

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ARTJOM ISSAJEV

**Anioonse fragmendi mõju proteiinkinaaside CK2 ja DYRK1A
inhibiitorite afiinsusele**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: *teadur* Kaido Viht

juhtivteadur Asko Uri

TARTU 2018

INFOLEHT

Anioonse fragmendi mõju proteiinkinaaside CK2 ja DYRK1A inhibiitorite afiinsusele

Käesolevas töös iseloomustatakse CK2 bisubstraatsete inhibiitorite seondumisvõimet proteiinkinaasile DYRK1A. Võrreldi 16 inhibiitorit, mis erinesid üksteisest proteiinkinaasi ATP-taskusse suunatud struktuurielemendi ja sellega seotud anioonse fragmendi poolest. Töö tulemused näitasid, kuidas nimetatud struktuursed erisused muudavad inhibiitorite afiinsust ja selektiivsust CK2 ja DYRK1A suhtes. Lisaks avastati kõrgafiinne DYRK1A fluorestsentssond, mida saab kasutada uute DYRK1A inhibiitorite iseloomustamiseks.

Märksõnad: CK2, DYRK1A, proteiinkinaas, inhibiitor, afiinsus

CERCS kood: P310 Proteiinid, ensümoloogia.

The impact of anion fragment on the affinity of protein kinase inhibitors CK2 and DYRK1A

The main goal of current work is to characterize the ability of CK2 bisubstrate inhibitors to bind with protein kinase DIRK1A. 16 inhibitors were compared, which differed by structural elements targeted to the ATP-pocket of protein kinase, as well as by anionic fragments incorporated into the structures of the inhibitors. The results showed, how the above mentioned structural differences change the affinity and selectivity of inhibitors in relation to CK2 and DYRK1A. A high-affinity fluorescent probe for DYRK1A was discovered, which can be used for characterizing new inhibitors of DYRK1A.

Key words: CK2, DYRK1A, protein kinase, inhibitor, affinity

CERCS code: P310 Proteins, enzymology.

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Valkude fosforüülimine.....	7
1.2. Proteiinkinaasid.....	8
1.2.1. Klassifikatsioon.....	9
1.2.2. Struktuur.....	10
1.2.3. Regulatsioonimehhanismid	12
1.2.4. Rakendused	12
1.3. CK2	13
1.3.1. Struktuur. CK2 α ja CK2 β isovormid	13
1.3.2. Regulaatormehhanismid.....	13
1.3.3. Funktsioonid.....	14
1.3.4. CK2 onkogeenne potentsiaal.....	14
1.4. DYRK-kinaasid.....	15
1.4.1. Struktuur. DYRK perekonna liikmed.....	15
1.4.2. Regulaatormehhanismid.....	16
1.4.3. Funktsioonid.....	16
1.4.4. DYRK1A neurodegeneratiivsetes haigustes	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	18
2.1. Töö eesmärgid.....	18
2.2. Eksperimendi käik.....	18
2.3. Materjal ja meetodika.....	18
2.3.1. Reagendid.....	18
2.3.2. Aparatuur.....	20
2.4. Protokollid.....	21
2.4.1. Fluorestsentsligandi tiitrimine kinaasiga.....	21
2.4.1.1. CK2 α^{1-335} ja DYRK1A aktiivse vormi kontsentratsiooni määramine	21
2.4.1.2. DYRK1A fluorestsentssondide afiinsuste leidmine.....	22
2.4.2. Fluorestsentsligandi ja märgistamata ligandi konkureeriv sidumine kinaasiga	22
2.5. Tulemused ja arutelu	25

2.5.1. DYRK1A aktiivse vormi stabiilsus.....	25
2.5.2. DYRK1A jaoks sobiva fluorestsentssondi valik	26
2.5.3. CK2 α^{1-335} ja DYRK1A inhibiitorite afiinsuste võrdlus	27
KOKKUVÕTE.....	30
RESÜMEE / SUMMARY	31
KIRJANDUSE LOETELU	32
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	34
LISAD.....	35
LIHTLITSENTS	48

KASUTATUD LÜHENDID

ACN - atsetonitriil

ADP - adenosindifosfaat

aPK - atüüpilised proteiinkinaasid

ARC - algselt, adensiini ja oligoargiini konjugaat; hiljem, TÜ keemia instituudis konstrueeritud proteiinkinaaside inhibiitor

ATP - adensiintrifosfaat

CK2 - kaseiini kinaas 2

CK2 α - CK2 katalüütilise alaühiku isovorm α

CMGC - CDK, MAPK, GSK3 ja CLK kinaaside rühm

DMSO - dimetüülsulfoksiid

DS - Downi sündroom

DSK - kaksikspetsiifilised kinaasid

DTT - ditiotreitol

DYRK1A - türosiini fosforüülimisega reguleeritud kaksikspetsiifiline proteiinkinaas 1A

ePK - eukarüootilised proteiinkinaasid

HEPES - 4-(2-hüüdoksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape

HPLC - kõrgeefektiivne vedelikkromatograafia

K_D - dissotsiatsioonikonstant saadud sidumiskatses

K_d - dissotsiatsioonikonstant saadud väljatõrjumiskatses

MQ - Milli-Q-seadmega saadud ülipuhas vesi

P4 - neljakomponendiline puhver

PK - proteiinkinaas

STK - seriin/treoniinkinaas

TFA - trifluoroetaanhape

TK - türosiinkinaas

Tween-20 - polüsorbaat 20

UV/Vis - ultraviolett ja nähtav valgus

SISSEJUHATUS

Proteiinkinaasid on ensüümide perekond, mis katalüüsib fosforüülimise protsesse. Selline regulatsiooni mehhanism aktiveerib ja deaktiveerib valke ning mängib tähtsat rolli praktiliselt kõigis rakuprotsessides. Käesolevas töös pööratakse tähelepanu kahele proteiinkinaaside super-perekonna esindajale: CK2 ja DYRK1A.

Proteiinkinaas CK2 on hädavajalik rakkude ellujäämiseks. CK2 osaleb rakutsükli reguleerimises ja kaitseb rakke apoptoosi eest. Tänapäevaks CK2 on tähtis sihtmärk vähihaiguste ravimises. DYRK1A kodeeriv geen paikneb 21 kromosoomis Downi sündroomi kriitilises piirkonnas. DYRK1A on seotud erinevate neurodegeneratiivsete haigustega, mille hulgas on Alzheimeri, Parkinsoni ja Huntingtoni tõved, ka mõned Downi sündroomi tunnused.

Mõlema kinaasi inhibeerimine on prioriteetne suund inhibiitorite kui potentsiaalsete ravimite väljatöötamises. Käesolevas töös püüti leida struktuursed erisused, mis saavad tõsta inhibiitorite afiinsust või selektiivsust CK2 ja DYRK1A kinaasi suhtes. Kirjandusest on teada, et negatiivse peptiidahela ühendamine inhibiitori struktuuriga suurendab inhibiitori afiinsust CK2 suhtes. Selle töö raames vaadeldakse anioonse fragmendi mõju inhibiitorite afiinsusele DYRK1A suhtes. Samuti võrreldakse uuritud inhibiitorite selektiivsust CK2 ja DYRK1A suhtes.

Töö teostati Keemia Instituudis, Bioorgaanilise Keemia Õppetoolis.

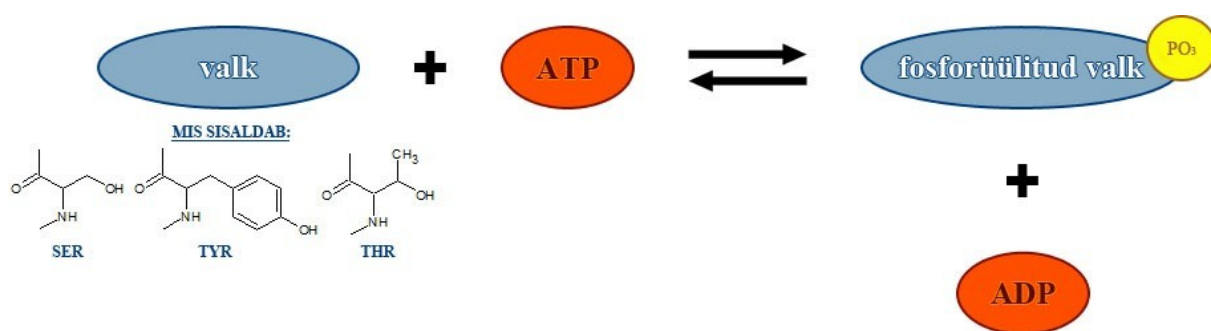
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Valkude fosforüülimine

Valkude aktiivsus rakus ei ole ajaliselt konstantne. Muutes ensüümide jt valkude aktiivsust, saab rakk muuta metabolismi protsesside suunda ja sellega adapteeruda välistingimustele, vastata hormonaalsetele ja teistele signaalidele, säilitada sisekeskkonna stabiilsust jne.

Üks meetoditest, millega saab reguleerida valkude aktiivsust, on kovalentne modifikatsioon. Kovalentse modifikatsiooni käigus toimub funktsionaalse rühma ülekandmine doonormolekulist sihtvalgule. Uus funktsionaalne rühm struktuuris muudab valgu aktiivsust. Rakus on väga palju kovalentse modifikatsiooni tüüpe (nt. metüülimine, sulfoonimine, atsetüülimine). Fosforüülimine on üks levinumaid kovalentse modifikatsiooni tüüpe (Ardito *et al.*, 2017).

Rohkem kui kaks kolmandikku kõikidest valkudest, mida kodeerib inimgenoom, on fosforüülitud mingil ajahetkel (Ardito *et al.*, 2017). Fosforüülimine kujutab endast γ -fosfaadi ülekandmist ATP-st aminohappe külghela polaarsele rühmale (joonis 1). Sõltuvalt polaarsest rühmast, millega seondub fosforüülrühm, eristatakse: O-fosforüülimist (-OH rühm, mida sisaldavad aminohapped seriin, türosiin, treoniin) ja N-fosforüülimist (aminohapped histidiin, lüsiin, arginiin) (Schwartz and Murray, 2011). Fosforüülitakse ka tsüsteiini, asparagiinhappe, glutamiinhappe jääke (Gusev, 2000). O-fosforüülimine on valdav produktide suurema stabiilsuse tõttu (Schwartz and Murray, 2011).



Joonis 1. O-fosforüülimisreaktsiooni skeem. Reagentide poolel on ATP ja valk, mis sisaldab seriini, treoniini või türosiini jääki. Reaktsiooni produktide poolel on ADP ja modifitseeritud valk, milles aminohappe külghelal on moodustunud fosforestri.

Kuna paljud ensüümid ja retseptorid aktiveeruvad ja deaktiveeruvad fosforüülimise kaudu, on selline regulatsiooni mehhanism tähtis praktiliselt kõigis rakuprotsessides: metabolismis ja

transkriptsioonis, signaaliülekanes ja rakutsükli erinevates etappides, immuunvastuses, närvisüsteemi funktsioneerimises, jne (Roskoski, 2015).

Fosforüülimine on mõjus ja laialt levinud järgmistel põhjustel:

1. **Fosforüülrühm on valgu koosseisus dianioon.** Füsioloogilise pH juures fosforüülrühm esineb dianioonina, sellist laengut ei oma ühegi kodeeritud aminohappe külghel (Schwartz and Murray, 2011). Kui üle kanda fosforüülrühm valgumolekulile, lisatakse neutraalse aminohappe külghelasse negatiivse laenguga funktsionaalrühm. Niisugune sündmus toob kaasa muutusi valgu struktuuris: lõhub ära vanu sidemeid ja moodustab uusi vastasmõjusid (Gusev, 2000).
2. **Vesiniksidemed.** Fosforüülrühm saab moodustada vesiniksidemeid ja niiviisi tekitada ja tugevdada nii sisemolekulaarseid kui molekulidevahelisi interaktsioone (Schwartz and Murray, 2011).
3. **Fosforüülrühma allika kättesaadavus.** Fosforüülrühma allikaks on ATP, mis esineb igas rakus ja suures kontsentratsioonis (1-4 mM, mõnikord kuni 12 mM) (Schwartz and Murray, 2011). Rakkudevahelises ruumis on ATP kontsentratsioon on madal.
4. **Termodünaamiline stabiilsus.** Fosforüülrühma ülekandmine ATP-lt valgule on termodünaamiliselt soodus (Schwartz and Murray, 2011).
5. **Ensüümid-antagonistid.** Paljud bioloogilised protsessid, mis toimuvad meie kehas, on kontrollitud ensüümidega. Valkude fosforüülimise eest vastab ensüümide super-perekond nimega proteiinkinaasid. Siinjuures, proteiinkinaasiga ülekandud fosforüülrühma eemaldamist hüdrolyüsireaktsioonil katalüüsitakse teise perekonna ensüümidega – fosfataasidega. Proteiinkinaasid ja fosfataasid on seega võimelised reguleerima valkude pöörduvat kovalentset modifikatsiooni (v. fosforüülimist ja defosforüülimist) (Ardito *et al.*, 2017).

Kokkuvõttes, fosforüülrühma struktuuri unikaalsus, lihtne kättesaadavus, reaktsiooni termodünaamiline stabiilsus ja pöörduvus teevad fosforüülrühma ideaalseks keemiliseks lülitiks, et mõjutada ja reguleerida keerulisi bioloogilisi protsesse.

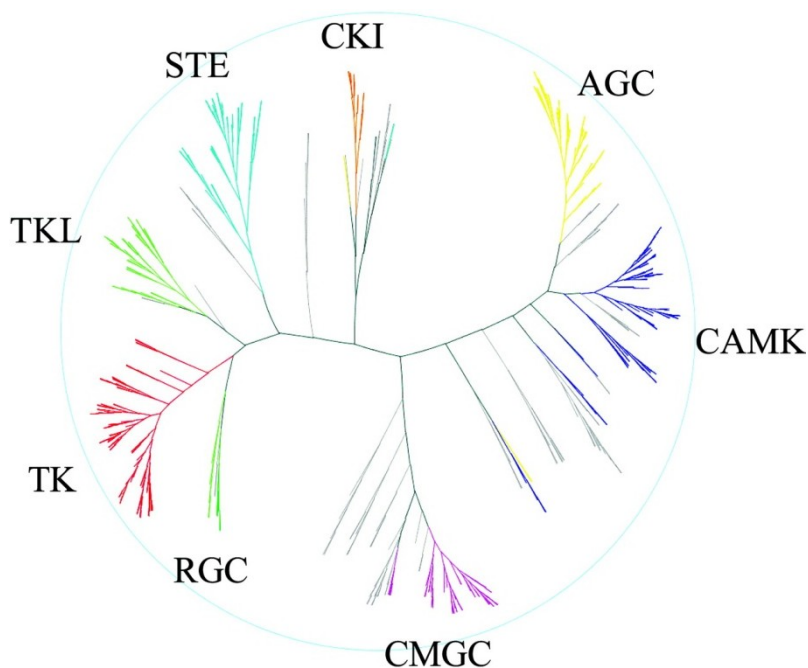
1.2. Proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid (PK) on ensüümide super-perekond, mille liikmed katalüüsivad fosforüülimise protsessi. Inimese genoomis on 538 geeni, mis kodeerivad proteiinkinaase (Fabbro *et al.*, 2015). Kõikidest proteiinkinaasidest orienteeruvalt 50 ei sisalda tähtsaid katalüütilisi aminohappe jääke ja seetõttu ei saa need kinaasid fosforüülimist läbi viia. Niisuguseid proteiinkinaase nimetatakse pseudokinaasideks. PKde super-perekond on

arvukuselt teine ensüümide perekond ja viies valkude perekond inimorganismis. (Roskoski, 2015)

1.2.1. Klassifikatsioon

PK efektiivsemaks uurimiseks on vaja neid grupeerida. Seda saab teha eri viisil. Algne klassifikatsioon põhines erinevustel PK aktiivsuse regulatsioonis (Gusev, 2000). Edasi ilmus klassifikatsioon, mis põhines kinaasi spetsiifilisusel (kas PK fosforüülib üht kindlat või mitut valku). Praegu rakendatakse klassifikatsiooni, mis põhineb PK katalüütiliste domeenide aminohappeliste järjestuste võrdlemisel (joonis 2).



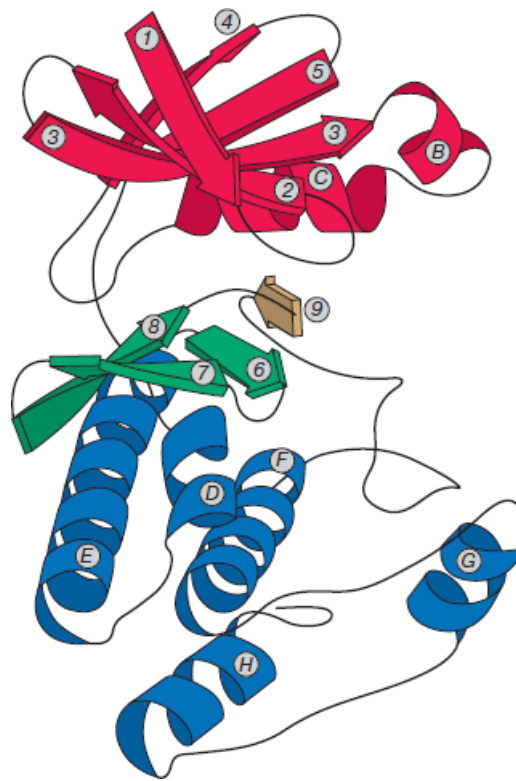
Joonis 2. ePK domeenide dendrogramm (Manning *et al.*, 2002). PK moodustavad 8 gruppi: **AGC** (siia kuuluvad kinaasid PKA, PKG, PKC), **CaMK** (Ca^{2+} /calmodulin sõltuvad kinaasid), **CKI** (cell kinase 1), **CMGC** (siia kuuluvad kinaasid CDK, MAPK, GSK3 ja CLK), **STE** (Sterile kinase), **RGC** (Receptor Guanylate Cyclases), **TK** (Tyrosine kinase) ja **TKL** (Tyrosine kinase-like) (Ardito *et al.*, 2017). Need ensüümid, mis omavad kinaasset aktiivsust, aga ei sisalda sarnaseid ePK-ga aminohappejärjestusi, moodustavad eraldiseisva atüüpiliste proteiinkinaaside perekonna (aPK) (Manning *et al.*, 2002).

Lisaks klassifitseeritakse PK fosforüülitava aminohappe substraadiselektiivsuse alusel. Kinaasid, mis fosforüülivad seriini, saavad fosforüülda ka treoniini. Koos need moodustavad seriin/treoniinkinaaside (STK) rühma, mis on kõige arvukaim (385 liiget) (Roskoski, 2015). Teise rühma kuuluvad türosiinkinaasid (TK) (90 liiget) (Schwartz and Murray, 2011). Viimase rühma moodustavad kaksikspetsiifilised kinaasid (DSK), mis on võimelised fosforüülima kõiki kolme aminohappeääki.

1.2.2. Struktuur

Vaatamata PK mitmekesisusele on nende katalüütiliste alaühikute ruumiline struktuur väga sarnane. Kõik kinaasid sisaldavad kaht substraadisidumispirkonda, et kinni hoida modifitseeritavat valku ja fosforüülrühma allikat (ATP), ja katalüütilist tsentrit, et läbi viia fosforüülimise protsessi (Gusev, 2000).

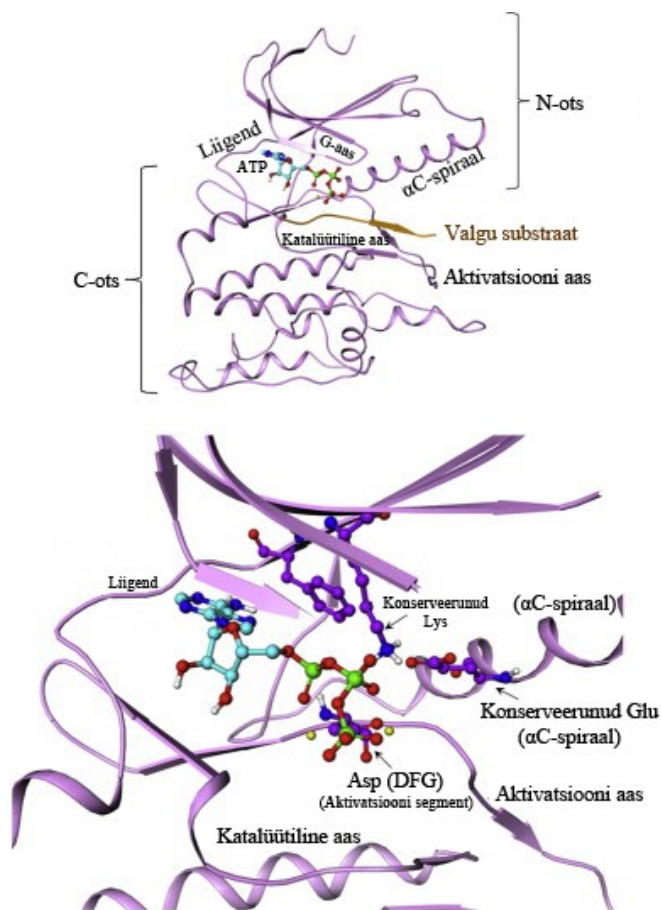
PK katalüütiline domeen (ehk kinaasne domeen) koosneb kahest subdomeenist: väiksemast N-terminaalsest osast, mille moodustavad 5 β -ahelat ja 1 kuni 3 α -spiraali, ja suuremast C-terminaalsest osast, mis koosneb ainult α -spiraalidest (Schwartz and Murray, 2011). Mõlemad subdomeenid on seotud omavahel peptiidahelaga (liigend, hing). Subdomeenide vahele jääb katalüütiline tasku, kuhu seondub ATP, ning selle lähedale PK pinnale fosforüülitav valk (Schwartz and Murray, 2011) (joonis 3).



Joonis 3. Katalüütilise domeeni struktuuri mudel (Gusev, 2000).

Röntgenkristallografia abil on kindlaks tehtud PK struktuursed erisused, mis on tähtsad substraatide sidumiseks ja fosforüülrühma edukaks ülekandmiseks. Neid jagatakse 11-ks piirkonnaks (Roskoski, 2015). Edaspidi on räägitud ainult mõnedest neist (joonis 4).

Väiksem aminoterminalne osa. Selleks, et ATP jääks sidumistaskusse kogu fosforüülimise protsessi käigus ja oleks õigesti ruumiliselt orienteeritud, ATP vajab „turvavöid“. N-terminaalses osas on mitu järjestust, mis vastutavad selle eest. Esiteks, glütsiini-rikas G-aas, mis seob ATP α - ja β -fosfaatrühmi (Schwartz and Murray, 2011). G-aas on üks liikuvamatest kinaasi osadest. Just G-aas koos α C-spiraaliga seovad ja õigesti orienteeruvad substraate katalüüsi läbiviimiseks (Schwartz and Murray, 2011). α C-spiraalis omavad tähtsust veel üks glütsiini rikas motiiv (P-aas) ja selles sisalduv konserveerunud lüsiini jääk. Lisaks sellele, α C-spiraali otsa ja lüsiini positiivne laeng aitavad stabiliseerida negatiivselt laetud fosfaatrühmi (joonis 4) (Matte et al., 1998). Kui muteerida G-aasa või lüsiini, siis kinaas ei saa siduda ATP-d ja kaotab oma aktiivsuse. Konserveerunud glutamiinhappe jääk, mis samamoodi paikneb α C-spiraalis, moodustab soolasilla koos lüsiiniga (Roskoski, 2015). See hoiab lüsiini ühes ja samas asendis ja annab stabiilsuse kogu lüsiin-glütsiin-fosforüülrühm seostuvale struktuurile.



Joonis 4. PK katalüütilise domeeni struktuuri elemendid (Schwartz and Murray, 2011).

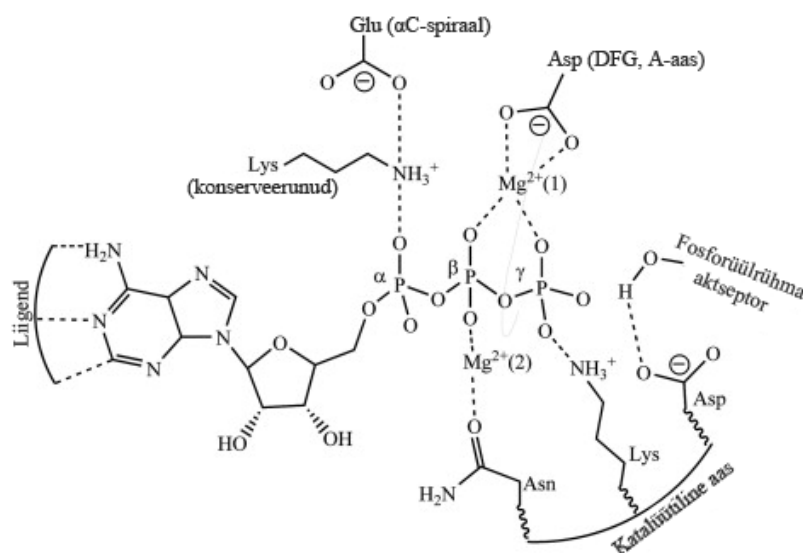
G-aas (glütsiin-rikas aas), α C-spiraal, mis koosneb P-aasast (fosforüülrühma seonduvast glütsiin-rikkast aasast), konserveerunud lüsiinist ja konserveerunud glutamiinhapest, A-aas (aktivatsiooni aas) koos DFG motiiviga, C-aas (katalüütiline aas) koos HRD motiiviga.

aktiivsesse saiti nii kauaks, kui on vaja fosforüülimise läbiviimiseks. Ja viimaseks eripärastest struktuuridest C-osas on YRD (või HRD) motiiv, mis kuulub katalüütilisesse aasa (Roskoski, 2015). HRD motiivis on asparagiinhape, mis osaleb γ -fosforüülrühma ülekandes ATP-st modifitseeritavale valgule (Schwartz and Murray, 2011). Kui see aminohape PK struktuuris asendada saab viimane siduda ATP-d, aga ei fosforüüli valke.

Proteiinkinaasi suurem, C-terminaalne osa, sisaldab konserveerunud järjestust DFG, mis on kriitiline katalüüsiks (Schwartz and Murray, 2011). Selle koostisesse kuuluv asparagiinhape seondub metallioonidega (Mg^{2+}).

Magneesiumioonid orienteerivad ATP γ -fosforüülrühma ja formeerivad õiget geomeetriat selle ülekandmiseks valk-substraadile (joonis 5) (Matte *et al.*, 1998). DFG on suure aasa alguseks, mida nimetatakse aktivatsiooni aasaks (A-aas). Just A-aas määrab PK spetsiifilise loomuse – võimalust fosforüülda seriini/treoniini, türosiini või kõike kolme aminohapet.

PK substraadiselektiivsus sõltub aminohappe järjestusest, mis ümbritseb fosforüülitava seriini, treoniini või türosiini jääke valk-substraadis ja mida nimetatakse konsensusjärjestuseks. Kui PK tunneb ära seda järjestust, siis kinaasi ja substraadi vahel tekib kõrge afiinsus. Tekkinud afiinsus on piisavalt kõrge selleks, et valk jääks PK



Joonis 5. Molekulaarsed interaktsioonid substraatide, konserveerunud jääkide ja kofaktorite vahel (Schwartz and Murray, 2011).

1.2.3. Regulatsioonimehhanismid

Kinaasi molekuli võivad kuuluda regulatiivsed alaühikud või domeenid, mis võivad olla sama valgumolekuli osad või eraldi valgud. Regulatiivsed domeenid võivad siduda madalmolekulaarseid ligande (nt sekundaarseid virgatsaineid), mille seondumine kinaasi aktiveerib. Regulatiivsed domeenid või alaühikud mõjutavad ka kinaasi paiknemist rakus, näiteks seovad selle rakumembraaniga vms. Laialt levinud kinaaside regulatsioonimehhanismiks on ka katalüütilise alaühiku fosforüülimine, mis lülitab kinaasi aktiivsuse sisse. (Ardito *et al.*, 2017)

1.2.4. Rakendused

Kõik eespool märgitud struktuurid tagavad korrektset, suunatud PK tööd. Mutatsioonid geeni piirkonnas, mis kodeerib kinaasi regulatiivseid elemente, võivad viia kontrollimatu aktiivsusega PK sünteesile, mis omakorda viib vastava rakuprotsesside valele reguleerimisele. See on paljude vähkkasvajate tekkimise ja arenemise aluseks (Ardito *et al.*, 2017). Näiteks valk p53 aktiveeritakse fosforüülimisega ja see stimuleerib geenide transkriptsiooni rakutsükli inhibeerimiseks, DNA taastamiseks ja raku programmeeritud surmaks. Viga p53-valgu fosforüülimise mehhanismis saab viia valgu inaktivatsioonile, mis edasi saab muuta tavalise raku vähirakuks (Ardito *et al.*, 2017). Vähi allikaks on ka epigeneetilised põhjused (ei ole seotud DNA järjestusega) (Ardito *et al.*, 2017). Ka siin osalevad proteiinkinaasid, mis vastutavad inimrakus signaaliülekanne eest ja vahendavad paljusid rakureaktsioone. Kromosoomne kaardistamine näitas, et 164 kinaasi kuulub amplikoonidele, mis tihti kohtuvad kasvajates, ja veel 80 kinaasi – lookustele, mis on seotud teiste raskete haigustega (Manning

et al., 2002). Kuigi iga lookus sisaldab palju geene, annavad need andmed lähtepunkti kinaaside funktsioonide uurimiseks. Tänapäevaks on inimese kasvajates leitud rohkem kui 1000 PK ekspressiooni variatsiooni (Ardito *et al.*, 2017). Kõik see teeb PKd ravimite arendamise sihtmärgiks ja loob vajaduse sellega seotud uurimistööks. Liigikaudu 40 inhibiitorit (Roskoski, FDA-approved protein kinase inhibitors, 2018) on käesolevaks hetkeks turul vähihaiguste ravimitena. Kõige tuntum nendest on Imatinib (Glivec®), mis Ameerika Ühendriikide FDA (Food and Drug Administration) poolt lubati kasutusse juba 2001 aastal kroonilise müeloidse leukeemia ravimina (Roskoski, 2015). Praegu ajaks on vähkkasvajad PKde inhibiitorite väljatöötamise prioriteediks.

1.3. CK2

CK2, endise nimetusega kaseiini kinaas 2, on üks kõige rohkem konserveerunud valkudest looduses (Trembley *et al.*, 2009), mis asub igapaikselts kõikides eukarüootsetes rakkudes. Traditsiooniliselt klassifitseeritakse CK2 STK rühmale (Litchfield, 2003). CK2 saab fosforüülda ka türosiini, kuigi niisuguse fosforüülimise kiirus on madalam võrreldes seriini ja treoniini fosforüülimisega (Litchfield, 2003). Mõned autorid klassifitseerivad CK2 DSKde hulka.

1.3.1. Struktuur. CK2 α ja CK2 β isovormid

CK2 tähtsaks struktuurseks iseärasuseks on see, et CK2 esineb rakkudes nii holoensüümi (kahe katalüütilise alaühiku ja kahte regulatiivse alaühiku valguline tetrameer) kui vaba katalüütilise alaühiku vormis. Mõlemad vormid omavad katalüütilist aktiivsust, kuid nende substraadiselektiivsus on mõnevõrra erinev. (Litchfield, 2003)

Inimrakkudes on kaks katalüütilise alaühiku isovormi (CK2 α , CK2 α' , moolmassid vastavalt 42 ja 38 kDa) ja üks katalüütilist aktiivsust mitteomav regulatoorse alaühiku isovorm (CK2 β , 28 kDa), mis saavad moodustada heterotetrameersed holoensüümid koostisega: $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_1\alpha'1\beta_2$, $\alpha'2\beta_2$. Vaatamata sellele, et isoformid CK2 α ja CK2 α' on kodeeritud erinevate geenide poolt, on nende aminohappejärjestused 90 % ulatuses identsed. Lisaks sellele need isovormid saavad teineteisest teataval määral funktsionaalselt kompenseerida. Suurem osa inhibiitoritest ei erista üht isovormi teisest.

1.3.2. Regulaatormehhanismid

CK2 iseärasuseks on selgete regulatsioonimehhanismide puudumine. Kuigi CK2 katalüütilisi alaühikuid fosforüülitakse, ei ole see katalüütilise aktiivsuse tekkimiseks vajalik. Samuti

puudub regulatsioon sekundaarsete virgatsainete kaudu. CK2 aktiivsuse regulatsioonis on tõenäoliselt tähtsad valk-valk interaktsioonid, näiteks holoensüümide agregatsioon. (Litchfield, 2003)

1.3.3. Funktsioonid

Minimaalne aminohappejärjestus, mida CK2 saab ära tunda ja fosforüülida on: S-X-X-Acid, kus X võib olla iga kodeeriv aminohape, Acid – negatiivse laenguga jääk (Glu, Asp, pSer või pTyr). Lisaks suurendab substraatide afiinsust CK2 suhtes rohkema arvu negatiivse laenguga aminohappejääkide olemasolu esitatud konsensusjärjestuse piirkonnas, mille tõttu CK2 kuulub atsidofiilsete kinaaside hulka. Tänapäevaks on leitud päris palju CK2 substraate (Meggio and Pinna, 2018). CK2 osaleb rakutsükli reguleerimises ja fosforüülib valke, mille funktsioonid on seotud rakutsükli progresseerumisega (Pin1). CK2 fosforüülib ka paljusid substraate, mis võtavad osa geenide ekspressioonist ja proliferatsioonist (näit. RNA polümeraas I, II ja III). Lisaks selle, CK2-1 on ka antiapoptootiline funktsioon. Kinaas fosforüülib valke, mida suunatakse kaspaas-vahendatud degradatsioonile apoptoosi käigus. Fosforüülimine kaitseb valke degradatsiooni eest. (Litchfield, 2003)

CK2 kadumine tuuma maatriksist esimese 24 tunni jooksul kutsub apoptootiliste rakkude kolmekordset suurendamist, 48 tunni pärast – 21 kordset suurendamist (Trembley *et al.*, 2009).

1.3.4. CK2 onkogeenne potentsiaal

Võitluses kasvajakrakkude vastu on tähtis „sihtida” biomolekule, mis on vajalikud kasvajakrakkude ellu jäämiseks. Vastasel juhul kasvajakrakud saavad surmast pääseda kasutades alternatiivset teed. Proteiinkinaas CK2 on asendamatu osaleja raku bioloogias ja on hädavajalik raku elamiseks. Seda kinnitavad edutud katsed teha CK2 α või CK2 β -nokautseid elujõulisi hiiri (Trembley *et al.*, 2009). Kuid mitte ainult CK2 kriitiline roll teeb selle ideaalseks sihtmärgiks inhibeerimiseks. On tähtis ka see, missugust funktsiooni täidab CK2 vähirakkude elus.

Nagu teada, vähirakkude võtmeerisusteks on: „mitte reguleeritud kasv, apoptoosist kõrvalehoidumine, piiramatult replikatiivne potentsiaal, püsiv angiogenees, kudede invasioon ja metastaasid, ja genoomi ebastabiilsus“ (Trembley *et al.*, 2009). CK2 funktsioonid on seotud minimaalselt kahe vähirakkude peatunnusega: mitte reguleeritud kasvu ja apoptoosiga. On teada, et paljudes uuritud vähirakkudes CK2 tase on kõrge. Normaalrakkudes CK2 toodetakse aktiivsemalt proliferatsiooni käigus ja selle lõpus tuleb selle kontsentratsioon tagasi basaalsele tasemele. Vähirakkudes CK2 kõrgeks ekspresseerunud säilib, mis toetab

rakkude kontrollimatut kasvu. Peale selle saab kõrgem CK2 tase ka tõsta onkogeenide töö efektiivsust. Näiteks, CK2 α üleekspressioon c-myc ja Tal-1 transgeense ekspressiooniga hiirtel viib leukemia ja lümfoomi sageduse tuntavale tõusule. Lisaks, CK2 kõrge tase surub maha apoptoosi, mida kutsuvad nii sisesed kui ka välised signaalid. Näiteks saab tuua keemilisi (näit. etoposidi) või füüsilisi (näit. soojusšoki) agente, mis kutsuvad esile apoptoosi ja panevad CK2 kiiresti liikuma tuuma maatriksisse valkude kaitsmiseks. (Trembley *et al.*, 2009)

Kuigi CK2 omaette ei ole onkokinaas, tõstab see vähirakkude onkogeenset potentsiaali loendatud viiside abil. Seetõttu omab CK2 inhibeerimine perspektiivi vähihaiguste ravimisel. CK2 olemasolevad inhibiitorid suurendavad apoptoosi ja tõstavad vähirakkude vastuvõtlikkust kemoterapiale (Litchfield, 2003). On arendatud CK2 inhibiitorite transpordi meetodid ainult kahjustatud kudedesse ja rakkudesse, et mitte häirida terve rakke.

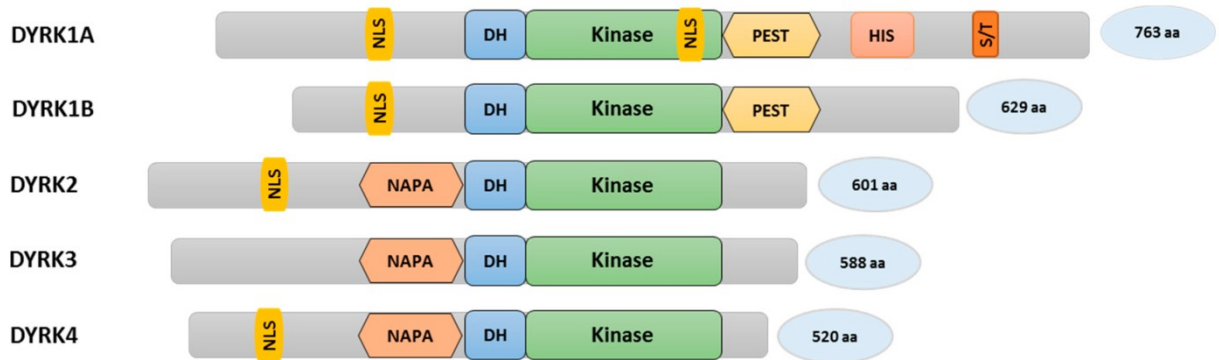
1.4. DYRK-kinaasid

DYRK kinaasid (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases) kujutavad endast CMGC rühma kuuluvate kaksikspetsiifiliste proteiinkinaaside perekonda, mis aktiveeruvad türosiini fosforüülimisega (Becker and Sippl, 2011).

1.4.1. Struktuur. DYRK perekonna liikmed

Imetajate rakkudes on 5 DYRK perekonna esindajat, mida klassifitseeritakse kahte rühma: DYRK I, kuhu kuuluvad DYRK1A ja DYRK1B ning DYRK II, kuhu kuuluvad DYRK2, DYRK3 ja DYRK4 (Park *et al.*, 2009). DYRK konsensusjärjestus on RXS/TP, kus R – arginiin, P – proliin, X – määratlemata aminohape (Alexeeva, 2013). DYRK katalüütiline domeen on sarnane kõikidel liikmetel (Alexeeva, 2013). Lisaks katalüütilisele domeenile on DYRK struktuurides teisi motiive, mille poolest DYRK kinaasid erinevad üksteisest (joonis 6). DYRK I klassi esindajatel on ainult nendele iseloomulikud konserveerunud aminohappejärjestused. N-terminaalses otsas asub järjestus NLC (Nuclear localization signal), mis on vajalik valgu transpordiks rakutuuma. C-terminaalses osas on veel 3 iseloomulikku järjestust. Üks nendest – PEST, mis on rikas proliini (P), glutamiinhappe (E), seriini (S), treoniinijääkide (T) poolest ja mis on signaalseks peptiidiks valgu degradatsioonile. Struktuuri kuulub veel HIS (13 histidiini koopiat) ja S/T – seriini ja treoniinirikas piirkond. (Park *et al.*, 2009)

DYRK1A, mis on eraldatud erinevatest organismidest, on 99% identne järjestuse poolest. See tõendab iga perekonna liikme funktsioonide säilitamist (Soppa and Becker, 2015).



Joonis 6. DYRK perekonna liikmete struktuuride võrdlus (Singh and Lauth, 2017). Kõik liikmed on sarnased kinaasse domeeni poolest.

1.4.2. Regulaatormehhanismid

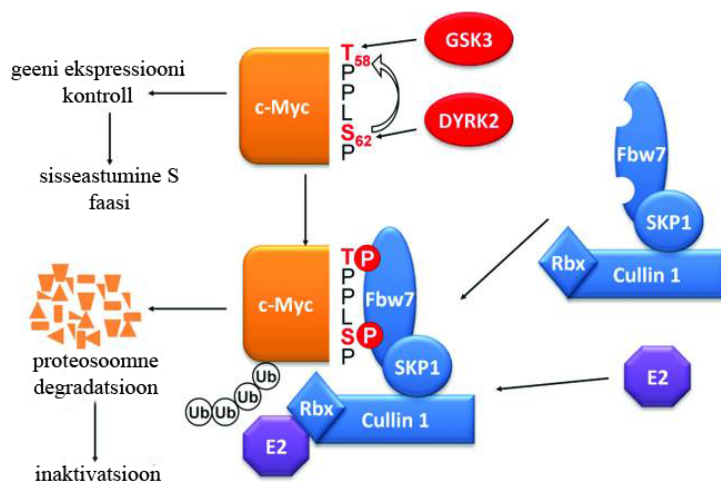
Esialgselt DYRK kinaasid ei ole aktiivses, vaid on vahevormis. Täieliku katalüütilise aktiivsuse saavutamiseks on vaja fosforüülda türosiini jääki, mis asub nende konserveerunud YxY motiivis aktivatsiooni aasas (Becker and Sippl, 2011). Selline ühekordne aktivatsioon toimub translatsiooni käigus. DYRK kinaasid ise katalüüsivad oma türosiini fosforüülimist (Soppa and Becker, 2015). Just selline võime peegeldub DYRK perekonna nimetuses ja arvab DYRK kaksikspetsiifiliste kinaaside hulka.

Türosiini asendamine aktivatsiooni aasas viib DYRK kinaasi katalüütilise aktiivsuse alandamisele (> 80%). Türosiini defosforüülimine ei lülita välja kinaasi, vaid alandab selle aktiivsust (~50%). Kui arvesse võtta fakti, et DYRK1A taseme väike muutus viib tõsistele fenotüübilistele tagajärgedele, rakus peavad olema teised regulaatormehhanismid kui sisse/välja lülitamine fosforüülimisega. Mõned uuringud kinnitavad DYRK kinaaside reguleerimist valkude interaktsioonidega. Selline hüpotees on kooskõlas PEST järjestusega, mis suunab DYRK1 ensümaatilisele degradatsioonile. Praegu ajaks pole DYRK kinaaside regulatsioonimehhanisme lõplikult selgitatud. Pigem on leitud, et DYRK1A on alati katalüütiliselt aktiivne (Becker and Sippl, 2011).

1.4.3. Funktsioonid

DYRK kinaasid ekspresseeruvad igapaiksel, kuid ebaühtlaselt, ning osalevad paljudes rakuprotsessides. DYRK kinaasid fosforüülivad regulaatorvalke, mis on kriitilised raku normaalseks kasvuks ja jagunemiseks. Näiteks, DYRK2 fosforüülib valke c-Jun ja c-Myc, kutsub esile nende degradatsiooni ubiquitiin-proteosoomse süsteemi kaudu (joonis 7) (Becker, 2012). S faasi sissekäiguks rakk vajab c-Jun c c-Myc kõrget taset, DYRK2 mängib negatiivset regulatoorset rolli. DYRK3 aeglustab erütropoeesi (vereloomet) (Soppa and Becker, 2015).

DYRK1B fosforüülib tsükliini D1 proteosoomseks degradatsiooniks, millega peatub rakutsükli puhkefaasis (G0 faasis) (Becker, 2012). DYRK1A on kõige iseloomustatum DYRK perekonna liige ja ta on paljude funktsioonidega. Nende hulgas on transkriptsiooni faktorite fosforüülimine, histoonide modifikatsioon, sünaptiline funktsioon neuronites j.n.e. (Soppa and Becker, 2015) Nimetatud funktsioonid on täidetud kas valgu stabiliseerimise või ubikvitiin-proteosoomse degradatsiooni abil, mis aktiveerub fosforüülimisega.



Joonis 7. DYRK2 suunab c-Myc ubikvitineerimisele ja sellele järgnevalt degradatsioonile (Becker, 2012). DYRK2 esineb priming-kinaasina ja fosforüülib c-Myc selleks, et seda saaks ära tunda GSK3 β kinaas. See fosforüülib c-Myc teist korda ja saadud molekuli seob kompleks, mis indutseerib ubikvitineerimist E2 ligandiga.

1.4.4. DYRK1A neurodegeneratiivsetes haigustes

Viimasel ajal äratub DYRK1A kinaas teadlaste tähelepanu seoses selle geeni asukohaga 21 kromosoomi Downi sündroomi (DS) kriitilises piirkonnas. Oletatakse, et just DYRK1A ekspressiooni muutus on seotud niisuguste DS tunnustega nagu arengupeetus, motoorsed defektid, Alzheimeri tõve (AD) varasem staadium, ja veel teiste haiguste hulga – Parkinsoni (PD) ja Huntingtoni (HD) tõbedega. (Becker and Sippl, 2011)

DYRK1A inhibiitorite areng on algstaadiumis, vaid transgeensete hiirte ravimise esimesed tulemused on lootustäratavad ja lubavad olla kasulikuks võitluses ülalpool nimetatud haiguste vastu (Park *et al.*, 2009).

Kuna DYRK perekonna esindajad on kriitilised rakkude ellujäämiseks, need on ka potentsiaalseteks sihtmärkideks vähihaiguste ravimisel (Becker, 2012). Seda kinnitavad andmed, et DYRK1B tase muutub kõrgemaks mõnedes vähi tüüpides (Soppa and Becker, 2015). Katsed inhibeerida DYRK1A või DYRK1B soodustasid vähirakkude korduvat üleminekut puhkefaasile. Niisugune omadus saab tõsta vähirakkude vastuvõtlikkust kemoteeraapiale või kiiritusravile (Soppa and Becker, 2015). Praegu ajaks pole DYRK kinaaside täpne roll vähi arengus lõpuni selge.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Selle töö raames olid seatud järgmised eesmärgid:

- leida DYRK1A kinaasile sobiv fluorestsentssond;
- iseloomustada bisubstraatsete CK2 inhibiitorite seondumisvõimet proteiinkinaasile DYRK1A;
- määrata struktuursed erisused, mis mõjutavad inhibiitorite CK2 ja DYRK1A vahelist selektiivsust.

2.2. Eksperimendi käik

Töö eksperimendialne osa koosnes järgmistest etappidest:

1. Eksperimendi disain (kinaaside, inhibiitorite ja meetodite valik);
2. Eksperimendi ettevalmistused (inhibiitorite puhastamine, puhtuse kontroll, lahuste tegemine);
3. CK2 α^{1-335} ja DYRK1A aktiivse vormi kontsentratsiooni määramine;
4. DYRK1A jaoks sobiva fluorestsentssondi valik (inhibiitorite afiinsuste leidmine ja võrdlemine);
5. CK2 α^{1-335} inhibiitorite K_D väärtuste määramine ja võrdlemine varemalt publitseeritud andmetega;
6. Valitud CK2 α^{1-335} inhibiitorite DYRK1A afiinsuse määramine;
7. CK2 α^{1-335} ja DYRK1A inhibiitorite afiinsuste võrdlus.

2.3. Materjal ja meetodika

2.3.1. Reagendid

Puhvri komponendid: HEPES (ChemCruz), NaCl (Naxo OÜ), Tween-20 (Sigma Corp.), DTT (Promega Corp.), DMSO (Sigma Corp.).

Emalahused vedelikkromatograafia ja masspektromeetria jaoks: ACN (Honeywell Corp.), TFA (Fisher Scientific Inc.).

Kinaasid: CK2 α^{1-335} (University of Cologne, Saksamaa) ja DYRK1A (The Arctic University of Norway, Tromsø, Norra) saadi kingitusena.

Kõik vesilahused olid tehtud MQ vees (eritakistus 18,2 M Ω ·cm, summaarne süsiniku sisaldus < 1 mg/kg, aparaat Millipore Simplicity 185, Millipore GmbH, Austria).

CX-4945 osteti firmast Synkinase (Shanghai). Ülejäänud inhibiitorid olid samas laboris varemalt sünteesitud.

Tabel 1. Töös kasutatud inhibiitorid			
Kood	Struktuur	$\varepsilon (\lambda_{\max})$ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^a	$\lambda_{\max}$ (nm)
TBBi	TBBi	10 000	272
ARC-1504	TBBi-(CH ₂) ₇ -CO-DAsp-LAsp ₅ -LLys(PromoFluor-647)	250 000	650
ARC-1502	TBBi-(CH ₂) ₇ -CO-DAsp-LAsp ₅ -LLys	10 000	272
ARC-1510	TBBi-(CH ₂) ₉ -CO-LAsp ₃	10 000	272
CX-4945	CX-4945	9 000	360
ARC-1513o	CX-O-(CH ₂) ₈ -CO-LAsp ₆ -LLys(PromoFluor-555)	150 000	557
ARC-3140	TIBI-(CH ₂) ₇ CO-DAsp-LAsp ₅ -LLys	10 300	295
ARC-794	TIBI-(CH ₂) ₇ CO-DAsp-LAsp ₅ -LLys(PromoFluor-555)	150 000	557
ATB	ATB	23 000	320
ATB-Suc	ATB-Suc	23 000	320
ARC-773	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda	23 000	320
ARC-769	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda-Nasp	23 000	320
ARC-784	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda-Nasp ₃ -Nlys(Alexa Fluor 647)	270 000	650
ARC-772	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda-Nasp ₃	23 000	320
ARC-779	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda-DAsp ₃	23 000	320
ARC-780	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda-LAsp ₃	23 000	320
ARC-786	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda-Nasp ₅ -Nlys	23 000	320
^a fluorestsentsligandide neeldumiskoeftsendid on võetud toote spetsifikatsioonidest, teised neeldumiskoeftsendid pärinevad järgnevatest allikatest : Vahter <i>et al.</i> 2017, Enkvist <i>et al.</i> 2012, Rahnel <i>et al.</i> 2017			

ATB ja ATB-Suc puhastati täiendavalt vedelikukromatograafiaga gradientse elueerimise režiimis, kasutades eluente A (0.1 % TFA/H₂O) ja B (0.1 % TFA/ACN). Gradient: 20-35 % B/4 min, 35-90 % B/6 min, 90 % B/3 min. Kogutud fraktsioonid eemaldati solvendist tsentrifugaalvaakumkontsentraatoriga üleöö.

Kontrolliti järgmiste inhibiitorite puhtust: ARC-1504, CX-4945, ARC-1502, ARC-3140 - gradient 30-90 % B/20 min; TBBi, ARC-1424N - gradient 20-80 % B/20 min; ATB, ATB-Suc – gradient 20-80 % B/20 min. Eluendi liikumiskiirus oli 1 ml/min. Kolonniahju

temperatuur oli 40 °C. Ainet pidi puhtaks, kui selle sisaldus lahuses oli vähemalt 95 %. Teiste inhibiitorite puhtus juba oli kontrollitud.

Inhibiitorite täpset kontsentratsiooni määrati UV/Vis spektromeetriga. Arvutamiseks kasutati Lamberti-Beeri seadust:

$$A = \varepsilon * C * l \quad (1)$$

kus A – lahuse absorptsioon, ε – aine neeldumiskoeffitsient, l – optilise tee pikkus (cm), C – lahuse kontsentratsioon. Optilise tee pikkus oli üldjuhul 0,1 cm. TBBi juhul kasutati küveti läbimõõduga 1 cm, lahuse ruumala oli 500 µl. Võrdluslahuseks oli MQ vesi. Inhibiitorite neeldumiskoeffitsiendid ja nendele vastavad neeldumismaksimumid on esitatud tabelis (Tabel 1).

2.3.2. Aparatuur

UV/Vis-spektroskoopia: spektromeeter NanoDrop 2000c (Thermo Scientific)

Vedelikkromatograafia-massispektromeetria: pumbad, klonniahi, injektor, detektor, kontrollerr Prominence (Shimadzu Corp.), kolonn (00G-4435-E0, Gemini 54 C18 110A, 250x4,6mm 5 micron, 342250-26); pumbad, degaseerija, dioddrividetektor Prominence (Shimadzu Corp.), kolonn (Luna C18 250x4,6mm); massdetektor LSMS-2020 (Shimadzu Corp.), programm Postrun 5,82 SP1

Aurustamine vaakumis: tsentrifugaalvaakumkontsentraator RVC 2-25 (Martin Christ GmbH), külmkuivati ALPHA 2-4 LD PLUS (-85 °C, Martin Christ GmbH), vaakumpump Chemistry hybrid pump RC 6 (Vacuubrand GmbH).

Fluorestsentsanisatroopia analüüs: mikroplaadilugeja Pherastar (BMG Labtech), termostaat THERMOstar (BMG Labtech); optiliste moodulitega: FP ex: 540(20) nm, em: 590(20) ja FP ex: 590(50) nm, em: 675(50) nm.

Analüütilised kaalud: XP205 (Mettler Toledo Corp.), tentrifuugid 3-16PK (Sigma Laboratory Centrifuges) ja CM-50 (ELMI Ltd.)

Digitaalpipetid: Eppendorf Research ja Eppendorf Research Plus (Eppendorf Corp.)

Andmete analüüs: programmid GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc.) ja Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp.)

Laboriplastik: 384 süvendiga vähesiduva pinnaga polüstüreenmikroplaadid (Corning Inc.), vähesiduva pinnaga eppendorf-tuubid 0,5 µl (Eppendorf Corp.), pipetiotsikud: vähesiduva pinnaga otsikud (10 ja 1000 µl – Axygen, 200 µl – Repel Polymer Technology, StarLab GmbH)

2.4. Protokollid

2.4.1. Fluorestsentsligandi tiitrimine kinaasiga

2.4.1.1. CK2 α^{1-335} ja DYRK1A aktiivse vormi kontsentratsiooni määramine

Valmistati 4-komponendiga puhver (P4) koostisega: HEPES (50 mM, pH = 7,5), NaCl (150 mM), Tween-20 (0,005 %), DTT (5 mM), MQ vees. Määrati fluorestsentssondi ARC-1504 (CK2 jaoks) ja ARC-784 (DYRK1A jaoks) kontsentratsiooni UV/Vis spektroskoopiaga. Fluorestsentssondi lahjendati kontsentratsioonini 100 nM (CK2 jaoks) ja 125 nM (DYRK1A jaoks), kogus 55 μ l. Valmistati kinaasi lahust, $V = 35$ μ l, $C = 375$ nM. Nummerdati pesad mikroplaadil A-N (kokku 14 pesa). Lisati 16 μ l puhvrit pesadesse B-M, 20 μ l pesasse N. Lisati A ja B pesasse 16 μ l kinaasi lahust. Tehti kahekordne lahjendusega lahjendusreeja pesades B-L: B pesast võeti 16 μ l ja kanti üle C pesasse, C pesast sama kogus kanti üle D pesasse jne. Saadud lahjendusreale lisati 4 μ l fluorestsentssondi lahust pesadesse A-M. Lõplik ruumala igas pesas oli 20 μ l (Tabel 2).

Tabel 2. Sidumiskatse pipeteerimisskeem				
Pesa tähis	V (puhver), μ l	V (1,25x kinaasi lahust), μ l	V (5x fluorestsentssondi lahust), μ l	$\sum V$
A	0	16	4	20
B-L (11 tk.)	16	16 $\rightarrow$ (ülekanne järgmistesse pesadesse)	4	20
M	16	0	4	20
N	20	0	0	20

Mikroplaadile kantud lahuseid inkubeeriti termostaadis 30 °C juures 15 minutit ja analüüsiti mikroplaadilugejaga. Kalibreerimispunktiks oli kõige kangema vaba fluorestsentssondi sisaldusega lahust (M pesa) ning mõõdetud fluorestsentsi intensiivsuste väärtustest lahutati puhverlahusest mõõdetud signaal (pesa N). Tulemustest koostati graafik: anisotroopiamuut vs kinaasi kontsentratsioon (Graafik 1).

Tulemused lähendati mittelineaarse regressiooniga vastavalt võrrandile:

$$Y = (1 - M) * A_f + M * A_b \quad (2),$$

kus Y - mõõdetud anisotroopia. Y näitab summaarset anisotroopiat, mis sõltub üksikute komponentide anisotroopiate summast: A_f - vaba ligandi anisotroopia, A_b - täielikult seotud ligandi anisotroopia.

$$M = \frac{Q * Z}{1 + Z * (Q - 1)} \quad (3)$$

$$Q = \frac{I_{kompleks}}{I_{proov}} \quad (4)$$

Q - seotud ja vaba ARC-T kvantsaagiste jagatis. Kvantsaagist iseloomustavad vaba ligandi (I_{proov}) ja seotud ligandi ($I_{kompleks}$) signaali intensiivsused. Q (ARC-1504) = 1, Q (ARC-784) = 0,8.

$$Z = \frac{L_t + K_D + R_t * \sqrt{(L_t + K_D + R_t) - 4 * L_t * R_t}}{2 * L_t} \quad (5)$$

Z näitab kompleksi kontsentratsiooni. L_t - ligandi lõppkontsentratsioon, L_t (ARC-1504) = 20 nM, L_t (ARC-784) = 25 nM. K_D - kompleksi dissotsiatsioonikonstant, K_D (CK2-ARC-1504) = 0,4 nM, K_D (DYRK1A-ARC-784) = 1,8 nM. R_t - ensüümi aktiivse vormi kontsentratsioon, mis väljendub aktiivse kinaasi osakaaluna k summaarsest kinaasivalgu kontsentratsioonist X :

$$k = \frac{R_t}{X} \quad (6)$$

2.4.1.2. DYRK1A fluorestsentssondide afiinsuste leidmine

Eksperiment teostati sama protokoll järgi, mis on kirjeldatud peatükis 2.4.1.1, fluorestsentsligandi (ARC-784, ARC-794 ja ARC-1513o) kontsentratsioonidel 1 nM. Lahuste fluorestsentsanisotroopia väärtused mõõdeti peale lahuste inkubeerimist 20 ja 50 min 30 °C juures. Tulemused lähendati võrrandile 2, millest leiti K_D väärtused (Graafik 2).

2.4.2. Fluorestsentsligandi ja märgistamata ligandi konkureeriv sidumine kinaasiga

Konkureeriva sidumise katsed teostati järgnevatel kontsentratsioonidel: ARC-1504 (0,5 nM) ja CK2 α (1,5 nM aktiivne vorm) või ARC-784 (2 nM) ja DYRK1A (3 nM aktiivne vorm). Inhibiitorite lähtelahuste kontsentratsioon oli 1,25 μ M, V = 30 μ l. Teiste lähtelahuste kontsentratsioonid on esitatud järgnevalt:

CK2. Fluorestsentssond ARC-1504 lahjendati kontsentratsioonini 5 nM, $V = 15 \mu\text{l}$. Valmistati kinaasi ja fluorestsentssondi kompleksi lahus: $C(\text{CK2}) = 7,5 \text{ nM}$ ja $C(\text{ARC-1504}) = 2,5 \text{ nM}$, $V = 55 \mu\text{l}$.

DYRK1A. Fluorestsentssond ARC-784 lahjendati kontsentratsioonini 20 nM, $V = 15 \mu\text{l}$. Valmistati kinaasi ja fluorestsentssondi kompleksi lahus: $C(\text{DYRK1A}) = 15 \text{ nM}$ ja $C(\text{ARC-784}) = 10 \text{ nM}$, $V = 55 \mu\text{l}$.

Lahused kanti mikroplaadile Tabelis 3 toodud skeemi kohaselt.

Tabel 3. Väljatõrjumiskatse pipeteerimisskeem					
Pesa tähis	V (puhver), μl	V (1,25x inhibiitori lahus), μl	V (5x fluorestsentssondi ja kinaasi kompleksi lahus), μl	V (10x fluorestsentssondi lahus), μl	ΣV
A	0	16	4	0	20
B-K (10 tk.)	16	8 → (ülekanne järgmistesse pesadesse)	4	0	20
L	16	0	4	0	20
M	18	0	0	2	20
N	20	0	0	0	20

Fluorestsentsanisotroopia mõõdeti peale lahuste inkubeerimist analoogselt protokollile punktis 2.4.1.1. Saadud andmetest koostati graafik, mille x-teljel on kümnendlogaritm inhibiitori kontsentratsioonist $\log(C/M)$, y-teljel mõõdetud anisotroopia väärtus. Andmed lähendati võrrandile (2), kus M saab leida valemist (3), Q saab leida valemist (4) ja Z saab leida kuupvõrrandi valemist:

$$Z = \frac{j}{3 * K_D 1 + j} \quad (7)$$

$$j = 2 * \sqrt{d^2 - 3 * e} * \cos \frac{w}{3} - 3 \quad (8)$$

$$w = \cos^{-1} \frac{-2d^3 + 9 * d * e - 27 * f}{2 * \sqrt{(d^2 - 3e)^3}} \quad (9)$$

$$f = -K_D 1 * K_d 2 * R_t \quad (10)$$

$$d = K_D1 + K_d2 + 10^x + L_t - R_t \quad (11)$$

$$e = (10^x - R_t) * K_D1 + (L_t - R_t) * K_d2 + K_D1 * K_d2 \quad (12)$$

Põhierinevuseks võrrandist (2) on see, et Z sõltub mitte ühest, vaid kahest tasakaalukonstandist: K_{D1} - fluorestsentsligandi dissotsiatsioonikonstant ja K_{d2} - konkureeriva ligandi dissotsiatsioonikonstant. Analüüsi parameetrid: $L_t(\text{ARC-1504}) = 0,5 \text{ nM}$, $L_t(\text{ARC-784}) = 2 \text{ nM}$, $R_t(\text{CK2}) = 1,5 \text{ nM}$, $R_t(\text{DYRK1A}) = 3 \text{ nM}$, $Q(\text{ARC-1504}) = 1$, $Q(\text{ARC-784}) = 0,8$, $K_{D1}(\text{CK2-ARC-1504}) = 0,4 \text{ nM}$, $K_{D1}(\text{DYRK1A-ARC-784}) = 1,8 \text{ nM}$. Korduskatsed olid tehtud eripäevadel.

2.5. Tulemused ja arutelu

Selles töös iseloomustati kuueteistkümne CK2 inhibiitori afiinsust DYRK1A suhtes ja anioonse fragmendi mõju inhibiitori afiinsusele ning selektiivsusele mõlema kinaasi suhtes. Kirjandusest on teada, et negatiivse peptiidahela pikendamine suurendab inhibiitori afiinsust CK2 suhtes ning afiinsus kasvab umbes 3 korda iga negatiivse laengu lisandumisel (Viht *et al.*, 2015). Oletatavasti selle põhjuseks on negatiivselt laetud aminohapped CK2 konsensusjärjestuses (toodud teoreetilises osas).

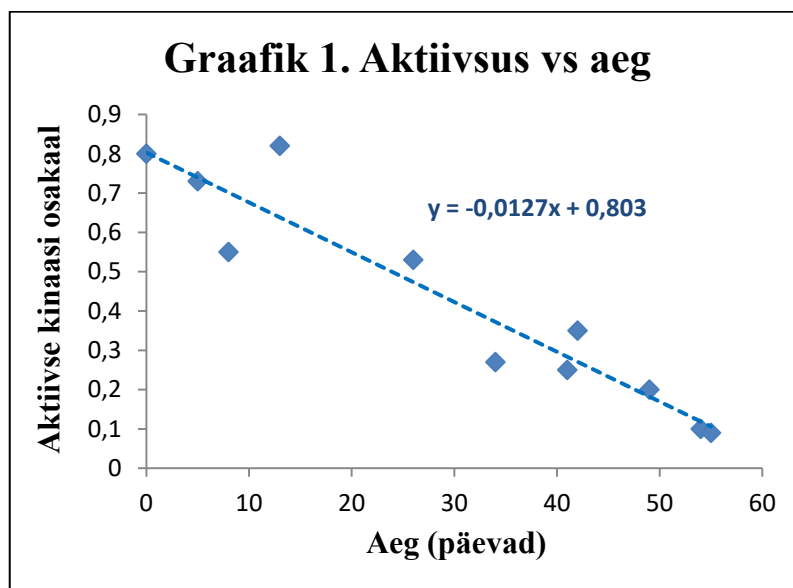
Hüpotees: Negatiivse laenguga peptiidi lisamine ei suurenda oluliselt inhibiitori seondumisvõimet kinaasile DYRK1A, vaid muudab inhibiitorid selektiivsemaks CK2 suhtes.

Tulemused on esitatud vastavalt eksperimendi etappide järjestusele. Kõik kasutatud inhibiitorid olid kromatograafiliselt vähemalt 95 % puhtad. (LISA 1).

2.5.1. DYRK1A aktiivse vormi stabiilsus

Kuna kinaasi aktiivsus lahuses seismise käigus väheneb, näiteks denaturatsiooni ja oksüdatsiooni mõjul, määrati aktiivse kinaasi osakaal (k) enne iga konkurentse sidumise katse läbiviimist. Kinaasi alglahuseid säilitati $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures külmutatud kujul ja sulatati ära eksperimendi läbiviimiseks (päev 1), edasi hoiti sama alglahust jääkastis kogu eksperimendiperioodi jooksul (55 päeva). DYRK1A korral saadud k väärtused katse läbiviimise päevadel on toodud tabelis 4 ja graafikul 1. CK2-ga oli tehtud vähe katseid, seetõttu pole aktiivsuse kadu sedavõrd jälgitav ja neid andmeid töös ei esitata. Vastavad sidumiskõverad on esitatud lisa (LISA 2).

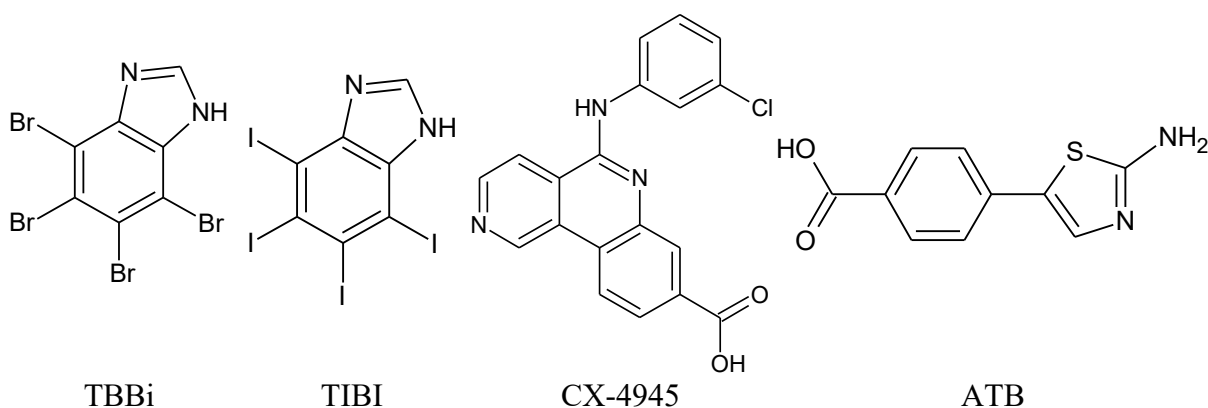
Tabel 4. DYRK1A aktiivsuse muutus ajas	
Aeg (päevad)	Aktiivse kinaasi osakaal
0	0,80
5	0,73
8	0,55
13	0,82
26	0,53
34	0,27
41	0,25
42	0,35
49	0,20
54	0,10
55	0,09



Punktide hajumine on tõenäoliselt põhjustatud pipeteeritud ruumala (1 µl) määramatusest. Üldine tendents jääb selgeks. DYRK1A aktiivsus väheneb ajas ühtlase kiirusega.

2.5.2. DYRK1A jaoks sobiva fluorestsentssondi valik

Fluorestsentsligandid valiti eelnevalt samas laboris sünteesitud CK2-le seonduvate fluorestsentsligandide hulgast, võttes arvesse publitseeritud selektiivsuspaneele, kus on toodud andmed nende fluorestsentsligandide märgistamata prekursorite võimest inhibeerida DYRK-kinaase (Enkvist et al. 2012, Vahter et al. 2017, Rahnel et al. 2017). Uuritud CK2 inhibiitorid saab jagada nelja rühma vastavalt heterotsükililisele fragmendile, mis läheb ATP taskusse: TBBi, CX-4945, TIBI ja ATB (joonis 8). DYRK1A jaoks sobiva fluorestsentssondi valimiseks olid võetud iga rühma fluorestsentsmärgisega esindajad: ARC-1504 (TBBi), ARC-1513o (CX-4945), ARC-794 (TIBI) ja ARC-784 (ATB). Struktuurid on esitatud lisas (LISA 4).

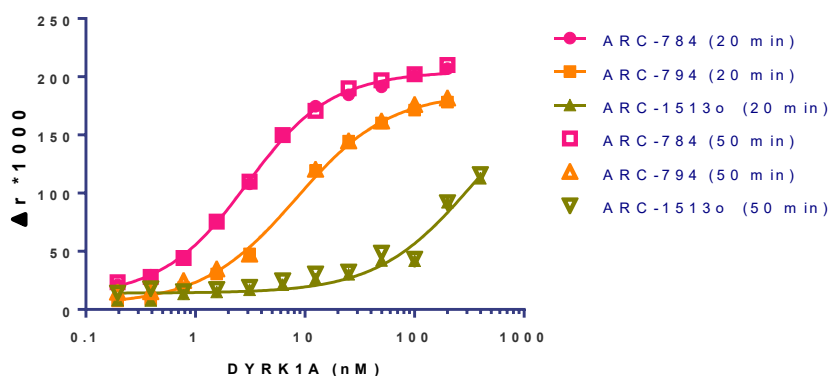


Joonis 8. CK2 inhibiitorite aromaatsed struktuurid, mis seonduvad ATP taskusse.

Selektiivsuspaneelist on teada, et ARC-1504 fluorestsentsmärgistamata prekursor ARC-1502 on madalama afiinsusega DYRK kinaaside suhtes, kui teiste uurimisaluste inhibiitori klasside esindajad. Seetõttu jäeti fluorestsentsligandi valikust kõrvale ARC-1504, mida kasutati üksnes CK2 ligandide uurimiseks. Selektiivsuspaneeli andmete põhjal võis ennustada, et valitud seeriast kõige afiinsem inhibiitor DYRK suhtes on ARC-772, mille värviga märgistatud analoog on ARC-784. Korduskatses oli võetud lisarida, milles $C_{lõpp}(ARC-784) = 25 \text{ nM}$ (LISA 3). Antud töös leitud K_D väärtused on toodud tabelis 5 ja graafikul 2.

Tabel 5. DYRK1A fluorestsentssondide afiinsuste võrdlemine				
Fluorestsentssondi kood	Kinaasi ATP-taskusse seonduv fragment	Fluorestsentsmärgis	C (nM)	K_D (nM)
ARC-1504	TBBi	PromoFluor-647		
ARC-784	ATB	Alexa Fluor 647		
ARC-794	TIBI	PromoFluor-555	1	1,5 (0,3)
ARC-1513o	CX-4945	PromoFluor-555	1	13,55 (0,3)
			1	351 (97)

ARC-784 osutus kõige väiksema dissotsiatsioonikonstandiga ehk kõige suurema afiinsusega fluorestsentssondiks. ARC-794 on nõrgema, kuid küllaltki tugeva afiinsusega fluorestsentssond. ARC-1513o on liiga madala afiinsusega fluorestsentssond. Edasiseks tööks valiti ARC-784 kui kõige afiinsem fluorestsentssond uuritud seerias.



Graafik 2. Fluorestsentssondide ARC-784, ARC-794 ja ARC-1513o tiitrimine kinaasiga DYRK1A. X-teljel on toodud aktiivse DYRK1A.

Graafikus 2 on näha, et 20 ja 50 minuti inkubeerimine annab praktiliselt kokkulangevad tulemused, mis näitab, et kompleksimoodustumine oli jõudnud tasakaalu juba esimesel mõõtmisel.

2.5.3. CK2 α^{1-335} ja DYRK1A inhibiitorite afiinsuste võrdlus

Uurimiseks valiti CK2 inhibiitorid, mille kohta on publitseeritud K_d väärtused, mis olid sünteesitud samas laboris ja mis erinevad teineteisest ATP-taskusse seonduva struktuuriosa ja negatiivse laenguga peptiidi või peptoidi pikkuse poolest. Leitud K_d väärtused on esitatud tabelis 6, sidumiskõverad on esitatud lisas (LISA 5).

Tabel 6. CK2 α^{1-335} ja DYRK1A inhibiitorite afiinsuste võrdlus				
Kood	Struktuur	K_d (SD), nM		
		DYRK1A	CK2 α^{1-335}	Jagatis
TBBi	TBBi	280 (106)	640 (120) ^a	0,44
ARC-1502	TBBi-(CH ₂) ₇ -CO-DAsp-LAsp ₅ -LLys	440 (180)	0,52 (0,06) ^a	230
ARC-1510	TBBi-(CH ₂) ₉ -CO-LAsp ₃	200 (60)	1,6 (0,1) ^b	120
CX-4945	CX-4945	9 (2)	1,2 (1,0)	8
ARC-1513o	CX-O-(CH ₂) ₈ -CO-LAsp ₆ -LLys(PromoFluor-555)	350 (100)	0,016 ^c	22000
ARC-3140	TIBI-(CH ₂) ₇ CO-DAsp-LAsp ₅ -LLys	21 (4)	0,5 (0,4)	42
ARC-794	TIBI-(CH ₂) ₇ CO-DAsp-LAsp ₅ -LLys(PromoFluor-555)	14,0 (0,3)	0,038 (0,003) ^b	360
ATB	ATB	1200 (200)	48 (7) ^d	24
ATB-Suc	ATB-Suc	445 (6)	11 (2) ^d	40
ARC-773	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda	180 (60)	8 (2) ^d	22
ARC-769	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda-Nasp	114 (6)	4 (1) ^d	29
ARC-772	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda-Nasp ₃	58 (2)	0,03 (0,01) ^b	2000
ARC-779	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda-DAsp ₃	34 (4)	0,047 (0,006) ^b	720
ARC-780	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda-LAsp ₃	26 (4)	0,04 (0,02) ^b	650
ARC-786	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda-Nasp ₅ -Nlys	36 (2)	0,015 (0,005) ^b	2400
ARC-784	ATB-Suc-N(CH ₂ COOH)-Dda-Nasp ₃ -Nlys(Alexa Fluor 647)	1,5 (0,3)	0,021 (0,004) ^b	73
^a Enkvist <i>et al.</i> 2012 ^b samas laboris tehtud mõõtmised teiste inimeste poolt ^c Vahter <i>et al.</i> 2017 ^d Rahnel <i>et al.</i> 2017				

Inhibiitorite afiinsust iseloomustab K_d väärtus. Mida väiksem on K_d , seda afiinsem on inhibiitor kinaasi suhtes. Üleval toodud inhibiitorid erinevad teineteisest heterotsükli poolest, moodustades neli rühma: TBBi, CX-4945, TIBI ja ATB. Inhibiitorid ühes rühmas erinevad teineteisest anioonse fragmendi suuruse poolest ehk asparagiinhappejääkide või vastavate peptoidanalogoide (Nasp) arvu poolest.

Anioonse fragmendi mõju. TBBi seerias võrreldati ARC-1502 ja ARC-1510. ARC-1510, mis sisaldab kolm anioonset aminohapet, on kaks korda afiinsem DYRK1A suhtes võrreldes ARC-1502, mille koostises on viis anioonset fragmenti. Järelikult, TBBi seerias inhibiitorite kõrvalahela negatiivse laengu suurendamine muudab inhibiitorite afiinsust madalamaks

DYRK1A suhtes. Sama tendents säilib CX-4945 seerias, milles CX-4945 on 40 korda afiinsem kui ARC-1513o, mis sisaldab 6 anioonset fragmenti. ATB seerias võrreldati ARC-769 (1 Nasp), ARC-772 (3 Nasp) ja ARC-786 (5 Nasp). Mida pikem anioonne peptiidahel ATB seerias, seda afiinsemad on inhibiitorid DYRK1A suhtes, aga see mõju on väike (2-3 korda). CK2 α korral anioonsete fragmentide arvu suurendamine teeb inhibiitoreid afiinsemaks kõigis seeriates. Lisaks, CK2 α on tundlikum negatiivse laengu suhtes. CK2 α K_d muutub tugevamini ARC 769-786 reas, vastavad inhibiitorid on sada või tuhat korda afiinsemad võrreldes DYRK1A-ga. Saab väita, et negatiivse peptiidahela pikendamine teeb inhibiitoreid selektiivsemaks CK2 α suhtes.

Heterotsüklilise struktuuri mõju. Samuti aromaadne struktuur mõjutab inhibiitorite afiinsust ja selektiivsust. TBBi on 7 korda afiinsem DYRK1A-le kui CK2 α -le. Saab väita, et heterotsükel TBBi muudab inhibiitori selektiivsemaks DYRK1A suhtes. Võrreldes ARC-3140 ja ARC-1502, mis erinevad üksteisest ainult heterotsüklilises struktuuris paikneva halogeeni poolest, saab öelda, et TIBI tõstab inhibiitorite afiinsust DYRK1A suhtes.

Isomerisatsiooni mõju. Tabelis on toodud ka kaks inhibiitorit, mis on teineteise peegelisomeerid. ARC-779 sisaldab kolm asparagiinhappe jääki D-vormis, ARC-780 sisaldab samapalju jääke L-vormis. Enantiomeeride K_d väärtused on lähedased nii CK2 α -l, kui ka DYRK1A-l. Järelikult, stereisomeeria ei avalda suurt mõju inhibiitorite afiinsusele.

DYRK1A suhtes kõige afiinsem on fluorestsentssond ARC-784, kõige selektiivsem on TBBi. Teised CK2 α inhibiitorid ei ole väga afiinsed ega selektiivsed. Need saavad DYRK1A inhibeerida, kui kasutada inhibiitorit suuremas doosis. Antud seerias kõige suurema selektiivsusega ligand on ARC-1513o, mis on 22000 korda afiinsem CK2 α suhtes. Anioonsete fragmentide arvu kasv teeb TBBi ja CX-4945 rühmade inhibiitoreid selektiivsemaks CK2 α -le. Anioonse fragmendi kasv ATB rühmas tõstab inhibiitorite afiinsust nii DYRK1A-le, kui ka CK2 α -le, kuigi mõju CK2 α -le on tunduvalt suurem.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli iseloomustada Tartu Ülikooli Keemia Instituudi Bioorgaanilise keemia Õppetoolis välja töötatud CK2 inhibiitorite afiinsust proteiinkinaasile DYRK1A. Uuriti, kuidas erineva pikkusega anioonsete fragmentide ühendamine inhibiitori molekulidega mõjutab nende seondumisvõimet kinaasidele ning määrati struktuursed erisused, mis mõjutasid inhibiitorite CK2 ja DYRK1A vahelist selektiivsust. Töö hüpoteesiks oli, et negatiivse laenguga peptiidi lisamine inhibiitori struktuuri omab suuremat mõju nende afiinsusele CK2 suhtes ja ei suurenda inhibiitorite afiinsust DYRK1A suhtes.

Töös avastati kõrgafiinne fluorestsentssond ARC-784 DYRK1A uurimiseks. Antud sondi saab kasutada aktiivse DYRK1A kontsentratsiooni määramiseks ning väljatõrjumiskatse formaadis uute inhibiitorite avastamiseks. Lisaks uuriti nelja inhibiitorite seeriat, mis erinesid proteiinkinaasi ATP-taskusse suunatud struktuurilemendi poolest (TBBi, TIBI, CX, ATB). Eksperimendi tulemused näitasid, et negatiivse laenguga peptiidahel suurendab kõigi uuritud inhibiitorite korral seondumise selektiivsust CK2 kasuks. Negatiivse laengu kasv suurendas kõigi inhibiitorite sidumise võimet CK2-le, kuid mõju DYRK1A-le oli uuritud inhibiitorite seeriate korral erinev. Näiteks kui CX, TBBi või TIBI inhibiitorite seeriates alandasid anioonsed fragmendid afiinsust DYRK1A suhtes, ATB seerias aga afiinsus mõnevõrra kasvas.

Uuritud inhibiitorite hulgast kõige CK2-selektiivseks osatus ARC-1513o, mis oli 22000 korda afiinsem CK2 α -le. DYRK1A suhtes kõige afiinsem oli fluorestsentssond ARC-784, kõige selektiivsem aga modifitseerimata TBBi.

Saadud tulemusi saab kasutada uute inhibiitorite disainil, mis oleks afiinsed ja selektiivsed kas DYRK1A või CK2 suhtes.

RESÜMEE / SUMMARY

The impact of anion fragment on the affinity of protein kinase inhibitors CK2 and DYRK1A

Artjom Issajev

Summary

The main goal of current BA thesis is to characterize affinity of CK2 inhibitors of protein kinase DYRK1A, which was elaborated in the Institute of Bioorganic Chemistry, at University of Tartu. It was studied how does the unification of anion fragments of different length with the molecules of inhibitor influence their binding ability with kinases. Next, structural specifics that influenced mutual selectivity of inhibitors CK2 and DYRK1A was defined. The major hypothesis of the BA thesis is the following: the addition of negatively charged peptides to the structure of inhibitors has a greater impact on their affinity towards CK2 and does not increase the affinity of inhibitors in relation to DYRK1A.

During this study fluorescence probe ARC-784 with high affinity was discovered to investigate DYRK1A. Above-mentioned probe can be used to define active concentration of DYRK1A and, in the format of displacement test, to discover new inhibitors. Additionally, we studied the series of four inhibitors (TBBi, TIBI, CX, ATB), which differed from structural elements that are targeted to PK ATP-pocket. The results of experiment showed that a chain of negatively charged peptides increases binding selectivity of all studied inhibitors in favor of CK2. The growth of negative charge increased binding ability of all inhibitors in relation to CK2. However, the impact on DYRK1A was different with respect to all series of investigated inhibitors. For example, anion fragments decreased the affinity of DYRK1A in the series of CX, TBBi or TIBI inhibitors, whereas the affinity somewhat increased in ATB series.

Among all studied inhibitors the most CK2-selective occurred to be ARC-1513o, which had 22000 times more affinity towards CK2 α . In relation to DYRK1A the highest affinity exhibited the fluorescence probe ARC-784, the most selective was, however, unmodified TBBi.

The acquired outcomes of the study can be further applied to design new inhibitors that would be affine and selective in relation to DYRK1A or CK2.

- Alexeeva, M. (2013). Biophysical characterization of the DYRK family. Master's Thesis in Chemistry. *The Arctic University of Norway*.
- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G. and Lo Muzio, L. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*, 40: 271–280.
- Becker, W. (2012). Emerging role of DYRK family protein kinases as regulators of protein stability in cell cycle control. *Cell Cycle* 11:18, 3389–3394.
- Becker, W. and Sippl, W. (2011). Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS Journal*, 278: 246–256.
- Fabbro, D., Cowan-Jacob, S.W. and Moebitz, H. (2015). Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. *British Journal of Pharmacology*, 172: 2675–2700.
- Gusev, N. (2000). Protein kinases: Struktüre, classification, properties and biological role. *Соросовский образовательный журнал*, 6:12
- Litchfield, D. W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem journal*, 369: 1-15.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *SCIENCE*, 298: 1912-1934.
- Matte, A., Tari, L.W. and TJ Delbaere, L. (1998). How do kinases transfer phosphoryl groups? *STRUCTURE*, 6: 413–419.
- Meggio, F. and Pinna, L.A. (2018). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB Journal*, 13:3, 349-368.
- Park, J., Song W.-J. and Chung K.C. (2009). Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66: 3235–3240.
- Roskoski, R. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research* 100, 1–23.
- Schwartz, P.A. and Murray, B.W. (2011). Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorganic Chemistry*, 39: 192–210.
- Soppa, U. and Becker, W. (2015). DYRK protein kinases Quick guide. *Current Biology*, 25: R483–R489.
- Trembleya, J. H., Wanga, G., Ungerc, G., Slatond, J. K. Ahmeda, K. (2009). CK2: A key player in cancer biology. *Cell Mol Life Sci.*, 66: 1858–1867.

- Rahnel, H., Viht, K., Lavogina, D., Mazina, O., Haljasord, T. Enkvist, E. and Uri, A. (2017). A Selective Biligand Inhibitor of CK2 Increases Caspase-3 Activity in Cancer Cells and Inhibits Platelet Aggregation. *ChemMedChem*, 12: 1–15.
- Vahter, J., Viht, K., Uri, A. and Enkvist, E. (2017). Oligo-aspartic acid conjugates with benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid scaffold as picomolar inhibitors of CK2. *Bioorg. Med. Chem.* 25 (7) 2277–2284.
- Viht, K., Saaver, S., Vahter, J., ..., Uri, A. (2015). Acetoxymethyl Ester of Tetrabromobenzimidazole–Peptoid Conjugate for Inhibition of Protein Kinase CK2 in Living Cells. *Bioconjugate Chem.*, 26: 2324–2335.
- Enkvist, E., Viht, K., Bischoff, N., ... Uri, A. (2012). A subnanomolar fluorescent probe for protein kinase CK2 interaction studies. *Org. Biomol. Chem.*, 10: 8645–8653.
- Singh, R. and Lauth, M. (2017). Emerging Roles of DYRK Kinases in Embryogenesis and Hedgehog Pathway Control. *J. Dev. Biol.* 5, 13, 1-16 (doi:10.3390/jdb5040013).

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Roskoski, R. (2018.04.20 seisuga). *FDA-approved protein kinase inhibitors*. Retrieved from
From the Blue Ridge Institute for Medical Research in Horse Shoe:
<http://www.brimr.org/PKI/PKIs.htm>

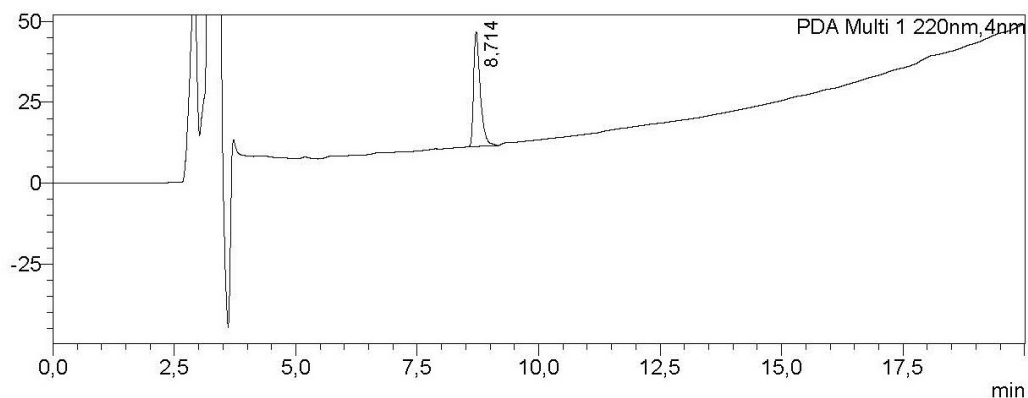
LISAD

LISA 1. Inhibiitorite HPLC kromatogrammid (6 lk)

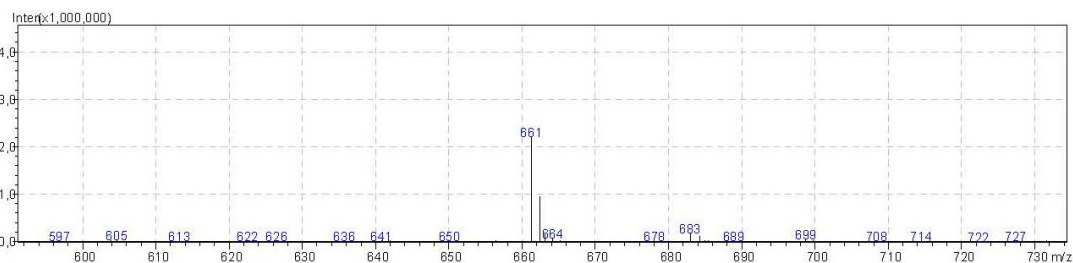
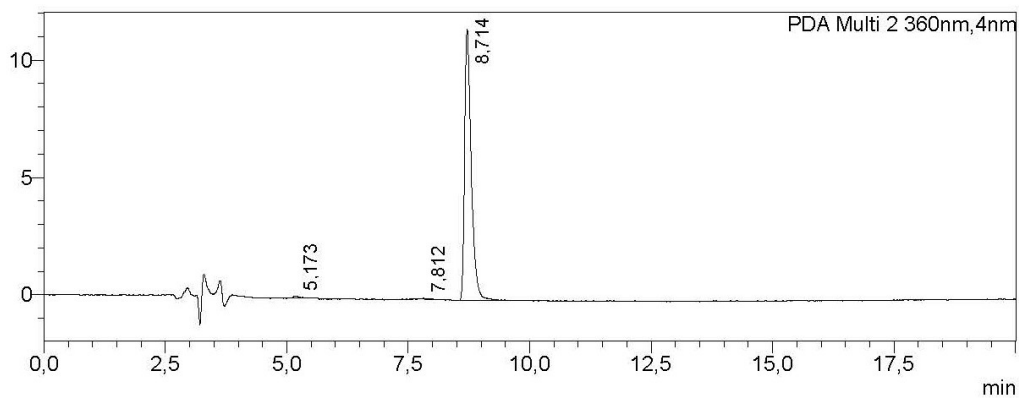
Sample Name : CX-4945 purity
 Sample ID : 30-90/20
 Data Filename : Endel_Artjom-2.lcd
 Method Filename : hedi.lcm
 Batch Filename :
 Vial # : -1
 Injection Volume : 2 uL
 Date Acquired : 2/1/2018 11:54:47 AM
 Date Processed : 2/1/2018 2:49:42 PM

Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

mAU



mAU

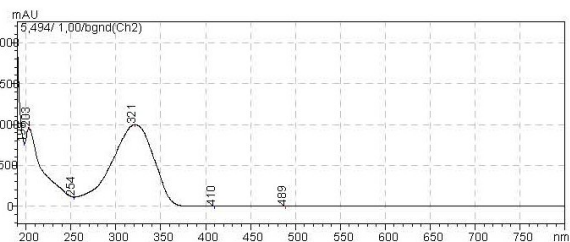


PDA Ch1 220nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	8,714	333209	100,000
Total		333209	100,000

PDA Ch2 360nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	5,173	601	0,549
2	7,812	420	0,384
3	8,714	108497	99,067
Total		109519	100,000

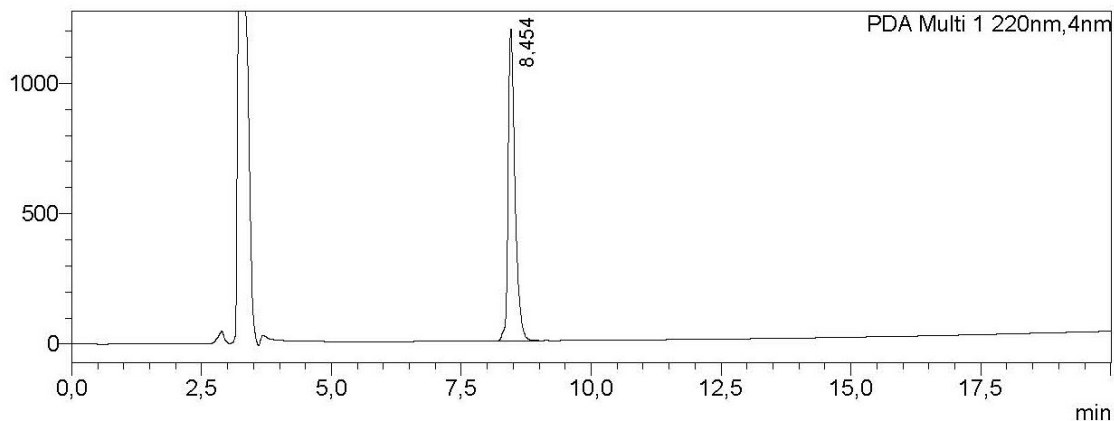


LISA 1 Ik 2/6

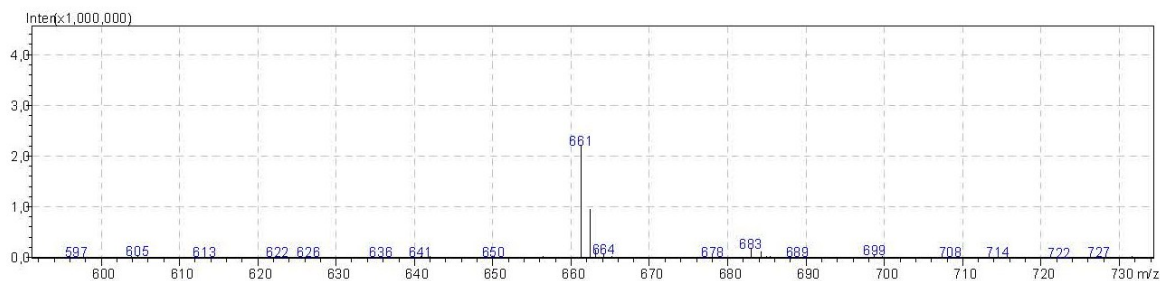
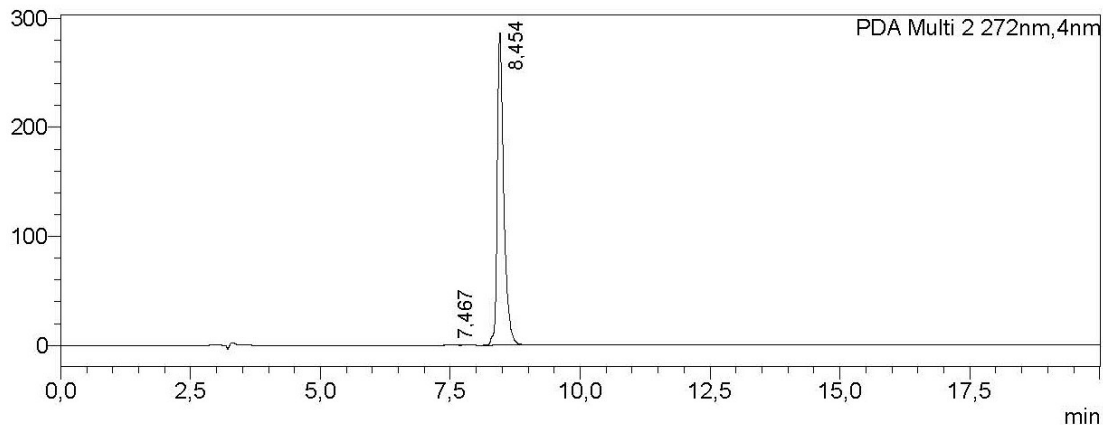
Sample Name : ARC-1502 purity
 Sample ID : 30-90/20
 Data Filename : Endel_Artjom-3.lcd
 Method Filename : hedi.lcm
 Batch Filename :
 Vial # : -1
 Injection Volume : 2 uL
 Date Acquired : 2/1/2018 12:21:02 PM
 Date Processed : 2/1/2018 3:01:49 PM

Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

mAU



mAU

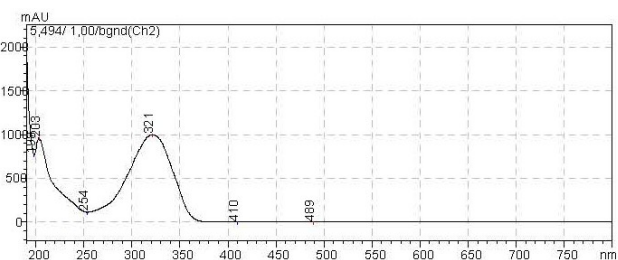


Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	8,454	11023787	100,000
Total		11023787	100,000

PDA Ch2 272nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	7,467	1049	0,042
2	8,454	2505010	99,958
Total		2506059	100,000

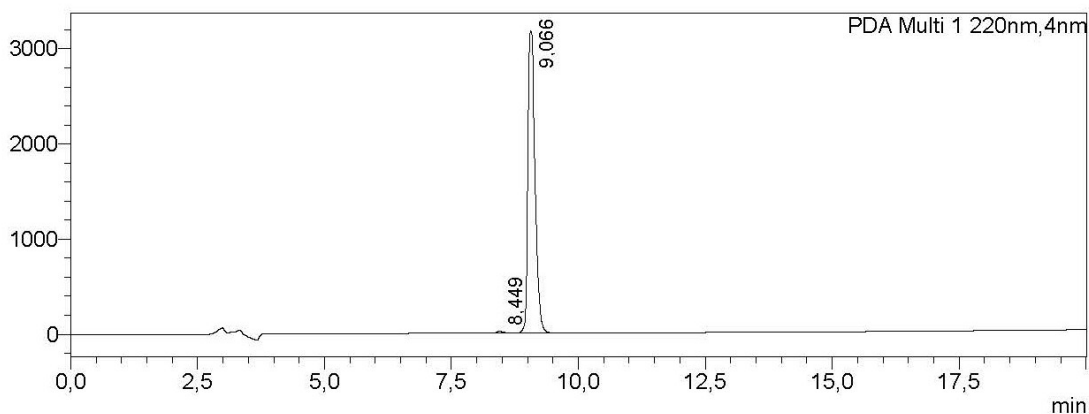


LISA 1 Ik 3/6

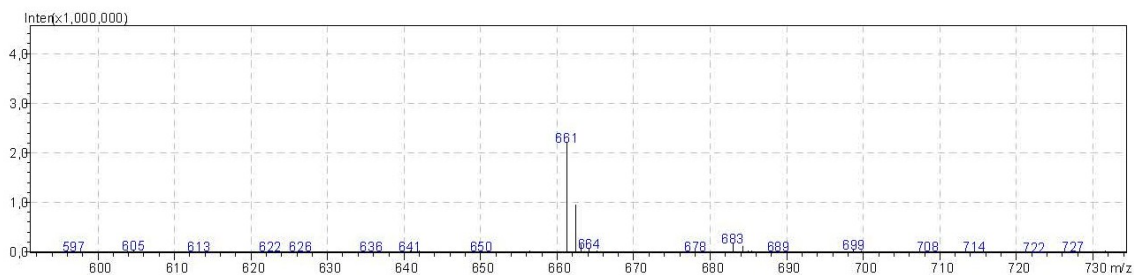
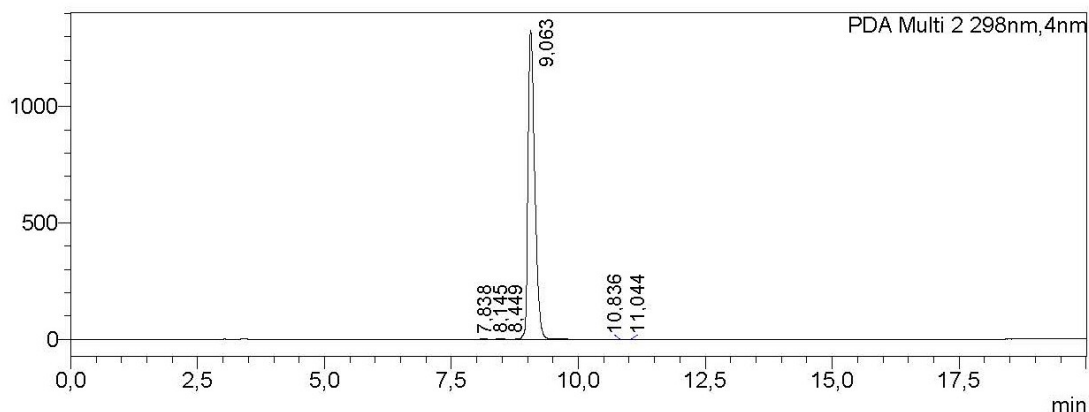
Sample Name : ARC-3140 purity
 Sample ID : 30-90/20
 Data Filename : Endel_Artjom-4.lcd
 Method Filename : hedi.lcm
 Batch Filename :
 Vial # : -1
 Injection Volume : 2 uL
 Date Acquired : 2/1/2018 12:48:18 PM
 Date Processed : 2/1/2018 3:19:45 PM

Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

mAU



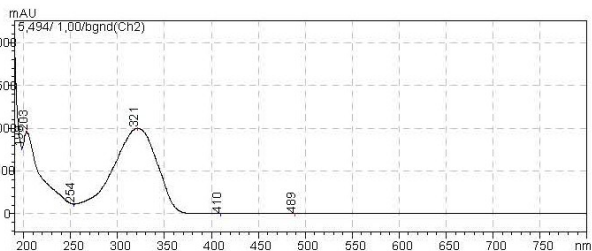
mAU



Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	8.449	129567	0.419
2	9.066	30787719	99.581
Total		30917286	100.000

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	7.838	3040	0.025
2	8.145	5591	0.046
3	8.449	13965	0.114
4	9.063	12229986	99.785

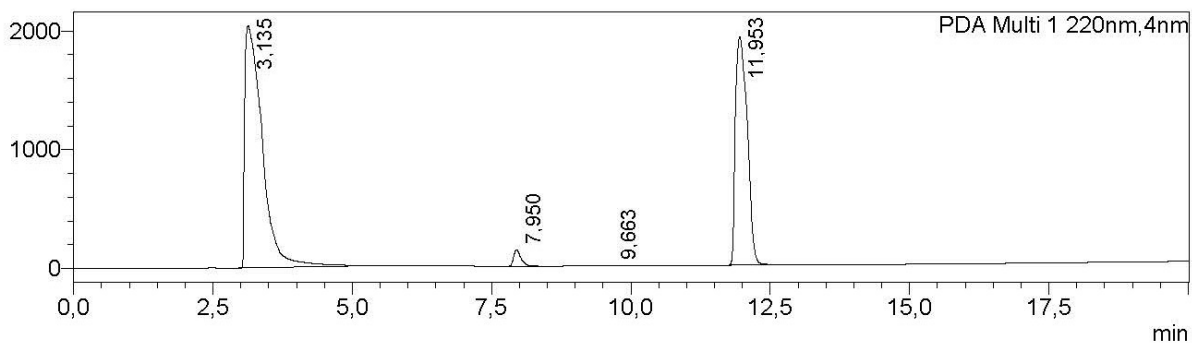


LISA 1 Ik 4/6

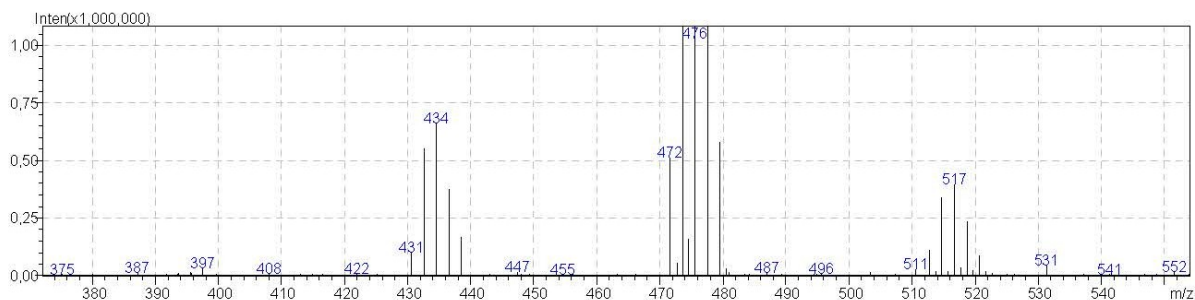
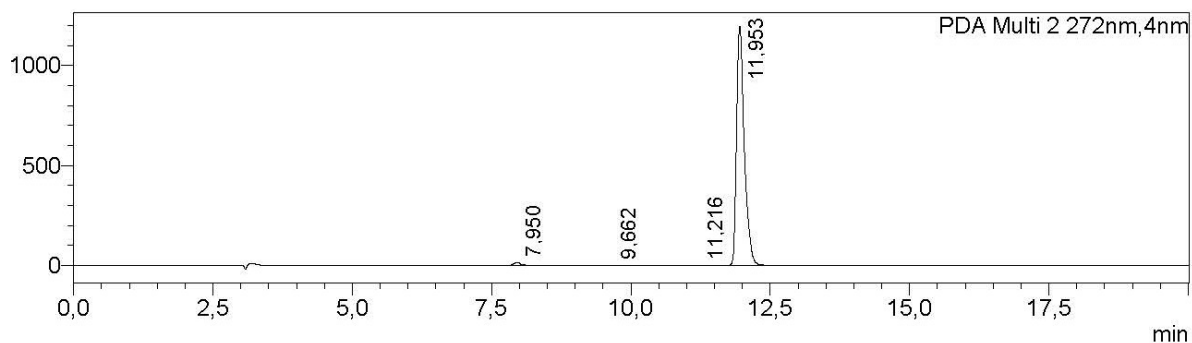
Sample Name : TBBi purity
Sample ID : 30-90/20
Data Filename : ARTJOM_2.lcd
Method Filename : hedi.lcm
Batch Filename :
Vial # : -1
Injection Volume : 6 uL
Date Acquired : 3/16/2018 12:48:07 PM
Date Processed : 3/16/2018 1:08:10 PM

Sample Type : Unknown
Acquired by : System Administrator
Processed by : System Administrator

mAU



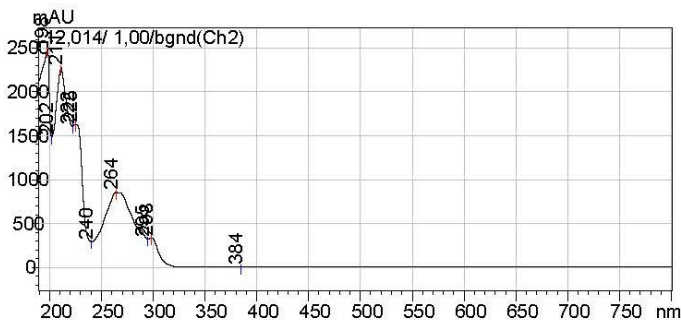
mAU



Peak Table

PDA Ch1 220nm			
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	3.135	44855710	60.356
2	7.950	1191035	1.603
3	9.663	31756	0.043
4	11.953	28239602	37.998
Total		74318103	100.000

PDA Ch2 272nm			
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	7.950	130045	1.118
2	9.662	7580	0.065
3	11.216	8951	0.077
4	11.953	11486600	98.740
Total		11633175	100.000

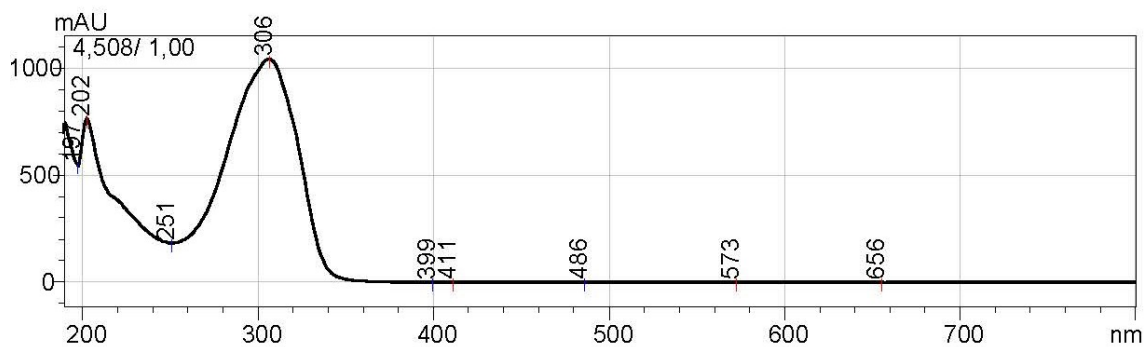
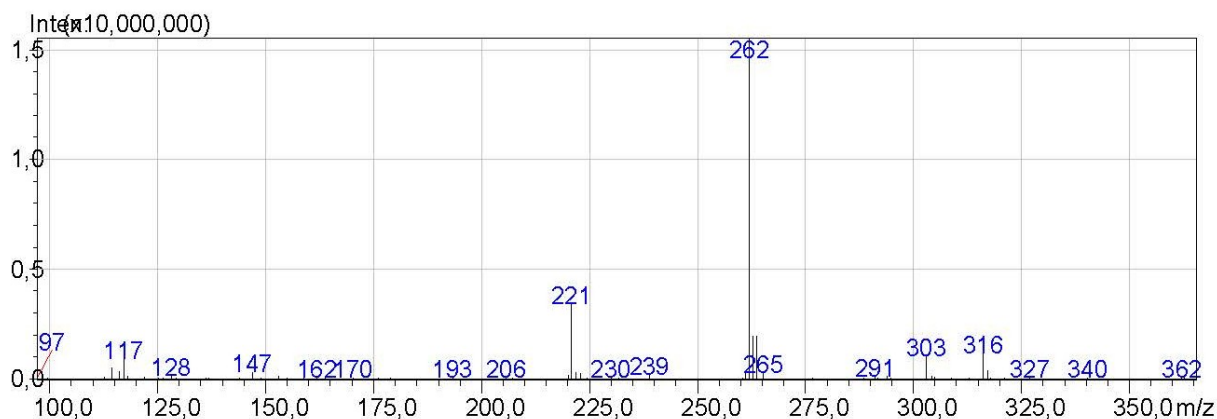
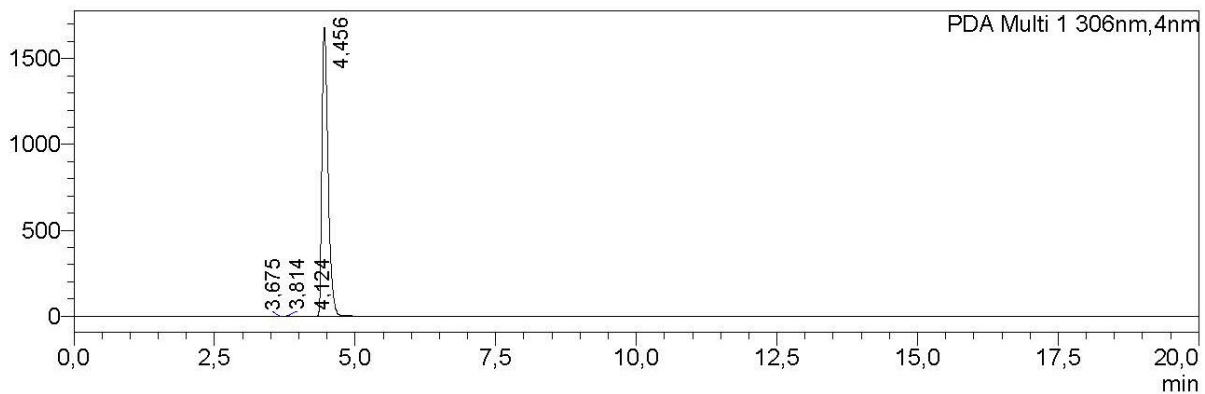


LISA 1 Ik 5/6

Sample Name : ATB
Sample ID : 20-80/20 min
Data Filename : ATB1.lcd
Method Filename : Kaido_gradient.lcm
Batch Filename :
Vial # : -1
Injection Volume : 6 uL
Date Acquired : 3/28/2018 10:41:39 AM
Date Processed : 3/28/2018 11:01:42 AM

Sample Type : Unknown
Acquired by : System Administrator
Processed by : System Administrator

mAU



Peak Table

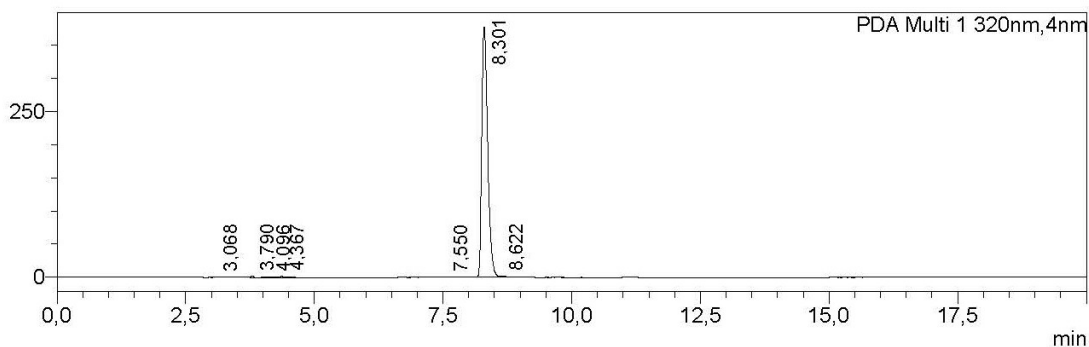
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	3.675	3129	0.025
2	3.814	14385	0.114
3	4.124	17804	0.141
4	4.456	12565291	99.720
Total		12600609	100.000

LISA 1 Ik 6/6

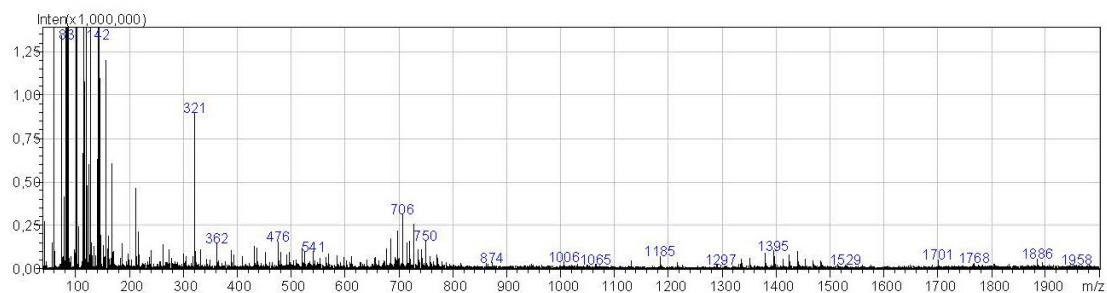
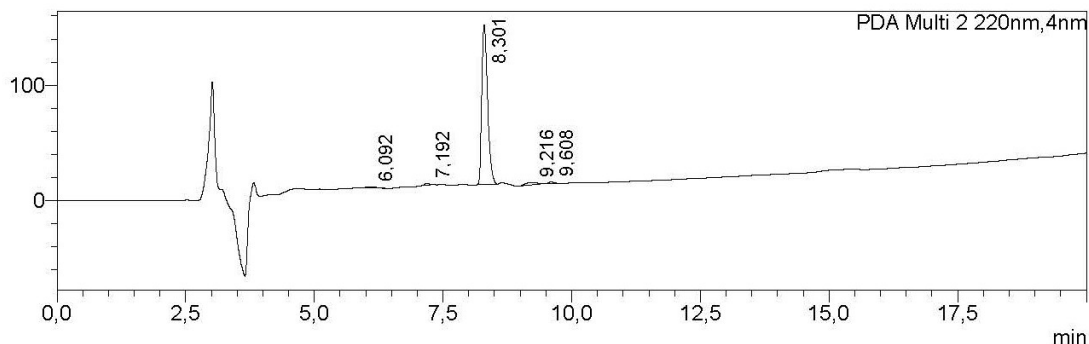
Sample Name : ATB-SUC
Sample ID : 20-80/20 min
Data Filename : ATB-SUC2.lcd
Method Filename : Kaido_gradient.lcm
Batch Filename :
Vial # : -1
Injection Volume : 6 uL
Date Acquired : 3/28/2018 1:16:17 PM
Date Processed : 3/28/2018 1:36:20 PM

Sample Type : Unknown
Acquired by : System Administrator
Processed by : System Administrator

mAU



mAU



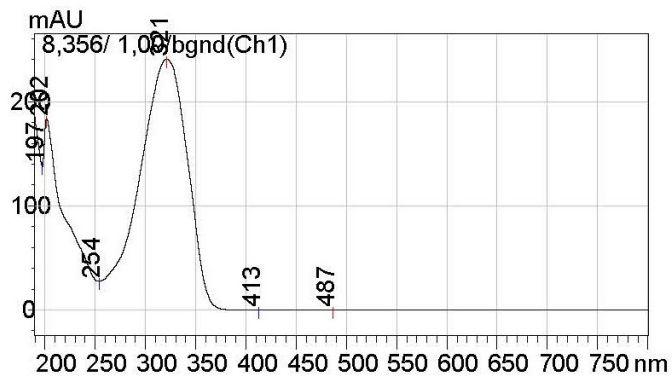
Peak Table

PDA Ch1 320nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	3.068	4823	0.158
2	3.790	10646	0.349
3	4.096	14345	0.470
4	4.367	17360	0.569
5	7.550	1868	0.061
6	8.301	3000402	98.354
7	8.622	1172	0.038
Total		3050617	100.000

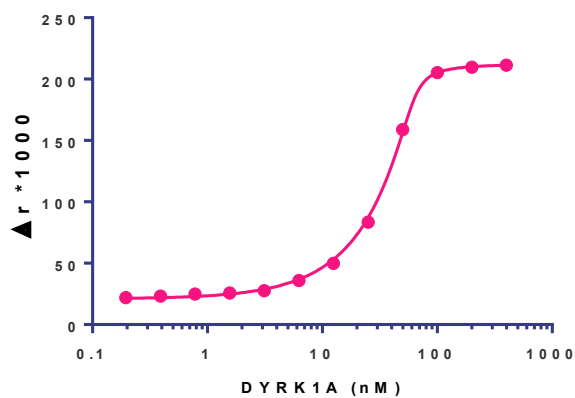
PDA Ch2 220nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	6.092	16551	1.429
2	7.192	9969	0.861
3	8.301	1085078	93.687
4	9.216	35738	3.086
5	9.608	10859	0.938
Total		1158194	100.000

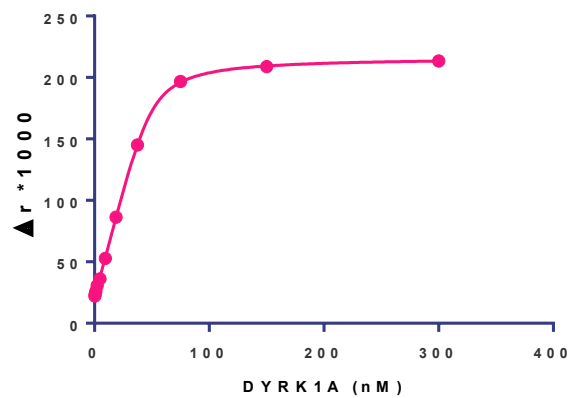


LISA 2. DYRK1A aktiivsuse määramise sidumiskõverad (2 lk)

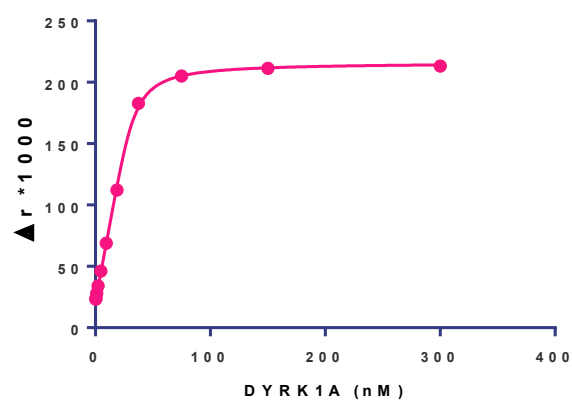
0 päev



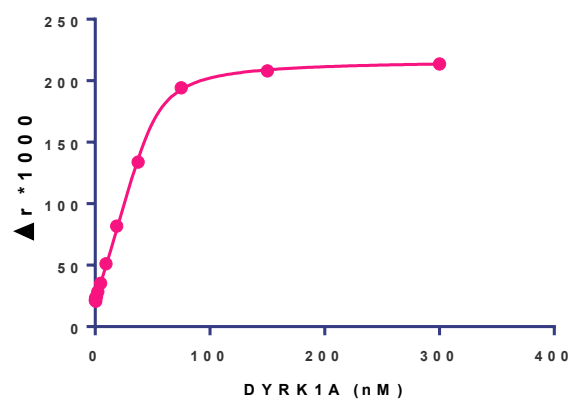
8 päev



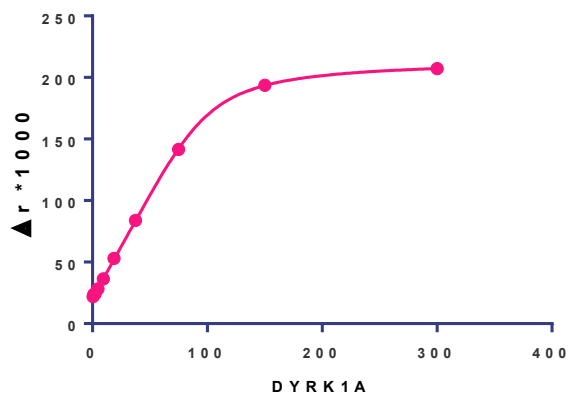
13 päev



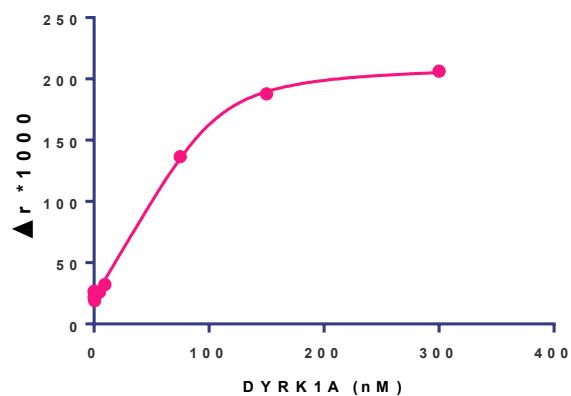
26 päev



34 päev

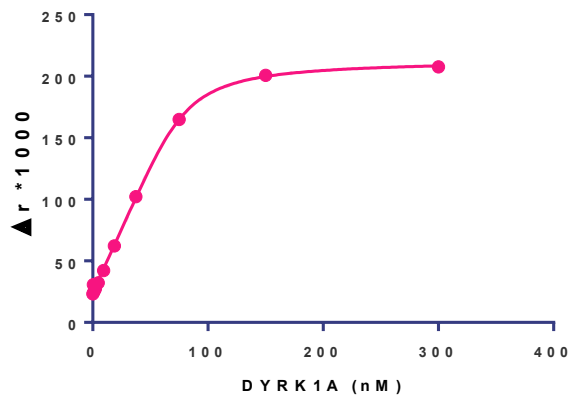


41 päev

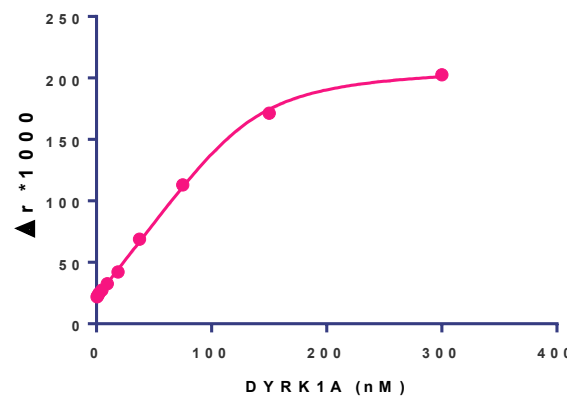


LISA 2 lk 2/2

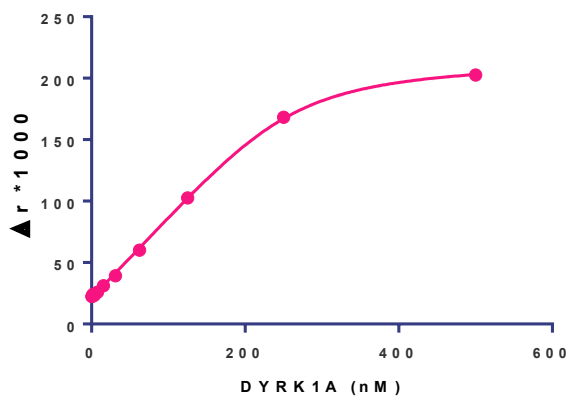
42 päev



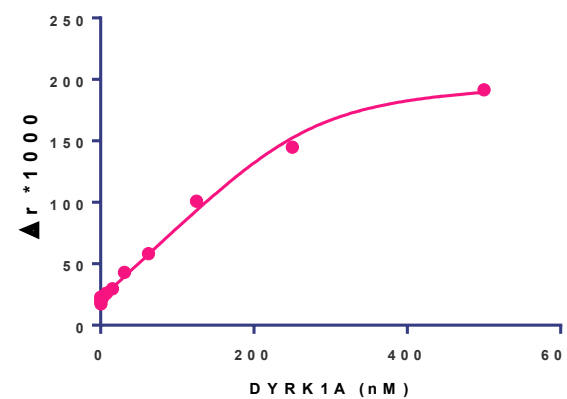
49 päev



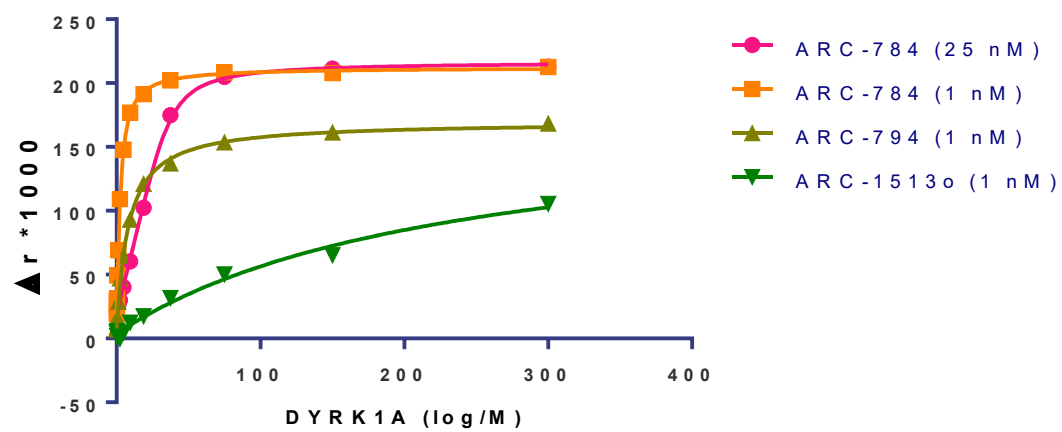
54 päev



55 päev

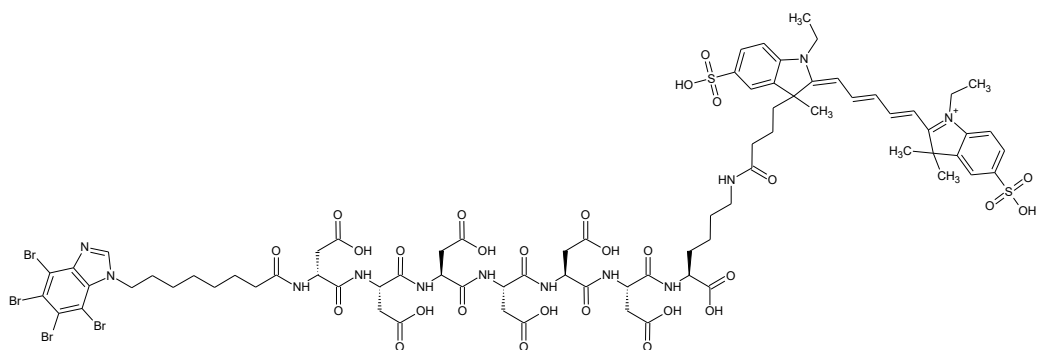


LISA 3. DYRK1A fluorestsentssondide sidumiskõverad

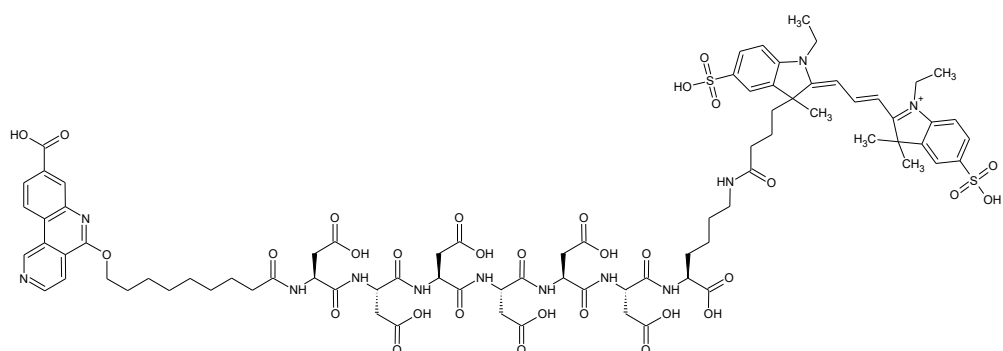


LISA 4. DYRK1A fluorestsentssondide struktuurid

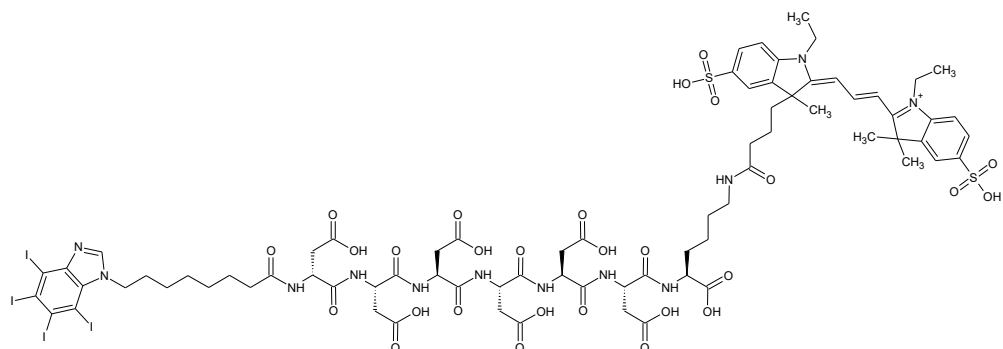
ARC-1504



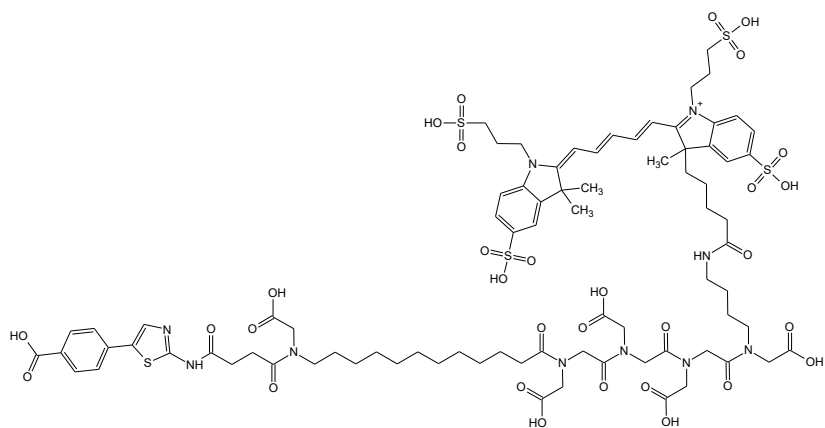
ARC-1513o



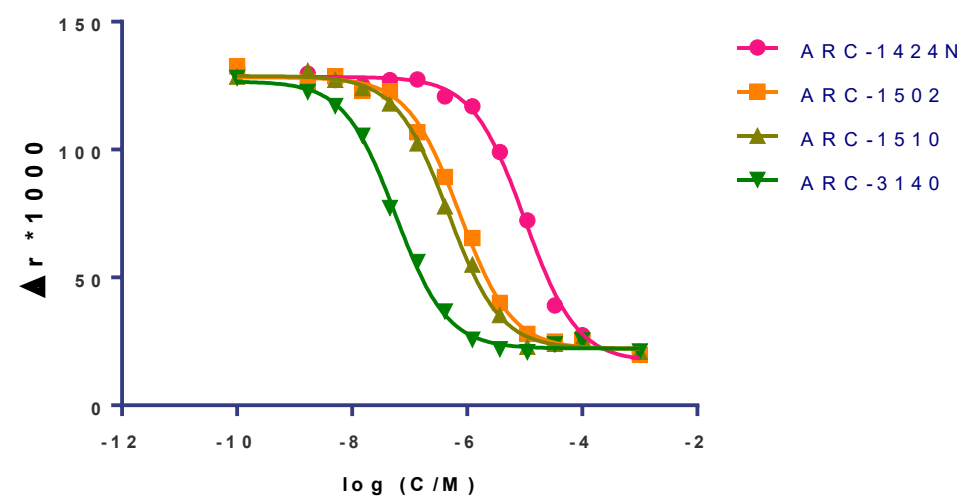
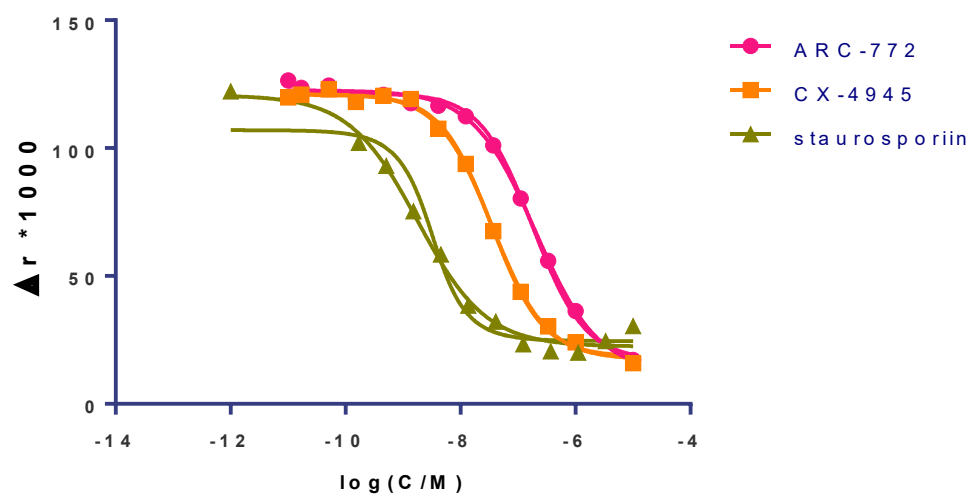
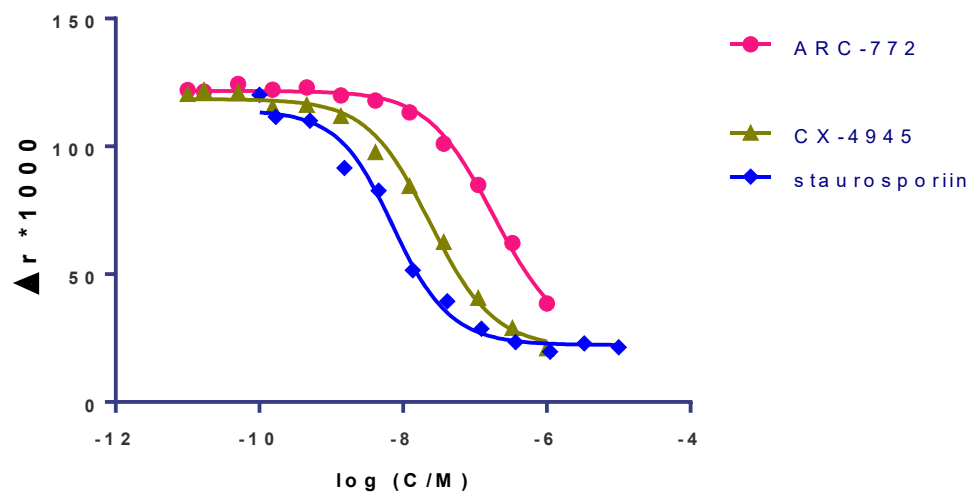
ARC-794

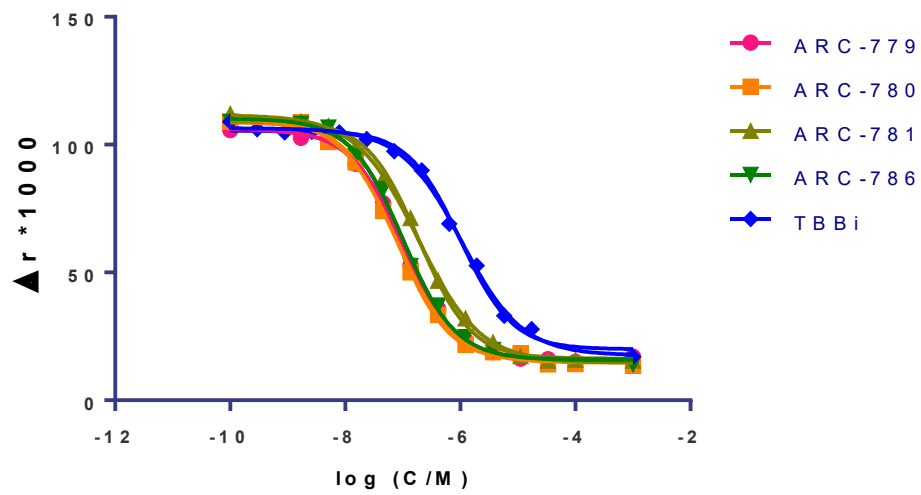
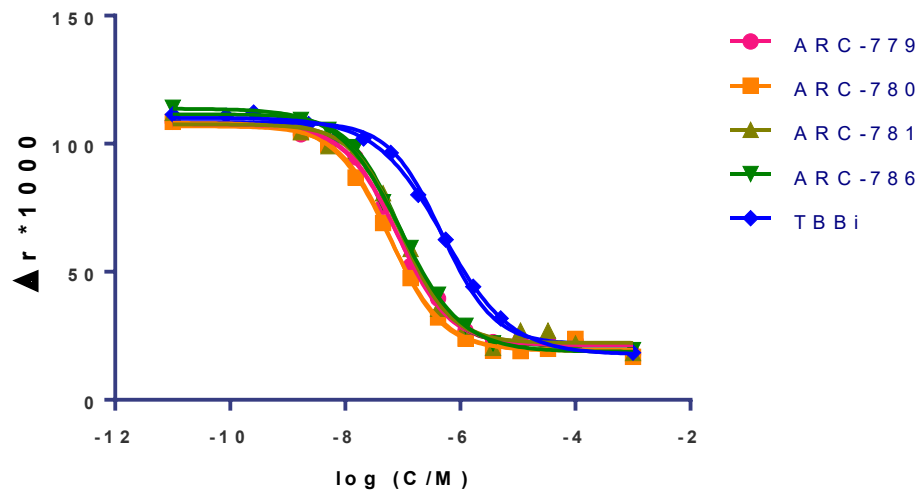


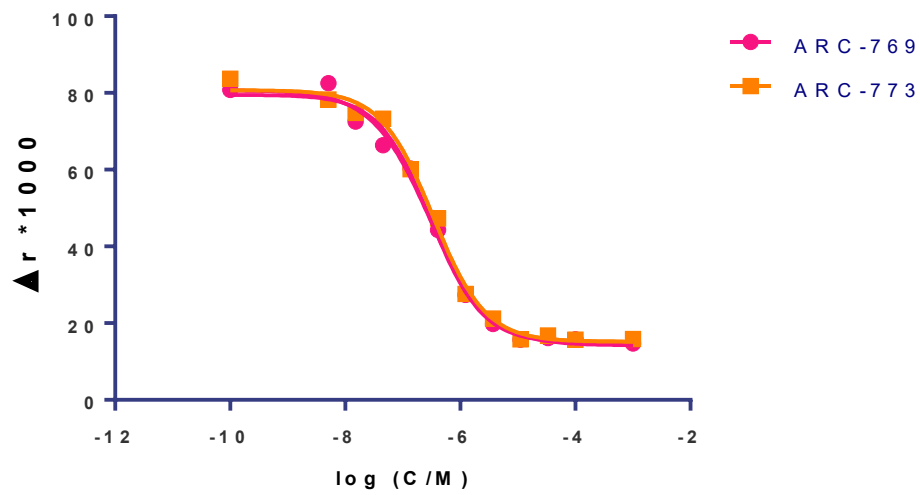
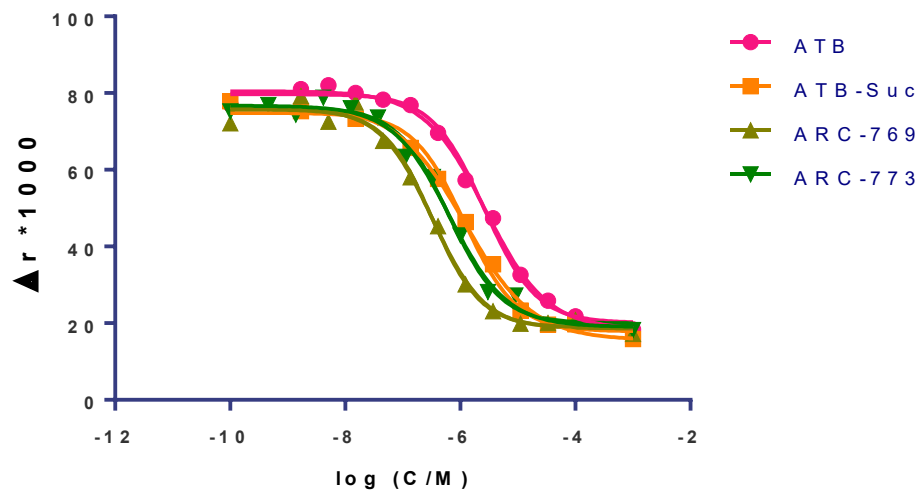
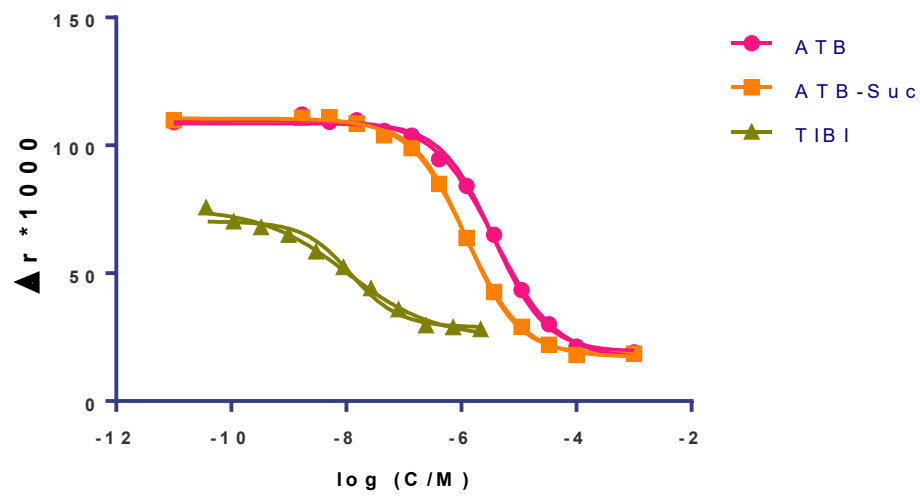
ARC-784



LISA 5. DYRK1A inhibiitorite sidumiskõverad (3 lk)







LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Artjom_Issajev _____

(sünnikuupäev: _____ 19.08.1993 _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

Anioonse fragmendi mõju proteiinkinaaside CK2 ja DYRK1A inhibiitorite
_____ afiinsusele _____

mille juhendajad on _____ Kaido_Viht _____ ja _____ Asko_Uri _____,
(juhendaja nimi)

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu **kolme aasta möödumisel kaitsmisest (alates 01.06.2021)**, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, _____ 28.05.2018 _____ (kuupäev)