

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
Keemia instituut

TAAVO TÄHTJÄRV
**Oligoarginiinvektor proteiinkinaasi
bisubstraatse inhibiitori rakkuviimiseks**
Bakalaureusetöö

Juhendaja: teadur Kaido Viht

Tartu 2015

Kasutatud lühendid:

9diAc – nonaandihape

ACN – atsetonitriil

ADP – adenosiin-5`-trifosfaat

Ahx – aminoheksaanhape

ARC – adnosiini analoogi ja oligoarginiini konjugaat

ATP – adenosiin-5`trifosfaat

Boc – *tert*-butüüloksükarbonüül

BSA – veiseseerumi albumiin

cAMP – tsükliline adenosinmonofosfaat

DIPEA – *N,N*-diisopropüületüülamiin

DMF – dimetüülformamiid

DMSO – dimetüülsulfoksiid

DTT – ditiotreitool

EDT – etaanditool

Fmoc – fluorenüülmetüüloksükarbonüül

HBTU – *O*-bensotriasool-*N,N,N',N'*-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat

HEPES – (4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape

HOBt – hüdroksübensotriasool

HPLC – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

HPLC-MS – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia mass-spektromeetria

IC₅₀ – inhibiitori kontsentratsioon, mille juures toimub pool maksimaalsest inhibeerimisest

MQ – ülipuhas vesi (Milli-Q[®])

NMM – *N*-metüülmorfoliin

Npys – S-3-nitro-2-püridiin

P20 – Tween® 20

Pbf – 2,2,4,6,7-pentametüüldihüdrobensofuraan-5-sulfonüülrühm

PIPY- 6-(piperasiin-1-üül)-7-deasapuriin

PK – proteiinkinaas

PKA – proteiinkinaas A

PKAc – cAMP-sõltuva proteiinkinaasi katalüütiline alaühik

PKAr – cAMP-sõltuva proteiinkinaasi regulatoorne alaühik

Scm – metoksükarbonüülsulfenüül

TA – tioanisool

TEA – trietüülamiin

TFA – trifluoroäädikhape

TGL – aeglahutusega lumineestsents

TGL – aeglahutusega lumineestsents

TIPS – triisopropüülsilaan

UV-Vis – ultraviolet ja nähtav valgus

Sisukord

Sissejuhatus	6
1 Valdkonnaülevaade	7
1.1 Proteiinkinaasid	7
1.2 Proteiinkinaas A	9
1.3 ARC-tüüpi inhibiitorid	9
1.4 Peptiidisüntees tahkel kandjal	11
1.4.1 Tahkefaasisünteesi strateegiad	11
1.4.2 Aminohapete aktiveerimine	12
1.4.3 Atsüülimisreaktsiooni jälgimine	13
1.4.4 Tsüsteiin tahkefaasisünteesis.....	13
1.5 Disulfiidsideme moodustumine	14
1.5.1 Oksüdatiivsed meetodid disulfiidsideme moodustamiseks.....	15
1.5.2 Aktiveeritud sulfanüülrühmaga derivaadid disulfiidsideme tekitamiseks	15
2 Raku plasmamembraani läbivad peptiidid	17
3 Eksperimentaalne osa	18
3.1 Aparatuur ja töövahendid	18
3.2 Kasutatud kemikaalid	18
3.3 Peptiidisüntees tahkel faasil.....	19
3.4 Fmoc-Cys(Scm)-D-Arg ₉ -NH ₂ süntees	20
3.5 NH ₂ -Cys(Scm)-D-Arg ₉ -NH ₂ süntees	20
3.6 ARC-2102 süntees.....	21
3.7 Disulfiidsidestatud konjugaadi süntees	21
3.8 Aktiivse PKAc kontsentratsiooni määramine.....	21
3.9 Konkurentse sidumise katsed	22
4 Tulemused ja arutelu	23

4.1	ARC-2102-D-Arg ₉ -konjugaadi süntees.....	26
4.2	Sünteesitud ühendite bioloogilise aktiivsuse iseloomustamine.....	26
6	Kokkuvõtte	29
7	Summary	30
8	Kasutatud kirjanduse loetelu	31
9	Lisad	34

Sissejuhatus

Disulfiidside on looduses laialt levinud valkude aktiivsete konformatsioonide moodustamisel. Paljud organismis reguleerivaid funktsioone läbiviivad ensüümid sisaldavad samuti väävelväävelsidet. Asko Uri uurimisrühmas on välja töötatud adenosini analoogi ja oligo-D-arginiini konjugaadid (ARC), mis on proteiinkinaaside suure sidumisvõimega bisubstraatsed inhibiitorid. Adenosini konjugaat seostub proteiinkinaasi ATP ning oligo-D-arginiini fragment valksubstraadi sidumistaskusse. Proteiinkinaas katalüüsib valkude fosforüülimist ja sellega reguleerib rakulisi protsesse. ARC-i peptiidne fragment sisaldab tavaliselt arginiinijääke, mis kuuluvad proteiinkinaasi äratundmisjärjestusse. Raku plasmamembraani läbimiseks peab konjugaadil olema 6 – 9 arginiinijääki, mis tõstavad aga molekuli massi ja positiivse laengu kõrgeks ning võivad suurendada mittespetsiifilist seondumist rakus olevatele komponentidele, näiteks nukleiinhapetele. Selle probleemi lahenduseks on vähendada ARC-tüüpi ühendites arginiinide arvu ning liita molekuliga nn transportvektor üle sideme, mis raku tingimustes laguneb. Selleks, et parandada proteiinkinaasi bisubstraatsed inhibiitori raku plasmamebraani läbimisvõimet, arendatakse käesolevas töös strateegia, kus oligoarginiinne transportvektor on inhibiitoriga ühendatud üle disulfiidsideme. Sünteesitakse nonaarginiini-põhised transportvektorid, mis sisaldavad aktiveeritud sulfanüülrühmaga tsüsteiini, mis võimaldab tekitada disulfiidsideme tsüsteiini sisaldava ARC-tüüpi inhibiitoriga.

Käesoleva töö eesmärgiks on 1) leida sobiv meetod ARC-tüüpi inhibiitori konjugeerimiseks transportpeptiidiga üle disulfiidsideme 2) sünteesida transportpeptiidiga konjugeeritav ARC-tüüpi inhibiitor 3) iseloomustada sünteesitud ainete afiinsuseid cAMP-sõltuva proteiinkinaasi suhtes.

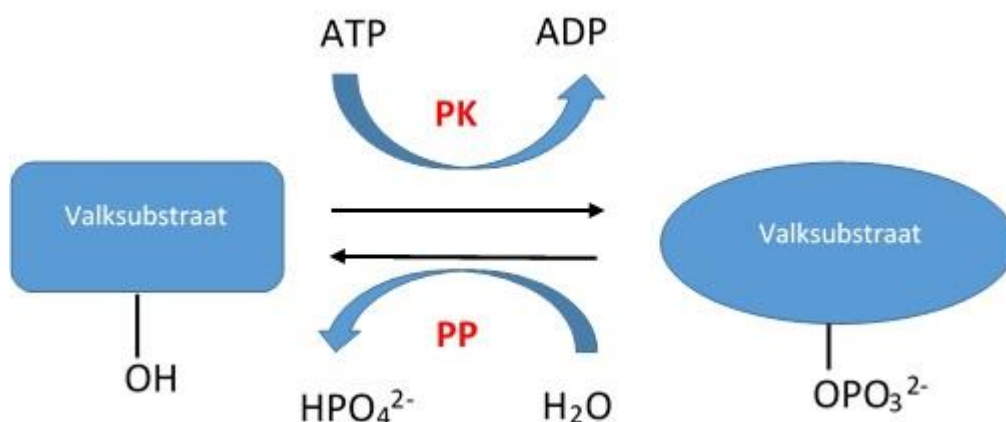
1 Valdonnaülevaade

1.1 Proteiinkinaasid

Fosforüülimine on translatsioonijärgne valkude modifikatsioon, mille abil muudetakse valkude aktiivsust ja nende vastasmõjusid mitmesuguste bioloogiliselt aktiivsete ühenditega. Fosforüülrühm kantakse üle peamiselt seriinile ning harvemini treoniinile ja türosiinile [1]. Proteiinkinaasi poolt äratuntav fosforüülitav piirkond sõltub valgu ehitusest, näiteks aminohapete äratundmisjärjestusest. Fosforüülimist saab katalüüsida ensümaatiliste reaktsioonidega. Üks peamisi fosforüülimise reaktsioone toimub ATP-ga, sest seda nukleosiidtrifosfaati leidub rakus suures kontsentratsioonis - tavaliselt 1– 4 mM piires, kuid võib olla ka kuni 12 mM. [2]

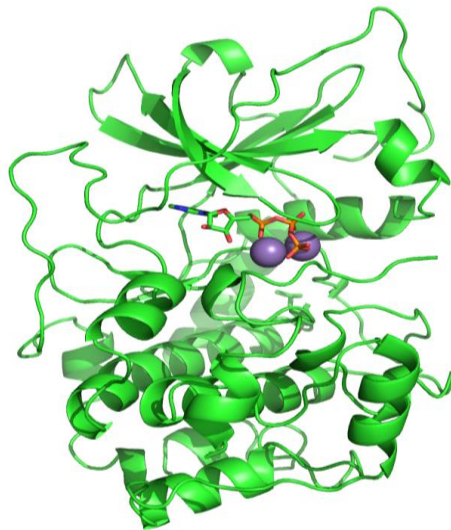
γ -fosforüülrühma ülekannet nukleosiidtrifosfaadilt valgu aminohappejäagi hüdroksüülrühmale katalüüsib proteiinkinaasi ensüüm. Fosforüülrühm eemaldatakse fosfataaside poolt katalüüsitavas hüdrolyütilises reaktsioonis (Joonis 1). Selline mehhanism tagab selle, et organism suudab reageerida erinevatele stiimulitele. Inimgenoom kodeerib kokku 538 proteiinkinaasi, millest umbes 2% inimese kõikidest geenidest kodeerib just proteiinkinaase. [2 - 4]

Proteiinkinaasi katalüütiline alaühik on globulaarne valk, mis koosneb kahest alaüksusest: väiksemast N-terminaalsest sagarast ning suuremast C-terminaalsest sagarast. N-terminaalne osa koosneb viiest β -lehest ning ühest α -heeliksist. Seevastu C-terminaalne osa koosneb peamiselt α -heeliksist. Need kaks poolt on omavahel seotud peptiidahelaga nii, et nende vahele moodustub aktiivtasku, kuhu seondub ATP (Joonis 2) [2].



Joonis 1. Valku fosfolüürimise skeem, kus PK tähistab proteiinkinaasi ja PP proteiinfosfataasi.

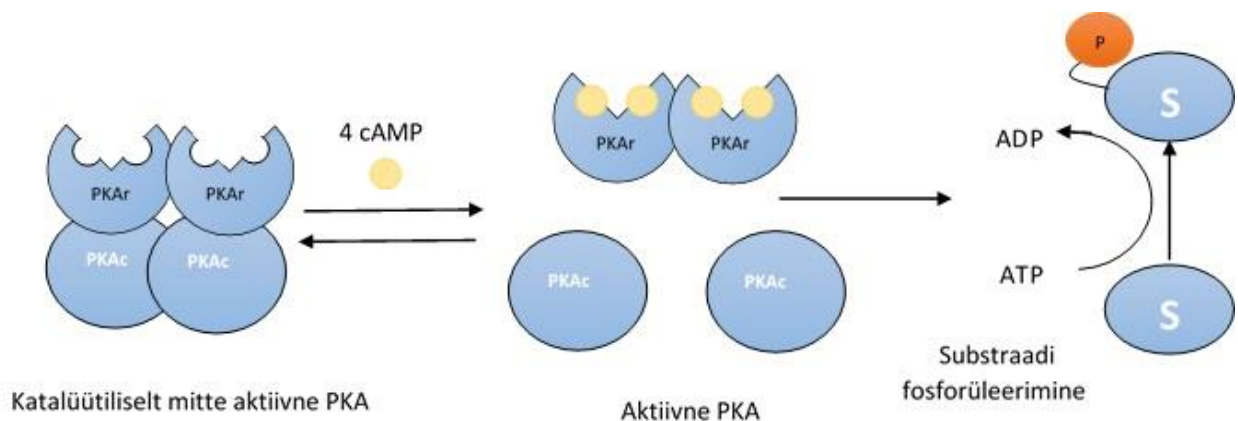
Proteiinkinaasid katalüüsivad valkude fosforüülimist ja sellega reguleerivad rakulisi protsesse, näiteks raku metabolismi, jagunemist, liikumist, elulemust ja surma. Mutatsioonidest ja üleekspressioonist tingitud proteiinkinaasi häired võivad aga organismis esile kutsuda muutusi, mille tagajärel võib areneda vähkkasvaja [6]. On täheldatud ka hulga teisi haigusi, mis on seotud PK-de väärtalitusega, näiteks Alzheimeri tõbi, kõrgevererõhutõbi, immuunpuudulikkus ja kesknärvisüsteemi haigused [3]. Üheks lahenduseks PK-de väärtalitustest tingitud haiguste raviks on PK inhibiitorid. Inhibiitorid kataksid nukleotiide siduva sidumistasku ja sellega väheneks ensüümi fosforüülimise võime. ATP on paljude teiste kinaaside substraat ning seetõttu on paljude proteiinkinaaside sidumistaskud sarnased. See omakorda raskendab ATP-konkurentsete selektiivsete inhibiitorite arendamist. [7]



Joonis 2. PK struktuur, kus on näha ATP molekuli seostumist aktiivtaskusse. Lillad molekulid tähistavad Mg^{2+} (PDB kood 1ATP) [5].

1.2 Proteiinkinaas A

Proteiinkinaas A (PKA) on kõige rohkem uuritud ja iseloomustatud PK. PKA substraadid ja funktsioonid on mitmekesised. PKA on seotud glükogeeni, lipiidide ja suhkrute metabolismiga. Lisaks sellele kontrollib PKA ionkanaleid ning pikaajalisi modifikatsioone närvi sünapstes. PKA aktivaatoriks on tsükliline adenosiinmonofosfaat (cAMP) [8]. Selle puudumisel on PKA heterotetrameerne holoensüüm, mis koosneb kahest reguleerivast alaühikust PKAr ja kahest katalüütilisest alaühikust PKAc. PKAr alaühikul on kaks cAMP-i aktiivtaskut. Katalüütiline aktiivsus on PKAc₂PKAr₂ holoensüümis blokeeritud, sest PKAr alaühik takistab valksubstraadi sidumist. cAMP-i liitumine PKAr-alaühikutega muudab PKAr- ja PKAc-vahelist afiinsust, mille tulemusena PKA holoensüüm dissotseerub PKAr-dimeeriks ja kaheks PKAc-monomeeriks (Joonis 3). Aktiivsed katalüütilised alaühikud vabanevad kompleksist ja on võimelised fosforüülama substraatvalkude seriini ja/või treoniini jääke vastavalt fosforüleerimiskoha konsensusjärjestusele (äratundmisjärjestusele) [9-11]. PKA on basofiilne kinaas, mille konsensusjärjestus on –R-(R/K)-X-(S/T)-B–, kus B väljendab hüdrofoobset ja X määratlemata aminohappejääke [12].

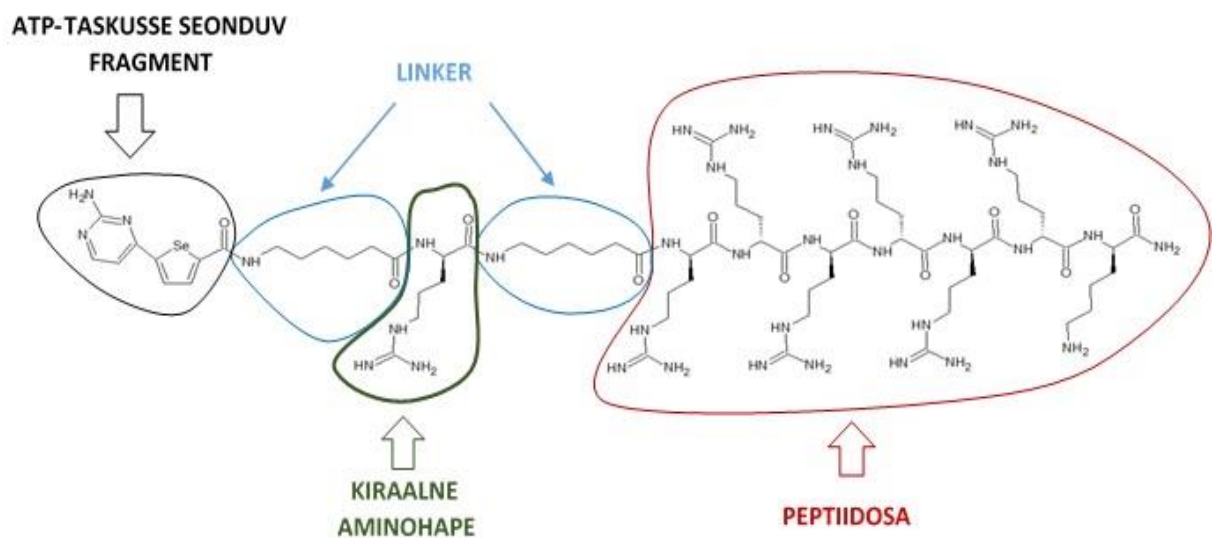


Joonis 3. PKA regulatsioon cAMP molekulidega.

1.3 ARC-tüüpi inhibiitorid

Inhibiitor on aine, mis seostub inhibeeritava ensüümiga ning vähendab sellega viimase aktiivsust. PK-de puhul saab inhibiitoreid jagada mono- ja bisubstraatseteks inhibiitoriteks. ATP taskusse seonduvad PK inhibiitorid on suurem osa monosubstraatsed, mis võivad olla ATP-konkurentsed või peptiidikonkurentsed. ATP-konkurentsed inhibiitorid konkureerivad rakus kõrge ATP kontsentratsiooniga. ATP-konkurentsete inhibiitorite selektiivsuse saavutamine on raskendatud, sest ATP-sidumiskohad on kinaasidel sarnased. [9]

Proteiinkinaaside bisubstraatsed inhibiitorid koosnevad kahest fragmendist ja neid ühendavast linkerist. Linker peab olema sobiva pikkusega, et mõlemad fragmendid saaksid seostuda kinaasiga. Selline lähenemine tagab inhibiitorile rohkem interaktsioone inhibeeritava ensüümiga ning seega samuti suurema selektiivuse ning suurema seondumisvõime. Üheks kõige enam uuritud bisubstraatseks inhibiitoriks on adensiini derivaadi ja oligo-arginiini konjugaadid (ARC), mis omavad selektiivsust basofiilsete (PKA) kinaaside suhtes. Kõige afiinsematel ARC-tüüpi inhibiitoritel on PKA-ga pikomolaarne seondumisvõime. ARC vastab üldisele valemile: Arom-L¹-S-L²-P-NH₂, kus L tähistab linkerit (tavaliselt 6-aminoheksaanhape), S kiraalset D-aminohapet ja P D-aminohappeid sisaldavat peptiidi ning Arom heteroaromaatset struktuuriosa (Joonis 4). Arom struktuuriüksus on disainitud seostuma kinaasi ATP-sidumistaskusse. Sellistel ühenditel on mitmeid eeliseid aktiivsuse, selektiivsuse ja stabiilsuse arendamises. [9]



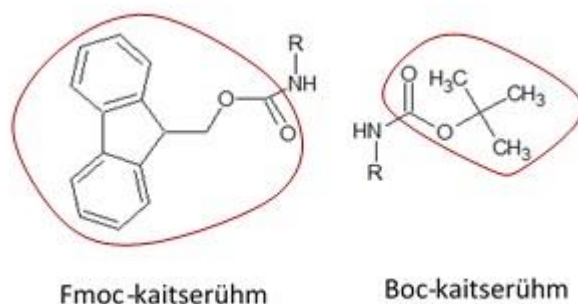
Joonis 4. ARC adensiini analoogi ja oligo-arginiini konjugaadi struktuur.

1.4 Peptiidsüntees tahkel kandjal

Aastal 1963 töötas Ameerika teadlane Robert B. Merrifield välja uude peptiidsünteesimeetodi – tahkefaasisünteesi [12]. Selle lähenemise puhul sünteesitakse peptiide tahkele kandjale ehk polümeerile (vaigule) aminohapete järkjärgulise üksteise otsa kondenseerimisega ja enamasti alustatakse C-terminaalsest aminohappest. Vaiguline kandja on poorse ehitusega ristseotud polüstüreen. Tahkefaasisünteesis peavad olema kõik aminohappe külghelal olevad funktsionaalrühmad kaitstud selliste kaitserühmagadega, mis sünteesi jooksul kasutatavate reagentidega ei eemaldu. N-terminaalne kaitserühm peab olema aga eemaldatav sünteesi käigus. [13]

1.4.1 Tahkefaasisünteesi strateegiad

N-terminaalsest kaitserühmast lähtudes on välja töötatud kaks peamist sünteesistrateegiat: Fmoc- ja Boc-tahkefaasisüntees (Joonis 5). Fmoc-strateegias on α -aminorühma kaitserühm eemaldatav aluselises keskkonnas 20 % piperidiiniga dimetüülformamiidis. Peptiid vaigul ja külghelate kaitserühmad on labiilsed TFA-le. Miinuseks on antud sünteesistrateegial see, et α -süsinikud võivad aluselises keskkonnas deprotoneeruda, mistõttu võib aminohappe stereokonfiguratsioon muutuda. Boc-keemia korral kasutatakse mõlemal juhul happelist keskkonda: nõrgemat hapet (TFA) Boc-rühma eemaldamiseks ja tugevamat hapet (veevaba HF) peptiidi vaigult ja külghelate kaitserühmade eemaldamiseks. Vesinikfluoriidhappega töötamine aga nõuab spetsiaalset aparatuuri. [13]

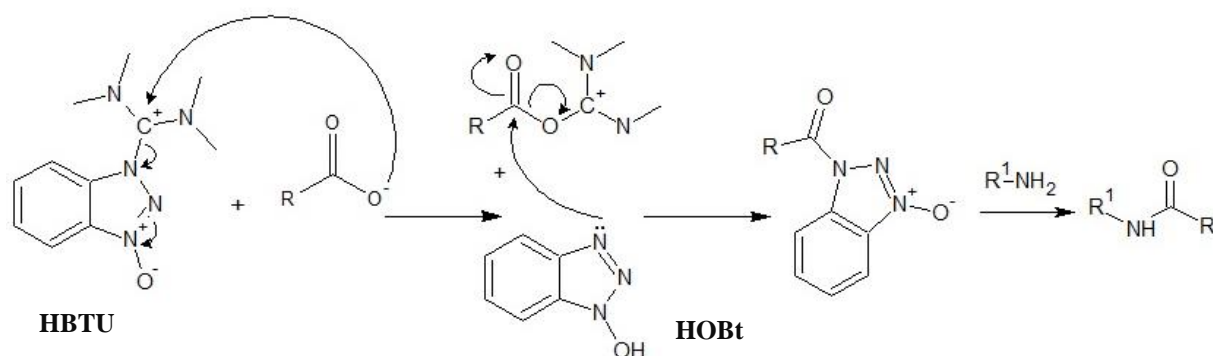


Joonis 5. N-terminaalsed kaitserühmad Fmoc ja Boc.

Tahkefaasisüntees on optimeeritud nii, et toimuks võimalikult vähe kõrvalreaktsioone. Esmalt kinnitub aminohappe karboksüülrühm polümeeri funktsionaalrühmade külge, kuhu hakkavad järgnevad aminohapped peptiidi ahelat moodustama. Kuna tavaliselt lisatakse aminohapped on kaitstud N-terminaalsest otsast, vältimaks kontrollimatut ahelate kasvu, tuleb kaitserühm enne järgmise aminohappejärgi lisamist eemaldada. Kogu tsüklit korratakse, kuni on saavutatud soovitud aminohappejärjestus. [14]

1.4.2 Aminohapete aktiveerimine

Peptiidsideme moodustumine on kõrge aktivatsioonienergiaga reaktsioon. Seepärast tuleb amiidsideme tekkeks karboksüülrühm aktiveerida anhüdriide ja aktiivseid estreid moodustavate reagentidega. Kõige enam on rakendust leidnud *O*-bensotrasool-*N,N,N',N'*-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaadiga (HBTU) ja hüdroksübensotriasool (HOBT) (Joonis 6). Iga sünteesietapi lõpus filtreeritakse liias olevad reagentid ja tahkefaasisünteesi lõpus eemaldatakse peptiid polümeerilt, mille käigus aminohappejärgi kaitserühmad tulevad samuti maha. Viimase etapina sadestatakse peptiid, näiteks eetris ja puhastatakse kõrgrõhvedelikkromatograafia. [22]

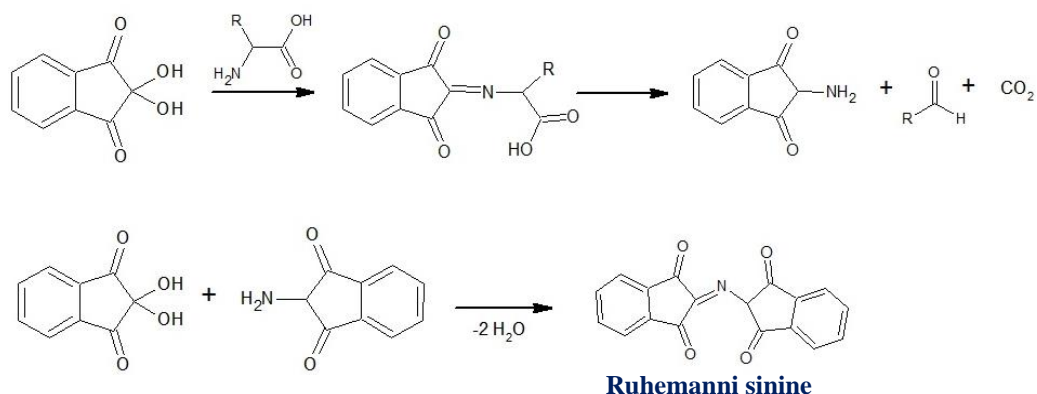


Joonis 6. Aminohappe karboksüülrühma aktiveerimine HBTU-ga.

Tahkefaasisünteesis tuleb kasutada selliseid lahusteid, kus polümeer hästi punduks. See on vajalik selleks, et hõlbustada reagentide difusiooni polümeerimaatriksisse. Enim kasutatavad lahustid on dimetüülformamiid (DMF) ja dimetüülkloriidi (DCM). Reaktsioonide toimumist tahkefaasisünteesis saab kiirendada, lisades aminohapet liias, mis suurendab etapi saagist, kuna lahusefaasis oleva reageerimata materjali ja kõrval saaduste eraldamine vaigu külge seotud peptiidist toimub filtreerimisega, mis on lihtsasti ja kiirelt teostatav. [22]

1.4.3 Atsüülimisreaktsiooni jälgimine

Hoolimata atsüülimisreaktsiooni saagise tõstmiseks kasutusele võetud meetoditest, ei kulge kõik amideerimisreaktsioonid edukalt lõpuni. Sünteesietappide jälgimiseks on loodud vabade aminorühmade tuvastamiseks värvusreaktsioone. Üheks selliseks on Kaiseri test. Juhul kui vaigul esineb vabu aminorühmi, siis polümeer värvub kuumutades siniseks (Ruhemanni sinine)(Joonis 7) [15]. Alternatiivne värvusreaktsioon on 2,3,5,6-tetraklorobensokinooniga (kloraniil), kus polümeeriterad värvuvad kuumutades intensiivseks pruuniks või violetseks [16]. Juhul kui atsüülimisreaktsioon pole õnnestunud, tuleb seda korrata või reageerimata aminorühmad katta (*capping*) mõne atsüülitava reagentiga, näiteks etaanhappe anhüdriidiga. See vähendab aga lõpp-produkti saagist. Samuti saab reaktsioonikulgu jälgida Fmoc-testi abil. Nimelt vaigu kohalt kogutakse lahus pärast N-terminaalse kaitserühma eemaldamist, mis sisaldab Fmoc-rühma eemaldamisel tekkivat dibensofulveeni, millel on iseloomulik neeldumine UV-alas. Lahuse neeldumise kaudu saab määrata vaigu küljes olevat peptiidi hulka.

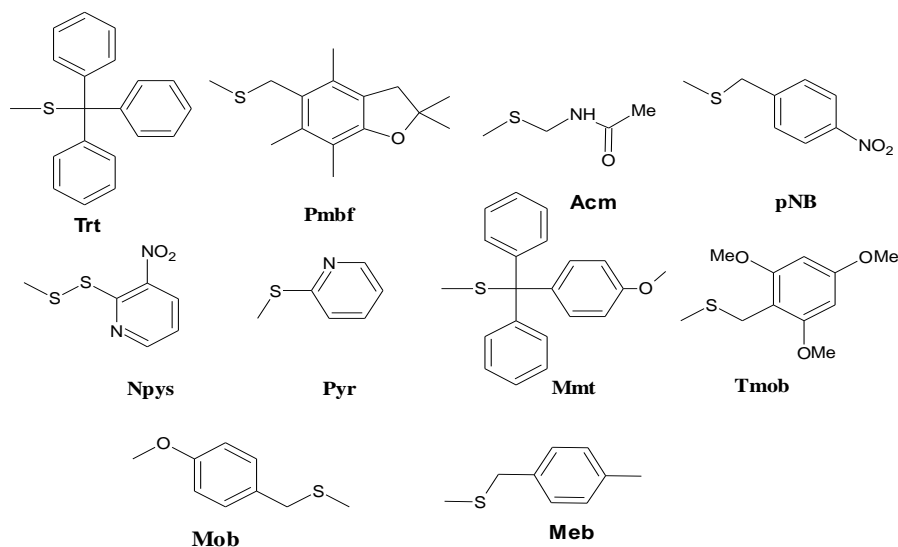


Joonis 7. Ninhüdrini reaktsioon aminohappega.

1.4.4 Tsüsteiin tahkefaasisünteesis

Tsüsteiini sulfanüülrühm on võimeline amiinidega konkureerima atsüülimises, sest väävel on hea nukleofiil. Tsüsteiinil võib kõrvalrühm oksüdeeruda või toimuda alküülimine. Lisaks on Trt-kaitserühm tundlik ratseemumisele. Seetõttu peab tsüsteiini kõrvalahel olema kaitstud (Joonis 8). Kõige rohkem kasutatakse Fmoc-keemias happetundlikku kaitserühma tritüüli (Trt) .[17]

On välja töötatud kaitserühmi, mis vähendavad Cys ratseemumist ning on eemalduvad pehmemates tingimustes. Fmoc-keemias on leitud mitmeid sobivaid happete tundlikke kaitserühmi, näiteks Trt kaitserühma analoogiks sobib 2,2,4,6,7-pentametiül-2,3-dihüdrobensofuraan-5-metiül (Pbfm), mida saab kergesti eemaldada 1% TFA-ga 5 % trietüülsilaani juuresolekul. Boc-keemias on leitud, et üheks püsivaks kaitserühmaks on p-nitrobensüül (pNB). Kaitserühma atsetamidometüül (Acm) saab kasutada disulfiidsideme moodustumisel, kuid see eemaldub toksilise elavhõbeda juuresolekul. Tsüsteiini sisaldavate peptiidide vaigult eemaldamisel tuleb lisada lahusesse redutseerijaid (DTT, tioanisool, etüleenditiool), et vältida kõrvalreaktsioonina disulfiidsideme moodustumist. [18]



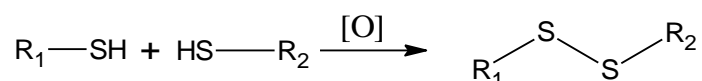
Joonis 8. Cys kaitserühmad tahkefaasisünteesis.

1.5 Disulfiidsideme moodustumine

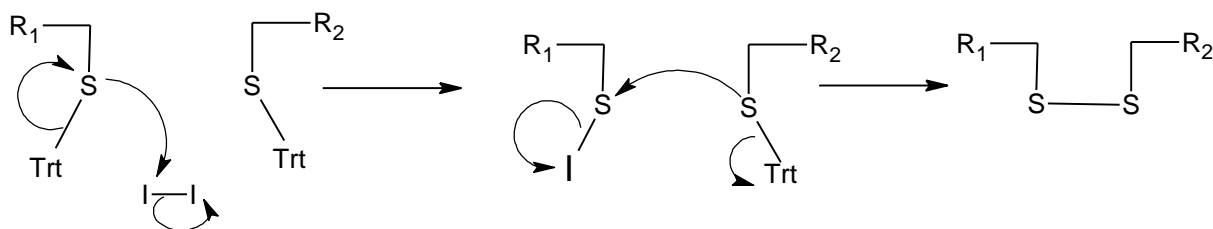
Looduses esineb hulganisti väävliühendeid. Organismides leidub 20-st kodeeritud aminohapest väävli aatomit kahel: süsteiinil ja metioniinil. Tsüsteiin on aminohapete prekursoriks teistele valkudele, koensüüm A-le ja γ -glutamüülsüsteiinüülglytsiini ning tsüsteiini kataboolsetele produktidele tauriinile ja anorgaanilisele väävliile [19]. Disulfiidside suurendab metaboolset ja termilist stabiilsust. Näiteks organismides esinev peptiidne hormoon insuliin, kus disulfiidside ühendab peptiidseid ahelad, suurendades nii molekuli konformatsioonilist stabiilsust [20]. Peptiid, mis sisaldab põhiahelas rohkem kui ühte tsüsteiini, saab moodustada sisemolekulaarset disulfiidsidet. Disulfiidsideid peptiidide saab kasutada paljudel muudel eesmärkidel, näiteks biokonjugatsioonil, β -lehe stabilisatsioonil ja siRNA transportimisel [18]. Disulfiidsideme moodustamiseks on välja töötatud mitmeid erinevaid meetodeid.

1.5.1 Oksüdatiivsed meetodid disulfiidsideme moodustamiseks

Kasutades tsüsteiinil TFA-tundlikke kaitserühmi, näiteks S-Xan, S-Tmob, S-Mmt või S-Trt, moodustub pärast kliivimist vaba tiolrühm, mida saab oksüdeerida. Sünteesi võib läbi viia nii lahuse faasis kui ka tahkel kandjal. Oksüdeerimiseks on mitmeid võimalusi. Sulfanüülrühmad oksüdeeruvad õhu hapniku toimel ja moodustavad disulfiidsidemeid. See meetod on küll lihtne, kuid reaktsioon võib võtta aega mitu päeva. Oksüdeerijana saab kasutada 20 % dimetüülsulfoksiidi vesilahust pH vahemikus 3 – 8 [13]. Samuti saab kasutada oksüdeerijana anorgaanilist oksüdeerijat kaaliumraudtsüaniidi $K_3[Fe(CN)_6]$ -i. See sool on aga valgustundlik ning reaktsioon tuleks läbi viia pimedas. [21]. Oksüdeerimisreaktsioon viiakse läbi järgmise skeemi alusel:



Disulfiidsidet saab moodustada ka kaitstud sulfanüülrühmaga ühenditest. Selline lähenemine väldib vahepealset oksüdatsioonitundliku vaba sulfanüülrühmaga ühendi eraldumist. Disulfiidsideme moodustumiseks peaksid sidet moodustavad tsüsteiinid olema kaitstud samade kaitserühmadega [20] (Joonis 9). Kaitserühmadega S-Tmob, S-Mnt, S-Trt ja S-Acm võib oksüdeerijana kasutada joodi (Joonis 9). [14]

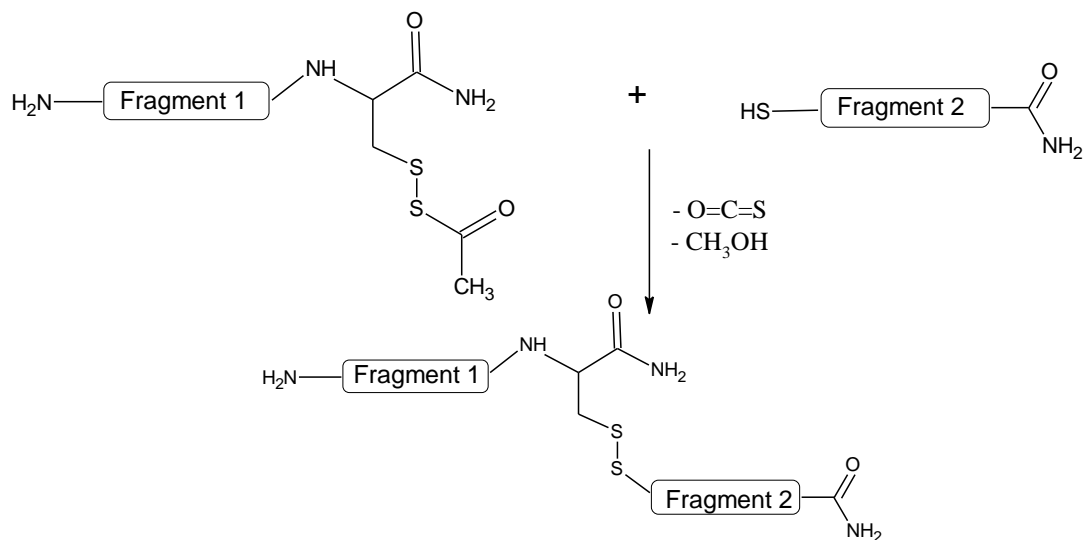


Joonis 9. Joodi oksüdatiivne reaktsioon sulfanüülrühmadega.

1.5.2 Aktiveeritud sulfanüülrühmaga derivaadid disulfiidsideme tekitamiseks

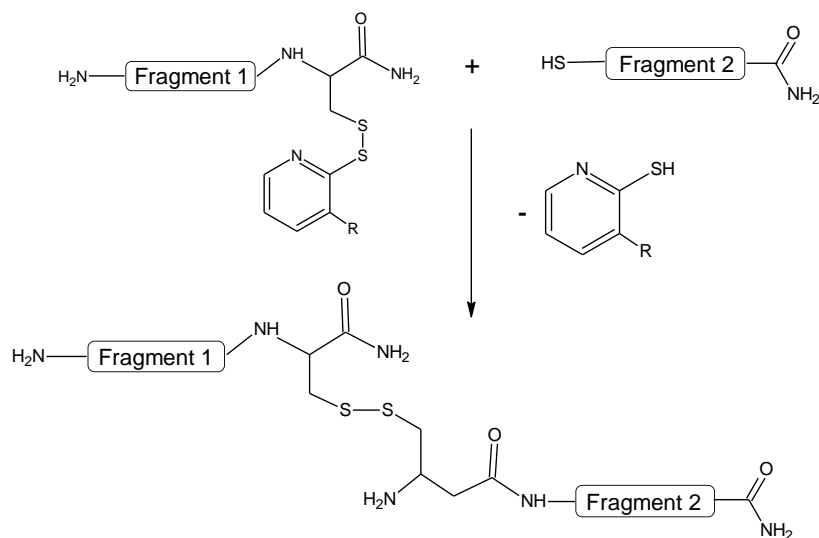
Disulfiidsideme moodustumiseks saab kasutada aktiveeritud sulfanüülrühmaga derivaate. Otsesel disulfiidsidme tekkimisel on üks tsüsteiin vaba tiolrühmaga, samal ajal kui teine tsüsteiini ahel peab olema kaitstud mõne aktiivse kaitserühmaga, nagu S-3-nitro-2-püridiinsulfenüül (S-Npys), S-2-püridiinsulfenüül (S-Pyr) ja S-metoksükarbonüülsulfenüül (S-Scm). Fmoc-peptiidisünteesi strateegias kasutatakse aluselisi reagente (piperidiin), mille suhtes pole paljud kaitserühmad püsivad. [22]

Kaitserühmade S-Trt, S-Acm, S-Tmob või S-Xan töötlemisel metoksüsulfenüülkloriidiga (ScmCl) kloroformis ja/või metanoolis annab S-Scm aktiivse kaitserühma (Joonis 10).



Joonis 10. Cys(Scm) reaktsioon vaba sulfanüülrühmaga.

Reaktsioonil Pyr-Cl-i ja Npys-Cl-ga äädikhappes saab aktiivsed kaitserühmad S-Pyr ja S-Npys (Joonis 11). Sulfenüülkloriidid on head elektrofiilid ja sellepärast võib esineda nendega teatavaid probleeme, näiteks põhjustab pöördumatuid muudatusi trüptofaanis [22-23].



Joonis 11. Cys(Npys) reaktsioon vaba sulfanüülrühmaga.

2 Raku plasmamembraani läbivad peptiidid

Raku plasmamembraan koosneb fosfolipiidsest kaksikkihist ja valkudest, mis muudavad membraani amfiifiliseks. Fosfolipiidid on ühendid, millel on polaarne rühm ja kaks hüdrofoobset süsivesiniksaba. Rakumembraani läbivad kergesti väikse molekulmassiga hüdrofiilsemad ühendid, kuid ka suuremad struktuurid on võimelised lipiidset kaksikkihti läbima nii endotsütoosi abil kui ka plasmamembraani struktuuri muutuste kaudu [24]. Transportmolekule kasutatakse organismis väga laialdaselt terapeutiliste molekulide viimiseks läbi rakumembraani, näiteks aju, silma ja immuunsüsteemi. Sellise mehhanismi abil transporditakse erinevad nukleiinhappeid, siRNA-sid ja farmatseutilisi nanokandjaid [25]. Polaarsete ja negatiivselt laetud ühendite liikumine läbi plasmamembraani on üldjuhul takistatud. Terapeutiliste molekulide transpordiks rakumembraani on välja töötatud mitmeid meetodeid, näiteks rakku sisenevad peptiidid (RSP; ing. *cell-penetrating peptides*, CPP). RSP-d koosnevad tavaliselt kuni 40-st aminohappejäägist ning on võimelised rakku transportima bioaktiivseid ühendeid [26].

Üheks esimesena avastatud RSP-ks oli transaktiveeritud transkriptsionaalne aktivaator (TAT) immuunpuudulikkuse viirusel HIV-1 [27]. Nii see molekul kui ka arginiinidest koosnev RSP läbivad membraani makropinotsütoosi teel, kuid ühest mehhanismi, kuidas molekulid rakumembraani läbivad, ei ole. Oligoarginiinide raku plasmamembraani läbitavus sõltub arginiinijääkide arvust. On leitud, et kõige paremini läbivad rakumembraani 6 – 9 arginiini sisaldavad peptiidid [28]. Transportmolekul võib olla seotud transporditava molekuliga nii kovalentselt kui ka mittekovalentselt. Mittekovalentselt saab rakku viia näiteks siRNA ja plasmiidid, millel on anioonse struktuur ning mis seostub katioonse transportpeptiidiga tänu laengute vahelistele vastastikmõjudele. Kovalentse sideme moodustamiseks rakku transporditava ühendi ja RSP vahel kasutatakse mitmeid võimalusi. Peptiidside on keemiliselt vastupidavad, kuid peptiidside vahel on lagundatavad peptidaaside ja proteaaside poolt katalüüsitud reaktsioonides. Üheks võimaluseks on RSP siduda transporditava fragmendiga disulfiidsidemega. Disulfiidside katkeb redutseerivas keskkonnas, näiteks raku sees suures kontsentratsioonis oleva glutatiooni poolt. Seega võimaldab üle disulfiidsideme konjugeerimine raku sees transporditava molekuli RSP küljest lahti ühendada. [19]

3 Eksperimentaalne osa

3.1 Aparatuur ja töövahendid

UV-Vis spektreid mõõdeti spektrofotomeetriga NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), mille mõõtevahemik oli 190 – 840 nm. Kasutati neelduvuskoeefitsente $\epsilon_{301\text{nm}}(\text{Fmoc}) = 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{337\text{nm}}(\text{Npys}) = 4900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{594\text{nm}}(\text{Atto 590}) = 120\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{290\text{nm}}(\text{ARC-2102, ARC-2107, ARC-1048}) = 16\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ja $\epsilon_{654\text{nm}}(\text{ARC-1063}) = 250\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Spektreid mõõdeti lahuses ruumalaga 1,5 μl , mille optiliseks teepikkuseks oli 0,1 cm, ning võrdluslahusena kasutati puhast lahustit.

Mass-spektrid mõõdeti vedelikkromatograafia-massispektromeetriga LCMS-2020 (Shimadzu). Kõrgefektiivse vedelikkromatograafia jaoks kasutati diodrividetektoriga Shimadzu Prominence LC Solution HPLC kromatograafi SPD M20A. Pöördfaaskromatograafia teostati kolonniga Luna C18(2) 100A 5 μ (250 \times 4.6 mm). Kasutati manuaalset proovisisestit ning elueeriti vesi-atsetonitriili gradiendiga (0,1 % TFA), mille liikumiskiirus oli 1 ml/min.

Aeglahutatud luminesentskiirgust (TGL) mõõdeti mikrotiiterplaadilugejaga Pherastar (BMG Labtech) ergastusfiltriga 337 \pm 25 nm ja emissioonifiltriga 675 \pm 25 nm. TGL signaal koguti 300 μs jooksul viivitusega 80 μs . Enne mõõtmisi inkubeeriti lahuseid 30 – 90 minutit 30 °C juures termostaadil THERMOstar (MBG Labtech).

Lahused valmistati 384 süvendiga vähesiduva pinnaga mikrotiiterplaadil (Corning). Lahuste pipeteerimiseks kasutati automaatpipette Eppendorf Research (Eppendorf).

Tulemuste analüüsiks kasutati GraphPad Prismi (versioon 6, GraphPad).

3.2 Kasutatud kemikaalid

MQ H₂O toodeti seadmega Millipore Simplicity 185 (Millipore GmbH; eritakistus 18,2 M Ω -cm, summaarne süsiniku siasaldus < 6mg/kg). Ülejäänud reagentid olid pärit järgnevatest kommertsiaalsetest allikatest:

Fmoc-[D-Arg(Pbf)]₆-NH₂-MBHA vaik – Caslo, DMF, Fmoc-Rink-Amide MBHA vaik, HBTU – Iris Biotech GmbH; HOBt, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH – Novabiochem; nonaandihape – Reachim; NMM, piperidiin, isopropanool, dikloroetaan, Fmoc-6-Ahx-OH – Fluka; Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, Boc-Cys(Acm)-OH, metoksükarbonüülsulfenüülkloriid (ScmCl), metüülfenüülsulfiid, DMSO, TEA, fenool, TIPS, heksaantiool, DTT, BSA, HEPES, NaCl, P20, Boc-Cys(Npys)-OH – Sigma-Aldrich; 1,2-etaanditiool – Lancaster Synthesis;

TFA – Fisher Scientific; PKA α (Biaffin GmbH & Co KG).

PIPY, ARC-1063 ja ARC-1408 olid samas laboris eelnevalt sünteesitud.

ARC-2102, ARC-2107, ARC-1408 inhibiitorite ja ARC-1063 kontsentratsioonid mõõdeti UV-Vis spektroskoopiaga. Kontsentratsioonid arvutati vastavalt Lambert-Beeri seadusele:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)cl \quad (1),$$

kus A – neeldumine ja ε - aine neelduvuskoeffitsient lainepikkusel λ , c – aine kontsentratsioon, l – optiline teepikkus.

3.3 Peptiidisüntees tahkel faasil

Peptiidisünteesil kasutati Fmoc-tahkefaasisünteesistrateegiat. Reaktsioon viidi läbi toatemperatuuril (20 – 25°C), kasutades 100 mg polümeeri kohta umbes 1 ml solvendi. Sünteesiskaala oli 1 – 100 μ mol. Polümeeril lasti 45 minutit punduda DMF-s. N-terminaalse Fmoc-kaitserühma eemaldamiseks töödeldi polümeeri kaks korda 20 % piperidiinilahusega DMF-s (5+15 minutit). Pärast kaitserühma eemaldamist pesti vaiku 3 korda, et eemaldada lahuses olevad reagentid ja kõrvalsaadused reaktsioonikeskkonnast. Vabade aminorühmade olemasolu tõestati Kaiseri testi abil [16]. Polümeeri laadungi kontrollimiseks koguti Fmoc-rühma eemaldamislahused ja kaks pesulahust, milles määrati tekkinud dibensofulveeni kontsentratsioon lahuse absorptsiooni järgi ($\lambda_{\max} = 301$ nm). Fmoc- ja Boc-kaistud aminohapete peptiidahelasse liitmiseks lisati aminohappele (3 ekv) HBTU (2,94 ekv), HOBt (9 ekv) ja N-metüülmorfoliin (NMM, 9 ekv) DMF-s. Saadud lahus lisati peale 3-minutilist eelaktivatsiooni polümeerile ja lasti 45 minutit reageerida. Aminohapete atsüülimisreaktsiooni saagist kontrolliti Fmoc-testi abil, kus koguti vaigu kohalt piperidiini lahus ja kaks pesulahust ning mõõdeti selle adsorptsioon UV-alas.

Peptiidi eemaldamiseks polümeerselt kandjalt pesti vaiku isopropanooliga (2 korda) ja diklorometaaniga (3 korda) ning kuivatati tund aega vaakumis. Peptiidi eemaldamiseks töödeldi vaiku seguga TFA/H₂O/TIPS (90/5/5; v/v/v) (segu I) või TFA/fenool/tioanisool/H₂O/EDT (82,5/5/5/5/2,5; v/m/v/v/v; reagent K) 3 tundi. Peptiidi toorprodukt sadestati dietüüleetrise ja pesti 3 korda samas solvendis. Seejärel puhastati peptiid pöördfaasilise kromatograafia ning analüüsiti tulemusi ESI MS-ga.

3.4 Fmoc-Cys(Scm)-D-Arg₉-NH₂ süntees

Fmoc-Cys(Trt)-[D-Arg(Pbf)]₉-NH₂-Rinkamiid-MBHA vaik sünteesiti eelnevalt kirjeldatud tahkefaasisünteesimeetodil. Lähtuti Fmoc-[D-Arg(Pbf)]₆-Rinkamiid MBHA polümeerist (laadung = 0,18 mmol/g 109,4 mg, sünteesiskaala 19,7 µmol). Trt-rühma Scm-rühmaks konverteerimiseks kasutati kaht eeskirja. Esimese eeskirja kohaselt töödeldi vaiku metoksükarbonüülsulfenüülkloriidiga (ScmCl, 1,2 ekv) 3 tundi 0 °C juures DMF-i lahuses. Peptiid eemaldati polümeerilt seguga I. Seejärel puhastati aine pöördfaaskromatograafiliselt ACN/0,1 % TFA gradiendiga retentsioonigaeg (rt) 15,7 min 10 – 90 % ACN/30 min. Aine molekulmassi tõestamiseks mõõdeti ESI MS (Lisa 1).

Teise eeskirja kohaselt lisati vaigule (5,6 mg, 1 µmol) TFA/CH₂Cl₂ segu (50/50; v/v) ning 4 °C juures lisati sellele järk-järgult poole tunni jooksul ScmCl-i (1,2 ekv). Reaktsioon kestis 45 minutit ning aine puhastati eelmise ainega analoogselt, muutes gradiendi aeglasemaks (10-60 % ACN/30 min). Määrati produkti mass ESI MS-ga, rt = 20,9 min (Lisa 2). Fmoc-Cys(Scm)-D-Arg₉-NH₂ pandi reageerima heksaantiooliga (0,5 ekv) DMF-s, et veenduda aine võimes moodustada disulfiidsidet. Reaktsiooni saadusi analüüsiti pöördfaaskromatograafiliselt gradiendiga 10-60 % ACN/30 min ning massi ESI MS-ga rt = 20,3 min (Lisa 3).

3.5 NH₂-Cys(Scm)-D-Arg₉-NH₂ süntees

Boc-Cys(Acm)-[D-Arg(Pbf)]₉-Rinkamiid-MBHA vaik (laadung 0,18 mmol/g, 56,9 mg, 10,2 µmol) sünteesiti eelnevalt kirjeldatud tahkefaasisünteesimeetodil ning pandi reageerima ScmCl-ga (1,2 ekv) diklorometaanis. Reaktsioonil lasti toimuda 3 tundi ning seejärel eemaldati lõppsaadus polümeerilt reagent K-ga. Aine puhastati HPLC-ga 10-60 % ACN/30 min ning määrati ESI MS-ga saaduse mass rt = 11,2 min (Lisa 4).

3.6 ARC-2102 süntees

Võeti Fmoc-Rinkamiid MBHA vaik (laadungiga 0,45 mmol/g) ning lisati tahkefaasisünteesi eeskirja alusel Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, kahes korduses Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, 6-(Fmoc-amino)kapronhape, Fmoc-Ala-OH ja nonaandihape. Nonaandihappe (20 ekv) mõlema karboksüülrühma aktiveerimiseks kasutati samuti aktivaatoreid HBTU, HOBt-i ning NMM (vastavalt 3 ekv; 3 ekv; 20 ekv). Reaktsioonil lasti toimuda 2 tundi ja sellele järgnes 5 pesu DMF-ga. PIPY (3 ekv) lahustati DMF:DMSO (5:1) segus, millele lisati NMM (20 ekv), ning saadud lahus lisati polümeerile, reaktsioonil lasti toimuda 2 tundi. Pärast seda eemaldati peptiid polümeerilt seguga I. Peptiidi süntees tuli välja saagisega 1,2 % (üle kümne etapi). Sünteesi saadust analüüsiti HPLC-ga gradiendi juures 10-60 % ACN/30 min $r_t = 11,9$ min (Lisa 5).

3.7 Disulfiidsidestatud konjugaadi süntees

Sünteesiti H_2N -Cys(Npys)-D-Arg₉-D-Lys-NH₂ saagisega 2,66 % (üle nelja etapi), kus tsüsteiini kaitserühmal on endal UV alas neeldumine $\lambda = 337$ nm juures. See võimaldab paremini jälgida sünteesi kulgu, sest disulfiidsideme moodustumisel vabaneb lahusesse vaba Npys rühm, millel on erinev neeldumise spekter. Peptiid eemaldati vaigult seguga I ning puhastati pöördfaaskromatograafiliselt 10 – 60 % ACN/30 min $r_t = 20,7$ (Lisa 6). Puhastatud aine pandi reageerima ARC-2102-ga DMF/fosfaatpuhvri segus (pH = 7,21 v/v; 95/5). Lahustunud hapniku eemaldamiseks degaseeriti solvente eelnevalt vaakumis ultrahelivannis ja hoiti argooni atmosfääris. Sünteesi analüüsiti pöördfaaskromatograafil gradiendil 20-40 % ACN/15 min + 40-80 %/10 min $r_t = 19,5$ min (Lisa 7).

3.8 Aktiivse PKAc kontsentratsiooni määramine

Valmistati puhver, mis sisaldas 50 mM HEPES-t (pH = 7,5), 150 mM NaCl-i, 7,5 μ M BSA-d ja 5 mM DTT-d. Ensüümi aktiivse kontsentratsiooni määramiseks analüüsiti PKAc-lahuse ensüümvalgu lahjendusseeriat alates 180 nM kontsentratsioonist, millele lisati fluorestsentssond kontsentratsiooniga 10 nM. Lahuse mikroplaadile kantav lõppruumala oli 20 μ l. Enne mõõtmist inkubeeriti lahuseid 30 °C juures 30 minutit ning järgnevalt mõõdeti lahuste aeglahutusega fluorestsentsi. Detektori kalibreerimiseks kasutati ARC-1063 10 nM lahust. Aktiivse kinaasi kontsentratsioon arvutati järgmise valemi abil:

$$Y = Y_{min} + M \times [EL_f] \quad (2),$$

kus Y – mõõdetud TRF signaal, Y_{\min} – taustsignaal, M -kompleksi molaarne intensiivsus, $[EL_f]$ – ensüümi-fluorestsentsligandi kompleksi tasakaaluline kontsentratsioon, mis arvutatakse valemist:

$$[EL_f] = \frac{k \times X + K_d + [L]_T - \sqrt{(k \times X + K_d + [L]_T)^2 - 4 \times X \times k \times [L]_T}}{2} \quad (3),$$

kus $[L]_T$ – ligandi summaarne kontsentratsioon, K_d – ligandi ja kinaasi kompleksi dissotsiatsioonikonstant, X – ensüümi summaarne kontsentratsioon, k – aktiivse ensüümi kontsentratsioon/summaarne ensüümi kontsentratsioon.

3.9 Konkurentse sidumise katsed

Mõõtelahused sisaldasid uuritavat ligandit (kolmekordne lahjendusseeria), ARC-1063 (10 nM; $K_d = 0,02$ nM) ja PKAc-d (aktiivne kinaasi kontsentratsioon 0,5 nM). Ensüümi inkubeeriti lahuseid 30 ja 60 minutit 30°C juures. Tulemuste arvutamiseks kasutati järgmist valemit:

$$Y = Y_{\min} + M \times [EL_f] \quad (4),$$

kus Y – mõõdetud TGL väärtus, Y_{\min} – taustsignaal, M -kompleksi molaarne intensiivsus, $[EL_f]$ – ensüümi-fluorestsentsligandi kompleksi tasakaaluline kontsentratsioon, mis arvutatakse valemist:

$$[EL_f] = \frac{j}{3 \times K_d + j} \times [L]_t$$

$$j = 2 \times \sqrt{d \times d - 3 \times e} \times \cos \frac{w}{3} - d$$

$$w = \arccos \frac{-2 \times d^2 \times d + 9 \times d \times e - 27 \times f}{2 \times \sqrt{(d \times d - 3 \times e)^3}} \quad (5),$$

$$f = -K_{D1} \times K_{D2} \times R_t$$

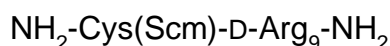
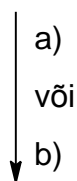
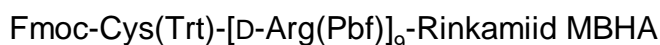
$$d = K_{D1} + K_{D2} + 10^X + [L]_T - R_t$$

$$e = (10^X - R_t) \times K_{D1} + ([L]_T + R_t) \times K_{D2} + K_{D1} \times K_{D2}$$

kus $[L]_T$ – ligandi summaarne kontsentratsioon, K_{D1} – ARC-1063-PKAc kompleksi dissotsiatsioonikonstant, K_{D2} – uuritava ligandi ja ensüümi kompleksi dissotsiatsioonikonstant, R_t – ensüümi summaarne kontsentratsioon.

Transportfragmendi nonaarginiini puhul katsetati mitut varianti, et leida kõige optimaalsem meetod ARC molekuli nonaarginiinile sidumiseks. Asümmetriliste disulfiidide moodustamiseks on vaja selektiivset reaktsiooni, kus üks tsüsteiini väävel on aktiveeritud ja teine mitte. See väldib olukorda, kus tekiks homodimeer kahe tsüsteiiniga märgistatud ARC või nonaarginiini vahele, mis vähendaks sünteesi saagist ja raskendaks saaduste puhastamist. Meetodid leiti kirjandusest ning uuriti, missuguse protokollil alusel moodustub kõige paremini väävel-väävelside. Oligoarginiin disainiti nii, et tsüsteiin paikneks N-terminaalses otsas (st oleks viimane peptiidahelasse liidetav aminohape), mis vähendaks tsüsteiini võimalikku ratsemisatsiooni edasise sünteesi käigus.

Fmoc-Cys(Scm)-D-Arg₉-NH₂ sünteesiti kahe erineva protokollil alusel. Esimesel juhul vahetati vaigul tsüsteiini Trt kaitserühm ScmCl abil aktiveeritud sulfanüülrühmaga tsüsteiiniks [14]. Antud meetodi saagis oli madal (0,28 % üle 3 etapi). Kromatogrammis oli näha saadusele vastav domineeriv piik ja sellest mitte hästi lahus olevad suurema retentsiooniajaga piigid. Lisaks jäi osa saadud toorproduktist lahustumatuks (Lisa 1). Teisel meetodil eemaldati Fmoc-Cys(Trt)-(D-Arg)₉-NH₂ TFA/CH₂Cl₂ seguga Trt kaitserühm ning ScmCl lisati TFA/DCM segus polümeerile, mille tulemusena Trt happekatalüütiline eemaldamine ja sulfanüülrühma reaktsioon ScmCl toimuvad samas etapis [32] (Joonis 13). Selle reaktsiooni saagis oli 5,2 % (üle 3 etapi), mis oli palju suurem võrreldes eelmise meetodiga. Antud tingimustes toimub vähesel määral saaduse vaigult eemaldumine. HPLC-analüüs näitas domineerivat piiki, mis vastas lõppsaadusele (Lisa 2). Võrreldes eelmise meetodiga oli lõpp-produkt eraldatav suurema saagisega, mis võib tuleneda sellest, et see meetod väldib oksüdatsioonitundliku vaba tsüsteiiniga peptiidi eraldamisetappi. Veendumaks, et Scm-kaitstud tsüsteiini ja nonaanarginiini sisaldav peptiid on võimeline disulfiidsidet moodustama, viidi läbi testreaktsioon heksaantiooliga. Reaktsioonisegu HPLC-MS analüüs näitas kõrgema retentsiooniajaga produkti teket, mille massispekter vastas tekkinud disulfiidile (Lisa 3).

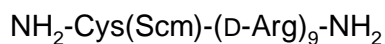
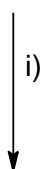
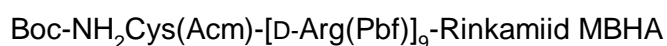


Joonis 13. Trt-kaitserühma asendamine Scm-ga, kus:

a) 1) DCM/TFA (1:1) + ScmCl (1,2 ekv) 3 tundi, 4 °C, 2) polümeerilt eemaldamine TFA/H₂O/TIPS (90/5/5; v/v/v), või

b) 1) ScmCl (1,2 ekv) DCM-s 3 tundi, 4 °C, 2) polümeerilt eemaldamine TFA/H₂O/TIPS (90/5/5; v/v/v)

NH₂-Cys(Scm)-D-Arg₉-NH₂ süntees põhines S-atseetamidometüül (Acm) kaitserühma asendamisel aktiivse Scm kaitserühmaga (Joonis 14). Selleks pandi Boc-Cys(Acm)-[D-Arg(Pbf)]₉-Rinkamiid-MBHA vaik reageerima ScmCl-ga. Sünteesi saagis oli 11,4 % (üle 5 etapi) ja seega on antud lähenemine kõige efektiivsem käsitletud meetoditest (Lisa 4). Ka sel juhul ilmnes vaigult eemaldatud saaduses vees ja atsetonitriilis lahustumatu sade.



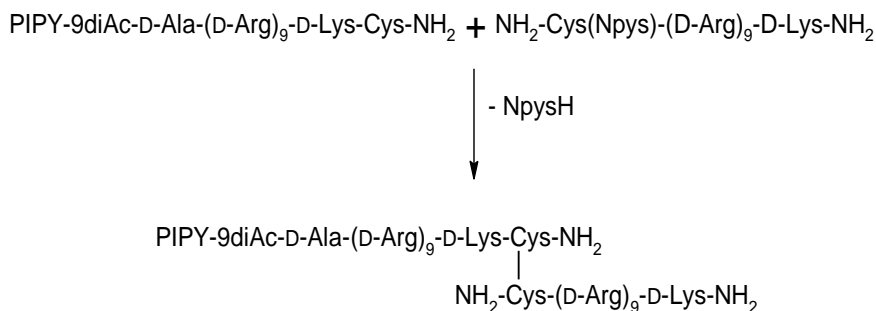
Joonis 14. Scm-kaitstud tsüsteiinide süntees, kus:

i) 1) ScmCl (1,2 ekv) DCM-s 3 tundi 4 °C 2) polümeerilt eemaldamine reagent K-ga TFA/fenool/tioanisool/H₂O/EDT (82,5/5/5/5/2,5; v/m/v/v/v)

Cys(Npys)-D-Arg₉-Lys-NH₂ kromatogrammil ei ilmnunud märkimisväärselt kõrvalsaadusi (Lisa 6). Tehtud katsed näitasid, et Npys-kaitserühma strateegial on märgatavaid eeliseid Scm-rühma ees. Kuna Npys-kaitstud Cys on kommertsiaalselt kättesaadav, siis saab selle peptiidisünteesi käigus otse peptiidahelaga liita. Npys-kaitserühmal on UV-alas temale iseloomulik neeldumine, mille abil saab määrata sünteesikulgu ja detekteerida reaktsiooni produkte. Kuid Npys kaitserühm on alusetundlik ning seega ei saa seda siiski kasutada Fmoc-sünteesistrateegias [33]. Samas Scm-kaitstud rühmal on omad eelised, näiteks on võimalik konverteerida erinevatest kaitserühmadest, mis annab sünteesis planeerimises suurema vabaduse ning võimaldab kavandada keerulisemaid Fmoc-kaitserühma kasutamisega sobivaid sünteesistrateegiaid.

4.1 ARC-2102-D-Arg₉-konjugaadi süntees

Disulfiidside sünteesiti Npys-kaitstud sisaldava oligoarginiini ja ARC-2102 vahel. Reaktsiooni segu HPLC-analüüsil oli näha nii vaba NpysH kui ka produkti teket (Lisa 7) ning vähesel määral ka reageerimata lähtematerjale (Joonis 15). Kokkuvõtlikult, kavandatud sünteesistrateegia oli ARC-2102-(D-Arg)₉-konjugaadi sünteesimiseks tulemuslik.

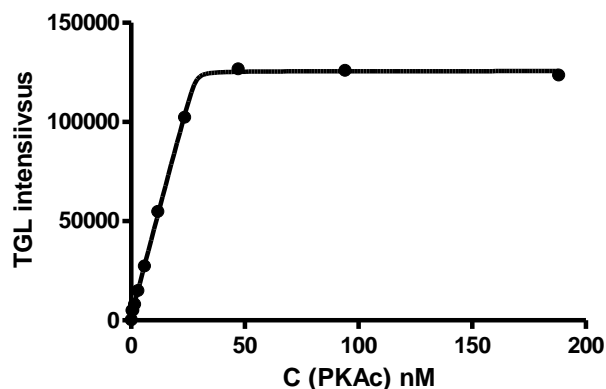


Joonis 15. Disulfiidsideme moodustamise reaktsioon.

4.2 Sünteesitud ühendite bioloogilise aktiivsuse iseloomustamine

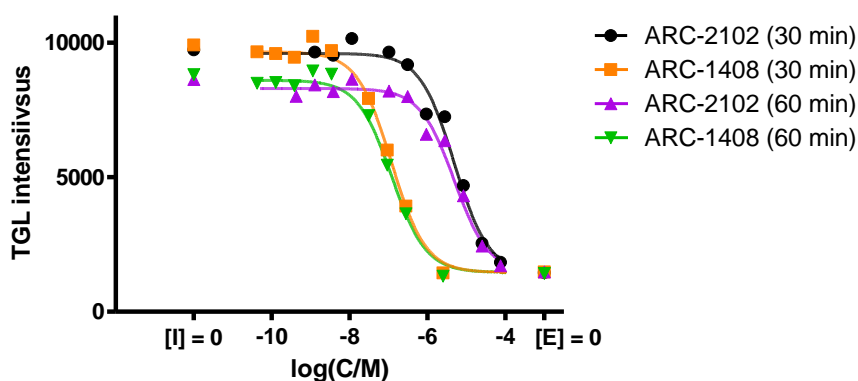
ARC-2102 PKAc-ga seondumisvõime kindlakstegemiseks kasutati konkureerivat sidumise meetodit, mis põhineb aeglahutusega fotoluminestsentskiirguse (TGL) mõõtmisel. Selle meetodi puhul alustatakse luminestsentssignaali kogumist alles teatud aja möödudes pärast proovi ergastamist. Selline lähenemine võimaldab vältida taustast tulenevat luminestsentsi ning samuti ka proovist emiteeruvat autofluorestsentsi. Seega parandab TGL meetod oluliselt signaal-müra suhet, mis võimaldab määrata selliste proovide luminestsentsi, kus on vaja väga kõrget tundlikkust [34]. Hiljuti on välja töötatud fluorestsentsmärgistatud ARC-inhibiitorid, mis sisaldavad tiofeeni või selenofeeni struktuure. Selliste ARC-de seondumisel PK puriini sidumistaskusse, teeb võimalikuks pika elueaga (19 – 266 µs) fotoluminestsentsi emiteerumine. Seevastu vaba fluorestsentsmärgistatud ligandist kiirguva signaali eluiga jääb mõne nanosekundi vahemikku [35].

Kuna kinaasi aktiivsus ajas väheneb, näiteks ensüümi denatureerumise tõttu, on tarvis iseloomustada aktiivse PK hulka kasutatavas ensüümi preparaadis. Kinaasi aktiivse kontsentratsiooni määramiseks tiitriti fikseeritud kontsentratsiooniga kõrgafiinse TGL-ligandi ARC-1063 lahust PKAc-ga (Joonis 16). Aktiivse kinaasi protsentuaalne kogus summaarsest ensüümvalgu hulgast jäi vahemikku 27 – 35 % (Joonis 12).



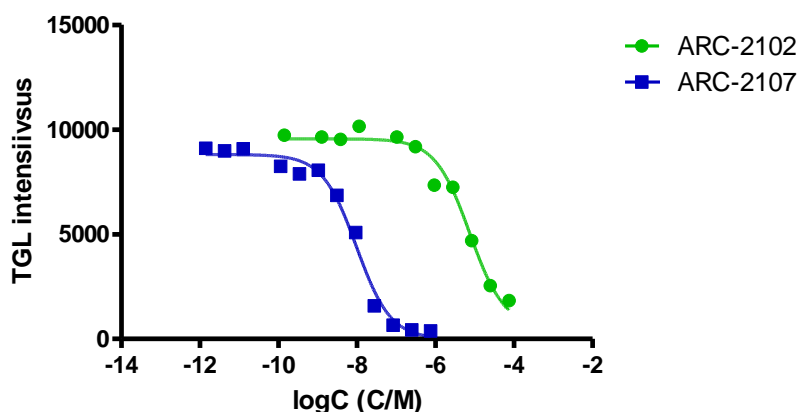
Joonis 16. ARC-1063 (10 nM) tiitrimine PKAc-ga.

Konkureeriva sidumise katse teostati PKAc kinaasi ja fluorestsentsligandi sisaldava ARC-1063 kompleksiga, kus võrdlusinhibiitoriks valiti varem kirjeldatud analoogse struktuuriga inhibiitor ARC-1408, mis omab inhibeerimiskonstandi (K_d) väärtust 0,19 nM [30]. Mõõtmised teostati lahuste kokku segamisest kahe inkubatsiooniaja möödumisel. 30- ja 60-minutilise inkubatsiooniajaga saadud tulemused langesid kokku, mis näitab, et komplekside moodustumine oli tasakaalu jõudnud (Joonis 17). ARC-2102 K_d väärtuseks leiti $1,2 \pm 0,9$ nM. Võrreldes ARC-1408-ga on ARC-2102-l pisut madalam afiinsus, mis võib tuleneda nii linkeri kui peptiidosa struktuuride erinevusest.



Joonis 17. Fluorestsentsligandi ARC-1063 väljatõrjumine PKAc kompleksist konkureerivate ligandidega ARC-2102 ja ARC-1408 30- ja 60-minutilise inkubatsiooniajaga.

Samuti võrreldi ARC-2102 ja ARC-2107 inhibiitoreid. Leiti, et disulfiidsidemega konjugaadil oli ligi kaks suurusjärku parem seondumine kinaasiga kui ARC-2102-l. Selline erinevus tuleneb arvatavasti arginiinide tunduvalt suuremast arvust, mis parandab inhibiitori seondumist kinaasi valksubstraadi aktiivtaskusse (Joonis 18).



Joonis 18. Fluorestsentsligandi ARC-1063 väljatõrjumine PKAc kompleksist konkureerivate ligandidega ARC-2102 ja ARC-2107.

ARC-2107 K_d väärtus jäi pikomolaarsesse piirkonda $1,35 \pm 1,15$ pM, mis erines ARC-2102-st kaks suurusjärku. Näiteks varasemalt kirjeldatud ARC-1411, mis sisaldas 6 arginiinijääki, oli K_d väärtus 2 pM. 11 arginiinijääki sisaldaval peptiidil ARC-2107 jäi K_d -väärtus samasse piirkonda. Järelikult üle 6 arginiini peptiidossa lisamine muudab antud struktuuride afiinsust vähe (Tabel 1).

Tabel 1. ARC-i struktuurid ning nende dissotsiatsioonikonstandid PKAc suhtes. * käesolevas töös mõõtmata IC_{50} väärtus.

ARC-kood	Struktuur	K_d [nM]	IC_{50} [nM]
ARC-1408	PIP _Y -9diAc-D-Arg-Ahx-DArg-NH ₂	$0,31 \pm 0,06$ 0,19 [30]	167 ± 51
ARC-2102	PIP _Y -9diAc-D-Ala-Ahx-(D-Arg) ₂ -D-Lys-Cys-NH ₂	$1,2 \pm 0,9$	612 ± 432
ARC-1411	PIP _Y -9diAc(DArg) ₆ -D-Lys-NH ₂	0,002 [30]	*
ARC-2107	PIP _Y -9diAc-D-Ala-Ahx-(D-Arg) ₂ -D-Lys-Cys-NH ₂ Cys-(D-Arg) ₉ -D-Lys-NH ₂	$0,014 \pm 0,008$	$4,5 \pm 3,2$

6 Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli leida sobiv meetod, kuidas sünteesida transportpeptiidiga konjugeeritav ARC-tüüpi inhibiitor ja oligoarginiinist koosnev transportmolekul ning siduda need omavahel disulfiidsidemega. Saamaks teada disainitud molekulide omadusi, tuli iseloomustada ainete afiinsuseid PKA suhtes.

Transportpeptiidi sünteesi strateegias lähtuti kahe rühmaga modifitseeritud Cys derivaatidest (Scm ja Npys). Esimene Scm-rühm moodustub kaitserühma reageerimisel ScmCl-ga. Npys-rühmaga kaitstud Cys derivaati oli võimalik muretseda sünteesifirmast, mis tegi selle meetodi lihtsaks. Seejärel viidi läbi testreaktsioone, et veenduda ainete reageerimisvõimes. Sünteeside käigus veenduti, et kõige paremini on võimalik Scm kaitserühmaks konverteerida tsüsteiini kaitserühma AcM, kuid kõige laialdasemalt kasutatav Trt-kaitserühma reaktsioonidel on aktiivse Scm-rühma moodustumine vähem efektiivne. Disulfiidsideme moodustamisel lähtuti mõlemast aktiveeritud kaitserühmast ning ARC-tüüpi inhibiitori tsüsteiini sulfanüülrühma reaktsioonist. Kõik ained puhastati pöördfaaskromatograafiliselt.

Seejärel sünteesiti inhibiitor ARC-2102, mille struktuuri peptiidosas oli kaks arginiini. ARC-2102 iseloomustati konkureerival sidumise meetodil, mis põhineb aeglahutusega fotoluminescentskiirguse detekteerimisel, kasutades võrdlusainena varasemalt sünteesitud ARC-1408, mis sisaldas samuti kaht arginiini. Nii referentsaine kui ka ARC-2102 afiinsused jäid subnanomolaarsesse piirkonda (K_d väärtused vastavalt 0,19 ja 1,2 nM).

Cys(Npys)-i ja oligoarginiini sisaldav peptiidiga toimus edukalt ARC-tüüpi inhibiitori disulfiidsidestamine. ARC-2102 inhibiitori sidumine oligoarginiine sisaldava fragmendiga suurendas ühendi afiinsust PKAc suhtes (uue konjugaadi ARC-2107 K_d oli 14 pM). Kuna saadud ühend omab potentsiaalselt lähteühendist efektiivsemat võimet läbida raku plasmamembraani, siis edasises tegevuses tuleks jätkata rakukatsetega, et välja selgitada sünteesitud aine täpsemad omadused (näiteks raku plasmamembraani läbimisvõime, bioloogiline aktiivsus, lokalisatsioon rakkudes ning toksilisus).

7 Summary

Conjugation of oligoarginine vector and bisubstrate inhibitor of protein kinase for enhanced cellular delivery

The goal of this research was to find a suitable method to combine the transport molecule consisting of oligoarginine and an ARC-type inhibitor by using a disulphide bond. In addition, the inhibitor able to conjugate with a transport peptide was needed to be synthesised. In order to establish the characteristics of the designed molecules, the affinity of substances towards target kinase PKA was studied.

The conjugation strategy of oligoarginine to compound was based on reaction of Cys activated by two groups (Scm or Npys). In first strategy, the formation of Scm was obtained by the replacement of AcM and Trt protecting groups, which were activated by ScmCl. The derivative of Npys-protected Cys was commercially available. The test reactions were performed in order to ensure the reactivity of substances. During the syntheses, it was verified that the most promising method to convert Scm into a protecting group was in the presents of protecting group AcM of cysteine. Still, this reaction type has a relatively low yield when using the widely used Trt-protecting group instead of AcM-group. The formation of disulphide bond occurred between either of the activated protecting groups and the cysteines sulfanyl group in the structure of ARC-type inhibitor. All compounds were purified by using the reverse-phase liquid chromatography.

Subsequently, an ARC-type inhibitor containing two arginine residues in peptide part was synthesised. The novel compound was described by the competitive displacement method with time-resolved fluorescence (TRF) read-out. In addition, the comparison of novel ARC-2102 and previously synthesized and characterized ARC-1408 was performed. The obtained K_d values remained in the subnanomolar range (K_d values 0.19 nM and 1.2 nM, respectively).

The formation of disulphide bond between the oligoarginine fragment containing active Npys-group, and ARC-type inhibitor was successful. When the compound ARC-2102 was modified by adding arginine residues, the K_d values of the obtained conjugate ARC-2107 remained in the picomolar range ($K_d = 14$ pM). As ARC-2107 contained oligo-arginine fragment and thus potentially has the cell plasmamembrane penetrating properties, the further reserch should focus on the characterization of ARC-2107 in live cell experiments, *e.g.*, to determine the cell plasma membrane penetrating properties of the compound, its biological activity, localization in live or fixed cells, and toxicity.

8 Kasutatud kirjanduse loetelu

1. Hunter, T.; Why nature chose phosphate to modify proteins. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **2012**, 367, 2513–2516
2. Schwartz, P. A.; Murray B.W. Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg. Chem.* **2011**, 39, 5-6, 192 – 210.
3. Shen, K.; Hines, A. C.; Schwarzer, D.; Pickin, K. A.; Cole, P. A. Protein kinase structure and function analysis with chemical tools. *Biochimica et Biophysica Acta.* **2005**, 1754, 65 – 78.
4. Cheng, H.-C.; Qi, R. Z.; Paudel, H.; Zhu, H.-J. Regulation and Function of Protein Kinases and Phosphatases. <http://www.hindawi.com/journals/er/2011/794089/>, vaadatud 29.05.2015.
5. Kristallstruktuur RCSB Protein Data Bank leheküljelt, PDB 1ATP, autorid: Zheng, J.; Trafny, E. A.; Knighton, D.R.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Ten Eyck, L.F.; Sowadski, J. M., töödeldud programmiga Pymol. Viimati alla laetud 28.05.2015.
6. Knapp, V.; Sundström, M. Recently targeted kinases and their inhibitors – the path to clinical trials. *Current Opinion in Pharmacology.* **2014**, 17, 58 – 63.
7. Bogoyevitch, M. A.; Barr, R. K.; Ketterman, A. J. Peptide inhibitors of protein kinases discovery, characterisation and use. *Biochimica et Biophysica Acta.* **2005**, 1754, 1-2, 79 – 99.
8. Krauss, G. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co: Weinheim, **2003**. pp 231 – 234.
9. Lavogina, D.; Enkvist, E.; Uri, A. Bisubstrate Inhibitors of Protein Kinases: from Principle to Practical Applications. *ChemMedChem.* **2010**, 5, 1, 23 – 34.
10. Taylor, S. S.; Kim, C.; Vigil, D.; Haste, N. M.; Yang, J.; Wu, J.; Anand, G. S. Dynamics of signaling by PKA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* **2005**, 1754, 1–2, 25–37.
11. Taylor, S. S.; Kim, C.; Cheng, C.Y.; Brown, S. H.J.; Wu, J.; Kannan, N. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: Diverse strategies for drug design. *Biochimica et Biophysica Acta.* **2008**, 1784, 16 – 26.

12. Hardie, D. G. Protein phosphorylation, 2nd ed: A practical approach. Oxford University Press, New York, **2000**, pp 222 – 225.
13. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide J. Am. Chem. Soc., **1963**, 85, 14, pp 2149 – 2154.
14. Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. CRC Press. Barcelona, **1997**.pp 19-95, 209-236.
15. Kaiser, E.; Colescott, R.L.; Bossinger, C.D.; Cook, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Anal. Biochem. **1970**, 34, 2, 595–598.
16. Mařík, J.; Song, A.; Lam, K. S. Detection of primary aromatic amines on solid phase. Tetrahedron Letters. **2003**, 44, 23, 4319–4320.
17. Barlos, K.; Gatos, D.; Koutsogianni. Fmoc/Trt-amino acids: comparison to Fmoc/tBu-amino acids in peptide synthesis. J. Peptide Res. **1998**, 51, 194-200.
18. Postma, T. M.; Albericio F. Disulfide formation strategies in peptide synthesis. Eur. J. Org. Chem. **2014**, 2014, 17, 3519–3530.
19. Stipanuk, M. H. Sulfur amino acid metabolism: Pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. Annual reviews. 2004, 24, 539–577.
20. Chang, X.; Jørgensen, A. M. M.; Bardrum, P.; Led, J. J. Solution structures of the R6 Human insulin hexamer. biochemistry. **1997**, 36, 31, pp 9409–9422.
21. Kudryavtseva, E. V.; Sidorova, M.V.; Evstigneeva, R. P. Some peculiarities of synthesis of cysteine-containing peptides. Russian Chemical Reviews. **1998**, 67, 7, 545 – 562.
22. Chan, W. C.; White, P. D. Fmoc solid phase peptide synthesis. Oxford University Press. New York, **2000**, pp 1-111.
23. Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. Amino acid-protecting groups Chem. Rev. **2009**, 109, 2455–2504.
24. Erazo-Oliveras, A.; Muthukrishnan, N.; Baker R.; Wang, T.-Y.; Pellois J.-P. Improving the endosomal escape of cell-penetrating peptides and their cargos: strategies and challenges. Pharmaceuticals. **2012**, 5, 1177 – 1209.

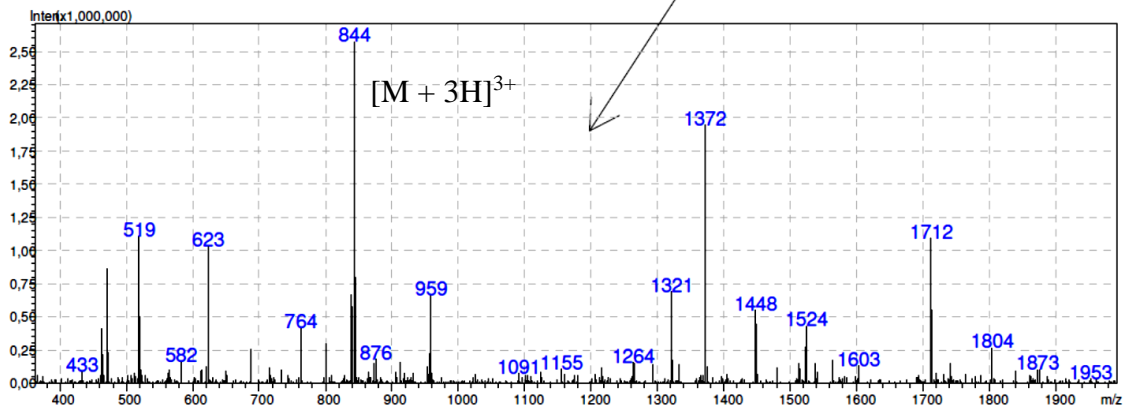
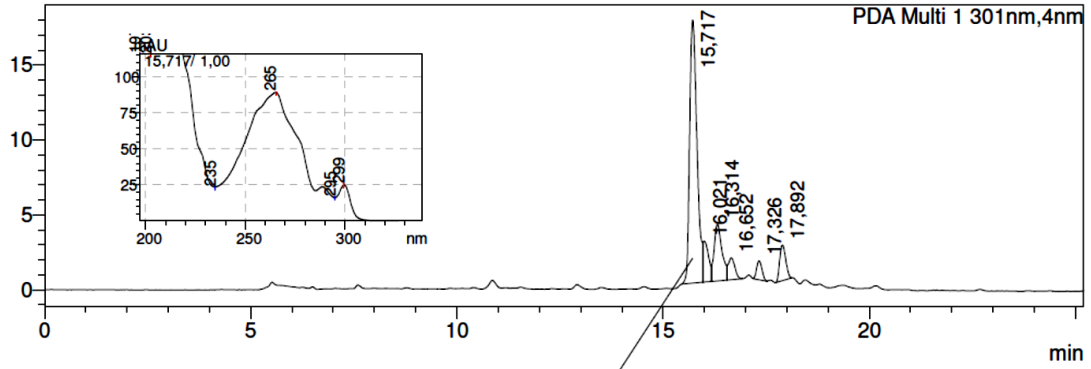
25. R. R. Sawant, R. R. Patell, N. R.; Torchilin, V. P. Therapeutic delivery using cell-penetrating peptiides. *European Journal of Nanomedicine*. 2013, 5, 3, 141–158.
26. Copolovici, D. M.; Langel, K.; Eriste, E.; Langel, Ü. Cell-Penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *American Chemical Society*. 2014, 8, 3, 1972–1994.
27. Wagstaff, K. M.; Jans, D. A. Protein transduction: Cell penetrating peptides and their therapeutic applications current medicinal chemistry. **2006**, 13, 1371–1387.
28. Mitchell, D.J.; Kim, D.T.; Steinman, L. Fathman, C.G. Rothbard, J.B. Polyarginine enters cells more effciently than other polycationic homopolymers. *J. Peptide Res*. **2000**, 56, 318–325.
29. Jiang, Soomets, Langel, Design and synthesis of cell-penetrating peptides - handbook of CPPs. **2007**, pp 534 – 551.
30. Viira, B. Synthesis of inhibitors for protein kinases PKA and PKB, Master thesis. 2012, University of Tartu, Tartu, Estonia.
31. Mitchell, D. J.; Kim, D.T.; Steinman, L. Fathman, C. G.; Rothbard, J. B. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Pept Res*. **2000**, 56, 5, 318 – 25.
32. Zalipsky, S.; Mullah, N.; Engbers, C.; Hutchins, M. U.; Kiwan, R. Thiolytically cleavable dithiobenzyl urethane-linked polymer–protein conjugates as macromolecular prodrugs: reversible PEGylation of proteins. *Bioconjugate Chem*. **2007**, 18, 1869–1878.
33. Alberico, F.; Andreu, D.; Giralt, E. Navalpotro, C.; Pedroso, E.; Ponsati, B. Ruiz-Gayo, M. Use of the Npys thiol prodecting in solid phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res* **1989**, 34,124-128.
34. Song, X.; Quirk, S. Time-resolved luminescence detection and imaging promises a bright future. *J Biosens Bioelectron*. **2012**, 3–5, <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6210.1000e115>
Vaadatud 28.05.2015.
35. Enkvist, E.; Vaasa, A.; Kasari, M.; Kriisa, M.; Ivan, T.; Ligi, K. Raidaru, G.; Uri, A. Protein-induced long lifetime luminescence of nonmetal probes. *ACS Chem. Biol*. **2011**, 6, 1052–1062.

9 Lisad

LISA 1

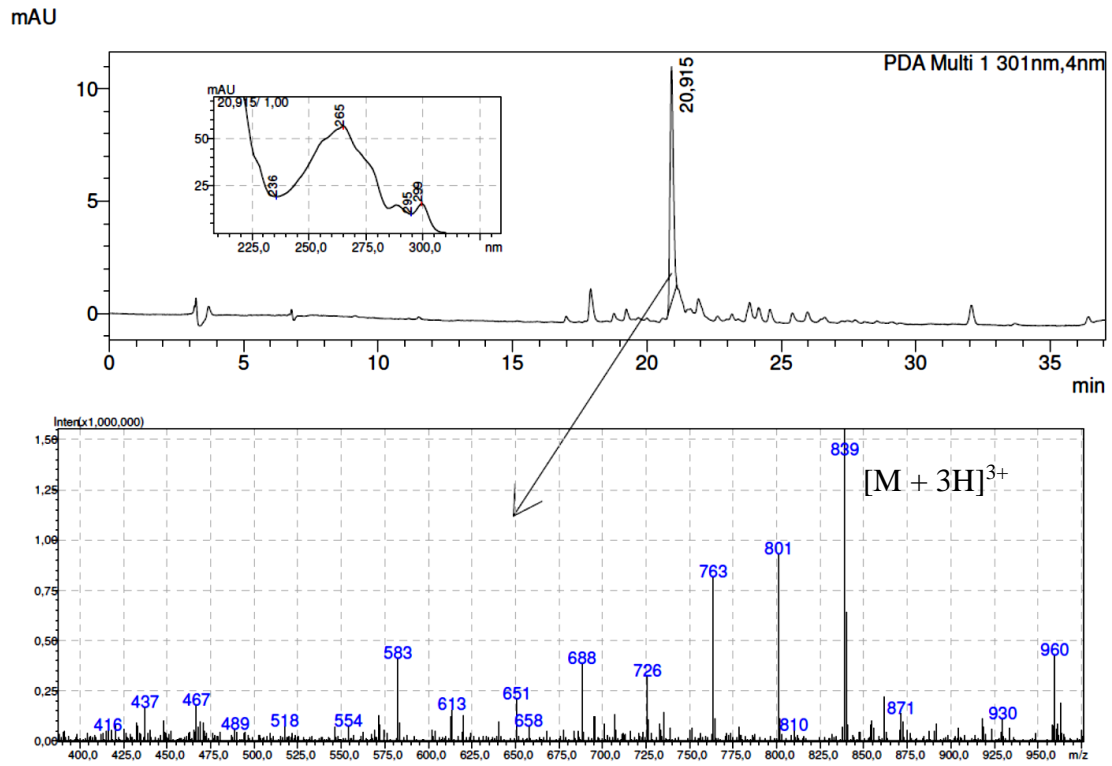
HPLC-MS andmed: Fmoc-Cys(Scm)-(D-Arg)₉-NH₂ süntees I (C₇₄H₁₂₈N₃₈O₁₄S₂)

mAU



LISA 2

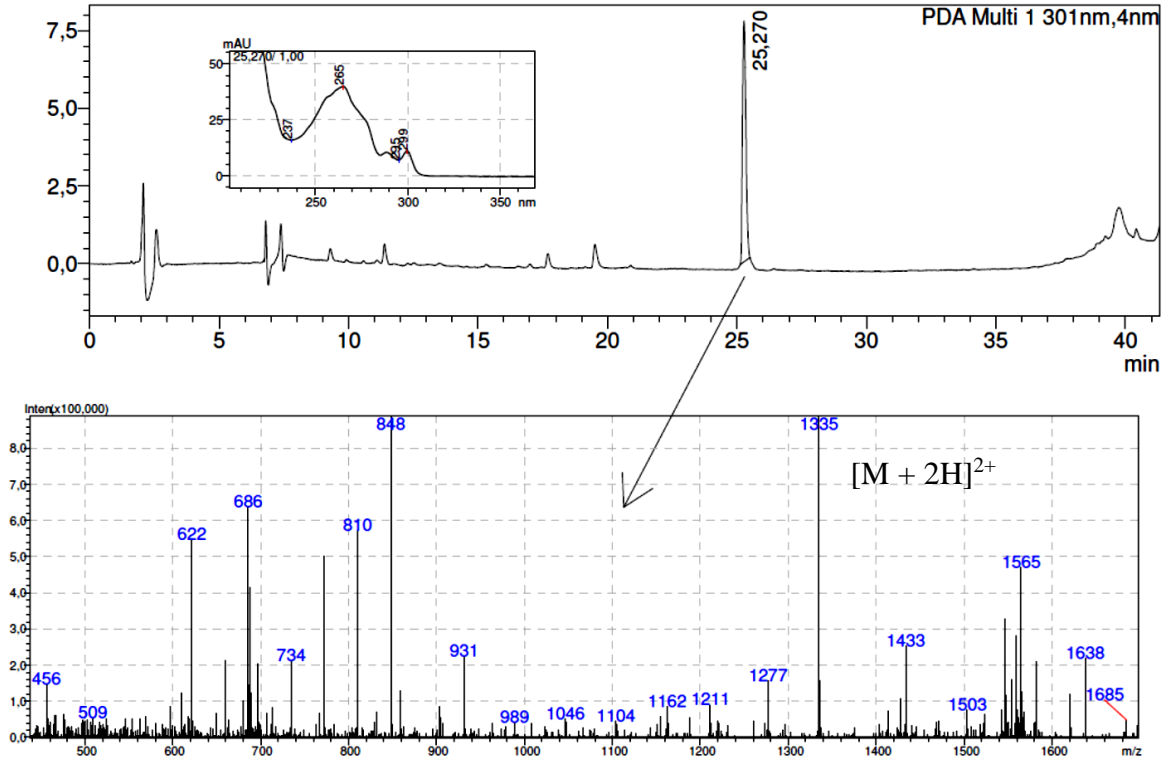
HPLC-MS andmed: Fmoc-Cys(Scm)-D-Arg⁹-NH₂ süntees II (C₇₄H₁₂₈N₃₈O₁₄S₂)



LISA 3

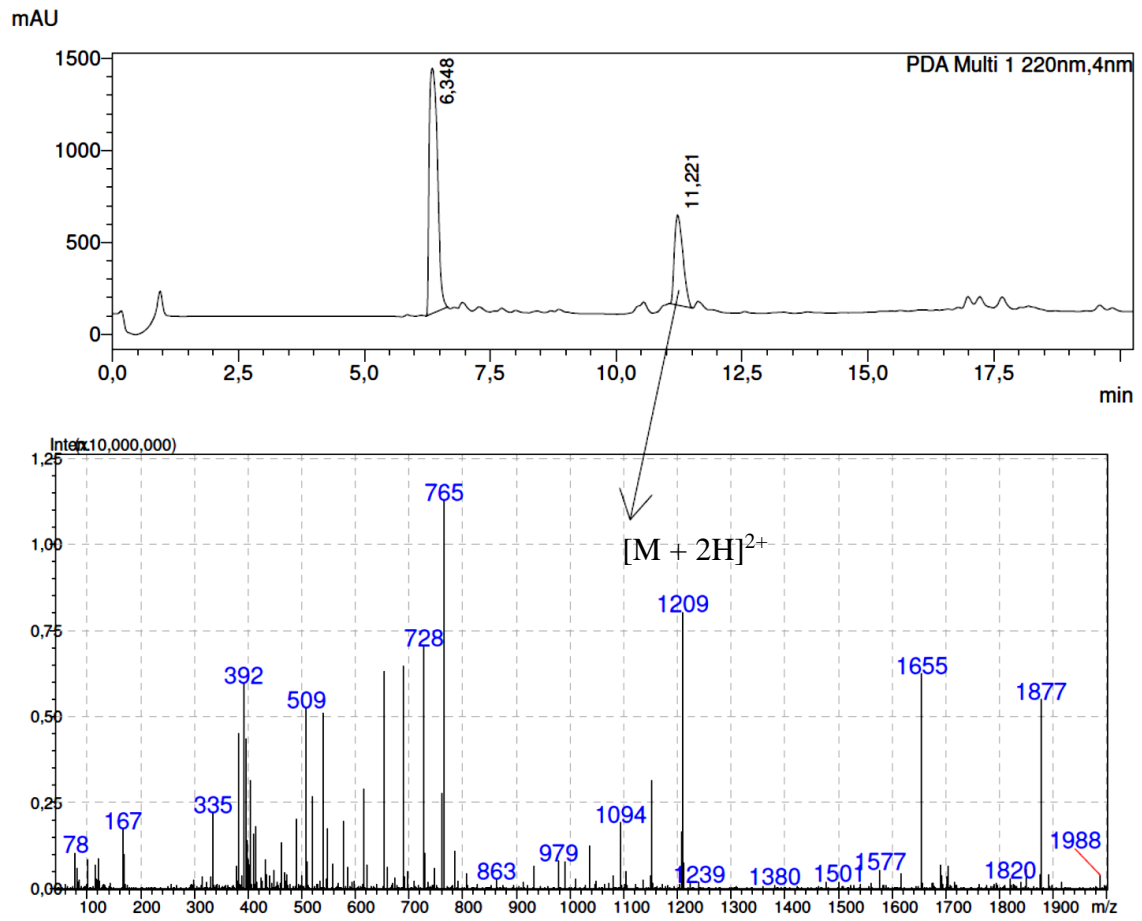
HPLC-MS andmed: Fmoc-Cys(S-Hex)-D-Arg⁹-NH₂ süntees II (C₇₈H₁₃₈N₃₈O₁₂S₂)

mAU



LISA 4

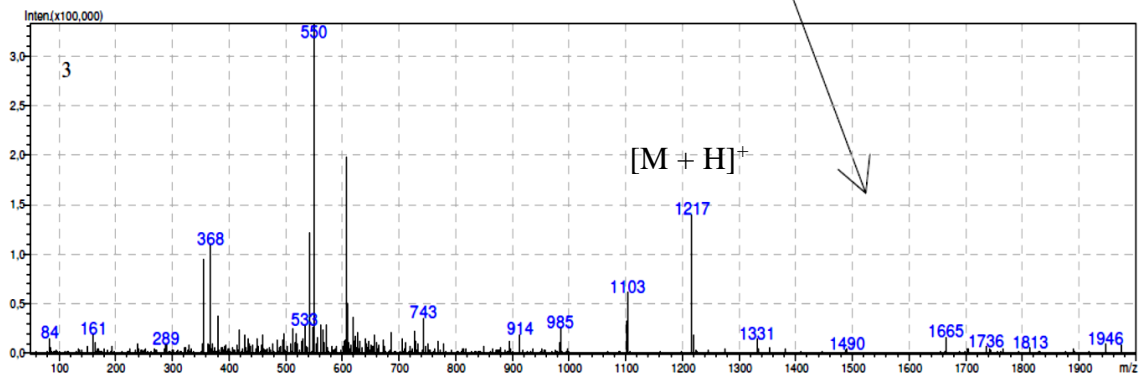
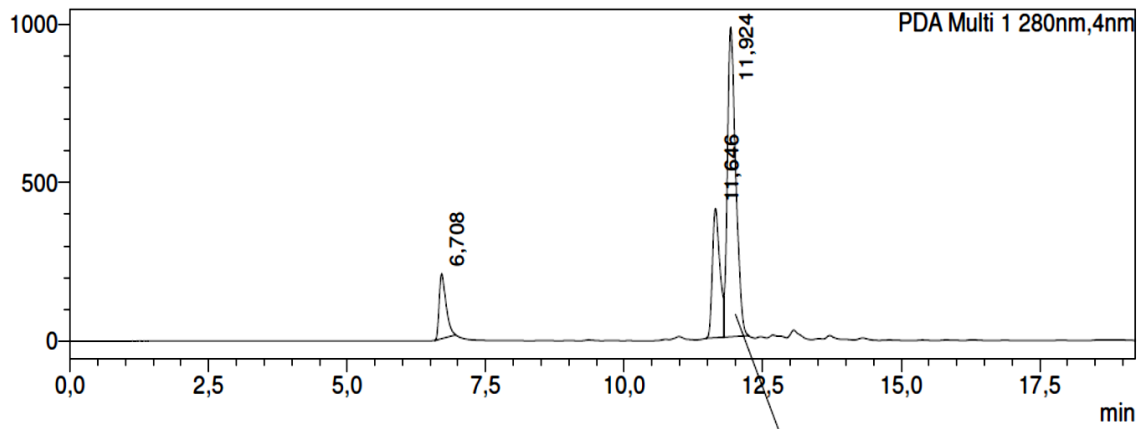
HPLC-MS andmed: NH₂-Cys(Scm)-D-Arg⁹-NH₂ süntees (C₅₉H₁₁₈N₃₈O₁₂S₂)



LISA 5

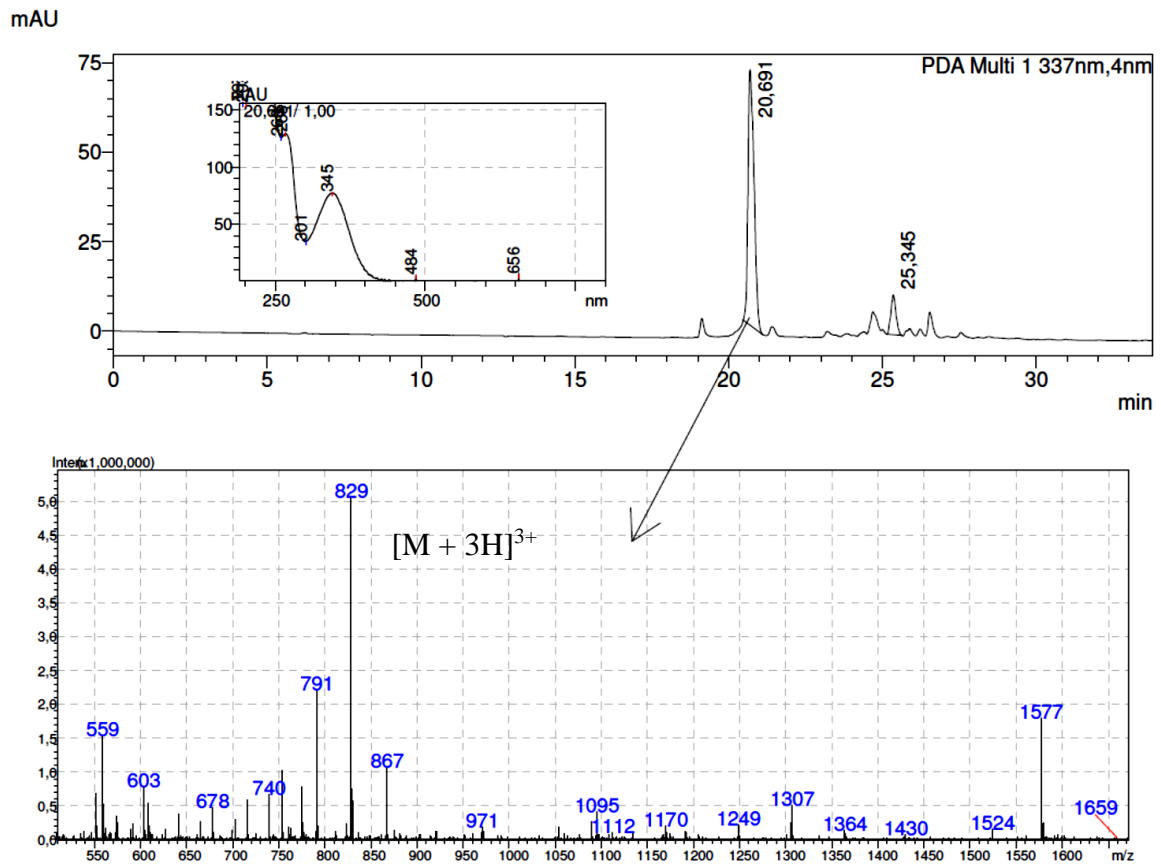
HPLC-MS andmed: PIPY-9diAc-D-Ala-Ahx-(D-Arg)₂-D-Lys-Cys-NH₂ (ARC-2102) süntees
(C₄₉H₈₅N₁₉O₈S)

mAU



LISA 6

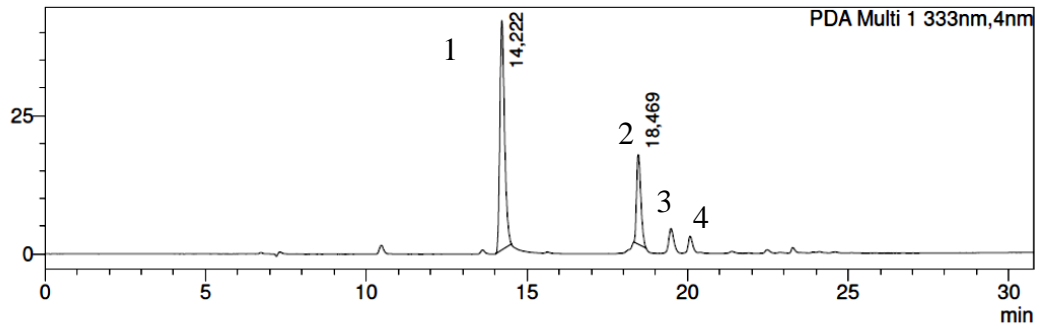
HPLC-MS andmed: H₂N-Cys(Npys)-D-Arg⁹-D-Lys-NH₂ süntees (C₆₂H₁₁₈N₄₀O₁₂S₂)



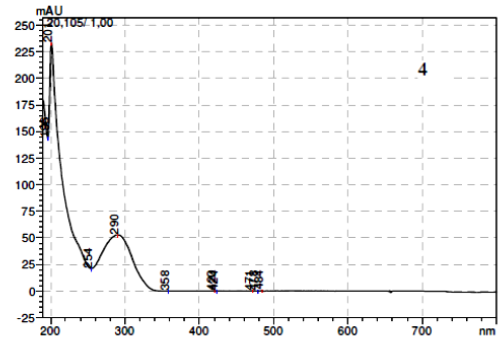
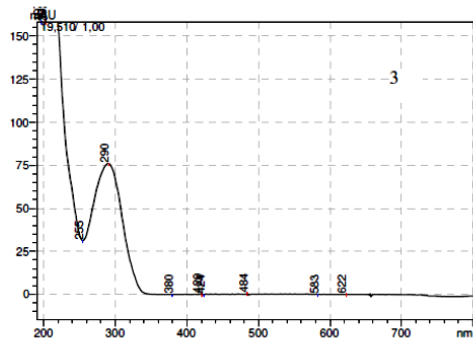
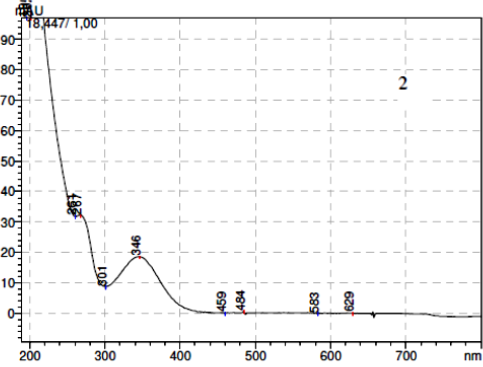
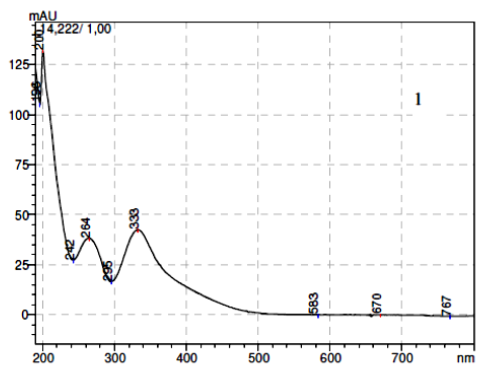
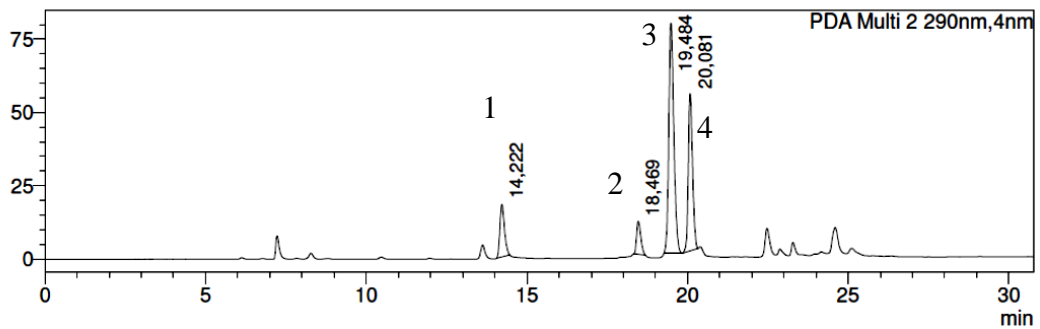
LISA 7

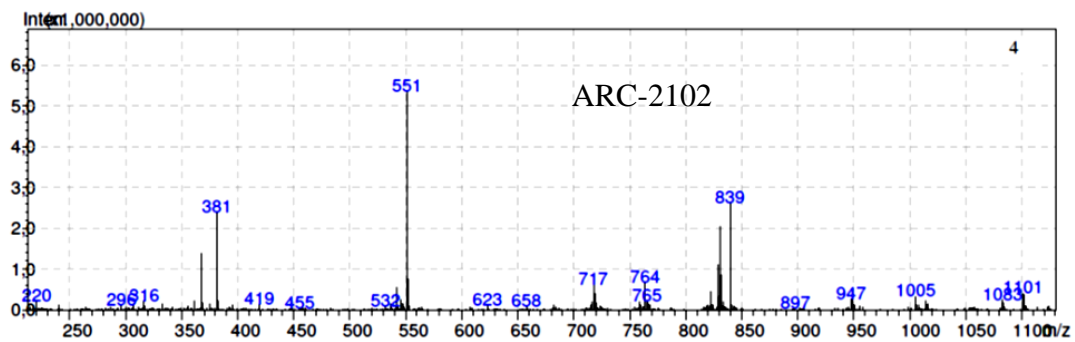
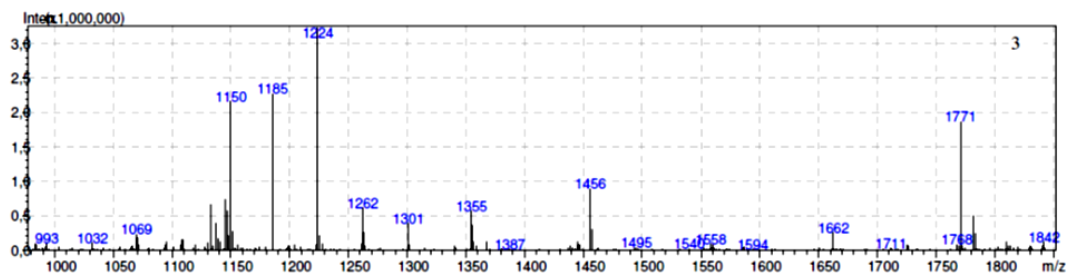
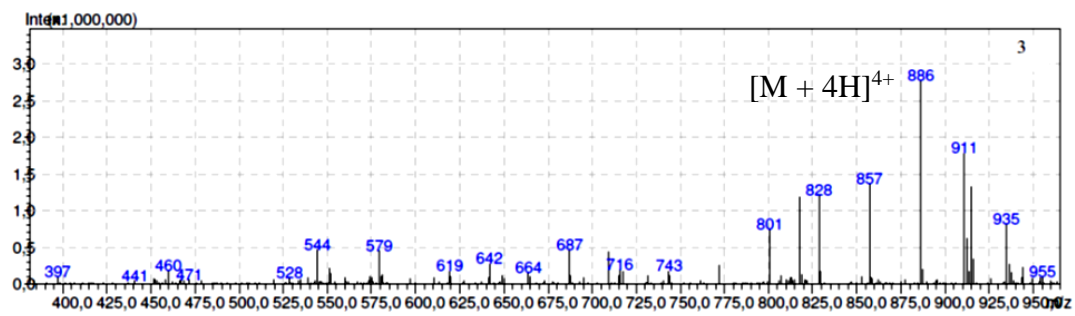
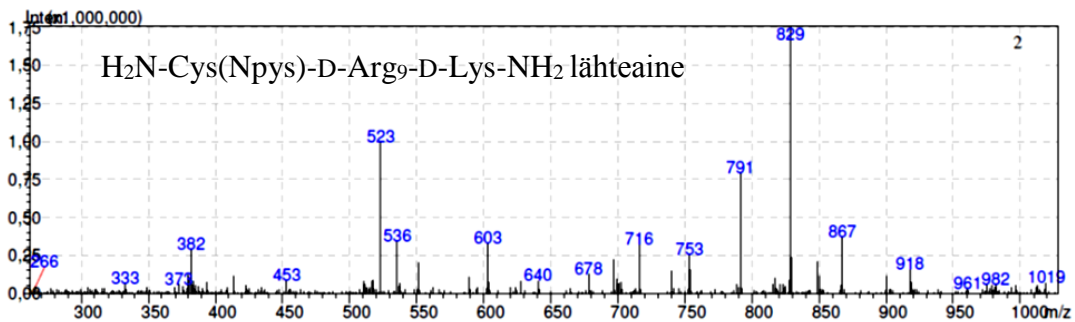
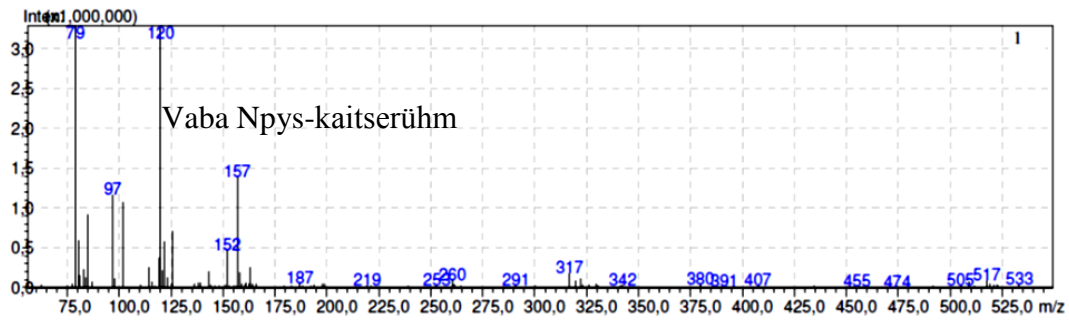
HPLC-MS andmed: PIPY-9diAc-D-Ala-Ahx-(D-Arg)₂-D-Lys-Cys-NH₂ sūntees
 (C₁₁₆H₁₉₉N₅₇O₁₈S₂) NH₂-Cys-(D-Arg)₉-D-Lys-NH₂

mAU



mAU





Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, _____ Taavo Tähtjärvi _____,
(*autori nimi*)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Oligoarginiinvektor proteiinkinaasi bisubstraatse inhibiitori rakkuviimiseks ,
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on _____ Kaido Viht,
(*juhendaja nimi*)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **29.05.2015**