

Diss.
B-455

TARTU ÜLIKOOL

FÜÜSIKA-KEEMIA TEADUSKOND

KEEMIA OSAKOND / KEEMILISE FÜÜSIKA INSTITUUT

SISUKORD..... 2

SISSEJUHATUS..... 5

KATRIN SAK

KASUTATUD LÜHENDID..... 8

**PROTEIINKINAAS C SUBSTRAATSPETSIIFILISUSE UURIMINE
REAKTSIOONIL MÜELIINI ALUSELISE VALGU
JÄRJESTUSEL PÕHINEVATE SÜNTEETILISTE PEPTIIDIDEGA**

1. 1. 1. Proteiinkinaasid ja nende klassifikatsioon..... 11

1. 1. 2. Proteiinkinaas C (PKC)..... 14

MAGISTRITÖÖ

1. 1. 2. 1. **BIOORGAANILISE KEEMIA ERIALAL**..... 15

1. 1. 2. 2. Füüsikokeemilised omadused..... 15

1. 1. 2. 3. Struktuur ja aktivatsioon..... 16

1. 1. 2. 4. Katalüütiline mehhanism..... 16

Juhendaja **JAAK JÄRV**

1. 1. 2. 5. Bioloogiline roll..... 20

1. 1. 2. 6. Substraatspetsiifilisus..... 21

1. 2. PEPTIIDIDE SÜNTEESI KOKKOLLAATISE JA ANALÜÜSI-
MEETODID..... 25

1. 2. 1. Tahket kandjat hõivitava peptiidsünteesi põhilised..... 26

1. 2. 2. Sünteetiliste peptiidide süntees..... 29

TARTU 1996

SISUKORD

SISUKORD.....	2
SISSEJUHATUS.....	5
KASUTATUD LÜHENDID.....	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	11
1. 1. PROTEIINKINAAS C (PKC).....	11
1. 1. 1. Proteiinkinaasid ja nende klassifikatsioon	11
1. 1. 2. Proteiinkinaas C (PKC)	14
1. 1. 2. 1. Jaotumus kudedes ja rakusiseses keskkonnas	15
1. 1. 2. 2. Füsioloogilised omadused	15
1. 1. 2. 3. Struktuur ja aktivatsioon	16
1. 1. 2. 4. Katalüütiline mehhanism	18
1. 1. 2. 5. Bioloogiline roll	20
1. 1. 2. 6. Substraatspetsiifilisus	21
1. 2. PEPTIIDIDE SÜNTEESI-, PUHASTAMISE JA ANALÜÜSI- MEETODID.....	25
1. 2. 1. Tahkel kandjal läbiviidava peptiidsünteesi põhiideed	26
1. 2. 2. Sünteetiliste peptiidide puhastamine	29

1. 2. 3. Analüüsiviisid.....	30
1. 3. PEPTIIDIDE STRUKTUURI ISELOOMUSTAMINE.....	32
1. 3. 1. Peptiidside.....	32
1. 3. 2. Peptiidahela sekundaarse struktuuri tüübid.....	33
1. 4. PEPTIIDIDE KVANTITATIIVSED STRUKTUUR-AKTIIVSUS SÕLTUVUSED ENSÜÜMKATALÜÜTILISTEL REAKTSIOONIDEL.....	41
2. MATERJAL JA METOODIKA.....	44
2. 1. PEPTIIDE SÜNTEES, PUHASTAMINE JA ANALÜÜS.....	45
2. 1. 1. Sünteesidel kasutatud reagentid ja solvendid.....	45
2. 1. 2. Aparatuur.....	46
2. 1. 3. Sünteesi eeskiri.....	48
2. 2. FOSFORÜLEERIMISREAKTSIOONI KINEETIKA.....	53
2. 2. 1. Kasutatud reaktiivid.....	53
2. 2. 2. Fosforüleerimisreaktsiooni kineetika mõõtmise meetoodika.....	54
2. 2. 3. Andmete töötlus.....	54
2. 3. KVANTKEEMILISED ARVUTUSED.....	56
3. TULEMUSED.....	58

3. 1. PEPTIIDSUBSTRAADID.....	58
3. 2. PEPTIIDSUBSTRAATIDE FOSFORÜLEERIMIS- REAKTSIOONIDE KINEETILISED PARAMEETRID.....	60
3. 3. LOKAALSETE MUTATSIOONIDE MÕJU KVANTKEEMILINE MODELLEERIMINE PEPTIIDAHELA KONFORMATSIOONILE.....	63
4. ARUTELU.....	73
4. 1. PROTEIINKINAAS C SUBSTRAATSPETSIIFILISUS.....	73
4. 2. KVANTITATIIVSED STRUKTUUR-AKTIIVSUS SÕLTUVUSED. OPTIMAALSE SUBSTRAATJÄRJESTUSE ENNUSTAMINE.....	76
KOKKUVÕTE.....	83
SUMMARY.....	85
KASUTATUD KIRJANDUS.....	87
TÄNUAVALDUS.....	97

SISSEJUHATUS

Proteiinkinaasid on ensüümid, mis katalüüsivad fosfaatrühma ülekannet fosfaadi doonorilt (ATP etc.) substraatproteiini aktseptoraminohappele, moduleerides sel moel vastava valgus aktiivsust [5, 6, 7]. Proteiinkinaaside poolt valgus äratuntavate alade iseloom on määratud fosforüleeritava aminohappe ümbruses paiknevate aminohapete struktuuri poolt ning seega on võimalik nende ensüümide substraatspetsiifilisuse süstemaatilist uurimist läbi viia vastavate proteiinsubstraatide järgi sünteesitud peptiididega [12]. Arvukate peptiidjärjestuste võrdlemise ning substraatide struktuur-funktsioonsõltuvuste uurimise tulemusena on osutunud võimalikuks määratleda proteiinkinaas C jaoks nn. konsensusjärjestus. Antud ensüümi korral peetakse substraatspetsiifilisuse seisukohalt olulise tähtsusega motiiviks järjestust X- Arg- X- X- Ser- X- Arg- X [18, 28, 29]. Varieerides X-ga tähistatud positsioonides erinevaid aminohappeid, on võimalik leida antud ensüümi jaoks sobivamate kineetiliste parameetritega substraate ning uurida substraat-kinaas-interaktsioonile esitatavaid spetsiifilisuse nõudeid [29]. Peptiidsubstraatide sünteesimise põhieesmärgiks on seega paremate kineetiliste omadustega ja kõrgelt spetsiifiliste substraatide loomine [29].

Käesoleva töö eesmärgiks on proteiinkinaas C ja substraadi vaheliste interaktsioonide uurimine fosforüleeritavale aminohappejäägile (seriini jäägile) järgneva aminohappe varieerimisel ning vastava positsiooni jaoks substraatspetsiifilisuse seisukohalt optimaalse aminohappe leidmine. Sellest tulenevalt hõlmab antud töö eksperimentaalne osa müeliini aluselise valgus (MBP₄₋₁₄) järjestusel põhinevate **peptiidsubstraatide sünteesi**, kasutades Merrifieldi poolt loodud tahkel kandjal läbiviidava peptiidsünteesi põhiideid ning varieerides

erinevaid looduslikke aminohappeid fosforüleeritavale aminohappejäägile järgnevas asendis, **sünteesiliste peptiidide puhastamist** pöördfaas-kõrgrõhkvedelik-kromatograafia abil, nende peptiidide **analüüsi** plasma desorptsioon mass-spektromeetri abil ja aminohapete kvantitatiivse määramise teel ning nende peptiidsubstraatide **fosforülatsioonireaktsiooni kineetika uurimist**.

Peptiidsubstraatide jaoks määratud fosforüleerimisreaktsioonide kineetilisi konstante analüüsitakse kahest aspektist lähtudes:

1) substraatide "äratundmise" molekulaarse mehhanismi süstemaatiliseks uurimiseks analüüsitakse **struktuur-aktiivsus sõltuvusi** proteiinkinaas C poolt katalüüsivates reaktsioonides. Vastav lähenemine võimaldab kineetilisi parameetreid teoreetiliselt määrata antud peptiidahela vastavas positsioonis paikneva suvalise aminohappe jaoks ning seega on võimalik nii optimaalse aminohappejäägi kindlakstegemine kui ka erinevate regressiooniparameetrite intensiivsuse hindamine antud asendi jaoks;

2) uuritakse **peptiidide ruumilise struktuuri võimalikku seost ensüümkatalüütilisel reaktsioonil avalduva bioloogilise aktiivsusega**, modelleerides kvantkeemiliselt lokaalsete mutatsioonide mõju peptiidahela konformatsioonile. Vastavad arvutused on tehtud gaasifaasis hepta-alaniini kui mudelpeptiidi jaoks, kasutades programmipaketti *MOPAC*.

Käesoleva töö kirjanduslikus osas antakse ülevaade proteiinkinaas C füsioloogilistest, katalüütilistest ja regulatiivsetest omadustest, analüüsitakse kirjanduses esitatud substraatspetsiifilisust käsitlevaid andmeid; esitatakse peptiidsubstraatide sünteesimise, puhastamise ja analüüsiviiside teoreetilised alused; peatutakse ensüüm-substraatreaktsioonide spetsiifilisuse ja peptiidahela sekundaarse struktuuri vaheliste seoste uurimisel ning peptiidide kvantitatiivsete struktuur-aktiivsus sõltuvuste analüüsimisel.

Käesoleva töö tulemused on publitseeritud järgmises artiklis:

Järv, J., **Sak, K.**, Eller, M., Ek, P., Engström, Å., Engström, L. (1996) Quantitative Structure- Activity Relationships in the Protein Kinase C Reaction with Synthetic Peptides Derived from Myelin Basic Protein. *Bioorganic Chemistry*, 24, 159-168.

KASUTATUD LÜHENDID

- PKC - proteiinkinaas C
- NTP - nukleosiidtrifosfaat
- NDP - nukleosiiddifosfaat
- ATP - adensiinrifosfaat
- GTP - guanosiinrifosfaat
- cAMP - tsükliline adensiinmonofosfaat
- cGMP - tsükliline guanosiinmonofosfaat
- DAG - diatsüülglütserool
- PI - fosfatidüülinositool
- cPKC - klassikalised PKC isoensüümid
- nPKC - neo- PKC isoensüümid
- TPA - 12- O- tetradekanoüülforbool 13- atsetaat
- MBP - (*Myelin Basic Protein*) müeliini aluseline valk
- MLC - (*Myosin Light Chain*) müosiini kerge ahel
- V_m - kiiruse väärtus ensüümi küllastumisel substraadiga
- K_m - Michaelise konstant (substraadi kontsentratsioon, millel $v = V_m/2$)
- SPPS - (*Solid Phase Peptide Synthesis*) tahkel kandjal läbiviidav peptiidsüntees
- Boc - tert.-butüüloksükarbonüül
- Fmoc - 9-fluoreenüülmetüüloksükarbonüül
- TFA - trifluoroetaanhape
- DCM - diklorometaan (metüleenkloriid)
- DMF - N,N-dimetüülformamiid
- DCC - N,N'-ditsükloheksüülkarbodiimiid

HBTU - 2-(1 H-benso-triasool-1-üül)-1,1,3,3,-tetrametüül uroonium
heksafluorofosfaat

BOP - bensotriasolüül N-oksütrisdimetüülaminofosfoonium heksafluorofosfaat

PyBOP - bensotriasolüül oksü-tris(pürrolidino)-fosfoonium heksafluorofosfaat

HOBt - 1-hüdoksübensotriasool

KOBt - 1-hüdoksübensotriasooli kaaliumisool

t-Bu - tert.-butüül

HF - vesinikfluoriidhape

EDT - 1,2-etaanditool

HPLC - (*High Performance/ Pressure Liquid Chromatography*)
kôrgrôhkvedelikkromatograafia

RP- HPLC - (*Reversed Phase HPLC*) pöördfaas-kôrgrôhkvedelikkromatograafia

UV - ultraviolett

MS - mass-spektromeetria

PDMS - plasma desorptsioon mass-spektromeetria

HCl - vesinikloriidhape

N - normaalsus

QSAR - (*Quantitative Structure Activity Relationships*) Kvantitatiivsed struktuur-
aktiivsus sõltuvused

MR - molekulaarse refraktsiooni indeks

π - hüdrofoobsusparameeter

σ - elektroonsusparameeter

E_s - steerilisusparameeter

P - jaotuskoefitsent

EDTA- etüleendiamiintetraetaanhape

TRIS- Tris(hüdoksümetüül)aminometaan

DTT- ditiotreitool

R
|
Aminohapped NH₂-CH-COOH R=

A	Ala	alaniin	CH ₃
R	Arg	arginiin	(CH ₂) ₃ NHC(NH)NH ₂
N	Asn	aspargiin	CH ₂ CONH ₂
D	Asp	aspargiinhape	CH ₂ COOH
C	Cys	tsüsteiin	CH ₂ SH
Q	Gln	glutamiin	CH ₂ CH ₂ CONH ₂
E	Glu	glutamiinhape	CH ₂ CH ₂ COOH
G	Gly	glütsiin	H
H	His	histidiin	CH ₂ COHNCHNH _____
I	Ile	isoleutsiin	CH(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)
L	Leu	leutsiin	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
K	Lys	lüsiin	(CH ₂) ₄ NH ₂
M	Met	metioniin	CH ₂ CH ₂ SCH ₃
F	Phe	fenüülalaniin	CH ₂ C ₆ H ₅
P	Pro	proliin	CH ₂ CH ₂ CH ₂ -
S	Ser	seriin	CH ₂ OH
T	Thr	treoniin	CH(CH ₃)OH
W	Trp	trüptofaan	CH ₂ CCHNHC ₆ H ₄ _____
Y	Tyr	türosiin	CH ₂ C ₆ H ₄ OH
V	Val	valiin	CH(CH ₃) ₂

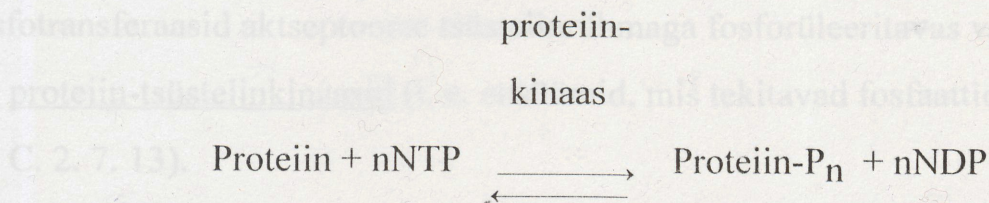
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. 1. PROTEIINKINAAS C (PKC)

1. 1. 1. PROTEIINKINAASID JA NENDE KLASSIFIKATSIOON

Proteiinkinaasid moodustavad homoloogsete proteiinide rühma [1], mille regulatoorset toimemehhanismi on viimase 40 aasta vältel intensiivselt uuritud [2]. Vastavad proteiinid on osutunud märkimisväärseteks meditsiinilisteks huviobjektideks, olles suurelt jaolt kodeeritud onkogeenide poolt ning omades olulist rolli nii eukariootse raku tsükli regulatsioonis [3, 4] kui ka mitmetes metaboolsetes radades [1].

Proteiinkinaasid on ensüümid, mis katalüüsivad fosfaatrühma ülekannet fosfaatdoonorilt substraatproteiini aktseptoraminohappele [5, 6], moduleerides sel viisil vastava proteiini aktiivsust [7]. Proteiinkinaaside poolt katalüüsitud reaktsioon on summaarselt esitatav järgmise võrrandina :



Üldjuhul vastab NTP-le ATP, samas on tuntud vähemalt üks proteiinkinaas, mille puhul reaktsioonist osavõtvaks nukleosiidtrifosfaadiks on GTP [8, 9].

Modifitseeritavaks aminohappejäägiks on tavaliselt serüül-, treonüül- ja/või türosüülrühm. Reaktsiooni toimumiseks on vajalik bivalentsete metallioonide (põhiliselt Mg^{2+} , harvemini Mn^{2+}) olemasolu reaktsioonikeskkonnas [10].

Nomenklatuuri reeglite kohaselt klassifitseeriti antud kinaase algselt proteiinsubstraadi spetsiifilisuse järgi [6], kuna aga enamik proteiinkinaase omab mitmeid substraate, on vastavaid ensüüme otstarbekam klassifitseerida aktseptoraminohappe spetsiifilisuse alusel [5]. Kirjanduses esineb ka kinaasidega otseselt interakteeruvate ja nende toimet reguleerivate spetsiifiliste agentide (cAMP, cGMP, Ca²⁺, etc.) baasil tehtud jaotusi [8, 9, 10], kuid süstemaatiliseks ja üldaktsepteeritavaks peetakse järgmist aktseptoraminohappe spetsiifilisusel põhinevat klassifikatsiooni:

1. Fosfotransferaasid aktseptoorse alkoholrühmaga fosforüleeritavas valgus — proteiin-seriin/treoniinkinaasid (i. e. seriini- ja treoniinispetsiifilised proteiinkinaasid, mis tekitavad fosfaatestreid) (E. C. 2. 7. 10).
2. Fosfotransferaasid aktseptoorse fenoolrühmaga fosforüleeritavas valgus — proteiin-türosiinkinaasid (i. e. türosiinispetsiifilised proteiinkinaasid, mis tekitavad fosfaatestreid) (E. C. 2. 7. 11).
3. Fosfotransferaasid aktseptoorse histidüül-, arginüül- või lüsüülrühmaga fosforüleeritavas valgus — proteiin-histidiinkinaasid etc. (i. e. ensüümid, mis tekitavad fosforamidaate histidiini 1- ja 3- positsioonis, arginiini guaniidgrupis või lüsiini ε- NH₂- rühmas) (E. C. 2. 7. 12).
4. Fosfotransferaasid aktseptoorse tsüsteiinrühmaga fosforüleeritavas valgus — proteiin-tsüsteiinkinaasid (i. e. ensüümid, mis tekitavad fosfaatioestrid) (E. C. 2. 7. 13).
5. Fosfotransferaasid aktseptoorse atsüülrühmaga fosforüleeritavas valgus — proteiin-aspartüül- või glutamüülkinaasid (i. e. ensüümid, mis tekitavad fosfor- ja karboksüülhapete segaanhüdriide) (E. C. 2. 7. 14) [5].

Toodud klassifikatsiooni esimesse ja teise rühma kuuluvad ensüümid on väga arvukalt tuntud, enamikku neist on puhastatud ja ka kloneeritud. Kõige laialdasemat

rolli proteiinkinaaside hulgas omavad multifunktsionaalsed seriin/treoniinkinaasid, mis paistavad silma spetsiifiliste substraatide suure arvukuse poolest. Kolme viimasesse kategooriasse kuuluvaid ensüüme on tunduvalt vähem iseloomustatud [5].

Proteiinkinaase leidub kõikides eukarüootsetes rakkudes, samuti on kindlaks tehtud nende ensüümide olemasolu mitmetes bakterites ja viirustes [10]. Tänapäeval on eukarüootidest eraldatud enam kui sada proteiinkinaaside molekulaarset kloni ning kui arvestada veel ka muudest organismidest pärinevaid, ulatub tuntud kinaaside arv 200-ni [5].

Proteiinkinaas C koosneb ühest subühikust, mille molekulmass on ca 82000 [10], esinedes seejuures mitmeti isovormidena [12]. Tänapäeval tuntakse 11 erinevat isoensüümi [4], mida jagatakse kahte suurte rühma:

1. Ca^{2+} -ioonide olemasolust sõltuvad, i.e. klassikalised PKC isoensüümid (ϵ PKC α , ϵ PKC β I, ϵ PKC β II, ϵ PKC γ), mis on kodeeritud kolme eri geeni poolt (α , β , γ).
2. Ca^{2+} -ioonide olemasolust sõltumatud, i.e. neo-PKC isoensüümid (nPKC δ , nPKC ϵ , nPKC ζ , nPKC θ), mida kodeerivad erinevad geenid [14].

Klassikalised ja neoisoensüümid erinevad oluliselt struktuuriliste omaduste ja ensümaatilise aktiivsuse poolest. Lisaks sellele on erinevused vaid kudedes ja rakkudes leidumise spetsiifikaad. Oluliste erinevuste tõttu ensümaatilises aktiivsuses on PKC neoisoensüümide olemasolu seni sageli arvestamata jäänud [14]. Kuna laudasemalt on levinud PKC α , β ja γ isoensüümid (i.e. klassikalised isoensüümid) ning nende ensümaatilist aktiivsust, keemilist toimemehhanismi ja substraadispetsiifilisust on intensiivselt uuritud, on käesolevas töös edaspidi lähtutud PKC klassikalistest isoensüümidest.

1. 1. 2. PROTEIINKINAAS C (PKC)

Proteiinkinaas C (PKC) on Ca^{2+} -ioonide ja fosfolipiidide poolt aktiveeritav seriin/treoniinkinaaside kategooriasse kuuluv proteiinkinaas, mis on levinud paljudes erinevates kudedes [11] ning omab olulist rolli signaali ülekandes ja mitmete teiste rakuprotsesside regulatsioonis [12]. Füsioloogilistes tingimustes aktiveerub ensüüm diatsüülgütserooli, membraani fosfolipiidide ning Ca^{2+} -ioonide juuresolekul [11]. Uuritav kinaas eraldati esmakordselt roti ajust Nishizuka et al. poolt 1979. aastal [10, 13].

Proteiinkinaas C koosneb ühest subühikust, mille molekulmass on ca 82000 [10], esinedes seejuures mitmete isovormidena [12]. Tänapäeval tuntakse 11 erinevat isoensüümi [4], mida jagatakse kahte suurte rühma:

1. Ca^{2+} -ioonide olemasolust sõltuvad, i.e. klassikalised PKC isoensüümid (cPKC α , cPKC β I, cPKC β II, cPKC γ), mis on kodeeritud kolme eri geeni poolt (α , β , γ).
2. Ca^{2+} -ioonide olemasolust sõltumatud, i.e. neo-PKC isoensüümid (nPKC δ , nPKC ϵ , nPKC ζ , nPKC θ), mida kodeerivad erinevad geenid [14].

Klassikalised ja neoisoensüümid erinevad oluliselt struktuuriliste omaduste ja ensümaatilise aktiivsuse poolest, jaotusesiseselt on erinevused vaid kudedes ja rakkudes leidumise spetsiifikas. Oluliste erinevuste tõttu ensümaatilises aktiivsuses on PKC neoisoensüümide olemasolu siiani sageli arvestamata jäetud [14]. Kuna laialdasemalt on levinud PKC α , β ja γ isoensüümid (i.e. klassikalised isoensüümid) ning nende ensümaatilist aktiivsust, katalüütilist toimemehhanismi ja substraadispetsiifilisust on intensiivselt uuritud, on käesolevas töös edaspidi lähtutud PKC klassikalistest isoensüümidest.

1. 1. 2. 1. JAOTUMUS KUDEDES JA RAKUSISESES KESKKONNAS

Proteiinkinaas C-d on leitud eukarüootsete organismide eri liikide erinevatest kudedest [15]. Suures ulatuses leidub PKC-d vereliistakutes, ajus, lümfotsüütides, kopsudes, neerudes, maksas etc. [16].

PKC rakusisene jaotus sõltub rakutsükli faasist; immunotsütokeemiliste uuringute järgi on ensüüm lokaliseerunud põhiliselt plasmamembraani, tsütoplasmasse, tuumakesse ja Golgi aparati [13].

1. 1. 2. 2. FÜSIKOKEEMILISED OMADUSED

Proteiinkinaas C on suhteliselt mittestabiilne ja säilib 0 °C juures vaid mõned päevad. Ensüüm võib inaktiveeruda külmutamise ja järgneva sulatamise vältel ning lüofilisatsioonil [16]. PKC molekulkaaluks määrati geelelektroforeesil 82 000, tihedusgradientanalüüsil hinnati sedimentatsioonikoefitsendiks 5.1 S ning geelfiltratsioonil leiti Stokesi raadius (42 Å). Proteiinkinaas C isoelektriline punkt on pH 5.6 juures [16, 17].

Vastava ensüümi moodustab üksik polüpeptiidahel ilma subühikuliste struktuurideta. Proteiinkinaas C omab kahte funktsionaalselt erinevat domääni, milledest üks on hüdrofoobne ja võimaldab kinnitumist membraanile ning teine hüdrofiilne, kandes katalüütiliselt aktiivset tsentrit [15].

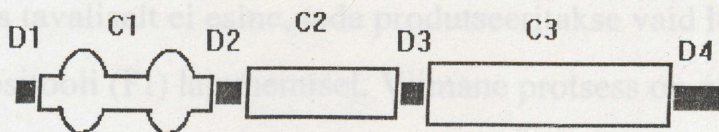
Proteiinkinaas C reaktsioonides substraatvalguga kasutatakse fosfaatdoonorina vaid ATP-d, optimaalne magneesiumioonide kontsentratsioon reaktsioonisegus (40 mM Tris-atsetaatpuhvril) on 5-10 mM ja sobivaim pH 7.5- 8.0 [16, 17].

1. 1. 2. 3. STRUKTUUR JA AKTIVATSIOON

Mõistmaks proteiinkinaas C regulatiivset toimemehhanismi ja substraatspetsiifilisuse probleemi, on oluline käsitleda ensüümi ruumilist struktuuri [4]. Selle määramine on seni osutunud võimalikuks keemilise homogeensuse ni puhastatud proteiinkinaas A kristallograafilisel ja röntgenstruktuuranalüütilisel uurimisel [9].

Klassikalised proteiinkinaas C isoensüümid (cPKC) sisaldavad kolme erinevat ala:

- 1) diatsüülglütserooli (DAG) ja forboolestri seostumisdomääni (tandemina korduvate tsüsteiinirikaste järjestuste ala) (C1),
- 2) Ca^{2+} -ioonide sidumisdomeeni (C2),
- 3) proteiinkinaasi katalüütilist domeeni (C3) (joonis 1).



cPKC $\beta_1^{\alpha/\gamma}$ β_{II}

Joonis 1. Klassikaliste proteiinkinaas C isoensüümide (cPKC) skemaatiline struktuur (C1 ja C2 vastavad reguleerijate domäänidele, C3 on katalüütiline domeen) [14].

Neoensüümidel, i. e. Ca^{2+} -ioonide olemasolust sõltumatutel isovormidel, C2 domeen puudub. Vastavad domeenid on eraldatud nn. D -järjestuste kaudu.

Karboksüülotsa D4 järjestus võimaldab iseloomustada iga PKC isovormi individuaalselt, hõlmates tüüpspetsiifilisi funktsioone [14]. Katalüütiline domeen

koosneb tavaliselt ca 240 aminohappejäägist ning sisaldab ATP-seostumiskohta, valksubstraadi sidumisregiooni ja silmuselise struktuurina esinevat katalüüsi toimumiskohta. ATP-seostumisala paikneb domääni aminootsas, olles iseloomustatud struktuuralse motiiviga Gly- X- Gly - X - X - Gly. Tsentraalselt paiknev Asp184 on vastutav aluskatalüütilise fosfaatrühma üleviimisprotsessi eest valksubstraadile. Valksubstraadi sidumisregioon ei ole üheselt määratletud, tõenäoliselt hõlmab see katalüütilise domääni karboksüülotsa 60 viimast aminohappejääki [18].

Kirjeldatud regulatoorsed domäänid osalevad ensüümi aktiivse tsentri sobivaima konformatsiooni moodustamisel, paiknedes silmustena väljaspool globulaarset tuuma, on ebaolulised katalüütilise aktiivsuse tagamisel, omavad aga märkimisväärset rolli substraadi lokaliseerimisel ja seostumisel ensüümiga [4].

Proteiinkinaas C on normaalselt mitteaktiivne, olles aktiveeritud diatsüülglütserooli (DAG) poolt Ca^{2+} -ioonide ja membraani fosfolipiidide juuresolekul. Aktivatsioon on Ca^{2+} -ioonide suhtes väga spetsiifiline, teised bivalentsed katioonid sarnast mõju ei avalda [11, 16]. Diatsüülglütserooli membraanides tavaliselt ei esine, teda produtseeritakse vaid lühiajaliselt fosfatidüülinositooli (PI) lagunemisel. Viimane protsess on omakorda esile kutsutud mitmete neurotransmitterite, hormoonide, kasvufaktorite ja teiste bioloogiliselt aktiivsete ainete poolt [10, 17, 19]. On postuleeritud, et vastav fosfatidüülinositooli ringe mõjutab Ca^{2+} -kanalite avanemist rakumembraanis, on aga selge, et PI lagunemise primaarne produkt DAG suurendab juba väikestes kogustes proteiinkinaas C näivat afiinsust nii Ca^{2+} -ioonide kui ka fosfolipiidide suhtes ja muudab ensüümi täielikult aktiivseks; ka olukorras, kus Ca^{2+} -ioonide üldkontsentratsioon ei suurene [14, 15]. DAG olemasolu võimaldab PKC pöörduvat kinnitumist membraanile ja ensümaatilise aktiivsuse avaldumist [15].

Proteiinkinaaside toime regulatsioonil mängivad olulist rolli struktuurid, mis sarnanevad proteiinkinaaside fosforülatsiooniala motiividega. Need nn. pseudosubstraadi prototüübid paiknevad regulatoorsetes domäänides ja vastutavad

proteiinkinaaside hoidmise eest inaktiivses olekus. DAG üks võimalik toime PKC ahelas seletub seega konformatsioonilise muutuse tekitamises, mis eemaldab aktiivselt alalt pseudosubstraatstruktuuri ja võimaldab nii substraadi kinnitumist ensüümi aktiivsele tsentrile [18].

Uuritud fosfolipiidide hulgast on osutunud PKC aktivatsioonil asendamatuks fosfatidüülseriin, teised fosfolipiidid ilmutavad vastavalt positiivset või negatiivset lisamõju PKC aktiveerimisele. Nii suurendab fosfatidüületanoolamiini lisand veelgi ensüümi aktiivsust, kuna fosfatidüülkoliin ja sfingomüeliin toimivad inhibiitoritena [15, 17].

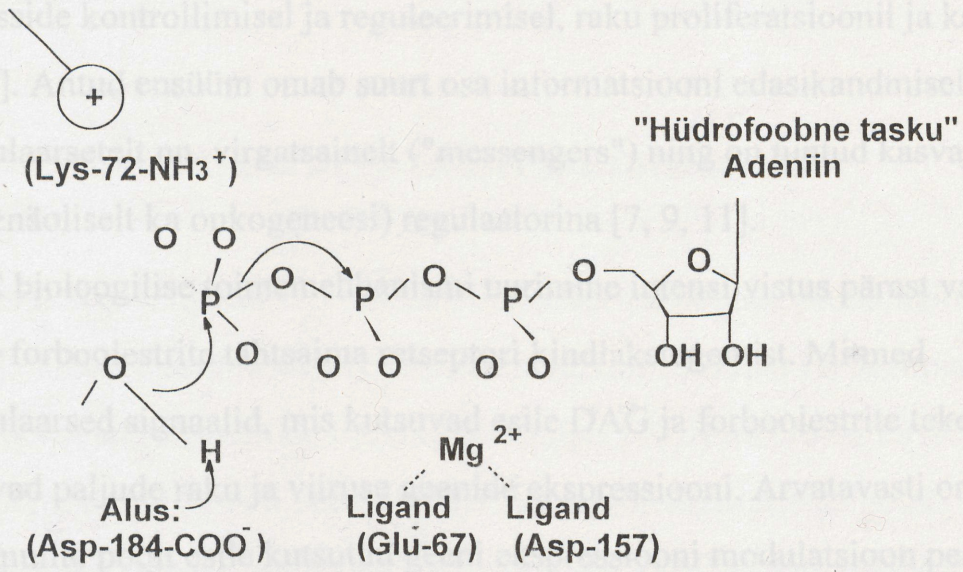
Forboolestrid (nagu 12- O- tetradekanoüülforbool 13- atsetaat, TPA) võivad asendada DAG-d nii *in vitro* kui ka *in vivo* ja seega vahetult aktiveerida PKC-d Ca^{2+} -ioonide ja fosfolipiidide olemasolul reaktsioonikeskkonnas. PKC-le spetsiifilist inhibiitorit siiani leitud ei ole, küll aga inhibeerivad selle ensüümi toimet mitmed fosfolipiididega interakteeruvad ained (kloorpromasiin, dibukaiin, imipramiin, fentolamiin, verapamiil ja tetrakaiin), mis ilmselt takistavad aktivatsiooniprotsessi, toimimata seejuures ensüümi aktiivse alaga [10, 11, 16, 17].

1. 1. 2. 4. KATALÜÜTILINE MEHCHANISM

Proteiinkinaaside katalüütilist toimet mehhanismi substraatvalgu fosforüleerimisel on käsitletud, lähtudes ensüümi struktuurist ning uurides kinaasi aktiivse tsentri koostisesse kuuluvate aminohappejääkide polaarseid ja hüdrofoobset iseloomu [1, 2, 20, 21, 22]. Katalüütilise toimet mehhanismi selgitamisel on oluliseks osutunud ka kvantitatiivsete struktuur- aktiivsussõltuvuste uurimine [23].

Kõik seriin/treoniinkinaasid omavad aktiivtsentris lähedistiku paiknevaid Lys-72 ja Asp-184 jääke, mis võtavad osa nii substraadi sidumisest kui ka katalüüsist [20]. Katalüüsi esimeses staadiumis toimub ATP γ -fosfaatrühma trigonaalse bipüramidaalse fosforiaatomi juures elektronpaari nukleofiilne ümberpaigutus,

millele järgneb nukleofiili (seriini, treoniini või türosiini) prootoni ülekanne ensüümi aktiivses tsentris asuvale aluselisele aminohappejäägile (Asp-184). Negatiivse laenguga pentakoordineeritud fosfaatrühm stabiliseeritakse proteiini positiivselt laetud jäägi (Lys-72) poolt [1, 2]. Mg-ATP kompleks on ensüümi aktiivtsentrisse seotud nii adenosiini kui ka trifosfaatahela kaudu, kusjuures seondumist adenosiini kaudu peetakse olulisemaks [20]. Riboosiringi hüdroksüülgrupid moodustavad ensüümi sobivate aminohappejääkidega vesiniksidemeid, tekitades nii nn. "hüdrofoobse tasku", mis on vesiniksidemete kaudu omakorda seotud puriinahela N(6) ja N(7) lämmastikuaatomitega [1, 2]. Ensüümi aluselise funktsionaalrühma seondumisel vesiniksideme kaudu fosforüleeritava hüdroksüülrühmaga viimase hapnikuaatomi nukleofiilsus suureneb ning see on omakorda eelduseks ATP γ -fosfaadi fosforiaatomi atakeerimisel [20]. Skemaatiliselt on seda katalüüsimehhanismi kujutatud joonisel 2 [1].



Joonis 2. Proteiinkinaaside katalüütilise toimemehhanismi üldskeem [1].

Kvantitatiivsete struktuuri ja aktiivsuse vaheliste sõltuvuste uurimisel on näidatud, et proteiinkinaaside poolt katalüüsitavates reaktsioonides omab olulist rolli induktsiooniefekt. Sellest lähtudes on oletatud, et katalüüsireaktsiooni kiirust

limiteerivas staadiumis toimub fosforüleeritavalt hüdroksüülrühmalt prootoni eemaldumine ensüümi aktiivtsentris paiknevale aluselisele funktsionaalrühmale ja seeläbi leiab aset oksüaniooni teke. Nii formeerunud suure nukleofiilsusega oksüanioon tagab fosforüülrühma kiire üleviimise ATP-lt substraadile [23].

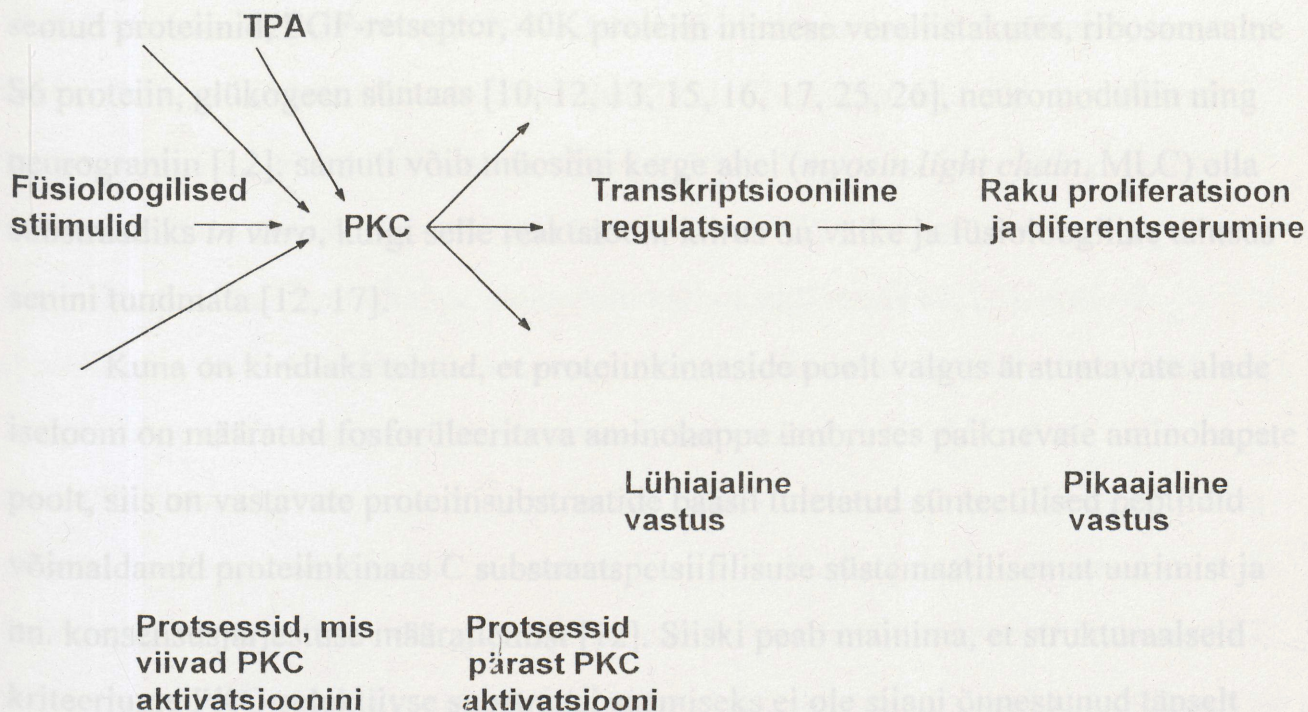
1. 1. 2. 5. BIOLOOGILINE ROLL

Proteiinkinaaside esmalt avastatud bioloogiline roll seostub mitmete metaboolsete ja tsütoskeletis toimuvate protsesside regulatsiooniga. Katalüüsivat valksubstraatide fosforülatsioon on osutunud rakusiseste protsesside regulatsiooni tähtsaimaks mehhanismiks, kuna enamik eukariootides asetleidvaid füsioloogilisi protsesse on sõltuvad proteiinide fosforülatsioonist [4, 18].

Proteiinkinaas C kui multifunktsionaalne ensüüm mängib rolli paljude rakuprotsesside kontrollimisel ja reguleerimisel, raku proliferatsioonil ja kasvamisel [13, 15, 16]. Antud ensüüm omab suurt osa informatsiooni edasikandmisel mitmetelt ekstratsellulaarsetelt nn. virgatsainelt ("messengers") ning on tuntud kasvajate arengu (tõenäoliselt ka onkogeneesi) regulaatorina [7, 9, 11].

PKC bioloogilise toimetehhanismi uurimine intensiivistus pärast vastava kinaasi kui forboolestrite tähtsaima retseptori kindlakstegemist. Mitmed ekstratsellulaarsed signaalid, mis kutsuvad esile DAG ja forboolestrite teket, moduleerivad paljude raku ja viiruse geenide ekspressiooni. Arvatavasti on see välise stiimulite poolt esile kutsutud geeni ekspressiooni modulatsioon peamisi sündmusi, mis viib rakus niisuguste pikaajaliste vastusteni nagu raku proliferatsioon ja diferentseerumine. Seega peaks PKC toime nendes rakuprotsessides hõlmama ka geeni ekspressiooni modulatsiooni [14].

PKC funktsionaalne mitmekesisus tuleneb ühelt poolt substraatide paljususest, teiselt poolt aga erinevate aktivatsioonimehhanismide olemasolust, skemaatiliselt on PKC võimalik funktsionaalne toimerada esitatud joonisel 3 [14].



Joonis 3. Proteiinkinaas C funktsionaalne toimerada [14].

1. 1. 2. 6. SUBSTRAATSPETSIIFILISUS

Substraatspetsiifilisuse probleemi on käsitletud paljude proteiinkinaaside korral [13], lähtudes teadmisest, et substraatmolekuli struktuur on tsentraalseks kriteeriumiks nende ensüümide funktsioneerimisel [10]. Fosforüleeritavat aminohappejääki ümbritseva järjestuse uurimine proteiinkinaaside poolt katalüüsitavates valkudes ja sünteetiliste peptiidide fosforülatsioonikineetika mõõtmine võimaldab käsitleda substraatspetsiifilisust positsiooniliste aminohappeeliste määramise tasandil [18].

Sellest ideest lähtudes võib proteiinkinaas C substraatspetsiifilisus olla piisavalt lai [15, 16, 17, 24]. Selle ensüümi looduslikeks substraatideks on viis erinevat histooni tüüpi (H2B, H1 et al.), protamiin, müeliini aluseline proteiin (*myelin basic protein*, MBP), troponiin I ja troponiin T, mikrotuubuliga-

assotsieerunud proteiin, mitmed identifitseerimata lahustuvad ja membraaniga seotud proteiinid, EGF-retseptor, 40K proteiin inimese vereliistakutes, ribosomaalne S6 proteiin, glükogeen süntaas [10, 12, 13, 15, 16, 17, 25, 26], neuromoduliin ning neurograniin [12]; samuti võib müosiini kerge ahel (*myosin light chain*, MLC) olla substraadiks *in vitro*, kuigi selle reaktsiooni kiirus on väike ja füsioloogiline tähtsus senini tundmata [12, 17].

Kuna on kindlaks tehtud, et proteiinkinaaside poolt valgus äratuntavate alade iseloom on määratud fosforüleeritava aminohappe ümbruses paiknevate aminohapete poolt, siis on vastavate proteiinsubstraatide baasil tuletatud sünteetilised peptiidid võimaldanud proteiinkinaas C substraatspetsiifilisuse süstemaatilisemat uurimist ja nn. konsensusjärjestuse määramist [12]. Siiski peab mainima, et struktuuralseid kriteeriume PKC-selektiivse substraadi saamiseks ei ole siiani õnnestunud täpselt määratleda [12, 24].

Järgnevas substraatspetsiifilisuse arutelus on fosforüleeritava aminohappe positsioon tähistatud tinglikult 0-ga ning temast aminootsa poole jäävate aminohapete paiknemiskoha kirjeldamisel kasutatakse negatiivseid, karboksüülotsas vastavalt positiivseid numbreid.

Üheks enam arvestatavaks faktoriks substraatspetsiifilisuse kirjeldamisel on PKC nagu ka mitmete teiste proteiinkinaaside korral aluseliste aminohapete esinemine fosforüleeritava aminohappe (Ser / Thr) vahetus läheduses [7, 12, 13, 24, 26]. Nende katioonsete aminohapete arvu suurendamisel substraatstruktuuris täheldati fosforülatsiooni kineetika parameetrite märgatavat paranemist *in vitro* ning tõdeti Arg eelistust Lys-le (arginiini asendamisel lüsiiniga vähenesid nii fosforüleerimise kiirus kui ka K_m) [12, 18]. Paljudes töödes on käsitletud aluseliste aminohapete osatähtsust ühel ja teisel pool fosforüleeritavat jääki. Siiski on oluline mainida, et saadud tulemused on varieeruvad, mis näitab, et absoluutset PKC-spetsiifilist konsensusjärjestust määrata võimalik ei ole [12, 18]. Nii on ühelt poolt PKC-spetsiifilise substraadi kriteeriumina toodud aluseliste aminohapete olemasolu peptiidjärjestuse amino-otsas [12, 13, 25], kus positiivsete laengute olemasolu eriti

-1 ja -2 positsioonides suurendab substraadi aktiivsust [27]. Teiselt poolt peetakse PKC äratundmisel primaarseks faktoriks aluseliste aminohapete leidumist fosforüleeritava järjestuse karboksüülotsas [12]. Chen *et al.* näitasid, et positiivse laengu esinemise nõuet aminootsias võib rahuldada ka ainuke Lys- jääk paiknevana fosforüleeritava aminohappe suhtes -4 positsioonis [12]. Samas peetakse väga oluliseks aluselise aminohappe olemasolu karboksüülotsas [12, 25], eriti +2 positsioonis. Seda tõendab nii vastavas kohas arginiini asendamisel neutraalse, hüdrofoobse aminohappega (Ile) konstateeritud enam kui 1000-kordne fosforülatsiooni kiiruse langus [12, 25], kui ka teadmine, et +2 asendis paiknev Arg on osutunud väga tundlikuks stereokeemilise inversiooni (L-isomeeri asendamine D-isomeeriga) suhtes [24]. Niisugused erinevused esitatud andmetes raskendavad PKC substraatspetsiifilisuse tähtsimate faktorite kindlakstegemist, samal ajal osutades ka antud ensüümi tolerantsusele substraadi äratundmisel. PKC tolerantsust äratuntava aminohappejärjestuse suhtes näitab ka fakt, et substraadi molekulis arginiini guaniidrühma asendamine aminogrupiga [25] fosforülatsioonikiirust oluliselt ei mõjuta. Samas võib PKC-spetsiifiliste substraatide suur arvukus olla põhjustatud ka eri isoensüümide erinevast spetsiifilisusest, kuna uuringud teostatakse enamasti roti ajast eraldatud antud ensüümi klassikaliste (α , β ja γ) isovormide seguga [7, 18, 12, 29].

Chen *et al.* näitasid, et oluline faktor substraadi äratundmisel on ka fosforüleeritava aminohappe (Ser /Thr) suhtes +1 positsioonis paiknev hüdrofoobne aminohape Phe [12], mida kinnitavad paljude looduslike substraatide analüüsimisel saadud andmed [7, 12, 24, 28]. Hüdrofoobse aminohappe olemasolu selles positsioonis tehti kindlaks ka mitmete PKC isovormide substraattjärjestustes [12]. Asendus Ile-ga kompenseerib osaliselt Phe puudumist, samas Ala asemelepanek vähendab vastava substraadi aktiivsust väga oluliselt. Need andmed näitavad, et +1 asendis on substraatspetsiifilisuse seisukohalt määrav hüdrofoobse aminohappe olemasolu, samas pakub suurt huvi teiste faktorite (nagu kõrvalahela suurus, aromaatsus vs alifaatsus etc.) mõju uurimine, millele ka antud töö eksperimentaalne

osa on keskendunud ning mis võimaldab optimeerida substraat-kinaas interaktsioone. Samas näitasid Kwon et al., et substraatide afiinsust PKC suhtes võib suurendada ka hüdrofoobse aminohappe olemasolu -1 asendis fosforüleeritava aminohappejäägi suhtes [7].

Seega on proteiinkinaas C substraatspetsiifilisuse määramisel olulised nii positiivselt laetud aminohapped fosforüleeritava jäägi ümbruses kui ka hüdrofoobse aminohappe olemasolu, seejuures ei oma tähtsust mitte ainult vastavate aminohapete asukoht, vaid ka nende olemus [12].

Arvukate peptiidjärjestuste võrdlemise ning substraatide struktuur-funktsioonsõltuvuste uurimise tulemusena on võimalik määratleda PKC konsensusjärjestuse struktuuri. Substraatspetsiifilisuse seisukohalt on olulise tähtsusega motiiv **X - Arg - X - X - Ser - X - Arg - X**, mis esineb ka antud ensüümi pseudosubstraadi autoregulaatorses regioonis [18, 28, 29]. Varieerides X-ga tähistatud positsioonides erinevaid aminohappeid on võimalik leida sobivamate kineetiliste parameetritega substraate antud ensüümi jaoks ning uurida substraat-kinaas interaktsioonile esitatavaid spetsiifilisuse nõudeid [29].

1. 2. PEPTIIDIDE SÜNTEESI-, PUHASTAMISE JA ANALÜÜSIMEETODID

Süntetilised peptiidsubstraadid omavad olulist osa nii proteiinkinaaside substraatspetsiifilisuse uurimisel kui ka nende ensüümide aktiivsuse mõõtmisel [29]. On kindlaks tehtud, et proteiinkinaaside substraatspetsiifilisus on peamiselt määratud fosforüleeritavat aminohappejääki ümbritseva peptiidi järjestuse poolt [4, 9, 10, 11, 29]. On siiski oluline mainida, et antud ensüümide substraatspetsiifilisuse kujundamisel omavad märkimisväärset rolli ka substraadi kõrgemat järku struktuurid [9, 29] (käesoleva töö peatükk 1.3). Valkude fosforüleeritava ala aminohappejärjestuse baasil sünteesitud peptiidid võimaldavad seega uurida nii fosforülatsioonimehhanismi kui ka substraatmolekulile esitatavaid struktuuraalseid nõudeid reaktsiooni toimumiseks [30].

Proteiinkinaaside peptiidsubstraatide saamiseks tuntakse kolme võimalikku lähenemisteed:

- 1) looduslike või eksogeensete substraatide teadaolevate fosforüleeritavate järjestuste baasil analoogide süntees (kõige sagedasem ja ka antud töös aluseks võetud lähenemisviis);
- 2) kombinatoorse keemia põhiideedel baseeruv statistiliste peptiidkogumite loomine, varieerides erinevaid aminohappeid kõikides spetsiifilisuse seisukohalt olulistest positsioonides;
- 3) substraatanaloogide sünteesimine pseudosubstraadi autoregulaatorsetele regioonidele vastavate järjestuste alusel [29, 31].

Põhieesmärk peptiidsubstraatide sünteesimisel proteiinkinaaside jaoks on luua paremate kineetiliste omadustega ja kõrgelt spetsiifilisi substraate [29].

1. 2. 1. TAHKEL KANDJAL LÄBIVIIDAVA PEPTIIDSÜNTEESI PÕHIIDEED

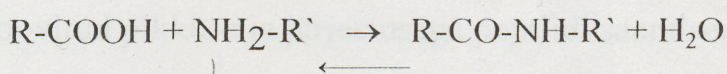
Peptiidsüntees tahkel kandjal (*Solid Phase Peptide Synthesis*, SPPS) võeti esmakordselt kasutusele Bruce Merrifieldi poolt 1963. aastal [32]. Tänu mitmetele eelistele klassikalise lahuses läbiviidava peptiidsünteesi ees (tunduvalt väiksem aja- ja töökulu, võimalus sünteesida väga paljudest aminohapetest koosnevaid peptiidahelaid, märgatavalt kõrgemad reaktsioonisaagised etc.) on see meetodika omandanud laialdase rakenduse ning on tehtud mitmeid edasiarendusi ja täiendusi antud sünteesistrateegia rakendamise hõlbustamiseks (uute sidumisreagentide, blokeerimisrühmade ja tahke kandja materjalide kasutuselevõtmine, peptiidi eraldamiseks tahkelt kandjalt kasutatava lahuse koostise optimeerimine, sünteesietappide automatiseerimine etc.) [33, 34, 35].

Järgnevalt on esitatud tahkel kandjal läbiviidava peptiidsünteesi põhietapid.

1. Esimene blokeeritud α -aminorühmaga aminohape seotakse kovalentse sideme abil tahkele polümeerile, millena kasutatakse enamasti 1 %-lise divinüülbenseeni lisandiga polüstüreeni. α -aminorühma blokeerimiseks võttis Merrifield algselt kasutusele hapete suhtes tundliku Boc-blokeerimisrühma, mida tänapäeval on suures ulatuses välja tõrjumas Fmoc-grupp [36, 37, 38]. Viimase kasutamine võimaldab töötada märgatavalt leebemates tingimustes, nõudmata sünteesitava peptiidi töötlemist tugeva happega [39]. Siinjuures peab mainima, et vastavad blokeeritud α -aminorühmaga tahkele kandjale seotud aminohappederivaadid on kättesaadavad ka valmiskujul ning üha enamates laboratooriumides lähtutakse peptiidide sünteesimisel juba polümeeri küljes olevast esimesest sobivast aminohappest.

2. Sünteesi jätkamiseks tuleb eemaldada tahke kandja külge seotud aminohappe α -aminorühma blokeerimiseks kasutatud rühmitis. Boc-blokeerimisgrupi kasutamisel saavutatakse see aminohappe/peptiidi töötlemisel TFA-lahusega DCM-s, kusjuures tekkinud trifluoroatsetaat tuleb neutraliseerida tertsiaarse amiiniga. Fmoc-rühm kõrvaldatakse piperidiini lahusega DMF-s, seejuures ei ole neutralisatsiooniprotsess vajalik ja reaktsioonietappide koguarv tsüklis on sellevõrra väiksem [39].

3. Soovitud pikkuse ja koostisega peptiidahela saamiseks seotakse tahkele kandjale kinnitatud esimese aminohappe külge ühekaupa vajalikke aminohappeid. See etapp hõlmab peptiidsideme formeerumist. Peptiidsideme spontaanne moodustumine on ebatõenäoline protsess, kuna selle reaktsiooni tasakaal on nihutatud peptiidsideme hüdrolyüüsi suunas:



Soovitud amiidi saamiseks peab üks rühmadest (kas karboksüül- või aminorühm) olema aktiveeritud. Sidumisprotsess on praktiliselt teostatav vaid karboksüülrühma aktiveerimise teel [40].

Tänapäeval kasutatakse mitmeid erinevaid aktiveerivaid reagente, kusjuures reagenti valik sõltub vastavalt Boc- või Fmoc-keemia kasutamisest ning liidetava aminohappe ja tema kõrvalahelas olevate aktiivsete rühmade blokeerimiseks kasutatud gruppide olemusest. Algselt laialdast populaarsust omanud DCC-d on eriti Fmoc-keemias välja tõrjumas uued ning tunduvalt efektiivsemad sidumisreagentid [41, 42, 43] nagu HBTU (aitab alla suruda ratsemisatsiooni, võimaldab kõrge saagisega sidumisprotsesse lühikese aja vältel) [44, 45], BOP (kiired ja suure saagisega reaktsioonid, võimaldab efektiivselt siduda kõrvalahelas asuvate blokeerimata hüdroksügruppidega aminohappeid) [46, 47, 48], PyBOP [49], HOBt, KOBt [50] etc.

Sünteesi vältel kasutatakse kõigi seotavate komponentide ja reagentide suurt liiga, mida võib polümeerile seotud peptiidilt filtreerimise käigus kergesti eemaldada. Seega kaob ära vajadus vaheühendite pidevaks puhastamiseks. Ebasoovitavate kõrvalreaktsioonide vältimiseks peavad olema blokeeritud ka lisatavate aminohapete aktiivsed külghelad, kusjuures eri rühmade kaitsmiseks on väljakujunenud erinevad standardsed blokeerimisrühmad (Boc-keemia kasutamisel enamasti bensüül-tüüpi blokeeringud, Fmoc-keemia korral t-Bu-tüüpi blokeeringud) [39].

Kõrgema saagise saamise eesmärgil on soovitatav sidumisprotsessi vältel muuta solventide polaarsust [36]. Aminohapete seostumise määra võib kontrollida nii ninhüdriintesti (Kaiser testi) [51, 52], pikriinhappe kasutamisel põhineva meetodi (Gisini protseduuri) [53] kui ka muude menetluste rakendamise teel.

Peptiidideme sünteesi tsükli, milline seisneb eelmise aminohappe deblokeerimises ja järgmise aminohappe sidumises immobiliseeritud peptiidahela külge korratakse soovitud pikkuse ja järjestusega peptiidi saamiseni, kusjuures sünteesiprotsess lõpeb viimasena seotud blokeeritud aminohappe deblokeerimisega.

4. Peptiidid eemaldatakse tahkelt kandjalt, kusjuures samaaegselt kõrvaldatakse ka aktiivsete külghelate blokeerimiseks kasutatud rühmad. Boc-keemia kasutamisel jõutakse vastava tulemuseni immobiliseeritud peptiidahela töötlemisel HF-ga. HF-i kasutamisel tuleb rakendada spetsiaalseid töövõtteid, kuna see reagent on väga toksiline ja korrosiivne ning reageerib ka klaasiga. Fmoc-keemias kasutatakse vastaval eesmärgil TFA-d. Mitmete ebasoovitavate kõrvalreaktsioonide vältimiseks tuleb TFA-le lisada sobivas vahekorras lisakomponente [39]. Seejuures on sobivaimaks osutunud järgmise koostisega segu: 82.5 % TFA-d, 5 % fenooli, 5 % destilleeritud vett, 5 % tioanisooli ja 2.5 % EDT-d (mahuprotsendid) [54]. Vajaduse korral on sobivate tingimuste kompleksi valikul võimalik kõrvalahelate deblokeerimine ja peptiidi eemaldamine tahkelt kandjalt läbi viia ka astmeliselt [41].

1. 2. 2. SÜNTEETILISTE PEPTIIDIDE PUHASTAMINE

Tahkel kandjal läbiviidava peptiidsünteesi käigus saadud peptiid sisaldab alati mitmeid kõrvalsaadusi. Viimased tekivad sünteesietappide võimaliku ebatäielikkuse tulemusena, põhjustades erineva pikkusega lühenenud peptiidahelate teket, ning samuti deblokeerimisprotsesside ja peptiidi kandjalt lahutamise käigus toimuvate keemiliste modifikatsioonide tõttu. Tavaliselt hinnatakse vähem kui 30 aminohappejääki sisaldava peptiidahela-toorprodukti puhtust 80- 95 %- le. Seega on vajalik sünteesiprodukte puhastada [33, 34, 36, 55, 56, 57, 58].

Sünteesiliste peptiidide puhastamiseks on kasutatud mitmeid erinevaid füüsikalisi-keemilisi meetodeid (ioonvahetuskromatograafiat, jaotuskromatograafiat, afiinsustehnikaid, ionvahetus- ja pöördfaas-HPLC- d etc.) [33, 41]. Tänapäeval puhastatakse sünteesilisi peptiide enamasti pöördfaas-kõrgrõhkvedelik-kromatograafia (RP-HPLC) abil [33, 36, 41, 55, 59, 60, 61]. Viimane omab teiste võimalike meetoditega võrreldes mitmeid märgatavaid eeliseid (kõrge lahutamisevõime, suhteliselt lühike puhastusprotsessi aeg etc.) [41, 55, 62].

Kõrgrõhkvedelikkromatograafia (HPLC) võimaldab peptiide lahutada tänu nende erinevatele interaktsioonidele derivatiseeritud lahustumatu kandja (nn. statsionaarse faasi) osakestega. Derivatiseeritud kandja paikneb silindrilises kolonnis; mobiilne faas, mis allub lahutamisele, voolab läbi kolonni ning kolonnist väljuvaid elueerunud osakesi detekteeritakse. Tuntakse kahte põhilist kandja tüüpi: ionvahetus- ja pöördfaaskandjat. Esimesel juhul põhineb lahutamine laengute vahetel interaktsioonil peptiidide ja statsionaarse faasi vahel. Peptiide elueeritakse kolonnist pH, ioonse jõu või nende mõlema suuruse muutmise teel. Kuivõrd see HPLC-i alaliik on tuntud kui "normaalfaas" kromatograafia, siis vastupidiste elueerimistingimustega kromatograafiat tuntakse pöördfaas HPLC-na. Peptiidide seostumine kandjaga toimub siin hüdrofoobsete interaktsioonide kaudu ja elutsiooni

soodustatakse eluendi hüdrofoobsuse suurendamise või ioonilisuse vähendamise teel. Eluent konkureerib kandja hüdrofoobsete gruppidega [33]. Samas ei ole RP-HPLC kasutamisel võimalik eristada peptiidide nende erineva happelisuse, aluselisuse ja ka molekulide suuruse alusel, mistõttu väga kõrge lahutuvuse saavutamiseks soovitatakse mitmeid meetodeid (elektroforeetilisi ja eri liiki kromatograafilisi meetodeid) kasutada komplekselt [34].

Sünteesiliste peptiidide puhastamisel on RP-HPLC osutunud siiani asendamatuks meetodiks, olles sel eesmärgil kasutusel juba 1973.-st aastast alates [34, 55]. Meetodi raames on mitmeid tingimusi parandatud, optimeerides ühelt poolt mobiilse faasi manipulatsiooni antud tahke kandja korral ning teiselt poolt statsionaarse faasi olemust [57, 63, 64, 65].

Puhtale peptiidile vastavad fraktsioonid eraldatakse, kogutakse ja lüofiliseeritakse.

1. 2. 3. ANALÜÜSIVIISID

Sünteesiliste peptiidide analüüsimiseks kasutatakse mitmeid eri meetodeid.

Puhastatud produktide homogeensuse hindamiseks on enam levinud RP-HPLC [36] ja kapillaartsoonelektroforeesi kasutamine [33, 34].

Sünteesiliste peptiidide kovalentne struktuur määratakse kindlaks nende aminohappelise koostise alusel [36, 41]. Samuti rakendatakse sel eesmärgil peptiidahela sekveneerimist (Edmani degradatsiooni) [36] ja ultraviolettspektroskoopiat [33]. Sünteesiproductide struktuurilisel iseloomustamisel on olulisel kohal ka mass-spektromeetriaalised uuringud. Nii on võimalik FAB MS-i (*Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry*) ja PDMS-i (*Plasma Desorption Mass Spectrometry*) kasutamisel hinnata molekulaarse iooni jaoks tema täpset massi [36, 46].

Eriti viimasel ajal pakuvad struktuur-funktsioonuuringute raames suurt huvi sünteetiliste peptiidide sekundaarne ja tertsiaarne struktuur. Neid on võimalik kindlaks määrata nii infrapunase-spektroskoopia abil kui ka tuumamagnetresonantsuuringute käigus [33, 34, 36, 41].

Peptiidide täpseks analüüsimiseks tuleb mitmeid meetodeid kasutada komplekselt (sekveneerimine + mass-spektromeetria (MS), sekveneerimine + aminohappeanalüüs etc.), kuna vaid ühe analüüsitehnika rakendamine annab sageli limiteeritud informatsiooni ja võib seega viia ebakorreksete järeldusteni [33, 36].

Käesolevas töös kirjeldati sünteesitud peptiidide kvantitatiivselt aminohappeanalüüsi teel. Sel eesmärgil lahutati peptiidide hüdrolüüsimisel saadud vabasid aminohappeid ionvahetuskromatograafiliselt, derivatiseeriti neid kolonnijärgselt ninhüdriniga ja detekteeriti järgnevalt fotospektromeetriselt vastavalt 440 nm (proliini ja hüdroksüproliini kindlakstegemiseks) ja 570 nm (kõikide ülejäänud aminohapete detekteerimiseks) juures [33, 66, 67].

Kvalitatiivselt iseloomustati sünteesiprodukte Cf^{252} -plasma desorptsioon mass-spektromeetriga (Cf^{252} -PDMS), kasutades Cf^{252} spontaansel lõhustumisel saadud raskete ionide interaktsioone tahkele matriksile kantud analüüsitava prooviga, indutseerimaks suurte ja mitteaurustuvate molekulide desorptsiooni- ja ionisatsiooniprotsesse [68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75].

1.3.1. PEPTIIDSIDE

Peptiidide struktuuri iseloomustamisel on määravaks tema põhiahela kuju. Põhijaduna lämmastiku elektronpaari delokalisatsioonist ja resonantsstruktuuride olemasolust on peptiidides side süsiniku ja lämmastiku aatomite vahel lähenedud ning omab kaksiksidemele lähedast iseloomu (joonis 4a). Vastav side on tasapinnaline ja tema torsioonnurk ω on defineeritud peptiidi põhiahela aatomite C_{α} -

1. 3. PEPTIIDIDE STRUKTUURI ISELOOMUSTAMINE

Kirjanduses esineb mitmeid viiteid substraatmolekuli kõrgemat järku (sekundaarse, tertsiaarse) struktuuri rollile proteiinkinaaside poolt katalüüsivate fosforülatsiooniprotsesside kineetiliste parameetrite määramisel [7, 10, 12, 18, 29, 76, 77]. Nii on näiteks proteiinkinaas A jaoks teada, et ta ei "tunne ära" looduslikku lüsosüümi molekuli, küll aga toimub fosforüleerumine denatureeritud lüsosüümi korral [10]. On ilmne, et konformatsioonilisest eripärast tulenevad faktorid mängivad rolli ka sünteetiliste peptiidide fosforülatsiooniprotsesside kineetikas. Nii omab peptiidahela primaarne järjestus vaid teatud osa substraatspetsiifilisuse määramisel ja seega on ilmne, et peptiidahela sekundaarne struktuur on seejuures oluliseks lisafaktoriks [7, 76]. Samas ei ole võimalik kirjandusest leida andmeid, kuidas substraatmolekuli konformatsioon proteiinkinaaside toimele mõju avaldab. Käesoleva töö eksperimendi tulemuste arutlemisel peatutakse eraldi peptiidide konformatsiooni võimalikul mõjul PKC substraatreaktsiooni kineetikale. Seepärast on järgnevalt peatutud ka peptiidsideme ja sellele iseloomulike parameetrite ning peptiidahela sekundaarse struktuuri võimalike tüüpide kirjeldamisel.

1. 3. 1. PEPTIIDSIDE

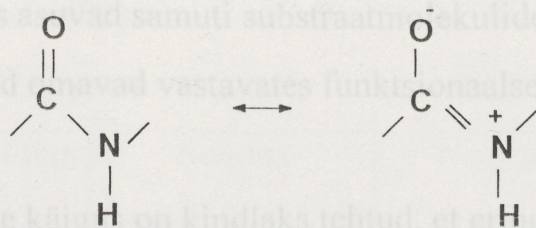
Peptiidide struktuuri iseloomustamisel on määravaks tema põhiahela kuju. Põhjustatuna lämmastiku elektronpaari delokalisatsioonist ja resonantsstruktuuride olemasolust on peptiidides side süsiniku ja lämmastiku aatomite vahel lühenenud ning omab kaksiksidemele lähedast iseloomu (joonis 4a). Vastav side on tasapinnaline ja tema torsioonnurk ω on defineeritud peptiidi põhiahela aatomite C_{α} -

C(O)- N- C_α kaudu. Tulenevalt sarnasusest kaksiksidemega võib peptiidside esineda kahe rotatsioonilise isomeerina: *trans*- ($\omega = 180^\circ$) ja *cis*- ($\omega = 0^\circ$) isomeeridena (joonis 4b). Madalama energiaga isomeer on tavaliselt *trans*- isomeer ning seega on peptiidsidemed enamasti ka *trans*- asendis [33, 78].

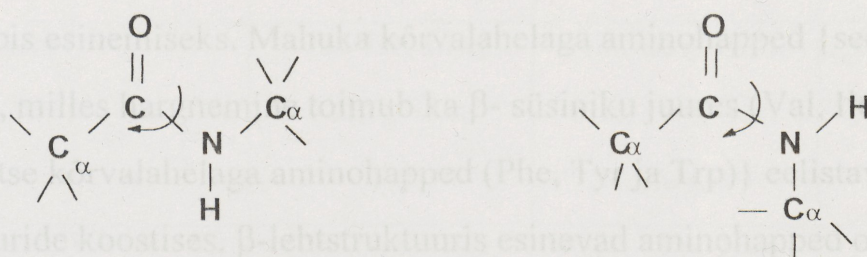
Peptiidside, mis tekib proliini jäägi lämmastiku ja eelneva aminohappe karboksüülrühma süsiniku vahel, võib erandina tavalisest amiidsidemest esineda nii *trans*- kui ka *cis*- isomeeridena [79], kuna vastavate konformatsioonide energiatega vahe on väike ($G_0 < \sim 2 \text{ kcal / mol}$). *cis*- konformatsiooni esinemise võimalikkusest tulenevalt esinevad prolüülamiidide korral teatud eelistused kindlatele sekundaarse struktuuri motiividele (pöörded) ning seega mängivad proliini sisaldavad peptiidid olulist rolli peptiidahela konformatsiooni määramisel. Sel viisil võib toodud fenomen olla kriitiline substraatide äratundmisel ensüümide ja retseptorite poolt [80]. Tasakaal *cis*- ja *trans*- isomeeride vahel ning isomerisatsioonikiirus on sõltuv peptiidahela täpsest järjestusest. Empiirilisel on leitud, et X- Pro side domineerib *cis*- isomeerina, kui X on suur ja hüdrofoobne aminohape [33].

1. 3. 2. PEPTIIDAHELA SEKUNDAARSE STRUKTUURI TÜÜBID

Eristatakse kolme erinevat peptiidide sekundaarse struktuuri tüüpi: α -heeliks (α -*helix*), β -leht (β -*sheet*) ja pöörded (*turns*). Seejuures käsitletakse α -heeliksit ja β -lehte regulaarsete struktuuridena, kuna nende põhiahelas esinevad korduvate suurustega torsioonnurgad ning N-H ja C=O rühmade vahel paiknevad vesiniksidemed on perioodilise paigutusega. Pöördeid loetakse seevastu mitteregulaarseteks struktuurideks põhiahela erineva suurusega torsioonnurkade ja enamasti vaid ühe N-H ja C=O rühmade vahel paikneva vesiniksideme tõttu. Ülejäänud aminohappejäägid moodustavad ahelas nn. juhuslikke keerde, mida peetakse küll ebaregulaarseteks, kuid samas korduvateks struktuurideks [33, 81].



(a) Peptiidside resonancevormid



trans- isomeer

$$\omega = 180^{\circ}$$

cis- isomeer

$$\omega = 0^{\circ}$$

(b) *trans*- ja *cis*- isovormid

Joonis 4. Peptiidside iseloomustavad parameetrid [33].

Ebaregulaarse sekundaarse struktuuri tüübina võiks eraldi käsitleda veel luupstruktuuri, samas sisaldab see aga ühte või mitut pööret ning seepärast luupstruktuure eraldi sekundaarse struktuuri kategooriaks ei loeta. Seejuures on veenvaks faktoriks veel teadmine, et aminohapped, mis esinevad pöördstruktuurides, on põhilised koostisüksused ka luupstruktuuride moodustumisel. Kuna ühelt poolt paiknevad luupstruktuurid substraatmolekulide välispinnal ja teiselt poolt nende

molekulide “äratundmisalad” glükosülatsiooni, fosforülatsiooni, transpordi ja teiste protsesside toimumiseks asuvad samuti substraatmolekulide pinnal, on tõenäone arvata, et luupstruktuurid omavad vastavates funktsionaalsetes protsessides tsentraalset osa [81].

Mitmete uuringute käigus on kindlaks tehtud, et erinevad aminohapped omavad erinevaid eelistusi ahela sekundaarse struktuuri moodustumisel. Levitt näitas, et nii aminohappe keemiline struktuur kui ka stereokeemilised omadused määravad vastava aminohappe esinemise kindla sekundaarse struktuuri koostisosana. 19 20-st looduslikult leiduvast aminohappest omavad statistilist eelistust kindlas struktuuritüübis esinemiseks. Mahuka kõrvalahelaga aminohapped {seega Gln, Lys, aminohapped, milles hargnemine toimub ka β - süsiniku juures (Val, Ile ja Thr) või suure aromaatses kõrvalahelaga aminohapped (Phe, Tyr ja Trp)} eelistavad paikneda β -lehtstruktuuride koostises. β -lehtstruktuuris esinevad aminohapped omavad seega piiratud konformatsioonilist vabadust. Väikese polaarse kõrvalahelaga aminohapped (Ser, Asp, Asn) ning Gly, millel kõrvalahel puudub, ja Pro, millel kõrvalahel on tsükliceerunud, asuvad enamasti pööretes. Pöörete moodustumiseks on seega Arg) olulised aminohapped, mis omavad tendentsi muuta ahela suunda. Kõik ülejäänud {mittepolaarse (Ala, Cys, Leu, Met), polaarse (Gln, His) ja laetud (Glu, Lys) kõrvalahelaga} aminohapped eelistavad paikneda α -heeliksi koostisüksustena, välja arvatud arginiin, millel spetsiifilised eelistused puuduvad [82].

Samuti võib (läheldes nii aminohapete keemilisest struktuurist kui ka nende stereokeemilistest omadustest) konstateerida kindlate aminohapete sobimatust teatud sekundaarsete struktuuritüüpide koostisosadena. Tabelis 1 on esitatud looduslike aminohapete jaoks kolmeastmeline (soodus, neutraalne, sobimatu) sobivusskaala mingis kindlas sekundaarse struktuuri tüübis esinemiseks [82].

Tabel 1. Aminohapete konformatsioonilised eelistused α -heeliksis, β -lehes ja pööretes esinemiseks [82].

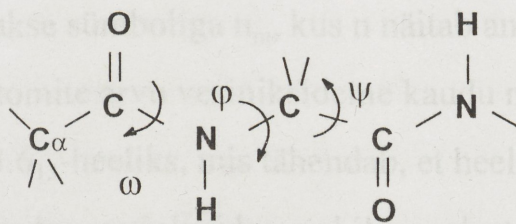
Sekundaarse struktuuri tüüp	Soodus	Neutraalne	Sobimatu, struktuuri lõhkuv
α -heeliks	Ala, Leu, Met, His, Glu, Gln, Lys, (Cys)	Val, Ile, Phe, Trp, Asp, Asn, Arg	Tyr, Thr, Gly, Ser, Pro
β -leht	Val, Ile, Phe, (Trp), Tyr, Thr	Ala, Leu, Met, His, Gly, Ser, Arg	Glu, Gln, Lys, Asp, Asn, Pro, Cys
Pöörded	Gly, Ser, Asp, Asn, Pro	Gly, Gln, Lys, Tyr, Thr, (Arg)	Ala, Leu, Met, His, Val, Ile, Phe, (Trp), (Cys), (Arg)

Peptiidi põhiahela konformatsiooni iseloomustamiseks on kasutusel kolm erinevat torsioonnurka:

φ — nurk põhiahela aatomite C(O)-N-C $_{\alpha}$ -C(O) vahel,

ψ — nurk põhiahela aatomite N-C $_{\alpha}$ -C(O)-N vahel,

ω — nurk põhiahela aatomite C $_{\alpha}$ -C(O)-N-C $_{\alpha}$ vahel (joonis 5) [33].



Joonis 5. Peptiidi konformatsiooni iseloomustavad torsioonnurgad [33].

On oluline mainida, et lühikesed (väiksemad kui 7-8 aminohappejääki sisaldavad) peptiidid ei oma intramolekulaarseid vesiniksidemeid ja molekulisiseseid hüdrofoobseid tõmbejõude; mistõttu lühikeste peptiidide konformatsiooni määratlemisel on olulise tähtsusega nende tõmbejõud naaberpeptiidmolekulide ja solventi molekulidega. Seetõttu on lühikestele peptiididele omane struktuuriline muutlikkus ja antud konformatsioon on oluliselt sõltuv solventi polaarsusest. Samas on pikemate (8 ja enama aminohappejäägiga) peptiidide korral konformatsiooni stabiliseerimisel olulisemad intramolekulaarsed vesiniksidemed ning interaktsioonid naaberpeptiidmolekulide ja solventiga ei ole enam määrava tähtsusega. Seejuures on peptiidi konformatsioon, sõltumata väliskeskkonnast, tavaliselt ühene ning ka erinevate solventide kasutamisel on ahela konformatsioon enamasti sama [83].

α -HEELIKS

Heeliks on peptiidide sekundaarse struktuuri üks enamlevinud kategooriaid, olles esindatud mitme erineva tüübina (paremkeermeline α -heeliks, vasakkeermeline α -heeliks, 3_{10} -heeliks, kollageen-heeliks, polüproliin et al), millest peptiidahelates võib kõige sagedamini leida paremkeermelist α -heeliksit. Kuna heeliksites esinevad peptiidid on planaarsed ja *trans*-asendis, siis on antud struktuurid iseloomustatud vaid φ ja ψ nurkadega [33, 78, 84]. Paremkeermelise α -heeliksi jaoks on need parameetrid enam-vähem konstantsed (teoreetiliselt $\varphi = -57.5^\circ$, $\psi = -47.5^\circ$; kristallstruktuuride uurimise keskmistena $\varphi = -63.8^\circ$, $\psi = -41.0^\circ$) [85, 86]. Standardse α -heeliksi korral on pöörde kõrgus (ehk nn. samm) 5.4 \AA [78].

Heelikseid tähistatakse sümboliga n_m , kus n näitab aminohappejääkide arvu ühe pöörde kohta ja m aatomite arvu vesiniksideme kaudu moodustunud ringis. Nii on standardne α -heeliks 3.6_{13} -heeliks, mis tähendab, et heeliksi pööre sisaldab 3.6 aminohappejääki ja iga korduv vesiniksideme abil moodustunud tsükliline struktuur koosneb 13-st aatomist [33, 84].

Helikaalsed struktuurid on stabiliseeritud ahelasiseste vesiniksidemete abil. Standardses α -heeliksis on i -nda aminohappejäägi karbonüülgrupp ($C=O$) seotud vesiniksideme kaudu $(i+4)$ -nda jäägi amiidrühma ($N-H$)-ga. 3_{10} -heeliksis on vesiniksides moodustunud i -nda ja $(i+3)$ -nda aminohappejäägi vastavate rühmade vahele [33, 78, 84].

Paremkeermeliste α -heeliksiste struktuuri uurimisel nende aminohappelisest järjestusest lähtudes on kindlaks tehtud, et prolüüljääk peptiidahelas lõhub helikaalset struktuuri, murdes heeliksi telge $20-30^\circ$ -se nurga võrra, omades seega olulist osa nii peptiidahela konformatsiooni määratlemisel kui ka proteiinide tihedal kokkupakkimisel [86, 87, 88, 89]. Prolüüni esinemine α -heeliksis aminootsast arvestatuna pärast neljandat aminohappejääki on väga harv nähtus, kuna, olles iminohape, puudub amiidrühmal prooton ning prolüüljääk ei ole võimeline moodustama vesiniksidesid protioni aktseptoriga (põhiahela karbonüülrühma hapniku aatomiga). Kuna α -heeliksis moodustab i -nda aminohappejäägi amiidi prooton vesiniksideme $(i-4)$ -nda jäägi karbonüülrühma hapnikuga, siis prolüüni esinemine helikaalse peptiidi aminootsast kaugemal kui neli aminohappejääki põhjustab peptiidahelas nn. sõlme teket [87]. Samas prolüüni leidumine peptiidahela alguses heeliksi esimeses pöördes on isegi stabiliseeriva mõjuga; omades vaid ühte rotatsioonnurka, on entroopia kadu prolüüni korral väiksem kui teistel aminohapetel ja seega on soodustatud regulaarse helikaalse struktuuri teket [90].

β -LEHT

β -lehena käsitletakse tavaliselt kahest väljavenitatud peptiidahelast vesiniksidemete kaudu moodustunud struktuuri, kusjuures ahelate vahelised vesiniksidemed esinevad põhiahela iga teise aminohappejäägi karbonüülrühma ($C=O$) ja amiidi $N-H$ vahel. Kõrvutiasetsevad ahelad võivad paikneda kahel eri viisil: paralleelselt (peptiidahelad kulgevad samas suunas — aminootsast karboksüülotsani) või antiparalleelselt (peptiidahelate suund on erinev) [33, 78, 84, 91].

Vesiniksidemete kaudu ühendatud põhiahelate aatomid asetsevad paarikaupa tasapinnaliselt ja nii moodustub nn. volditud struktuur [91]. Paralleelse β -lehe korral on torsioonnurgad $\varphi = -119^\circ$ ja $\psi = 113^\circ$; antiparalleelse β -lehe jaoks vastavalt $\varphi = -139^\circ$ ja $\psi = 135^\circ$ [33]. Aminohapete kõrvalahelad paiknevad perpendikulaarselt üleval- ja allpool β -lehe üldist tasapinda [33, 91]. Kuna ahelate vahelised vesiniksidemed tekivad vaid ahela iga teise aminohappejäägi kaudu, on ilmne võimalus suuremate struktuuride moodustumiseks, mis sisaldavad mitmeid peptiidahelaid. Väänded sellistes laiendatud struktuurides viivad β -silindrite tekkeni [33].

Palju on uuritud β -lehe tekke sõltuvust ahela aminohappelisest järjestusest ja loodud on eri tingimuste jaoks mõnevõrra erinevaid skaalasisid (blokeeritud ja blokeerimata peptiidahelate jaoks etc.) [84, 92]; käsitletud on nii vesiniksidemete mõju antud sekundaarse struktuuri stabiliseerimisel kui ka mõningate orgaaniliste solventide võimalikku toimet vastava struktuuri lõhkumisel [84, 91, 92].

PÖÖRDED

Pöörded moodustavad peptiidide sekundaarse struktuuri olulise kategooria, omades märkimisväärset rolli peptiidahela suuna muutmisel [93]. Pööordeid klassifitseeritakse aminohappejääkide arvu järgi, mis võtavad osa vastava struktuuri moodustumisest. Nii hõlmab üks β -pööre nelja ja γ -pööre kolme aminohappejääki [33]. Stereokeemiliste kriteeriumide baasil eristatakse omakorda veel kolme erinevat β -pöördet tüüpi [84]. Pöördstruktuur on stabiliseeritud vesiniksideme abil, mis moodustub risti üle pöördet, hoides sel viisil koos struktuuri kaht otsa. Kui pöördet esimest aminohappejääki tähistada i -ga, siis β -pöördet korral moodustub vesinikside i -nda aminohappejäägi karbonüülgrupi ja $(i+3)$ -nda jäägi N-H rühma vahele, tekitades nii kümneaatomilise ringi. γ -pöördet korral on vesinikside tekkinud i -nda aminohappejäägi karbonüülrühma ja $i+2$ jäägi N-H grupi vahele, moodustades sel viisil seitsmeaatomilise ringi [33, 78].

Palju on tegeldud pöörete aminohappelise koostise uurimisega. On selge, et põhiliseks faktoriks aminohapete eelistuse skaalas on steerika. Proliin omab märgatavat eelistust β -pöörde (i+1)-asendis paiknemiseks ning ka empiirilised uuringud tõestavad selle aminohappe väga sagedast esinemist antud positsioonis. (i+2)-asendis paikneva aminohappejäägi kõrvalahel peaks olema (i+1)-asendis esineva aminohappejäägi karbonüülrühmast vastaspool. Seega oleks (i+2)-asendis β -pöörde seisukohalt lähtudes väga soodus D-aminohappe esinemine. L-aminohapetest koosnevas homokiraalses peptiidahelas paikneb sel kohal enamasti glütsiini jääk. Empiiriliselt on kindlaks tehtud, et mahuka hüdrofoobse kõrvalahelaga aminohappe esinemine β -pöörde antud asendis on välistatud, teiselt poolt on vastavas positsioonis osutatud aga serüülrühma võimalikule paiknemisele [94, 95].

γ -pöörete korral on aminohappelise eelistusi tunduvalt vähem uuritud, siiski on ka selle struktuuri jaoks ilmne proliini esinemise nõue (i+1)-asendis [94].

Pöörded on olulised struktuurimotiivid paljude peptiidide ja proteiinide bioloogilise aktiivsuse tagamisel, võimaldades sealhulgas ka peptiidsubstraatide "äratundmist" ensüümide ja retseptorite poolt [84, 96]. On väidetud, et umbes 80 % serüül- või treonüüljäägi hüdroksüülrühma fosforüleerimisest proteiinkinaaside poolt toimub β -pöördstruktuurides [84], kuna pöörded paiknevad substraatmolekuli välispinnal ja võimaldavad fosforüleeritava hüdroksüülrühma steeriliselt soodsat asetust [33, 84, 94, 96]. Siit ilmneb proliini kui ainukese loodusliku iminohappe krutsiaalne roll peptiidahela konformatsiooni määratlemisel ning seega ka tema bioloogilise aktiivsuse tagamisel, võimaldades seega paremini mõista peptiidide struktuuri ja aktiivsuse vahelisi seoseid.

1. 4. PEPTIIDIDE KVANTITATIIVSED STRUKTUUR- AKTIIVSUS SÕLTUVUSED ENSÜÜMKATALÜÜTILISTEL REAKTSIOONIDEL

Kvantitatiivsed struktuur-aktiivsus sõltuvused (*Quantitative Structure-Activity Relationships*, QSAR) käsitlevad keemiliste ühendite struktuuri ja reaktsioonivõime vahelisi seoseid. Peptiidide QSAR-i uurimise põhieesmärgiks on võimalikult täpsete mudelite leidmine, mille alusel saaks teoreetiliselt hinnata peptiidide potentsiaalset bioloogilist aktiivsust. Vastava tulemuseni on võimalik jõuda peptiidahelate koostises olevate aminohapete omadusi kirjeldavate parameetrite korreleerimise käigus [97]. Standardsed parameetrid aminohapete erinevate kõrvalahelate jaoks on kirjanduses toodud ning korrelatsioonanalüüsiks seega kättesaadavad.

QSAR-s kasutatavad parameetrid võib jagada kolme suurde rühma: elektroonsed, hüdrofoobsed ja steerilised karakteristikud [98]. Loodud on mitmeid erinevaid elektroonse parameetri (σ) skaalasisid (-R efekti iseloomustav σ^- , +R efekti iseloomustav σ^+ , induktsioonimõju iseloomustav σ_I , alifaatsetele ühenditele omane σ^* etc.) [98]. Steeriliste mõjude kirjeldamiseks kasutatakse enamasti Tafti steerilisuse parameetrit E_s , mis iseloomustab ruumilistest efektidest tulenevaid vastasmõjusid reageerivate molekulide vahel [98]. Hüdrofoobsete efektide kirjeldamiseks (mida peetakse eriti oluliseks ensüüm-substraat-interaktsioonide korral) on tarvitusele võetud logaritmi uuritava aine jaotuskoefitsendist, mõõdetuna vee ja lipiidset keskkonda modelleeriva faasi (enamasti n-oktanooli) vahel:

$$\pi = \log P_s - \log P_o,$$

kus π on hüdrofoobsuse karakteristik ning P_s ja P_o jaotuskoefitsendid vastavalt uuritava aine ja homoloogilise rea esimese liikme jaoks [98, 99, 100]. Aminohapete hüdrofoobsuse kirjeldamiseks kasutatakse Fauchere ja Pliska poolt esitatud andmeid, kus logaritm on võetud aminohappe N-atsüülamiidi jaotuskoefitsendist süsteemis n-oktanool / vesi, imiteerides amino- ja karboksüülrühma juures laengute puudumise kaudu aminohappejääkide olekut peptiidahelas [101].

Lisaks kolmele eelpool nimetatud põhiparameetrile on QSAR-s kasutusel veel mõningad karakteristikud. Molekulaarrefraktsioon (MR) iseloomustab samaaegselt nii molekuli polariseeritavust kui ka ruumilist mahukust (*bulkiness*). Uuritavat molekuli võib iseloomustada ka tema molekulmassi, vastava molekuli koostises olevate erinevat tüüpi aatomite ja funktsionaalrühmade arvu abil; aatomite vaheliste sidemete pikkuste ja sidemete vaheliste nurkade alusel etc.

Järv ja Ragnarsson kasutasid proteiinkinaas A peptiidsubstraatide kvantitatiivsete struktuur-aktiivsuse sõltuvuste analüüsimisel nii hüdrofoobsus- ja sterilisusparameetreid kui ka molekulaarse refraktsiooni indekseid ning näitasid, et peptiidsubstraatide seostumise efektiivsus ensüümiga on oluliselt sõltuv aminohapete kõrvalahelate omadustest [102].

Matemaatiliselt esitatakse kvantitatiivsed struktuur-aktiivsuse sõltuvused tavaliselt multilineaarse regressioonina:

$$A = A_0 + \sum_{i=1}^n a_i \cdot x_i,$$

kus A on molekuli aktiivsus, A_0 standardmolekuli aktiivsus, n parameetrite arv mudelis, x_i käsitletav parameeter, ja a_i regressioonanalüüsi kordaja. Leitud mudeli headust iseloomustavad regressioonvõrrandi parameetrid (standardhälve s , korrelatsioonikoefitsient r , F -statistik etc.). Peptiidide korral eeldatakse aminohapete jaoks kasutatavate parameetrite aditiivsust, seega

$$x_i = \sum_{j=1}^m x_j,$$

2. MATERJAL JA METOODIKA

kus m tähistab aminohapete arvu peptiidahelas, x_j mingile aminohappele vastavat karakteristikut ja x_i antud parameetrit peptiidahela jaoks summaarselt. On oluline mainida, et selline lähenemine ei arvesta aminohapete külghelate vahel esineda võivaid interaktsioone ja sellest tulenevaid võimalikke muutusi peptiidahelas [100].

Peptiidide kvantitatiivsete struktuur-aktiivsuse sõltuvuste analüüs on realselt rakendatav vaid aminohapete varieerimisel ahela mingis kindlas positsioonis, kuna peptiidahela kõigi positsioonide jaoks samaaegne analüüsi läbiviimine limiteeritud eksperimentaalsete andmete olemasolu korral muudaks regressioonvõrrandi vabadusastmete arvu liiga väikeseks ja korrelatsioonikordaja ei oleks enam usaldusväärne.

Sel eesmärgil sünteesiti 14 erinevat peptiidjärjestust Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala, kus X tähistab vastavalt ühte järgmistest aminohapetest: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro ja Val. Vastavad aminohapped valiti nii hüdfoobsus- kui ka struktuur-aktiivsuse sõltuvusparameetrite alusel.

Töö eksperimentaalne osa seisnes antud peptiidjärjestuste sünteesimises, puhastamises ja analüüsimises ning vastavate substraatide fosforilatsioonikineetika mõõtmises. Lisaks modelleeriti kvantkeemiliselt vastavate lokaalsete mutatsioonide mõju peptiidahela konformatsioonide gaasifaasis, võttes mudelpeptiidiks regulaarsel α -helikaalset struktuuri omava heptaalanini molekuli.

2. MATERJAL JA METOODIKA

Antud töö eksperimentaalses osas lähtuti PKC spetsiifilise loodusliku substraadi müeliini aluselise valgu järjestusest 4-14 (MBP₄₋₁₄) ehk nn. Nishizuka peptiidist **Gln-Lys-Arg-Pro-Ser(8)-Gln-Arg-Ser-Lys-Tyr-Leu**, kusjuures substraatspetsiifilisust uuriti seriinile järgneva aminohappe varieerimisel. Kuivõrd selle ensüümi konsensusjärjestuses on seriinile järgneva positsiooni jaoks optimaalne aminohape määratlemata ja kirjanduses esineb vaid mõningaid viiteid vastava aminohappe füsikokeemiliste omaduste kohta (hüdrofoobsuse nõue [12]), püüti käesolevas töös seriinile järgnevas asendis aminohapete varieerimise käigus leida antud esüümi jaoks sobivaimate kineetiliste parameetritega substraatjärjestust. Sel eesmärgil sünteesiti 14 erinevat peptiidjärjestust **Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala**, kus X tähistab vastavalt ühte järgmistest aminohapetest: Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro ja Val. Vastavad aminohapped valiti nii hüdrofoobsus- kui ka struktuur-aktiivsus-sõltuvusparameetrite alusel.

Töö eksperimentaalne osa seisnes antud peptiidjärjestuste sünteesimises, puhastamises ja analüüsimises ning vastavate substraatide fosforülatsioonikineetika mõõtmises. Lisaks modelleeriti kvantkeemiliselt vastavate lokaalsete mutatsioonide mõju peptiidahela konformatsioonile gaasifaasis, võttes mudelpeptiidiks regulaarset α -helikaalset struktuuri omava heptaalaniini molekuli.

2. 1. PEPTIIDIDE SÜNTEES, PUHASTAMINE JA ANALÜÜS

2. 1. 1. SÜNTEESIDEL KASUTATUD REAGENDID JA SOLVENDID

AINE NIMETUS	PUHTUSASTE
1-metüül-2-pürrolidoon, NMP	for synthesis
N-etüül-diisopropüülamiin, DIEA	zur Synthese
Piperidiin	zur Synthese
Diklorometaan, DCM	HPLC Grade
N, N-dimetüülformamiid	Millipore, Peptide Synthesis Reagent
Dietüüleeter	pro analysi
Trifluoroetaanhape, TFA	Peptide Synthesis Grade
Tioanisool	zur Synthese
Atseetonitriil	für die Chromatographie
1,2-etaanditiool, EDT	zur Synthese
Fenool	for synthesis

1-hüdoksübensotriasool monohüdraat, HOBt hüdraat
2-(1 H-Bensotriasool-1-üül)- 1,1,3,3-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat, HBTU
Fmoc-L-Ala-tahkel kandjal
Fmoc-L-Ala-OH

Fmoc-L-Arg(Pmc)-OH
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH
Fmoc-Gly-OH
Fmoc-L-His(Trt)-OH
Fmoc-L-Ile-OH
Fmoc-L-Leu-OH
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH
Fmoc-L-Phe-OH
Fmoc-L-Pro-OH
Fmoc-L-Ser(tBu)-OH
Fmoc-L-Val-OH

Kuna kasutati ainult L-isomeerseid aminohappe derivaate, siis on edaspidi täht "L" jäetud märkimata.

2. 1. 2. APARATUUR

Peptiidsubstraadid sünteesiti Uppsala Ülikooli Biomeditsiinikeskuses, kusjuures kasutati allpool kirjeldatavat aparatuuri.

1. Peptiidsüntesaator (*Peptide Synthesizer Model 430, Applied Biosystems*).
2. Ultrahelisegaja (*Ultrasonics*; tüüp K5 101, seeria number L 121).
3. Mehaaniline segaja (Ab Thermo-Glas).
4. Lauatsentrifuug (LKB-Beckman Instruments AB, HB W-69). Kasutati valikrežiimi 70 000 pööret minutis, proove tsentrifuugiti 5 minuti vältel.

5. Pöördfaas-kõrgrõhkvedelikkromatograaf (kolonn Vydac CRT*218TP1010 911125-18-11, *Protein & Peptide*, diameeter 1.0 cm). Peptiidide lahutamiseks kasutati järgmist programmeeritud gradientsüsteemi (*Automated Gradient Controller*):

AEG (min)	KIIRUS (ml/min)	A (%)	B (%)
alghetk	4.00	100	0
1.00	4.00	100	0
60.00	4.00	60	40
80.00	4.00	20	80
100.00	0.50	20	80

kus A on 0.1 %-line TFA vesilahus ja
B on 0.1 %-line TFA lahus atseetonitriilis.

Töö alguses ja enne iga proovi süstimist kromatograafi pesti kolonni 10 ml B-ga (2.5 minutit voolukiirusel 4 ml/min) ning tasakaalustati 20 ml A-ga (5 minutit, 4 ml/min). Fraktsioonide kogumiseks kasutati automaatset kollektorit (2112 Redirac, Fraction Collector LKB Bromma). Fraktsioonikogujaid vahetati iga 0.3 minuti möödudes ning signaale detekteeriti 230 nm juures (UV detektor 230 nm AUFS 2).

6. Lüofilisaator (tyllström & söner, kylteknik a_b, 115-001011). Proove lüofiliseeriti ööpäeva jooksul.

7. Cf²⁵²-plasma desorptsioon mass-spektromeeter (BIO-ION 20, NORDIC AB), mis oli ühendatud arvuti ja printeriga. Masside määramisel kasutati pinget 15 kV.

8. Aminohappeanalüüsid lasti teha Uppsala Ülikooli Biomeditsiinikeskuse Biokeemia osakonnas, vastava aparatuuriga ei tutvunud.

2. 1. 3. SÜNTEESI EESKIRI

Peptiidsubstraatide sünteesimisel kasutati Merrifieldi tahke kandja meetodit.

Järgnevalt on toodud sünteesimise üldeeskiri punktide kaupa.

1. Kuna peptiidahela karboksüülotsa neli esimest aminohapet olid kõikide järjestuste jaoks identsed, siis sünteesiti tetrameer Arg(Pmc)-Ala-Lys(Boc)-Ala-tahkel kandjal kõikide peptiidide jaoks ühiselt. Vastav süntees teostati süntesaatori abil, kasutades järgmisi reagente ja solvente:

AINE	M _K (g/mol)	MMOOLIDE ARV	MASS (mg)
Fmoc-Ala-tahkel kandjal	1587.3 (keskmine M _K)	0.6	952.4
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.6	1.0	468.6
Fmoc-Ala-OH	311.3	1.0	311.3
Fmoc-Arg(Pmc)-OH	662.8	1.0	662.8

0.5 M HBTU/HOBt lahus DMF-s	200 ml
2 M DIEA lahus NMP-s	200 ml
DMF	1000 ml
DCM	1000 ml
20 %-line piperidiini lahus DMF-s	200 ml

Tahke kandjaga seotud aminohappe moolide arv määrab produkti moolide arvu, kuna lisatavate derivaatide kogus (1 mmool) on määratud süntesaatori

programmi poolt {käesolevas töös kasutati mudeli 430 A versiooni *FastMoc*TM *Cycles*, mida oli moderniseeritud *Multiple Chemistry Synthesis* ploki (P/N 400823) lisamise teel}. Igas tsüklis lisatavate reagentide ja solventide hulgas, tööprotsesside järjekord ning etappide ajalised kestused olid programmeeritud.

2. Peptiidsubstraatide edasisel ühekaupa sünteesimisel lähtuti 0.04 mmoolist i.e. ca 83.4 mg-st tetrameerist tahkel kandjal { M_K (keskmine) = 2086 g/mol}. Sünteesid teostati ühekordse kasutamisega 5 ml-stes süstaldes, mille põhja olid asetatud spetsiaalsed filtrid. Nimetatud kogus kandjat kaaluti süstlasse, lasti paisuda 5 minuti vältel DMF-ga ning pesti neli korda sama solvendiga (ca 5 ml igal korral). Neljakordne molaarne liig lisatavat aminohappe derivaati lahustati 0.5 M HBTU/HOBt lahuses DMF-s ning lisati 2 M DIEA lahust NMP-s (nii et aminohape/HBTU/HOBt/DIEA = 1/1/1/2, moolide suhted). Saadud lahus lisati tetrameerile tahkel kandjal ja sidumise soodustamiseks raputati süstalt reaktsiooni vältel ebaregulaarselt. 45 minuti möödumisel lisati reaktsioonisegule 0.5 ml DCM-i (muutes nii segu polaarsust ja soodustades ainete segunemist). Süstal ühendati vaakumiga ning reaktsioonisegu eemaldati tahkelt kandjalt. Kasutatud reagentide liia kõrvaldamiseks pesti kandjat neli korda DMF-ga. Fmoc-blokeeringu eemaldamiseks töödeldi kandjat kaks korda (a' 5 min) 20 %-lise piperidiini lahusega DMF-s (a' ca 3 ml). Vastava reagenti liig kõrvaldati kandjalt neljakordse pesemise käigus DMF-ga. Toodud eeskirja kohaselt lisati kõik viis järgnevat aminohapet. Pärast viimase Fmoc-blokeerimisrühma eemaldamist ja kandja pesemist DMF-ga töödeldi produkti DCM-ga ning jäeti see ööpäevaks eksikaatorisse kuivama.

Kuna kõikide vastavate peptiidide sünteesimisel lähtuti sarnasest hulgast tahkel kandjal olevast tetrameerist, võib sünteesis kasutatud aminohappederivaatide kogused tuua alljärgnevalt:

AINE	M _K (g/mol)	MMOOLE	MASS (mg)
Arg(Pmc)-Ala-Lys(Boc)-Ala-tahkel kandjal	2086	0.04	83.4
	(keskmine M _K)		
Fmoc-Z-OH	M	0.16	0.16 * M
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383.4	0.16	61.3
Fmoc-Pro-OH	337.4	0.16	54.0
Fmoc-Arg(Pmc)-OH	662.8	0.16	106.0
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.6	0.16	75.0

kus Fmoc-Z-OH on sõltuvalt peptiidist:

Fmoc-Ala-OH	311.4 g/mol	0.16 mmooli	49.8 mg
Fmoc-Arg(Pmc)-OH	662.8	0.16	106.0
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596.7	0.16	95.5
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	411.4	0.16	65.8
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610.7	0.16	97.7
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	425.4	0.16	68.1
Fmoc-Gly-OH	297.3	0.16	47.6
Fmoc-His(Trt)-OH	619.7	0.16	99.2
Fmoc-Ile-OH	353.4	0.16	56.5
Fmoc-Leu-OH	353.4	0.16	56.5
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.6	0.16	75.0
Fmoc-Phe-OH	387.4	0.16	62.0
Fmoc-Pro-OH	337.4	0.16	54.0 või
Fmoc-Val-OH	339.4	0.16	54.3.

Ühe aminohappe (0.16 mmooli) lisamiseks vajati:

HBTU	379.3 g/mol	0.16 mmooli	60.7 mg
HOBt	153.1	0.16	24.5
DMF	0.32 ml		
2 M DIEA lahus NMP-s	0.16 ml		
DCM	0.5 ml.		

3. Kõrvalahelate blokeerimiseks kasutatud gruppide eemaldamiseks ja peptiidi lahutamiseks tahkelt kandjalt töödeldi süstaldes olevaid produkte vastava seguga (fenool/EDT/tioanisool/destilleeritud vesi/TFA = 0.8/0.25/0.5/0.5/10.0, ruumalasuhted) Ala-, Gln-, Glu-, Gly-, Ile-, Leu-, Lys- ja Val-peptiidi korral vastavalt 1.5 tunni vältel ning Arg-, Asn-, Asp-, His-, Phe- ja Pro-peptiidi korral 3.5 tunni vältel. Saadud segud sadestati 0⁰C-ni jahutatud dietüüleetrisesse, sadenenud peptiidid tsentrifuugiti, tsentrifugaadid dekanteeriti ning peptiide pesti analoogselt (sadet tsentrifuugides ja lahust dekanteerides) neli korda eetriga. Produktid jäeti ööpäevaks eksikaatorisse kuivama.

4. Toorprodukte uuriti mass-spektromeetriliselt, lahustades ca 1 mg uuritavat ainet 50 µl-s TFA 0.1 %-lises vesilahuses, deponeerides 5 µl saadud lahust spetsiaalsele nitrotselluloosmaatriksile ning lisades aine adsorptsiooni soodustamiseks 5 µl etanooli. Proov kuivatati lämmastikuvoorus ja viidi spektromeetrisse. Arg-, Asn-, Asp-, His-, Phe- ja Pro-peptiidide korral konstateeriti produktide ühesust, kuna ülejäänud peptiidide korral tõdeti lisaks põhiproductile veel blokeerimata Arg-ga peptiidide olemasolu. Viimase põhjuseks oli vastavate peptiidide korral kasutatud liiga lühike peptiidi kandjalt mahavõtmise ja kõrvalrühmade deblokeerimise aeg.

5. Ala-, Gln-, Glu-, Gly-, Ile-, Leu-, Lys- ja Val-peptiide puhastati RP-HPLC-ga. 15-20 mg toorprodukti lahustati 7.5 ml-s 0.1 %-lises TFA vesilahuses, saadud lahused filtreeriti läbi steriilse tselluloosatsetaadist filtri ja süstiti kromatograafi. Mass-spektromeetriliselt puhastele peptiididele vastavad fraktsioonid koguti ja lüofiliseeriti, külmutades vedelikku süsihappejääga allajahutatud etanoolis täieliku tardumiseni ning asetades vastavad proovid seejärel koheselt lüofilisaatorisse.

6. Kõikide lõpp-produktide puhtuses veenduti kvalitatiivselt mass-spektromeetriliselt (kasutades Cf^{252} -PDMS-i) ja kvantitatiivselt aminohappeanalüüsi abil.

Aminohappeanalüüsid lasti teha Uppsala Biomeditsiinikeskuse Biokeemia osakonnas.

1, 2- Dioleiin	Sigma
L- α -Fosfatidüül- α -seriin	Sigma
Ditjotreitool, DTT	Sigma
γ -[^{32}P] ATP	Amersham
Etileendiamiintetraetaanhape, EDTA	Kõrgeima
TRIS-HCl puhver	kommertselt
Kaltsiumatsetaat, $(CH_3COO)_2Ca$	saadaoleva
Magneesiumkloriid, $MgCl_2$	pulitusastmega
Fosforhape, H_3PO_4	

Proteiinkinaas C (PKC) oli puhastatud sea põrnast Parkeri-et al [103] meetodil. Ensüüm koosnes põhiliselt β -isoensüümist ja sisaldas α -isoensüümi jääke ning omas spetsiifilist aktiivsust 80 ühikut/mg (kus 1 ühik on defineeritud kui ensüümi kogus, mis katalüüsib 1 nmol fosfaatrühiga ülekannet ATP-lt histoon H1-le ühe minuti jooksul).

Fosfocelluloospaber P81 pärines Whatmanilt.

2. 2. FOSFORÜLEERIMISREAKTSIOONI KINEETIKA

2. 2. 1. KASUTATUD REAKTIIVID

1, 2- Dioleiin	Sigma
L- α -Fosfatidüül- α -seriin	Sigma
Ditiotreitool, DTT	Sigma
γ -[32 P] ATP	Amersham
Etüleendiamiintetraetaanhape, EDTA	Kõrgeima
TRIS-HCl puhver	kommertselt
Kaltsiumatsetaat, (CH ₃ COO) ₂ Ca	saadaoleva
Magneesiumkloriid, MgCl ₂	puhtusastmega
Fosforhape, H ₃ PO ₄	

Proteiinkinaas C (PKC) oli puhastatud sea põrnast Parkeri et al [103] meetodil. Ensüüm koosnes põhiliselt β -isoensüümist ja sisaldas α -isoensüümi jääke ning omas spetsiifilist aktiivsust 80 ühikut/mg (kus 1 ühik on defineeritud kui ensüümi kogus, mis katalüüsib 1 nmol fosfaatrühma ülekannet ATP-lt histoon H1-le ühe minuti jooksul).

Fosfotselluloospaber P81 pärines Whatmanilt.

2. 2. 2. FOSFORÜLEERIMISREAKTSIOONI KINEETIKA MÕÕTMISE METOODIKA

Proteiinkinaas C poolt katalüüsitud fosforülatatsioonireaktsioon sünteetiliste peptiididega viidi läbi 25 °C juures järgmise koostisega reaktsioonisegus:

- 1) 115 µl peptiidsubstraadi lahust 50 mM TRIS-HCl puhvril (pH 7.5);
- 2) 30 µl 150 mM TRIS-HCl puhvrit (pH 7.5) 5 mM kaltsiumatsetaadiga;
- 3) 30 µl 20 mM TRIS-HCl puhvrit (pH 7.5), mis sisaldas 450 µg/ml fosfatidüülseriini ja 8 µg/ml dioleiini;
- 4) 20 µl proteiinkinaas C lahust 20 mM TRIS-HCl puhvril (pH 7.5) 2 mM EDTA-ga ja 0.5 mM ditiotreitoliga;
- 5) 30 µl 0.75 mM [³²P]ATP-d 37.5 mM MgCl₂ lahuses. Vastava radioaktiivse ATP eriaktiivsus oli 100 cpm/pmol.

Peptiidsubstraatide fosforüleerimiseks lisati reaktsioonisegule radioaktiivse ATP lahust ja reaktsiooni kineetika mõõtmiseks võeti reaktsioonisegust sobivate ajavahemike järel 30 µl suuruseid alikvoote, kandes need 2 × 2 cm suurustele fosfotselluloospaberitele. Vastavad paberid viidi reaktsiooni peatamiseks koheselt jääkülma 75 mM fosforhappelahusesse ja pesti lisaks neli korda sama happega (a' ca 10 min). Fosfotselluloospabereid kuivatati 80 °C juures ja paberite Tsherenkovi radiatsiooni mõõdeti Beckmann LS-7500 stsintillatsioonloenduril.

2. 2. 3. ANDMETE TÖÖTLUS

Proteiinkinaas C poolt katalüüsitavaid reaktsioone jälgiti 10- 15 minuti jooksul, võttes iga 1-3 minuti möödudes reaktsioonisegust alikvoote. Mõõtmised

teostati erinevatel substraadi kontsentratsioonidel ning fosforülatsioonireaktsioonide algkiirused arvutati graafikutelt teljestikus cpm vs aeg. Algkiiruste sõltuvus peptiidsubstraadi kontsentratsioonist oli hüperboolne ja kirjeldatav Michaelis - Menteni võrrandi abil:

$$v = \frac{K_m * [S]}{K_m + [S]}$$

Analüüsid teostati programmpaketi Enzfitter abil (Elsevier). Kasutades mittelineaarset vähimruutude meetodit, leiti Michaelis- Menteni võrrandi parameetrid (V ja K_m) ja arvutati reaktsioonide teist järku kiiruskonstandid k_{II} ($= V / K_m$).

Uuritavate molekulide ehitamiseks kasutati programmpaketti PC Model (Windows'i versioon 1.0). Sama programmi abil, kasutades MMX-meetodit, viidi läbi ka peptiidmolekulide celnev molekulaarmehaaniline optimeerimine. Seejuures analüüsiti läbi peptiidsidemete kõik võimalikud *cis*- ja *trans*-kombinatsioonid ning leiti madalaima energiaminimumuga konformatsioon. Viimase geometria optimeeriti kvantkeemiliselt programmpaketi MOPAC (versioon 6.0) abil, rakendades AM1 hamiltoniaani. Energia minimeerimise lõpetamise kriteeriumiks loeti gradiendiväärtust GRAD 0.01 kcal/mol.

Kõikide uuritavate molekulide jaoks saadi standardsed väljundfailid. Molekulide geometria iseloomustamiseks leiti aatomite vaheliste kauguste maatriksilt peptiidahela kõigi α -süsinikuaatomite vahelised distantsid.

Lisaks geometria iseloomustamisele kirjeldati peptiide ka energeetilisest aspektist lähtuvalt. Seejuures defineeriti peptiidi konformatsiooni kirjeldamiseks uus parameeter — "konformatsiooniline pingenergia". Antud suurus vastab energiale,

2. 3. KVANTKEEMILISED ARVUTUSED

Aminohappe muutuse võimalikku mõju peptiidahela konformatsioonile uuriti peptiidide kvantkeemilise modelleerimise teel, lähtudes regulaarse α -helikaalse struktuuriga L-alaniini heptameerist (Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala) [84]. Vastav mudelkäsitlus viidi läbi gaasifaasis. Erinevaid looduslikke aminohappeid (X) varieeriti ahela teises positsioonis peptiidi aminootsast arvestades (Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala). Valitud tingimused võimaldasid vältida nii aminohapete kõrvalahelate laeng-laeng- interaktsioonidest kui ka solvendi toimest põhjustatud lisamõjusid ja käsitleda erinevate aminohapete rolli peptiidahela konformatsiooni muutmisel. Proliini mõju uurimiseks varieeriti vastavat aminohapet lisaks teisele positsioonile ka neljandas, imiteerimaks sünteetilistes substraatides esinevat fragmenti -Pro-Ser-Pro-.

Uuritavate molekulide ehitamiseks kasutati programmpaketti *PC Model* (Windows'i versioon 1.0). Sama programmi abil, kasutades MMX-meetodit, viidi läbi ka peptiidmolekulide eelnev molekulaarmehaaniline optimeerimine. Seejuures analüüsiti läbi peptiidsidemete kõikvõimalikud *cis*- ja *trans*-kombinatsioonid ning leiti madalaima energiamiinimumiga konformatsioon. Viimase geomeetria optimeeriti kvantkeemiliselt programmpaketi *MOPAC* (versioon 6.0) abil, rakendades AM1 hamiltoniaani. Energia minimeerimise lõpetamise kriteeriumiks loeti gradiendiväärtust GRAD 0.01 kcal/mol.

Kõikide uuritavate molekulide jaoks saadi standardsed väljundfailid. Molekulide geomeetria iseloomustamiseks leiti aatomite vaheliste kauguste maatriksilt peptiidahela kõigi α -süsinikuaatomite vahelised distantid.

Lisaks geomeetria iseloomustamisele kirjeldati peptiide ka energeetilisest aspektist lähtuvalt. Seejuures defineeriti peptiidi konformatsiooni kirjeldamiseks uus parameeter — "*konformatsiooniline pingeenergia*". Antud suurus vastab energiale,

mis on vajalik heptaalaniini struktuuri viimiseks peptiidi Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala põhiahela konformatsioonile vastavasse ruumilisse struktuuri. Vastava arvutuse teostamiseks asendati geomeetriselt optimeeritud peptiidahela aminohappe X kõrvalahel heptaalaniinile sarnaselt metüülrühmaga, kuid seejuures jäeti algse molekuli põhiahela Cartesiuse koordinaadid, aatomite vahelised nurgad ja dihedraalsed nurgad muutumatuks. Kõrvalahelate liikumist sellise arvutuse teostamisel ei piiratud. Vastavad pingestatud põhiahelaga struktuurid reoptimeeriti *MOPAC* programmiga eelpooltoodud tingimusi rakendades. Kuna metüülrühm on teiste looduslike aminohapete kõrvalahelatest ruumiliselt väiksem (*excl.* glütsiin), siis pingestatud peptiidstruktuuride arvutused koondusid. Lõpliku tulemuse saamiseks leiti vastavate pingestatud struktuuride (ΔH_{ping}) ja geomeetriselt optimeeritud heptaalaniini molekuli (ΔH_{ala}) tekkeentalpiaate vahe, mille alusel defineeriti suurus konformatsiooniline pingenergia ($\Delta\Delta H$):

$$\Delta\Delta H = \Delta H_{\text{ping}} - \Delta H_{\text{ala}}$$

PEPTIIDSUBSTRAAT Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala X	SUNTEESI SAAGIS %	DEBLOKEE- RIMIS- JA KANDJALT LAHUTA- MISPROT- SESSI SAAGIS %	KROMATO- GRAAFILISE PUHASTA- MISE SAAGIS %
Ala	92.6	128.5*	57.3
Arg	92.1	98.6	
Asu	71.2	89.1	
Asp	92.3	96.1	
Glu	92.5	112.7*	54.8
Gln	89.3	119.9*	42.3

3. TULEMUSED

3. 1. PEPTIIDSUBSTRAADID

Antud töös sünteesiti Merrifieldi tahke kandja meetodil 14 erinevat peptiidi, kusjuures sünteesi lõpp-produktide ühesuses veenduti kvalitatiivselt mass-spektromeetriliselt ning kvantitatiivselt aminohappeanalüüsi teel. Siinjuures on arvuliste näitajatenä ära toodud kandja küljes paiknevate blokeeritud peptiidahelate sünteesimise saagised, kõrvalahelate deblokeerimis- ja peptiidide kandjalt lahutamisprotsesside saagised ning kromatograafiliste puhastamiste saagised (juhul kui puhastamist läbi viidi).

PEPTIIDSUBSTRAAT Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala X:	SÜNTEESI SAAGIS %	DEBLOKEE- RIMIS- JA KANDJALT LAHUTA- MISPROT- SESSI SAAGIS %	KROMATO- GRAAFILISE PUHASTA- MISE SAAGIS %
Ala	92.6	128.5*	57.3
Arg	92.1	98.6	
Asn	71.2	89.1	
Asp	92.5	96.1	
Gln	92.5	112.7*	54.8
Glu	90.3	119.9*	42.3

Gly	92.5	135.1*	72.0
His	94.2	95.2	
Ile	95.6	120.7*	67.9
Leu	89.4	133.8*	59.0
Lys	94.1	130.9*	49.8
Phe	93.8	94.1	
Pro	94.5	97.0	
Val	92.1	135.4*	63.0

vastavalt Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro või Val)

* 100 %-st suurema reaktsioonisaagise põhjustas kõrvalahelate mittetäielik deablokeerimine ja seega kaitstud kõrvalahela(te)ga (suurema massiga) peptiidide olemasolu soovitud produktis, mistõttu vastavad ained vajasisid kromatograafilist puhastamist.

Tabel 2. Kineetilised parameetrid proteiinkinaas C reaktsioonil peptiidsubstraatidega Lys-Arg-Pro-Ser-X-Gln-Arg-Ala-Lys-Ala

X	$10^7 V$ (mol/min mg)	K_m (μM)	$10^5 k_d$ (liter/min mg)
Ala	0.89 ± 0.1	24 ± 74	2.7
Arg	2.6 ± 0.2	22 ± 6	117
Asn	1.2 ± 0.2	312 ± 58	3.7
Asp	0.28 ± 0.06	1106 ± 408	0.26
Gln	1.3 ± 0.1	59 ± 10	21
Glu	0.53 ± 0.09	896 ± 110	0.59
Gly	0.35 ± 0.01	161 ± 8	2.2

3. 2. PEPTIIDSUBSTRAATIDE

FOSFORÜLEERIMISREAKTSIOONIDE KINEETILISED PARAMEETRID

Antud töös uuriti müeliini aluselise valgu järjestusel põhineva 12 erineva peptiidsubstraadi **Lys- Arg- Pro- Ser- X- Arg- Ala- Lys- Ala** (kus X tähistab vastavalt Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro või Val) fosforülatsioonireaktsioonide kineetikat. Kõik reaktsioonid allusid Michaelis-Menteni võrrandile ja seega oli võimalik antud substraatide jaoks määrata kineetilisi parameetreid V (maksimaalne kiirus) ja K_m (Michaelis-Menteni konstant, substraadi kontsentratsioon, mille korral $v = V / 2$). Vastavad parameetrid on esitatud tabelis 2, samas on toodud ka teist järku kiiruskonstandid k_{II} , mis on leitud V ja K_m suhtena.

Tabel 2. Kineetilised parameetrid proteiinkinaas C reaktsioonil peptiidsubstraatidega Lys-Arg-Pro-Ser-X-Gln-Arg-Ala-Lys-Ala

X	$10^7 V$ (mol/min mg)	K_m (μM)	$10^4 k_{II}$ (liter/min mg)
Ala	0.89 ± 0.1	324 ± 74	2.7
Arg	2.6 ± 0.2	22 ± 6	117
Asn	1.2 ± 0.2	312 ± 58	3.7
Asp	0.28 ± 0.06	1106 ± 408	0.26
Gln	1.3 ± 0.1	59 ± 10	21
Glu	0.53 ± 0.09	896 ± 110	0.59
Gly	0.35 ± 0.01	161 ± 8	2.2

His	1.6 ± 0.1	60 ± 15	24
Ile	0.91 ± 0.08	20 ± 5	46
Leu	0.86 ± 0.06	16 ± 3	54
Lys	2.6 ± 0.2	18 ± 4	146
Phe	0.96 ± 0.05	20 ± 4	47
Pro	määramata	määramata	määramata
Val	1.2 ± 0.1	18 ± 3	66

Nagu tabelis 2 esitatud andmetest selgub, oli kõigi uuritud substraatide korral võimalik analüüsida fosforüleerimisreaktsioonide kineetikat, kusjuures erandiks osutus peptiid, milles seriini kõrval positsioonis X oli Pro. Viimasel juhul oli reaktsioon väga aeglane ja seega ei olnud antud tingimustes võimalik reaktsiooni kineetilisi parameetreid määrata. Toodud fenomeni võib seletada vastava peptiidi sekundaarse struktuuri kardinaalse erinevusega, millele püütakse põhjust leida peatükis 3.3.

Tabelis 2 on näha, et aminohapete varieerimine seriinile järgnevas positsioonis muudab peamiselt vaid K_m väärtusi; erinevused maksimaalse kiiruse V korral on märgatavalt väiksemad. Maksimaalne kiirus V muutus uuritud seeria lõikes vähem kui kümme korda, kusjuures katioonsete aminohapete (Arg, Lys) varieerimisel positsioonis X oli V suurem kui mitteioonsete aminohapete (Ala, Asn, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Phe, Val) korral ja anioonsete aminohapetega (Asp, Glu) peptiidide fosforüleerimisreaktsioonide maksimaalsed kiirused osutusid väikseimateks. Erandiks oli seejuures peptiid, kus asendis X oli Gly, kuna maksimaalne fosforüleerimiskiirus oli sel juhul ca 3-4 korda väiksem kui teiste mitteioonsete aminohapetega peptiidjärjestuste vastav parameeter.

Samal ajal muutus K_m antud seeria lõikes ca 70 korda, olles märgatavalt suurem peptiidide korral, kus positsioonis X paiknes anioonne aminohape.

Spetsiifilisuse seisukohalt on selge, et seriinile järgnevas positsioonis katioonse aminohappe esinemine suurendab substraatide reaktsioonikiirust V , parameeter K_m on seejuures lähedaste väärtustega katioonsete ja mitteioonsete aminohapete korral (Gln, His, Ile, Leu, Phe, Val). Samas on näha, et anioonsete aminohapetega peptiidide fosforüleerimisreaktsioonide maksimaalne kiirus on väiksem ja K_m samas tunduvalt suurem kui teistel peptiididel, mis näitab selgelt, et substraatspetsiifilisuse seisukohalt lähtudes on anioonse aminohappe esinemine seriinile järgnevas positsioonis ebasoodne.

Sarnase analüüsi võib teha, kasutades teist järku kiiruskonstante k_{II} , millised on leitud V ja K_m väärtuste suhtena (Tabel 2). On selgelt näha, et Asp- ja Glu-peptiidide korral on vastav parameeter tunduvalt väiksem kui teistel järjestustel. Samas on ilmne, et sobivaimad aminohapped selle positsiooni jaoks oleksid Lys ja Arg (k_{II} vastavalt 146 ja 117 liitrit /min*mg). Mitmete peptiidide korral, kus varieeritud positsioonis oli hüdrofoobne aminohape (nagu Val, Leu, Phe ja Ile), oli k_{II} suurem kui neutraalsete hüdrofiilsete aminohapetega (Gln, Asn) peptiidide korral. See näitab ka hüdrofoobsete aminohapete sobivust antud positsiooni jaoks.

Saadud andmed kinnitavad ühelt poolt proteiinkinaas C tolerantsust substraadi struktuuri iseärasuste suhtes, samas aga näitavad teiselt poolt katioonse aminohappe (Lys või Arg) paiknemise teatud eelistust antud positsioonis.

3. 3. LOKAALSETE MUTATSIOONIDE MÕJU KVANTKEEMILINE MODELLEERIMINE PEPTIIDAHELA KONFORMATSIOONILE

Proteiinkinaas-substraatreaktsiooni spetsiifika sõltub mitmetest faktoritest. Palju on käsitletud laengulisi interaktsioone kinaasi aktiivtsentri ja substraatmolekuli vahel ning ilmne on selliste interaktsioonide osa nii substraadi sidumises kui ka katalüüsis. Tunduvalt vähem on käsitletud substraatmolekuli võimalike ruumiliste konformatsioonide mõju ensüümatalüütilise reaktsiooni kineetikale. Siiski esineb kirjanduses mitmeid viiteid, kus osutatakse sünteetiliste peptiidide sekundaarse struktuuri võimalikule mõjule nii substraadi sidumise kui ka ensüümreaktsiooni katalüütilistes staadiumides. On selge, et erineva aminohappelise koostisega peptiidahelate sekundaarsed struktuurid võivad erineda ning mõjutada fosforüleeritavate hüdroksüülrühmade kättesaadavust. See viitab peptiidmolekuli ruumilise struktuuri ja tema bioloogilise aktiivsuse vahelisele võimalikule seosele.

Kuivõrd antud töö eksperimentaalne osa seisnes ühe varieeruva aminohappega peptiidide sünteesimises ja vastavate ühendite aktiivsuse mõõtmises reaktsioonil proteiinkinaas C-ga, siis modelleerimaks lokaalsete mutatsioonide mõju peptiidahela ruumilisele struktuurile lähtuti käesolevas töös L-alaniini heptameeri kui regulaarse α -helikaalse struktuuriga mudelpeptiidi molekulist gaasifaasis. Vastava ahela ühes kindlas positsioonis varieeriti kõikki looduslikke aminohappeid (Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala; X — looduslik aminohape). Kvantkeemilise optimeerimise tulemusena saadud molekulide lõppgeomeetriaid analüüsiti, lähtudes peptiidi põhiahela kõigi α -süsinikuaatomite vahelistest kaugustest.

Vastavad võimalikud kauguste kombinatsioonid on toodud tabelis 3, kus α -süsinikuaatomite nummerdamist on alustatud peptiidi aminootsast, nagu näidatud joonisel 6.

X:	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His
C1C2	3.867	3.858	3.863	3.868	3.871	3.860	3.868
①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	
NH ₂ -CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH-COOH							
C1C3	11.47	10.73	8.83	8.74	8.424	8.84	11.450
CH ₃	Y	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
C1C7	17.223	16.017	12.312	12.166	11.904	12.317	17.205
C2C3	3.855	3.889	3.881	3.879	3.870	3.867	3.854
C2C4	5.719	5.660	5.467	5.490	5.502	5.368	5.757
Joonis 6. α -süsinikuaatomite nummerdamine peptiidi Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala geomeetria analüüsimiseks (Y — aminohappe X kõrvalahel)							
C2C6	11.454	11.433	10.758	10.825	10.839	10.586	11.480
C2C7	14.454	14.433	10.758	10.825	10.839	10.586	14.497
C3C4	3.856	3.855	3.874	3.876	3.877	3.872	3.855
C3C5	5.725	5.745	5.419	5.414	5.402	5.369	5.734
Lisaks on tabelis 3 esitatud peptiidi Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Ala-Ala geomeetria optimeerimisel saadud molekuli α -süsinikuaatomite vahelised kaugused.							
C3C6	11.481	11.503	10.791	10.827	10.820	10.511	11.480
C3C7	14.481	14.433	10.758	10.825	10.839	10.586	14.497
C4C5	3.856	3.855	3.874	3.876	3.877	3.872	3.855
C4C6	5.723	5.714	5.404	5.394	5.377	5.393	5.724
C4C7	8.926	8.927	5.875	5.928	5.965	5.765	8.931
C5C6	3.856	3.855	3.878	3.878	3.879	3.878	3.856
C5C7	5.759	5.764	5.697	5.699	5.699	5.681	5.760
C6C7	3.851	3.851	3.883	3.883	3.884	3.882	3.851
ΔH							
(kcal/mol)	-353.19	-341.21	-433.18	-443.31	-317.76	-342.68	-298.37
ΔH_{pept}	-353.19	-350.36	-346.73	-346.84	-346.56	-346.41	-353.12
$\Delta\Delta H$	0.00	2.83	6.46	6.35	6.63	6.78	0.07

Tabel 3. α -süsinikuaatomite vahelised kaugused Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala peptiidi molekulis (X — looduslik aminohape) (Å)

X:	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His
C1C2	3.867	3.858	3.863	3.868	3.871	3.860	3.868
C1C3	5.749	6.029	5.677	5.664	5.788	5.655	5.717
C1C4	8.934	7.350	6.465	6.269	5.948	6.572	8.934
C1C5	11.471	10.724	8.838	8.744	8.424	8.849	11.450
C1C6	14.462	12.565	11.039	10.885	10.659	11.118	14.461
C1C7	17.223	16.017	12.312	12.166	11.904	12.317	17.205
C2C3	3.855	3.889	3.881	3.879	3.870	3.867	3.854
C2C4	5.719	5.660	5.467	5.490	5.502	5.368	5.757
C2C5	8.898	8.888	6.152	6.254	6.309	5.956	8.940
C2C6	11.440	11.374	8.548	8.549	8.484	8.511	11.480
C2C7	14.454	14.433	10.758	10.825	10.839	10.586	14.497
C3C4	3.856	3.855	3.874	3.876	3.877	3.872	3.855
C3C5	5.725	5.745	5.419	5.414	5.402	5.369	5.734
C3C6	8.901	8.891	5.992	5.896	5.766	6.067	8.922
C3C7	11.481	11.503	8.218	8.191	8.127	8.220	11.491
C4C5	3.856	3.856	3.876	3.874	3.872	3.878	3.856
C4C6	5.723	5.714	5.404	5.394	5.377	5.393	5.724
C4C7	8.926	8.927	5.875	5.928	5.965	5.765	8.931
C5C6	3.856	3.855	3.878	3.878	3.879	3.878	3.856
C5C7	5.759	5.764	5.697	5.699	5.699	5.681	5.760
C6C7	3.851	3.851	3.883	3.883	3.884	3.882	3.851
ΔH (kcal/ mol)	-353.19	-341.21	-433.18	-443.31	-317.76	-342.68	-298.37
ΔH_{ping}	-353.19	-350.36	-346.73	-346.84	-346.56	-346.41	-353.12
$\Delta\Delta H$	0.00	2.83	6.46	6.35	6.63	6.78	0.07

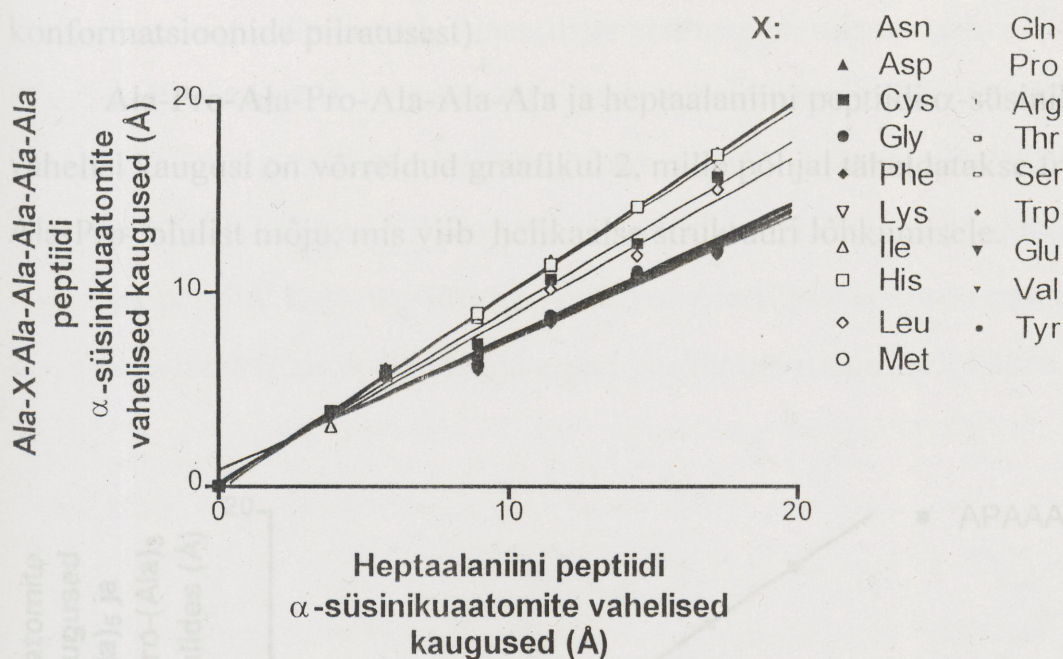
Tabeli 3 järg

X:	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln
C1C2	3.055	3.869	3.883	3.868	3.865	3.898	3.868
C1C3	6.106	5.723	5.811	5.697	5.789	5.793	5.677
C1C4	8.740	6.130	6.721	6.218	8.904	8.920	6.250
C1C5	11.643	8.590	10.157	8.657	11.507	11.511	8.653
C1C6	14.432	10.780	11.892	10.821	14.520	14.445	10.820
C1C7	17.320	12.059	15.378	12.159	16.568	17.259	12.214
C2C3	3.864	3.875	3.869	3.876	3.855	3.852	3.878
C2C4	5.752	5.497	5.749	5.505	5.642	5.718	5.501
C2C5	8.939	6.257	8.922	6.240	8.806	8.895	6.191
C2C6	11.471	8.494	11.471	8.474	11.383	11.441	8.432
C2C7	14.505	10.820	14.483	10.825	13.107	14.452	10.812
C3C4	3.856	3.876	3.856	3.876	3.858	3.856	3.875
C3C5	5.721	5.413	5.719	5.418	5.740	5.726	5.422
C3C6	8.899	5.832	8.898	5.838	8.946	8.905	5.839
C3C7	11.477	8.161	11.475	8.174	11.243	11.483	8.189
C4C5	3.856	3.873	3.856	3.873	3.856	3.856	3.873
C4C6	5.722	5.384	5.725	5.391	5.755	5.726	5.396
C4C7	8.929	5.947	8.928	5.965	7.971	8.929	5.988
C5C6	3.855	3.878	3.856	3.878	3.853	3.856	3.877
C5C7	5.759	5.699	5.760	5.700	6.275	5.760	5.698
C6C7	3.851	3.883	3.851	3.884	3.885	3.851	3.884
ΔH (kcal/ mol)	-363.20	-362.17	-369.43	-350.30	-387.31	-344.84	-392.31
ΔH_{ping}	-347.54	-346.76	-352.46	-346.80	-348.70	-352.41	-346.81
$\Delta\Delta H$	5.65	6.43	0.73	6.39	4.49	0.78	6.38

Tabeli 3 järg

X:	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	-Pro(2)- Ala- Pro(4)-
C1C2	3.869	3.860	3.867	3.867	3.868	3.867	3.898
C1C3	5.700	5.640	5.707	5.759	5.710	5.679	5.811
C1C4	6.207	6.686	6.247	5.978	6.248	6.449	9.310
C1C5	8.640	8.790	8.677	8.454	8.483	8.834	10.894
C1C6	10.811	11.137	10.854	10.676	10.746	11.024	11.920
C1C7	12.151	12.423	12.175	11.932	12.225	12.284	9.632
C2C3	3.876	3.877	3.873	3.874	3.878	3.878	3.848
C2C4	5.504	5.315	5.520	5.493	5.534	5.460	6.447
C2C5	6.233	5.732	6.259	6.285	6.067	6.151	9.140
C2C6	8.466	8.381	8.499	8.478	8.281	8.546	10.520
C2C7	10.820	10.462	10.834	10.828	10.750	10.749	9.472
C3C4	3.876	3.869	3.876	3.877	3.874	3.874	3.893
C3C5	5.419	5.335	5.427	5.409	5.419	5.406	5.875
C3C6	5.843	6.083	5.863	5.784	5.801	5.975	6.693
C3C7	8.170	8.233	8.176	8.138	8.167	8.203	5.896
C4C5	3.873	3.880	3.873	3.872	3.873	3.876	3.864
C4C6	5.391	5.395	5.393	5.380	5.389	5.397	5.801
C4C7	5.967	5.756	5.951	5.965	5.997	5.865	7.267
C5C6	3.878	3.878	3.878	3.878	3.877	3.878	3.869
C5C7	5.700	5.804	5.700	5.698	5.705	5.696	5.828
C6C7	3.884	3.882	3.883	3.994	3.884	3.883	3.850
ΔH (kcal/ mol)	-325.69	-393.31	-398.55	-356.78	-287.37	-365.21	-334.78
ΔH_{ping}	-346.79	-346.54	-346.75	-346.61	-346.69	-346.82	-349.29
$\Delta\Delta H$	6.40	6.65	6.44	6.58	6.50	6.37	3.90

Lähtudes L-alaniini heptameerist kui regulaarsest α -helikaalsest struktuurist, võib vastavale molekulile iseloomulikke kaugusi aluseks võttes analüüsida peptiidide Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala struktuuralseid kõrvalekaldeid α -heeliksist. Vastavasisulise analüüsi tulemused on toodud graafikul 1.

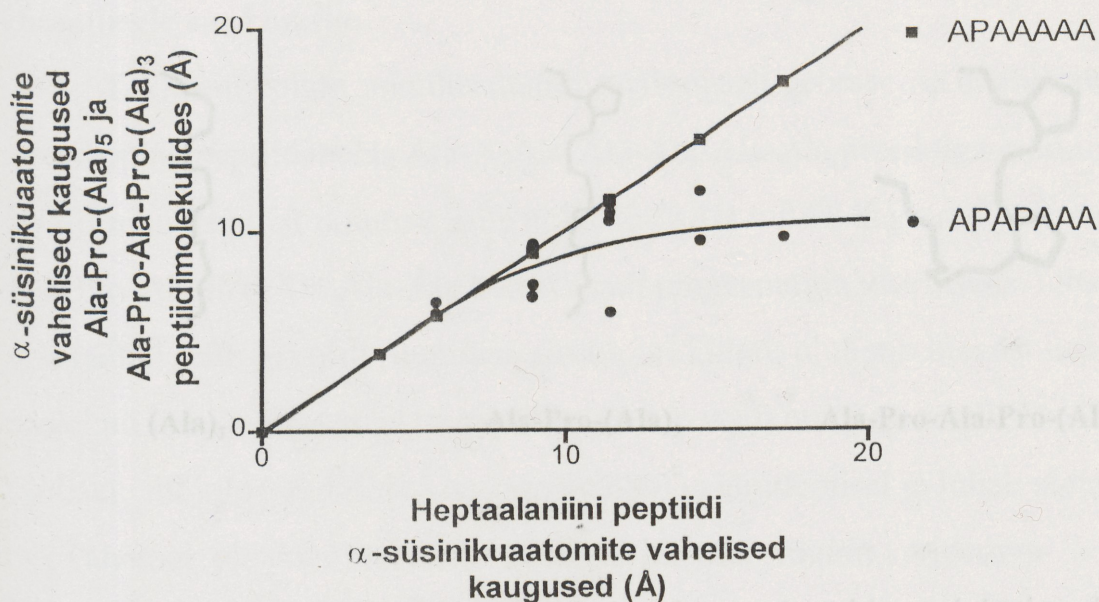


Graafik 1. Heptaalaniini ja Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala peptiidi α -süsinikuaatomite vaheliste kauguste võrdlev analüüs

Graafikult 1 on näha, et peptiidide Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala kõrvalekalde suurus regulaarsest α -heeliksist on asendusrühma X keemilisest loomusest tulenevalt mõnevõrra erinev, kuid mitte ühelgi vaadeldaval juhul ei toimu α -helikaalse struktuuri hävinemist. Seda väidet kinnitavad ka ühele lähedased tõusud vastavatel sirgetel. Graafiku detailsem analüüs näitab, et histidiini, isoleutsiini, aspargiini ja proliini varieerimine aminootsast arvestatuna peptiidi teises positsioonis

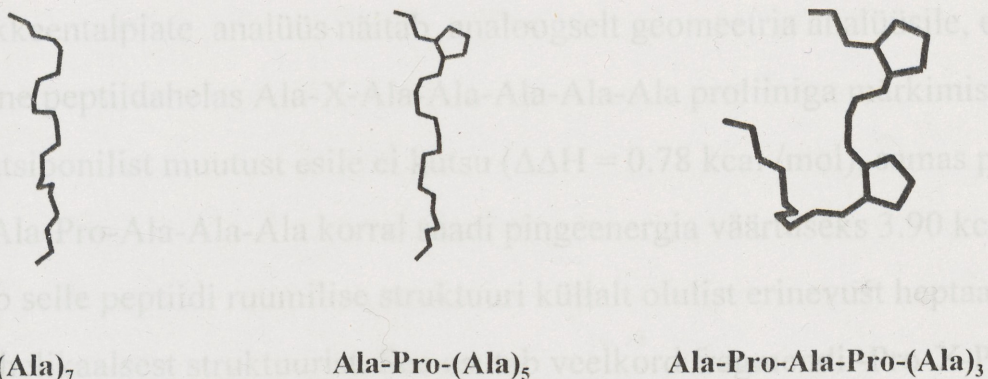
heptaalaniini ruumilisele struktuurile arvestatavat mõju ei avalda. Ahela alguses paikneva proliini korral on ühe rotatsiooninurga olemasolust tingituna tegemist heeliksist stabiliseeriva toimega, nagu seda on näidatud kirjanduses [90]. Märkimisväärsem on kõrvalekalle helikaalsest struktuurist laengut omavate aminohapete (aspargiin- ja glutamiinhape, lüsiin ja arginiin) ning metioniini, trüptofaani, türosiini ja fenüülalaniini sisaldavates peptiidides (põhjustatuna ilmselt vastavate aminohapete kõrvalahelate mahukusest ja seega kõrvalahelate rotameersete konformatsioonide piiratusel).

Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Ala-Ala ja heptaalaniini peptiidi α -süsinikuaatomite vahelisi kaugusi on võrreldud graafikul 2, mille põhjal täheldatakse fragmendi -Pro-Ala-Pro- olulist mõju, mis viib helikaalse struktuuri lõhkumisele.



Graafik 2. Proliini mõju uurimine peptiidahela geomeetriaalsete α -süsinikuaatomite vaheliste kauguste võrdlemise teel

Graafikul 2 toodud andmed näitavad, et fragment -Pro-Ala-Pro- muudab oluliselt peptiidi ruumilist struktuuri ning avaldub α -süsinikuaatomite vaheliste kauguste tunduvas lühenemises vastava molekuli korral. Peptiidahelate optimeeritud geomeetriaga konformatsioone on piltlikult kujutatud joonisel 7. On ilmne, et -Pro-Ala-Pro- fragmenti sisaldavas peptiidis esineb põhiahela tagasipöördumine ning seetõttu on vastava peptiidi ruumiline struktuur oluliselt erinev. Kõrvutades seda teadmist antud töö eksperimentaalses osas uuritud peptiidide fosforüleerimisreaktsioonide kineetiliste andmetega, mis näitasid peptiidi Lys-Arg-Pro-Ser-Pro-Arg-Ala-Lys-Ala väga aeglast reaktsiooni, võib oletada fragmendi -Pro-X-Pro- olulist rolli peptiidide konformatsiooni määratlemisel. Nähtavasti initsieerib sellise fragmendi olemasolu peptiidis ahela tagasipöördumist, mille tagajärjel peptiidi Lys-Arg-Pro-Ser-Pro-Arg-Ala-Lys-Ala korral muutub seriini fosforüleeritava hüdroksüülrühma asend ensüümile ruumiliselt kättesaamatuks.



Joonis 7. Prolüüni sisaldavate peptiidide konformatsioonide projektsioonid

Leitud -Pro-X-Pro- fragmendi olemasolust põhjustatud fenomen võib omada ka üldisemat tähtsust peptiidide sekundaarse struktuuri teoorias, tema olemuse täpsem uurimine jätkub. On oluline mainida, et vastavad kvantkeemilised arvutused

on mudeli lihtsustamiseks tehtud gaasifaasis, jättes solvendi poolt põhjustatud võimalikud mõjud arvestamata.

Lisaks ülaltoodule uuriti peptiide (Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala) ka energeetilisest aspektist lähtudes. Sel eesmärgil määrati antud heptaalaniini seeria peptiidide jaoks konformatsiooniline pingenergia (vt. *eksperimentaalne osa*), mille arvulised väärtused (kcal/mol) on toodud tabelis 3. Konformatsiooniline pingenergia on kompleksne suurus, sisaldades ilmselt aminohapete kõrvalahelate ruumilisest mahukusest ning laeng-laeng interaktsioonidest ja muudest faktoritest tulenevaid mõjusid. Seetõttu on laetud või ruumiliselt mahukama kõrvalahelaga aminohapete korral vastava parameetri väärtused suuremad ning väikeste neutraalsete hüdrofoobsete ja alifaatsete kõrvalahelate korral on antud parameetri väärtused nullilähedased. Sel viisil on käesolevas töös iga aminohappe jaoks defineeritud energeetiline suurus, mis iseloomustab mingi kõrvalahela mõju peptiidi ruumilisele struktuurile.

Tekkeentalpia analüüs näitab analoogselt geomeetria analüüsile, et X asendamine peptiidahelas Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala proliiniga märkimisväärset konformatsioonilist muutust esile ei kutsu ($\Delta\Delta H = 0.78$ kcal/mol), samas peptiidi Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Ala korral saadi pingenergia väärtuseks 3.90 kcal/mol, mis näitab selle peptiidi ruumilise struktuuri küllalt olulist erinevust heptaalaniini molekuli helikaalsest struktuurist. See osutab veelkord fragmendi -Pro-X-Pro- olulisele mõjule peptiidide konformatsiooni määratlemisel ja lubab oletada suuremal või vähemal määral kinnistatud struktuuride teket muidu varieeruva konformatsiooniga lühikeste peptiidahelate korral.

Oluline on selle kvantkeemiliselt kirjeldatud fenomeni seos eksperimendiga. Käesoleva töö eksperimentaalses osas on näidatud, et peptiidi Lys-Arg-Pro-Ser-Pro-Arg-Ala-Lys-Ala fosforüleerimisreaktsioon on niivõrd aeglane, et tema kineetilisi parameetreid määrata võimalik ei olnud. Kvantkeemiliste modelleerimiste tulemustele toetudes on ilmne, et fragment -Pro-Ser-Pro- muudab ahela ruumilise

struktuuri seriini juures küllalt kinnistunuks ja seejuures fosfoaktseptoorse hüdrosüülrühma ensüümile ruumiliselt kättesaamatuks ning välistab sel viisil fosforülatsioonireaktsiooni toimumise võimalikkuse. See viitab seni suhteliselt vähe uuritud seosele peptiidahela ruumilise struktuuri ja tema bioloogilise aktiivsuse vahel ning loob edasised võimalused nii bioaktiivsete ainete sünteesi planeerimiseks kui ka ensüüm-substraatreaktsiooni molekulaarse mehhanismi uurimiseks.

Proteiinkinaaside substraatspetsiifilisust on kirjanduses üsna palju käsitletud ja arvukate eksperimentaalsete andmete baasil on mitmete kinaaside jaoks leida optimaalse substraadi konsensusjärjestused. Nii on proteiinkinaas C jaoks substraatspetsiifilisuse seisukohalt oluline motiiv X-Arg-X-X-Ser-X-Arg-X, kus X tähistab ühte 20-st looduslikast aminohappest. Vastava järjestuse täpsem piiritlemine võimaldaks paremate kineetiliste parameetritega substraatjärjestuste disaini ja pakuks huvi mitmete vastava ensüümi poolt katalüüsivate füsioloogiliste protsesside uurimisel. Sel eesmärgil varieeriti antud töös PKC ühe loodusliku substraadi — müelliini aluselise valguga järjestusel 4-14 põhineva peptiidahela seriinile järgnevas positsioonis erinevaid aminohappeid.

Peptiidahela Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala seriinile järgnevas X-ga tähistatud asendis varieeriti erinevate füsikokeemiliste parameetritega aminohappeid (Ala, Arg, Asa, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro ja Val) ning konstateeriti proteiinkinaas C suurt tolerantsust vastavate substraatjärjestuste suhtes. Sünteesiliste peptiidsubstraatide fosforüleerimisreaktsioonide kineetiliste parameetrite võrdlemisel tehti kindlaks anioonsete aminohapete (Lys ja Arg) eelistus antud asendi jaoks. Samas tõdeti ka katioonsete aminohapete (Val, Leu, Phe ja Ile) sobivust, mis on kooskõlas teadmisega, et antud ensüümi mitmete looduslike substraatide vastavas asendis on võimalik teatud hüdrosüülsete aminohapete olemasolu. Kineetiliste parameetrite võrdlemise tulemusel võib samuti väita, et anioonsete aminohapete (nagu Asp ja

4. ARUTELU

4. 1. PROTEIINKINAAS C SUBSTRAATSPETSIIFILISUS

Proteiinkinaaside substraatspetsiifilisust on kirjanduses üsna palju käsitletud ja arvukate eksperimentaalsete andmete baasil on mitmete kinaaside jaoks teada optimaalse substraadi konsensusjärjestused. Nii on proteiinkinaas C jaoks substraatspetsiifilisuse seisukohalt oluline motiiv **X- Arg- X- X- Ser- X- Arg- X**, kus X tähistab ühte 20-st looduslikust aminohappest. Vastava järjestuse täpsem piiritlemine võimaldaks paremate kineetiliste parameetritega substraadjärjestuste disaini ja pakuks huvi mitmete vastava ensüümi poolt katalüüsivate füsioloogiliste protsesside uurimisel. Sel eesmärgil varieeriti antud töös PKC ühe loodusliku substraadi — müeliini aluselise valgu järjestusel 4-14 põhineva peptiidahela seriinile järgnevas positsioonis erinevaid aminohappeid.

Peptiidahela **Lys-Arg- Pro- Ser- X- Arg- Ala- Lys- Ala** seriinile järgnevas X-ga tähistatud asendis varieeriti erinevate füsikokeemiliste parameetritega aminohappeid (**Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro ja Val**) ning konstateeriti proteiinkinaas C suurt tolerantsust vastavate substraadjärjestuste suhtes. Sünteetiliste peptiidsubstraatide fosforüleerimisreaktsioonide kineetiliste parameetrite võrdlemisel tehti kindlaks katioonsete aminohapete (**Lys ja Arg**) eelistus antud asendi jaoks. Samas tõdeti ka hüdrofoobsete aminohapete (**Val, Leu, Phe ja Ile**) sobivust, mis on kooskõlas teadmisega, et antud ensüümi mitmete looduslike substraatide vastavas asendis on kindlaks tehtud hüdrofoobsete aminohapete olemasolu. Kineetiliste parameetrite analüüsimise tulemusena võib samuti väita, et anioonsete aminohapete (nagu **Asp ja**

Glu) esinemine seriinile järgnevas positsioonis on substraatspetsiifilisuse seisukohalt välistatud.

Huvitav fenomen kaasnes proliini viimisega seriinile järgnevasse asendisse. Sel juhul oli PKC poolt katalüüsitud fosforüleerimisreaktsioon väga aeglane ja kineetiliste parameetrite mõõtmine võimatu. Toodud nähtus seletub ilmselt vastava peptiidahela ruumilise struktuuri oluliste erinevustega. Peptiidide konformatsiooniliste muutuste uurimiseks lokaalsete mutatsioonide tulemusena teostati kvantkeemilised arvutused, võttes mudeliks L-alaniini heptameeri ning varieerides erinevaid looduslikke aminohappeid (X) peptiidi aminootsast arvestatuna teises positsioonis (Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala). Samas leiti ka peptiidi Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Ala-Ala tõenäosim konformatsioon gaasifaasis. Nii eksperimentaalsed kui ka arvutuslikud tulemused viitavad fragmendi -Pro-X-Pro- olulisele rollile peptiidahela konformatsiooni määratlemisel, andes ahelale küllalt pingestatud struktuuri. Nii on peptiidis Lys-Arg-Pro-Ser-Pro-Arg-Ala-Lys-Ala seriini fosforüleeritav hüdroksüülrühm ilmselt peptiidahela ruumilisest paigutusest tingituna ensüümi jaoks kättesaamatu ja reaktsiooni ei toimu. Fragmendi -Pro-X-Pro- roll peptiidis on ilmselt vastava molekuli bioaktiivsuse avaldumist inhibeeriv, kuigi on selge, et selle fenomeni olemus vajab veel edaspidist nii teoreetilist kui ka eksperimentaalset uurimist. Samas on ilmne, et substraatmolekulide kvantkeemiline modelleerimine võimaldab planeerida sünteesi ja teostada eelnevat sünteesitavate ainete selekteerimist.

Seega näitab käesolev töö ühelt poolt proteiinkinaas C küllalt suurt tolerantsust substraatmolekuli struktuuri suhtes, kuivõrd seriinile järgnevas positsioonis on lubatud nii katioonne kui ka hüdrofoobne aminohape. Teiselt poolt ilmneb oluline seos peptiidi ruumilise struktuuri ja bioloogilise aktiivsuse vahel, kusjuures teatud tingimustel määrab see faktor reaktsiooni toimumise võimalikkuse, nagu see ilmnes peptiidahela Lys-Arg-Pro-Ser-Pro-Arg-Ala-Lys-Ala korral.

Seega oleks otstarbekas edaspidises sünteesitavaid substraatjärjestusi eelnevalt modelleerida arvutil. Samas võimaldaks selline eelnev analüüs tõenäoliselt leida ka

huvitavamaid substraatstruktuure ning ette ennustada olulisemaid muutusi peptiidsubstraatide bioloogilise aktiivsuse avaldumise võimalikkuses.

4.2. KVANTITATIIVSED STRUKTUUR-AKTIIVSUS SÕLTUVUSED.

OPTIMAALSE SUBSTRAATJÄRJESTUSE ENNUSTAMINE

Proteiinkinaas C substraatide "äratundmise" molekulaarse mehhanismi süstemaatiliseks uurimiseks analüüsiti peptiidide Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala fosforülatsioonireaktsioonide kineetilisi parameetreid kvantitatiivsete struktuuraktiivsuse sõltuvuste abil. Selleks kasutati fosforüleerimilsreaktsiooni teist järku kiiruskonstante k_n , millised erinevalt maksimaalsest kiirusest V ja Michaelis-Menteni konstandist K_m ei sõltu kiiruse limiteerivast staadiumist.

Struktuur-aktiivsuse sõltuvused iseloomustavad kvantitatiivselt ensüümi spetsiifilisust fosforüleeritava peptiidi erinevates positsioonides paiknevate aminohapete suhtes. Vastavasisulise süstemaatilise analüüsi katse tehti proteiinkinaas A korral Järve ja Ragnarssoni poolt [102]. Käesolevas töös püütakse sarnast analüüsi rakendada ka proteiinkinaas C jaoks peptiidsubstraatide seeria Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala korral, kus varieerub aminohappe struktuur seriinile järgnevas positsioonis.

Struktuur-aktiivsuse sõltuvuses on seni kasutatud parameetreid π ja MR, mis iseloomustavad vastavalt aminohapete kõrvalahelate hüdrofoobsust ja ruumilist mahukust. Antud parameetrite väärtused (esitatuna vastavalt Fauchère, J.-L., ja Piiska, V. (1983) [101] ning Hansch, C. ja Leo, A. (1979) [98] poolt) looduslike aminohapete kõrvalahelate jaoks on esitatud tabelis 4.

Tabel 4. Kvantitatiivse struktuur-aktiivsuse sõltuvuse parameetrite väärtused

aminohappe kõrvalahelat) jaoks [101, 98].

4. 2. KVANTITATIIVSED STRUKTUUR-AKTIIVSUS

SÕLTUVUSED.

OPTIMAALSE SUBSTRAATJÄRJESTUSE ENNUSTAMINE

Proteiinkinaas C substraatide "äratundmise" molekulaarse mehhanismi süstemaatiliseks uurimiseks analüüsiti peptiidide Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala fosforülatsioonireaktsioonide kineetilisi parameetreid kvantitatiivsete struktuur-aktiivsuse sõltuvuste abil. Selleks kasutati fosforüleerimisreaktsiooni teist järku kiiruskonstante k_{11} , millised erinevalt maksimaalsest kiirusest V ja Michaelis-Menteni konstandist K_m ei sõltu kiirust limiteerivast staadiumist.

Struktuur-aktiivsuse sõltuvused iseloomustavad kvantitatiivselt ensüümi spetsiifilisust fosforüleeritava peptiidi erinevates positsioonides paiknevate aminohapete suhtes. Vastavasisulise süstemaatilise analüüsi katse tehti proteiinkinaas A korral Järve ja Ragnarssoni poolt [102]. Käesolevas töös püütakse sarnast analüüsi rakendada ka proteiinkinaas C jaoks peptiidsubstraatide seeria Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala korral, kus varieerub aminohappe struktuur seriinile järgnevas positsioonis.

Struktuur-aktiivsuse sõltuvustes on seni kasutatud parameetreid π ja MR , mis iseloomustavad vastavalt aminohapete kõrvalahelate hüdrofoobsust ja ruumilist mahukust. Antud parameetrite väärtused (esitatuna vastavalt Fauchere, J.-L., ja Pliska, V. (1983) [101] ning Hansch, C. ja Leo, A. (1979) [98] poolt) looduslike aminohapete kõrvalahelate jaoks on esitatud tabelis 4.

Tabel 4. Kvantitatiivse struktuur-aktiivsus sõltuvuse parameetrite väärtused aminohappe kõrvalahelate jaoks [101, 98].

Aminohape	π [101]	MR [98]	Ind
Alaniin	0.31	5.65	0
Arginiin	-1.01	30.05	1
Aspargiin	-0.60	14.46	0
Aspargiinhape	-0.77	11.58	-1
Glutamiin	-0.22	19.11	0
Glutamiinhape	-0.64	16.23	-1
Glütsiin	0	1.03	0
Histidiin	0.13	23.79	0
Isoleutsiin	1.80	19.59	0
Leutsiin	1.70	19.59	0
Lüsiin	-0.99	25.05	1
Metioniin	1.23	23.12	0
Fenüülalaniin	1.79	30.01	0
Proliin	0.72	13.95	0
Seriin	-0.04	11.82	0
Treoniin	0.26	11.82	0
Trüptofaan	2.25	39.81	0
Türosiin	0.96	31.83	0
Valiin	1.22	14.96	0

Tulenevalt polaarsete ja iooniliste rühmade olemasolust vastavate asendajate korral ei esinenud suuruste π ja MR-i vahel mingit märkimisväärset korrelatsiooni (r^2

= 0.0876), mis võimaldas mõlemaid parameetreid kasutada samas

korrelatsioonivõrrandis, milline andis $\log k_{II}$ väärtuste jaoks järgmise sõltuvuse:

$$\log k_{II} = -(4.18 \pm 0.41) + (0.25 \pm 0.17) \pi - (0.07 \pm 0.02) MR \quad (1)$$

$$n = 13, s = 0.635, r = 0.768,$$

kus n tähistab andmete arvu, s on standardhälve ning r korrelatsioonikoefitsent.

Vastavad parameetrid on antud 95 %-lisel usaldusnivool.

Konstantide pK_m jaoks saadud sõltuvus oli halvem ($r = 0.758$, $s = 0.488$) ning intensiivsusefaktorid π ja MR -i jaoks olid vastavalt 0.31 ± 0.13 ja 0.05 ± 0.02 .

Korreleerides $\log V$ väärtusi saadi veelgi halvem korrelatsioon ($r = 0.703$), mis näitab, et enamike peptiidide fosforüleerimisreaktsioonide maksimaalsed kiirused olid üsna sarnased.

Varieerides peptiidis Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala ioonseid aminohappeid (Arg, Lys, Asp või Glu), täheldati korrelatsioonivõrrandist (1) märgatavaid hälbeid. See viitab laenguliste interaktsioonide olulisusele proteiinkinaas C substraadi äratundmisel ja katalüüsis. Kuna peptiidsubstraatide fosforüleerimisreaktsioonide kineetilised parameetrid paranesid tunduvalt katioonse aminohappe esinemisel asendis X ning anioonse aminohappe korral täheldati reaktsioonivõime olulist langust, on loogiline oletada teatud negatiivselt laetud rühmade olemasolu proteiinkinaas C aktiivtsentris fosforüleeritava peptiidsubstraadi läheduses. Vastav negatiivne laeng võib osaliselt kuuluda ka ensüümiga seondunud ATP molekulile.

Kvantitatiivsetes struktuur-aktiivsus sõltuvustes püüti oletatavat laengu efekti arvestada lisaparameetri Ind abil. Esimeses lähenduses hinnati vastava parameetri väärtusi katioonsetel aminohapetel +1-ga, anioonsetel aminohapetel -1 -ga ning mitteioonsete asendajate korral 0-ga, nagu seda on näidatud ka tabelis 4. Sellise paranduse sisseviimisel korrelatsioonivõrrandisse saadi järgmised sõltuvused:

$$\log k_{II} = -(3.60 \pm 0.19) + (0.32 \pm 0.07) \pi - (0.03 \pm 0.01) MR + (1.04 \pm 0.15) Ind \quad (2)$$

$$n = 13, s = 0.271, r = 0.965;$$

$$pK_m = (3.65 \pm 0.17) + (0.35 \pm 0.06) \pi + (0.02 \pm 0.01) MR + (0.74 \pm 0.13) Ind \quad (3)$$

$$n = 13, s = 0.234, r = 0.955.$$

On ilmne, et ioonilise laengu selline arvestamine parandab oluliselt struktuuraktiivsus sõltuvuste kvaliteeti, samas väheneb aga aminohapete kõrvalahelate mahukust iseloomustava suuruse (MR-i) osatähtsus korrelatsioonis. Seega võib arvata, et mitteioonsete aminohapete paiknemisel asendis X toimub vastavate substraatide äratundmine proteiinkinaas C poolt peamiselt vaid hüdrofoobsuse alusel. Tuginedes saadud korrelatsioonidele, püüti vastavaid võrrandeid koostada ilma MR-parameetrit arvesse võtmata. Saadud sõltuvused on esitatavad järgmisel kujul:

$$\log k_{II} = -(2.96 \pm 0.11) + (0.35 \pm 0.11) \pi + (1.30 \pm 0.19) Ind \quad (4)$$

$$n = 13, s = 0.396, r = 0.914;$$

$$pK_m = (4.05 \pm 0.08) + (0.36 \pm 0.08) \pi + (0.90 \pm 0.15) Ind \quad (5)$$

$$n = 13, s = 0.290, r = 0.921.$$

Ilmneb, et see lihtsustus korrelatsioonvõrrandite kvaliteeti ei parandanud, küll aga on selge, et ioonilisust iseloomustava indikaatorparameetri sissetoomisel korrelatsioonide kvaliteet suureneb tunduvalt.

Konstandi $\log V$ jaoks saame laenguefkti arvestamisel järgmise sõltuvuse:

$$\log V = -(7.25 \pm 0.11) - (0.02 \pm 0.04) \pi + (0.013 \pm 0.006) MR + (0.32 \pm 0.08) Ind \quad (6)$$

$$n = 13, s = 0.147, r = 0.898.$$

Siit järeldub, et nii asendajate mahukus kui ka hüdrofoobsus omavad

laenguefektiga võrreldes tunduvalt väiksemat osa ning vastava sõltuvuse võib taandada üheparameetriliseks võrrandiks:

$$\log V = -(7.01 \pm 0.05) + (0.41 \pm 0.09) Ind \quad (7)$$

$$n = 13, s = 0.170, r = 0.825.$$

Eelpool toodud andmete põhjal on selge, et nii nagu proteiinkinaas A [102], nii ka proteiinkinaas C korral saab peptiidsubstraatide fosforülatsioonireaktsioone iseloomustada kvantitatiivsete struktuur-aktiivsus sõltuvuste abil. Kuigi antud töös näidati seda peptiidahela Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala ühe positsiooni korral, võib loota vastava korrelatsiooni esinemist kogu ahela ulatuses.

Leitud sõltuvused võimaldavad teoreetiliselt arvutada peptiidsubstraatide fosforüleerimisreaktsioonide kineetikat iseloomustavaid parameetreid $\log k_{II}$, pK_m ja $\log V$ kõigi võimalike aminohapete varieerimisel peptiidahela Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala positsioonis X. Kasutades leheküljel 79 toodud $\log k_{II}$ jaoks leitud korrelatsioonivõrrandit (2), leiti vastava suuruse teoreetilised väärtused. Saadud tulemused, kõrvutatuna eksperimentaalsete $\log k_{II}$ väärtustega, on esitatud tabelis 5.

Tabel 5. Peptiidsubstraatide Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala proteiinkinaas C poolt katalüüsitavate fosforülatsioonireaktsioonide eksperimentaalsed ja ennustatud kineetilised parameetrid

Aminohape X	log k_{II} , eksperimentaalne	log k_{II} , ennustatud	Jääk
Ala	-3.57	-3.31	-0.26
Arg	-1.93	-1.82	-0.11
Asn	-3.34	-3.28	-0.06
Asp	-4.58	-4.48	-0.10
Gln	-2.68	-3.00	0.32
Glu	-4.16	-4.28	0.12
Gly	-3.66	-3.57	-0.09
His	-2.62	-2.72	0.10
Ile	-2.34	-2.34	0.00
Leu	-2.27	-2.37	0.10
Lys	-1.83	-1.99	0.16
Met	Määramata	-2.40	Määramata
Phe	-2.33	-1.97	-0.36
Pro	Määramata	-2.88	Määramata
Ser	Määramata	-3.20	Määramata
Thr	Määramata	-3.10	Määramata
Trp	Määramata	-1.48	Määramata
Tyr	Määramata	-2.17	Määramata
Val	-2.18	-2.69	0.51

Tabelis 5 esitatud kvantitatiivsete struktuur-aktiivsus sõltuvuste alusel saadud andmed on heas kooskõlas eksperimentaalsete tulemustega. Nagu eksperimendis ilmnes, on efektiivseteks substraatideks peptiidid, kus seriinile järgnevas asendis on katioonsed aminohapped (Lys ja Arg) ning anioonsete aminohapetega (Asp ja Glu) peptiidid omavad väiksemaid $\log k_{II}$ väärtusi kogu reaktsiooniseeria ulatuses. Kõikide ülejäänud substraatide kineetilised parameetrid sõltuvad asendis X olevate aminohapete kõrvalrühmade hüdrofoobsusest.

Paigutades selles peptiidsubstraatide aktiivsuse "tagasiarvutuses" seriinile järgnevasse asendisse proliini, arvutati selle peptiidi jaoks $\log k_{II}$ väärtuseks -2.88, mis oluliselt ei erine teiste vastavate peptiidide parameetritest. Eksperimentaalselt täheldati aga väga aeglast reaktsiooni, mistõttu antud tingimustes oli fosforüleerimisreaktsiooni kineetilisi parameetreid võimatu määrata. Siit ilmneb oluline kõrvalekalle eksperimentaalsete ja ennustuslike tulemuste vahel, mis viitab kvantitatiivsete struktuur-aktiivsus sõltuvuste kasutamise reaalsetele piirangutele. Viimased seostuvad arvatavasti peptiidsubstraadi konformatsiooni olulise muutumisega -Pro-X-Pro- fragmendi sisseviimisel ahelasse, mida lähemalt käsitleti antud töö peatükis 3.3. Proliini sisseviimisel peptiidahela Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala positsiooni X ilmnenuv kõrvalekalle kvantitatiivsete struktuur-aktiivsus sõltuvuste kehtivusest kinnitab omakorda konformatsiooniliste aspektide arvestamise vajalikkust proteiinkinaas C reaktsioonidel sünteetiliste peptiidsubstraatidega. Seega on selge, et antud kinaasi substraatspetsiifika on kompleksne ja selle uurimisel tuleb arvesse võtta mitmeid erinevaid faktoreid.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti proteiinkinaas C substraatspetsiifilisust, kasutades sünteetiliste peptiidide seeriat, milline oli koostatud, lähtudes selle kinaasi ühe loodusliku substraadi — müeliini aluselise valgu järjestusest 4-14. Selles peptiidis varieeriti fosfoaktseptoorsele seriinile järgnevas positsioonis asuvaid aminohappeid.

Saadud tulemused on esitatud alljärgnevalt:

1. Proteiinkinaas C efektiivseteks substraatideks on peptiidid Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala, kus positsioonis X paiknevad katioonsed aminohapped (Lys või Arg). Substraatspetsiifilisuse seisukohalt on takistatud anioonsete aminohapete esinemine vastavas peptiidahela positsioonis. See viitab teatud negatiivsete laengute olemasolule kas proteiinkinaas C enda aktiivtsentris või ensüümi ja ATP kompleksis.
2. Kvantkeemilise arvutuse tulemusena selgus, et fragment -Pro-X-Pro- omab olulist rolli peptiidahela konformatsiooni määramisel, muutes α -süsinikuaatomite vahelised kaugused peptiidis Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Ala-Ala tunduvalt lühemaks, võrreldes seda kvantkeemilistel arvutustel mudeliks valitud heptaalaniini regulaarse α -helikaalse struktuuriga ning pöörates peptiidiahela ruumiliselt tagasi. Vastav fragment pingestab peptiidahela struktuuri.

Sama efekt esineb ilmselt peptiidi Lys-Arg-Pro-Ser-Pro-Arg-Ala-Lys-Ala korral, kus ahela ruumilise orientatsiooni eripärast tingituna oli proteiinkinaas C poolt katalüüsitud fosforülatsioonireaktsioon väga aeglane ja kineetiliste parameetrite leidmine seega võimatu. Nähtavasti on vastava peptiidi konformatsioon fragmendi -Pro-Ser-Pro- poolt pingestatud ning seriini fosforüleeritav hüdroksüülrühm edasise peptiidahela poolt varjestatud.

3. Proteiinkinaas C jaoks oli võimalik koostada kvantitatiivseid struktuur-aktiivsus sõltuvusi ja analüüsida nende abil selle ensüümi substraatspetsiifilisust.

Seega võib käesoleva töö kokkuvõttena väita, et proteiinkinaas C substraatspetsiifilisus on kompleksne ja sõltub mitmetest erinevatest teguritest (laengulised interaktsioonid, aminohapete hüdrofoobsed omadused, peptiidsubstraatide konformatsioonid).

The results obtained are following:

1. The effective substrates of this enzyme seems to be peptides where a cationic amino acid (Arg or Lys) stands in the position following to Ser. It can be assumed that some negative groups seem to be located in the active center of protein kinase C, close to the variable amino acid of the peptide substrates. This negative charge can also be associated with the enzyme-bound ATP molecule.
2. The quantum-chemical modeling of peptides Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala, where X stands for all natural amino acids, and also Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Ala-Ala, indicated that the fragment -Pro-X-Pro- has an essential disturbing effect on the regular α -helical structure. This effect was analyzed by using the distances between all α -carbon atoms, which in the case of peptide Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Ala-Ala were much shorter comparing with the regular α -helical heptalaanine structure, and also on the ground of conformational strain energy values. The results of this analysis revealed that the fragment -Pro-X-Pro- induced constrained peptide conformations and caused the turning back of this peptide backbone.

The same effect seems to appear in the case of the peptide Lys-Arg-Pro-Ser-Pro-Arg-Ala-Lys-Ala. The spatial structure of this peptide seems to be strained seems around the fragment -Pro-Ser-Pro- and the phosphorylatable

SUMMARY

The aim of the present work was to study the substrate specificity of protein kinase C. For this purpose the peptide series **Lys-Arg-Pro-Ser-X-Arg-Ala-Lys-Ala**, where X stands for Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro or Val, was synthesized and the kinetics of their phosphorylation by protein kinase C was studied. The results obtained are following:

1. The effective substrates of this enzyme seems to be peptides where a cationic amino acid (Arg or Lys) stands in the position following to Ser. It can be assumed that some negative groups seem to be located in the active center of protein kinase C, close to the variable amino acid of the peptide substrates. This negative charge can also be associated with the enzyme-bound ATP molecule.
2. The quantum-chemical modeling of peptides Ala-X-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala, where X stands for all natural amino acids, and also Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Ala-Ala, indicated that the fragment -Pro-X-Pro- has an essential disturbing effect on the regular α -helical structure. This effect was analyzed by using the distances between all α -carbon atoms, which in the case of peptide Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Ala-Ala were much shorter comparing with the regular α -helical heptaalanine structure, and also on the ground of conformational strain energy values. The results of this analysis revealed that the fragment -Pro-X-Pro- induced constrained peptide conformations and caused the turning back of this peptide backbone.

The same effect seems to appear in the case of the peptide Lys-Arg-Pro-Ser-Pro-Arg-Ala-Lys-Ala. The spatial structure of this peptide seems to be strained seems around the fragment -Pro-Ser-Pro- and the phosphorylatable

hydroxyl group of serine seems to be spatially covered by the further backbone. It gives the reason for very slow phosphorylation of this peptide by protein kinase C and also shows the crucial role of the fragment -Pro-X-Pro- in the determination of the peptide conformation and its activity.

3. It was possible to create QSAR for the peptide phosphorylation reaction, characterizing the molecular mechanism of recognition of peptide substrates by protein kinase C. In this study the peptide structure was varied in a single position following the phosphorylatable serine. It was established that the parameters π , MR and Ind, yielded a sufficiently good description of the specificity of protein kinase C. The crucial exception to this was the peptide Lys-Arg-Pro-Ser-Pro-Arg-Ala-Lys-Ala, containing the motif -Pro-Ser-Pro- and which phosphorylation reaction by protein kinase C was very slow.
4. Hunter, T. (1987) Protein Kinases. *Methods in Enzymology*, 5, 367-376.
 5. Hunter, T. (1991) Protein Kinase Classification. *Methods in Enzymology*, 200, 3-37.
 6. Traugh, J. A., Ashby, C. D., Walsh, D. A. (1974) Criteria for the Classification of Protein Kinases. *Methods in Enzymology*, 38, 290-299.
 7. Kwon, Y-G, Mendelow, M., Lawrence, D. S (1994) The Active Site Substrate Specificity of Protein Kinase C. *J. of Biol. Chem.*, 269, 4839-4844.
 8. Krebs, E. G., Beavo, J. A. (1979) Phosphorylation-Dephosphorylation of Enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 923-959.
 9. Flockhart, D. A., Corbin, J. D. (1982) Regulatory Mechanism in the Control of Protein Kinases. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 12, 133-186.
 10. Roach, P. J. (1984) Protein Kinases. *Methods in Enzymology*, 107, 81-101.
 11. Kitano, T., Go, M., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1986) Assay and Purification of Protein Kinase C. *Methods in Enzymology*, 124, 349-359.
 12. Chen, S-J, Klami, E., Gower, C., Powell, C. M., Sessoms, J. S., Sweatt, J. D. (1993) Studies with Synthetic Peptide Substrates Derived from the Neuronal

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Benner, S. A., Gerloff, D. (1992) Patterns of Divergence in Homologous Proteins as Indicators of Secondary and Tertiary Structure: A Prediction of the Catalytic Domain of Protein Kinases. *Advances in Enzyme Regulation*, 31, 121-181.
2. Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J., Sowadski, J. M., Gibbs, C. S., Zoller, M. J. (1993) A Template for the Protein Kinase Family. *TIBS*, 18, 84-89.
3. Pines, J. (1994) Protein Kinases and Cell Cycle Control. *Cell Biology*, 5, 399-408.
4. Hunter, T. (1994) 1001 Protein Kinases Redux -- towards 2000. *Cell Biology*, 5, 367-376.
5. Hunter, T. (1991) Protein Kinase Classification. *Methods in Enzymology*, 200, 3-37.
6. Traugh, J. A., Ashby, C. D., Walsh, D. A. (1974) Criteria for the Classification of Protein Kinases. *Methods in Enzymology*, 38, 290-299.
7. Kwon, Y-G, Mendelow, M., Lawrence, D. S (1994) The Active Site Substrate Specificity of Protein Kinase C. *J. of Biol. Chem.*, 269, 4839-4844.
8. Krebs, E. G., Beavo, J. A. (1979) Phosphorylation-Dephosphorylation of Enzymes. *Ann. Rev. Biochem*, 48, 923-959.
9. Flockhart, D. A., Corbin, J. D. (1982) Regulatory Mechanism in the Control of Protein Kinases. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 12, 133-186.
10. Roach, P. J. (1984) Protein Kinases. *Methods in Enzymology*, 107, 81-101.
11. Kitano, T., Go, M., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1986) Assay and Purification of Protein Kinase C. *Methods in Enzymology*, 124, 349-359.
12. Chen, S- J., Klann, E., Gower, C., Powell, C. M., Sessoms, J. S., Sweatt, J. D. (1993) Studies with Synthetic Peptide Substrates Derived from the Neuronal Adenosine Cyclic 3', 5'-phosphate Dependent Protein Kinase: Kinetic

- Protein Neurogranin Reveal Structural Determinants of Potency and Selectivity for Protein Kinase C. *Biochemistry*, 32, 1032- 1039.
13. Kuo, J. F., Shoji, M., Girard, P. R., Mazzei, G. J., Turner, R. S., Su, H- D. (1986) Phospholipid/ Calcium-Dependent Protein Kinase (Protein Kinase C) System: A Major Site of Bioregulation. *Advances in Enzyme Regulation*, 25, 387- 400.
 14. Ohno, S., Akita, Y., Hata, A., Osada, S- I., Kubo, K., Konno, Y., Akimoto, K., Mizuno, K., Saido, T., Kuroki, T., Suzuki, K. (1992) Structural and Functional Diversities of a Family of Signal Transducing Protein Kinases, Protein Kinase C Family; Two Distinct Classes of PKC, Conventional cPKC and Novel nPKC. *Advances in Enzyme Regulation*, 31, 287-303.
 15. Nishizuka, Y. (1983) Phospholipid Degradation and Signal Translation for Protein Phosphorylation. *TIBS*, 8, 13- 16.
 16. Kikkawa, U., Minakuchi, R., Takai, Y., Nishizuka, Y. (1983) Calcium- Activated, Phospholipid- Dependent Protein Kinase (Protein Kinase C) from Rat Brain. *Methods in Enzymology*, 99, 288-298.
 17. Kajikawa, N., Kikkawa, U., Itoh, K., Nishizuka, Y. (1989) Membrane- Permeable Diacylglycerol, Its Application to Platelet Secretion, and Regulation of Platelet Protein Kinase C. *Methods in Enzymology*, 169, 430-442.
 18. Kemp, B. E., Pearson R. B. (1990) Protein Kinase Recognition Sequence Motifs. *TIBS*, 15, 342-346.
 19. Hauschildt, S., Stefens, U., Wagner- Roos, L., Bessler, W. G. (1988) Role of Proteinkinase C and Phosphatidylinositol Metabolism in Lipopeptide- Induced Leukocyte Activation as Signal Transducing Mechanism. *Molecular Immunology*, 25, 1081- 1086.
 20. Yoon, M. Y., Cook, P. F. (1987) Chemical Mechanism of the Adenosine Cyclic 3', 5'- monophosphate Dependent Protein Kinase from pH Studies. *Biochemistry*, 26, 4118.
 21. Cook, P. F., Neville, M. E., Vrana, K. E., Hartl, F. T., Roskoski, R. R. (1982) Adenosine Cyclic 3', 5'- monophosphate Dependent Protein Kinase: Kinetic

31. K Mechanism for the Bovine Skeletal Muscle Catalytic Subunit. *Biochemistry*, 21, 5794. *Methods in Enzymology*, 201, 287-303.
22. Whitehouse, S., Framisco, J. R., Casnellic, J., Krebs, E. G., Walsh, A. (1983) Studies on the Kinetic Mechanism of the Catalytic Subunit of the cAMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.*, 258, 3693. *Freemans and Company*.
33. C
23. Järv, J. (1996) Oxyanion Formation in Phosphoryl Transfer Catalyzed by Protein Kinases A and C. *J. Molecular Catalysis*, submitted. *Proteins. Angew. Chem.*
34. B
24. Eller, M., Järv, J., Toomik, R., Ragnarsson, U., Ekman, P., Engström, L. (1993) Substrate Specificity of Protein Kinase C Studied with Peptides Containing D-Amino Acid Residues. *J. Biochem.*, 114, 177- 180. *Peptide Segments. J. Org.*
35. A
25. Ferrari, S., Marchiori, F., Borin, G., Pinna, L. A. (1985) Distinct Structural Requirements of Ca²⁺ / Phospholipid- Dependent Protein Kinase (Protein Kinase C) and cAMP- Dependent Protein Kinase as Evidenced by Synthetic Peptide Substrates. *FEBS*, 184, 72- 77. *Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-*
36. K
37. C
26. Yasuda, I., Kishimoto, A., Tanaka, S-I., Masahiro, T., Sakurai, A., Nishizuka, Y. (1990) A Synthetic Peptide Substrate for Selective Assay of Protein Kinase C. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 166, 1220- 1227. *07*
38. C
27. Eller, M., Järv, J., Toomik, R., Ragnarsson, U., Ekman, P., Engström, L. (1992) Peptide Fragments of Myelin Basic Protein as Substrates of Protein Kinase C. *Biochem. Int.*, 27, 625- 631. *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology. Vol.*
40. C
28. Pearson, R. B., Kemp, B. E. (1991) Protein Kinase Phosphorylation Site Sequences and Consensus Specificity Motifs: Tabulations. *Methods in Enzymology*, 200, 62-81. *N. Mullen, D. G. (1987) Solid-Phase Peptide*
41. B
29. Kemp, B. E., Pearson, R. B. (1991) Design and Use of Peptide Substrates for Protein Kinases. *Methods in Enzymology*, 200, 121-134.
30. Engström, L., Ekman, P., Humble, E., Ragnarsson, U., Zetterqvist, Ö. (1984) Detection and Identification of Substrates for Protein Kinases: Use of Proteins and Synthetic Peptides. *Methods in Enzymology*, 107, 130-153.

31. Kemp, B. E., Pearson, R. B., House, C. M. (1991) Pseudosubstrate-Based Peptide Inhibitors. *Methods in Enzymology*, 201, 287- 303.
32. Merrifield, R. B. (1963) Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149-2154.
33. Grant, G. A. *Synthetic Peptides. A User's Guide*. W. H. Freeman and Company. New York, 1992. 382 pp.
34. Bayer, E. (1991) Towards the Chemical Synthesis of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 30, 113- 129.
35. Albericio, F., Pons, M., Pedroso, E., Giralt, E. (1989) Comparative Study of Supports for Solid-Phase Coupling of Protected-Peptide Segments. *J. Org. Chem.*, 54, 360-366.
36. Kent, B. H. (1988) Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 57, 957-989.
37. Carpino, L. A., Han, G. Y. (1972) The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-protecting Group. *J. Org. Chem.*, 37, 3404-3409.
38. Carpino, L. A. (1987) the 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Family of Base-Sensitive Amino-Protecting Groups. *Acc. Chem. Res.*, 20, 401-407.
39. Stewart, J. M., Young, J. D. (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*. Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois. 176 pp.
40. Gross, E., Meienhofer, J. (1979) *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 1. Major Methods of Peptide Bond Formation. Academic Press. New York, San Francisco, London. 435 pp.
41. Barany, G., Kneib-Cordonier, N., Mullen, D. G. (1987) Solid-Phase Peptide Synthesis: a Silver Anniversary Report. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 30, 705-739.
42. Fields, G. B., Noble, R. L. (1990) Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 35, 161-214.

43. Hudson, D. (1988) Methodological Implications of Simultaneous Solid-Phase Peptide Synthesis. I. Comparison of Different Coupling Procedures. *J. Org. Chem.*, 53, 617-624.
44. Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W., Gillessen, D. (1989) New Coupling Reagents in Peptide Chemistry. *Tetrahedron Letters*, 30, 1927-1930.
45. Dourtoglou, V., Gross, B. (1984) O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-Tetramethyluronium Hexafluorophosphate as Coupling Reagent for the Synthesis of Peptides of Biological Interest. *Synthesis*, 572-574.
46. Fournier, A., Danho, W., Felix, A. M. (1989) Applications of BOP Reagent in Solid Phase Peptide Synthesis. *Int. J. peptide Protein Res.*, 33, 133-139.
47. Fournier, A., Wang, C-T., Felix, A. M. (1988) Applications of BOP Reagent in Solid Phase Synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 31, 86-97.
48. Seyer, R., Aumelas, A., Caraty, A., Rivaille, p., Castro, B. (1990) Repetitive BOP Coupling (REBOP) in Solid Phase Peptide Synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 35, 465-472.
49. Coste, J., Le-Nguyen, D., Castro, B. (1990) PyBOP: A New Peptide Coupling Reagent Devoid of Toxic By-Product. *Tetrahedron Letters*, 31, 205-208.
50. Sivanandaiah, K. M., Suresh Babu, V. V., Shankaramma, S. C. (1994) Synthesis of Peptides Mediated by KOBt. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 44, 24-30.
51. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P. I. (1970) Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.*, 34, 595-598.
52. Sarin, V. K., Kent, S. B. H., Tam, J. P., Merrifield, R. B. (1981) Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Anal. Biochem.*, 117, 147-157.
53. Gisin, B. F. (1972) The Monitoring of Reactions in Solid-Phase Peptide Synthesis with Picric Acid. *Anal. Chim. Acta*, 58, 248-249.

54. King, D. S., Fields, C. G., Fields, G. B. (1990) A Cleavage Method which Minimizes Side Reactions following Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 36, 255-266.
55. Lorne Burke, T. W., Mant, C. T., Hodges, R. S. (1988) A Novel Approach to Reversed- Phase Preparative High- Performance Liquid Chromatography of Peptides. *J. of Liquid Chromatography*, 11, 1229- 1247.
56. Ball, H. L., Mascagni, P. (1992) Purification of Synthetic Peptides Using Reversible Chromatographic Probes Based on the Fmoc Molecule. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 40, 370- 379.
57. Crabb, J. W., Heilmeyer, L. M. G. (1984) Micropreparative Protein Purification by Reversed- Phase High- Performance Liquid Chromatography. *J. of Chromatography*, 296, 129- 141.
58. Wilce, M. C., Aguilar, M. I., Hearn, M. T. W. (1993) High- Performance Liquid Chromatography of Amino Acids, peptides and proteins. CXXII. Application of Experimentally Derived Retention Coefficients to the Prediction of Peptide Retention Times: Studies with Myohemerythrin. *J. of Chromatography*, 632, 11- 18.
59. Round, a. J., Aguiler, M. I., Hearn, M. T. W. (1994) High- Performance Liquid Chromatography of Amino Acids, Peptides and Proteins. CXXXIII. Peak Tracking of Peptides in Reversed- Phase High- Performance Liquid Chromatography. *J. of Chromatography A*, 661, 61- 75.
60. Rivier, J., McClintock, R., Galyean, R., Anderson, H. (1984) Reversed- Phase High- Performance Liquid Chromatography: Preparative Purification of Synthetic Peptides. *J. of Chromatography*, 288, 303- 328.
61. Guo, D., mant, C. T., Hodges, R. S. (1987) Effects of Ion- Pairing Reagents on the Prediction of Peptide Retention in Reversed- Phase High- Performance Liquid Chromatography. *J. of Chromatography*, 386, 205- 222.
62. Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reverse Phase HPLC. Chemical Design Ltd., Oxford, England, 1991, 33 pp.

63. Pearson, J. D., Lin, N. T., Regnier, F. E. (1982) The Importance of Silica Type for Reverse- Phase Protein Separations. *Anal. Biochem.*, 124, 217- 230.
64. Wehr, C. T. (1984) High- Performance Liquid Chromatography: care of Columns. *Methods in Enzymology*, 104, 133- 154.
65. Mant, C. T., Hodges, R. S. (1989) Optimization of Peptide Separations in High- Performance Liquid Chromatography. *J. of Liquid Chromatography*, 12, 139- 172.
66. Ozols, J. (1990) Amino Acid Analysis. *Methods in Enzymology*, 182, 587- 601.
67. Gross, E., Meienhofer, J. (1981) *The Peptides . Analysis, Synthesis, Biology.* Vol. 4. Modern Techniques of Conformational, Structural, and Configurational Analysis. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, pp. 198- 260.
68. Macfarlane, R. D., Torgerson, D. F. (1976) Californium-252 Plasma Desorption Mass Spectroscopy. *Science*, 191, 920-925.
69. Macfarlane, R. D. (1982) Particle-Induced Desorption Mass Spectrometry of Large Involatile Biomolecules: Surface Chemistry in the High-Energy-Short-Time-Domain. *Acc. Chem. Res.*, 15, 268-275.
70. Torgerson, D. F., Skowronski, R. P., Macfarlane, R. D. (1974) New Approach to the Mass Spectroscopy of Non-Volatile Compounds. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 60, 616-621.
71. Cotter, R. J. (1988) Plasma Desorption Mass Spectrometry: Coming of Age. *Anal. Chem.*, 60, 781A.
72. Waller, G. R., Dermer, O. C. *Biochemical Applications of Mass Spectrometry.* A Wiley- Interscience Publication John Wiley & Sons. New York, Chichester, Brisbane , Toronto. pp. 1209-1218.
73. Jungclas, H., Danigel, H., Schmidt, L. (1982) Quantitative ^{252}Cf Plasma Desorption Mass Spectrometry for Pharmaceuticals. A New Approach to Coupling Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. *Org. Mass. Spectrometry*, 17, 86-90.

74. Svehla, G. (1981) Analysis of Complex Hydrocarbon Mixtures. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York. 841 pp.
75. Roepstorff, P., Nielsen, P. F., Klarskov, K., Hojrup, P. (1988) Applications of Plasma Desorption Mass Spectrometry in Peptide and Protein Chemistry. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, 16, 9-18.
76. Williams, R. E. (1976) Phosphorylated Sites in Substrates of Intracellular Protein Kinases: A Common Feature in Amino Acid Sequences. Science, 192, 473-474.
77. Mentlein, R. (1988) Proline Residues in the Maturation and Degradation of Peptide Hormones and Neuropeptides. FEBS Letters, 234, 251- 256.
78. Fersht, A. (1985) Enzyme Structure and Mechanism. W. H. Freeman and Company, New York, 452 pp.
79. Eberhardt, E. S., Loh, S. N., Raines, R. T. (1993) Thermodynamic Origin of Prolyl Peptide Bond Isomers. Tetrahedron Letters, 34, 3055- 3056.
80. Andres, C. J., MacDonald, T. L., Ocain, T. D., Longhi, D. (1993) Conformationally Defined Analogs of Prolylamides. *trans*- Prolyl Peptidomimetics. J. Org. Chem., 58, 6609- 6613.
81. Leszczynski, J. F., Rose, G. D. (1986) Loops in Globular Proteins: A Novel Category of Secondary Structure. Science, 234, 849- 855.
82. Levitt, M. (1978) Conformational Preferences of Amino Acids in Globular Proteins. Biochemistry, 17, 4277- 4284.
83. Karle, I. L. (1989) Conformational Characteristics of Peptides and Unanticipated Results from Crystal Structure Analyses. Biopolymers, 28, 1- 14.
84. Krimm, S., Bandekar, J. (1986) Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins. Advances in Protein Chemistry, 38, 181-364.
85. Sankararamkrishnan, R., Sreerama, N., Vishveshwara, S. (1991) Characterization of Proline- Containing Right- Handed α -Helix by Molecular Dynamics Studies. Biophysical Chemistry, 40, 97-108.

86. Sankararamakrishnan, R., Vishveshwara, S. (1992) Geometry of Proline-Containing Alpha- Helices in Proteins. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 39, 356-363.
87. Woolfson, D. N., Williams, D. H. (1990) The Influence of Proline Residues on α -Helical Structure. *FEBS Letters*, 277, 185- 188.
88. Sankararamakrishnan, R., Vishveshwara, S. (1990) Conformational Studies on Peptides with Proline in the Right-Handed α -Helical Region. *Biopolymers*, 30, 287-298.
89. Kemp, D. S., Curran, T. P., Davis, W. M., Boyd, J. G., Muendel, C. (1991) Studies of N-Terminal Templates for α -Helix Formation. Synthesis and Conformational Analysis of (2*S*, 5*S*, 8*S*, 11*S*)-1-Acetyl-1,4-diaza-3-keto-5-carboxy-10-thiatricyclo[2.8.1.0^{4,8}]-triadecane (Ac-Hel₁-OH). *J. Org. Chem.*, 56, 6672-6682.
90. Richardson, J. S., Richardson, D. C. (1988) Amino Acid Preferences for Specific Locations at the Ends of α Helices. *Science*, 240, 1648-1652.
91. Kemp, D. S., Bowen, B. R., Muendel, C. C. (1990) Synthesis and Conformational Analysis of Epindolidione- Derived Peptide Models for β -Sheet Formation. *J. Org. Chem.*, 55, 4650-4657.
92. Narita, M., Kojima, Y. (1989) The β -Sheet Structure-Stabilizing Potential of Twenty Kinds of Amino Acid Residues in Protected Peptides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 62, 3572- 3576.
93. Callahan, J. F., Newlander, K. A., Burgess, J. L., Eggleston, D. S., Nichols, A., Wong, A., Huffman, W. F. (1993) The Use of γ -Turn Mimetics to Define Peptide Secondary Structure . *Tetrahedron*, 49, 3479-3488.
94. Rose, G. D., Gierasch, L. M., Smith, J. A. (1985) Turns in Peptides and Proteins. *Advances Protein Chemistry*, 37, 1-109.
95. McDonald, D. Q., Still, W. C. (1996) Molecular Mechanics Parameters and Conformational Free Energies of Proline-Containing Peptides. *J. Org. Chem.*, 61, 1385-1391.

96. Ripka, W. C., De Lucca, G. V., Bach II, A. C., Pottorf, R. S., Blaney, J. M. (1993) Protein β -Turn Mimetics 1. Design, Synthesis, and Evaluation in Model Cyclic Peptides. *Tetrahedron*, 49, 3593-3608.
97. Jonsson, J., Eriksson, L., Hellberg, S., Sjöström, M., Wold, S. (1989) Multivariate Parametrization of 55 Coded and Non-Coded Amino Acids. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 8, 204-209.
98. Hansch, C., Leo, A. (1979) *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 336 pp.
99. Akamatsu, M., Yoshida, Y., Nakamura, H., Asao, M., Iwamura, H., Fujita, T. (1989) Hydrophobicity of Di- and Tripeptides Having Unionizable Side Chains and Correlation with Substituent and Structural Parameters. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 8, 195-203.
100. Roseman, M. A. (1988) Hydrophilicity of Polar Amino Acid Side-Chains is Markedly Reduced by Flanking Peptide Bonds. *J. Mol. Biol.*, 200, 513-522.
101. Fauchere, J.-L., Pliska, V. (1983) Amino Acid Scale: Hydrophobicity Scale (π -r). *Eur. J. Med. Chem.*, 18, 369-375.
102. Järv, J., Ragnarsson, U. (1991) Linear Free Energy Relationships in cAMP-Dependent Protein Kinase Reactions with Synthetic Substrates. *Bioorganic Chemistry*, 19, 77-87.
103. Parker, P.J., Stabel, S., Waterfield, M.D. (1984) *EMBO J.*, 3, 953- 959.
104. Drew, M. G. B. (1993) *CTI Centre for Chemistry Software Reviews*, 8, 21-22.
105. Olmsted, Williams. (1992) *Chemistry: The Molecular Science*, Mosby, 329-344.

TÄNUAVALDUS

Suur- suur aitäh juhendajale, **professor Jaak Järvele** mitmete nõuannete ja igakülgse abi eest. Tänan ka **professor Mati Karelsoni** ja Teoreetilise Keemia Õppetooli töötajaid kvantkeemiaalaste nõuannete eest. Samuti tänan **professor Ilmar Koppelit**, kes võimaldas mul TEMPUS projekti raames õppida nii Uppsala Ülikooli Biomeditsiini Keskuses kui ka Madridi Keemilise Füüsika Instituudis "Rocasolanos". Aitäh ka sealsetele professoritele **Lorentz Engströmile** ja **Åke Engströmile** osutatud praktilise abi eest ning professor **Jose-Louis Abboudile** üldkeemilise mõtteviisi arendamise eest.

Suur aitäh Kristile ning emale ja isale.