

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Helin Räägel

**BISUBSTRAATNE INHIBIITOR ARC SURUB EFEKTIIVSELT MAHA RHO-
KINAASIST LÄHTUVAID SIGNAALIRADASID RAKUKULTUURIS**

Magistritöö

Juhendajad: Margus Pooga, Ph.D
Sulev Ingerpuu, Ph.D

Tartu 2007

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
PROTEIINKINAASID	5
RHO PEREKONNA VÄIKESED GTPAASID	5
RHO-KINAAS EHK ROCK	7
RHO-KINAASI INHIBIITORID	8
Y-27632	8
ARC-341	10
RAKKU PENETREERUVAD PEPTIIDID (RPP)	11
Arginiinirikkad peptiidid	11
TÖÖ EESMÄRGID	14
KASUTATUD MATERJALID JA METOODIKA	15
RAKUD	15
KASUTATUD INHIBIITORID JA KEMIKAALID	15
FLUORESTSENTSMIKROSKOPIA	15
ARC-343 sisenemine rakkudesse ja klorokviini efekt ARC-i sisenemisele.....	15
Aktiinifibrите dissotsiatsioon HeLa rakkudes ARC-341 või Y-27632 toimel.....	15
ARC-i sisaldavate vesiikulite happelisuse määramine LysoSensoriga.....	16
Fokaalsete kontaktide ning adhesioonide visualiseerimine ARC-341 või Y-27632 töödeldud rakkudes.....	16
ROCK2 AFIINSUSKROMATOGRAAFIA	16
WESTERN BLOT AFIINSUSKROMATOGRAAFIA FRAKTSIOONIDE ANALÜÜSIMISEKS	17
TOKSILISUSE TEST MTT MEETODIL	18
ARC-341 JA Y-27632 TOIMEL DISSOTSIEERUNUD AKTIINI HULGA KVANTIFITSEERIMINE WESTERN BLOT ANALÜÜSIGA	18
RAKKUDE LIIKUMISE MÕÕTMINE HAAVA PARANEMISE KATSEGA (WOUND HEALING ASSAY).....	18
ARC-343 LOKALISATSIOON HELa RAKKUNDES PÄRAST MIKROSÜSTIMIST	19
TULEMUSED	20
ARC SISENE RAKKUNDESSE ENAMASTI ENDOTSÜTOOSI TEEL, KUID VABANEH HILJEM VESIIKULITEST. KLOOROKVIIN SOODUSTAB ARC-I VABANEMIST VESIKULAARSETEST STRUKTUURIDEST	20
ARC ESINEB RAKKUNDES EELKÕIGE VARASEMATES JA HILISEMATES ENDOSOOMIDES NING TAKISTAB MÕNINGAL MÄÄRAL LÜSOSOOMIDE KÜPSEMIST	21
ARC SEOB RHO-KINAASI RAKULÜSAADIS	23
ARC TAKISTAB AKTIINI TSÜTOSKELETI MOODUSTUMIST	23
KLOOROKVIIN TUGEVDAB ARC-341 INHIBIITOORSET EFEKTI	26
ARC-341 PÕHJUSTAB AKTIINIFIBRITE DISSOTSIEERIMIST OLIGOMEERIDEKS EFEKTIIVSEMALT KUI Y-27632 ..	27
Y-27632- NING ARC-341-TÖÖTLUS MUUDAVAD RAKUD LIKUVAKS	28
Y-27632-TÖÖDELDUD RAKKUNDE FOKAALSED KONTAKTID ON NÕRGENENUD, ARC-341-GA INKUBEERITUD RAKKUNDEL ON FOKAALSED KONTAKTID TUGEVAMAD	30
ARC-341 EI OLE RAKKUNDELE TOKSILINE	33
ARUTELU	34
KOKKUVÕTE	40
SUMMARY	42
KASUTATUD KIRJANDUS	44

KASUTATUD LÜHENDID

AP	aluseline fosfataas
ARC	adenosiin-oligoarginiini konjugaat
BSA	veise seerumi albumiin
DTT	ditiotreitool, Clelandi reagent
EDTA	etüleendiamiintetraädikhape
FCS	veise loote vereseerum
FITC	fluorestsein-isotiotsüanaat
GAP	GTPaasset aktiivsust tõstev valk
GEF	guanosiinnukleotiidi vahetusfaktor
(E)GFP	roheliselt fluorestseeruv valk
GTPaasid	GTP-hüdrolüüsi vahendavad valgud
LDH	laktaadi dehüdrogenaas
LPA	Lüsofosfatidüülhape
MLC	müosiini kerge ahel
MLCK	müosiini kerge ahela kinaas
MTT	3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid
NFDM	Lõssipulber
PBS	fosfaat-puhverdatud soolalahus
PFA	Paraformaldehüüd
PKA	proteiinkinaas A
PMSF	fenüülmetüülsulfonüülfluoriid
ROCK	Rho-kinaas
RPP	rakku penetreeruv peptiid
SDS	naatrium dodetsüülsulfaat
TAMRA	Tetrametüülrodamiin
TBS	Tris-puhverdatud soolalahus

SISSEJUHATUS

Proteiinkinaaside täpne regulatsioon on vajalik mitmete rakuliste protsesside käivitamiseks ja läbiviimiseks ning häired nende aktiveerimisel/inaktiveerimisel võivad põhjustada haiguste tekkimise. Aktiini tsütoskeleti moodustumise ja dünaamika eest vastutab Rho-kinaas, mis aktiveeritakse vastusena välisele signaalile RhoA poolt ning fosforüülib mitmeid valke ja ensüüme. Rho-kinaasist lähtuv signaalirada põhjustab nii otseselt kui kaudselt aktiinifibriles sisalduva müosiini kerge ahela fosforüülitusastme tõusu, mis viib aktiini tsütoskeleti moodustumisele, olemasolevate fibrile tugevnemisele ja mehhaanilise pinge moodustumisele rakkudes. Aktiini tsütoskeleti tugevnemisega on otseselt seotud ka substraadiga seotud fokaalsete kontaktide tugevnemine ning kontaktide küpsemine fokaalseteks adhesioonideks.

Rho-kinaaside funktsioonide uurimiseks ning tema hüperaktivatsiooni tagajärjel välja kujunenud haiguste raviks on siiani kasutatud sünteetilist inhibiitorit Y-27632. Nagu enamuse teistelegi proteiinkinaasidele sünteesitud inhibiitoritest, konkureerib Y-27632 ATP-ga ensüümi ATP-sidumistsentrisse seondumisel, takistades ülekandeks vajaliku fosfaatrühma seondumist kinaasile. Mitmed antud strateegia põhjal välja töötatud inhibiitorid ei oma piisavat substraadi spetsiifikat ning mõjuvad teistelegi signaaliradadele.

Uutlaadi bisubstraatse strateegia alusel disainitud Rho-kinaasi inhibiitor ARC on tugevalt afiinne Rho-kinaasi suhtes ning suudab *in vitro* Y-27632-st efektiivsemalt ensüümi aktiivsust inhibeerida. Käesolevas töös uuriti 6 arginiinijääki sisaldavat peptiidset motiivi omava ARC-i võimet inhibeerida Rho-kinaasi aktiivsust rakukultuuris. Esmalt kontrolliti ühendi sisenemiseefektiivsust ja lokalisatsiooni elusrakkudes ning tema võimet seondada rakulises keskkonnas oma sihtmärki Rho-kinaasi. Seejärel kirjeldati inhibiitori toimet aktiini tsütoskeletile, substraadile kinnitumiseks vajalike struktuuridele ja rakkude migreerumisele ning võrreldi saadud tulemusi Y-27632-töödeldud rakkudega.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid on olulisteks molekulaarseteks lülititeks enamikes rakulistes protsessides ning nende kontsentratsioon ja aktiivsus on tugeva kontrolli all, tagamaks normaalset rakutegevust (Smits ja Medema, 2001; Galderisi *et al.*, 2003; Gerthoffer, 2005). Proteiinkinaaside aktiivsuse ebakorrektnen reguleerimine võib põhjustada kõrvalekaldeid rakulistes protsessides ning kutsuda esile erinevate haiguste avaldumise (Testa ja Tschlis, 2005; Budzyn *et al.*, 2006). Mitmed olulised protsessid rakkudes vajavad aktiini tsütoskeleti keerulist ning täpset regulatsiooni, mille eest vastutavad erinevad proteiinkinaasid, fosforüülides oma sihtmärke ning andes aluse signaaliradade toimimisele kõnealuste protsesside läbiviimiseks (Riento ja Ridley, 2003). Aktiini tsütoskeleti organiseerumisel mängivad tähtsamat rolli kaks erinevat proteiinkinaasi – müosiini kerge ahela kinaas (MLCK) ning Rho-kinaas (ROCK), mis mõjutavad nii otseselt (MLCK, ROCK) kui kaudselt (ROCK) aktiinisaldavate struktuuride ning filamentide moodustumist ja vastutavad sellest lähtuvate rakuliste protsesside toimumise eest (Katoh *et al.*, 2001).

Rho perekonna väikesed GTPaasid

Rakkude normaalse elutegevuse aluseks on tema tsütoskeleti dünaamika kompleksne reguleerimine. Tsütoskelett koosneb kolmest komponendist – mikrotuubulitest, intermediaarsete filamentide võrgustikust ning aktiinifibriididest. Aktiini tsütoskeleti dünaamika, modelleerimise ja reguleerimise ning fokaalsete adhesioonide moodustumise eest vastutavad mitmed erinevad Rho perekonna väikesed GTPaasid. Rho perekonna GTPaasid vahendavad raku pinna retseptorite signaali ja aktiini tsütoskeleti organiseerimist vastusena stiimulitele ekstratsellulaarsest keskkonnast (kus positiivseteks signaalideks on näiteks seerumi lipiidid või lüsofosfatidüülhape (LPA)). Stiimuli esinemisel keskkonnas transporditakse Rho perekonna GTPaasid raku plasmamembraani lähedusse ning konverteeritakse inaktiivsest guanosiindifosfaadiga (GDP) seotud vormist aktiivseks GTP-ga seotud vormi (Boguski ja McCormick, 1993; Kaibuchi *et al.*, 1999; Amano *et al.*, 2000). GTP ülekannet vahendavad spetsiaalsed guanosiinnukleotiidi vahetusfaktorid (GEF-id) (Bishop ja Hall, 2000), mis saavad positiivse signaali raku pinnal aktiveeritud heterotrimeerse G-valguga seotud retseptorilt. Aktiveeritud heterotrimeerne G-valk dissotsieerub vastusena stiimulile G α

monomeeriks ja G β γ dimeeriks. G α subühik käivitab signaaliraja, mis viib RhoGEF-ide aktiveerimisele. See omakorda vahendab väikeste Rho GTPaaside üleminekut aktiivsesse GTP-ga seotud vormi (Somlyo ja Somlyo, 2003; Ren ja Fang, 2005; Marx *et al.*, 2005), mille tagajärjel toimub antud GTPaasi vahendatud efektormolekulide aktiveerimine ning selle kaudu raku aktiinitsütoskeleti ning adhesioonide moodustumine. Võimalik, et on olemas ka teisi aktiveerimisradu ning nende radade valik sõltub rakutüübist ning aktiveerivast stiimulist (Somlyo ja Somlyo, 2003).

Lisaks GEF-idele, mis Rho GTPaase aktiveerivad, leidub rakkudes vastavaid valke inaktiveerivaid ühendeid, mis kiirendavad GTP-de hüdrolyüüsi. Neid kutsutakse GTPaas-aktiveerivateks valkudeks (GAP) (Hakoshima *et al.*, 2003). On näidatud, et kui aktiveeritud p190RhoGAP on seondunud RhoA-ga, inhibeeritakse nii *in vitro* kui *in vivo* RhoA efektorvalkude signaal ning see viib rakusisese pingele (*tension*) ja aktiinitsütoskeleti kokkutõmbumise vähenemisele. Antud GAP inhibeerimine aga algatab Rho-vahendatud aktiinitsütoskeleti remodelleerimise ning suurendab rakkude kinnitumist ning migratsiooni (Burgstaller ja Gimona, 2004). Kuigi välja pakutud signaalirajad on veel suure osas täpselt kirjeldamata, on teada juba kümneid erinevaid RhoGAP-e, mis kas spetsiifiliselt või mittespetsiifiliselt Rho GTPaase inaktiveerivad. Samas on oletatud, et erinevad GAP-id võivad vahendada ka erinevat raku dünaamikat või käitumise suunamist (Lua ja Low, 2004). Lisaks Rho GTPaase inaktiveerivatele GAP-idele on leitud rakkudes teisigi negatiivseid regulaatoreid, näiteks RhoGDI-d, mis on oma nime saanud võimest inhibeerida guanosiinnukleotiidi dissotsiatsiooni. Kuid lisaks eelnevale on RhoGDI suuteline viima läbi ka GTP hüdrolyüüsi (Hakoshima *et al.*, 2003; Somlyo ja Somlyo, 2003).

Rho perekonna väikestest GTPaasidest enim uuritud liikmeteks on RhoA, Rac1 ja Cdc42 (Clark *et al.*, 1998; Evers *et al.*, 2000; Nikolic, 2002; Aspenstrom *et al.*, 2004). Kuigi nad kõik mõjutavad aktiini tsütoskeleti ning adhesioonide moodustumist, toimivad nad üksteisest veidi erinevalt. Rac1 genereerib membraani lainetusi (*membrane ruffles*) ning viib lamellipoodide tekkimisele (Hall, 1998; Tsubakimoto *et al.*, 1999). Cdc42 stimuleerib aga aktiini filamente sisaldavate filopoodide moodustumist (Kozma *et al.*, 1995; Moorman *et al.*, 1999). Mõlemad protsessid on olulised fokaalsete komplekside moodustumises. RhoA funktsiooniks on indutseerida aktiini stressifibriite teke vastusena mitmetele rakuvälistele signaalidele (Izawa *et al.*, 1998) ning suunata fokaalsete komplekside tugevdamist ja nende üleminekut fokaalseteks adhesioonideks, kaasates kompleksidesse rohkem aktiini fiibreid

(Kaverina *et al.*, 2002). Seega osalevad Rac1 ning Cdc42 rohkem substraadiga esmaste kontaktide loomisel, kuid RhoA nende komplekside edasises arengus fokaalseteks adhesioonideks. Fokaalseteks adhesioonideks nimetatakse rakukultuuris olevate rakkude kontaktpunkte substraadi ning membraani vahel, kus põhiliseks “ankruks” on aktiinifiibrilite otste tugevdatud ning omavahel ristseotud võrgustik. Seega on aktiini tsütoskeleti, fokaalsete kontaktide ning adhesioonide formeerumine ja remodelleerimine dünaamiline protsess, mida reguleerivad Rho perekonna väikesed GTPaasid (Parsons *et al.*, 2000).

Rho-kinaas ehk ROCK

RhoA põhiline sihtmärkvalk on seriin-treoniin kinaas ROCK (Rho-kinaas), mis aktiveerimisel RhoA-GTP-ga vahendab Rho-indutseeritud aktiinifiibrilite moodustumist rakus (Watanabe *et al.*, 1999). Rho-kinaasidel (molekulmassiga umbes 160 kDa) on siiani kirjeldatud 2 isovormi – ROCK2 ehk ROK α ja ROCK1 ehk ROK β (Takaishi *et al.*, 2000). Kuigi nende kahe isovormi järjestuse identsus on madal (64%), on mõlema valgu kinaasne domeen suhteliselt tugevalt konserveerunud (90%), mis annab aluse arvata, et nende toime ja funktsioon rakkudes on sarnane (Amano *et al.*, 2000).

Rho-kinaasi põhilisteks substraatideks rakus on müosiini kerge ahel (MLC) ning müosiini fosfataas, millede fosforüülimine käivitab aktiini tsütoskeleti moodustumise ning aktiinifiibrilite tugevnemise (Amano *et al.*, 2000). Aktiinifiibrilite koostises oleva müosiin-II filamentide fosforüülimine on vajalik fiibrilite moodustumiseks, mistõttu Rho-kinaas osaleb otseselt fiibrilite tekitamisel. ROCK-vahendatud MLC fosforüülimine toimub (erinevalt MLC kinaasist (MLCK-st)) Ca²⁺-sõltumatu mehhanismi abil ning mängib olulist rolli sile-, südame- ja mittelihaskude kontraktsioonis (Fukata *et al.*, 2001; Chiba ja Misawa, 2004; Ren ja Fang, 2005; Meyer-ter-Vehn *et al.*, 2006). Lisaks otsesele MLC fosforüülimisele mõjutab ROCK-i aktiivsus ka kaudselt fosforüülitud MLC stabiilsust, sest müosiini fosfataasi fosforüülimine inaktiveerib antud ensüümi ning MLC defosforüülimine on seetõttu pärsitud (Kimura *et al.*, 1996; Maekawa *et al.*, 1999). Rho-kinaas fosforüülib müosiini fosfataasil müosiini siduva subühiku ning takistab nii antud valkude interaktsiooni ja fosfataasi funktsioneerimisraja toimimist (Fukata *et al.*, 2001; Velasco *et al.*, 2002; Riento ja Ridley, 2003). ROCK-i toimel inhibeeritud müosiini fosfataas ja suurenenud fosforüülitud MLC hulk põhjustab Rho-vahendatud aktiinifiibrilite ning fokaalsete adhesioonide moodustumist ja säilumist mittelihaskudes (Totsukawa *et al.*, 2000).

Veel üheks oluliseks valguks, mis mängib rolli aktiinitsütoskeleti moodustumises ning mille aktiivsust mõjutab Rho-kinaas, on LIM-kinaas. Rho-kinaas fosforüülib ning aktiveerib LIM-kinaasi, mis omakorda fosforüülib ning inaktiveerib kofiliini. Kofiliin omab aktiini depolümeeriseerivat toimet ning on seetõttu üheks aktiini dünaamikat reguleerivaks ensüümiks. Seega viib kofiliini inaktiveerimine aktiini depolümeeriseerimise inhibeerimisele ning aktiinifibrilite täiendavale stabiliseerimisele (Takaishi *et al.*, 2000; Maekawa *et al.*, 1999). LIM-kinaasi üleekspressioon HeLa rakkudes indutseerib tugevate, paksude, kimpjate stressifibrilite moodustumise, mis on sarnased nendele fibrilitele, mis tekivad aktiivse Rho või ROCK-i vahendusel (Maekawa *et al.*, 1999). Nii on ROCK-indutseeritud stressifibrilite formeerumine reguleeritud MLC fosforüülimise ja fosforüülitud vormi säilumise ning lisaks kofiliini inaktiveerimise kaudu (Takaishi *et al.*, 2000; Riento ja Ridley, 2003; Sachdev *et al.*, 2002).

Lisaks eelpoolmainitud substraatidele ning radadele, on Rho-kinaasil kirjeldatud teisigi sihtmärke rakkudes, millede fosforüülimine ROCK-i poolt on oluline aktiini tsütoskeleti alalhoiuks ning modelleerimiseks. Seega mängib ROCK tähtsalt rolli mitmetes rakulistes protsessides, mille toimumiseks on vajalik aktiini tsütoskeleti moodustumine, regulatsioon ja dünaamika, nagu rakkude kinnitumine ja liikumine, tsütokinees jne (Amano *et al.*, 2000; Riento ja Ridley, 2003; Nelson *et al.*, 2004).

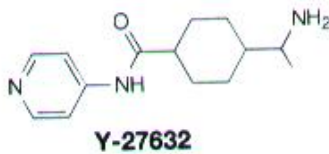
Rho-kinaasi inhibiitorid

Proteiinkinaaside kompleksne regulatsioon ning nende valkude sagedane ebanormaalne aktivatsioon/inhibitsioon erinevate haiguste korral on teinud nendest olulise sihtmärgi nii teadustegevuses kui ravimitööstuses. Proteiinkinaaside inhibiitorid on seetõttu äratanud suurt tähelepanu kui potentsiaalsed ravimid, samas on nad kasulikud vahendid teadustöös, uurimaks erinevate kinaaside funktsioone ja tähtsust nii *in vitro* kui *in vivo*. Enamus disainitud kinaaside inhibiitoreid mimikeerivad ATP-d ning konkureerivad sellega ensüümi ATP-sidumistsentrisse seondumisel (Ishizaki *et al.*, 2000; Senderowicz, 2002; Takami *et al.*, 2004).

Y-27632

Rho-kinaasidele on sünteesitud hulganisti erineva struktuuri ning selektiivsusega inhibiitoreid, et suurendada efektiivsust ja samas ka tõsta selektiivsust. Takami on oma grupiga sünteesinud

kolme tüüpi inhibiitoreid, mis (i) konkureerivad ATP-ga või (ii) fosfaadi aktseptoriga (kinaasi substraadiga) või (iii) ei kuulu kummagi kategooria alla (Takami *et al.*, 2004). Enimtuntud spetsiifiline Rho-kinaasi inhibiitor on Y-27632 [(+)-(R)-trans-4-(1-



Joonis 1. Rho-kinaaside inhibiitori Y-27632 struktuur.

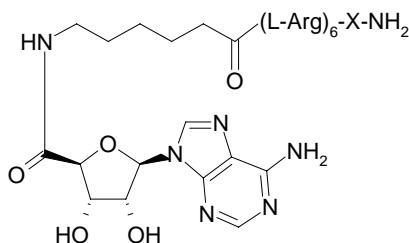
aminoetüül)-N-(4-püridüül)tsükloheksaankarboksamiid dihüdrokloriid] (Joonis 1) (Uehata *et al.*, 1997), mis moduleerib nii ROCK2 kui ROCK1 aktiivsust nii *in vitro* kui *in vivo* (Ishizaki *et al.*, 2000). Y-27632 sisaldab püridiinirühma, mistõttu ta konkureerib ATP-ga, seondudes kinaasi katalüütilisse saiti, blokeerides selle ATP-le ning inhibeerides seega kinaasi aktiivsust substraatide fosforüülimisel (Ishizaki *et al.*, 2000; Narumiya *et al.*, 2000; Fukata *et al.*, 2001). Esmalt kasutati Y-27632-e kaltsium-sõltumatu vaskulaarsete ning bronhiaalsete silelihaste kokkutõmbumise efektiivseks inhibeerimiseks. Hiljem avastati kokkutõmbumise mehhanism – Rho-ROCK rada – ning nüüd kasutatakse dominantselt negatiivsete ja konstitutiivselt aktiivsete ROCK konstruktide kõrval Y-27632 efektiivselt ka Rho-kinaaside osaluse ja funktsioonide uurimiseks erinevates rakulistes protsessides (Ishizaki *et al.*, 2000).

Y-27632 kasutamise on näidatud ROCK-i rolli erinevates rakufunktsioonides. Mitmed grupid on demonstreerinud, et Y-27632 lisamine juba madalatel kontsentratsioonidel viib rakkudes ROCK-i aktiivsuse inhibitsioonile, millega kaasneb aktiinifibrilite moodustumise blokeerimine ning olemasolevate fibrilite dissotsieerimine (Watanabe *et al.*, 1999; Totsukawa *et al.*, 2000; Scaife *et al.*, 2003). Fibrilid kadusid 1-tunnisel töötlemisel Y-27632-ga, kuid pärast inhibiitori eemaldamist lahusest tekkisid fibrilid taas. See näitab kui oluline on Rho-kinaasi aktiivsus raku stressifibrilite terviklikkuse säilimisel (Katoh *et al.*, 2001). Lisaks fibrilite kadumisele täheldas Shah grupp NIH3T3 rakkude suuruse vähenemist, mis oli märgatav juba pärast 30 minutulist inkubatsiooni inhibiitoriga (Shah *et al.*, 2001). Lisaks stressifibrilite intaktsusele omab Y-27632 negatiivset toimet ka fokaalsete adhesioonide moodustumisele. Katoh ja kolleegid on näidanud, et fibroblastide töötlemine Y-27632-ga viib fokaalsete adhesioonide häirumisele ning rakkudes väheneb mehhaaniline pinge (*tension*) (Katoh *et al.*, 2001).

Seega on korduvalt kirjeldatud Y-27632 võimet takistada aktiini tsütoskeleti moodustumist ning sellest lähtuvate protsesside toimumist, näiteks silelihas- (Uehata *et al.*, 1997; Tomasek *et al.*, 2006) ning mittelihasrakkude kontraktsiooni, adhesiooni ning rakkude liikumist (Shiokawa *et al.*, 2002; Koga *et al.*, 2006). Siiski on leitud, et Y-27632 omab võrreldavat afiinsust ning inhibeerimisvõimet mitmete teistegi kinaaside suhtes (näiteks PRK2-le (*protein kinase C-related kinase 2*) (Davies *et al.*, 2000)), mis rõhutab vajadust spetsiifilisemate Rho-kinaasi (aga ka teiste kinaaside) inhibiitorite järele.

ARC-341

Uutlaadi proteiinkinaaside bisubstraat-analoogsete inhibiitorite disainimisel võeti aluseks adenosiin-5'-karboksüülhappederivaadid, mille riboosi 5'-süsiniku aatomi külge lisati lühike peptiidne järjestus. Antud ühendi loomisel lähtuti põhimõttest, et inhibiitor seonduks üheaegselt nii kinaasi ATP- kui substraadi sidumiskohta, olles võimeline blokeerima ensüümi mõlemast positsioonist (Loog *et al.*, 1999; Uri *et al.*, 2002). Antud töös kasutatud bisubstraatsel inhibiitoril ARC (*adenosine oligo-arginine conjugate*) peptiidne motiiv koosneb kuuest arginiinijäägist. Lisaks substraadi sidumissaiti seondumisele, aitab tugevalt positiivset laengut kandev ning rakku penetreeruvate peptiidide (RPP) perekonda kuuluv oligoarginiini järjestus ühendil läbida plasmamembraani ning siseneda rakkudesse. ARC-i translokatsioonivõimet on demonstreeritud erinevate rakkudega (Uri *et al.*, 2002; Viht *et al.*, 2003). Kuigi ARC on võimeline efektiivselt inhibeerima Rho-kinaasi (ja vähemal määral teisi kinaase) *in vitro* (Enkvist *et al.*, 2006), pole tema toimet sihtmärkensüümidele rakukultuuris veel kirjeldatud.



ARC-341, X = -
 ARC-342, X = Lys
 ARC-343, X = Lys(5-TAMRA)
 Affi-Gel-(ARC-342), X = Lys(Affi-Gel)

Joonis 2. Rho-kinaasi inhibiitori ARC struktuur.

Rakku penetreeruvad peptiidid (RPP)

Mitmete valkude, peptiidide, oligonukleotiidide ja ravimite terapeutilise kasutamise potentsiaal on olnud limiteeritud nende vähese võimega läbida rakkude plasmamembraane. 1990ndate aastate keskpaiku avastati, et mitmed valgud ning valkudest pärinevad peptiidid on võimelised efektiivselt vahendama erinevate lastmolekulide translokatsiooni nii *in vitro* kui *in vivo*, tehes neist lootustandvad molekulaarsed transportervektorid (Fawell *et al.*, 1994; Vivés *et al.*, 1997; Lindgren *et al.*, 2000; Lundberg *et al.*, 2003; Järver ja Langel, 2004). Rakku penetreeruvad peptiidid (RPP-d) koosnevad kuni 30 aminohappest, mille füüsikaliskemilised omadused (nagu laeng, selle kontsentratsioon peptiidil, aminohappe ja peptiidse motiivi struktuur jms) mängivad olulist rolli nende internalisatsioonivõimes ning sisenemismehhanismis (Rothbard *et al.*, 2002). Enamike RPP-de ühiseks tunnuseks on mitmete aluseliste aminohapete olemasolu peptiidse järjestuses, mis annab neile füsioloogilistest tingimustes tugeva positiivse laengu (Vivés *et al.*, 1997; Futaki *et al.*, 2001; Soomets *et al.*, 2000). Lisaks positiivsele laengule on osade penetreeruvate peptiidide efektiivseks translokatsiooniks vajalik veel trüptofaani või fenüülalaniinijääkide (või muude planaarse struktuuride) esinemine kindlates positsioonides (Derossi *et al.*, 1994; Christiaens *et al.*, 2004) ja polüpeptiidahela pikkus (Vivés *et al.*, 1997; Geisler ja Chmielewski, 2007).

Arginiinirikkad peptiidid

Looduslikest valkudest pärinevate RPP-de (Tat, Penetratin) kõrval on oma koha leidnud ka mitmed sünteetilised ning disainitud peptiidid, näiteks oligoarginiini järjestused, millede internalisatsioonivõime võib ületada mitmekordselt eelpoolmainitud RPP-de sisenemiseefektiivsust (Jones *et al.*, 2005). Võrreldes erinevaid positiivse laenguga aminohapetest koosnevate polümeeride sisenemist rakkudesse, leiti, et polüarginiinid on efektiivsemad internaliseerujad kui peptiidid, mis sisaldavad oma järjestuses lüsiini, ornitiini või histidiini. Võimalik, et suurenenud sisenemiseefektiivsus tuleneb hargnenud struktuuriga guanidiinrühma võimest moodustada rakupinna anioonsete struktuuridega üheaegselt kahte ioonset või vesiniksidet, kuna arginiinil on erinevalt teistest positiivselt laetud aminohapetest kõrvalahelas kaks aminorühma. Seega on arginiinirühm oluline struktuuri komponent, mis suures osas vastutab kogu peptiidse ühendi internalisatsiooni eest (Mitchell *et al.*, 2000; Zaro ja Shen, 2003; Futaki, 2005). Maksimaalne internalisatsioon ning akumulereerumine rakkudesse on kirjeldatud 6 kuni 9-st arginiinijäägist koosnevate oligomeeride korral, mis

tähendab, et siingi mängib rakkudesse sisenemisel olulist rolli peptiidahela pikkus (Mitchell *et al.*, 2000; Wender *et al.*, 2000; Futaki *et al.*, 2001).

Arginiini oligomeeride sisenemismehhanism on (nagu mitmete teistegi RPP-de puhul) veel täpselt kirjeldamata. Mitmed grupid on näidanud, et arginiinirikad peptiidid sisenevad rakkudesse enamasti temperatuurist ning energiast sõltuva endotsütoosi teel (Vivés *et al.*, 2003; Lundberg *et al.*, 2003; Drin *et al.*, 2003; Maiolo *et al.*, 2005; Abes *et al.*, 2007), kuid puudub konsensus, millist endotsütoosi alaliiki katioonsed RPP-d kasutavad. Olenevalt peptiidi ja lastmolekuli kompleksi suurusest on kirjeldatud nii makropinotsütoosi (Wadia *et al.*, 2004; Nakase *et al.*, 2004; Kaplan *et al.*, 2005) kui lipiidsete parvekeste poolt vahendatud kaveolaarse endotsütoosi osalust arginiinirikaste RPP-de sisenemisel rakkudesse (Ferrari *et al.*, 2003; Fittipaldi *et al.*, 2003; P. Säälik, avaldamata andmed). Lisaks sellele on näidatud, et endotsütoosi osaluse ulatus peptiidi sisenemisel sõltub molekulis leiduvate positiivsete laengute arvust ehk ahela pikkusest, samas kui mitte-endotsütootiliseks internalisatsiooniks on olulised arginiini guanidiinstruktuurid (Zaro ja Shen, 2003). Guanidiinrühm on võimeline moodustama sidet membraanides sisalduvate negatiivselt laetud lipiidide pearühmadega ning vahendama guanidiinrühma-rikaste oligomeeride sukeldumist bilipiidkihti (Sakai ja Matile, 2003; Sakai *et al.*, 2005)

Pärast endotsütootilist sisenemist rakkudesse, koguneb polüarginiin küpsevatesse endosoomidesse, kust osa peptiidist (saavutades piisavalt kõrge vesiikulisisese kontsentratsiooni/peptiidi-lipiidi suhte) on võimeline destabiliseerima vesiikulite membraani ning antud struktuuridest välja lekkima (Fuchs ja Raines, 2004). Suurem osa RPP-dest jääb aga endosomaalsetesse struktuuridesse, kus nad on vastuvõtlikud proteolüütilisele lagundamisele ning pole suutelised seetõttu oma funktsiooni rakus täitma. Et suurendada vesiikulitest vabanemist ning rakulisi efekte vastusena sisseviidud lastmolekulide aktiivsusele, on mitmetes töödes kasutatud endosoomide küpsemist takistavaid ühendeid. Malaariavastane ravim, klorokviin, takistab endosoomide hapustumist ning soodustab vesiikulites lõksus olevate molekulide vabanemist tsütosooli (Accapezzato *et al.*, 2005). Küsimuses, kas klorokviin põhjustab ainult endosoomide lekkimist või viib ka osade vesiikulite purunemisele, pole suudetud veel kokkuleppele jõua. Võimalik, et madalamatel kontsentratsioonidel (25 μM) ei löhu klorokviin endosoomi, vaid destabiliseerib vesiikulite membraani (Accapezzato *et al.*, 2005), samas kui kõrgem kemikaali kontsentratsioon (kuni 200 μM) põhjustab vähemalt osade endosoomide katki minemist (Wadia *et al.*, 2004). Transduktsioonil või

endosoomidest välja lekkides tsütosooli jõudnuna suunduvad mitmed positiivselt laetud RPP-d (tuuma lokaliseerimise signaali (NLS-i) jälgimiseks) tuuma struktuuridesse (Ziegler *et al.*, 2005).

TÖÖ EESMÄRGID

- ✓ Uurida TAMRA-ga märgitud ARC-i (ARC-343) sisenemismehhanismi rakkudesse ning lokalisatsiooni rakkudes
- ✓ Kontrollida ARC-i võimet seondada Rho-kinaasi rakulisest keskkonnast
- ✓ Kirjeldada ARC-i efekte aktiini tsütoskeletile, fokaalsetele kontaktidele raku ja substraadi vahel ning rakkude migreerumisele võrreldes Y-27632-ga
- ✓ Tõendada, et ARC ei ole rakkude metaboolsele aktiivsusele pärssiva toimega ega oma toksilist efekti

KASUTATUD MATERJALID JA METOODIKA

Rakud

Inimese emakakaela kartsinoomist pärinevaid HeLa rakke kultiveeriti IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes (Gibco, Invitrogen, USA), mis sisaldas 10% veiselote vereseerumit (FCS) (PAA Laboratories, Austria), 100 IU/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomüsiini (Gibco, Invitrogen, USA). Rakke kasvatati inkubaatoris 5% CO₂ keskkonnas veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37°C.

Kasutatud inhibiitorid ja kemikaalid

Positiivse kontrollina kasutati Rho-kinaaside spetsiifilist inhibiitorit Y-27632 sõltuvalt katsest kontsentratsioonivahemikus 1 – 30 µM. Uuritavaks inhibiitoriks oli ARC, mida kasutati samades kontsentratsioonides. Y-27632 osteti firmalt Tocris (MO, USA). ARC-341, agarosmaatriksiga seotud ARC-341 (ARC-342) ning TAMRA-ga märgitud ARC-341 (ARC-343) sünteesiti Dr. Uri tööühema poolt (Enkvist *et al.*, 2006). Afiinsuskromatograafias kasutatud proteaaside inhibiitorite segu osteti firmalt Roche (Saksamaa), PMSF ja teised kasutatud ühendid pärinevad firmalt Sigma (MO, USA). Töös kasutatud lahused on valmistatud firma AppliChem (Saksamaa) kemikaalidest (kui pole öeldud teisiti).

Fluorestsentsmikroskoopia

ARC-343 sisenemine rakkudesse ja klorokviini efekt ARC-i sisenemisele

HeLa rakud (25 000 rakku/klaas) külvati 24-kaevulise plaadi (Grenier bio-one, Saksamaa) kannudesse ümmargustele alusklaasidele (Ø 12 mm, Menzel-Gläser, Saksamaa) ning lasti kinnituda ja paljuneda 24-48 tundi 60-70% konfluentsuseni. Rakke inkubeeriti 3 µM TAMRA-ga märgitud ARC-iga (ARC-343) ilma või koos 100 µM klorokviiniga (Sigma, MO) seerumvabas söötmes 37 °C juures 30 min ning pesti 3 korda PBS-iga (á 3 minutit). Elusrakud sulundati 33% glütserooli sisaldavas PBS-i lahuses ning fluorestsentskujutised salvestati CCD Olympus DP70 kaameraga varustatud Olympus BX61 fluorestsentsmikroskoobiga. Fluorestsentsfotode viimistlemiseks ning lõplikuks vormistamiseks kasutati arvutiprogrammi Adobe Photoshop 6.0.

Aktiinifibrille dissotsiatsioon HeLa rakkudes ARC-341 või Y-27632 toimel

HeLa rakud külvati alusklaasidele eespool kirjeldatud viisil. 60-70% konfluentsed rakud transfekteeriti pAcGFP-actin plasmiidiga (Clontech Laboratories, CA) ExGen 500 transfektsioonireagendiga (Fermentas, Leedu) kasutades tootjapoolset protokollit. 24 tundi

hiljem inkubeeriti rakke 10 μ M ARC-341 või 10 μ M Y-27632-ga ilma või koos 100 μ M klorokviiniga seerumvabas söötmes 37 °C juures 15 min kuni 7 tundi. Kontrollrakke inkubeeriti samade vahemike jooksul seerumiga või seerumita söötmes. Rakud pesti, sulundati ning kujutised salvestati ja töödeldi eespool kirjeldatud viisil.

ARC-i sisaldavate vesiikulite happelisuse määramine LysoSensoriga

HeLa rakud (50000 rakku/klaas) külvati alusklaasidele eespool kirjeldatud viisil. 60-70% konfluentseid rakke inkubeeriti 1 μ M LysoSensoriga (Molecular Probes, OR) ilma või koos 100 μ M klorokviiniga ning ilma või koos 3 μ M ARC-341-ga 1 kuni 2 tundi 37 °C juures. Rakud pesti, sulundati ning kujutised salvestati ja töödeldi eespool kirjeldatud viisil.

Fokaalsete kontaktide ning adhesioonide visualiseerimine ARC-341 või Y-27632 töödeldud rakkudes

HeLa rakud (15000 rakku/klaas) külvati alusklaasidele eespool kirjeldatud viisil ning lasti kinnituda ja paljuneda 48-72 tundi. Rakke töödeldi 10 või 20 μ M ARC-341 või Y-27632-ga 4 tundi seerumvabas söötmes, fikseeriti 4 % paraformaldeüüdi (PFA) lahuses PBS-is 30 min jääl, pesti TBS-iga 2x ning permeabiliseeriti rakud 0,1% Triton X-100-ga PBS-is 10 min jääl. Mittespetsiifiliste seondumiste vähendamiseks blokeeriti 10% veise seerumi albumiini (BSA) lahusega TBS-is 40 min toatemperatuuril. Fokaalsetes kontaktides olev fosfotürosiin märgiti 5 μ g/ml fosfotürosiini vastase hiire monoklonaalse antikehaga (PY20, Abcam, UK) ning fokaalsetes adhesioonides paiknev *zyxin* küüliku polüklonaalse *zyxin*'i vastase antikehaga (*zyxin*, Abcam, UK) 1% BSA lahuses TBS-is 1 tund toatemperatuuril. Rakud pesti 5x 3min TBS-iga ning inkubeeriti 20 μ g/ml küülikuvastase Alexa-594-ga konjugeeritud ning hiirevastase Alexa-488-ga konjugeeritud sekundaarsete antikehadega 1% BSA TBS-is 30 min. Rakud pesti 5x 3 min TBS-iga, sulundati 33% glütserooli PBS-is, fluorestsentskujutised salvestati Nikoni konfokaalmikroskoobiga EZ-C1 ning töödeldi 3.30 FreeViewer ning Adobe Photoshop 6.0 programmidega.

ROCK2 affiinsuskromatograafia

Koekultuuri tassidele (\varnothing 10 cm) kinnitunud rakke lasti kasvada 80-90% konfluentsuseni. Katsepäeval pesti rakke 2 korda PBS-iga, rakud eemaldati plastikult kummispaatliga ning koguti tsentrifuugides 190xg 20°C juures 5 minutit. Saadud rakuksade külmutati ning lüüsiit jääkülma lüüsiipuhvriga (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 1mM DTT, 2,5x proteaaside inhibiitorite segu, 2 mM PMSF, 1% Triton X-100) 10 minutit jääl (vahepeal suspenderides). Rakulüsaati tsentrifuugiti esmalt 2375xg 4°C juures 5

minutit, et eemaldada suuremad rakumembraani osad ning tuumad (sade 1). Supernatant (sup.1) koguti ja tsentrifuugiti uuesti 16060xg 4°C juures 10 minutit, et eemaldada rakkude tsütoskelett (sade 2). Saadud supernatandist (sup.2) eemaldati ATP geelfiltratsioonil Sephadex G-25-i kolonnis HR10/10 (Farmacia Fine Chemicals AB, Rootsi), mis tasakaalustati eelnevalt geelfiltratsiooni (GF) puhvriga (25 mM Tris HCl pH 7,2, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 1mM DTT, 0,1% Tween-20). Geelfiltratsioonil koguti 3 fraktsiooni (fr.1-3), millele lisati koheselt inhibiitorid (tootja poolt soovitatav kogus (1x) proteaaside inhibiitorite segu (Roche, Saksamaa), 1 mM PMSF, 1 mM DTT), et vähendada proteolüüsi. Fraktsiooni, mis sisaldas kõige rohkem Rho-kinaasi, kanti ARC-342-maatriksile ning inkubeeriti segu 4°C juures segades (15 rpm *end-over-end* Labino B.V.) 1 tund. Maatriks eemaldati tsentrifuugimisel 900xg 4°C juures 5 minutit, pesti 5 korda PD puhvriga (GF puhver, 1x proteaaside inhibiitorite segu, 1 mM PMSF) (á 1 ml), tsentrifuugiti vahepeal 5 minutit 900xg 4°C juures ning kõik supernatandid koguti (pesu 1-5). Maatriksile seondunud valgud elueeriti poole geeli mahu (50 µl SDS-proovipuhvrer/100 µl agarosgeel) 4x värvitu SDS-proovipuhvri lisamisel. Saadud sademetele (sade 1, sade 2) lisati 1 ml 4x SDS-proovipuhvrit 50 mg rakusademe kohta, supernatantidele ja pesulahustele lisati pool mahust 4x SDS-proovipuhvrit. Proovid lahutati geelelektroforeesil ning analüüsiti Western blot'il ROCK2 vastaste küüliku polükloonaalsete antikehadega (Rock-2 (H-85), Santa Cruz Biotechnology, CA).

Western blot afiinsuskromatograafia fraktsioonide analüüsimiseks

Valgud lahutati 8% akrüülamiidgeelis (Laemmli, 1970) ning kanti üle PVDF (polyvinylidene difloride) membraanile (Pro Blot, ABI). Membraani blokeeriti mittespetsiifilise seondumise vähendamiseks 3 tundi 6% BSA-ga TBS-is (pidevalt segades) ning pesti pesulahusega (0,1% Tween-20 TBS-is). Membraani inkubeeriti 1-2 µg/ml ROCK2 vastase küüliku polükloonaalse antikehaga (Rock-2 (H-85), Santa Cruz Biotechnology, CA) TBS-is 4°C juures üleöö (pidevalt segades), pesti 3 korda 10 minutit pesulahusega ning inkubeeriti aluselise fosfataasiga (AP) konjugeeritud sekundaarse küülikuvastase IgG antikehaga lahjendusel 1:2000-1:3000 (Vector Laboratories, CA) 1% BSA lahuses TBS-is toatemperatuuril 1 tund (pidevalt segades). Membraani pesti pesulahusega 3 korda 10 minutit ja loputati aluselise fosfataasi (AP) puhvris (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris pH 9,5). Signaal ilmutati kasutades substraadina 300 µg/ml NBT (*nitrobluetetrazolium*) ja 165 µg/ml BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolüülfosfaat) AP puhvris.

Toksilisuse test MTT meetodil

HeLa rakud külvati tihedusel 50000 rakku 24-kaevulise plaadi (Grenier bio-one, Saksamaa) kannu kohta ja kasvatati üleöö IMDM-is. Rakke inkubeeriti 10 μM LPA või 1 – 30 μM Y-27632 või ARC-341-ga seerumvabas söötmes 1 tund 37°C juures. Rakud pesti PBS-iga 2x ning inkubeeriti 0,5 mg/ml MTT [3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüül-tetrasooliumbromiid] seerumiga söötmes 4 tundi 37°C juures. Sadenenud MTT formasaan, mis tekib rakkudes mitokondriaalse aktiivsuse toimetel, lahustati samas mahus 20% SDS-iga 0,02 M HCl-s üleöö toatemperatuuril. Moodustunud lahuste optiline tihedus mõõdeti spektrofotomeetril (Genios plus, Tecan, Austria) lainepikkusel 540 nm. Ühendite pikaajalise efekti mõõtmiseks töödeldi rakke eelpool kirjeldatud viisil. Pärast 1-tunnilist inkubatsiooni vahetati sööde 10% FCS-iga rikastatud söötme vastu ning lasti rakkudel kasvada 24 tundi, misjärel teostati MTT töötlus. Saadud andmed kanti üle ja töödeldi arvutiprogrammis Microsoft Excel.

ARC-341 ja Y-27632 toimetel dissotsieerunud aktiini hulga kvantifitseerimine Western blot analüüsiga

HeLa rakud (100000 rakku/kann) külvati 12-kannulistele plaatidele (Grenier bio-one, Saksamaa). Järgmisel päeval inkubeeriti rakke 20 μM ARC-341 või Y-27632-ga seerumvabas söötmes 37°C juures 15 min, 30 min, 1 tund või 7 tundi. Rakud pesti, töödeldi 0,1% Triton X-100-ga PBS-is 5 min jääl ning koguti supernatandid. Supernatandis olevad valgud kontsentreeriti (Darbre, 1986). Rakkudest vabanenud β -aktiini hulk kvantifitseeriti Western blot'il, kus membraani mittespetsiifilised seondumiskohad blokeeriti esmalt 5% rasvavaba piima pulbriga (NFDM) PBS-is 4°C juures üleöö ning inkubeeriti seejärel 0,05 $\mu\text{g/mL}$ hiire polükloonaalse β -aktiini vastase antikehaga (beta Actin antibody [ACTN05 (C4)], Abcam, UK) 5% NFDM PBS-is 1 tund toatemperatuuril. Membraani pesti 3x 7 min pesulahusega (0,1% Tween-20 TBS-is) ning inkubeeriti aluselise fosfataasiga konjugeeritud sekundaarse hiirevastase IgG antikehaga (Vector Laboratories, CA) (1:2500 lahjendus 5% NFDM PBS-is) 1 tund toatemperatuuril. Membraan pesti 3x 7 min pesulahusega ning signaal ilmutati eelpool kirjeldatud viisil.

Rakkude liikumise mõõtmine haava paranemise katsega (*wound healing assay*)

HeLa rakud külvati 8-augulise eemaldatava kambriga klaasidele ning lasti kasvada 100% konfluentseks. 0,5-20 μl -ise mahutavusega väikese pipeti otsikuga tõmmates tekitati rakukihti „haav“. Rakke inkubeeriti 5 – 20 μM ARC-341 või Y-27632-ga 0, 4 või 9 tundi 37°C juures.

„Haava” läbimõõd mõõdeti kasutades CCD Olympus DP70 kaameraga varustatud Olympus BX61 fluorestsentsmikroskoopi ning DP Controller programmi. Tulemused töödeldi programmiga Microsoft Excel, võttes 0 ajapunkti (esialgse läbimõõdu) haava maksimumlaiuseks (100%).

ARC-343 lokalisatsioon HeLa rakkudes pärast mikrosüstimist

HeLa rakud (400000 rakku/tass) külvati tassidel (Ø 35 mm, Grenier bio-one, Saksamaa) olevatele klaasidele (Ø 8 mm, Menzel-Gläser, Saksamaa) ning lasti kinnituda ja paljuneda 48 tundi. Valmistati 250 µM ARC-343 lahus ning tsentrifugeeriti 16000xg 10 min, et eemaldada lahusest agregaadid, mis võiksid süstimise ajal nõela ummistada. Mikrosüstimisel kasutati Eppendorffi mikromanipulaatoritega varustatud Zeiss Axiovert S 100 invertmikroskoopi, automaatset Transjector 5246 mikrosüstimismasinat (Eppendorff, Saksamaa) ning Femtotips mikrosüstimisnõelu (Ø 15 µm või Ø 0,5 µm, Eppendorff, Saksamaa), millega süstiti rakkudesse 150 Pa juures 0,5 sek jooksul 250 µM-set ARC-343. Mikrosüstitud rakud pesti, sulundati ning kujutised salvestati eelpool kirjeldatud viisil.

TULEMUSED

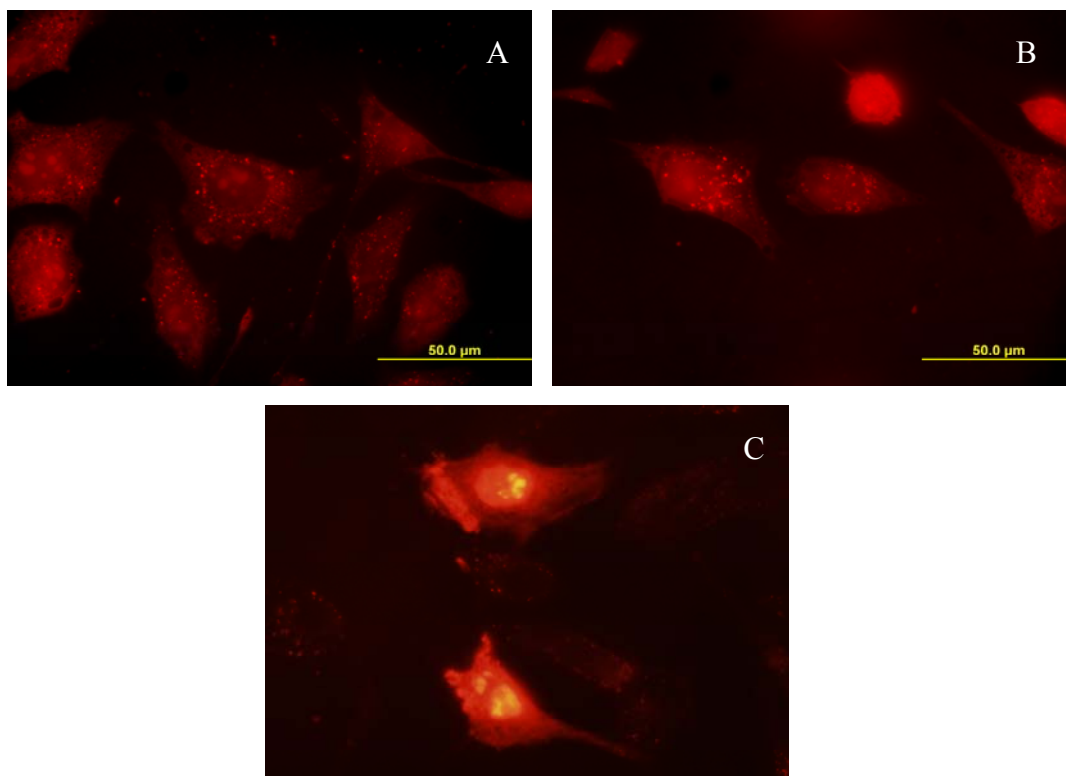
ARC siseneb rakkudesse enamasti endotsütoosi teel, kuid vabaneb hiljem vesiikulitest.

Klorokviin soodustab ARC-i vabanemist vesikulaarsetest struktuuridest.

ARC-i sisenemise uurimiseks inkubeeriti rakke tetrametüüldiamiiniga (TAMRA) märgitud ARC-iga (ARC-343) ilma või koos klorokviiniga 30 min või 2 tundi ning vaadeldi elusrakke fluorestsentsmikroskoobis. ARC-343 sisenes efektiivselt HeLa rakkudesse juba 30 min jooksul, mil oli näha fluorestsentsmärgise koondumist vesikulaarsetesse struktuuridesse, mis olid kogunenud või suundusid perinukleaarsesse piirkonda (Joonis 3A). Kuigi enamus ARC-343 esines rakus granulaarselt, oli mingil määral esindatud ka difuusne tsütoplasma märkumine. Pärast 2-tunnilist inkubatsiooni oli aga märgata oluliselt rohkem fluorestsentssignaali sisaldavaid vesiikuleid, mis paiknesid samuti tuuma ümbruses (avaldamata andmed).

Klorokviini töötlus mõjutas ARC-343 sisaldavate vesiikulite suurust, muutes nad suuremaks ning fluorestsentssignaali suhtes intensiivsemalt värvunumaks kui klorokviinita töödeldud rakkudes (Joonis 3B). ARC-i sisaldavate vesiikulite lokaliseerimise muutust ei olnud aga märgata ning ka klorokviiniga töödeldud rakkudes akumulerusid fluorestsentsmärkega ühendit sisaldavad endosoomid perinukleaarsesse piirkonda. Lisaks endosoomide morfoloogia muutumisele oli klorokviiniga töödeldud rakkude tsütoplasmas märgata tugevamat difuusset ARC-343 märkimist.

Mikrosüstimisega HeLa rakkude tsütoplasmasse viidud ARC-343 hajus üle kogu raku tsütoplasma ning koondus seejärel tuuma ja tuumakestesse (Joonis 3C). Lokaliseerimise või siirdumise konkreetsetesse teistesse rakulistesse kompartmentidesse ega membraanidesse ei olnud märgata.

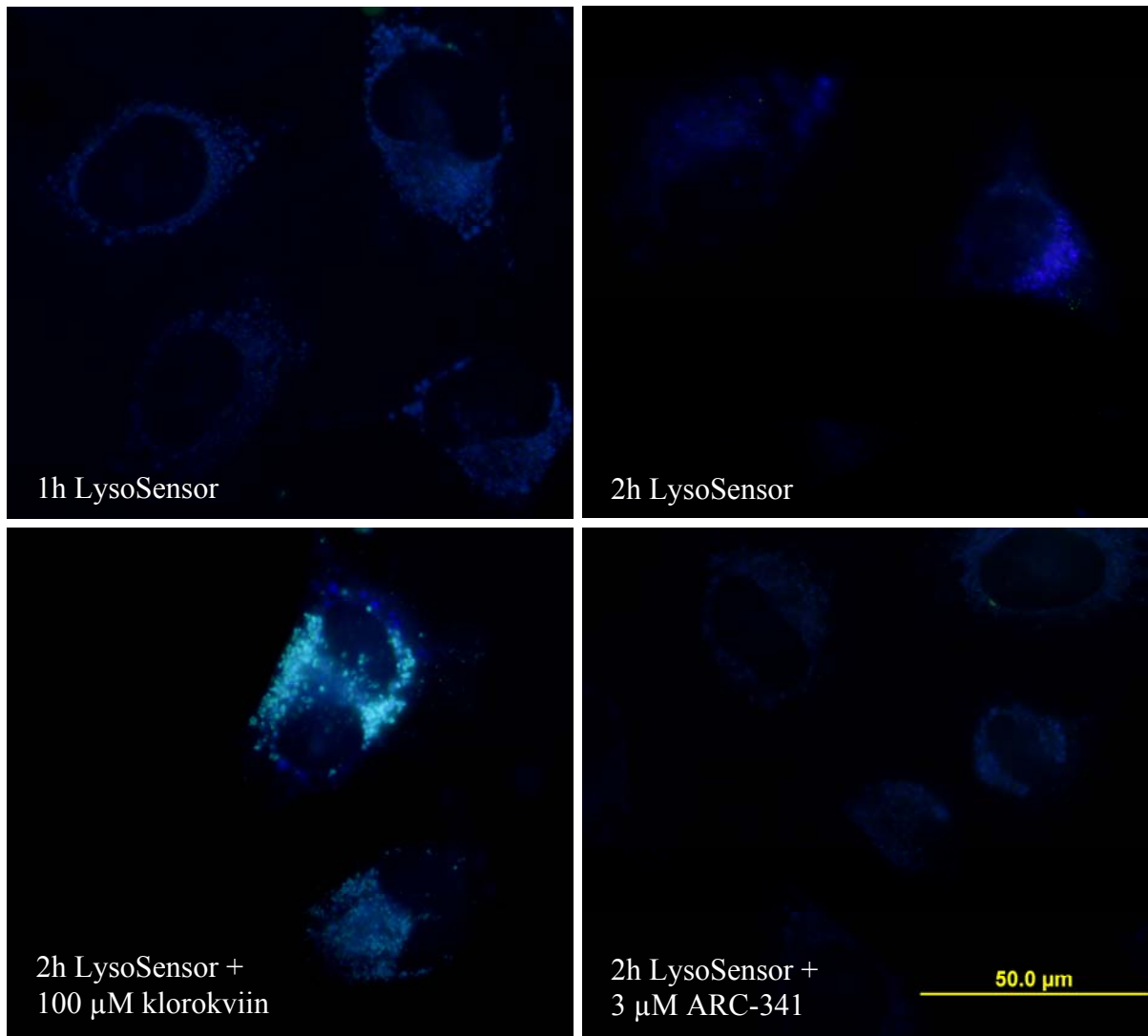


Joonis 3. TAMRA-ga märgitud ARC-i sisenemine ning lokaliseerimine HeLa rakkudes.

HeLa rakke inkubeeriti 3 μM ARC-343-ga ilma (A) või koos 100 μM klorokviiniga (B) temperatuuril 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 minutit. Mõlemal juhul koondus ARC-343 vesiikulitesse, kuid paiknes ka hajusalt tsütoplasmas. Klorokviiniga töödeldud rakkude vesiikulid olid suuremad ning tsütosoolse fluorestsentsi intensiivsus oli kõrgem. ARC-343 mikrosüstimisega HeLa rakkudesse (C) jäi osa ühendist tsütosoolse kompartimenti, samas toimus tugev koondumine tuuma ja tuumakestesse. Mõõtlõik 50 μm .

ARC esineb rakkudes eelkõige varasemates ja hilisemates endosoomides ning takistab mõningal määral lüsoosomide küpsemist.

Et uurida ARC-i sisaldavate endosoomide küpsusastet ning ühendi suunamist lüsoosoomidesse, inkubeeriti rakke 1 μM LysoSensoriga ilma või koos 3 μM ARC-341 või 100 μM klorokviiniga 1 kuni 2 tundi ja vaadeldi elusrakke fluorestsentsmikroskoobis. LysoSensor siseneb elusatesse rakkudesse endotsütoosiga ning tema fluorestsentssignaali gamma muutub endosoomide küpsemisel, mil toimub pH alanemine ning vesiikulite muundumine lüsoosomideks. LysoSensoriga töödeldud rakkudes oli 1 tunni möödudes märgata suuremas osas vaid heledamalt siniselt märkunud endosoomseid vesiikuleid, mille pH ei olnud veel jõudnud langeda, kuid 2-tunnilise inkubatsiooni järel olid enamus vesiikuleid sügavsinised madala pH-ga tuuma ümbrusesse kogunenud lüsoosomid (Joonis 4, ülemine rida). Klorokviini-töötlus takistas vesiikulite hapustumist ning 2 tunni möödumisel oli valdav enamus vesiikuleid tugevalt helesinised ja märgata oli vaid üksikuid tumesiniseid happelisi



Joonis 4. ARC takistab mõningal määral endosoomide küpsemist lüsoosoomideks.

HeLa rakke inkubeeriti 1 μM pH-st sõltuvalt fluorestseeruva LysoSensoriga temperatuuril 37 °C 1 tund või 2 tundi ilma või koos 100 μM klorokviini või 3 μM ARC-341-ga. 1 tunni möödudes esines rakkudes peamiselt keskmise sinise varjundiga vesiikuleid, vähem sügavsiniseid madala pH-ga lüsoosome, samas kui 2 tunni pärast prevaleerisid kontrollrakkudes perinukleaarsed lüsoosoomid. Klorokviin takistas vesiikulite hapustumist, põhjustades helesiniselt märkunud varasemate (kõrgema pH-ga) endosoomide prevaleerimise. ARC-341-töötlus ei andnud klorokviiniga võrreldavat efekti, kuid vesiikulid sarnanesid pigem 1 tund LysoSensoriga töödeldud rakkudega, st. lüsoosoomide moodustumine oli mõningal määral takistatud. Mõõtlõik 50 μm .

lüsoosome. Samuti oli klorokviiniga töödeldud rakkudes detekteeritavad mitmed suuremad endosoomid ning paisunud vesiikulid. Rakkude 2-tunnisel inkubeerimisel ARC-341-ga oli märgata nii veidi heledamalt kui tumedamalt värvunud vesiikuleid, kuid lüsoosome tundus olevat mõningal määral vähem kui ainult LysoSensoriga töödeldud rakkudes (Joonis 4). 2-tunnine ARC-341 töötlus ei andnud nii drastilist erinevust kui klorokviini töötlus, kuid meenutas pigem 1-tunnilise inkubatsiooniga LysoSensoriga töödeldud rakke.

ARC seob Rho-kinaasi rakulüsaadis

ARC on disainitud nii, et ta suudab efektiivselt siduda ning inhibeerida Rho-kinaasi *in vitro* (Enkvist *et al.*, 2006). Et kontrollida ARC-i võimet seondada ROCK-i ning moodustada oma sihtmärgiga stabiilset kompleksi rakulises keskkonnas, kasutati agarooosi külge konjugeeritud ARC-341 (ARC-342) aafiinsusmaatriksina Rho-kinaasi pretsipitatsioonil ja saadud proovid analüüsiti Western blot meetodil. Rakulüsaadi fraktsioneerimisel tsentrifuugimisega ilmnes, et suurem osa Rho-kinaasist lokaliseerub tsütoplasmas ning ainult minoorne osa ensüümist on otseselt assotsieerunud raku membraansete komponentide ning tsütoskeletiga (avaldamata andmed). Seetõttu kasutati ARC-342 aafiinsusmaatriksiga pretsipiteerimisel rakulüsaadi tsütosoolset fraktsiooni, millest eemaldati eelnevalt ühendiga Rho-kinaasi ATP-sidumissaiti konkureeriv ATP geelfiltratsioonil.

Agarooosile immobiliseeritud ARC seob efektiivselt Rho-kinaasi ning on võimeline seda rakulüsaadist kontsentreerima, tuvastades maatriksiga seondunud valke hõbetatud geelis (avaldamata andmed) või ROCK vastase antikehaga Western blot'il (Joonis 6B). Väike osa ROCK-ist ei seondunud aafiinsusmaatriksiga, sest ROCK-i oli mõningal määral võimalik detekteerida maatriksilt eemaldatud lahuses. Samuti võib moodustunud ARC-ROCK kompleksi lugeda stabiilseks, kuna kontsentreeritud maatriksi pesuproovid ei sisaldanud Rho-kinaasi.

Hõbetamisega aafiinsusmaatriksile seondunud valkude visualiseerimisel selgus, et lisaks Rho-kinaasile seondusid ARC-iga mitmed teisedki valgud, näiteks PKA katalüütiline subühik, mida oli võimalik detekteerida ka Western blot meetodil (avaldamata andmed). PKA katalüütiline subühik oli võimeline küll seonduma ARC-iga, kuid seandumine oli nõrk ja lühiajaline, sest suur osa seondunud valgust vabanes maatriksi pesemisel pesulahustesse.

ARC takistab aktiini tsütoskeleti moodustumist

Eelnevalt on näidatud, et ARC kui bisubstraatne inhibiitor suudab efektiivselt maha suruda Rho-kinaasi aktiivsust *in vitro* (Enkvist *et al.*, 2006). Et kontrollida ARC-341 inhibitoorset efekti Rho-kinaasile koekultuuris, transfekteeriti HeLa rakud eelnevalt aktiin-GFP plasmiidiga ning aktiinifibrille kadumist vastusena ROCK aktiivsuse maha surumisele Y-27632 või ARC-341 toimel vaadeldi elusrakkudes fluorestsentsmikroskoobiga. ARC-341 efekt ilmnes juba 15 min möödudes, mil kogu raku ulatuses olid detekteeritavad peenemad

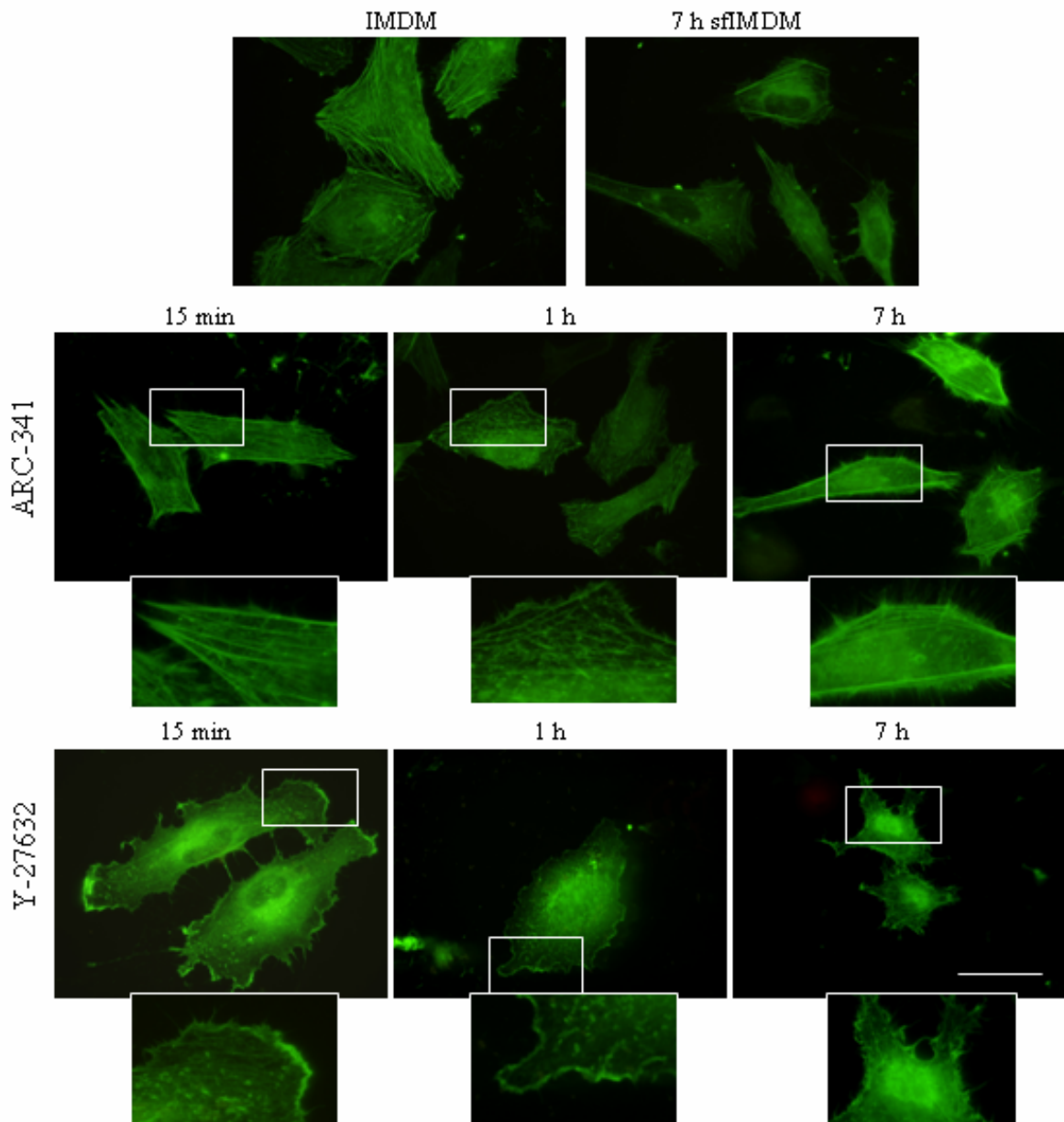
filamendid (Joonis 5, keskmine rida). Siiski ei olnud üheski rakus näha fiibrite täielikku kadumist. Y-27632 toime aktiini tsütoskeletile oli tugevam – juba 15-minutiline töötus dissotsieeris enamuse aktiini fiibritest ja märgata oli difuusse aktiin-GFP signaali hajusalt tsütoplasmas ning selle koondumist perinukleaarsesse piirkonda (Joonis 5, alumine rida). Y-27632-töötuse puhul koondus osa aktiin-GFP-st plasmamembraani lähedusse ning eriti just lamellipoodidesse.

Tugevam ARC-341 efekt oli märgatav 1-tunnilise inkubatsiooni möödudes, kus aktiini fiibrid veel eksisteerisid, kuid nad olid selgelt hapramad ning katkenumad (Joonis 5, keskmine rida). Alates 1 tunnist muutusid aktiini filamendid järjest narmendavamateks kuni enamus neist kadus 7 tunni jooksul. ARC-341-töötusele omaselt toimus aktiini tsütoskeleti dissotsieerimine rakkude tsentraalses osas, samas kui kortikaalsed fiibrid olid alati olemas ning nende intaktsust inhibiitoriga töötlemine ei mõjutanud. Perifeersed aktiini „kaablid” plasmamembraani all säilusid ka 20 μ M ARC-341 korral (avaldamata andmed). 7-tunnilise ARC-341-töötuse möödudes kadus rakkude normaalne kuju ning nad omandasid „karvase” fenotüübi. Karvase fenotüübi kutsus esile rohkete filopoodide esinemine ARC-341-ga töödeldud rakkude pinnal.

Y-27632 töötus omas tugevat efekti rakkude aktiini tsütoskeletile juba 15 min jooksul, samas kui rakkude poolt omandatud lamestunud morfoloogia säilus kõikide ajapunktide jooksul. Y-27632 puhul oli selgelt märgata kõikide, ka kortikaalsete aktiinifiibrite kadumist ning lamellipoodide induktsiooni (Joonis 5, alumine rida). Siiski oli 7 tunni pärast märgata rakkude morfoloogia muundumist lamellipoodiderikkast olekust jätkeid omavateks rakkudeks. Moodustunud jätked olid kaetud hõredate lühikeste mikroogadega, kuid neid oli vähem ja nad olid lühemad kui ARC-341-ga töödeldud rakkudes detekteeritud filopoodid. Samuti oli 7 tunni möödudes märgata Y-27632-ga töödeldud rakkude puhul mõningast rakkude kokkutõmbumist ning rakusuuruse vähenemist.

ARC-341 oli lisaks olemasolevate aktiini fiibrite dissotsieerimisele võimeline takistama ka aktiini tsütoskeleti *de novo* teket rakkudes, kus aktiini tsütoskelett oli eelnevalt dissotsieeritud pikaajalise (24 tundi) seerumvabas söötmes inkubeerimisega ning seejärel selle moodustumist indutseeritud lüsofosfatidüülhappega (LPA). ARC-341-töötus vähendas oluliselt aktiinifilamentide arvu ning jämedust, kuid ühendi toime ei olnud nii tugev kui Y-27632 korral. Y-27632-töödeldud rakkudega samaväärse efekti saavutamiseks oli vaja kasutada

kõrgemat ARC-341 kontsentratsiooni. ARC-341 blokeeris aktiini tsütoskeleti moodustumise 20 μM kontsentratsiooni juures, andes analoogsed tulemused 10 μM Y-27632-ga (avaldamata andmed).

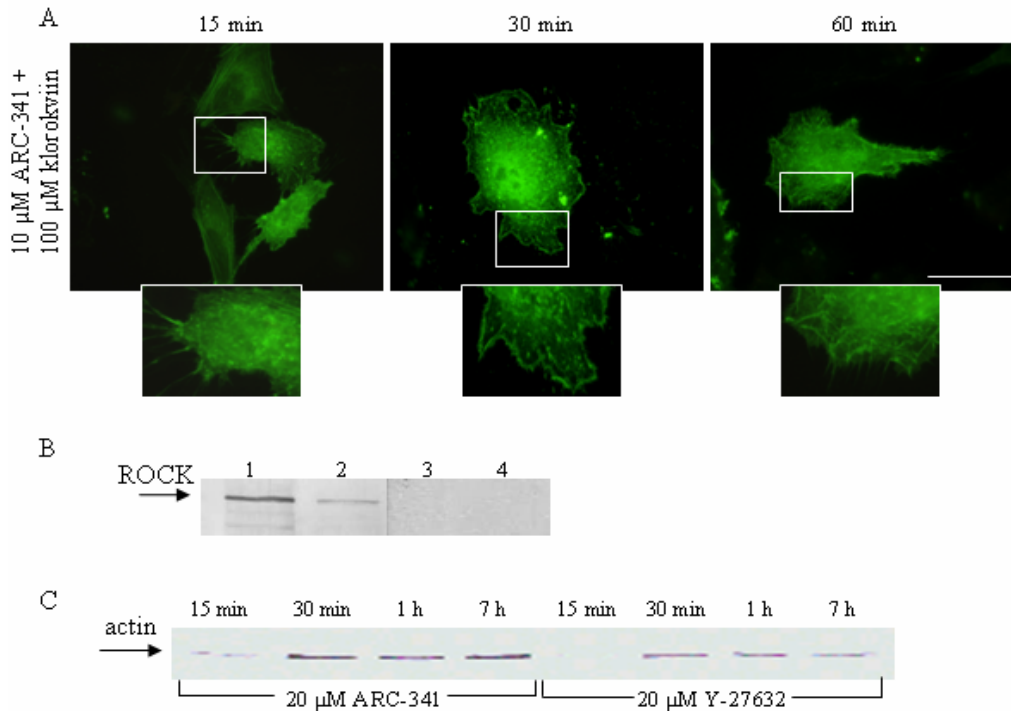


Joonis 5. ARC-341 ja Y-27632 toime aktiini tsütoskeletile.

HeLa rakud transfekeeriti aktiin-GFP-d ekspresseeriva plasmiidiga ning töödeldi seejärel 10 μM ARC-341 või Y-27632-ga temperatuuril 37 °C 15 minutit, 1 tund või 7 tundi. Aktiinifibrilite dissotsieerumine oli nähtav mõlema Rho-kinaasi inhibiitori puhul, kuigi Y-27632 oli märgatavalt tugevama toimega. Lisaks sellele indutseeris Y-27632-töötlus rohkete lamellipoodide (ja jätkete) tekke ning aktiini koondumise nendesse struktuuridesse. ARC-341 põhjustas lühemaegsetel inkubatsioonidel aktiinifibrilite narmendamist, pikematel aga tsentraalsete filamentide kadumise ning arvukate filopoodide (ja “karvase” fenotüübi) tekke. 7 tundi seerumivabas keskkonnas kasvanud (7 h sfIMDM) rakude aktiinifibrilid olid peenemad kui töötlemata rakkudes, kuid säilunud olid nii tsentraalsed kui kortikaalsed filamentid. Mõõtlõik 50 μm .

Klorokviin tugevdab ARC-341 inhibitoorset efekti

ARC-i rakkudesse sisenemise katsetes selgus, et klorokviin tõstab ARC-343 kontsentratsiooni tsütoplasmas, mistõttu kontrollisime klorokviini võimet tugevdada ARC-341 inhibitoorset mõju aktiini tsütoskeletile rakkudes, mis ekspresseerisid aktiin-GFP valku. 15-minutiline inkubatsioon 10 μ M ARC-341-ga koos klorokviiniga kaotas enamuse aktiinifibritest ning järelejäänud tsütoskelett narmendas tugevalt (Joonis 6A). Lisaks olid osad rakud kaotanud ARC-341-töötluusele omase kortikaalse aktiini ning rakkudele, kus oli märgata suurimat inhibitoorset efekti, oli moodustunud hulganisti pikki filopode. Leidus ka rakke, millele klorokviin ei olnud koos ARC-341-ga suurenenud efekti andnud, mistõttu nende aktiinifibriid olid nähtavad, kuigi peenemad ning meenutasid ainult ARC-341-ga töödeldud rakke. 30 minuti möödudes sarnanesid rakud enamasti Y-27632-töödeldud rakkudega, olles kaotanud kogu oma aktiini tsütoskeleti ning omasid mõningal määral neile tüüpilisi lamellipode plasmamembraani all (Joonis 6A). Aktiin-GFP lokaliseerus difuusselt tsütoplasmas, olles mõningal määral koondunud lamellipoodidesse, ning pikad ohtrad filopoodid olid asendunud lühemate mikroogadega. 1-tunnilise inkubatsiooni järel sarnanesid rakud samuti Y-27632-töödeldud rakkudega, kuid nende plasmamembraanil oli rohkem mikroogasid ning vähem lamellipode. Kuigi klorokviini koostoimel muutis ARC-341 rakud sarnaseks Y-27632-töödeldud rakkudele, ei leidunud ARC-341 korral rakke, mille pinnal oleksid eksisteerinud jätked (iseegi pikaajalisema inkubatsiooni järel). Y-27632 toimele ei avaldanud klorokviin aga mitte mingit efekti (avaldamata andmed).



Joonis 6. (A) Klorokviinitöötlus tugevdab ARC-i inhibitoorset efekti.

Aktiin-GFP plasmiidiga transfekeeritud HeLa rakke inkubeeriti 10 μM ARC-341-ga koos 100 μM klorokviiniga 37 °C juures 15, 30 või 60 minutit. Enamus rakkudes olevaid fiibreid kadus juba 15-minutilise töötuse järel, alates 30 minutist dissotsieerusid ka kortikaalsed fiibrid ja rakud sarnanesid Y-27632-ga töödeldud rakkudele. Samas esines ARC-341 ja klorokviini koostoimel rohkem mikroogasid ning Y-27632-töötlusele omaseid jätkeid ei moodustunud. Mõõtlõik 50 μm.

(B) ARC-agarooosi maatriks (ARC-342) seob efektiivselt ja tugevalt Rho-kinaasi.

HeLa rakulüsaati inkubeeriti 1 tund ARC-agarooosiga 4 °C juures. Enamus Rho-kinaasi seondus aafiinusmaatriksile (rada 1) ning ainult väike osa ROCK-ist ei olnud võimeline 1 tunni jooksul maatriksile kinnituma (rada 2). Moodustunud ARC-ROCK kompleks oli tugev ja stabiilne, sest aafiinusmaatriksi pesemisel ei eraldunud kinaasi pesulahustesse (rada 3, esimene pesulahus; rada 4, viies pesulahus).

(C) ARC-341 põhjustab aktiinifiibrите dissotsieerimist oligomeerideks efektiivsemalt kui Y-27632.

HeLa rakke inkubeeriti 20 μM ARC-341 või Y-27632-ga 37 °C juures 15, 30 minutit, 1 või 7 tundi, töödeldi seejärel Triton X-100-ga, et muuta rakumembraan osaliselt läbilaskvaks ning soodustada lühemate aktiini fragmentide lekkimist rakkudest välja. ARC-341-töötlus produtseerib rohkem aktiini oligomeere ning erinevalt Y-27632-st, suudab dissotsieerimiseefekti säilitada ka pikemaajaliselt.

ARC-341 põhjustab aktiinifiibrите dissotsieerimist oligomeerideks efektiivsemalt kui Y-27632

Kuigi aktiinifiibrите dissotsieerimisel andis ARC-341 nõrgema efekti kui Y-27632, hinnati mõlema inhibiitori toimel tekkinud monomeerse aktiini hulka Western blot analüüsiga. Selleks töödeldi rakke 20 μM ARC-341 või Y-27632-ga 15 min, 30 min, 1 tund või 7 tundi ning inkubeeriti Triton X-100-ga, et muuta rakumembraan auklikuks. Plasmamembraanis olevatest aukudes väljuvad rakkudest lühemad aktiini fragmendid, samas kui pikemad ning

plasmamembraaniga seotud tsütoskeleti fragmendid seal läbi ei mahu. Ekstratsellulaarsesse keskkonda kogunenud aktiini hulka kvantifitseeriti Western blot'il.

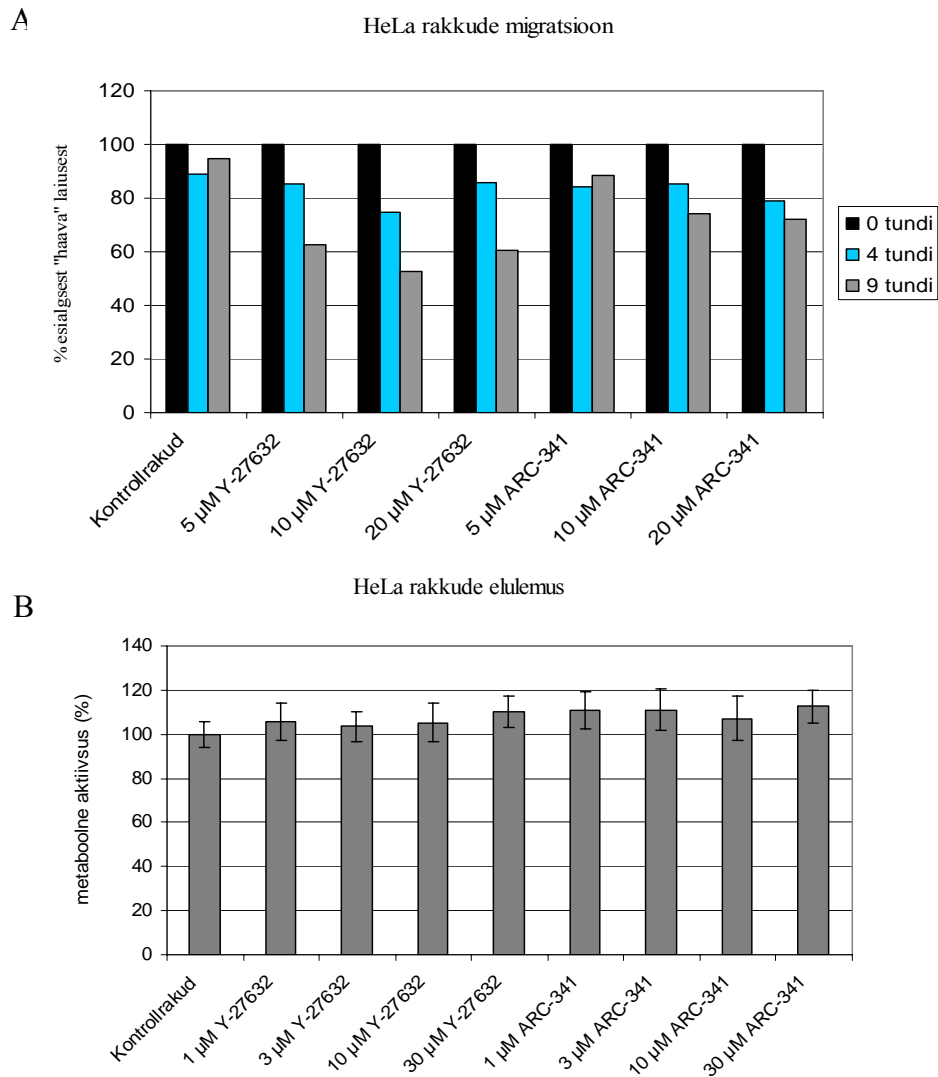
Olenemata sellest, et ARC-341 omas aktiini tsütoskeleti lagunemisele märksa väiksemat efekti, oli 20 μM ARC-341-ga inkubeerimise järel selgelt näha suuremat hulka lühikesi aktiini oligomeere kui Y-27632-ga töödeldud rakkudes. Kirjeldatud efekti oli märgatav juba 15 minuti järel, kuid tendents säilis kuni 7 tunnise inkubatsiooniaja lõpuni (Joonis 6C). Mõlema inhibiitori korral oli näha ajas suurenevat aktiini monomeriseerimise võimet, mis jõudis maksimumpunktini 30 minuti pärast ning püsis 7 tunnini. Siiski, Y-27632 efekt vähenes oluliselt pikemaajalise inkubatsiooni (7 tunni) käigus, kuid ARC-341 suutis efektiivselt säilitada kõrge aktiini dissotsieerimise aktiivsuse ka 7 tunni möödudes.

Y-27632- ning ARC-341-töötlus muudavad rakud liikuvaks

Rho-kinaaside osalust rakuliikumises on näidatud mitme grupi poolt (Shiokawa *et al.*, 2002; Koga *et al.*, 2006), siiski pole täieliku konsensuseni jõutud, kas ROCK-i inhibeerimine soodustab või pärsib rakkude liikumist. Rakkude morfoloogia ja kuju vaatlemisel aktiini tsütoskeleti dissotsieerimisel oli selge, et Y-27632-töötlus muudab rakud lamedamaks ning soodustab liikumise alustamiseks vajalike lamellipoodide tekkimist plasmamembraanile. Et kontrollida kasutatud Rho-kinaaside toimet rakkude migratsioonile, viidi läbi „haava paranemise” katse, kus 100% konfluentsesse rakukultuuri tekitati pipetiotsikuga „haav”, mille laiust mõõdeti enne (0-tunniline töötlus) ja pärast 4- ja 9-tunnilist inkubatsiooni Y-27632 või ARC-341-ga. Mõlema inhibiitori juuresolekul vähenes haava laius sõltuvalt inkubatsiooniajast ning oli märgata rakkude migratsiooni aktiivsuse järkjärgulist tõusu pikenevate töötlusperioodide puhul (Joonis 7A). ARC-341-töötusega toimus tugevam „haava” paranemine 4 tunni jooksul (kus haava esialgsest laiusest oli järel ligi 80-85%), samas kui 9-tunniline inkubatsioon küll vähendas veelgi „haava” laiust, kuid muutus oli väiksem. ARC-341 puhul oli lisaks ajalisele sõltuvusele näha mõningal määral kontsentratsioonist sõltuvat liikumise aktiveerumist, saavutades 10 μM ja 20 μM kontsentratsiooni juures umbes 25-30%-lise „haava paranemise”.

Y-27632-töötlus muutis rakud esimese 4 tunni möödudes enamvähem sama liikuvaks kui ARC-341 korral, kus haava laius moodustas 75-85% esialgsest mõõdust. Drastiline muutus oli märgata 9-tunnilise inkubatsiooni järel, kui „haav” oli vaid 50-60% esialgsest laiusest. Y-27632 omas seega tugevamat ajast sõltuvat toimet rakkude mobiilsusele kui ARC-341 ning

suutis lisaks esimesele 4 tunnile mõjuda liikumisele soodustavalt ka järgmised 5 inkubatsioonitundi. Y-27632 korral ei olnud näha olulist kontsentratsiooni-sõltuvust liikumise käivitamisele ning kõik kasutatud Y-27632 kontsentratsioonid (5 - 20 μM) suutsid esile kutsuda samaväärse rakkude migratsiooni taseme.



Joonis 7. (A) ARC-341 ja Y-27632 aktiveerivad rakkude liikumist.

Konfluentesse HeLa rakukultuuri tekitati pipetiotsikuga “haav”, mille laiust mõõdeti enne (0 tundi) ja pärast 4- ja 9-tunnilist inkubatsiooni 5 - 20 μM ARC-341 või Y-27632-ga 37 °C juures. Mõlemad ühendid aktiveerisid rakkude liikumist, kuid ARC-341-indutseeritud aktiivne migratsioon toimus põhiliselt 4 tunni jooksul, samas kui Y-27632 korral toimus “haava paranemine” ühtlases tempos kuni 9 tunnini.

(B) ARC-341 ja Y-27632 ei pärssi rakkude metaboolset aktiivsust.

HeLa rakke inkubeeriti 1, 3, 10 või 30 μM ARC-341 või Y-27632-ga 37 °C juures 1 tund, misjärel mõõdeti rakkude metaboolne aktiivsus MTT analüüsiga. Kumbki kasutatud ühend ei vähendanud rakkude metaboolset aktiivsust kasutatud kontsentratsioonidel võrreldes kontrollrakkudega.

Kontrollrakkudel oli samuti märgata mõningast rakkude mobiilsust, kuid liikumine oli vähene ning „haava” laius muutus enamasti vaid 5-10% ulatuses. Lisaks rakkude migratsiooni aktiivsuse määramisele vastusena ROCK-i inhibeerimisele, uurisime Rho-kinaasi lokaliseerimise liikuvates rakkudes nii immunofluorestsismikroskoopiliselt kui ekspresseerides rakkudes ROCK-EGFP-d. Rho-kinaasi koondumist kindlatesse rakulistesse piirkondadesse või kompartmentidesse migratsioonil või ensüümi aktiivsuse inhibeerimisel ei olnud võimalik kasutatud vahenditega detekteerida. Hajus tsütoplasmaatiline Rho-kinaasi signaal ei kadunud töötluste käigus ning säilis ka pikemaajaliste inkubatsioonide korral (avaldamata andmed).

Y-27632-töödeldud rakkude fokaalsed kontaktid on nõrgenenud, ARC-341-ga inkubeeritud rakkudel on fokaalsed kontaktid tugevamad

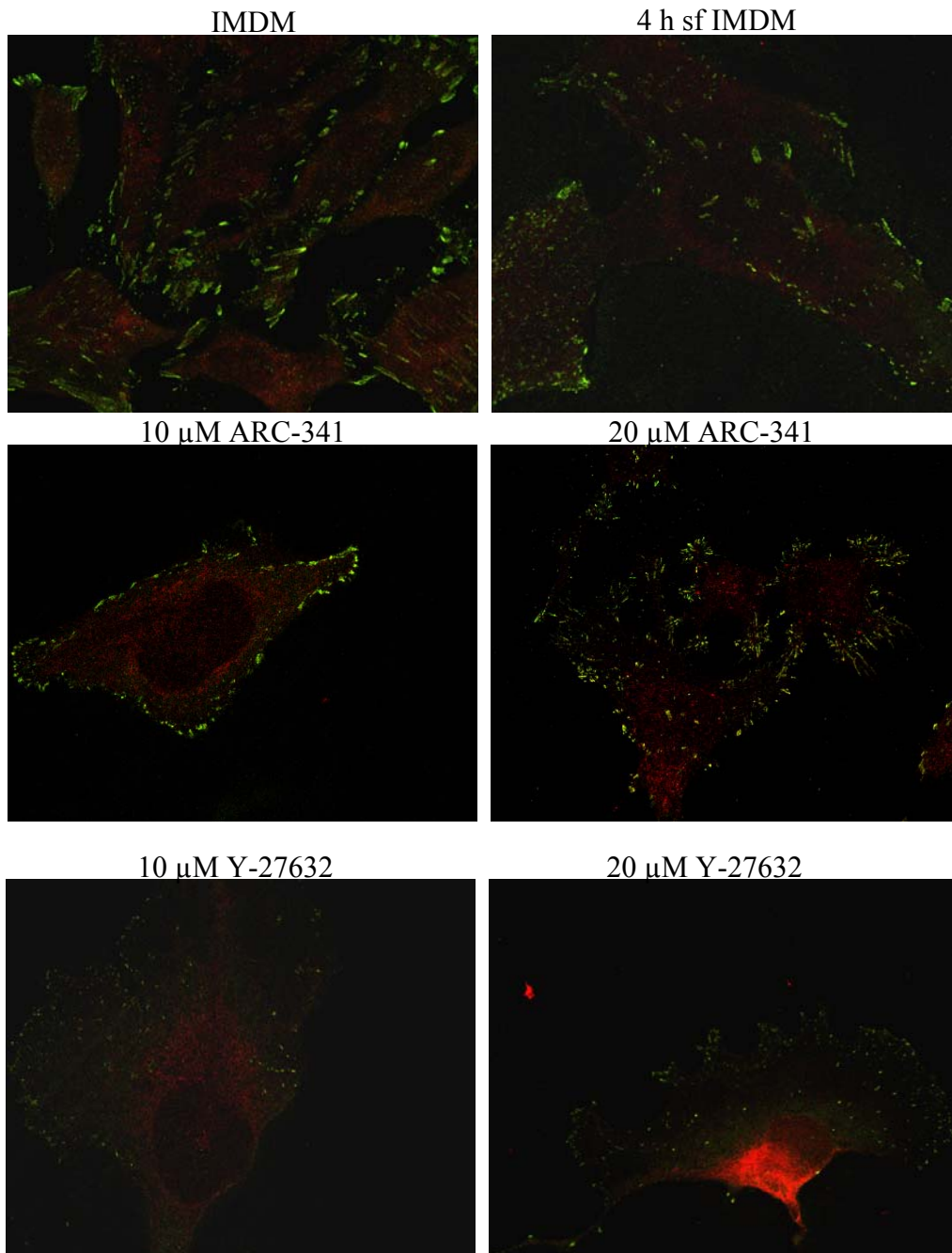
Rakkude liikumisega kaasneb raku lamestumine ning lamellipoodi(de) moodustumine juhtivale otsale (Kraynov *et al.*, 2000; Small *et al.*, 2002). Migreerumise hetkel moodustuvad fokaalsed kontaktid raku juhtiva otsa ning substraadi vahele. Formeeruvad fokaalsed kontaktid on dünaamilised ning võivad nii katkeda kui areneda küpseteks adhesioonideks, liikudes järkjärgult raku tagumise osa poole (Kaverina *et al.*, 2002). Eelnevatest katsetest selgus, et Y-27632 soodustab HeLa rakkude lamestumist, lamellipoodide moodustumist ning rakkude migreerumist, samas kui ARC-341-töötlus muutis rakud filopoodiderikkaks ning mõjus migreerumise aktiveerumisele nõrgemini. Seda, kuidas vastavad inhibiitorid mõjuvad rakulistele fokaalsetele kontaktidele ja adhesioonidele, vaadeldi immunofluorestsentsmikroskoopiliselt, kasutades kontaktide ja adhesioonide märkimiseks antud struktuuridesse koondunud markereid – vastavalt fosfotürosiinivastast või *zyxin*’ivastast antikeha. Seerumiga söötmes kasvatatud rakkudes esinesid tugevad fokaalsed kontaktid, mis paiknesid enamjaolt kimpudena raku plasmamembraani all või läheduses. Lisaks sellele oli paljude rakkude puhul märgata rakkude all olevaid kontakte, mis olid küllaltki tugevad ning asusid sageli paralleelsete ridadena (Joonis 8, ülemine rida). Seerumivabas keskkonnas olid paralleelsetena paiknevad fokaalsete kontaktide read kadunud, kuid mõningad hajusalt raku all olevad üksikute puktidenä märkunud kontaktid olid säilinud. Tugevad fokaalsete kontaktide kimbud plasmamembraanil olid alles jäänud ning need ääristasid rakkude servi nagu seerumit sisaldavas söötmes kasvatatud rakkude puhul (Joonis 8, ülemine rida).

10 μ M ARC-341 töötlus kaotas kõik rakkude all paiknevad kontaktid ning alles jäid vaid plasmamembraani ääristavad tugevad fokaalsete kontaktide kimbud, mis olid võrreldes

kontrollrakkudega nõrgemad, kuid ääristasid ühtlaselt kogu rakku (Joonis 8, keskmine rida). Plasmamembraani kuju järgi hinnates, omandasid rakud veidi lamestunud ilme ning kohati oli näha lamellipoodidelaadsete moodustiste formeerumist. 20 μ M ARC-341 soodustas silmnähtavalt filopoodide teket ning kõik moodustunud filopoodid olid täidetud fokaalsete kontaktide markeri fosfotürosiiniga (Joonis 8, keskmine rida). Tekkinud filopoodid paiknesid plasmamembraanil kimpudena, st. nad ei paiknenud mitte hajusalt üle kogu rakumembraani, vaid olid kogunenud kindlatesse regioonidesse. Üksikud kontaktid paiknesid ka rakupinna all, mis enamjaolt koondusid tuumaalusesse piirkonda.

Y-27632-töötamise puhul ei olnud märgata kontsentratsioonist sõltuvat vahet fokaalsete kontaktide lokaliseerimisel. Enamus olemasolevaid kontakte oli väikesed ning paiknesid hõredalt üle kogu raku ja substraadi vahelise piirkonna (Joonis 8, alumine rida). Võrreldes kontrollrakkudega, moodustusid Y-27632-töötamise tagajärjel oluliselt nõrgemad fokaalsed kontaktid ning tüüpilised tugevate kontaktide kimbud olid plasmamembraanil asendunud hajusate, punktiliste ja vaevumärgatavate fosfotürosiini märkumistega.

Fokaalsete adhesioonide muutumist ei olnud võimalik kasutatud töötamise käigus tuvastada ning kõikidel juhtudel oli märgata difuusse signaali esinemist tsütoplasmas, mis suuremas jaos koondus tuuma perifeersesse piirkonda (Joonis 8). Samuti ei olnud võimalik defineerida seda, kas *zyxin*'ivastase antikehaga märgitud fokaalsed adhesioonid paiknesid migreerumise suuna alusel tuumast ees- või tagapoolses osas, jäädes vastavalt raku juhtivasse või mahajäävasse/järeleveetavasse alasse.



Joonis 8. ARC-341 indutseerib raku all olevate fokaalsete kontaktide, aga mitte kortikaalsete kontaktide dissotsieerumist.

HeLa rakke inkubeeriti 4 tundi 10 või 20 μM ARC-341 või Y-27632-ga 37 °C juures ning fokaalsed kontaktid (roheline) ja adhesioonid (punane) visualiseeriti vastavalt fosfotürosiini ja *zyxin*'ivastase antikehaga. ARC-341-töötluste tagajärjel koondusid fokaalsed kontaktid raku alt plasmamembraani servadesse ning filopoodide tekkimisel antud struktuuridesse. Y-27632-töötluste tagajärjel paiknesid nõrgad fokaalsed kontaktid hajusalt üle kogu raku ning kontsentreerumist kindlatesse piirkondadesse ei olnud märgata. Fokaalsete adhesioonide signaal oli kõikide rakkude puhul ühtlaselt difuusne, koondudes enamasti tuuma lähedusse.

ARC-341 ei ole rakkudele toksiline

Arginiini oligomeerid võivad kõrgematel kontsentratsioonidel omada rakkudele toksilist efekti (Pooga *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2005). Kuna ARC-341 sisaldab oma struktuuris 6 arginiinijääki, kontrolliti ühendi toimet rakkude metaboolsele aktiivsusele. MTT test näitas, et 1-tunniline inkubatsioon ARC-341-ga ei oma pärssivat toimet HeLa (Joonis 7B) ega NIH3T3 (avaldamata andmed) rakkude elulemusele isegi 30 μM kontsentratsiooni juures. Kontrollrakkudega võrreldavad tulemused saadi kõigi kasutatud ühendi kontsentratsioonide juures. Lisaks kontrolliti ARC-341 pikaajalist mõju rakkudele, inkubeerides neid 1 tund ühenditega ning seejärel 24 tundi seerumiga söötmes, misjärel mõõdeti rakkude metaboolne aktiivsus. Erinevused kontrollrakkudega ei olnud tuvastatavad ühegi kasutatud ARC-341 kontsentratsiooni juures ning rakkude metaboolne aktiivsus oli identne töötlemata rakkude tasemega (avaldamata andmed).

Kuna osad penetreeruvad peptiidid on võimelised kõrgematel kontsentratsioonidel destabiliseerima plasmamembraani (Pooga *et al.*, 2002), kontrolliti ARC-341-töödeldud rakkude plasmamembraani terviklikkust LDH testiga. Järgides MTT testis kasutatud katseskeemi, leiti, et ARC-341 ei destabiliseeri rakkude plasmamembraani ka 30 μM kontsentratsiooni juures, kuna laktaadi dehüdrogenaasi (LDH) lekkimist töödeldud rakkudest ei olnud indutseeritud (avaldamata andmed).

ARUTELU

Proteiinkinaasid on võtmeensüümid enamikes rakulistes protsessides ning nende üleekspressioon või vale reguleerimine võib esile kutsuda erinevate tervisehäirete või haiguste tekkimise (Senderowicz, 2003; Michie ja Nakagawa, 2005; Anderson *et al.*, 2006). Antud töös uuritud proteiinkinaasid Rho-kinaasid ehk ROCK-id osalevad aktiini tsütoskeleti reguleerimisel, fosforüülides mitmeid substraate. ROCK-ide aktiivsus on seega vajalik arvukates raku elutegevuse protsessides, mille normaalseks toimimiseks on tarvis aktiini filamentide formeerumist, regulatsiooni ning dünaamikat, näiteks rakkude kinnitumine, liikumine, kontraktsioon või tsütokinees (Amano *et al.*, 2000; Riento ja Ridley, 2003; Nelson *et al.*, 2004).

Kuna proteiinkinaasid mängivad tähtsat rolli rakkude ning kogu organismi normaalse funktsioneerimise seisukohalt, on oluline disainida ning välja töötada neile erinevaid spetsiifilisi inhibiitoreid, et saavutada taas kontroll rakuprotsesside üle ning hävitada välja kujunenud haiguste kolded. Tänapäevani on enamuse proteiinkinaaside inhibiitorite disainimisel võetud aluseks ATP mimikeerimise strateegia (näiteks töös kasutatud Y-27632), et luua konkurents kahe molekuli vahel seondumisel ensüümi ATP-sidumistsentrisse (Ishizaki *et al.*, 2000; Senderowicz, 2002; Takami *et al.*, 2004). Antud töös uuriti ja kirjeldati uutlaadi bisubstraatse inhibiitori ARC (*adenosine-oligoarginine conjugate*) võimet maha suruda Rho-kinaaside aktiivsust, olles võimeline seonduma ning blokeerima nii kinaasi ATP- kui substraadi sidumissaidi. Antud põhimõttel ja strateegial disainitud ühendi võimet inhibeerida mitmete basofiilsete kinaaside aktiivsust (näiteks ROCK, PKA, akt/PKBa jm) *in vitro* on eelnevalt näidatud dr. Uri töögrupi poolt (Enkvist *et al.*, 2006). Käesolevas töös võrreldi ARC-i toimet ning efektiivsust Rho-kinaaside aktiivsuse mahasurumisele laialdaselt kasutuses oleva ROCK-ide inhibiitori Y-27632-ga rakukultuuris/elusates rakkudes, et saada täpsemat ülevaadet antud ühendite efektist rakkude aktiini tsütoskeletile ning migratsioonile.

Antud töös kasutatud ARC-341 peptiidne osa sisaldab 6 arginiinjääki, mis indutseerib tema sisenemist rakkudesse. TAMRA-ga märgitud ARC (ARC-343) sisenes efektiivselt HeLa rakkudesse, lisaks on näidatud tema võimet internaliseeruda ka NIH3T3 rakkudesse (avaldamata andmed). Oligoarginiinirikaste rakku penetreerivate peptiidide (RPP) sisenemismehhanism ning –transport raku on siiani veel selgusetud ja täpselt kirjeldamata. Siiski on kirjanduses näidatud, et oligoarginiinist koosnevad ja tugevalt laetud katioonsed

penetreeruvad peptiidid jäävad peamiselt vesikulaarsetesse struktuuridesse, sisenedes rakkudesse mingi endotsütoosiraja kaudu (Vivés *et al.*, 2003; Futaki *et al.*, 2004; Nakase *et al.*, 2004; Fotin-Mleczek *et al.*, 2005), ning vaid osa nendest on võimelised vesiikulitest „välja lekkima“ (Fuchs ja Raines, 2004). ARC-343 internalisatsioon oli samuti enamjaolt endotsütootiline, kuna fluorestsentsmärgis koondus vesiikulitesse ning punktiline signaal tsütoplasmas oli detekteeritav nii 30 minuti kui 2 tunni möödudes. TAMRA puhul on aga näidatud, et märgis ise soodustab mingil määral peptiidi (näiteks Tat) agregeerumist raku pinnal ning tõstab seega kunstlikult endotsütoosi osalust ühendi sisenemisel. Sellisel juhul kaldub peptiid jääma lõksu moodustunud endosoomidesse rohkem kui näiteks FITC-märgisega konjugeeritud kujul (Fischer *et al.*, 2002). Tõepoolest, FITC-iga konjugeeritud 4-arginiini jääki sisaldava ARC-iga olid tekkinud fluorestsentsmärgist sisaldavad vesiikulid väiksemad ning translokatsiooni läbi plasmamembraani tundus olevat rohkem (avaldamata andmed). ARC-343 puhul oli lisaks endosoomides sisalduvale signaalile märgata mõningast hajusat tsütoplasma märkumist, mis viitab sellele, et ARC-i esines rakkudes ka ekstravesikulaarselt. Tsütoplasma fluorestsentssignaal viitab ka endotsütoosist sõltumatu sisenemisraja kasutamisele rakkudesse internaliseerumisel. Endotsütoosist sõltumatu sisenemine võib olla (i) vahendatud adenosiini planaarse struktuuri poolt, mis võib põhjustada translokatsiooni läbi plasmamembraani ilma endotsütootiliste vesiikulite moodustumiseta (Derossi *et al.*, 1994; Christiaens *et al.*, 2004) või (ii) indutseeritud oligoarginiini enese poolt (Zaro ja Shen, 2003; Rothbard *et al.*, 2004). Rakkude töötlemine üheaegselt ARC-343 ja klorokviiniga suurendas ARC-i sisaldavaid vesiikuleid ning intensiivistas vesiikulitesse koondunud signaali. Klorokviin mõjub endotsütootiliste vesiikulite küpsemisele, takistades nende hapustumist (Joonis 4), mis viib vesiikulite paisumisele ning võib indutseerida varaste endosoomide fuseerumist. Kuna ARC-i sisaldus klorokviiniga töödeldud rakkudes olevates vesiikulites paistis olevat suurem, võisid nende vesiikulite membraanid olla ebastabiilsemad ning põhjustada suuremat ühendi lekkimist, nagu varemgi on kirjeldatud (Fuchs ja Raines, 2004). ARC-343 signaal oli klorokviiniga töödeldud rakkude tsütoplasmas mõnevõrra tugevam, mis tähendab, et vähemalt osa vesiikulites lõksus olnud ARC-ist oli suuteline vabanema klorokviini juuresolekul. Klorokviini toimel muutus ARC-i sisaldavate vesiikulite struktuur ning nende membraan võis muutuda läbilaskvamaks, mis põhjustas (i) ARC-i lekkimist kõikidest vesiikulitest või (ii) põhjustas osade vesiikulite purunemise ja nendes sisalduva materjali sattumise tsütoplasmasse. Huvitav on see, et LysoSensoriga töödeldud rakkudes suutis ka ARC ise indutseerida mõningal määral klorokviinile sarnaseid efekte, kus endosomaalsete vesiikulite hapustumine oli mõningal määral takistatud. See aga võib

tähendada, et ARC on võimeline ise indutseerima lekkivamate vesiikulite moodustumist rakus, mis võis olla üheks mitmest võimalusest, kuidas ARC hajusalt tsütoplasmasse kogunes. Mikrosüstimisel selgus, et rakkude tsütoplasmasse viidud ARC-343 lokaliseerus kõigepealt hajusalt üle kogu tsütosooli ning koondus seejärel tuuma ja tuumakestesse, nagu on näidatud mitmete teistegi tugevalt laetud katioonsete molekulide puhul (Fagerlund *et al.*, 2002; Moulton ja Moulton, 2004; Fabre ja Collins, 2006). Kuna mikrosüstimisel viidi ARC-343 rakkudesse Rho-kinaasi kontsentratsiooni suhtes ülehulgas, on võimalik, et tsütoplasmasse jäi püsima ainult see osa ARC-ist, mis oli seondunud oma sihtmärgiga ning käivitas seal eesmärgipäraseid efekte. Tõenäoliselt liikus ülejäänud osa inhibiitorist vastavalt oma füüsikalise-keemilistele omadustele raku poolt juhitud transpordiraja kaudu tuumakestesse, kus tema funktsioon ning toime on veel teadmata.

ARC-i efektiivsus siduda oma sihtmärki, Rho-kinaasi, rakkudes, tuvastati afiinsusmaatriksi abil. Maatriksile seondunud materjali analüüsil selgus, et ARC on võimeline tõhusalt seondama ning kontsentreerima ROCK-i ning moodustunud kompleks kahe molekuli vahel osutus tugevaks. Lisaks Rho-kinaasile, sidus kasutatud ARC-agaros maatriks (ARC-342) teisigi molekule (näiteks PKA katalüütilist subühikut (avaldamata andmed)), mis võis olla tingitud (i) ühendi peptiidse osa tugevast positiivsest laengust ja/või (ii) tema adenosiinigrupist. Märkimisväärne osa rakus leiduvatest ensüümidest kasutab ATP-laadset induktorit või katioonset substraati, mistõttu on võimalik, et ARC seondub mittespetsiifiliselt ka nende valkudega. Samas ei pruugi ühendi seandumine eelpoolmainitud omadustega molekulidega veel põhjustada nende aktiivsuse muutumist või häiritud reguleerimist. Kuna afiinsuskromatograafia katsetes kasutati ARC-agaros maatriksit võrreldes rakusisese Rho-kinaasi kontsentratsiooniga mitmekordses ülehulgas, võime oletada, et enamuse ROCK-i seoti afiinsusmaatriksile (tänu kõrgemale afiinsusele) eelisjärjekorras. Seega, sidudes enamuse rakulüsaadis sisalduvast Rho-kinaasist, täidab kasutatud inhibiitor efektiivselt oma funktsiooni ja on võimeline andma soovitud efekte ka rakulises keskkonnas.

Mitmed erinevad töögrupid on näidanud, et Y-27632 omab toimet aktiini tsütoskeletile, suutes efektiivselt lagundada rakkudes olevaid aktiini filamente (Ishizaki *et al.*, 2000; Honjo *et al.*, 2001; Katoh *et al.*, 2001). Antud töös saadud tulemused kinnitavad seda, et Y-27632 on efektiivne Rho-kinaaside inhibiitor, dissotsieerides aktiinifibriid juba 15-minutilise inkubatsiooni jooksul. Y-27632 toimel inhibeeritud ROCK-i aktiivsus viis aktiini tsütoskeleti kadumisele ning aktiin-GFP koondumisele lamellipoodidesse, viidates Rac1 aktiivsuse

prevaleerimisele. Mitmed erinevad grupid on kirjeldanud RhoA ning Rac1 vastastikust reguleerimist, mistõttu RhoA-st lähtuva raja inhibeerimine soodustab Rac1-raja domineerimist ja vastupidi (Moorman *et al.*, 1999; Rottner *et al.*, 1999; Salhia *et al.*, 2005). See seletab saadud tulemusi, et ROCK-ide inhibeerimine viib Rac1 poolt indutseeritud lamellipoodide tekkele ja plasmamembraani lainetamisele (*membrane ruffling*). Pikemaajaline inkubatsioon Y-27632-ga põhjustas jätkete moodustumise rakumembraanil, mis viitab aga liikuva fenotüübi omandamisele (Holtje *et al.*, 2005; Koga *et al.*, 2006). RhoA/ROCK signaaliraja katkestamine takistab fokaalsete adhesioonide küpsemist ning põhjustab mittepüsivate kontaktide prevaleerimise raku ja substraadi vahel. Nagu eelnevaltki näidatud, soodustas Y-27632 rakkude migreerumist, nõrgendades fokaalseid kontakte ja/või kaotades need rakkudes täielikult ning lagundades tugevad fokaalsed kontaktid rakuäärealadelt. Kuna kontakt substraadiga nõrgeneb ja raku juhtivale otsale moodustuvad liikumist indutseerivad lamellipoodid, on rakkude liikumine indutseeritud. Lisaks eelnevale oli Y-27632 puhul märgata mõningat rakkude suuruse vähenemist, mis võib olla tingitud samuti fokaalsete kontaktide ning adhesioonide nõrgenemisest, mis takistab rakkudel laiali sirutumast ning neile omast rakukuju ning suurust omandamast.

ARC-341 mõjus rakkude aktiini tsütoskeletile teisiti ja mõningal määral nõrgemini, kuna nähtavad inhibitoorsed efektid aktiini tsütoskeletile ilmsid alates 60-minutilise inkubatsioonist. ARC-i madalam inhibitoorne efekt lühiajalisematel inkubatsioonidel võib olla tingitud asjaolust, et märkimisväärne osa ARC-ist paikneb siis veel alles vesikulaarsetes struktuurides ning tema tsütosoolne kontsentratsioon ei ole veel piisav Rho-kinaaside aktiivsuse täielikuks pärssimiseks. ARC-341-töötlemisele omased nõrgad ning narmendavad aktiinifibriidid olid detekteeritavad kuni 4 tunnilise inkubatsioonini (avaldamata andmed). 7-tunniline ARC-341 töötlemine kaotas täielikult enamike rakkude tsentraalsed fiibrid, kuid tugevad kortikaalsed aktiinikaablid olid alati olemas. Teinegi märgatav erinevus Y-27632- ja ARC-341-töötlemise vahel oli see, et viimasega oli eelistatult indutseeritud hoopis filopoodide (mitte lamellipoodide) teke ning rakud omandasid „karvase” fenotüübi. Pikad ning arvukad filopoodid rakkude pinnal aga viitavad signaali kandumisele Cdc42-le ning antud väikesest GTPaasist lähtuvatele radadele (Kozma *et al.*, 1995; Nobes ja Hall, 1995; Takai *et al.*, 2001). Kuna lamellipoodide moodustumine oli ARC-341-töötlemise korral vähene ning prevaleeris Cdc42-aktivatsioon, olid rakud vähem valmid migreeruma ning seda näitas ka haava paranemise katse. Samuti võib väita fokaalsete kontaktide rohkuse ning tugevuse põhjal, et

rakud olid substraadi küljes jäigemalt kinni, seda just rakuäärtesse ning filopoodidesse koondunud kontaktide abil.

Klorokviin võimendas ARC-341 inhibitoorset efekti ning märgatavad muutused aktiini tsütoskelekti organiseerumises olid tuvastatavad juba 15 minuti möödudes, kuigi kirjeldatud toimet ei olnud võimalik kõikides rakkudes näha. Klorokviin suurendas rakkude tsütoplasmasse jõudvat ARC-i kontsentratsiooni ning tugevdas seetõttu ARC-i võimet seondada oma sihtmärkensüümi, Rho-kinaasi, tsütosoolis ja inhibeerida selle aktiivsust. ARC-341 ning klorokviini koostoimel saavutatud efekt aktiini tsütoskeletile tugevnes ajas kuni rakud sarnanesid suuremas osas Y-27632-ga töödeldud rakkudega, viidates sellele, et signaalirada kaldus Rac1-induktsiooni suunas. Samas võib rakkude fenotüübiliste omaduste põhjal öelda, et kuigi toimus selge Rac1-st lähtuva signaaliraja käivitumine, ei olnud Cdc42-rada veel täielikult välja lülitatud, kuna klorokviini ja ARC-iga koos töödeldud rakkudes säilusid arvukad, kuigi mõnevõrra lühemad mikroogad. Lisaks võib väita, et Rac1-ratta suundumine ei olnud nii tugev kui Y-27632 korral, sest kuigi moodustusid mitmed lamellipoodid, polnud ka pikemaajalise inkubatsiooni korral märgata rakke, millel oleksid moodustunud jätked ning täiendav liikumisvõime. Lisaks eelnevale, ei omanud kontrollina kasutatud rakku penetreeruvad peptiidid (Tat, Arg₉) aktiinisaldavate struktuuride terviklikkusele mingit toimet (avaldamata andmed), mis tõestab, et aktiini tsütoskeleti dissotsieerimisvõime on omane just ARC-ile, mitte tema peptiidsele motiivile.

Western blot analüüsiga kvantifitseeritud aktiini fiibrilise lagunemise võime hindamisel selgus, et ARC-341 produtseerib märgatavalt rohkem lühikesi aktiini oligomeere ning suudab säilitada kirjeldatud efekti ka pikemaajalistel töötlustel. Võimalik, et Y-27632-töötlusega moodustunud aktiini monomeerid inkorporeeritakse koheselt moodustuvatesse lamellipoodidesse, mis olid märgatavad ka fluorestsentsmikroskoobiga tehtud kujutistel. Kuid ei saa välistada ka olukorda, kus Y-27632 soodustab lihtsalt suuremate oligomeeride moodustumist, mis ei olnud võimelised kunstlikult rakkude plasmamembraani tekitatud pooridest välja lekkima. Seetõttu võib oletada, et ARC-341 on efektiivsem inhibiitor, olles võimeline produtseerima suuremal hulgal lühemaid aktiini fragmente.

ARC-341 ja Y-27632 efekti Rho-kinaasi sihtmärkvalkude fosforüülituse tasemetele uuriti samuti Western blot analüüsiga nii NIH3T3 kui HeLa rakkudes. Kasutatud antikehadega ei olnud võimalik kummagi inhibiitoriga töötlemisel tuvastada erinevusi müosiini kerge ahela,

müosiini fosfataasi ega kofiliini fosforüülimises võrreldes kontrollrakkudega. Sageli põhjustab ka vähene ensüümi aktiivsuse või valgu aktiivse vormi varieerumine olulisi ümberkorraldusi rakulistes protsessides. Seetõttu võib oletada, et kirjeldatud fenotüübiliste muutuste saavutamiseks vajalik fosforüülituse tasemete muutumine ei olnud piisav selle detekteerimiseks antud analüüsiga. Tõenäoliselt on antud fosfotüülitud valkude kontsentratsioonide mõõtmiseks vaja kasutada täpsemaid meetodeid või spetsiifilisemaid antikehi.

Antud töös kirjeldatud ARC-i poolt põhjustatud nõrgemad efektid rakukultuuris võrreldes *in vitro* tulemustega võivad olla põhjustatud faktist, et enamus ARC-ist siseneb antud kontsentratsioonil rakkudesse endotsütoosi teel. Esiteks, võib limiteerivaks astmeks olla ARC-i vabanemine vesiikulitest, teiseks, võib endosomaalne internalisatsioon suunata ühendi proteolüütilisele lagundamisele ja degradeerida inhibiitori peptiidse osa, mis vähendaks tema afiinsust oma sihtmärgi suhtes. Üheks võimaluseks mainitud probleemide lahendamisel on ARC-i pegüleerimine, mis pikendab tema eluiga *in vivo* ning parandab tema proteolüütilist stabiilsust (Viht *et al.*, 2003), kuid lisagrupid muudavad ARC-i molekuli suuremaks ning see võib segada tema sisenemist rakkudesse. Teiseks võimaluseks on D-aminohapetest koosnev peptiid, mis suudab vastu pidada lagundavate ensüümide aktiivsusele, mistõttu D-arginiinijääkidest koosneva peptiidse osaga ARC on sünteesimisel.

Kuna ARC on võimeline efektiivselt sisenema rakkudesse ning seal siduma ja inhibeerima Rho-kinaasi omamata toksilist mõju rakkude metaboolsele aktiivsusele, on selge, et kasutatud bisubstraatne strateegia on rakendatav teistegi proteiinkinaaside inhibiitorite disainimisel ja väljatöötamisel.

KOKKUVÕTE

Rakuliste protsesside korrektseks toimimiseks on vajalik erinevate proteiinkinaaside täpset regulatsiooni. Üheks oluliseks proteiinkinaasiks, mis vastutab raku normaalseks elutegevuseks vaja minema aktiini tsütoskeleti moodustumise ning ümberkorraldamise eest, on Rho-kinaas. Rho-kinaasi signaalirada kutsub nii otseselt kui kaudselt esile aktiinifiibrite koostises oleva müosiini kerge ahela fosforüülitusastme tõusu, tugevdades olemasolevaid fiibreid ning põhjustades sile-, südame- ja mittelihaskrakkudes kontraktsiooni. RhoA-ROCK raja üleaktiveerumine võib põhjustada erinevate haiguste (näiteks südamelihaste või vaskulaarsete silelihaste hüperkontraktsiooni) teket. Rho-kinaasi aktiivsust on võimalik maha suruda sünteetiliste inhibiitoritega (näiteks Y-27632), kuid kõrgema spetsiifika ning afiinsusega inhibiitorite välja töötamine on vajalik paremate tulemuste saavutamiseks.

Antud töös kasutatud Rho-kinaasi inhibiitori adenosiin-oligoarginiini konjugaadi (ARC) disainimisel on lähtutud põhimõttest, et ühend oleks võimaline seonduma ja blokeerima kinaasil nii ATP- kui substraadisidumise tsentri. Kuna *in vitro* oli ARC efektiivsem inhibiitor Rho-kinaasile kui Y-27632, oli oluline kontrollida ühendi toimet rakulises keskkonnas.

ARC sisenes rakkudesse juba 30 minuti jooksul, polnud kasutatud rakkudele toksiline ning sidus efektiivselt Rho-kinaasi rakulüsaadist, tõestades ühendi kasutamisevõimalusi ka väljaspool *in vitro* tingimusi. ARC-iga saavutati märgatavad efektid rakkude aktiini tsütoskeletile 60 minutist 7 tunnini, samas kui Y-27632 töötlus mõjus juba alates 15 minutist ning toime püsis 7 tunnini. Klorokviin tõstis ARC-i tsütosoolset kontsentratsiooni ja tagas aktiinifiibrite efektiivse dissotsiatsiooni. Kuigi Y-27632 oli visuaalselt aktiini tsütoskeleti moodustumisele tugevam inhibiitor, suutis ARC produtseerida suuremas hulgas lühemaid aktiini oligomeere ning säilitada oma tugevat inhibitoorset efekti ka 7 tunni möödudes. Mõlema inhibiitori töötlus suurendas rakkude migreerumisaktiivsust, kuid ARC-i korral toimus valdav enamus aktiivsest rakuliikumisest esimese 4 tunni jooksul, samas kui Y-27632-indutseeritud liikumine toimus ka pikemaajaliselt. Y-27632-töötusega saavutatud aktiivne rakkude liikumine väljendus ka fokaalsete kontaktide nõrgenemise ja kadumisenähtetena, mis ARC-i korral ei olnud nii prevaleeriv tendents. Võimalik, et ARC-i rakusisene toime on pärsitud tänu ühendi sisenemisele järgnevale suunamisele lüsoosoomidesse ning seal toimuvale proteolüütilisele lagundamisele, mistõttu on vajalik uurida ka D-arginiinidest koosneva ARC-i efekte rakukultuuris. Siiski võib eelneva põhjal järeldada, et ARC on efektiivne Rho-

kinaaside inhibiitor, mistõttu kasutatud bisubstraatne strateegia võib osutada sobivaks mudeliks kõrgema afiinsusega inhibiitorite disainimisel erinevatele proteiinkinaasidele.

BISUBSTRATE INHIBITOR ARC EFFECTIVELY MODULATES THE RHO KINASE/(ROCK)-PATHWAY IN CELL CULTURE

Helin Räägel

SUMMARY

Aberrant regulation of protein kinases impairs normal cellular functioning and may lead to disease. The protein kinase involved in the complex regulation of the dynamics of the actin cytoskeleton, Rho-kinase (ROCK), phosphorylates various substrates (e.g., MLC, myosin phosphatase), causing both directly and indirectly the elevation in MLC phosphorylation and the formation of actin fibers and tension inside cells. Hyperactivation of RhoA-ROCK pathway may cause hypertension and cardiovascular disorders. Thus, the design of highly specific protein kinase inhibitors is of the highest importance. A currently widely used ROCK inhibitor Y-27632 (mimicing and competing with ATP) is efficient in modifying the activity of the kinase, although creation of inhibitors with higher degree of affinity and specificity has been found to be necessary.

A novel bisubstrate inhibition approach was used in designing adenosine-oligoarginine conjugate (ARC), which is capable of binding and blocking both ATP and substrate binding pockets on the kinase giving better results in inhibiting ROCK's activity *in vitro* as compared to Y-27632. Therefore, it was essential to investigate the performance of ARC in cellular environment.

ARC entered the cells already after 30 minutes, showed no sign of cytotoxicity and was able to efficiently pull down Rho-kinase from cell lysates, proving its applicability outside *in vitro* experiments. Apparent effect of ARC on the actin cytoskeleton was achieved after 60 min up to 7 hours, while Y-27632-treatment affected the stability of the actin fibers starting from 15 minutes and visible effects persisted for 7 hours. Chloroquine increased the cytoplasmic concentration of ARC and yielded in efficient dissociation of actin cables. Despite Y-27632 being visibly stronger inhibitor than ARC, the latter was more capable of producing short actin oligomers and maintaining the established effect even after 7 hours of treatment. Additionally, both inhibitors increased the migration activity of cells, although most of the motility seen with ARC was detected during first 4 hours as compared to Y-27632, which

induced also longterm migration. The active migration of Y-27632-treated cells was also reflected in weakening and loss of focal contacts, which was not prevailing in ARC-treated cells. It is reasonable to suggest that the reduced intracellular effects of ARC are caused by directing of internalized ARC to lysosomal vesicles, where it is prone to be proteolytically digested. Thus, the cellular effects of D-arginine containing ARC needs to be assessed. We may conclude based on our results that ARC is a specific inhibitor of ROCK and the proposed bisubstrate strategy could be a useful lead in designing novel highly specific inhibitors for different protein kinases.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abes, S., H. Moulton, J. Turner, P. Clair, J. P. Richard, P. Iversen, M. J. Gait and B. Lebleu (2007). "Peptide-based delivery of nucleic acids: design, mechanism of uptake and applications to splice-correcting oligonucleotides." Biochem Soc Trans **35**(Pt 1): 53-5.
- Accapezzato, D., V. Visco, V. Francavilla, C. Molette, T. Donato, M. Paroli, M. U. Mondelli, M. Doria, M. R. Torrisi and V. Barnaba (2005). "Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens in vivo." J Exp Med **202**(6): 817-28.
- Amano, M., Y. Fukata and K. Kaibuchi (2000). "Regulation and functions of Rho-associated kinase." Exp Cell Res **261**(1): 44-51.
- Anderson, M. E., L. S. Higgins and H. Schulman (2006). "Disease mechanisms and emerging therapies: protein kinases and their inhibitors in myocardial disease." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **3**(8): 437-45.
- Aspenstrom, P., A. Fransson and J. Saras (2004). "Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system." Biochem J **377**(Pt 2): 327-37.
- Bishop, A. L. and A. Hall (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J **348 Pt 2**: 241-55.
- Boguski, M. S. and F. McCormick (1993). "Proteins regulating Ras and its relatives." Nature **366**(6456): 643-54.
- Budzyn, K., P. D. Marley and C. G. Sobey (2006). "Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease." Trends in Pharmacological Sciences **27**(2): 97-104.
- Burgstaller, G. and M. Gimona (2004). "Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of contractility at discrete microdomains." J Cell Sci **117**(Pt 2): 223-31.
- Chiba, Y. and M. Misawa (2004). "The role of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization of bronchial smooth muscle contraction in airway hyperresponsiveness." J Smooth Muscle Res **40**(4-5): 155-67.
- Christiaens, B., J. Grooten, M. Reusens, A. Joliot, M. Goethals, J. Vandekerckhove, A. Prochiantz and M. Rosseneu (2004). "Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides." Eur J Biochem **271**(6): 1187-97.
- Clark, E. A., W. G. King, J. S. Brugge, M. Symons and R. O. Hynes (1998). "Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases." J Cell Biol **142**(2): 573-86.

- Darbre, A. (1986). Analytical Methods. Practical Protein Chemistry - A Handbook. A. Darbre. Great Britain, John Wiley & Sons: 230-335.
- Davies, S. P., H. Reddy, M. Caivano and P. Cohen (2000). "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors." Biochem J **351**(Pt 1): 95-105.
- Derossi, D., A. H. Joliot, G. Chassaing and A. Prochiantz (1994). "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes." J Biol Chem **269**(14): 10444-50.
- Drin, G., S. Cottin, E. Blanc, A. R. Rees and J. Temsamani (2003). "Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides." J Biol Chem **278**(33): 31192-201.
- Enkvist, E., D. Lavogina, G. Raidaru, A. Vaasa, I. Viil, M. Lust, K. Viht and A. Uri (2006). "Conjugation of adenosine and hexa-(D-arginine) leads to a nanomolar bisubstrate-analog inhibitor of basophilic protein kinases." J Med Chem **49**(24): 7150-9.
- Evers, E. E., G. C. Zondag, A. Malliri, L. S. Price, J. P. ten Klooster, R. A. van der Kammen and J. G. Collard (2000). "Rho family proteins in cell adhesion and cell migration." Eur J Cancer **36**(10): 1269-74.
- Fabre, J. W. and L. Collins (2006). "Synthetic peptides as non-viral DNA vectors." Curr Gene Ther **6**(4): 459-80.
- Fagerlund, R., K. Melen, L. Kinnunen and I. Julkunen (2002). "Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5." J Biol Chem **277**(33): 30072-8.
- Fawell, S., J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky and J. Barsoum (1994). "Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 664-8.
- Ferrari, A., V. Pellegrini, C. Arcangeli, A. Fittipaldi, M. Giacca and F. Beltram (2003). "Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time." Mol Ther **8**(2): 284-94.
- Fischer, R., T. Waizenegger, K. Kohler and R. Brock (2002). "A quantitative validation of fluorophore-labelled cell-permeable peptide conjugates: fluorophore and cargo dependence of import." Biochim Biophys Acta **1564**(2): 365-74.
- Fittipaldi, A., A. Ferrari, M. Zoppe, C. Arcangeli, V. Pellegrini, F. Beltram and M. Giacca (2003). "Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins." J Biol Chem **278**(36): 34141-9.

- Fotin-Mleczek, M., R. Fischer and R. Brock (2005). "Endocytosis and cationic cell-penetrating peptides - A merger of concepts and methods." Current Pharmaceutical Design **11**(28): 3613-3628.
- Fuchs, S. M. and R. T. Raines (2004). "Pathway for polyarginine entry into mammalian cells." Biochemistry **43**(9): 2438-44.
- Fukata, Y., M. Amano and K. Kaibuchi (2001). "Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells." Trends Pharmacol Sci **22**(1): 32-9.
- Futaki, S. (2005). "Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms." Adv Drug Deliv Rev **57**(4): 547-58.
- Futaki, S., M. Niwa, I. Nakase, A. Tadokoro, Y. Zhang, M. Nagaoka, N. Wakako and Y. Sugiura (2004). "Arginine carrier peptide bearing Ni(II) chelator to promote cellular uptake of histidine-tagged proteins." Bioconj Chem **15**(3): 475-81.
- Futaki, S., T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda and Y. Sugiura (2001). "Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery." J Biol Chem **276**(8): 5836-40.
- Galderisi, U., F. P. Jori and A. Giordano (2003). "Cell cycle regulation and neural differentiation." Oncogene **22**(33): 5208-19.
- Geisler, I. and J. Chmielewski (2007). "Probing length effects and mechanism of cell penetrating agents mounted on a polyproline helix scaffold." Bioorg Med Chem Lett **17**(10): 2765-8.
- Gerthoffer, W. T. (2005). "Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle contraction." Canadian Journal of Physiology and Pharmacology **83**(10): 851-856.
- Hakoshima, T., T. Shimizu and R. Maesaki (2003). "Structural basis of the Rho GTPase signaling." J Biochem (Tokyo) **134**(3): 327-31.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**(5350): 509-14.
- Holtje, M., A. Hoffmann, F. Hofmann, C. Mucke, G. Grosse, N. Van Rooijen, H. Kettenmann, I. Just and G. Ahnert-Hilger (2005). "Role of Rho GTPase in astrocyte morphology and migratory response during in vitro wound healing." J Neurochem **95**(5): 1237-48.
- Honjo, M., H. Tanihara, M. Inatani, N. Kido, T. Sawamura, B. Y. Yue, S. Narumiya and Y. Honda (2001). "Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(1): 137-44.

- Ishizaki, T., M. Uehata, I. Tamechika, J. Keel, K. Nonomura, M. Maekawa and S. Narumiya (2000). "Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases." Mol Pharmacol **57**(5): 976-83.
- Izawa, I., M. Amano, K. Chihara, T. Yamamoto and K. Kaibuchi (1998). "Possible involvement of the inactivation of the Rho-Rho-kinase pathway in oncogenic Ras-induced transformation." Oncogene **17**(22): 2863-71.
- Jones, S. W., R. Christison, K. Bundell, C. J. Voyce, S. M. Brockbank, P. Newham and M. A. Lindsay (2005). "Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery." Br J Pharmacol **145**(8): 1093-102.
- Järver, P. and Ü. Langel (2004). "The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation." Drug Discov Today **9**(9): 395-402.
- Kaibuchi, K., S. Kuroda and M. Amano (1999). "Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells." Annu Rev Biochem **68**: 459-86.
- Kaplan, I. M., J. S. Wadia and S. F. Dowdy (2005). "Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis." J Control Release **102**(1): 247-53.
- Katoh, K., Y. Kano, M. Amano, K. Kaibuchi and K. Fujiwara (2001). "Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts." Am J Physiol Cell Physiol **280**(6): C1669-79.
- Katoh, K., Y. Kano, M. Amano, H. Onishi, K. Kaibuchi and K. Fujiwara (2001). "Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers." J Cell Biol **153**(3): 569-84.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina and J. V. Small (2002). "Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility." Int J Biochem Cell Biol **34**(7): 746-61.
- Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu and K. Kaibuchi (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." Science **273**(5272): 245-8.
- Koga, T., M. Awai, J. Tsutsui, B. Y. Yue and H. Tanihara (2006). "Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, induces alterations in adhesion, contraction and motility in cultured human trabecular meshwork cells." Exp Eye Res **82**(3): 362-70.
- Kozma, R., S. Ahmed, A. Best and L. Lim (1995). "The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts." Mol Cell Biol **15**(4): 1942-52.

- Kraynov, V. S., C. Chamberlain, G. M. Bokoch, M. A. Schwartz, S. Slabaugh and K. M. Hahn (2000). "Localized Rac activation dynamics visualized in living cells." Science **290**(5490): 333-7.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lindgren, M., X. Gallet, U. Soomets, M. Hällbrink, E. Brakenhielm, M. Pooga, R. Brasseur and Ü. Langel (2000). "Translocation properties of novel cell penetrating transportan and penetratin analogues." Bioconjug Chem **11**(5): 619-26.
- Loog, M., A. Uri, G. Raidaru, J. Järv and P. Ek (1999). "Adenosine-5'-carboxylic acid peptidyl derivatives as inhibitors of protein kinases." Bioorg Med Chem Lett **9**(10): 1447-52.
- Lua, B. L. and B. C. Low (2004). "Filling the GAPS in cell dynamics control: BPGAP1 promotes cortactin translocation to the cell periphery for enhanced cell migration." Biochem Soc Trans **32**(Pt 6): 1110-2.
- Lundberg, M., S. Wikström and M. Johansson (2003). "Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains." Mol Ther **8**(1): 143-50.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno and S. Narumiya (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." Science **285**(5429): 895-8.
- Maiolo, J. R., M. Ferrer and E. A. Ottinger (2005). "Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides." Biochim Biophys Acta **1712**(2): 161-72.
- Marx, R., J. Henderson, J. Wang and J. M. Baraban (2005). "Tech: a RhoA GEF selectively expressed in hippocampal and cortical neurons." J Neurochem **92**(4): 850-8.
- Meyer-ter-Vehn, T., S. Sieprath, B. Katzenberger, S. Gebhardt, F. Grehn and G. Schlunck (2006). "Contractility as a prerequisite for TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(11): 4895-904.
- Michie, A. M. and R. Nakagawa (2005). "The link between PKC ζ regulation and cellular transformation." Immunology Letters **96**(2): 155-162.
- Mitchell, D. J., D. T. Kim, L. Steinman, C. G. Fathman and J. B. Rothbard (2000). "Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers." J Pept Res **56**(5): 318-25.

- Moorman, J. P., D. Luu, J. Wickham, D. A. Bobak and C. S. Hahn (1999). "A balance of signaling by Rho family small GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 coordinates cytoskeletal morphology but not cell survival." Oncogene **18**(1): 47-57.
- Moulton, H. M. and J. D. Moulton (2004). "Arginine-rich cell-penetrating peptides with uncharged antisense oligomers." Drug Discov Today **9**(20): 870.
- Nakase, I., M. Niwa, T. Takeuchi, K. Sonomura, N. Kawabata, Y. Koike, M. Takehashi, S. Tanaka, K. Ueda, J. C. Simpson, A. T. Jones, Y. Sugiura and S. Futaki (2004). "Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement." Mol Ther **10**(6): 1011-22.
- Narumiya, S., T. Ishizaki and M. Uehata (2000). "Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632." Methods Enzymol **325**: 273-84.
- Nelson, C. M., D. M. Pirone, J. L. Tan and C. S. Chen (2004). "Vascular endothelial-cadherin regulates cytoskeletal tension, cell spreading, and focal adhesions by stimulating RhoA." Mol Biol Cell **15**(6): 2943-53.
- Nikolic, M. (2002). "The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth." Int J Biochem Cell Biol **34**(7): 731-45.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." Cell **81**(1): 53-62.
- Parsons, J. T., K. H. Martin, J. K. Slack, J. M. Taylor and S. A. Weed (2000). "Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement." Oncogene **19**(49): 5606-13.
- Pooga, M., A. Elmquist and Ü. Langel (2002). Toxicity and Side Effects of Cell-Penetrating Peptides. Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications. Ü. Langel. Boca Raton, Florida, CRC Press LLC: 245-262.
- Ren, J. and C. X. Fang (2005). "Small guanine nucleotide-binding protein Rho and myocardial function." Acta Pharmacol Sin **26**(3): 279-85.
- Riento, K. and A. J. Ridley (2003). "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 446-56.
- Rothbard, J. B., T. C. Jessop, R. S. Lewis, B. A. Murray and P. A. Wender (2004). "Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells." J Am Chem Soc **126**(31): 9506-7.
- Rothbard, J. B., E. Kreider, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, C. L. VanDeusen, L. Wright, B. L. Wylie and P. A. Wender (2002). Arginine-Rich Molecular Transporters for Drugs: The Role of Backbone and Side Chain Variations on Cellular Uptake. Cell-Penetrating

Peptides: Processes and Applications. Ü. Langel. Boca Raton, Florida, CRC Press LLC: 141-160.

- Rottner, K., A. Hall and J. V. Small (1999). "Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics." Curr Biol **9**(12): 640-8.
- Sachdev, P., L. Zeng and L. H. Wang (2002). "Distinct role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho family GTPases in Vav3-induced cell transformation, cell motility, and morphological changes." J Biol Chem **277**(20): 17638-48.
- Sakai, N. and S. Matile (2003). "Anion-mediated transfer of polyarginine across liquid and bilayer membranes." J Am Chem Soc **125**(47): 14348-56.
- Sakai, N., T. Takeuchi, S. Futaki and S. Matile (2005). "Direct observation of anion-mediated translocation of fluorescent oligoarginine carriers into and across bulk liquid and anionic bilayer membranes." Chembiochem **6**(1): 114-22.
- Salhia, B., F. Rutten, M. Nakada, C. Beaudry, M. Berens, A. Kwan and J. T. Rutka (2005). "Inhibition of Rho-kinase affects astrocytoma morphology, motility, and invasion through activation of Rac1." Cancer Res **65**(19): 8792-800.
- Scaife, R. M., D. Job and W. Y. Langdon (2003). "Rapid microtubule-dependent induction of neurite-like extensions in NIH 3T3 fibroblasts by inhibition of ROCK and Cbl." Mol Biol Cell **14**(11): 4605-17.
- Senderowicz, A. M. (2002). "The cell cycle as a target for cancer therapy: basic and clinical findings with the small molecule inhibitors flavopiridol and UCN-01." Oncologist **7 Suppl 3**: 12-9.
- Senderowicz, A. M. (2003). "Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators." Oncogene **22**(42): 6609-20.
- Shah, V., S. Bharadwaj, K. Kaibuchi and G. L. Prasad (2001). "Cytoskeletal organization in tropomyosin-mediated reversion of ras-transformation: Evidence for Rho kinase pathway." Oncogene **20**(17): 2112-21.
- Shiokawa, S., M. Iwashita, Y. Akimoto, S. Nagamatsu, K. Sakai, H. Hanashi, M. Kabir-Salmani, Y. Nakamura, M. Uehata and Y. Yoshimura (2002). "Small guanosine triphosphatase RhoA and Rho-associated kinase as regulators of trophoblast migration." J Clin Endocrinol Metab **87**(12): 5808-16.
- Small, J. V., T. Stradal, E. Vignat and K. Rottner (2002). "The lamellipodium: where motility begins." Trends Cell Biol **12**(3): 112-20.
- Smits, V. A. and R. H. Medema (2001). "Checking out the G(2)/M transition." Biochim Biophys Acta **1519**(1-2): 1-12.

- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (2003). "Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase." Physiol Rev **83**(4): 1325-58.
- Soomets, U., M. Lindgren, X. Gallet, M. Hällbrink, A. Elmquist, L. Balaspiri, M. Zorko, M. Pooga, R. Brasseur and Ü. Langel (2000). "Deletion analogues of transportan." Biochim Biophys Acta **1467**(1): 165-76.
- Zaro, J. L. and W. C. Shen (2003). "Quantitative comparison of membrane transduction and endocytosis of oligopeptides." Biochem Biophys Res Commun **307**(2): 241-7.
- Ziegler, A., P. Nervi, M. Durrenberger and J. Seelig (2005). "The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence." Biochemistry **44**(1): 138-48.
- Takai, Y., T. Sasaki and T. Matozaki (2001). "Small GTP-binding proteins." Physiol Rev **81**(1): 153-208.
- Takaishi, K., T. Matozaki, K. Nakano and Y. Takai (2000). "Multiple downstream signalling pathways from ROCK, a target molecule of Rho small G protein, in reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells." Genes Cells **5**(11): 929-936.
- Takami, A., M. Iwakubo, Y. Okada, T. Kawata, H. Odai, N. Takahashi, K. Shindo, K. Kimura, Y. Tagami, M. Miyake, K. Fukushima, M. Inagaki, M. Amano, K. Kaibuchi and H. Iijima (2004). "Design and synthesis of Rho kinase inhibitors (I)." Bioorg Med Chem **12**(9): 2115-37.
- Testa, J. R. and P. N. Tsichlis (2005). "AKT signaling in normal and malignant cells." Oncogene **24**(50): 7391-7393.
- Tomasek, J. J., M. B. Vaughan, B. P. Kropp, G. Gabbiani, M. D. Martin, C. J. Haaksma and B. Hinz (2006). "Contraction of myofibroblasts in granulation tissue is dependent on Rho/Rho kinase/myosin light chain phosphatase activity." Wound Repair Regen **14**(3): 313-20.
- Totsukawa, G., Y. Yamakita, S. Yamashiro, D. J. Hartshorne, Y. Sasaki and F. Matsumura (2000). "Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts." J Cell Biol **150**(4): 797-806.
- Tsubakimoto, K., K. Matsumoto, H. Abe, J. Ishii, M. Amano, K. Kaibuchi and T. Endo (1999). "Small GTPase RhoD suppresses cell migration and cytokinesis." Oncogene **18**(15): 2431-40.

- Uehata, M., T. Ishizaki, H. Satoh, T. Ono, T. Kawahara, T. Morishita, H. Tamakawa, K. Yamagami, J. Inui, M. Maekawa and S. Narumiya (1997). "Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension." Nature **389**(6654): 990-4.
- Uri, A., G. Raidaru, J. Subbi, K. Padari and M. Pooga (2002). "Identification of the ability of highly charged nanomolar inhibitors of protein kinases to cross plasma membranes and carry a protein into cells." Bioorg Med Chem Lett **12**(16): 2117-20.
- Wadia, J. S., R. V. Stan and S. F. Dowdy (2004). "Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis." Nat Med **10**(3): 310-5.
- Watanabe, N., T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki and S. Narumiya (1999). "Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization." Nat Cell Biol **1**(3): 136-43.
- Velasco, G., C. Armstrong, N. Morrice, S. Frame and P. Cohen (2002). "Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin." FEBS Lett **527**(1-3): 101-4.
- Wender, P. A., D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman and J. B. Rothbard (2000). "The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13003-8.
- Viht, K., K. Padari, G. Raidaru, J. Subbi, I. Tammiste, M. Pooga and A. Uri (2003). "Liquid-phase synthesis of a pegylated adenosine-oligoarginine conjugate, cell-permeable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase." Bioorg Med Chem Lett **13**(18): 3035-9.
- Vivés, E., P. Brodin and B. Lebleu (1997). "A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus." J Biol Chem **272**(25): 16010-7.
- Vivés, E., J.-P. Richard, C. Rispal and B. Lebleu (2003). "TAT peptide internalization: Seeking the mechanism of entry." Current Protein and Peptide Science **4**(2): 125-132.