

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
Keemia instituut

Ken Riisalu

ARC-PÕHINEVATE FOTOLUMINESTSENTSSONDIDE HAPNIKUTUNDLIKKUS

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Kadri Ligi, MSc

Asko Uri, PhD

Tartu 2015

Sisukord

Sissejuhatus	4
Kasutatud lühendid.....	5
1 Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Fotoluminestsents	6
1.1.1 Jablonski diagramm.....	6
1.1.2 Stokesi nihe	7
1.1.3 Fotoluminestsentsi kvantsaagis ja eluiga	8
1.1.4 Försteri resonantsenergia ülekanne	8
1.1.5 Fluorestsentsi anisotroopia	9
1.1.6 Luminestsentsi aegviivitusega mõõtmine	10
1.2 Proteiinkinaasid ja nende inhibiitorid.....	10
1.2.1 Proteiinkinaasid	10
1.2.2 Proteiinkinaaside inhibiitorid	11
1.2.3 ARC-Lum-sondid.....	12
2 Materjal ja meetodika.....	14
2.1 Puhverlahus	14
2.2 Hapnikuvaba süsteem	14
2.3 ARC-Lum-sondid ja proteiinkinaasid	14
2.4 Proteiinkinaaside aktiivsuse määramine.....	14
2.5 Mõõtmiste parameetrid.....	15
3 Tulemused ja arutelu	17
3.1 Vaba ARC-Lum(Fluo)-sondi luminestsents.....	17
3.1.1 BSA mõju	17
3.1.2 Katalaasi mõju.....	18
3.2 ARC-Lum-sondi ja proteiinkinaasi kompleksi hapnikutundlikkus	19
3.2.1 ARC-Lum(-)-sondi ja PKAc kompleksi luminestsents.....	19

3.2.2	ARC-Lum(Fluo)-sondide ja PKAc kompleksi luminesstsents	22
3.2.3	ARC-Lum(Fluo)-sondi ARC-1182 ja proteiinkinaasi Pim-1 kompleksi luminesstsents	23
3.2.4	Intramolekulaarse FRETi efektiivsus proteiinkinaasile seondunud ARC-Lum-sondis	25
	Kokkuvõte	26
	Summary	27
	Kasutatud kirjandus	28

Sissejuhatus

Proteiinkinaasid on ensüümid, mis katalüüsivad γ -fosforüülrühma ülekannet ATPlt substraatvalgule. Fosforüleerimine mõjutab substraatvalgu konformatsiooni, mille tulemusena muutub fosforüleeritud valgu aktiivsus, seostumine teiste biomolekulidega ja lokaliseerimine raku. Proteiinkinaaside aktiivsuse häired põhjustavad mitmeid raskeid haigusi, näiteks vähktõve erinevaid vorme. Nende haiguste diagnoosimiseks ja raviks on vajalikud meetodid proteiinkinaaside aktiivsuse määramiseks ja reguleerimiseks bioloogilistes süsteemides.

Tartu Ülikooli keemia instituudis on välja arendatud proteiinkinaaside bisubstraatsed inhibiitorid, mis põhinevad adensiini analoogide ja peptiidide konjugaatidel (ARCidel). Kui proteiinkinaasi ATP-taskusse seonduv ARCi fragment koosneb kahest või kolmest heterotsüklist, millest üks sisaldab väävli või seleeni aatomit, esineb ARC-inhibiitoril fosforestsents, mille karakteristikud muutuvad ARCi seondumisel proteiinkinaasiga. Selliste luminesentsomadustega ained on kasutatavad sondidena (indikaatoritena) proteiinkinaaside aktiivsuse mõõtmiseks. ARC-Lum-sondid jaotatakse ARC-Lum(-)- ja ARC-Lum(Fluo)-sondideks. Kui ARC-Lum(-)-sondide struktuuris on ainult tiofeeni või selenofeeni jääki sisaldav fosfor, siis ARC-Lum(Fluo)-sondid sisaldavad lisaks doonor-fosfoorile ka kõrge kvantsaagisega aktseptor-fluorofoori. Seega hõlmavad ARC-Lum(Fluo)-sondid luminofooride paari, mille vahel saab toimuda Försteri resonantsenergia ülekanne, mille efektiivsus sõltub sondi seotusest proteiinkinaasiga.

Antud töö eesmärgiks oli vees lahustunud hapniku mõju selgitamine ARC-Lum-sondide fotoluminesentsile. Uurimine pidi näitama, kas ARC-Lum-sondide kasutamisel hapnikuvabades tingimustes on võimalik oluliselt suurendada mõõtmiste tundlikkust ning signaal-müra suhet.

Kasutatud lühendid

Ahx – 6-aminoheksaanhappe jääk

ARC – adensiini analoogi ja oligoarginiini konjugaat

ARC-Lum – luminescentsomadustega adensiini analoogi ja oligoarginiini konjugaat

ARC-Lum(-) – luminesceeruva adensiini analoogi ja oligoarginiini konjugaat

ARC-Lum(Fluo) – luminesceeruva adensiini analoogi ja oligoarginiini konjugaat, millele on konjugeeritud kõrge kvantsaagisega fluorofoor

ATP – adensiin-5'-trifosfaat

BSA – veiseseerumi albumiin

C – katalaas

cAMP – 3',5'-tsükline adensiinmonofosfaat

FA – fluorestsentsi anisotroopia

FRET – Försteri resonantsenergia ülekanne, inglise keeles *Förster resonance-energy transfer*

G – glükoos

GO – glükoosi oksüdaas

HTRF – homogeenne aeglahutusega fluorestsents, inglise keeles *homogenous time-resolved fluorescence*

PF647 – fluorestsentsvärv PromoFluor-647

Pim-1 – Ser/Thr-proteiinkinaas, mida kodeerib onkogeen nimega proviraalne Moloney viiruse integratsioon, inglise keeles *proviral integration of Moloney virus*

PKA – cAMP-sõltuv proteiinkinaas, ka proteiinkinaas A

PKAc – cAMP-sõltuva proteiinkinaasi katalüütiline alaühik

TRF – aeglahutusega fluorestsents, inglise keeles *time-resolved fluorescence*

U/ml – ensüümi aktiivsuse mõõtühik, mis näitab aine hulka 1 ml lahuses, mida on tarvis 1 µmol substraadi ärareageerimiseks minutis

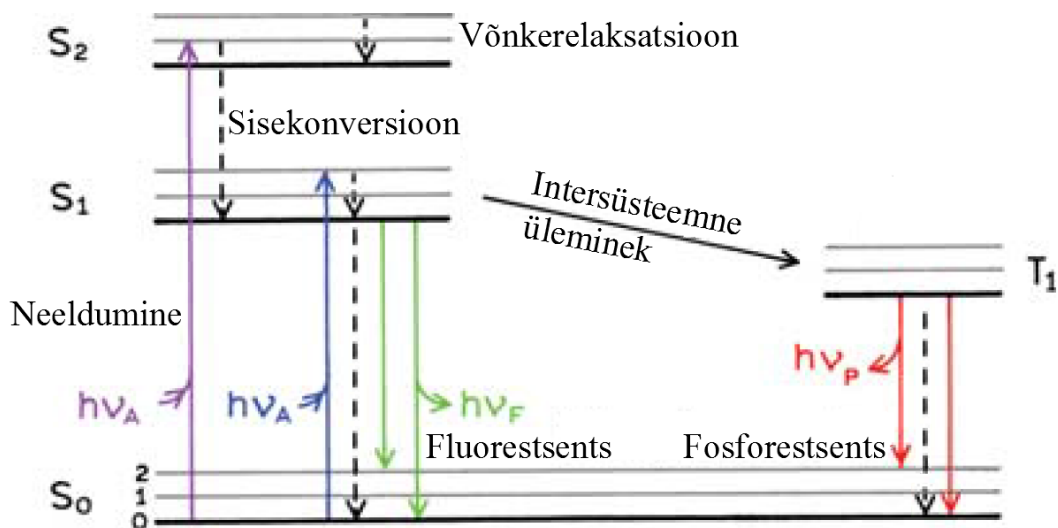
1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Fotoluminestsents

Luminestsents on valguse emiteerumine, mida põhjustab mittesoojusliku energia juhtimine ainesse. Selle üks alaliike on fotoluminestsents (edaspidi luminestsents), mille korral molekulid ergastuvad neelatud footonite toimele ning relakseerudes kiirgavad osa neelatud energiast footonitena tagasi. Energia neeldub ja vabaneb koos molekuli energiatasemetega muutustega. Luminestsents jaguneb sõltuvalt elektroonsetest energiatasemetest fluorestsentsiks ja fosforestsentsiks. Luminestsentsomadustega keemilisi ühendeid nimetatakse luminofoorideks, mis omakorda jagunevad vastavalt fluorofoorideks ja fosfoorideks. [1]

1.1.1 Jablonski diagramm

Luminestsentsi seaduspärasid kirjeldab Jablonski diagramm, mis on kujutatud joonisel 1. Põhiolekus on molekul singletisel energianivool S_0 . Footoni neelamisega omandab molekul kõrgema singletse elektroonse energiataseme (joonisel S_1 , S_2 ja S_3). Ühel elektroonsel energiatasemel on ka mitu vibratsioonilist energiataset, millelt saab toimuda mittekiirguslik relakseerumine sama elektroonse taseme kõige madalamale vibratsioonilisele tasemele ehk toimub võnkerelaksatsioon. Kõrgema energiaga elektroonsetelt olekutelt (S_2 kuni S_n , kus n on kahest suurem naturaalarv) saab molekul relakseeruda sisekonversiooni tulemusel S_1 energianivoole, mille kõige madalamalt vibratsiooniliselt tasemelt saab toimuda elektroni spinni muutus ja intersüsteemne üleminek tripletsele olekule või molekuli naasmine põhiolekusse kas soojusenergia eraldumisel või footoni kiirgamisel. Ergastunud molekuli poolt neelatud energia saab kanduda üle teistele keemilistele osakestele, näiteks lahusti molekulidele või hapnikule, mis on ühe õhu peamisi komponente ja tavatingimustel katset läbi viies alati vees lahustunud lahuses olemas. Kui sellisel energiaülekanal ei toimu kovalentsete sidemete ümberpaiknemist, siis nimetatakse protsessi mitte fotoreaktsiooniks, vaid luminestsentsi kustutamiseks. [1]



Joonis 1. Jablonski diagramm. [1] Singleti elektroonsed energiatasemed on tähistatud kui S_0 , S_1 ja S_2 ning tripleti elektroonsed energiataseme tähiseks on T_1 . Horisontaalsed jooned tähistavad elektronide vibratsioonilisi energiatasemeid. Katkendliku joonega on tähistatud mittekiirguslik relakseerumine. Molekul ergastatakse põhiolekust S_0 kõrgematele energiatasemetele, kust molekul relakseerub liigset soojust vabastades S_1 alumisele energiatasemele. Fluorestsentsiks nimetatakse valguskiirgust, mis eraldub molekuli relakseerumisel S_1 olekust põhiolekusse. Fosforestsentsiks nimetatakse valguskiirgust, mis eraldub, kui molekul relakseerub T_1 olekust põhiolekusse. Joonis on esitatud muudetud kujul.

Molekul võib footoni kiirata ka tripletsest ergastatud olekust singletsesse põhiolekusse naasmisel. Footoni kiirgamist molekuli üleminekul S_1 olekust põhiolekusse nimetatakse fluorestsentsiks ja footoni kiirgamist üleminekul ergastatud tripletsest olekust põhiolekusse nimetatakse fosforestsentsiks. Intersüsteemse ülemineku käigus muudab ergastatud molekuli elektron oma spinni ja ergastatud tripletsest olekust põhiolekusse naasmiseks peab elektroni spinn uuesti muutuma. Klassikalise mehaanika reeglite kohaselt on tegu keelatud üleminekul, mistõttu ei saa relakseerumine toimuda kõige efektiivsemat teed pidi ning seepärast kestab relakseerumine oluliselt kauem. Fluorestsentsi eluead on tavaliselt nanosekundites ning fosforestsentsi eluead ulatuvad mikrosekundist sekunditeni [1] [2]. Kuna relakseerumine toimub fosfooride korral suhteliselt kaua, on relakseerumisega konkureerivatel protsessidel rohkem aega toimuda. Ergastunud triplett võib naasta ergastatud singletsesse olekusse (S_1); naasta põhiolekusse (S_0) mittekiirguslikult ja eraldades energiat soojusena ning naasta põhiolekusse (S_0) kustutajate, näiteks hapniku toimel. [1] [3]

1.1.2 Stokesi nihe

Jablonski diagrammilt (joonis 1) on ühtlasi näha, et molekuli ergastamisele kulub rohkem energiat, kui molekuli relakseerumisel kõrgemalt elektroonselt energiatasemelt madalamale vabaneb. Sellise seaduspära avastas iiri füüsik G. G. Stokes, kelle järgi nimetatakse

neeldumisspektri ja emissioonispektri maksimumidele vastava lainepikkuste omavahelist nihet Stokesi nihkeks [1]. Energiakao põhjustavad kiire võnkerelaksatsioon kõrgetelt energiatasemetelt, relakseerumine põhioleku mõnele kõrgemale vibratsioonilisele tasemele või muud energiaülekanded: näiteks võivad Stokesi nihkele vastavat energiahulka suurendada lahusti poolt põhjustatud efektid, agregaatide moodustumine ja molekuliga ergastatud olekus toimuvad reaktsioonid. [4]

1.1.3 Fotoluminestsentsi kvantsaagis ja eluiga

Luminofoore iseloomustavad peamised parameetrid on lisaks neeldumis- ja kiirgumisspektrile luminestsentsi kvantsaagis (edaspidi kvantsaagis) ning luminestsentsi eluiga. Kvantssaagis näitab luminestsentsi tekitavate footonite hulga suhet neeldunud footonite hulka. Seega sõltub kvantsaagisest luminestsentsi intensiivsus: sama kiirgushulga neeldumise korral annab suurem kvantsaagis suurema eraldunud kiirgushulga. [5]

Luminestsentsi eluiga (τ) iseloomustab keskmiselt ühe molekuli veedetud aega ergastatud olekus. Luminestsentsi eluea saab leida valemist

$$I_t = (I_0 - I_{platoo}) * e^{-\frac{t}{\tau}} + I_{platoo}$$

(valem 1)

kus t on aeg, mis on möödunud proovi ergastamisest, I_t on luminestsentsi intensiivsus ajahetkel t , I_0 on luminestsentsi intensiivsus ergastamise hetkel, I_{platoo} on taustmüra.

Luminestsentsi eluiga ei iseloomusta ainult ainet, vaid ka ainet ümbritsevat keskkonda, mille mõjul võib molekuli luminestsentsi eluiga muutuda. Fluorestsentsi eluiga on fosforestsentsi omast oluliselt lühem, sest elektroni spinni muutus, mis peab toimuma molekuli relakseerumisel ergastatud triplesest olekust põhiolekusse, on kineetiliselt takistatud protsess. [5]

1.1.4 Försteri resonantsenergia ülekanne

Försteri resonantsenergia ülekanne (FRET, inglise keeles *Förster resonance energy transfer* või *Förster-type resonant energy transfer*) on kahe luminofoori dipoolidevaheline interaktsioon, mille tulemusel ühe luminofoori (doonori) neelatud energia kandub üle teisele luminofoorile (aktseptorile). FRETi toimumise eelduseks on doonori kiirgusspektri kattumine aktseptori neeldumisspektriga – seda kattuvust iseloomustab kattuvusintegraal. Kuna energia kandub FRETi korral molekulilt molekulile dipoolidevahelise interaktsiooniga, siis footonit

energiaülekanne käigus ei eraldu. Energiaülekanne sõltub doonori ja aktseptori vahelisest kaugusest, dipoolidevahelisest nurgast ja spektrite kattuvusintegraalist. Tänu sõltuvusele luminofooridevahelisest distantsist kasutatakse FRETi efektiivsuse arvutamist bioloogias ja keemias molekulidevahelise kauguse määramiseks ning nende vastastikuse toime detekteerimiseks. [6]

FRETi efektiivsust väljendab valem

$$\eta = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

(valem 2)

kus R_0 on molekulidevaheline kaugus, mille juures toimub energiaülekanne 50%-lise efektiivsusega (Försteri raadius ehk Försteri distants) ja r on doonori ja aktseptori kaugus teineteisest. R_0 iseloomustab konkreetset luminofooride paari kindlas lahustis. Efektiivsust saab lisaks arvutada ka kvantsaagiste, luminesentsi eluigade või luminesentsi intensiivsuste erinevusest vaba doonori ja doonori-aktseptori paari vahel. Teades mõlema oleku luminesentsi eluigasid, saab FRETi efektiivsuse arvutamiseks kasutada valemit

$$\eta = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

(valem 3)

kus τ_D on doonori luminesentsi eluiga ning τ_{DA} on doonori luminesentsi eluiga aktseptori juuresolekul. [7]

1.1.5 Fluorestsentsi anisotroopia

Fluorestsentsi anisotroopia (FA) põhineb fluorestsentsi depolariseeritavusel: kui fluorofoori ergastada polariseeritud valgusega, siis soojusliikumise mõjul on eralduv fluorestsentskiirus osaliselt depolariseeritud. FA sõltub fluorofooriga seotud aine molekulmassist, molekuli kujust ja lahuse viskoossusest. Suured molekulid ei jõua fluorestsentsi eluea jooksul nii palju pöörlema ning neelatud footoni tasapind on kiirgava footoni tasapinnaga samasuunaline. See-eest väike molekul pöörleb sama aja jooksul kiiremini ning eralduv valgus on rohkem depolariseeritud. Mõõtes nii polariseeritud kui ka depolariseeritud valguse intensiivsust, saab FA arvutada vastavalt valemile

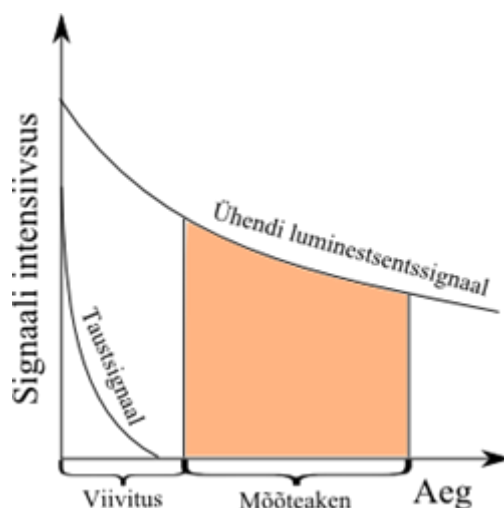
$$r = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + 2I_{vh}}$$

(valem 4)

kus r on anisotroopia, I_{vv} on vertikaalselt polariseeritud valgus ja I_{vh} on horisontaalselt polariseeritud valgus, kui proovi on ergastatud vertikaalselt polariseeritud valgusega. Antud töös kasutati FAI põhinevat meetodit proteiinkinaaside aktiivsuse määramiseks [8]. [9]

1.1.6 Luminestsentsi aegviivitusega mõõtmine

Luminestsentsi aegviivitusega mõõtmise puhul kasutatakse aine ergastamiseks valgussähvatust ehk lühiajalist ergastamist elektromagnetkiirgusega ühendi luminestsentsi elueast lühema ajavahemiku jooksul. Mõõtmist alustatakse pärast ergastamist ehk siis, kui valgusallikas on kustunud. See viivitus tagab, et ergastavat valgust ja fluorestsentsi mõõtmisel ei detekteerita. Muutes viivituse või mõõtmisakna pikkust, on võimalik kahe või enama punkti alusel arvutada luminestsentsi eluiga. [10]



Joonis 2. Luminestsentsi aegviivitusega mõõtmine.

1.2 Proteiinkinaasid ja nende inhibiitorid

1.2.1 Proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid on ensüümid, mis katalüüsivad γ -fosforüülrühma ülekannet ATPlt Tyr-, Ser- või Thr-jäägile substraatvalgu struktuuris. Fosforüleerimine mõjutab substraatvalgu konformatsiooni ja seeläbi võib mõjutada substraadi aktiivsust, interaktsioone teiste biomolekulidega ja ühtlasi lokaliseerimist rakus. Proteiinkinaaside aktiivsuse häireid seostatakse elusolenditel haigustega, näiteks erinevat tüüpi halvaloomuliste kasvajatega. Proteiinkinaaside uurimiseks ja ravimite arendamiseks kasutatakse tihti mudelkinaasina cAMP

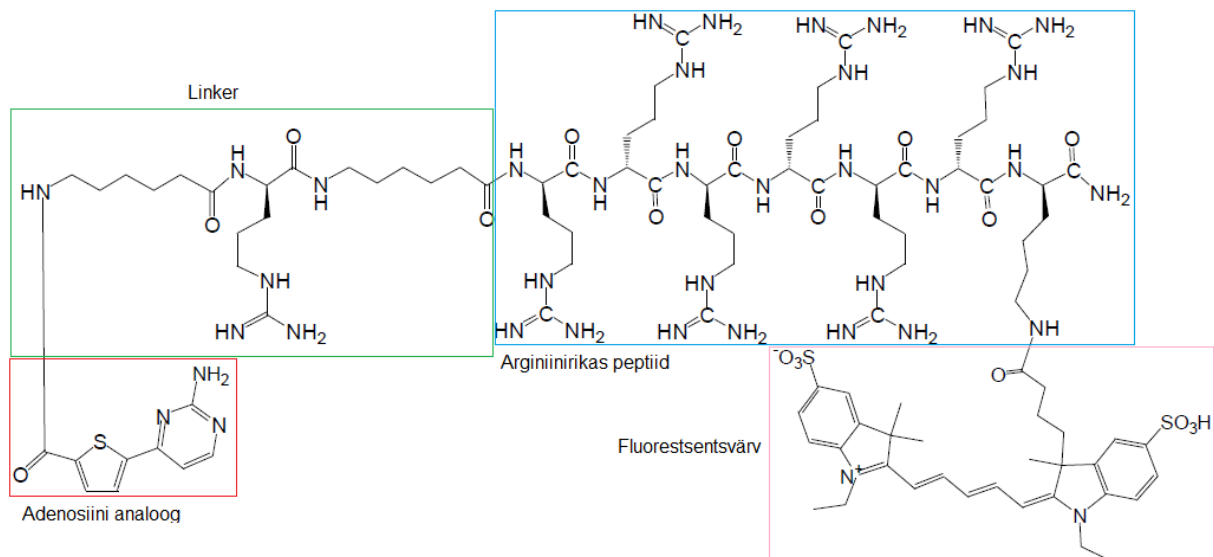
sõltuvat proteiinkinaasi (PKA-d), mis oli esimeseks proteiinkinaasiks, mille katalüütilisele alaühikule (PKAc) tehti kindlaks kristallstruktuur [11]. [12]

Proteiinkinaasidest eripärased on Pim-perekonna proteiinkinaasid, milles proliin asub olulises kohas, kus muidu moodustuks vesinikside ATP ja proteiinkinaasi valguahela vahel. Proliin on ainuke 20st valke moodustavast aminohappes, mille lämmastik on seotud kahe alküülrühmaga (mitte ühe alküülrühmaga nagu teistes aminohappes). Seetõttu puudub vastaval amiidrühmal võime esineda vesiniksideme doonorina ning ATP analoogid seonduvad proteiinkinaasiga Pim-1 teistmoodi kui ülejäänud proteiinkinaasidega. [13]

1.2.2 Proteiinkinaaside inhibiitorid

Proteiinkinaaside aktiivsust saab vähendada inhibiitorite abil. Peamised kolm pöörduvat inhibeerimismehhanismi on konkureeriv, mittekonkureeriv ja ebakonkureeriv. Konkureeriva inhibeerimise korral ei saa substraat ja inhibiitor üheaegselt ensüümiga seotud olla, sest nad mõlemad seonduvad aktiivtsentrisse või inhibiitor muudab ensüümi konformatsiooni substraadiga seandumiseks sobimatuks. Mittekonkureeriv inhibiitor seondub samasuguse afiinsusega nii vaba ensüümiga kui ka substraadiga kompleksis oleva ensüümiga. Ebakonkureeriv inhibiitor saab seonduda vaid juba moodustunud substraadi-ensüümi kompleksile. [14]

Proteiinkinaaside konkurentsed inhibiitorid seonduvad proteiinkinaasi ATP või substraatvalgu sidumistaskusse ning vähendavad sellega proteiinkinaasi võimet katalüüsida valkude fosforüleerimist. Bisubstraatsetel inhibiitoritel on omadus seonduda mõlema taskuga samaaegselt. Kahte taskusse seonduval inhibiitoril on võime moodustada proteiinkinaasiga rohkem sidemeid ning sellised inhibiitorid võivad seetõttu olla suure afiinsusega. Selles töös teostatakse katseid ARCidega: ainetega, mis koosnevad adenosiini analoogist ja arginiinirikast peptiidist, mis on omavahel seotud linkeriga (joonis 3). Bisubstraatsete inhibiitorite selektiivsust proteiinkinaaside suhtes mõjutab kõigi fragmentide struktuur. [2]



Joonis 3. Proteiinkinaaside bisubstraatne inhibiitor ARC-1182. [2] Joonis on esitatud täiendatud kujul. Fluorestsentsvärv on PromoFluor-647 (PF-647).

1.2.3 ARC-Lum-sondid

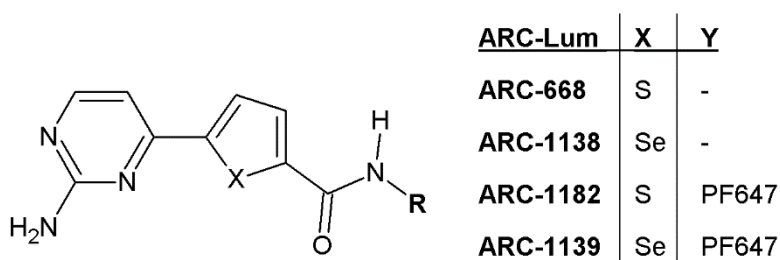
ARC-Lum-sondid on ARC-põhinevad inhibiitorid, mille adenosiini jälgendav aromaadne süsteem sisaldab tiofeeni või selenofeeni jääki. ARC-Lum-sonde on kahte tüüpi: ainult fosforestseeruvat adenosiini analoogi (doonorit) sisaldavat sondi nimetatakse ARC-Lum(-)-sondiks ja sondi, mille struktuuri on lisatud kõrge kvantsaagisega fluorofoor (aktseptor), nimetatakse ARC-Lum(Fluo)-sondideks. Varasemalt on näidatud, et proteiinkinaasile seondunud ARC-Lum-sond, mida ergastatakse ultraviolettkiirgusega, emiteerib pika elueaga luminestsentsi ($\tau = 20\text{-}250 \mu\text{s}$). Seejuures on ARC-Lum(Fluo)-sondidel märkimisväärselt suurem luminestsentsi intensiivsus kui ARC-Lum(-)-sondidel. Selle põhjuseks on intramolekulaarne FRET doonori ergastatud tripletselt olekult aktseptori singletsele olekule, mille tulemusel doonori luminestsentsi eluiga lüheneb, kuid kvantsaagis läheneb aktseptori kvantsaagisele. Sarnast protsessi on varasemalt kirjeldanud Lakowicz *et al.* [15], uurides ruteeniumiga metall-ligand komplekside luminestsentsi. [2]

Varasemalt on välja pakutud, et pikaelse luminestsentsi kvantsaagise suurenemine seondumisel proteiinkinaasile võib olla tingitud mittekiirguslike protsesside kiiruskoefitsientide vähenemisest ja hapniku kui kustutaja mõju vähenemisest. [2] Lahuses vabalt, proteiinkinaasile seondumata kujul olevate ARC-Lum(-)-sondide luminestsentsi elua pikenemine hapniku kõrvaldamisel keskkonnast on katseliselt tõestatud (avaldamata andmed), kuid ARC-Lum(Fluo)-sondide puhul pole seda seni õnnestunud detekteerida [16]. Samuti pole seni saadud mõõta ARC-Lum-sondi ja proteiinkinaasi kompleksi hapnikutundlikkust.

Põhjuseks on olnud vajamineva proovi suur hulk, proteiinkinaasi tootmise suur ajakulu ja hind, aga ka argoongaasiga töötlemise sobimatus hapniku kõrvaldamiseks ARC-Lum-sondi ja PKAc kompleksi sisaldavast lahusest.

Antud uurimuses kasutati varem välja töötatud ensümaatilist meetodit hapniku kõrvaldamiseks atmosfääri hapnikule avatud süsteemist vesilahuses. Meetod põhineb hapniku ja glükoosi vahelisel reaktsioonil, mida katalüüsib glükoosi oksüdaas. Reaktsiooni käigus tekivad glükoonhape ja vesinikperoksiid. Kuna viimane võib mõjutada uuritavat proovi ning selle mõõtmist, lisatakse lahusele katalaasi, mis lagundab vesinikperoksiidi veeks ja hapnikuks. [17]

Hapnikuvabas keskkonnas võrreldi omavahel vastavalt tiofeeni ja selenofeeni jääki sisaldavaid ARC-Lum(-)-sonde ARC-668 ja ARC-1138 ning vastavaid ARC-Lum(Fluo)-sonde ARC-1182 ja ARC-1139, mille peptiidi C-terminaalsesse otsa on seotud fluorestsentsvärv PromoFluor-647 (joonised 3 ja 4). Katsed teostati nii lahuses vabalt olevate ARC-Lum-sondidega kui ka proteiinkinaasi PKAc liia juuresolekul. Leitud luminesentsi eluigade põhjal arvutati FRETi efektiivsused hapniku juuresolekul ja hapnikuvabas keskkonnas.



R = Ahx-d-Arg-Ahx-(d-Arg)₆-d-Lys(**Y**)-NH₂

Joonis 4. Katsetes kasutatud ARC-Lum-sondide struktuur üldistatud kujul. PF647 – fluorestsentsvärv PromoFluor-647, Ahx – 6-aminoheksaanhappe jääk.

2 Materjal ja metoodika

2.1 Puhverlahus

Lahused valmistati 100 mM naatriumfosfaatpuhvrisse (100 mM, pH = 7,4), millele lisati Tween 20 lahust lõpliku massiprotsendiga 0,005% ja veiseseerumi albumiini (BSA) lõppkontsentratsiooniga 0,5 mg/ml.

2.2 Hapnikuvaba süsteem

Hapnikuvaba lahuse saamiseks kasutati glükoosi (20 mM), glükoosi oksüdaasi (2 U/ml) ning katalaasi (120 U/ml).

Hapnikuvaba keskkonna saavutamise kontrolliks mõõdeti üheaegselt proovidega MitoXpress Xtra (600-kordne lahjendus, Luxcel Biosciences, katalooginumber MX-400) luminesentsi eluiga nii hapnikuga kui ka hapnikuvabas keskkonnas samadel tingimustel. Ühendi luminesentsi eluea põhjal erinevates keskkondades oli võimalik kinnitada hapnikuvaba keskkonna saavutamist ja selle lõppemist ajas.

2.3 ARC-Lum-sondid ja proteiinkinaasid

Katsetes kasutati J. Rogozina poolt varem kirjeldatud meetodil toodetud PKAc-d [18], kusjuures ekspressioonivektor pT7-7 oli asendatud vektoriga pET28b. Pim-1 toodeti Oxfordi ülikoolis (University of Oxford) varem kirjeldatud meetodil [19]. Kasutatud ARC-Lum-sondid (ARC-668, ARC-1139 ja ARC-1182) sünteesiti Tartu Ülikooli keemia instituudis Asko Uri uurimisrühmas [2]. PKAc lõppkontsentratsioon oli alati 1,2 korda suurem ja Pim-1 lõppkontsentratsioon 40 korda suurem luminesentssondi kontsentratsioonist, et kogu lahuses olev ARC-Lum-sond oleks seotud kompleksi proteiinkinaasiga.

2.4 Proteiinkinaaside aktiivsuse määramine

Proteiinkinaaside aktiivsus võib ajas langeda. Seepärast määrati enne igat katset üle proteiinkinaasi aktiivse vormi hulk kasutatavas lahuses. Aktiivsuse määramiseks valmistati proteiinkinaasist kontsentratsiooniseeria ning igale proovile lisati võrdses koguses luminesentssondi sisaldavat lahust: proteiinkinaasi PKAc jaoks kasutati luminesentssonde ARC-1182 või ARC-1139, proteiinkinaasi Pim-1 jaoks kasutati fluorestsentssondi ARC-3117. Mõõdeti valmistatud lahuste FAd ja/või aegviivitusega luminesentsi. Andmed paigutati graafikule, kus x-teljel oli proteiinkinaasi kontsentratsioon ja y-teljel FA või luminesentsi intensiivsus. Andmeid analüüsiti programmiga GraphPad Prism (GraphPad Software), mille

abil sobitati valemitest 5, 6 ja 7 koosnevat süsteemi FA tulemustele ning valemit 8 aegviivitusega luminesentsi tulemustele:

$$Z = \frac{L_t + K_D + kE_0 - \sqrt{(L_t + K_D + kE_0)^2 - 4L_t kE_0}}{2L_t}$$

(valem 5)

$$M = \frac{QZ}{1 + Z(Q - 1)}$$

(valem 6)

$$A = (1 - M)A_f + MA_b$$

(valem 7)

$$TGL = B + M \frac{[L_t + K_D + kE_0 - \sqrt{(L_t + K_D + kE_0)^2 - 4L_t kE_0}]}{2}$$

(valem 8)

kus Z on kompleksis oleva sondi osakaal luminesentssondi kogukontsentratsioonist, L_t on sondi summaarne kontsentratsioon, K_d on dissotsiatsioonikonstant, k on proteiinkinaasi aktiivsus, E_0 on proteiinkinaasi kontsentratsioon, Q on seotud ja vaba sondi kvantsaagiste jagatis, M on sondi osakaal, mis võtab arvesse Q -d, A on mõõdetud FA, A_f on vaba sondi anisotroopia, A_b on täielikult seotud sondi anisotroopia, TGL on mõõdetud intensiivsus ja B on taustmüra.

2.5 Mõõtmiste parameetrid

Lahused valmistati firma Corning 384 süvendiga vähesiduva pinnaga plaadile (tootekood 3676). Lahuste lõppruumala oli kõigi mõõtmiste korral 20 µl. Proove termostateeriti enne mõõtmist 30 °C juures 15 minutit. Vastavalt konkreetsetele mõõtmistele lisati glükoosilahust plaadile koos teiste lahustega või vahetult enne mõõtmise alustamist. Mõõtmisteks kasutati plaadilugejat PHERAstar (BMG Labtech). Mõõtmised teostati 30 °C juures. Pikaealise luminesentsi intensiivsuse integreerimisvahemik oli 60-460 µs, mõõdetuna pärast ergastava sähvatus algust, kui ei ole välja toodud teisiti. Luminesentsi eluea mõõtmisel jaotati integratsiooniaken 5-20 µs pikkusteks alamvahemikeks ja luminesentsi intensiivsus määrati igas vahemikus eraldi. Mõõtmiseks kasutati HTRF 802D1 optilist moodulit, mille ergastusfilter laseb läbi valgust lainepikkusega 300-360 nm ja emissioonifiltrile vastav lainepikkuste

vahemik on 650-700 nm, kui ei ole välja toodud teisiti. Saadud andmeid analüüsiti tarkvaraga GraphPad Prism (GraphPad Software).

3 Tulemused ja arutelu

Katsete eesmärgiks oli uurida ARC-Lum-sondide pikaealise luminesentsi omadusi hapnikuvabas vesilahuses seondunult proteiinkinaasile ja samuti seondumata kujul. Esmalt kontrolliti varem välja töötatud hapniku ensümaatilise kõrvaldamise meetodika kohaldamise võimalikkust antud töös kasutatud ühenditele. Kontrolliti ka ARC-Lum-sondide hapnikutundlikkust proteiinkinaase mittesisaldavas vesilahuses. Omavahel võrreldi tiofeeni ja selenofeeni jääki sisaldavaid ARC-Lum(-)- ja ARC-Lum(Fluo)-sonde. Mõõdetud luminesentsi eluigade põhjal arvutati intramolekulaarse FRETi efektiivsused ARC-1182 ja ARC-1139 molekulide jaoks.

Analüüsis on kasutatud vaid andmeid, mis on mõõdetud glükoosi oksüdeerimise statsionaarses faasis. Analüüsil kasutati sellist ensümaatilist aktiivust, mis on vajalik, et atmosfäärist lahustuv hapnik reageeriks koheselt lahuses oleva glükoosiga ega jõuaks kustutada lumineseeruva molekuli tripletset olekut. Selleks, et olla kindel, et hapniku kõrvaldamisel toimuv luminesentsi eluea pikenemine on pöörduv protsess, jälgiti luminesentsi eluigasid ajas, kuniks need saavutasid sama taseme nagu proovid, kust hapniku ei olnud kõrvaldatud.

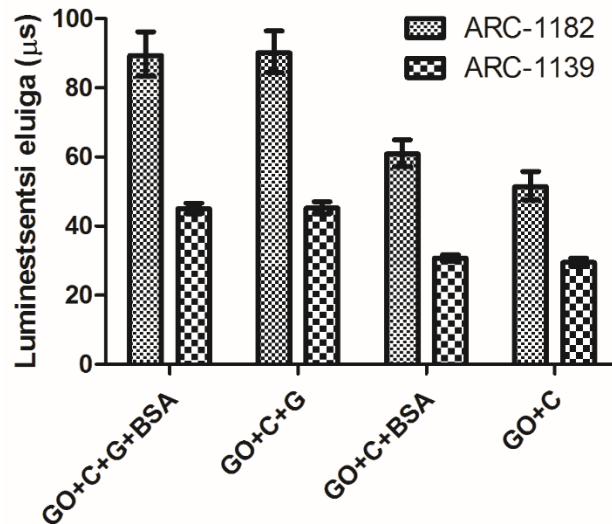
3.1 Vaba ARC-Lum(Fluo)-sondi luminesents

Kuigi varasemates katsetes, mis on teostatud küvetis ja vesilahuse töötlemisel argooniga ning mõõdetud spektrofluoromeetriga, ei ole õnnestunud ARC Lum(Fluo)-sondi hapnikutundlikkust tõestada [16], otsustati seda kontrollida ka uue hapniku ensümaatilise kõrvaldamise meetodika abil plaadilugejaga PHERAstar. Selleks kasutati kõrgemaid ARC-Lum(Fluo)-sondi kontsentratsioone (3,1-100 nM), kui katsetes proteiinkinaasidega plaadilugejaga PHERAstar tavaliselt kasutatakse (2-5 nM). Analüüsil varieeriti lahuse komponente, et kontrollida mittespetsiifilisest seondumisest tingitud pika elueaga luminesentsi võimalikkust. Kuna luminesentsi eluigade kontsentratsioonist sõltuvust ei esinenud, siis on siinkohal esitatud tulemused, mis saadi sondi 50 nM kontsentratsiooni juures.

3.1.1 BSA mõju

Albumiinid on kõige suurema kontsentratsiooniga lahustunud valgud verevedelikus. Veiseseerumi albumiin (BSA) on biokeemilistes katsetes sageli kasutusel, et vähendada nii analüüdi kui ka sondi mittespetsiifilist seondumist biokeemilistele ühenditele ja pindadele. ShanShan Wu näitas oma magistritöös [20], et PromoFluor-647ga märgistatud ARC-Lum-sond ARC-1182 seondub vähesel määral BSAGA. Seepärast otsustati uurida BSA mõju kasutatud

ARC-Lum-sondide luminesentsi elueale. Samade lahuste luminesentsi eluiga mõõdeti nii BSA juuresolekul kui ilma. Jooniselt 5 on näha, et BSA kasutamine puhvris sondi luminesentsi eluigasid ei mõjutanud. Seega otsustati edasistes katsetes BSAd puhverlahusesse siiski lisada, et vähendada mittespetsiifilist seondumist plastiku pinnale.



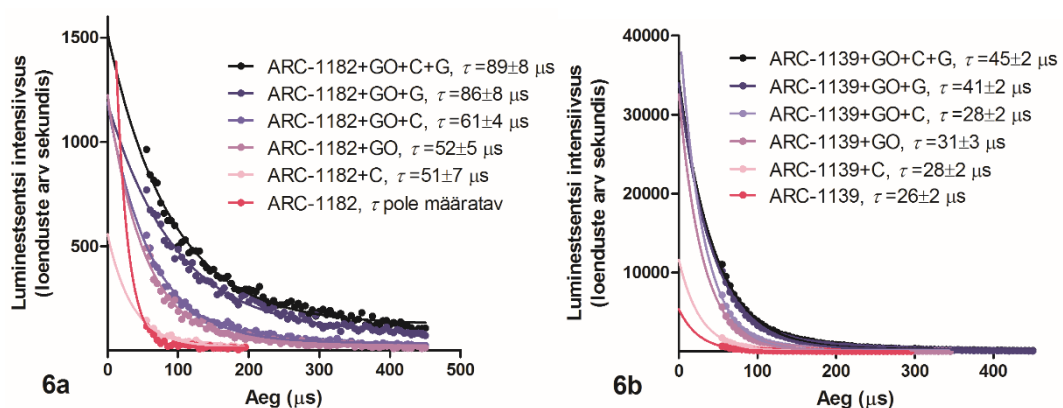
Joonis 5. ARC-1182 (50 nM) ja ARC-1139 (50 nM) luminesentsi eluigade sõltuvus lahuse komponentidest. Luminesentsi eluead määrati proovidele pärast vastava taustsignaali mahalahutamist. Vearivad põhinevad tulemuste kõverale sobitumisel usaldusnivooga 95%. Graafik illustreerib ühe katse tulemusi. Katsed ARC-1182 ja ARC-1139ga teostati erinevatel päevadel.

3.1.2 Katalaasi mõju

Jooniselt 5 nähtub seegi, et uuritud ARC-Lum(Fluo)-sondide luminesentsi eluiga pikenes hapniku kõrvaldamisel lahusest. Seepärast vaadeldi erinevate komponentide mõju nende sondide luminesentsi elueale. Välja töötatud hapnikuvaba süsteemi saavutamiseks oli tingimata vaja lisada glükoosi ja glükoosi oksüdaasi. Läbi viidud katsed olid kontrollimaks, kas katalaasil võib olla efekt sondi luminesentsi elueale ning kas see võib tulemusi rohkem mõjutada, kui selle lisamata jätmisel lahusesse tekkev vesinikperoksiid.

Jooniselt 6a nähtub, et ARC-1182 luminesentsi intensiivsus hapniku juuresolekul ei erine oluliselt puhvri poolt põhjustatud taustsignaalist, mistõttu pole luminesentsi eluea määramine täpne. Katalaasi lisamine ARC-1182-le (50 nM) ei mõjuta selle luminesentsi intensiivsust, kuid joonisel on siiski välja toodud arvutatud luminesentsi eluiga. Glükoosi oksüdaasi lisamisel ARC-1182 luminesentsi intensiivsus suureneb. Katalaasi lisamine glükoosi oksüdaasi ja ARC-1182t sisaldavale lahusele ei mõjuta lahuse intensiivsust, kuid mõjutab vähesel määral selle luminesentsi eluiga. ARC-1139ga teostatud katse tulemuste põhjal võib

samuti öelda, et katalaasi lisamine ei mõjuta olulisel määral sondi luminescentsomadusi, mistõttu katsetes proteiinkinaasiga otsustati seda lahusesse siiski lisada, et vältida proteiinkinaasi kahjustumist vesinikperoksiidi mõjul. Kuna esineb mittespetsiifiline seondumine glükoosi oksüdaasile, siis ei saa katseandmete põhjal öelda, kas luminescentsi eluea pikenemine hapniku kõrvaldamisel lahusest on tingitud vaba sondi või glükoosi oksüdaasile seondunud sondi luminescentsi eluea pikenemisest. Kuna katsetes proteiinkinaasiga kasutati madalaid ARC-Lum(Fluo)-sondi kontsentratsioone (vahemikus 2-5 nM) ja proteiinkinaasi võeti sondi suhtes liias, siis on mittespetsiifilise seondumise toimumine ebatõenäolisem ja selle mõju tulemustele võib pidada ebaoluliseks.



Joonised 6a ja 6b. ARC-1182 (50 nM, joonisel 6a) ja ARC-1139 (50 nM, joonisel 6b) luminescentsi eluea mõõtmine erinevate lahusekomponentidega. Kõigist proovidest on eelnevalt maha lahutatud vastav taustsignaal. Iga punkt vastab 5 μs pikkuse alamvahemiku luminescentsi intensiivsusele. Määramatused põhinevad tulemuste kõverale sobitumisel usaldusnivooga 95%. Graafik illustreerib ühe katse tulemusi.

3.2 ARC-Lum-sondi ja proteiinkinaasi kompleksi hapnikutundlikkus

3.2.1 ARC-Lum(-)sondi ja PKAc kompleksi luminescents

Ühendi luminescentsi eluea pikkus näitab molekulide ergastatud olekus veedetud keskmist aega. Mida pikem on luminescentsi eluiga, seda kauem saab toimuda hapniku difusioon ergastatud luminofoorini ja ühtlasi luminofoori kustutamine hapniku poolt. ARC-668 ja ARC-1138 ainus erinevus molekulide struktuuris on vastavalt väavli või seleeni aatom adensiini jälgendavas struktuuriosas. Kirjanduse põhjal võib oletada [21], et ARC-668 luminescentsi eluiga peaks olema pikem kui ARC-1138-l.

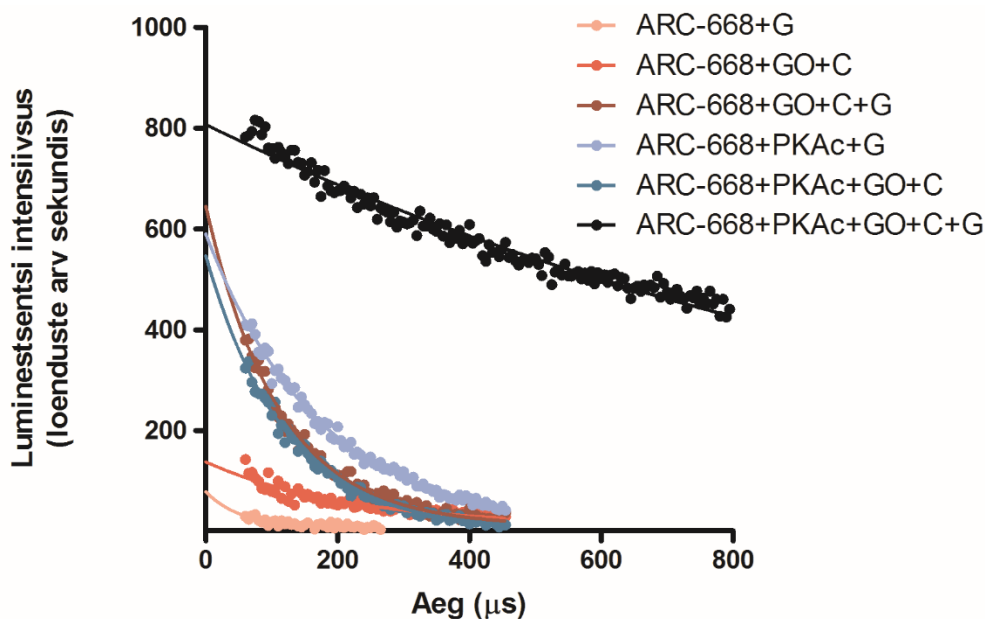
Varasemast on teada, et kõigi tiofeeni sisaldavate ARC-Lum(Fluo)-sondide luminescentsi eluiga on pikem, aga luminescentsi intensiivsus väiksem kui vastavatel selenofeeni jääki sisaldavatel ARC-Lum(Fluo)-sondidel. See-eest tabelis 1 toodud ARC-668 luminescentsi

eluiga kompleksis PKAc-ga hapniku juuresolekul on vaid mõnevõrra pikem ($27\pm 7\%$) kui ARC-1138 luminesentsi eluiga kompleksis PKAc-ga. Hapniku kõrvaldamisel vesilahusest pikenes ARC-668 luminesentsi eluiga PKAc-le seondunult üle 10 korra, nii et selle usaldusväärne määramine plaadilugejal PHERAstar osutus võimatuks.

*Tabel 1. ARC-668 (500 nM) ja ARC-1138 (100 nM) luminesentsi eluigade sõltuvus lahuse komponentidest. Mõõtmised viidi läbi optilise mooduliga TRF 904B1, millega ergastati proove lainepikkuste vahemikus 300-360 nm ja emissiooni mõõdeti lainepikkuste vahemikus 565-615 nm. Tulemused esindavad ARC-668 kolme katse ja ARC-1138 nelja katse keskmisi. Määramatused põhinevad eri päevadel tehtud mõõtmiste standardhälbel. *Erandina on esitatud kogutud standardhälve, sest selle proovi korral oli vastavus valemile suure veaga.*

	ARC-668	ARC-1138
PKAc+GO+C+G	1426±818* μ s	447±10 μ s
PKAc+GO+C	121±4 μ s	108±11 μ s
PKAc+G	141±28 μ s	111±14 μ s
GO+C+G	117±19 μ s	110±7 μ s
GO+C	93±15 μ s	64±8 μ s
G	73±13 μ s	63±4 μ s

Plaadilugejaga PHERAstar on võimalik mõõta luminesentsi intensiivsust 1720 μ s-ni pärast ergastava sähvatus algust. Hapnikuvaba ARC-668 ja PKAc kompleksi intensiivsus ei jõua selle ajaga piisavalt palju langeda, et tulemuste põhjal saaks väikese matemaatilise määramisveaga arvutada luminesentsi eluea väärtuse. Mõõteandmed on näha joonisel 7. Samadel tingimustel mõõtmist prooviti läbi viia ka plaadilugejal Synergy Neo (BioTek), mis võimaldab aegviivitusega mõõtmisi teha kuni 3000 μ s-ni, kuid detektori võimenduse seadistamisel kasutatud kiirgushulga toimetel proov kahjustus ja selle luminesentsi ei olnud enam võimalik mõõta. Põhimõtteliselt on ARC-668 ja PKAc kompleksi luminesentsi eluiga mõõdetav spektrofluoromeetril FluoroMax-4, mis on Tartu Ülikooli keemia instituudis olemas, kuid seni pole seda tehtud, sest vajalik PKAc hulk on ARC-668 madala kvantsaagise tõttu väga suur.



Joonis 7. ARC-668 (100 nM) luminesentsi eluiga. Mõõtmine viidi läbi optilise mooduliga TRF 904B1, millega proove ergastati lainepikkuste vahemikus 300-360 nm ja emissiooni mõõdeti lainepikkuste vahemikus 565-615 nm. Iga mõõtmispunkt joonisel vastab 5 μ s pikkuse alamvahemiku luminesentsi intensiivsusele. Graafik illustreerib ühe katse tulemusi, korduste arv oli 2-3.

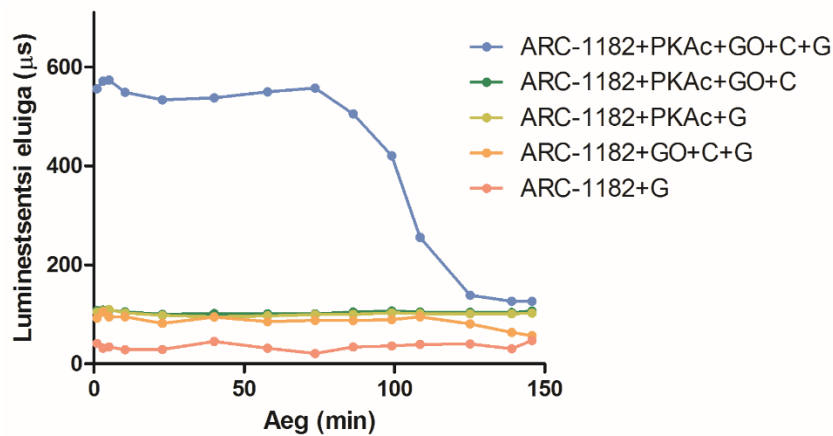
Sarnaselt ARC-Lum(Fluo)-sondidele suurenes glükoosi oksüdaasi ja katalaasi lisamisel ka vaba ARC-668 luminesentsi intensiivsus, mis võib viidata mittespetsiifilisele seondumisele. Kuigi absoluutskaalas on tegu väikese muutusega, oleks informatiivne mõõta ARC-668 eluiga hapnikuvabas keskkonnas, kasutades hapniku kõrvaldamiseks argoongaasi. Nii ARC-668 kui ka ARC-1138 luminesentsi eluiga on ka hapnikuvabas keskkonnas seondumata kujul lühem kui PKAc-le seondunult. Selle põhjal võib arvata, et proteiinkinaasile seondumisel moodustuvad vesiniksidemed ja hüdrofoobsed interaktsioonid mõjutavad ARC-Lum(-)-sondide fosforestsentsi kvantsaagist. Teise hüpoteesi kohaselt võib ka vesi olla oluline ARC-Lum(-)-sondide luminesentsi kustutaja: vee kui kustutaja mõju võib olla väiksem, kui sond on seondunud proteiinkinaasile. Edaspidi võiks uurida ARC-Lum(-)-sondide fosforestsentsi orgaanilistes lahustites.

Selenofeense osaga ARC-1138 on lühema luminesentsi elueaga kui ARC-668 (tabel 1), mis on kooskõlas varasemate tulemustega [2]. Samast tabelist on näha komplekside luminesentsi eluigade hapnikusõltuvus. Hapnikuga keskkonnas on mõlema sondi kompleksi luminesentsi eluead samas suurusjärgus. Kuigi ARC-668 hapnikuvaba kompleksi luminesentsi eluiga on suure määramatusega, on see ARC-1138 kompleksist hapnikuvabas vesilahuses oluliselt pikema luminesentsi elueaga. ARC-668 luminesentsi eluiga pikeneb 10,1 korda ning ARC-1138 eluiga 4 korda. Kuna hapnikuga keskkonnas toimub kustutamine, siis pikema tripleti eluea

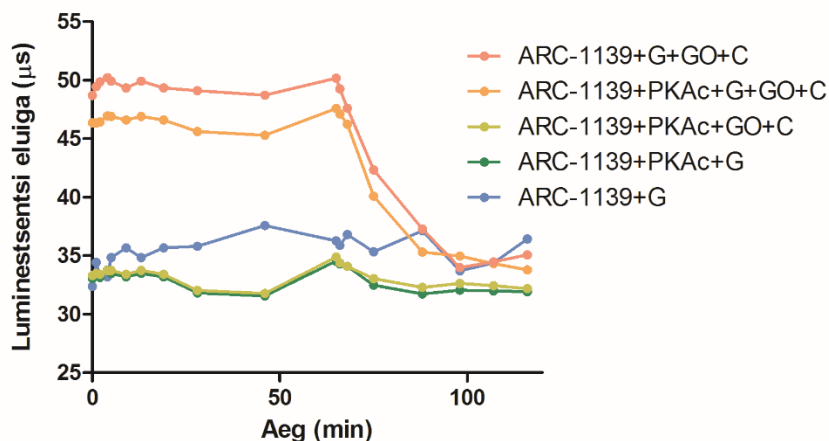
korral on signaal-müra suhte suurenemine hapniku kõrvaldamisel keskkonnast olulisem kui lühema eluea korral.

3.2.2 ARC-Lum(Fluo)-sondide ja PKAc kompleksi luminesstents

Kompleksis PKAc-ga mõõdeti ka ARC-Lum(Fluo)-sondide luminesstentsi intensiivsust ja eluiga nii hapnikuga kui ka hapnikuvabas keskkonnas. Iga proovi jaoks kasutati taustmüra määramiseks kontroll-lahust, mis sisaldas kõiki teisi komponente peale ARC-Lum(Fluo)-sondi. Joonistelt 8 ja 9 näha, et mõõtmised hapnikuvabas keskkonnas ei saa kasutatud glükoosi kontsentratsiooni juures kesta üle 60 minuti, mil hakkab lõppema glükoosi oksüdeerimise statsionaarne faas. Edasises analüüsis on kasutatud andmeid, mis on mõõdetud pärast 20 minuti möödumist glükoosi lisamisest.



Joonis 8. ARC-1182 (5 nM) luminesstentsi eluea muutumine ajas. Kõigist tulemustest on enne luminesstentsi eluea arutamist maha lahutatud vastav taustsignaal. Graafik illustreerib ühe katse tulemusi, korduste arv oli 3.

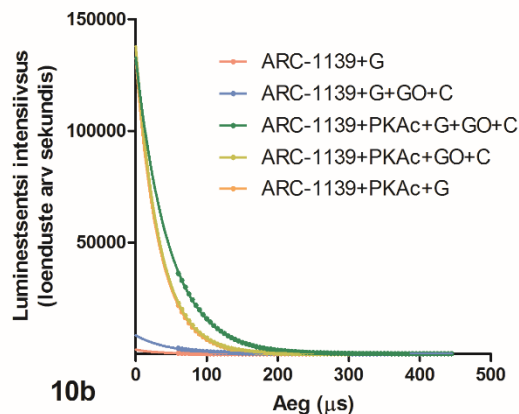
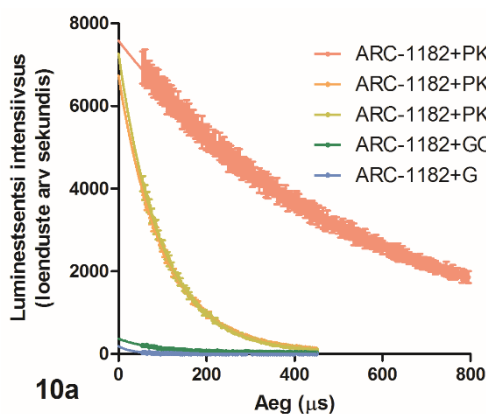


Joonis 9. ARC-1139 (2 nM) luminesstentsi eluea muutumine ajas. Kõigist tulemustest on enne luminesstentsi eluea arutamist maha lahutatud vastav taustsignaal. Graafik illustreerib ühe katse tulemusi, korduste arv oli 3.

Tabelis 2 toodud andmete põhjal saab väita, et hapnikuvabas keskkonnas toimub ootuspärane luminesentsi eluea tõus, seejuures ei ole selenofeeni sisaldava ARC-1139 hapnikutundlikkus nii suur nagu tiofeeni sisaldaval ARC-1182-l. Kuna viimase luminesentsi eluiga on pikem, on hapnikul rohkem aega luminesentsi kustutada. ARC-1139 oluliselt lühema luminesentsi eluea võib põhjustada ka efektiivsem intramolekulaarne FRET. FRETi efektiivsuse määramist käsitleb peatükk 3.2.4.

Tabel 2. ARC-1182 ja ARC-1139 luminesentsi eluigade sõltuvus lahuste komponentidest. Eluead määrati proovidele pärast vastava taustsignaali mahalahutamist. Tulemused esindavad kolme katse keskmisi, korduste arv oli 3. Määramatused põhinevad eri päevadel tehtud mõõtmiste standardhälbel.

	ARC-1182	ARC-1139
PKAc+GO+C+G	556±9 μs	47±2 μs
PKAc+GO+C	109±8 μs	33±1 μs
PKAc+G	146±77 μs	36±6 μs
GO+C+G	96±19 μs	42±2 μs
GO+C	61±7 μs	31±3 μs
G	30±14 μs	29±5 μs

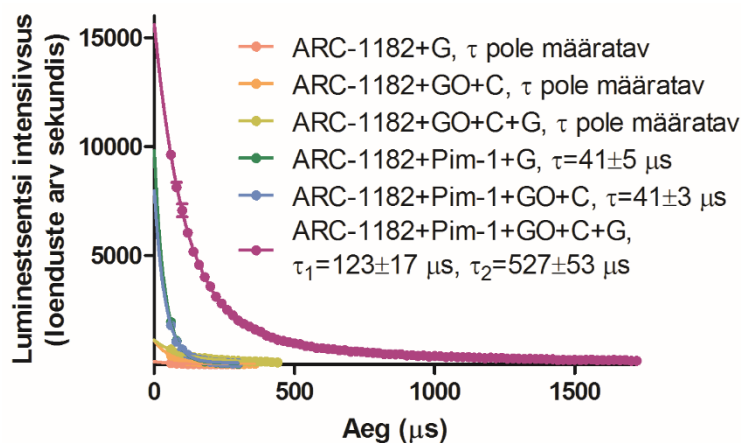


Joonised 10a ja 10b. ARC-1182 (5 nM) ja ARC-1139 (2 nM) luminesentsi eluiga. Kõigist proovidest on eelnevalt maha lahutatud vastav taustsignaal. Iga mõõtmispunkt joonisel vastab 5 μs pikkuse alamvahemiku luminesentsi intensiivsusele. Vearibad põhinevad 3 korduse tulemuste kõverale sobitumisel. Graafik illustreerib ühe katse tulemusi.

3.2.3 ARC-Lum(Fluo)-sondi ARC-1182 ja proteiinkinaasi Pim-1 kompleksi luminesents

PKAc-ga tehtud katseid ARC-1182ga korrati teise proteiinkinaasiga Pim-1. Pim-1 moodustab adensiiniga analoogse osaga ühe vesiniksideme vähem. See põhjustab võrreldes teiste

proteiinkinaasidega muutusi sondi ja Pim-1 seondumises. Kui hapniku juuresolekul oli Pim-1 ja ARC-1182 kompleksi luminesentsi eluiga 2,7 korda lühem kui ARC-1182 ja PKAc kompleksil, siis hapniku kõrvaldamisel lahusest pikeneb Pim-1-le seondunud ARC-1182 luminesentsi eluiga vaid 3 korda ning ARC-1182 ja PKAc kompleksi luminesentsi elueast hapnikuvabas keskkonnas on see 4,5 korda lühem. Pim-1 ja ARC-1182 kompleksi luminesentsi eluea langemist hapnikuvabas keskkonnas ei saadud kirjeldada üheeksponentsiaalse valemiga. Samas vastasid tulemused hästi kaheeksponentsiaalsele valemile. See eeldab, et luminesentsi intensiivsuse kustumine toimub mitme komponendi mõjul. Lühema eluea osakaal kogu elueast oli $84\pm 3\%$ (standardhälbe määramisel on kasutatud kolme paralleelkatse tulemusi). Hapnikuga keskkonnas kompleksi sisaldavate lahuste eluigade kõverad vastasid üheeksponentsiaalsele valemile, kuigi väiksema signaali tõttu ei pruukinud seal kahe komponendiga valemile vastavus välja tulla. Luminesentsi pika elueaga komponent on sarnane ARC-1182 ja PKAc kompleksi luminesentsi elueale samades tingimustes. Samas ei saa ühe puuduva vesiniksideme tõttu seondumine toimuda täpselt samamoodi. Seega vajab täiendavat uurimist, mis põhjustel ei saa üheeksponentsiaalse valemiga kirjeldada Pim-1 ja ARC-1182 kompleksi kustumist hapnikuvabas keskkonnas ning kui hästi vastab üheeksponentsiaalne valem hapnikuga keskkonnas Pim-1 katsete analüüsiks.



Joonis 11. ARC-1182 (5 nM) luminesentsi eluigade sõltuvus lahuse komponentidest. Hapnikuvaba kompleksi juures on välja toodud kaheeksponentsiaalsele valemile vastav lühike ja pikk luminesentsi eluiga. Iga mõõtmispunkt joonisel vastab 20 µs pikkuse alamvahemiku luminesentsi intensiivsusele. Graafik illustreerib ühe katse tulemusi. Vearibad põhinevad 2-3 tulemuse kõverale sobitumisel. Luminesentsi eluea tulemused esindavad kolme katse keskmisi, määramatud põhinevad eri päevadel tehtud mõõtmiste standardhälbel, korduste arv oli 2.

3.2.4 Intramolekulaarse FRETi efektiivsus proteiinkinaasile seondunud ARC-Lum-sondis

Teades FRETis osalevate doonori ja doonori-aktseptori paari luminesentsi eluigasid, saab valemi 3 järgi välja arvutada intramolekulaarse FRETi efektiivsuse. ARC-668 on FRETi paaris ainult doonorit sisaldav ühend ning ARC-1182 doonori ning aktseptori paari sisaldav ühend. Samal viisil moodustavad FRETi paari ARC-1138 ja ARC-1139 (ARC-1138 kohta avaldamata andmed). Vastavad luminesentsi eluea väärtused on toodud tabelites 1 ja 2. ARC-1182 intramolekulaarse FRETi efektiivsus doonorilt aktseptorile hapnikuga keskkonnas oli $10\pm 1\%$ ja hapnikuvabas keskkonnas saadi sama doonori ja aktseptori paari FRETi efektiivsuseks $61\pm 35\%$. ARC-1139 puhul saadi doonori ja aktseptori vahelise FRETi efektiivsuseks hapnikuga keskkonnas $69\pm 8\%$ ja hapnikuvabas keskkonnas $89\pm 5\%$. (Vearivad iseloomustavad liitmääramatust, mis on leitud 2-3 paralleelkatse tulemuste standardhälvetest.)

Tiofeeni jääki sisaldava paari madalama FRETi efektiivsuse võis põhjustada doonori emissioonispektri ja aktseptori ergastusspektri halvem kattuvus kui selenofeeni jäägiga paari korral. Lisaks võis ARC-668 korral olla hapniku kõrval kustutajaks mõni muu komponent, mis keskkonnas juures oli. Sellisel juhul oleks ainult doonorit sisaldava sondi ARC-668 tripleti eluiga ergastatud olekus mõõdetust pikem ja FRET toimuks arvatust efektiivsemalt.

Hapniku kõrvaldamisel pikenes oluliselt väävlit sisaldava ARC-Lum(Fluo) sondi ARC-1182 eluiga, mistõttu saab luminesentsi aegviivitusega mõõtmisel edaspidi kasutada pikemat viivitust ja integratsiooniakent kui hapniku juuresolekul. Kvantsaagise näilise suurenemise tõttu kustutaja kõrvaldamisel keskkonnast, peaks sama signaal-müra suhte saavutamiseks olema võimalik edaspidi kasutada katsetes madalamaid sondi kontsentratsioone kui hapniku juuresolekul.

Kokkuvõte

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida ARC-Lum-sondide pikaealise luminesentsi omadusi hapnikuvabas vesilahuses seondunult proteiinkinaasile ja samuti seondumata kujul. ARC-Lum-sondid on bisubstraatsed inhibiitorid, mis seonduvad proteiinkinaasidega ning millel on luminesentsomadused. Käesolevas töös kasutati mudelproteiinkinaasina cAMP sõltuva proteiinkinaasi katalüütilist alaühikut.

Esmalt kontrolliti varem välja töötatud hapniku ensümaatilise kõrvaldamise meetodika kohaldamise võimalikkust antud töös kasutatud ühenditele proteiinkinaase mitte sisaldavas vesilahuses. Vaadeldi kahe komponendi, veiseseerumi albumiini (BSA) ja katalaasi mõju vaba ARC-Lum(Fluo)-sondi luminesentsile. BSAd lisati mittespetsiifilise pinnale seondumise vähendamiseks ja katalaasi hapniku kõrvaldamise reaktsioonil tekkiva vesinikperoksiidi eemaldamiseks. Tulemuste põhjal leiti, et BSA ega katalaas ei avaldanud luminesentsi elueale olulist mõju ning seega oli nende kasutamine puhverlahuses õigustatud. Vaba ARC-Lum(Fluo)-sondi luminesentsi intensiivsus ilma proteiinkinaasi lisamata ja kõigi hapniku kõrvaldamiseks vajalike komponentide juuresolekul oli võrreldes ARC-Lum(Fluo)-sondi ja proteiinkinaasi vahelise kompleksi luminesentsi intensiivsusega tühine.

Töö põhiosas karakteriseeriti ARC-Lum-sondi ja proteiinkinaasi kompleksi hapnikutundlikkust vesilahuses. Omavahel võrreldi tiofeeni ja selenofeeni jääki sisaldavaid ARC-Lum(-) ja ARC-Lum(Fluo)-sonde. Ootuspäraselt oli selenofeeni jääki sisaldavate ARC-Lum-sondide luminesentsi eluiga lühem, aga luminesentsi intensiivsus suurem kui tiofeeni jääki sisaldavates ARC-Lum-sondides ka hapnikuvabas vesilahuses. Hapniku kõrvaldamise tulemusel toimunud luminesentsi eluea pikenemine oli tiofeeni jääki sisaldavate ühendite puhul suurem kui selenofeeni jääki sisaldavate ühendite puhul.

Mõõdetud luminesentsi eluigade põhjal arvutati intramolekulaarse FRET-i efektiivsused ARC-1182 ja ARC-1139 molekulide jaoks. Kummagi luminesentssondi jaoks toimus FRET hapnikuvabas keskkonnas näiliselt oluliselt efektiivsemalt. ARC-1139 korral oli FRET-i efektiivsus hapnikuga keskkonnas 68% ja hapnikuvabas keskkonnas 89%. Tänu sellele oli hapnikuvabas keskkonnas teostatud mõõtmine tundlikum kui hapniku juuresolekul teostatud mõõtmine. See tagab mõõtmisel parema signaal-müra suhte ning võimaldab katseid edaspidi läbi viia väiksemate ainekogustega.

Oxygen sensitivity of ARC-based photoluminescent probes

Ken Riisalu

Summary

The aim of this bachelor thesis was to assess luminescence properties of ARC-Lum probes in oxygen-free environment. ARC-Lum probes are responsive photoluminescent probes derived from bisubstrate inhibitors of protein kinases. The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase was used as the model protein kinase.

Firstly, the compatibility of the system used for the removal of dissolved oxygen from the measurement solution had to be established. These experiments were performed with ARC-Lum(Fluo) probes in the absence of protein kinases. Bovine serum albumin (BSA) was added to samples to prevent adsorption of probes to plastic surfaces. Catalase was added to the samples to remove hydrogen peroxide that was produced during the enzymatic removal of oxygen. BSA nor catalase had a noticeable effect on the luminescence lifetime of the free ARC-Lum(Fluo) probes. The luminescence intensity of free ARC-Lum(Fluo) probes in the absence of a protein kinase and in the presence of all other buffer components, which were required for the enzymatic removal of oxygen, was negligible.

The effect of removal of dissolved oxygen on the luminescence of the complex of ARC-Lum probes and protein kinases was determined. ARC-Lum(-) and ARC-Lum(Fluo) probes comprising either thiophene- or selenophene-containing moieties were compared. Expectedly, the luminescence intensity of thiophene-containing probes was smaller, but the luminescence lifetime longer than those of ARC-Lum probes comprising selenophene-containing moiety. The increase of luminescence lifetime upon removal of oxygen was bigger for the thiophene-containing probes if compared to their selenophene-containing counterparts.

Based on the luminescence lifetimes, the FRET efficiencies of ARC-Lum(Fluo) probes ARC-1182 and ARC-1139 were calculated. The observed FRET efficiency was higher in oxygen-free environment than in the presence of oxygen for both probes. FRET efficiency for ARC-1139 was 68% in the presence of oxygen and 89% in the absence of oxygen. Due to the increase of luminescence lifetime of complexed probes in oxygen-free conditions, time-gated measurements of luminescence can be performed with smaller concentration of both probes and protein kinases.

Kasutatud kirjandus

1. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer Science+Business Media: New York, 2006; pp 1-6.
2. Enkvist, E.; Vaasa, A.; Kasari, M.; Kriisa, M.; Ivan, T.; Ligi, K.; Raidaru, G.; Uri, A. Protein-Induced Long Lifetime Luminescence of Nonmetal Probes. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (10), 1052-1062.
3. Jaffé, H. H.; Miller, A. L. The Fates of Electronic Excitation Energy. *J. Chem. Educ.* **1966**, *43* (9), 469-473.
4. Sauer, M.; Hofkens, J.; Enderlein, J. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*; Wiley-VCH: Weinheim, 2011; pp 20-21.
5. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer Science+Business Media: New York, 2006; pp 8-10.
6. Gadella, T. W. J. *FRET and FLIM Techniques*, 1st ed.; Elsevier: Amsterdam, 2009; Vol. 33, pp 10-16.
7. Medintz, I.; Hildebrandt, N. *FRET - Förster Resonance Energy Transfer*; Wiley-VCH: Weinheim, 2014; pp 113-115.
8. Vaasa, A.; Viil, I.; Enkvist, E.; Viht, K.; Raidaru, G.; Lavõgina, D.; Uri, A. High-affinity bisubstrate probe for fluorescence anisotropy binding/displacement assays with protein kinases PKA and ROCK. *Anal. Biochem.* **2009**, *385* (1), 85-93.
9. Sauer, M.; Hofkens, J.; Enderlein, J. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*; Wiley-VCH: Weinheim, 2011; pp 27-29.
10. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer Science+Business Media: New York, 2006; pp 14-15.
11. Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; Ten Eyck, L. F.; Ashford, V. A.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; M., S. J. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **1991**, *253* (5018), 407-414.

12. Schwartz, P. A.; Murray, B. W. Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg. Chem.* **2011**, *39* (5-6), 192-210.
13. Jacobs, M. D.; Black, J.; Futer, O.; Swenson, L.; Hare, B.; Fleming, M.; Saxena, K. Pim-1 Ligand-bound Structures Reveal the Mechanism of Serine/Threonine Kinase Inhibition by LY294002. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 13728-13734.
14. Strelow, J.; Dewe, W.; Iversen, P. W.; Brooks, H. B.; Radding, J. A.; McGee, J.; Weidner, J. Mechanism of Action assays for Enzymes. In *Assay Guidance Manual*; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda, 2012.
15. Lakowicz, J. R.; Piszczek, G.; Kang, J. S. On the possibility of long-wavelength long-lifetime high-quantum-yield luminophores. *Anal. Biochem.* **2001**, *288* (1), 62-75.
16. Kasari, M.; Ligi, K.; Williams, J. A. G.; Vaasa, A.; Enkvist, E.; Viht, K.; Palsson, L.-O.; Uri, A. Responsive microsecond-lifetime photoluminescent probes for analysis of protein kinases and their inhibitors. *BBA-Proteins Proteom.* **2013**, *1834* (7), 1330-1335.
17. Baumann, R. P.; Penketh, P. G.; Seow, H. A.; Shyam, K.; Sartorelli, A. C. Generation of oxygen deficiency in cell culture using a two-enzyme system to evaluate agents targeting hypoxic tumor cells. *Radiat Res.* **2008**, *170* (5), 651-660.
18. Engh, R. A.; Girod, A.; Kinzel, V.; Huber, R.; Bossemeyer, D. Crystal Structures of Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase in Complex with Isoquinolinesulfonyl Protein Kinase Inhibitors H7, H8, and H89. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (42), 26157-26164.
19. Harrington, L.; Cheley, S.; Alexander, L. T.; Knapp, S.; Bayley, H. Stochastic detection of Pim protein kinases reveals electrostatically enhanced association of a peptide substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110* (47), 4417-4426.
20. Wu, S. Optimization of ARC-Lum Based Time-Gated Photoluminescence Method for Determination of Affinities of Protein Kinase Inhibitors. University of Tartu, Tartu. **2014**.
21. Zander, M.; Kirsch, G. On the Phosphorescence of Benzologues of Furan, Thiophene, Selenophene, and Tellurophene. *Z. Naturforsch.* **1989**, *44a*, 205-209.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Ken Riisalu,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „ARC-põhinevate fotoluminestsentssondide hapnikutundlikkus“, mille juhendaja on Kadri Ligi,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **01.06.2015**