstraatne, leukeemiavastane), vemurafenib (monosubstraatne, melanoomivastane), fasudil (monosubstraatne, vasospasmidevastane), temsiroliimus (monosubstraatne, neeruvähivastane) (Iqbal, Iqbal, 2014, lk 1–2; Shelledy, Roman, 2015, lk 361–362; Bhullar *et al.*, 2018, lk 2).

1.5. Proteiinkinaas A inhibiitorid

Organismi reguleerivad PKAc alamühikute aktiivsust PKAr-d ja inhibiitor peptiid PKI ning PKA signaalrada tervikuna n-ö lülitavad välja erinevad fosfodiesterasid (Ahmad *et al.*, 2015, lk e25). PKA-de jaoks on arendatud ka mitmeid tüüpe sünteetilisi inhibiitoreid, millest ravimitena kasutuselevõtuks on kõige potentsiaalsemateks osutunud ATP-konkurentsed (st vaadeldav aine peab ATP-ga n-ö võistlema sidumissaidi pärast) inhibiitorid (Dostmann, Nickl, 2010, lk 1482–1483).

ARC-tüüpi inhibiitorid (ingl *adenosine analogue-oligoarginine conjugate*) on samuti ühed uutest inhibiitoriarendustest, mis on andnud lootust mõjutada PK-e samasuguse kui mitte suurema efektiivsusega võrreldes seni genereeritud sünteetiliste ainetega. ARC-del on suur selektiivsus, sest nad seostuvad PK-i mitme saidiga, ning bioloogiline ja keemiline stabiilsus. Samuti esineb ARC-de puhul väga lai võimalike sünteesitavate inhibiitorite valik keemilise struktuuri poolest.

ARC-tüüpi inhibiitorite kolm struktuurikomponenti on:

1. nukleosiidi analoog, mis seostub PK-i ATP-sidumissaidiga;
2. linker, mis ühendab ATP-konkurentset ja peptiidset fragmente;
3. peptiidiahel (Arg-rikas), kus linkeriga seotud aminohape on eelistatult D-aminohape (eriline stereokeemiline ainemääratletus) ning mis seostub PK-i substraatvalgu sidumissaidiga. (Lavõgina, 2010, lk 113)

Antud uurimistöös sünteesitud inhibiitorid on ARC-tüüpi inhibiitorite edasiarendus. Mõlemal sünteesitud ainel on linkeri osas lisaaminorühm, mille mõju PKAc-le uuritigi.

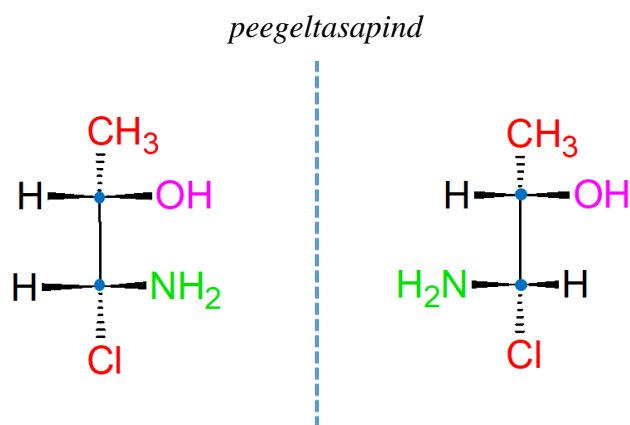
1.6. Optiline isomeeria

Isomeeria on samasuguse molekulivalemiga ainete esinemine erinevate ühenditena, mille struktuurid ei kattu. Optilise isomeeria ehk kiraalsuse puhul on aatomite järjestus molekulis sama, ent nende ruumiline paiknemine erineb, mistõttu on nendel ainetel erinev mõju polariseeritud valgusele. Molekul on kiraalne vaid siis, kui selle esinemiskujud ei vasta üksüheselt oma peegelpiltidele. Kiraalsuse illustreerimiseks kasutatakse sageli inimese parema ja vasaku käte võrdlust, sest nad on üksteise ühildumatud peegelpildid. Molekule, millel kiraalsuse ehk käelisuse esinemine puudub, nimetatakse akiraalseteks. (Lopp 2014, lk 32–33)

Optiline isomeeria jaguneb enantio- ja diastereoisomeeriateks. (Lille, 1997, lk 8, 72) Enantiomeerid (mõnikord esitletakse peegelisomeeri mõiste all) on stereoisomeerid, mis on üksteise peegelpildid (Lopp, 2014, lk 35). Diastereoisomeerid on stereoisomeerid, mis ei ole

teineteise peegelpildid (vt joonis 3) (Carey, Giuliano, 2014, lk 299). Et stereoisomeeride füüsikalised ja keemilised omadused (nt polaarsus, keemis- ja sulamistemperatuurid, aatomite ruumiline paigutus) ei ole samasugused, erineb ka nende mõju biomolekulile (Parsons, 2014, lk 42). Seetõttu on tähtis uurida selliste molekulide käitumist organismis esinevate ainetega (siin valkudega).

Antud uurimistöös on sünteesitavad ained kiraalsed diastereoisomeerid. Üks neist on D-isomeer (linkeriks D-Lys), teine on L-isomeer (linkeriks L-Lys).



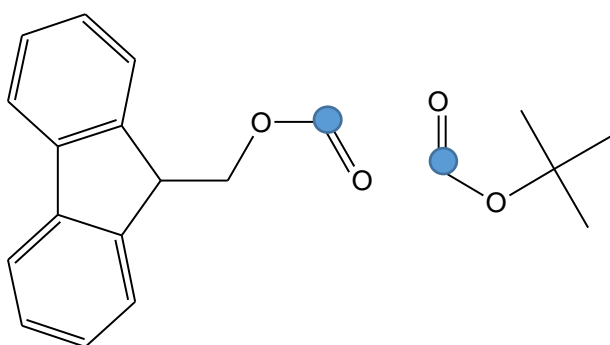
Joonis 3. Kiraalsed diastereomeersed molekulid. Siniste täppidena on tähistatud kiraalsed tsentrid, lilla, rohelise ja punasega on kujutatud asendusrühmi etaanis. Antud molekulid ei ole ei ühilduvad ega üksteise peegelpildid.

2. METOODIKA

2.1. Fmoc-tahkefaassüntees

Peptiidi tahkefaassünteesi (ingl *solid phase peptide synthesis*, SPPS) põhimõtte töötas 1962. aastal välja Ameerika biokeemik Robert Bruce Merrifield. Tema pikaaegne töö oli niivõrd suure tähtsusega, et seda hinnati 1984. aastal Nobeli preemia vääriliseks. (Wade, 2006, lk 1183) SPPS on 20. sajandi II poolest mitmeid kordi tõestanud oma tulemuslikku usaldusväärsust, mille pärast on seda meetodit hakatud kasutama erinevatel eesmärkidel, nt antibiootikumide ja proteiinligandide inhibiitorite arendamiseks, epitoopide sünteesimine antikehade valmistamiseks (Sheehan, 2000, lk 142). Tahkefaassünteesi eripära on peptiidse ahela kasvatamine viimase aminohappe N-terminaalist ($-\text{NH}_2$ -rühm), C-terminaal ($-\text{COOH}$ -rühm) on aga kinnitunud tahkele kandjale. Iga järgneva lisatava aminohappe N-terminaal ja kõrvalrühmad on kaitstud kaitserühmadega, et vältida kõrvalsaaduste tekkimist erinevates sünteesietappides.

Tuntumate kaitserühmade – Boc- ja Fmoc-rühmad – järgi on oma nimetused saanud kaks sünteetilise keemia valdkonda: Boc- ja Fmoc-keemiad (vt joonis 4). Antud töös oli N-terminaal iga kord kaitstud Fmoc-rühmaga, millest tulenebki sünteesiviisi nimetus Fmoc-tahkefaassüntees (Fmoc-SPPS), ning kõrvalrühmad kaitsti Boc-rühmaga. Kahe erineva kaitserühma kasutuselevõtt oli tingitud ortogonaalsuse reeglist, mille järgi tuleb terminaalsete rühmade ja kõrvalahela blokeerivad rühmad elimineerida erinevates tingimustes. Nii võetaksegi maha Fmoc-rühm aluselises keskkonnas ehk 20%-lise piperidiini lahusega dimetüülformamiidis (edaspidi DMF), Boc-rühma aga tugeva happe, tavaliselt trifluoroäädikhappega (edaspidi TFA). (Mor, 2007, lk 78)

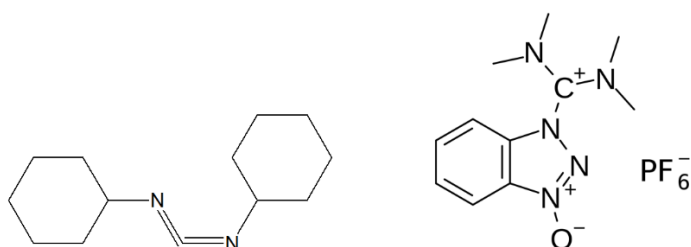


Joonis 4. Fmoc- ehk 9-fluorenüülmetskükarbonüülrühm ja Boc- ehk tert-butokskükarbonüülrühm. Seostumisel aminorühmaga moodustub uus side kaitserühmadel sinise täpina ära märgitud süsinikuga.

SPPS koosneb mitmest etapist, millest esimene on ühe aminohappe kinnitamine tahkele kandjale ehk vaigule (ingl *resin*). Viimase terad on kaetud nt amino- või hüdroksüülrühmadega, millega saab aminohappe C-terminaal moodustada peptiid- ehk amiidsideme või estersideme.

Niiviisi takistatakse edasist reageerimist selle aminohappe –COOH-rühma kaudu. Tahke kandja on vees mittelahustuv polümeer, mille reaktsioonitsentrite arvu väljendatakse nn laadungina (ingl *loading*) milliekvivalentides vaigu massiühiku kohta. *Resin*'i valik on üks tähtsaimatest SPPS-i ettevalmistusetappidest, sest just reaktsioonitsentrite arvust, terade suurusest jm vaigu omadustest sõltub sünteesi lõplik saagis. (Wade, 2006, lk 1183–1184)

Iga resinile lisatav aminohape tuleb eelnevalt aktiveerida, sest tavatingimustes on peptiidside moodustumine kõrge energiabarjääriga protsess. Aktiveerijateks on sellised asendusrühmad, mis vähendavad süsiniku aatomi elektrontihedust ning seega suurendavad elektrofiilsust. Enim levinud aktiveerijad on näiteks DCC ja HBTU, millest viimast kasutati ka siinses uurimistöös (vt joonis 5) (Wade, 2006, lk 1185).



Joonis 5. Tuntuimad aktiveerijad ehk vastavalt DCC ja HBTU (HBTU struktuurivalemi allikas: Vikipeedia 2018 s.v. HBTU).

Aktiveeritud aminohappe ja vaigule kinnitunud aminohappe N-terminaali vahel saab toimuda amiidsideme moodustumine. Kahest aminohappest koosnev peptiid tavaliselt ei rahulda teadlasi, nii et N-terminaalile eelnevalt lisatud kaitsev rühm (siin Fmoc) tuleb eemaldada ja varem läbi viidud etapid korrata. Vahepealsed puhastusprotsessid DMF lahusega on vajalikud kõrvalproduktide jms eemaldamiseks. Amiidsideme moodustamist nimetatakse atsüülimiseks ning kirjeldatud skeemi järgi viiakse atsüülimine läbi kuni 50 korda, kasvatades aminohappeahelat 50 aminohappe pikkuseks (Mor, 2007, lk 80).

Peptiidiahela valmimise korral hakatakse peptiidi tahkelt kandjalt eraldama. Produkti eraldamiseks (ingl *cleavage*) vaigust valmistatakse TFA/H₂O/TIPS (90:5:5, v/v/v) kokteil, millega eemaldatakse nii peptiid vaigult kui ka vajadusel kõrvalrühmadelt kaitsvad rühmad, nt Boc. Saadud lahus lahutatakse hüdrofoobsetest teradest, mis jäetakse katseanumasse, ning peptiid kogutakse TFA kokteilis lahustunud kujul eraldi nõusse. Vaakumi ja vajadusel toatemperatuurist kõrgema temperatuuriga keskkonnas aurustatakse lahus ning anuma seinale jääb vaid teadlast huvitav peptiid, mida vajadusel puhastatakse kõrvalsaadustest.

2.2. HPLC

Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (ingl *high-performance liquid chromatography*, HPLC) võimaldab sünteesi produkte kontrollida ja puhastada kõrvalsaadustest. Antud meetod on kromatograafiatüüpidest suurima lahutamise efektiivsusega, mis seletab selle eelistamist teistele ainepuhastusviisidele. Pöördfaas-HPLC (ingl *reversed-phase HPLC*, RP-HPLC) tööpõhimõte baseerub ainete lahutamisel polaarsuse järgi. Selle alusel jagunevad sisestatud proovi komponendid mobiilse ja statsionaarse faaside vahel ning seetõttu liiguvad kolonnis erineva kiirusega.

HPLC süsteemi kuuluvad:

1. lahusti reservuaar, mis vastutab solvendi piisava koguse eest katses;
2. kõrgrõhupump, mis säilitab kõrge rõhu katse vältel;
3. kolonn(id) proovi sisestamisauguga, kus toimub ainete eraldamine;
4. detektor, mis tuvastab katse käigus eraldunud ained;
5. andmete salvestaja ehk arvuti;
6. lahuse kollektor, kuhu jääb ülejäänud, katsetegijat mittehuvitav lahus. (Wilson, Walker 2010, lk 446–447)

Lahusti reservuaaris olevad lahustid mängivad HPLC süsteemis liikuva faasi rolli. Antud töös olid lahustitena kasutatud polaarsed vesi ja atsetonitriil (edaspidi ACN). Lahustid koos moodustavad ühtlase lahuse ehk eluendi. Proov, mis sisestati süsteemi süstla (ingl *injector*) kaudu, liigub kolonnidesse eluendiga kõrge rõhu tekitaja ja säilitaja ehk pumba abil. Kolonnide sisepind toimib kasutatud HPLC meetodis statsionaarse faasina, kuhu kinnituvad proovi hüdrofoobsed komponendid (hüdrofiilsed osakesed jäävad eluenti). Ajapikku ACN-i kogus eluendis suureneb (vee hulk vastavalt väheneb, summaarne voolukiirus ei muutu), et ainekomponentide eraldamine toimuks veel efektiivsemalt. (*Ibid.*, lk 446–448)

Et HPLC kolonnsüsteemi süstitava aine kogus on väike, peab detektori tundlikkus olema piisavalt kõrge, et see suudaks stabiilselt tuvastada väikese kontsentratsiooniga eluendi koostisosi. Antud uurimistöös kasutati ühena detektoritest diodrividetektorit, mis valgustab kolonni läbivaid osakesi UV/Vis kiirgusega, salvestades nende neeldumisspektreid ajaühikus. Andmed kuvatakse kas 3D- või tasapinnalise diagrammina. (*Ibid.*, lk 449–450)

Detektori valikuvõimalusi on aga erinevaid. Nii otsustati selles töös teise detektorina massispektromeetria (ingl *mass spectrometry*, MS) detektori kasuks. MS meetod põhineb osakeste massi ja laengu suhte (m/z) leidmisel peale nende lahutamist, mis võimaldabki tuvastada erinevaid ioone. Selle muudab hõlpsamaks tõsiasi, et üldjuhul on osakeste laengud +1 või –1 ja siis on m/z võrdne osakese massiga. See viis on suurima tulemuste õigsuse tõttu

muutunud tänapäeval möödapääsmatuks uurimismeetodiks analüütilises keemias. (Sparkman, 2000, lk 11510)

Tänapäeva teaduses eelistatakse kasutada HPLC-MS meetodit, mis rakendab aine komponentide tuvastamise nii MS detektori kui HPLC põhimõtetel, võimaldades saada vähemalt kaks korda usaldusväärsemaid tulemusi. HPLC-MS süsteemis on kromatograafia ja MS osad ühendatud. Et proovi polaarsuse ja mittepolaarsuse alusel lahutatud komponendid saaksid kontrollitud ka massispektromeetriga, ioniseeritakse osakesed gaasilises faasis. Praktilise biokeemia ajaloos üheks pöördepunktideks oli MS-ESI (ingl *electrospray ionization mass spectrometry*) kasutuselevõtt. ESI-ga tekitatakse ioonid laetud nõela abil, millega kokku puutudes saavad polaarsed molekulid laengu. Edasi liiguvad laetud osakesed juba MS detektorisse, kus teostatakse ioonide lahutamine m/z suhte alusel. (Shen, 2000, lk 5847)

2.3. Spektrofotomeetrilised uurimismeetodid

2.3.1. Ultraviolettkiirguse ja nähtava valguse spektroskoopia

Nähtav valgus ja ultraviolettkiirgus (ingl *ultraviolet and visible light*, UV/Vis) on valgusspektrist sagedaseim uurimiseks kasutatud piirkond biokeemiliste probleemide lahendamisel. Siinses uurimistöös võeti abiks UV/Vis spektroskoopia, et määrata ensüümi kontsentratsioon alglahuses. UV/Vis spektroskoopiat kasutatakse antud kiirgustele tundlike molekulide (osade) ehk kromofooride puhul. Nende hulka kuuluvad peptiid- ehk amiidrühm, mõnede aminohapete aromaatsed kõrvalahelad (nt trüptofaan ja türosiin), teatud prosteetilised rühmad, koensüümid. (Wilson, Walker, 2010, lk 482, 484) Prosteetilisi rühmi moodustavad proteiinidega kovalentselt seotud mittevalgulise ehitusega molekulid, koensüümid on aga nendega seotud mittekovalentselt (Carey, Giuliano, 2014, lk 1163).

UV/Vis spektroskoopia põhineb uuritava aine valguse neelduvuse määramisel. Alguses aineosakesed ergastatakse ning mõõdetakse valguse neelduvust sellise protsessi vältel, kus elektronid liiguvad kõrgemale energiatasemele. Iga aine neelduvus (A) on lineaarselt sõltuv tema molaarsest neeldumistegurist (ϵ), molaarsest kontsentratsioonist (c) ja lahuse kihi paksusest (L). Antud seaduspära kirjeldab Beer-Lamberti seadus:

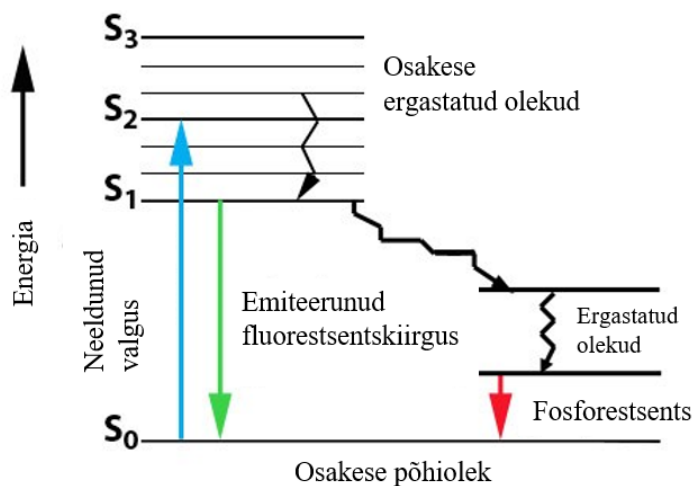
$$A = \epsilon c L \text{ (Atkins, Paula, 2002, lk 491)}$$

2.3.2. Fluorestsentspektroskoopia kui mitteradioaktiivne uurimismeetod

Uurimismeetodid, milles leiavad kasutust radioaktiivsed isotoobid või erinevad optilise spektroskoopia meetodid, on laialt levinud biokeemias kõrge efektiivsuse ja mitmete kasutamisevõimaluste pärast (Pochin, 1961, lk 1091–1092). Üks spektroskoopia uurimismeetoditest on fluorestsentspektroskoopia.

Aine fluorestsentsi uurimisel ergastatakse molekul algul footoni energiaga, mis võib uuritava aine osakeseni jõuda kas ultraviolettkiirgusest või nähtavast valgusest, ning molekuli elektronid tõusevad kõrgemale energianivoole (Slavik, 1994, lk 13). Et energia miinimumi printsiibi järgi on aineosake stabiilsem väiksemal energianivool, siis on kõrgemal energiatasemel olev osake ebapüsiv ning selline olukord pole tema jaoks n-ö soodne. Nii kaasnebki molekuli kiirgusega või kiirguseta naasmine madalama energiaga olekusse. (Wilson, Walker, 2010, lk 493–494)

Kiirguseta ergastumise kustumise (ingl *internal conversion*) korral kulub ergastuse energia vibreerimisele, roteerimisele (muundub soojusenergiaks) (*Ibid.*, lk 494; Sawhney, Singh, 2000, lk 279). Kiirgusega ergastuse kadumise tüübid on aga fluorestsents ja fosforestsents (Atkins, Paula, 2005, lk 515). Mõlemad protsessid on footoni emiteerumise (ingl *photon emission*) protsessid, mis esinevad aineosakese ergastatud olekust madalama energiatasemega, sageli põhiolekusse naasmisel (So, Dong, 2007, lk 1023). Üks erinevusi fluorestsentsi ja fosforestsentsi vahel seisneb protsesside kestvuses. Nimelt on viimase kestvusperiood tuhandeid kordi pikem kui fluorestsentsi oma (viimase korral emiteeruvad footonid ajavahemikus kuni 10^{-10} – 10^{-8} s sel ajal, kui fosforestseeruv aineosake kiirgab energiat ajaperioodil 10^{-6} s kuni 1 s peale ergastamist). Eelnevalt kirjeldatud protsessi illustreerib Jablonski diagramm (vt joonis 6). Fosforestseeruv molekul kiirgab footoneid veidi ka peale seda, kui proovi ergastamine on lõppenud. (Sawhney, Singh, 2000, lk 279)

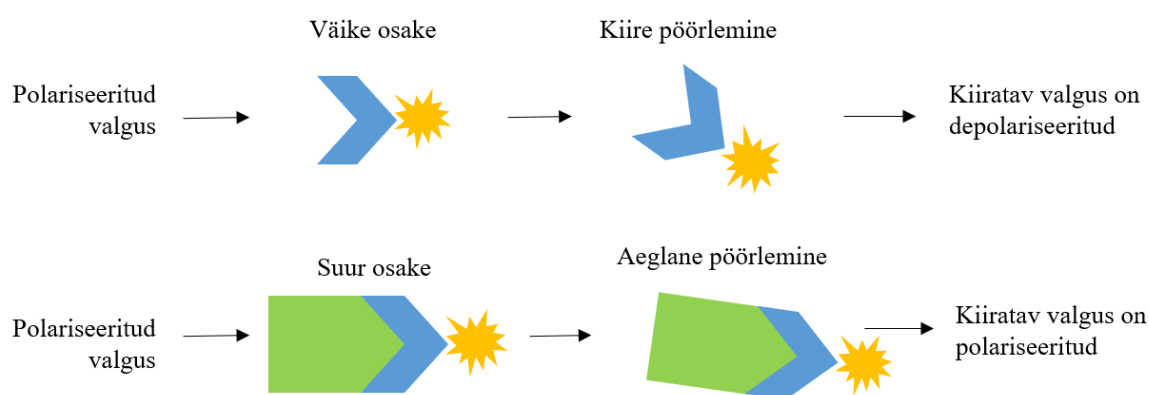


Joonis 6. Jablonski diagramm. S₀ on osakese madalaim energiatase ehk põhiolek, S₁, S₂, S₃ on ergastatud osakese kõrgemad energiatasemed (kohandatud Gaurav Tiwari blogist, 04.05.2015).

Fluorestsentsmeetodite alla kuuluvad fluorestsentsintensiivsuse ja fluorestsentsanisotroopia mõõtmised (Johnson, Reinhart, 1996, lk 243).

2.3.3. Fluorestsentsanisotroopia

Fluorestsentsanisotroopia (edaspidi FA) uurib erinevate molekulide pöörlemiskiiruseid polariseeritud valguse abil. Osake ergastatakse polariseeritud valgusega, st valguskiirte elektromagnetlained võnguvad vaid ühes tasapinnas, mis saavutatakse valguse juhtimisega läbi polarisaatori. Kui polariseeritud valgusega ergastada väikest molekuli, on sellest kiiratud valgus depolariseeritud, kuna osakese pöörlemiskiirus on suur. Kui aga väike molekul ühineb suuremaga, aeglustub nende pöörlemine (kompleks on raskem) ja aina rohkem tagasikiiratatavat valgust jääb polariseerituks (vt joonis 7). Üldistatult võib tõdeda, et FA sõltub vaatluse all oleva molekulikompleksi massist: FA väärtus kasvab vastavalt uuritava osakese / nende kompleksi molaarmassi suurenedes. FA väärtus on väikseim sellise osakese puhul, mis pöörleb kiiresti.



Joonis 7. Erineva suurusega molekulide ergastamine polariseeritud valgusega. Esimesel juhul uuritakse väikest osakest, mis pöörleb kiiresti ja FA on väike. Teisel juhul on tegu suure osakesega (kompleksiga), mis pöörleb aeglaselt ja FA on seega suur.

FA katsetes kasutatakse fluorofoore, fluorestseeruvaid osakesi, mille pöörlemiskiirus vabas vormis on väga suur. Kui fluorofoor seostub uuritava molekuliga, suureneb kompleksi mass, FA väärtus hakkab kasvama. Väljatõrjumiskatsetes uuritakse märgistusetu aineid (siin inhibiitorid), mis seostudes valguga, tõrjuvad selle küljest fluorestsentsmärgisega aine. Tulemuseks on signaali anisotroopia vähenemine, sest nüüd pöörleb vaba fluorofoor kiiremini ja rohkem kiiratatavast valgusest on depolariseeritud. Siinses uurimistöös kasutatakse fluorofoorina fluorestsentssondi ehk -ligandi.

3. EKSPERIMENTAALNE OSA

3.1. Inhibiitorite süntees Fmoc-tahkefaassünteesi meetodil

Siinse uurimistöö sünteesi lähteained olid *Fmoc-Rink-Amid resin*, I aminohape Fmoc-D-alaniin, II aminohape vastavalt sünteesile kas D- või L-lüsiin (α -aminorühm oli kaitstud Boc-rühmaga, külgahela aminorühm aga Fmoc-rühmaga), III vaigule lisatav aine ehk 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)tiofeen-2-karboksüülhape, aktiveerija HBTU (vt lisa 1; lisa 2). Lahustena võeti kasutusele DMF, NMM, DCM, TFA, H₂O, TIPS ja isopropüülalkohol.

Sünteesi esimene etapp oli lähteainete ettevalmistamine. Vaik, mida kaaluti mõlemal korral ligi 53 mg (1 ekv), jäeti punduma 2 ml DMF lahuses 12 tunniks. See oli vajalik seetõttu, et *resin*'i poorid suureneksid, selle funktsionaalrühmad oleksid reagentidele kättesaadavad ja vaik suudaks hiljem suurema hulga aminohappega seostuda. Vaigu aminorühmasid kaitsvad Fmoc-rühmad tuli peale pundumist eemaldada. Selleks lisati vaigule kaks korda 20%-list piperidiini lahust DMF-s, mis reageerib Fmoc-rühmaga oma aluselisuse tõttu. Et vaik oleks piperidiinist puhas, pesti seda seejärel viis korda DMF lahusega.

Sünteesi teine etapp koosnes Fmoc-rühmaga kaitstud aminohappe Ala ja HBTU aktiveerimisest ning sellega tahke kandja atsüülimisest. Esimene aminohape D-Ala (3 ekv) ja HBTU (2,94 ekv) lahustati DMF-s, lisati 0,25 ml NMM-i. Saadud segu hoiti 3 minutit, lisati vaigule ning jäeti loksuma 1,5 tunniks. Peale aminohappe kinnitumist tahkele kandjale pesti saadust uuesti.

Järgnevad etapid põhinesid eelnevatel. Vaigule kinnitunud alaniini N-terminaali küljest eemaldati piperidiiniga Fmoc-rühm, vaiku koos sellele kinnitunud alaniiniga pesti viis korda DMF-ga. Teine aminohape (vastavalt katsele D-Lys või L-Lys, mõlema puhul 3 ekv) ja HBTU lahustati DMF-s ja NMM-s ning lisati samamoodi tahkele kandjale. Segu vaiguga loksutati 1,5 h ja pesti. Lüsiini külgahela Fmoc-rühm eemaldati piperidiiniga ning peale järjekordset lahuse pesemist tehti atsüülimine tiofeeniga (1,5 ekv), mida oldi eelnevalt aktiveeritud HBTU-ga (1,4 ekv). Protsesside tulemus oli soovitud inhibiitor, mis on kinnitunud tahkele kandjale.

Iga atsüülimisreaktsiooni tulemuslikkust kontrolliti Kaiser testi ja UV/Vis lambi abil. Kaiser testi rakendati peale I ja II atsüülimist, UV/Vis lampi aga viimasena lisatava karboksüülhappe juures. Viimast kvalitatiivset meetodit võimaldas tiofeeni fluorestseerumisomadus.

Kaiser testi alustati sellega, et väike osa reageerinud, kuid juba pestud vaiguteri koos neile kinnitunud aminohapetega tõsteti eraldi anumasse. Teradele lisati 0,05 ml fenooli/EtOH ja sama palju ninhüdriini/EtOH lahuseid ning kuumutati. Positiivse testi korral on näha siniseks muutunud teri seetõttu, et kirjeldatud tingimustel värvuvad vabad aminorühmad siniseks. Siinses uurimistöös olid kõik testid negatiivsed, st reageerimata aminorühmad puudusid ja nii I kui II aminohape olid edukalt kinnitunud inhibiitori eelmisele koostisosale. Kolmanda aine

lüsiinijäägile kinnitumise kontrollimine seisnes mõlema inhibiitori sünteesil kasutatud katseanuma viimises UV/Vis lambi alla. Fluorestseeruv tiofeen andis endast märku, muutes terad helendavaks, ja see tähendas, et III aine oli efektiivselt kinnitunud ülejäänud peptiidiahela külge.

Enne SPPS-i viimast etappi pesti vaik peale DMF-i veel isopropüülalkoholi ja diklorometaani lahustega. Alkohol eemaldab DMF jäägid tahke kandja küljest. DCM omakorda aitab alkoholi maha pesta ja vaiguterad punduvad uuesti (alkoholi mõju tõttu tõmbusid nad kokku). Mõlemad pesemisprotsessid olid viiekordsed.

Sünteesi lõpetaval etapil eemaldati inhibiitori molekul tahkelt kandjalt. TFA, H₂O ja TIPS-i lahuse valmistamisel lisati anumasse 0,9 ml hapet ning 0,05 ml nii vett kui ka TIPS-i. Vaakumiga kuivatatud vaiguterad ja kirjeldatud lahus segati kokku, loksutati 1,5 h ning lahus tõsteti ümber väiksemasse ümarkolbi. Edaspidi kasutati vaid inhibiitori lahust. Kolbi viidud lahust roteeriti vaakumi abil 70 °C-ni soojendatud veevannis, kuni tahke saadus oli jäänud anuma pinnale.

Mõlema sünteesi saadusainete olemasolu tuvastati HPLC-MS meetodiga ja nad puhastati HPLC meetodiga. Nii esimest kui teist protsessi jälgiti valguse neeldumise järgi lainepikkusel 340 nm. Ainete puhastamise jaoks valmistati ette süstimislahus, milleks oli 20%-line ACN-i lahus. Kokku võeti 160 µl MQ-vett ja 40 µl ACN-i puhast lahust. Ühe süstitava proovi, milles sisaldus inhibiitorit ja äsja valmistatud ACN-i lahust, ruumala oli < 10 µl.

3.2. Biokeemilised katsed

Puhastatud inhibiitorite võimekust seostuda PKAc-ga uuriti biokeemiliste katsetega, kus kasutati FA-d. Esimeses katses määrati aktiivse PKAc kontsentratsioon lahuses, mis oli juba varasemalt laboris kättesaadav. PKAc oli inimese ensüümi järjestusega. Teises katses uuriti ensüümi ja inhibiitori vahelist seostumist. Selles etapis võeti kasutusele võrdlusinhibiitor ARC-1176, mille linkeri osas aminorühma ei leidunud ning mille toimimiseefektiivsus oli juba teada. Mõlemas katses kasutati fluorestsentssondina ARC-583, mille ensüümiga seostumise muutusi oli võimalik jälgida FA väärtuste muutumise abil (vt lisa 3). Nimetatud ained olid laboratooriumis varasemalt olemas, inhibiitorid ARC-1464 (D-isomeer) ja ARC-1465 (L-isomeer) olid aga sünteesitud uurimistöö raames.

Et biokeemiliste katsete jaoks oli vaja valmistada kindla kontsentratsiooniga lahuseid, määrati lähteainete ARC-1176, ARC-583, ARC-1464 ja ARC-1465 sisaldused alglahustes valguse neelduvusega. Viimase väärtused mõõdeti iga ühendi puhul UV/Vis spektromeetriga ning nende neeldumistegureid teades avaldati lahuse kontsentratsioon Beer-Lamberti seadusest. Kõigi nelja uuritud molekuliga tehti korduskatset, mille tulemused on toodud järgnevas tabelis

(vt tabel 1). Alglahuste kontsentratsioonid arvatud, valmistati mõlema biokeemilise katse jaoks vajaminevad kindla kontsentratsiooniga lõpplahused.

Tabel 1. ARC-1176, ARC-583, ARC-1464 ja ARC-1465 kontsentratsioonide arvutamiseks vajalikud väärtused. Viimases tulbas on toodud välja alglahuste arvatud kontsentratsioonide keskmised väärtused.

katse nr	neelduvus A	lainepikkus L (nm)	neeldumistegur ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	kontsentratsioon c (mM)
I _{ARC-1176}	0,595	339	15 000	0,401
II _{ARC-1176}	0,607	339		
I _{ARC-583}	0,759	559	80 000	0,096
II _{ARC-583}	0,777	559		
I _{ARC-1464}	1,206	337	15 000	0,817
II _{ARC-1464}	1,244	338		
I _{ARC-1465}	1,203	339	15 000	0,809
II _{ARC-1465}	1,224	339		

Puhverlahus, mis valmistati enne katse tegemist, koosnes juba olemasolevatest üksikutest HEPES/NaCl/P20, DTT ja BSA lahustest. Esimese lahuse koostisosade ülesanded on järgmised: HEPES (c = 5 mM) loob puhversüsteemi, NaCl (c = 150 mM) toimel valgud ei koaguleeru ning 0,005%-line polüsorbaat 20 lahus toimib mitteioonse pindaktiivse aina. DTT (c = 0,77 mg/ml) on antioksidant, BSA (c = 0,5 mg/ml) täidab aga stabiilse kõrvalkomponendi rolli.

3.2.1. Aktiivse PKAc kontsentratsiooni määramine

FA mõõtmise abil tiitrides on võimalik leida uuritavate ainete kontsentratsiooni. Nii tehtigi esimene fluorestsentsil põhinev katse laboratooriumis olnud PKAc (anumale märgitud kontsentratsioon oli 375 nM) aktiivse osa kontsentratsiooni määramiseks, sest vaatamata karmidele tingimustele (PKAc lahust oli hoitud temperatuuril $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) aktiivse ensüümi sisaldus muutub aja jooksul. Katses lasti fluorestsentssondil ARC-583 seostuda erineva kontsentratsiooniga ensüümiga ning saadi teada arvuti tehtud katseandmete analüüsi tulemusena aktiivse kinaasi osakaal.

Mikroplaadile kanti erinevaid lahuseid nii, et koguruumala igas pesas oleks 20 μl (vt tabel 2). Esimesse pesa (A) sisestati PKAc (c = 375 nM) ja ARC-583 (c = 100 nM) kompleks, järgnevas 11 pesas (B–L) oli moodustatud ensüümi kahekordne lahjendusseeria, eelviimasesse pesa

(M) oli lisatud vaid puhvrit ja fluorestsentssondi ning viimasesse pesa (N) oli kontrolliks kantud ainult puhvri lahus.

Tabel 2. Aktiivse PKAc kontsentratsiooni määramise katses kasutatud eeskiri lahuste mikroplaadile sisestamiseks. Lahuste pipeteerimise järjekord on vasakult paremale.

pesa	puhvri ruumala (µl)	PKAc ruumala (µl)	ARC-583 ruumala (µl)	Σ (µl)
A	0	16	4	20
B–L (11 pesa)	16	16→ (tõstetud eelnevast pesast järgmisesse)	4	20
M	16	0	4	20
N	20	0	0	20
Σ (µl)	212	32	52	

3.2.2. Väljatõrjumiskatse

Inhibiitorite afiinsusi mõõdeti nende võime abil välja tõrjuda fluorestsentsligandi (ARC-583) ensüümi aktiivtsentrist. Suurema molaarmassiga aine FA signaal on suurem. Nii oli eksperimendi alguses PKAc seotud sondiga ARC-583 ning kompleksi pöörlemisest tulenev FA väärtus oli suur. Kui reaktsioonisegule lisati inhibiitorit, seostus viimane ensüümiga, tõrjudes välja fluorestsentssondi. Et FA signaal oli saadav vaid ARC-583-lt ning et see vabanes mahukast ensüümist, st molaarmass vähenes märkimisväärselt, hakkas FA väärtus kahanema. Anisotroopia väärtuse jõudmine alumisele platoole tähendab, et kogu ensüüm on seostunud inhibiitoriga ja mida madalamal inhibiitori kontsentratsioonil see juhtub, seda efektiivsemaks loetakse inhibiitorit.

Siinse uurimistöö väljatõrjumiskatses kasutati sünteetiliselt inhibiitoreid ARC-1464 ja ARC-1465 ning juba varasemast teatud efektiivsusega võrdlusinhibiitorit ARC-1176. Iga eespool nimetatud aine jaoks eraldati oma veerg, kuhu sisestati lahuseid samasuguse eeskirja järgi (vt tabel 3). Kõikides pesades sisalduvate lahuste koguruumala oli 20 µl ning eelmisest katsest, kus määrati inhibiitorite ja fluorestsentssondi kontsentratsioone, saadud tulemuste abil valmistati vajaliku kontsentratsiooniga lahuseid. Esimese rea pesades (A) oli vaid inhibiitori ja ensüümi ning fluorestsentssondi kompleksi segu. Järgneva 10 rea (B–K) pesades oli inhibiitori lahjendusseeria puhvri ja ensüümi ning fluorestsentssondi kompleksi lahuses. 11. rea (L) pesadesse sisestati puhver ja fluorestsentssondiga ensüüm, 12. rea (M) moodustas ARC-583 (c = 20 nM) puhverlahuses ning viimase rea (N) pesades oli vaid puhver.

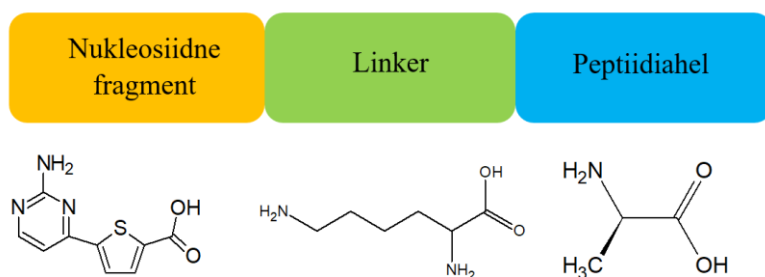
Tabel 3. Inhibeerimiskatses kasutatud eeskiri lahuste mikroplaadile sisestamiseks. Lahuste pipeteerimise järjekord on vasakult paremale.

pesa	puhvri ruumala (µl)	inhibiitori (ARC-1176/ARC-1464/ARC-1465) ruumala (µl)	ARC-583-PKAc kompleksi ruumala (µl)	20 nM ARC-583 ruumala (µl)	Σ (µl)
A	0	16	4	0	20
B–K (10 pesa)	16	8→ (tõstetud eelnevast pesast järgmisesse)	4	0	20
L	16	0	4	0	20
M	18	0	0	2	20
N	20	0	0	0	20
Σ (µl)	214	24	48	2	

4. TULEMUSTE ANALÜÜS JA ARUTELU

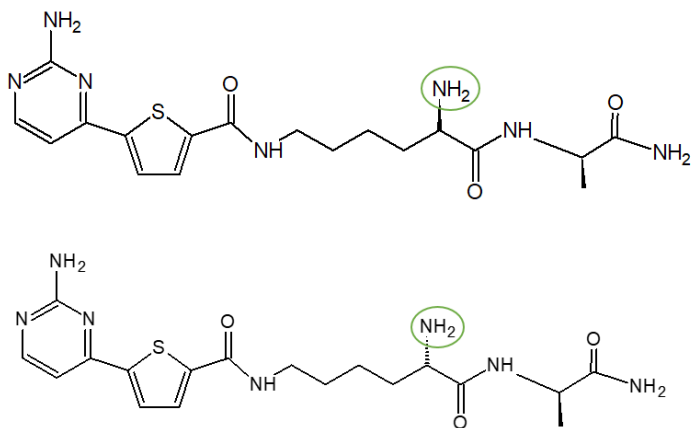
4.1. Inhibiitorite süntees ja iseloomustamine

Uurimistöö raames toetuti inhibiitorite struktuuride väljatöötamisel ARC-tüüpi inhibiitorite ehituslikele põhimõtetele ning eesmärgile luua võimalikult väikese massiga inhibeeriv molekul (vt joonis 8). Inhibiitori peptiidiahela rollis kasutati uurimistöös D-alaniini, mis seostus ühega kinaasi mitmest seostumissaidist. Nukleosiidse fragmendina kasutati 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)tiofeen-2-karboksüülhapet, mis pidi kinnituma ensüümi ATP-sidumissaidile. Linkeri valimine oli selle töö kontekstis tähtsaim aspekt. Et sooviti luua võrdlemisi lühikese ahelaga aine, otsustati linkeriks valida lüsiin.



Joonis 8. Sünteesitud inhibiitorite koostisosad.

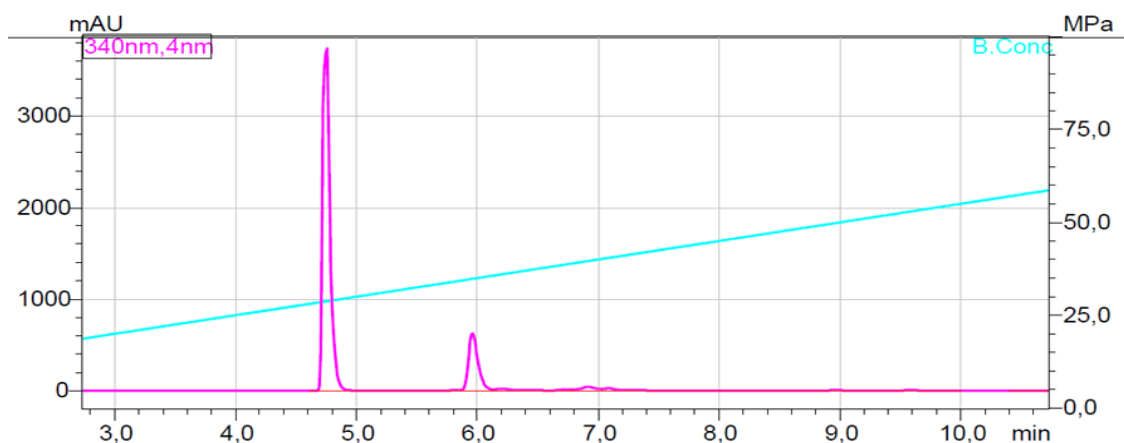
Inhibiitorite sünteesil kasutati D- ja L-konfiguratsioonis olevat lüsiini (vastavalt inhibiitorid ARC-1464 ja ARC-1465). D-alaniini N-terminaal pandi reageerima Lys-i karboksüülrühmaga ja tiofeeni C-terminaal reageeris Lys-i kõrvalahela ehk ϵ -aminorühmaga. Nii jäi α -aminorühm vabaks ning selle mõju ensüümile sai edukalt uurida. Teadlik kõrvalahela aminorühma reageerima suunamine ja teise aminorühma inaktiveerimine oli võimalik tänu Boc-kaitserühmale, mis oli sünteesi käigus α -aminorühma küljes, st kaitses seda. Fmoc-SPPS-i tulemusena said sünteesitud kaks diastereomeerset inhibiitorit ($M_{\text{inhibiitor}} = 419 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$), mille ainuke erinevus seisnes Lys-i peeahela α -süsiniku konfiguratsioonis (vt joonis 9).



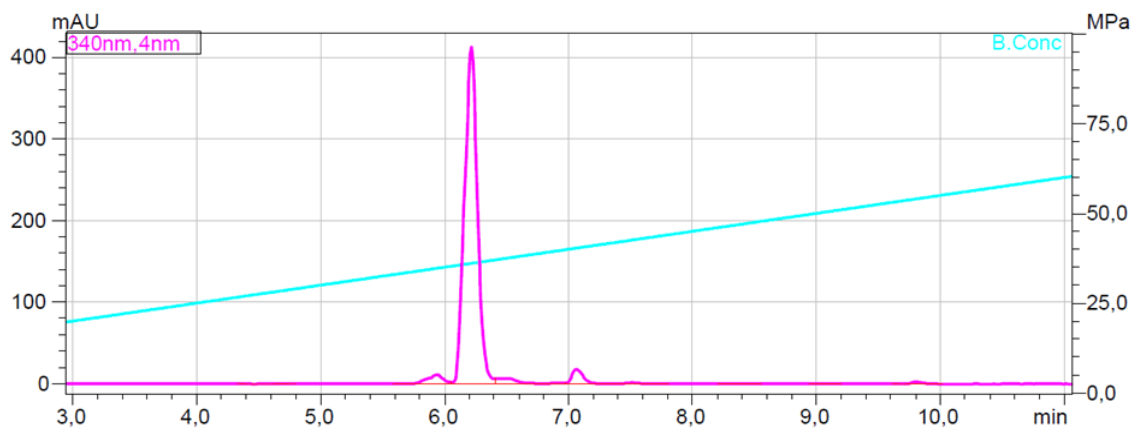
Joonis 9. Sünteesitud inhibiitorid: ülemine on ARC-1464, alumine aga ARC-1465. Rohelise ringiga on märgitud molekulide isomeeriat põhjustav aminorühm.

4.2. Saadusainete kontrollimine ja puhastamine

Inhibiitorite ARC-1464 ja ARC-1465 sisaldus katsesaaduste segus kontrolliti HPLC-MS meetodiga. HPLC-MS süsteemi kuulusid diodrividetektor ja massispektromeetria detektor ning nii saadigi kaks graafikut mõlema detektori abil kogutud andmetega. Esimesel, diodrividetektori abil saadud graafikul on abstsisssteljel märgitud elueerimisaeg minutites ning ordinaatteljel neelduvus mAU ühikutes 340 nm juures. ARC-1464 puhul on graafikul näha kaks kõrgemat piiki, mis tähendab, et sünteesijärgses lahuses oli lisaks põhiproduktile ka üks kõrvalprodukt (vt joonis 10). Kõrgema piigiga aine oli ARC-1464, teist saadust ei tuvastatud. ARC-1465 puhul on aga mitu piiki, kõrgeim neist kuulub inhibiitorile, teised piigid on ebavajalike kõrvalproduktide omad (vt joonis 11).

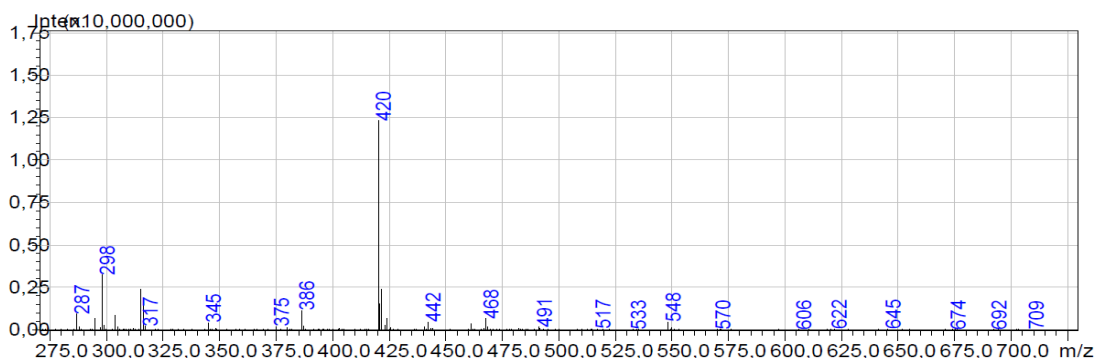


Joonis 10. ARC-1464 sisaldava proovi graafik, mis on saadud diodrividetektori abil.

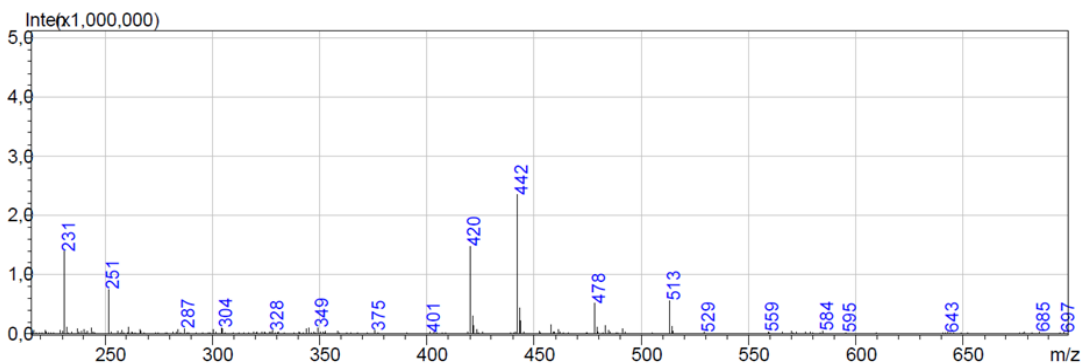


Joonis 11. ARC-1465 sisaldava proovi graafik, mis on saadud diodrividetektori abil.

MS detektoriga saadud andmetega graafikutelt on täpsemini eristuvad kõik sünteesi käigus tekkinud ained. Nii saab neilt usaldusväärsema info kui eespool kirjeldatud diodrividetektori graafikutelt. Mõlema inhibiitori graafikutel on näha üks teistest kõrgem piik, millele on märgitud ära osakese mass ($m = 420$ Da) (vt joonis 12; joonis 13). Inhibiitori molekulmassiga ($m = 419$ Da) võrreldes erineb graafikult loetud väärtus vaid 1 ühiku võrra. See on tingitud ühest protonist, mis annab osakesele laengu ning mis on arvatavasti liitunud aminorühma külge. Seega kuulub antud piik vastavalt katsele ARC-1464 või ARC-1465-le. MS kinnitas, et sünteediti planeeritud inhibiitorid.



Joonis 12. ARC-1464 sisaldava proovi graafik, mis on saadud MS detektori abil.



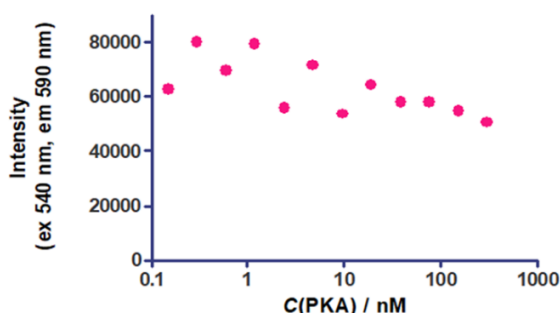
Joonis 13. ARC-1465 sisaldava proovi graafik, mis on saadud MS detektori abil.

Peale saadusainete kontrollimist puhastati katseteks vajaminev kogus inhibiitoreid sünteesi segust kasutades sama HPLC süsteemi. Tegutsemiseeskiri on välja toodud alapeatükis 3.1., kokku tehti kuus süsti mõlema aine puhul. Ühes proovis sisalduva lahuse komponentideks lahutamine võttis aega maksimaalselt 10 minutit, inhibiitorite piigid ilmusid arvuti kuvataval graafikutel kuuenda minuti paiku.

4.3. Biokeemilised katsed

4.3.1. PKAc kontsentratsiooni määramine

Mikroplaadile lahuste pipeteerimise eeskirjad on esitatud alapeatükis 3.2.1. Kui kõik vajalikud pesad täideti lahustega, sisestati mikroplaat masinasse Pherastar (BMG), mis mõõtis igast pesast tulevat kiirguse polariseeritust ehk FA signaali. Mikroplaadi sisu analüüsi tulemusel kuvas arvuti kaks graafikut: esimesel on näha fluorestsentsintensiivsus ja teisel FA (r) sõltuvus ensüümi kontsentratsioonist. Esimene graafik andis uurimistöö kontekstis lihtsa tõestuse sellest, et lahused olid korralikult mikroplaadile kantud (vt joonis 14). Graafikul paiknevate punktide asukohtade järgi on võimalik määrata, et korrelatsioon on üsna tugev ning lahused sisaldasid erinevates pesades samast fluorestsentsligandi kontsentratsiooni.

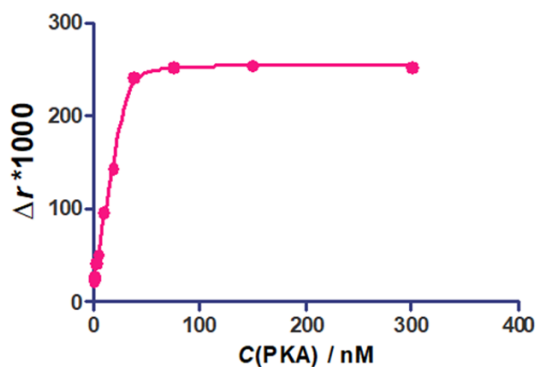


Joonis 14. Fluorestsentsi intensiivsus erineva PKAc kontsentratsiooniga pesades.

Teine graafik loob aga palju informatiivsema pildi. Nimelt saab sellelt teada aktiivse ensüümi kontsentratsiooni lahuses, määrates x väärtuse hetkel, mil FA muutub stabiilseks ehk jõuab maksimumini (vt joonis 15). Sel momendil on kogu fluorestsentssond seotud aktiivse ensüümiga. Antud katses saadi aktiivse kinaasi kontsentratsiooniks 62 nM ehk fluorestsentssondiga seostus kogu ensüümi kogusest 62%. Kasutades ensüümi kontsentratsiooni, mis oli alguses märgitud anumale ($c = 375$ nM) ja aktiivse ensüümi osakaalu, jõuti lihtsa arvutustehtega PKAc kontsentratsioonini alglahuses:

$$C_{\text{akt.}} = 0,62 \cdot 375 = 232,5 \text{ (nM)}.$$

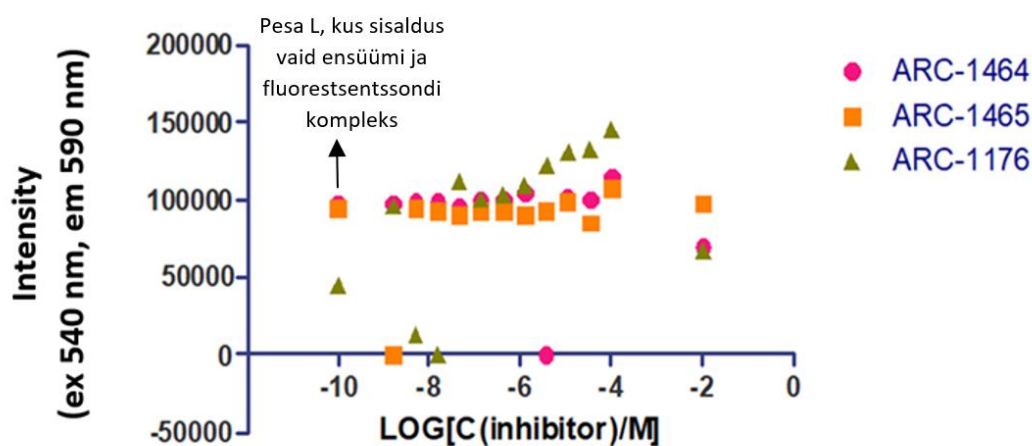
Saadud kontsentratsioon oli vajalik seetõttu, et viimaseks biokeemiliseks katseks oli vaja valmistada kindla kontsentratsiooniga lahused, teisisõnu kasutati $C_{\text{PKAc}} = 232,5$ nM hilisemate arvutuste käigus.



Joonis 15. FA sõltuvus PKAc kontsentratsioonist. FA väärtused on 1000-kordsed graafiku lugemise mugavuse huvides.

4.3.2. Väljatõrjumiskatse kolme inhibiitoriga

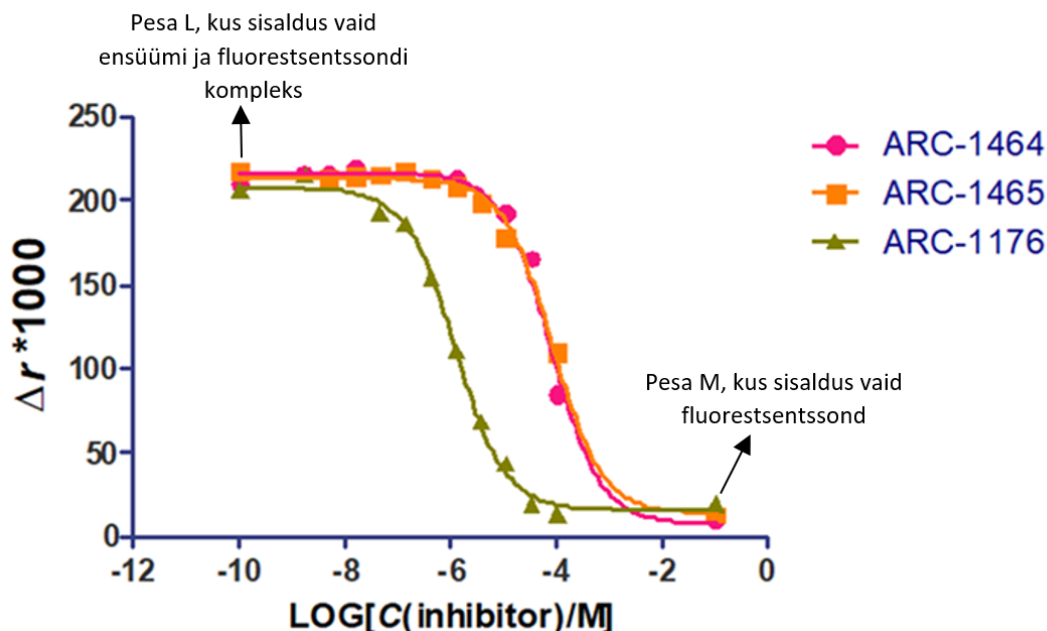
Mikroplaadile lahuste sisestamise eeskiri on esitatud alapeatükis 3.2.2. Lahused mikroplaadile kantud, sisestati plaat masinasse ning lasti sel teha mõõtmine. Ka selle biokeemilise katse tulemusena saadi kaks graafikut. Esimesel graafikul on sarnane roll eelneva katse esimese graafikuga, sest antud juhul kontrolliti samuti lahuste plaadile kandmise ühtlust (vt joonis 16). Näha on mitmed punktid, mis kalduvad oluliselt kõrvale enamikest punktides ning need jäeti välja FA graafiku analüüsist. Üldisemalt võttes saadi aga iga inhibiitori jaoks piisav andmepunktide arv, et neid usaldus- ja analüüsiväärseteks pidada.



Joonis 16. Fluorestsentsintensiivsus väljatõrjumiskatse erinevates katsepunktides.

Teisel graafikul on kõigi kolme inhibiitori tekitatud kõverad, mis iseloomustavad nende seostumise efektiivsust (vt joonis 17). Esimesel graafikul märgatud kõrvale kaldunud punktide väärtused eemaldati antud graafikust. IC_{50} väärtuste saamiseks võetakse graafikult FA väärtus, mis on 50% maksimumist. Sellele FA väärtusele vastavad uuritud inhibiitorite sellised kontsentratsioonid, mille juures on 50% fluorestsentsligandist ensüümist välja tõrjutud. Mida väiksem on IC_{50} väärtus, seda tugevamini seostub inhibiitor PKAc-ga. Graafikut analüüsides

saadi ARC-1464 korral IC_{50} väärtuseks 77,8 μM , ARC-1465 korral 82,8 μM ning võrdlusinhibiitori ARC-1176 korral 1,22 μM . Tuli välja, et kontrollinhibiitor oli umbes 65 korda efektiivsem kui mõlemad töö käigus sünteesitud inhibiitorid. Võrreldes aga stereomeere ARC-1464 ja ARC-1465 omavahel, ei esine olulist erinevust, st inhibeerivad omadused on neil väga sarnased.



Joonis 17. FA sõltuvus ARC-1464, ARC-1465 ja ARC-1176 kontsentratsioonidest.

4.4. Järeldused

Uurimistöö käigus sünteesitud inhibiitorid ei olnud võrdväärset efektiivsust inhibiitorid võrreldes juba olemasolevate inhibeerivate molekulidega. Seega aminorühma sisseviimine linkeri uuritud positsiooni ei ole soodne PKA-ga seostumiseks. Vaatamata sellele on ARC-1464 ja ARC-1465-l siiski olemas inhibeerivad omadused ning üks võimalusi neid parandada on molekuli struktuuri muutmine. Kui diastereomeere võrrelda omavahel, mõjuvad nad PKA-le sarnaselt, nii et neid saab pidada samasuguse afiinsusega inhibiitoriteks. Veidi suuremat edukust ensüümiga seostumisel võib küll täheldada ARC-1464 ehk D-lüsiini sisaldava inhibiitori puhul, kuid see pole mõõtmiste määramatust hinnates oluline erinevus.

Peale molekuli struktuuri muutust peetakse veel uurimistöö potentsiaalseks arengusuunaks ARC-1464 ja ARC-1465 katsetamist teiste ensüümide peal. Et iga PK on veidi erineva ehituse ja kujuga, leidub kindlasti mõni biomolekul, millele inhibiitoris sisalduv aminorühm n-õ sobib paremini. Nii võib osutada töös välja arendatud inhibiitor selle PK-i jaoks paremaks inhibeerijaks.

KOKKUVÕTE

Valkude funktsioonid tagavad elu võimalikkuse. Suurem osa organismides toimuvatest protsessidest teevad valgud, tsütoplasmas ainete lagundamisest rakkude jagunemiseni. Üks valkude tüüpidest – ensüümid, sh proteiinkinaasid –, on see, mis katalüüsib reaktsioone. Muteerunud PK-d ei täida aga oma ülesannet korrektselt ja toimuvad vead valkude- ja hiljem juba rakkudevahelisel infovahetusel. Kirjeldatud vead põhjustavad haigusi, nt immuunsüsteemi häired ja pahaloomulised kasvaja. Seda arvestades on tänapäeva meditsiini oluline tegevusvaldkond PK-de inhibiitorite arendamine ja sünteesimine. Efektiivne inhibiitormolekul seostub muteerunud PK-ga ning ei võimalda sellega ensüümi toimimist. Nii võib inhibiitor ära hoida tõsiste haiguste avaldumise.

Ka uurimistöös keskenduti inhibiitorite arendamisele. Uurimistöös raames sünteesiti esmalt Fmoc-tahkefaassünteesi meetodil kaks PKAc inhibiitorit, milles varasematega inhibiitormolekulidega võrreldes oli linkeris osas aminorühm. Viimane võis püstitatud hüpoteesi järgi oluliselt mõjutada ensüümiga seostumise efektiivsust. Kaks sünteesitud inhibiitorit erinesid uuritava aminorühma konfiguratsiooni poolest, neis sisalduv linker oli kas D- või L-lüsiin. Nii olid sünteesi lõppsaadused ARC-1464 ehk D-Lys-i sisaldav ja ARC-1465 ehk L-Lys-i sisaldav inhibiitorid. Nende ühendite määramiseks produktide segus analüüsiti saadud lahused kõrgefektiivse vedelikkromatograafia-massispektromeetria (HPLC-MS) ühissüsteemiga. Mõlemad sünteesid õnnestusid, lahuste segus oli kaks vajalikku isomeeri, mis puhastati HPLC-ga.

Edasistes biokeemilistes katsetes kasutati peamiste lähteainetena inimkinaasi järjestusega PKAc-d ja kolme inhibiitorit: töö käigus sünteesitud ARC-1464 ja ARC-1465 ning teadaoleva aktiivsusega võrdlusinhibiitorit ARC-1176. Biokeemiliste katsetega hinnati sünteesitud inhibiitorite seostumisvõimet PKAc-ga. Selgus, et töös valmistatud molekulid on ligikaudu 65 korda nõrgemate inhibiitorite omadustega, kui neid võrrelda juba olemasolevate inhibiitoritega, sh ARC-1176-ga. Esimene püstitatud hüpoteesidest pidas paika, sest uuritav aminorühm vähendas inhibiitormolekuli afiinsust. Stereomeeride omavahelisel võrdlemisel ei tuvastatud aminorühma erineva konfiguratsiooni mõju inhibiitorite afiinsusele ning teine hüpotees lükati ümber.

Uurimistöös võimalike edasiste arengusuundade hulka kuulub kindlasti välja töötatud inhibiitorite modifitseerimine. Muutumatu alustaladena jääksid püsima molekulide struktuurne põhimõte ehk sarnasus ARC-tüüpi inhibiitoritega, molekulide väike molekulmass. Muutusteks ja edasiarendusteks annab põhjuse inhibiitorite olemasolev inhibiitorivõime, praeguses kontekstis pole see lihtsalt piisavalt suur. Huvipakkuv on ka ülejäänud PK-de katsetamise aspekt, sest iga ensüüm on erineva ehitusega, ning ARC-1464 ja ARC-1465 võivad osutada mõne teise kinaasi efektiivseteks inhibiitoriteks.

RESÜMEE

Valkude õige funktsioneerimine on üks elu alustest. Neil lasub raku jagunemise, apoptoosi, jääkainete lõhustamise jm protsesside reguleerimine, mis kõik aitab rakul, üldisemas mõttes organismil, elus püsida. Ühed hädavajalikest valkudest on proteiinkinaasid, ensüümid, mis katalüüsivad teiste valkude fosforüülimisreaktsiooni, teisisõnu nad käivitavad rakkudes biokeemilisi protsesse. Et aga iga sünteesi käigus on võimalikud vead, siis tekib ka rakkudes muteerunud proteiinkinaase. Sellised molekulid osutuvad alati saatuslikeks organismidele, sest defektsete ensüümide vaba toimimine rakus jõuab lõpus apoptoosini välja. Anomaaliad ensüümide funktsioneerimises põhjustavad paljusid häireid organismis, sh pahaloomulisi kasvajaid, ning seetõttu on tänapäeva meditsiin hakanud arendama välja molekule – inhibiitoreid –, mis suudaksid muteerunud proteiinkinaaside laastavat toimet ära hoida. Kinaasi inhibeerimise põhimõttel toimivaid ravimeid kasutatakse maailmas juba üsna aktiivselt.

Uurimistöö eesmärk oli välja arendada kaks inhibiitorit, mis on omavahel stereomeeride üks vormidest – diastereomeerid, ning kontrollida nende seostumiseefektiivsust PKAc-ga, ühega mitmesajast avastatud proteiinkinaasist. Inhibiitorite struktuurne eripära seisnes linkeris olevas aminorühmas, mis pidi püstitatud hüpoteesi järgi mõjutama molekuli afiinsust PKAc-le. Teine hüpotees püstitati seoses diastereomeeride seostumiseefektiivsuste omavahelise võrdlemisega. Inhibiitorid sünteesiti edukalt Fmoc-tahkefaassünteesi meetodil, olemasolu lõppproduktide segus kontrolliti HPLC-MS ühissüsteemiga, puhastati HPLC-ga ning lõpus teostati biokeemilised katsed uurimaks molekulide seostumisaktiivsust.

Biokeemiliste katsete tulemusena saadi teada, et sünteesitud molekulidel on küll inhibeerimisvõime olemas, kuid see ei ole piisavalt suur võrreldes juba olemasolevate inhibiitoritega. Samuti ei saa tõdeda märkimisväärse erinevuse esinemist diastereomeeride afiinsuste vahel. Uurimistöö eesmärk sai täidetud ja leiti vastused esitatud uurimisküsimustele. Vaatamata tulemustele on tööl mitu potentsiaalset arengusuunda, millest üks on kindlasti inhibiitorite struktuuripõhine modifitseerimine. Lisaks on võimalik kontrollida sünteesitud inhibiitorite seostumiseefektiivsust teiste proteiinkinaasidega, sest igaüks neist on erineva ehituse ja kujuga.

ABSTRACT

Synthesis of inhibitors containing lysine with different α -aminogroup configuration and their effect on protein kinase A

Proper functioning of proteins is one of the necessary aspects for life to exist. Proteins control cell division, apoptosis, digestion of biomolecules and other processes which help the cell or the organism in general to stay alive. One kind of crucial proteins are protein kinases, enzymes that catalyze the reaction of phosphorylation. Thereby they start different biochemical processes. As in every synthesis the mistakes are possible to be made, the mutated protein kinases can be a yield of enzyme's synthesis in the cell. These molecules often become fatal for the cell wherethrough their functioning can lead to the apoptosis. Defective protein kinases trigger various health disorders such as malignant tumours and this has been a strong motivator for the modern medicine to conceive molecules – inhibitors – that could negate mutated enzymes. Medicaments based on the protein kinase inhibition are already utilised actively in many countries in the world.

The goal of the current research was to synthesize two inhibitors that are diastereomers and to test their affinity on the protein kinase A – one of the several hundred discovered protein kinases. The structure of inhibitors contained one additional aminogroup in the linker that, according to the hypothesis, should have influenced the activity of binding to the kinase. The second hypothesis was connected to the comparison of diastereomers' affinity. The synthesis of inhibitors was based on the method of Fmoc solid-phase peptide synthesis and the existence of them in the sum of compounds was identified by HPLC-MS combined system. Synthesized inhibitors were purified with HPLC and the biochemical experiments were conducted in order to control their activity to bind to the protein kinase A.

The results of biochemical experiments demonstrated that synthesized inhibitors binded to the kinase but the efficiency was not sufficiently high compared to the molecules that already exist. Additionally, the remarkable difference between two diastereomers' affinity was not perceived. The goal of the research paper was fulfilled and the problems raised at the beginning were solved. Notwithstanding the results of the current research paper it has many implications for further study. One of them is certainly modification of the structure of inhibitors. The research that studies other protein kinases is a second potential way to improve the current research paper because every enzyme has a different structure and synthesized molecules can be more efficient inhibitors of another kind of the kinase.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ahmad, F., Murata, T., Shimizu, K., Degerman, E., Maurice, E., Manganiello, V. 2015. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: important signaling modulators and therapeutic targets. *Oral Diseases*, July 9, Vol. 21, lk e25–e50
- Atkins, P., Paula, de J. 2002. Atkins' physical chemistry 7th Edition. New York: Oxford University Press Inc.
- Atkins, P., Paula, de J. 2005. Elements of Physical Chemistry 4th Edition. New York: Oxford University Press Inc.
- Bhullar, K.S., Lagarón, N.O., McGowan, E.M., Parmar, I., Jha, A., Basil, P.H., Rupasinghe, H.P.V. .2018. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Molecular Cancer*, February 19, lk 1–20.
- Byrne, D.P., Vonderach, M., Ferries, S., Brownridge, P.J., Evers, C.E., Evers, P.A. 2016. cAMP-dependent protein kinase (PKA) complexes probed by complementary differential scanning fluorimetry and ion mobility-mass spectrometry. *Biochemical Journal*, July 21, Vol. 473, lk 3159–3175
- Campbell, P.N., Smith, A.D., Peters, T.J. 2005. Biochemistry illustrated 5th Edition. Biochemistry and molecular biology in the post-genomic era. Oxford: Elsevier Churchill Livingstone
- Carey, F.A., Giuliano, R.M. 2014. Orgaaniline keemia. Tallinn: Tallinna Raamatutrükikoda
- Cell Signaling Technology kodulehekülg. Kättesaadav: <https://www.cellsignal.com/contents/science-protein-kinases/protein-kinases-human-protein-kinases-overview/kinases-human-protein>. (17.11.2018)
- Clark, D.P., Pazdernik, N.J. 2013. Molecular biology 2nd Edition. Oxford: Elsevier Inc.
- Dostmann, W.R., Nickl, C.K. (2010) Inhibitors of cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent protein kinases. Handbook of cell signaling 2nd Edition. Toim R.A. Bradshaw, E.A. Dennis. Oxford: Elsevier Academic Press
- Duong-Ly, K.C., Peterson, J.R. 2014. The human kinome and kinase inhibition as a therapeutic strategy. *Current Protocols in Pharmacology*, March, Vol. 60, Issue 1. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4128285/#R32>. (19.11.2018).
- Fayard, E., Tintignac, L.A, Baudry, A., Hemmings, B.A. 2005. Protein kinase B/Akt at a glance. *Journal of Cell Science*, Vol. 118, lk 5675–5678.

- Iqbal, N., Iqbal, N. 2014. Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemotherapy Research and Practice*, May 19, Vol. 2014, lk 1–9.
- Johnson, J.L., Reinhart, G.D. 1996. Effects on high pressure on the allosteric properties of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *High-Pressure effects in molecular biophysics and enzymology*. Toim J.L. Markley, D.B. Northrop, C.A. Royer. New York: Oxford University Press, Inc.
- Knight, Z.A., Shokat, K.M. 2005. Features of selective kinase inhibitors. *Chemistry & Biology*, June, Vol. 12, Issue 6, lk 621–637.
- Lille, Ü. 1997. Orgaaniline keemia I (2). Tallinn: Tallinna Tehnikaülikool.
- Lavõgina, D. 2010. Development of protein kinase inhibitors based on adenosine analogue-oligoarginine conjugates [dokoritöö]. Tartu: Tartu Ülikooli kirjastus.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Matthew, P.S., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. 2007. *Molecular Cell Biology 6th Edition*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Lopp, M. 2014. Stereokeemia. Tallinn: Tallinna Tehnikaülikooli kirjastus.
- Matte, A., Delbaere, L.T.J. 2007. Protein motifs: ATP-binding motifs. *Handbook of proteins. Structure, function and methods*. Volume 1. Toim M.M. Cox, G.N. Phillips Jr. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- Mesila, M. 2017. Proteiinkinaasi Aurora B jaoks biligandsete inhibiitorite arendamine ning biokeemilise mitteradioaktiivse inhibeerimismeetodi väljatöötamine [uurimistö]. Tallinn: Tallinna Reaalkool,
- Mor, A. 2007. Peptides: biological activities of small peptides. *Handbook of proteins. Structure, function and methods*. Volume 1. Toim M.M. Cox, G.N. Phillips Jr. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- Nestler, E.J., Greengard, P. 1999. Protein phosphorylation is of fundamental importance in biological regulation. *Basic neurochemistry 6th Edition: molecular, cellular and medical aspects* [e-raamat] Toim In G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fisher, M.D. Uhler. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28063/> (17.11.2018).
- Noble, M.E.M., Endicott, J.A., Johnson, L.N. 2004. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure [abstract]. *Science*, March 19, Vol. 303, Issue 5665, lk 1800–1805.
- Parsons, A.F. 2014. *Keynotes in Organic Chemistry 2nd Edition*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- Perkins, G.A., Wang, L., Huang, L.J., Humphries, K., Yao, V.J., Martone, M., Deerinck, T.J., Barraclough, D.M., Violin, J.D., Smith, D., Newton, A., Scott, J.D., Taylor, S.S., Ellisman, M.H.

2001. PKA, PKC, and AKAP localization in and around the neuromuscular junction. *BMC Neuroscience*, October 23, No 2, lk 1–11.

PhosphoSitePlus kodulehekülg. Kättesaadav:

<https://www.phosphosite.org/siteAction.action?id=4588> (17.11.2018).

Pochin, E.E. 1961. Radioactive isotopes in biochemistry. *British Medical Journal*, April 15, No 5232, lk 1091–1092.

Roberts, M.F., Kruchten, A.L. 2016. Receptor biology. Weinheim: Wiley-VCH.

Sawhney, S.K., Singh, R. 2000. Introductory practical biochemistry. New Delhi: Narosa Publishing House.

Scott, N.L., Lecomte, J.T.J. 2007. Protein structure: unusual covalent bonds. *Handbook of proteins. Structure, function and methods*. Volume 1. Toim M.M. Cox, G.N. Phillips Jr. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.

Shelledy, L., Roman, D. 2015. Vemurafenib: first-in-class BRAF-mutated inhibitor for the treatment of unresectable or metastatic melanoma. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, July–August, Vol. 6, Issue 4, lk 361–365.

Sheehan, D. 2000. Physical biochemistry: principles and applications. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.

Shen, T.–L. 2000. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry in peptide and protein analysis. *Encyclopedia of analytical chemistry. Applications, theory and instrumentation*. Volume 7. Toim R.A. Meyers. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.

Slavik, J. 1994. Fluorescent probes in cellular and molecular biology. Florida: CRC Press.

So, P.T.C., Dong, C.Y. 2007. Fluorescence Spectrophotometry. *Handbook of proteins. Structure, function and methods*. Volume 2. Toim In M.M. Cox, G.N. Phillips Jr. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.

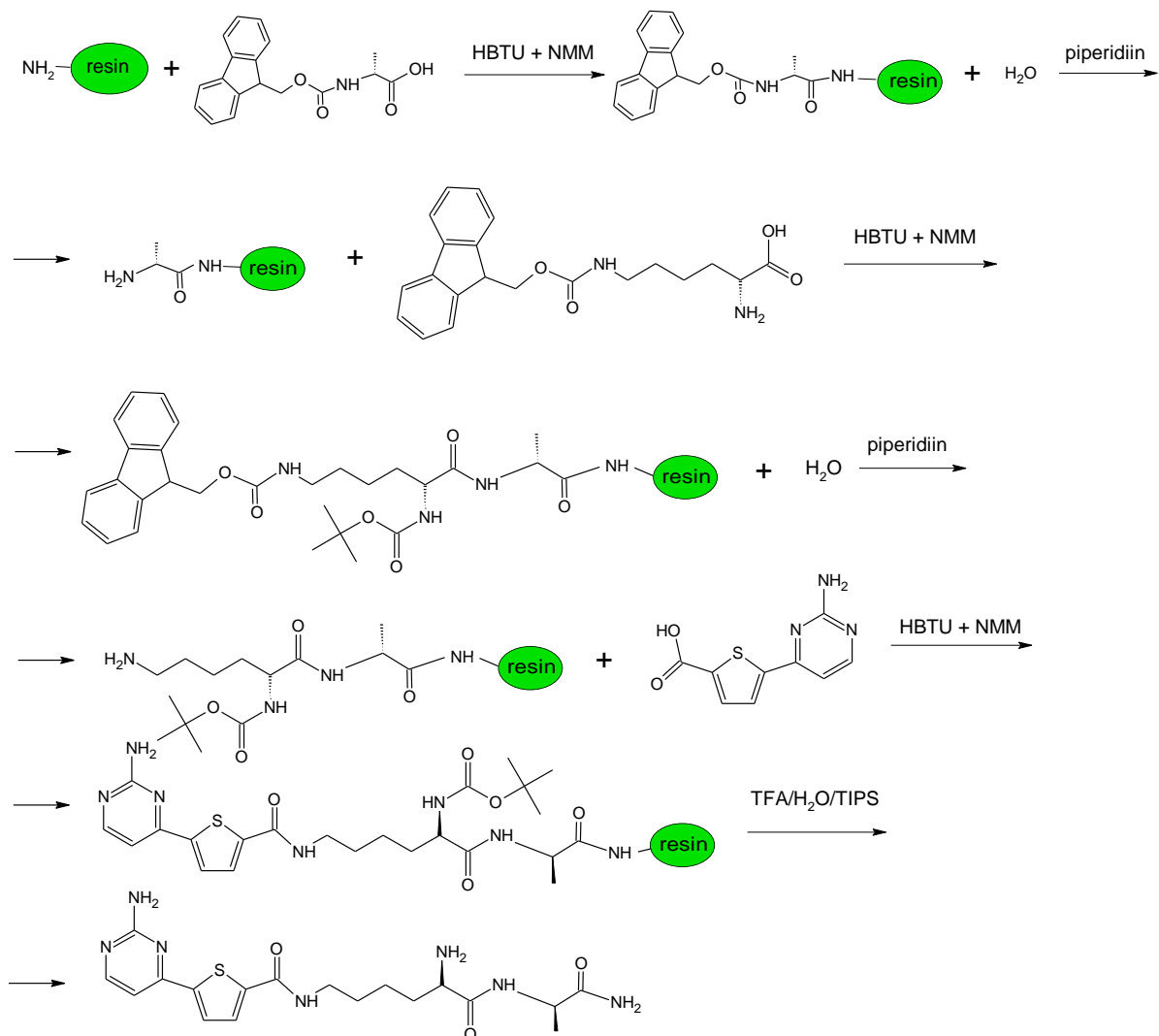
Soderberg, T. 2014. Phosphorylation reactions – kinase enzymes [e-õpiku postitus]. Kättesaadav:

[https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_\(Soderberg\)/10%3A_Phosphoryl_transfer_reactions/10.2%3A_A_Phosphorylation_reactions_-_kinase_enzymes](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_(Soderberg)/10%3A_Phosphoryl_transfer_reactions/10.2%3A_A_Phosphorylation_reactions_-_kinase_enzymes) (17.11.2018).

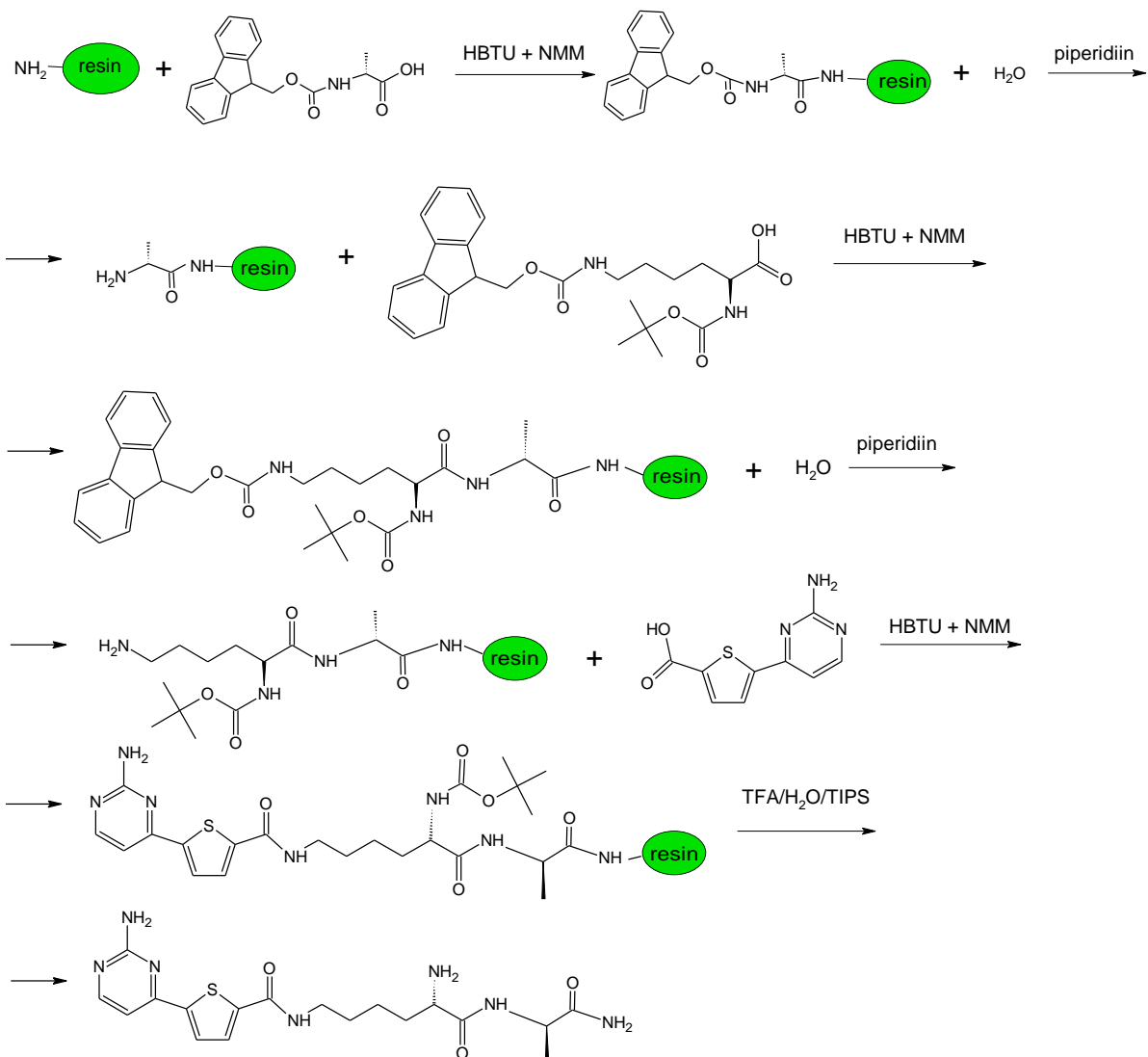
Sparkman, O.D. 2000. Mass Spectrometry: overview and history. *Encyclopedia of analytical chemistry. Applications, theory and instrumentation*. Volume 13. Toim R.A. Meyers. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.

- Tiwari, G. 2015. Consequences of light absorption – the Jablonski diagram [blogipostitus].
Kättesaadav: <https://gauravtiwari.org/consequences-of-light-absorption-the-jablonski-diagram/> (25.12.2018).
- Vikipeedia 2018. s.v. HBTU. Kättesaadav: <https://en.wikipedia.org/wiki/HBTU> (10.02.2019).
- Wade, L.G.Jr. 2006. Organic chemistry 6th Edition. New Jersey: Pearson Prentice Hall.
- Wang, Z., Cole, P.A. 2014. Catalytic Mechanisms and Regulation of Protein Kinases. *Methods in Enzymology. Protein kinase inhibitors in research and medicine*, Vol. 548. Toim K.M. Shokat.
Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4373616/> (19.11.2018).
- Wilson, K., Walker, J. 2010. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology.
Glasgow: Bell and Bain Ltd.

Lisa 1. ARC-1464 sünteesiskeem



Lisa 2. ARC-1465 sünteesiskeem



Lisa 3. Fluorestsentsligandi ARC-583 struktuurivalem

