

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Marju Vestman

**Dimeersete ARC-Lum sondide arendamine ja kinaas-inhibiitor-
kinaas kolmikkomplekside uurimine**

Magistritöö (30 EAP)

Keemia magister

Juhendaja: kaasprofessor Erki Enkvist, PhD

Tartu 2024

Sisukord

1.	Lühendid	4
2.	Sissejuhatus.....	5
3.	Kirjanduse ülevaade	6
3.1.	Proteiinkinaasid ja nende inhibiitorid.....	6
3.2.	ARC-id kui proteiinkinaasi inhibiitorid	6
3.3.	Luminesentsents.....	7
3.4.	Luminesentsentssignaali mõõtmine	7
3.4.1.	Aegviivitusega luminesentsentsi meetod	8
3.4.2.	Anisotroopia	9
4.	Eksperimentaalne osa	11
4.1.	Meetodid, reagensid ja aparatuur	11
4.2.	Orgaaniline süntees	12
4.2.1.	ARC-2304 [AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg) ₂ -DLys(Ahx)-NH ₂] süntees	12
4.2.2.	Inhibiitori märgistamine Sulfo-Cyanine5-bis-NHS ester fluorestsentsvärviga.....	12
4.2.3.	ARC-2300 [AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg) ₂ -DLys-NH ₂] märgistamine perüleenvärviga (PTCDA).....	13
5.	Tulemused ja arutelu.....	14
5.1.	ARC-2302 {[AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg) ₂ -DLys(*)-NH ₂] ₂ -Sulfo-Cyanine5} ja ARC-1063 [AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg) ₆ -DLys(Alexa-647)-NH ₂] võrdlus	14
5.1.1.	Sidumiskatse PKA-ga	14
5.1.2.	Luminesentsentsi kustumine, algintensiivsuse ja eluea määramine	16
5.1.3.	Sidumiskatse lüsaadiga	16
5.2.	ARC-2303 {[AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg) ₂ -DLys(*)-NH ₂] ₂ -PTCDA}	17
5.3.	ARC-2305 {[AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg) ₂ -DLys(Ahx*)-NH ₂] ₂ -Sulfo-Cyanine5} ja ARC-2307 [AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg) ₂ -DLys(Ahx-Sulfo-Cyanine5-OH)-NH ₂] võrdlus....	17
5.3.1.	Sidumiskatse PKA-ga	18
5.3.2.	Luminesentsentsi kustumine, algintensiivsuse ja eluea määramine	19
5.3.3.	Lüsaadikatse cGMP lahjendusseeriaga	19
5.4.	ARC-2306 {[AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg) ₆ -DLys(*)-NH ₂] ₂ -Sulfo-Cyanine5} ja ARC-2308 [AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg) ₆ -DLys(Sulfo-Cyanine5-OH)-NH ₂] võrdlus	20
5.4.1.	Sidumiskatse PKA-ga	20
5.4.2.	Luminesentsentsi kustumine, algintensiivsuse ja eluea määramine	21
5.4.3.	Lüsaadikatse cGMP lahjendusseeriaga	21
5.5.	ARC-2309 {[ASB-Suc-Ahx-(LAsp) ₆ -LLys(*)] ₂ -Sulfo-Cyanine5} ja ARC-2310 [ASB-Suc-Ahx-(LAsp) ₆ -LLys(-Sulfo-Cyanine5-OH)] võrdlus	22
5.5.1.	Sidumiskatse CK2 α -ga.....	22

5.5.2. Luminestsentsi kustumine, algintensiivsuse ja eluea määramine	23
6. Kokkuvõte	24
7. Summary	25
8. Allikad	26
9. Lisad	28
10. Infoleht	34
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	35

1. Lühendid

AKT	proteiinkinaas B, PKB
AMTH	5-(2-aminopürimidiin-4-üül)tiofeen-2-karboksüülhape
ARC	adenosiini analoogist ja arginiine sisaldavast peptiidist koosnev molekul või üldiselt Asko Uri grupis sünteesitud ühend
ASB	4-(2-amino-1,3-selenasool-5-üül)bensoehape
AU	suhteline ühik (ingl <i>arbitrary unit</i>)
Boc	tert-butüüloksükarbonüül
cAMP	tsükliiline adenosiinmonofosfaat
cGMP	tsükliiline guanosiinmonofosfaat
CK2 α	kaseiinkinaas 2 α -alaühik
DMF	N,N-dimetüülformamiid
DMSO	dimetüülsulfoksiid
FRET	Fösteri tüüpi resonantne energiaülekanne
HBTU	O-bensotriasool-N,N,N',N'-tetrametüül-uroonium-heksafluorofosfaat
HEPES	4-(2-hüdrosüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape
HPLC	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
MS	massispektromeetria
NMM	N-metüülmorfoliin
P20	2-(5-{[amino(imino)metüül]amino}-2-klorofenüül)-3-sulfanüülpropanhape
PI3K	fosfoinositiid 3-kinaas
PK	proteiinkinaas
PKA	proteiinkinaas A e cAMP-sõltuv proteiinkinaas
PKG	cGMP-sõltuv proteiinkinaas
PKI	proteiinkinaasi inhibiitor
PLQY	fotoluminestsentsi kvantsaagis (ingl <i>photoluminescence quantum yield</i>)
PTCDA	perüleen-3,4,9,10-tetrakarboksüül dianhüdriid
PTEN	fosfataasi ja tensiini homoloog
TFA	trifluoroäädikhape
TGL	aegviivitusega luminescents (ingl <i>time-gated luminescence</i>)
TLC	õhukese kihi kromatograafia
UV	ultraviolet-

2. Sissejuhatus

Proteiinkinaasid on ensüümid, mille ülesandeks organismis on fosforüleerida valke. Proteiinkinaasid mängivad rakkudes olulist reguleerivat rolli: fosforüleerimisreaktsiooni tulemusena võib muutuda valgu aktiivsus, asukoht rakus või afiinsus teiste valkude suhtes [1,2]. Häireid proteiinkinaaside töös on seostatud mitmete inimesel esinevate haigustega, näiteks südamehaigustega, diabeediga ja vähiga. Seetõttu on proteiinkinaasid olulised ravimisihtmärgid [3–6].

Ravimiarenduses on palju tähelepanu pööranud väikese molekulmassiga proteiinkinaasi inhibiitoritele (PKI), mis seonduvad kinaasi ATP-taskusse. 2024. aasta seisuga on ravimina kasutusele võetud 81 sellist ühendit [7]. Ühe hiljutise näitena andis 2024. aastal FDA heakskiidu tovorafeniibile glioomide raviks.

ARC-tüüpi proteiinkinaasi inhibiitorid koosnevad valgu taskusse kinnituvast (tavaliselt arginiinidest koosnevast) peptiidiahelast, kiraalsest eraldajast, vahelüli(de)st ja adensiini analoogist. ARC-id erinevad teistest PKI-dest just selle poolest, et nad on bisubstraatsed – ARC-id seonduvad korraga kinaasi valku siduvasse ja nukleosiidi siduvasse taskusse [8]. Tänu sellele on ARC-idel kõrgem afiinsus ja selektiivsus, võrreldes väikese molekulmassiga PKI-dega.

ARC-tüüpi inhibiitori märgistamisel fluorestsentsvärviga on võimalik sünteesida ARC-Lum ühendeid. ARC-Lum ühendi ja kinaasi kompleks emiteerib ergastamisel pika elueaga (~100 µs) luminescentskiirgust. See võimaldab ARC-Lum ühendeid kasutada sondidena kinaaside ja PKI-de uurimiseks komplekssetes bioloogilistes segudes ja rakkudes luminescentsmeetodite abil [9].

Selle töö eesmärgiks oli sünteesida dimeerseid ARC-Lum ühendeid, kus ühe fluorestsentsvärviga on ühendatud kaks ARC-inhibiitorit. Samuti sooviti uurida, kas dimeersed ARC-Lum ühendid moodustavad kinaasidega kolmikkompleksi, kus ühe dimeerse ARC-iga on seotud kaks kinaasi (Joonis 5), ning millised on nende komplekside luminescentsomadused (luminestsentsi intensiivsus, eluiga, fluorestsentsi anisotroopia) võrreldes kaksikkompleksidega.

3. Kirjanduse ülevaade

3.1. Proteiinkinaasid ja nende inhibiitorid

Proteiinkinaasid on ensüümid, mis vahendavad valkude fosforüleerimist. Fosforüleerimise toimumiseks peavad kinaasiga seonduma adenosiintrifosfaat (ATP) ning sihtmärkvalk. Seejärel toimub fosforüülrühma ülekandumine nukleosiidilt sihtmärkvalgu hüdroksüülrühmaga aminohappele, milleks on tavaliselt seriin või treoniin [2]. Inimese genoomis on kodeeritud üle 500 erineva kinaasi [10]. Seega on kinaasidel organismis oluline regulatoorne roll.

Proteiinkinaaside üleaktiivsust on seostatud mitmete haigusetga, sh vähiga. Näiteks on leitud, et teatud tüüpi rinnavähi puhul on üleaktiveeritud PI3K–AKT–PTEN signaalirada, mida seostatakse resistentsusega endokriinravile. Üks võimalik strateegia selle signaaliraja aktiivsuse vähendamiseks on proteiinkinaas B (PKB e AKT) inhibeerimine. 2023. aastal uurisid Turner *et al.* [11] väikese molekulmassiga AKT inhibiitori kapivasertiibi efektiivsust rinnavähi ravis ning leidsid, et kapivasertiib pikendab progressioonivaba ellujäämist. Samal aastal andis FDA heakskiidu kapivasertiibi kasutamiseks ravimina.

Proteiinkinaasid pakuvad huvi mitte ainult ravimiarenduse seisukohalt, vaid ka potentsiaalse diagnostilise vahendina. Inhibiitoreid, mis on ühendatud fluorestsentsmärgisega, saab kasutada sondidena, millega saab uurida kinaaside aktiivsust rakkudes [12,13]. Selle töö raames uuriti PKA, PKG ja CK2 α -ga seonduvaid sonde. On leitud, et nii PKA kui ka PKG mängivad rolli kardiovaskulaarsetes haigustes [6,14], CK2 üleaktiivsust seostatakse aga näiteks kopsuvähiga ja Hodgkini lümfoomiga [15,16]. Seetõttu on nende kinaaside aktiivsuse jälgimine oluline diagnostilisest vaatepunktist.

3.2. ARC-id kui proteiinkinaasi inhibiitorid

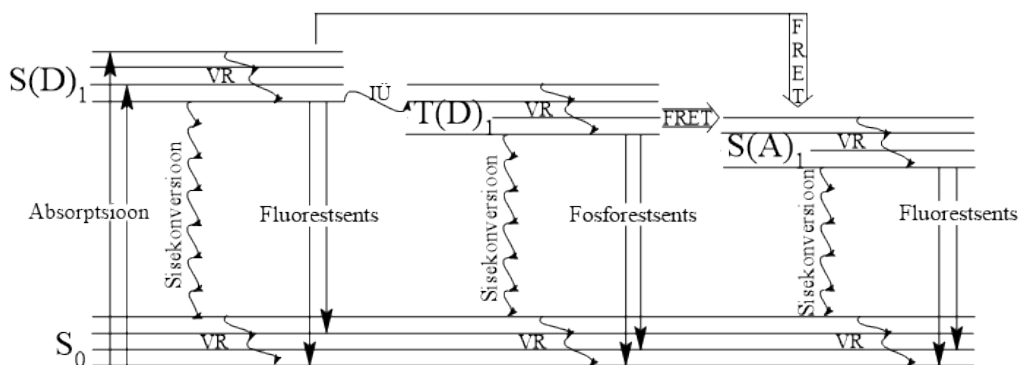
ARC-tüüpi inhibiitorid on bisubstraatsed – need koosnevad ATP taskusse seonduvast adenosiini analoogist ja valgu taskusse seonduvast peptiidiahelast, mille moodustavad tavaliselt arginiinid. ARC-e on aastate jooksul edasi arendatud kõrgema afiinsuse ja selektiivsuse suunas, kasutades ratsionaalset disaini, mis lähtub kinaasi struktuurist. Näiteks leidsid Lavögina *et al.* [11] 2009. aastal PKA C α ja ARC-1034 kompleksi kristallstruktuuri uurimisel, et inhibiitori afiinsust kinaasi suhtes on võimalik tõsta kiraalse eraldaja lisamisega. Tänu nendele edasiminekutele on ARC-tüüpi inhibiitoritel saavutatud subnanomolaarseid dissotsiatsioonikonstandi (K_d) väärtusi ja kõrget selektiivsust sihtmärkkinaasi suhtes [17].

ARC-i erinevad osad – adensiini analoog, peptiidiahel ja kiraalne eraldaja – on üksteisega ühendatud vahelülide ehk linkerite kaudu. Samuti võib ARC-e märgistada fluorestsentsvärviga, mis võimaldab neid kasutada sondidena [9].

3.3. Luminestsents

Fotoluminestsents jaguneb kaheks alaliigiks: fosforestsents ja fluorestsents. Fosforestsentskiirgus tekib molekuli relakseerumisel ergastatud tripletsest olekust singletsesse põhiolekusse. Fluorestsentsi puhul toimub aga relakseerumine ergastatud singletsest olekust singletsesse põhiolekusse. Kuna triplett-singlett relakseerumise protsess on aeglasem kui singlett-singlett relakseerumine, on fosforestsentsi eluiga pikem kui fluorestsentsil [18].

ARC-idele annab fosforestseeruvad omadused adensiini analoogina kasutatav osa, mis sisaldab tavaliselt tiofeeni- või selenofeenituumat. ARC-e saab märgistada ka fluorestseeruva märgisega. Molekulidel, millega on seotud nii fosfofor kui ka fluorofor, esinevad erilised luminestsentsomadused: need emiteerivad pika elueaga ja suure luminestsentsi kvantsaagisega kiirgust. Seda seletatakse Förster tüüpi resonantse energiaülekandega (FRET), st energia saab mittekiirguslikult kanduda fosfofoori (doonori) tripletsest olekult aktseptorfluorofoori singletsesse ergastatud olekusse ning alles seejärel toimub relakseerumine (Joonis 1) [19].

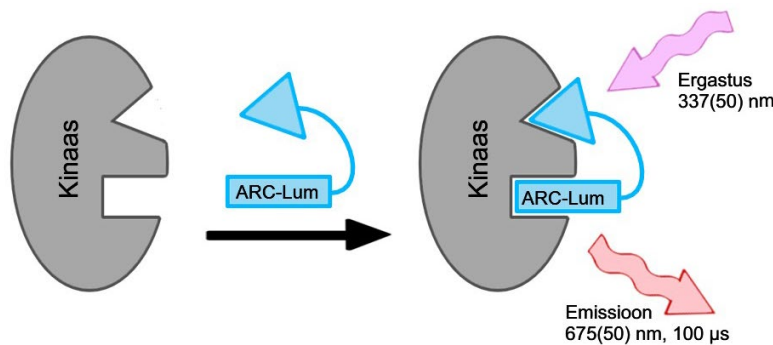


Joonis 1: Jablonski diagramm illustreerib energiaülekandeid doonor- ja aktseptorluminofooridega (ARC-Lum) süsteemis. S_0 – singletne põhiolek, $S(D)_1$ – doonorluminofoori singletne ergastatud olek, $T(D)_1$ – doonorluminofoori tripletne ergastatud olek, $S(A)_1$ – aktseptorluminofoori singletne ergastatud olek, IÜ – intersüsteemne üleminek, VR – vibratsiooniline relakseerumine, FRET – Förster tüüpi resonantse energiaülekanne [20].

3.4. Luminestsentssignaali mõõtmine

Siiski ei ilmne ARC-Lum ühendite pika elueaga luminestsents vabalt lahuses olles. Lahuses saab luminestsents kustuda mittekiirguslikel viisidel: energia saab muunduda molekuli kineetiliseks energiaks või kanduda lahuses olevale molekulaarsele hapnikule [21,22]. Kuid

kui ARC-Lum ühend moodustab kompleksi kinaasiga, siis on molekul kindlalt fikseeritud ja kaitstud molekulaarse hapniku eest ning emiteerib pika elueaga luminescentskiirgust (Joonis 2). Kuna selle luminescentsi eluiga ($\sim 100 \mu\text{s}$) on pikem kui rakkude enda fluorestsents, saab kinaasi-inhibiitori kompleksi emiteeritud signaali mõõta ilma rakkude fluorestsentssignaali registreerimata. Tänu sellele on ARC-Lum ühendid sobilikud kasutamiseks sondidena, millega saab uurida nii kinaase kui ka nende inhibiitoreid. Kuna kompleksi luminescentsi kvantsaagis on kõrge, saab neid katseid läbi viia lahjade, nanomolaarsete kontsentratsioonide juures [9].

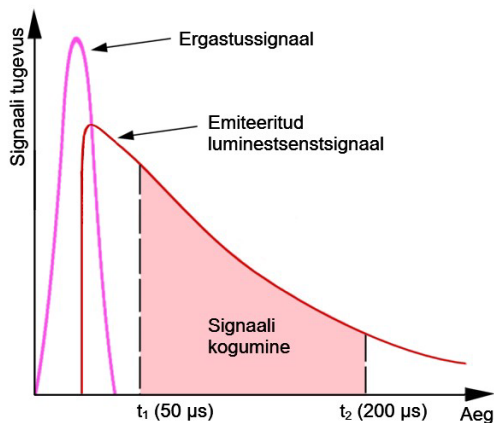


Joonis 2: ARC-Lum sondi ja kinaasi kompleksi ergastamisel tekib pika elueaga luminescentskiirgus [9].

Dimeersed ARC-Lum-id koosnevad kahest FRET-i doonorist ja ühest aktseptorist. Kui dimeerne ARC-Lum sond on moodustanud kolmikkompleksi, siis on mõlemad FRET-i doonorid luminescentsi kustumise eest kaitstud. Seetõttu eeldame, et aegviivitusega luminescentsi (TGL) mõõtmisel annab kolmikkompleks ligikaudu kaks korda kõrgema signaali kui kaksikkompleks.

3.4.1. Aegviivitusega luminescentsi meetod

Meetodit, mis kasutab ära pika elueaga luminescentsi, nimetatakse aegviivitusega luminescentsi meetodiks. TGL meetodi puhul alustatakse signaali kogumist u $50 - 60 \mu\text{s}$ pärast ergastamist, kui ergastussignaali ja proovi autofluorestsents on juba kustunud. Seejärel kogutakse signaali kindlaksmääratud aja jooksul (nt $200 \mu\text{s}$) ning signaali väärtused eri ajahetkedel summeeritakse/integreeritakse (Joonis 3) [23].



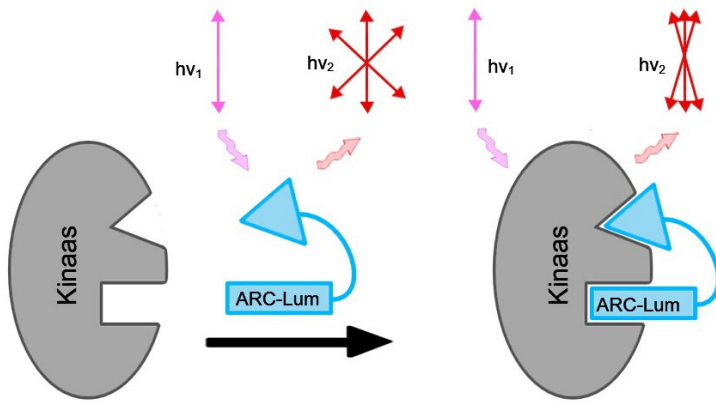
Joonis 3: TGL meetodi põhimõtteline skeem. t_1 – signaali kogumise algus, t_2 – signaali kogumise lõpp.

Kui TGL meetodit rakendatakse paljude lühikeste (nt $5 \mu\text{s}$) signaalikogumisintervallidega, saadakse luminesentssignaali tugevuse sõltuvus ajast. Seda sõltuvust saab analüüsida ühefaasilise kustumiskõveraga, millest on võimalik arvutada signaali algintensiivsus (I_0) ja luminesentsi eluiga (τ).

Kuna kolmikkompleksis on ARC-Lum ühend kahelt poolt ümbritsetud kinaasidega ja seega paremini kaitstud luminesentsi kustutajate eest, püstitatakse hüpotees, et kolmikkompleksil on tavalise kinaas-inhibiitor kompleksiga võrreldes kõrgem luminesentsi algintensiivsus ja eluiga.

3.4.2. Anisotroopia

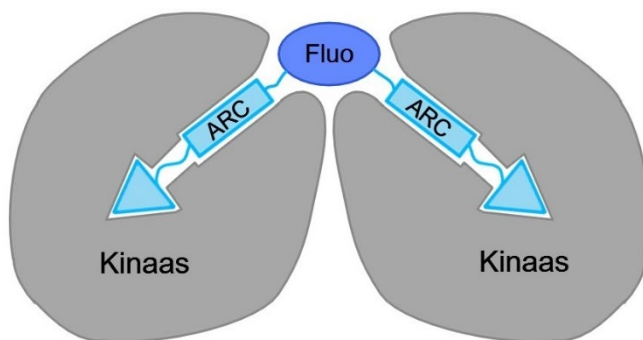
Lisaks pika elueaga luminesentssignaali mõõtmisele saab kinaasi-inhibiitori kompleksi tekkimist analüüsida ka fluorestsentsi anisotroopia mõõtmise kaudu. Fluorestsentsi anisotroopia näitab fluorestsentsi polariseerituse astet. Kui proovi ergastatakse polariseeritud kiirgusega, siis vabalt lahuses olev ARC-Lum ühend kiirgab tagasi madala polariseeritusega e madala anisotroopiaga fluorestsentskiirgust, sest ühend pöörleb lahuses kiiresti. Kompleksid on aga oluliselt suuremad kui vabad ARC-Lum-id ning pöörlevad seetõttu lahuses aeglasemalt. Kuna kompleks ei jõua oma ergastatud oleku aja jooksul nii palju pöörelda kui vaba ARC-Lum, siis jääb kompleksi poolt emiteeritud fluorestsentsi polarisatsioon sarnaseks ergastava kiirguse polarisatsiooniga – saadakse kõrge anisotroopiaga signaal (4) [24].



Joonis 4: Vaba ARC-Lum sondi fluorestsentsi anisotroopia on madal, kuid ARC-Lum sondi ja kinaasi kompleksi fluorestsentsi anisotroopia on kõrge.

Kahest kinaasist ja ühest ARC-Lum ühendist koosnev kolmikkompleks on suurem kui tavaline kaksikkompleks ning pöörleb lahuses veelgi aeglasemalt. Seetõttu eeldame, et kolmikkompleksi fluorestsentsi anisotroopia on kõrgem kui kaksikkompleksil.

Selle töö eesmärgiks oli sünteesida dimeerseid ARC-Lum ühendeid ning tõestada dimeersetest sondidest kolmikkomplekside tekkimist nende luminesentsomaduste uurimise kaudu. Kolmikkompleksi tekkimise tõestamiseks eeldati, et kolmikkompleksi TGL-signaali on ligikaudu kaks korda kõrgem kui kaksikkompleksil ja et kolmikkompleks annab ka kõrgema anisotroopia signaali. Püstitati hüpoteesid, et kolmikkompleksidel on kõrgem luminesentsi algintensiivsus ja pikem luminesentsi eluiga kui analoogsetel kaksikkompleksidel.



Joonis 5: Kolmikkompleksi põhimõtteline skeem. Kaks ARC-tüüpi inhibiitorit (joonisel „ARC“) on seotud ühe fluorestsentsmärgisega (joonisel „Fluo“), moodustades dimeerse ARC-Lum sondi. Dimeerne sond seondub kahe kinaasiga, mis kaitsevad sondi luminesentsi kustumise eest.

4. Eksperimentaalne osa

4.1. Meetodid, reagensid ja aparatuur

Sünteesides kasutati reagente firmadelt Sigma-Aldrich, Iris Biotech GmbH, Fluka. Reagensid olid piisavalt kõrge puhtusega ega vajanud eraldi puhastamist. Sidumiskatsetes kasutatud vereliistakute lüsaat oli valmistatud Darja Lavõgina poolt. PKA alglahused olid valmistatud Tanel Sõrmuse poolt. CK2 α alglahused olid valmistatud Karsten Niefindi poolt. ARC-668 oli sünteesitud Erki Enkvisti poolt. ARC-1529 oli sünteesitud Jaroslav Ivanovi poolt vastavalt varem avaldatud eeskirjale [25].

Peptiidide sünteesid viidi läbi kirjanduses välja toodud tahkefaasi peptiidsünteesi eeskirjade järgi [26], kasutades lähteainena Fmoc-DLys(Boc)-Wang vaiku *loading*'uga 0,6 mmol/g.

Reaktsioonide kulgu ja ekstraheerimise õnnestumist kontrolliti TLC-ga. Selleks kasutati CHCl₃:MeOH 9:1 eluenti ning Polygram (R) Sil G UV254 silikageeliga kaetud UV fluorofooriga plaate (Macherey – Nagel). Visualiseerimiseks kasutati 254 nm UV-kiirgust.

Reaktsioonide kulu kvalitatiivseks hindamiseks ja reaktsioonisegude puhastamiseks kasutati Shimadzu Prominence HPLC vedelikkromatograafi koos Shimadzu LCMS-2020 massispektromeetriga. Kolonn oli C18-pöördfaas-kolonn (Phenomenex Gemini 5 μ m) ning eluent oli atsetonitriili ja vee segu 0,1% TFA-ga. Atsetonitriili algkontsentratsioon eluendis oli 10%, seda tõsteti gradiendina kuni 95%-ni. Voolukiirus oli 1 ml/min.

Lahuste kuivatamiseks kasutati rotaatoraurustit Rotavapor (R) R-200 firmalt Büch, lüofilisaatorit Alpha 2-4 LD plus ja rotaator-vaakumkontsentraatorit RVC 2-25 CD plus firmalt Christ.

Lahuste kontsentratsioonid määrati UV-Vis spektrofotomeetriselt NanoDrop 2000c-ga. Kasutati järgmisi neeldumiskoeffitsente: ASB-konjugaatidel $\epsilon = 21\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [25], Sulfo-Cyanine5-bis-konjugaatidel $\epsilon = 271\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [27].

Sidumis- ja väljatõrjumiskatsetes kasutati B3 puhvrit: 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% P20. Katsed viidi läbi Corning 384 plaadil. Järgiti kirjanduses varasemalt välja toodud sidumis- ja väljatõrjumiskatsete eeskirju [9].

TGL-i, fluorestsentsi eluea, fluorestsentsi anisotroopia ja fluorestsentsi intensiivsuse mõõtmiseks kasutati mikroplaadilugejat PHERAstar firmalt BMG Labtech. Saadud tulemuste analüüsimiseks kasutati programmi GraphPad Prism.

TGL signaali koguti vahemikus 60-200 μ s. Ergastamiseks kasutati kiirgust lainepikkusega 337 nm ja emissioonisignaali koguti lainepikkusega 665 nm.

Eluea määramiseks mõõdeti emissioonisignaali tugevust ajahetkedel 0 – 795 μ s pärast ergastamist. Analüüsiks kasutati andmeid alates 55 μ s, kasutades ühefaasilise kustumise mudelit.

4.2. Orgaaniline süntees

4.2.1. ARC-2304 [AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg)₂-DLys(Ahx)-NH₂] süntees

1,66 mg (437 μ mol) HBTU-d lahustati 100 μ l DMF-is, pipeteeriti 1,68 mg (475 μ mol) Fmoc-6-Ahx-OH-le. Lisati 3,3 μ l NMM-i. Happe aktiveerimisreaktsioonil lasti kulgeda 5 min. 300 nmol (1 ekv) ARC-2300 lahustati 40 μ l DMF-is. Lisati 10 μ l Ahx-HBTU-NMM lahust (440 nmol/1,46 ekv HBTU; 480 nmol/1,58 ekv Ahx; 3 μ mol/10 ekv NMM). Reaktsiooniaeg oli 24 h. Reaktsioonisegu kuivatati lüofilisaatoriga. Seejärel lisati 50 μ l 20% piperidiini lahust, inkubeeriti 15 min ja kuivatati uuesti lüofilisaatoriga. Produkt puhastati HPLC-ga. Saagis oli 160 nmol (53%).

4.2.2. Inhibiitori märgistamine Sulfo-Cyanine5-bis-NHS ester fluorestsentsvärviga

Sulfo-Cyanine5-bis-NHS estrist valmistati ligikaudu 1 mM lahus DMF-is. Spektrofotomeetriliselt määrati lahuse täpseks kontsentratsiooniks 727,9 μ M. 100 nmol (1 ekv) ARC-2304-le [AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg)₂-DLys(Ahx)-NH₂] lisati 50 nmol (0,5 ekv) fluorestsentsvärvi lahust ja 1 μ l NMM-i (9100 nmol, 91 ekv).

Reaktsiooniaeg oli vähemalt 48 h. Reaktsioonisegu kuivatati lüofilisaatoriga. Produktide – dimeerne ARC-2305 {[AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg)₂-DLys(Ahx*)-NH₂]₂-Sulfo-Cyanine5} ja monomeerne ARC-2307 [AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg)₂-DLys(Ahx-Sulfo-Cyanine5-OH)-NH₂] – massid määrati HPLC-MS-iga ja produktid puhastati HPLC-ga.

Analoogselt toodud eeskirjaga märgistati ka teised inhibiitorid. ARC-2300 [AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg)₂-DLys-NH₂] produktideks olid dimeerne ARC-2302 {[AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg)₂-DLys(*)-NH₂]₂-Sulfo-Cyanine5} ja monomeerne ARC-2301 [AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg)₂-DLys(Sulfo-Cyanine5-OH)-NH₂]. ARC-668 [AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg)₆-DLys-NH₂] produktideks olid dimeerne ARC-2306 {[AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg)₆-DLys(*)-NH₂]₂-Sulfo-Cyanine5} ja monomeerne ARC-2308 [AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg)₆-DLys(Sulfo-Cyanine5-OH)-NH₂]. ARC-1529 produktideks olid dimeerne

ARC-2309 {[ASB-Suc-Ahx-(LAsp)₆-LLys(*)]₂-Sulfo-Cyanine5} ja monomeerne ARC-2310 [ASB-Suc-Ahx-(LAsp)₆-LLys(-Sulfo-Cyanine5-OH)]. ARC-ide struktuurid on toodud Lisa 1.

4.2.3. ARC-2300 [AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg)₂-DLys-NH₂] märgistamine perüleenvärviga (PTCDA)

300 nmol (1 ekv) ARC-2300 lahustati 30 µl DMF-is koos 0,1 µl (9100 nmol, 30 ekv) NMM-iga. PTCDA-st valmistati 8,5 mM suspensioon DMF-is, millest 17,6 µl (150 nmol, 0,5 ekv) lisati ARC-2300 lahusele. 30 min pärast reaktsiooni algust lisati 30 µl DMSO-d. Reaktsiooniaeg oli 1 nädal, seejärel reaktsioonisegu kuivatati lüofilisaatoriga. Produkt (dimeerne ARC-2303) puhastati HPLC-ga. Saagis oli 45 nmol (15%).

5. Tulemused ja arutelu

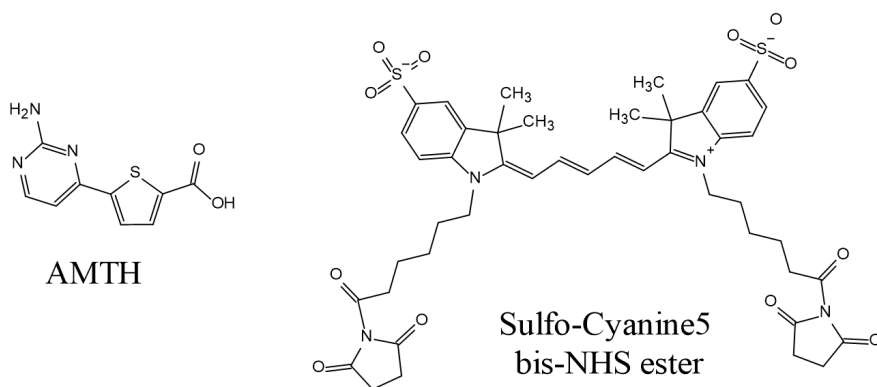
5.1. ARC-2302 {[AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg)₂-DLys(*)-NH₂]₂-Sulfo-Cyanine5} ja ARC-1063 [AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg)₆-DLys(Alexa-647)-NH₂] võrdlus

ARC-2300 ja sellest tuletatud ühendid on PKA inhibiitorid. Nende ühendite peptiidahela moodustavad kaks arginiini ja lüsiini ning adensiini analoogiks on AMTH (Joonis 6). ARC-2300 süntees viidi läbi tahke faasi peptiidsünteesi eeskirja järgi.

Esimeseks selle töö käigus sünteesitud dimeeriks oli ARC-2302 (Tabel 1). Selle ühendi lähteaineks oli ARC-2300, mis märgistati bifunktsionaalse Sulfo-Cyanine5 fluorestsentsvärviga (Joonis 6). Fluorestsentsmärgistamise käigus tekkis väikses koguses ka monomeerset ARC-2301, kuid mitte piisavalt katsetes kasutamiseks. Seetõttu kasutati ARC-2302-ga võrdlemiseks monomeerset ARC-1063, mille peptiidiahelas on kuus arginiini ja mis on märgistatud värviga Alexa647, mis on oma struktuurilt ja luminescentsomadustelt sarnane Sulfo-Cyanine5 värviga.

Tabel 1: ARC-ide struktuurid. * – fluorestsentsvärvi liitumiskoht.

ARC kood	Struktuur
ARC-2300	AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg) ₂ -DLys-NH ₂
ARC-2302	[AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg) ₂ -DLys(*)-NH ₂] ₂ -Sulfo-Cyanine5
ARC-1063	AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg) ₆ -DLys(Alexa-647)-NH ₂



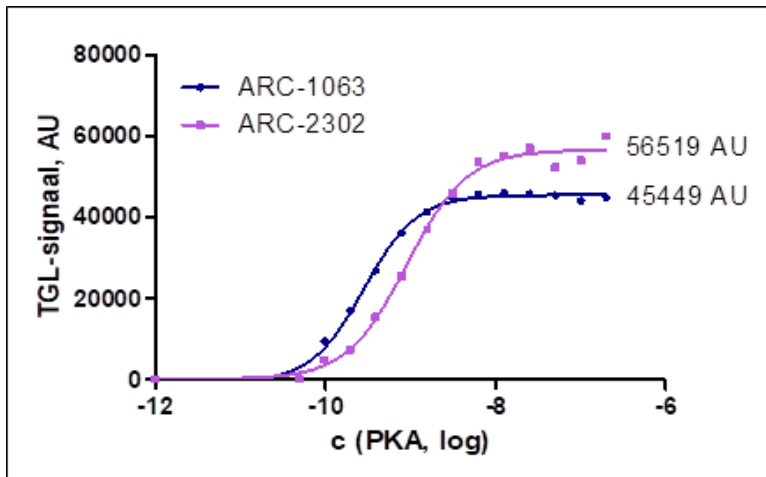
Joonis 6: AMTH ja Sulfo-Cyanine5 värvi struktuurid.

5.1.1. Sidumiskatse PKA-ga

ARC-2302 ja ARC-1063 võrreldi sidumiskatses, kus sonde lisati PKA lahjendusseeriale. Mõõdeti TGL-signaali (Graafik 1) ja fluorestsentsi anisotroopiat (Graafik 2). TGL-signaali ja fluorestsentsi anisotroopia mõõtmise eesmärgiks oli tõestada kolmikkompleksi tekkimist, võrreldes PKA sidumisgraafikuid dimeerse ja monomeerse sondi korral. Kui kogu lahuses olev dimeerne sond osaleb kolmikkomplekside moodustamises, siis peaks nägema, et

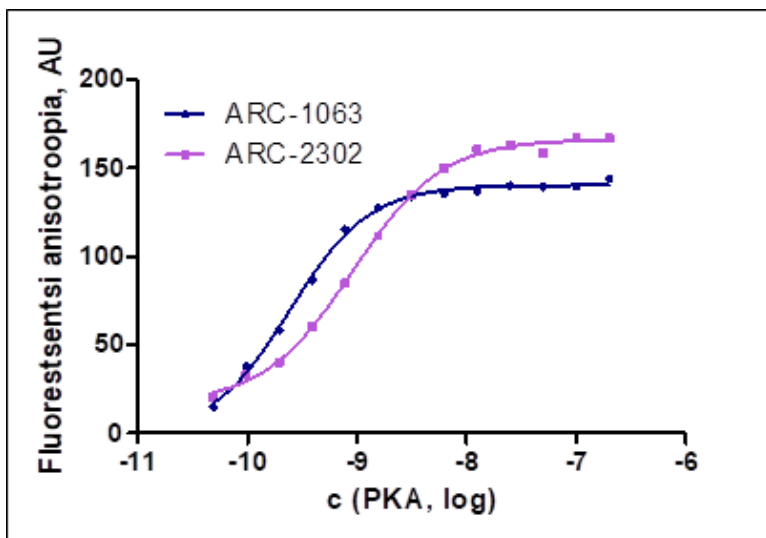
sidumiskõvera ülemisel platool on TGL-signaali dimerse sondi korral ligikaudu kaks korda kõrgem kui monomeerse sondi korral. Kui aga kolmikkompleksi ei teki, siis peaks mõlemad sondid andma ligikaudu sama suure signaali.

Lisaks mõõdeti fluorestsentsi intensiivsust, et näidata sondide kontsentratsioone süvendites (Lisa 2). Selgus, et ARC-1063 kontsentratsioon oli 1,79 korda suurem kui ARC-2302 kontsentratsioon. Seetõttu annab ARC-1063 TGL-i graafikul mõnevõrra kõrgema signaali, kui oodatud.



Graafik 1: TGL-signaali sõltuvus PKA kontsentratsioonist. Graafikul on toodud ülemiste platoode TGL-signaali väärtused.

Graafik 1 on näha ~1,2-kordset erinevust dimerse ARC-2302 ja monomeerse ARC-1063 TGL-signaali platoode kõrguses. Kui aga normeerida saadud tulemus fluorestsentsi intensiivsuse graafiku (Lisa 2) põhjal, siis on tulemuseks ~2,23-kordne erinevus. Sellest võib järeldada, et tõenäoliselt on tekkinud kolmikkompleksi.



Graafik 2: Fluorestsentsi anisotroopia sõltuvus PKA kontsentratsioonist.

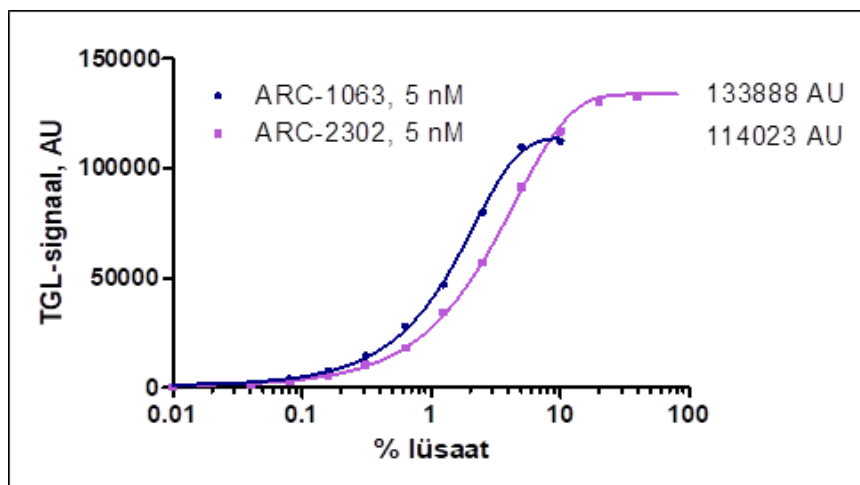
Graafik 2 on näha, et dimeerse ARC-2302 kompleksi fluorestsentsi anisotroopia signaal ülemisel platool on kõrgem, kui monomeerse ARC-1063 puhul. See viitab samuti kolmikkompleksi tekkimisele, sest kolmikkompleks on kaksikkompleksist suurem ja pöörleb lahuses aeglasemalt, andes kõrgema anisotroopia.

5.1.2. Luminestsentsi kustumine, algintensiivsuse ja eluea määramine

Keskmise luminestsentsi algintensiivsuse (I_0) ja eluea (τ) määramisel saadi kinaasi komplekside jaoks järgmised tulemused: $I_0(\text{ARC-2302}) = 8343 \pm 472 \text{ AU}$, $\tau(\text{ARC-2302}) = 80 \pm 3$, $I_0(\text{ARC-1063}) = 6599 \pm 257 \text{ AU}$, $\tau(\text{ARC-1063}) = 82 \pm 4$. Neid väärtusi mõjutab inhibeeriva osa struktuur, mis on ARC-2302 ja ARC-1063 puhul erinev. Seepärast ei ole otsene võrdlus võimalik.

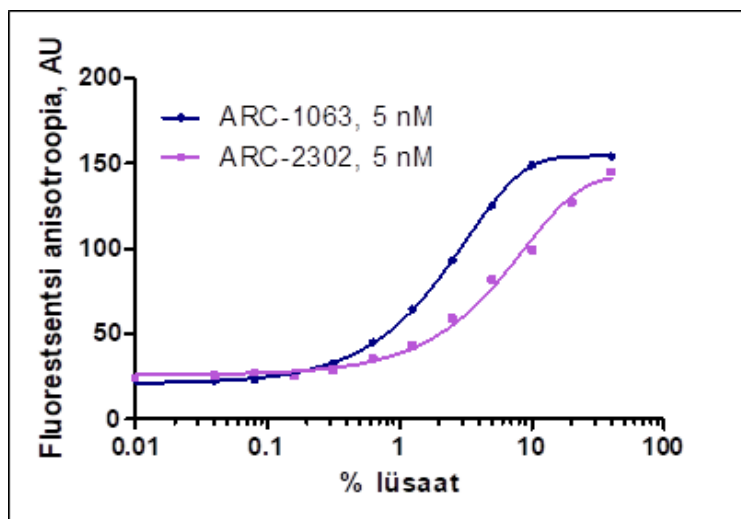
5.1.3. Sidumiskatse lüsaadiga

ARC-2302 ja ARC-1063 võrreldi sidumiskatses, kus sonde lisati vereliistakute lüsaadi lahjendusserieale (Graafik 3). Lüsaadikatse eesmärgiks oli tõestada, et sünteesitud ARC-Lumid sobivad sondina kasutamiseks ka keerulistes bioloogilistes segudes.



Graafik 3: TGL-signaali sõltuvus lüsaadi kontsentratsioonist. Graafikul on toodud ülemiste platoode TGL-signaali väärtused.

Lüsaadi sidumisgraafikul on samuti näha ~1,2-kordset erinevust ARC-2302 ja ARC-1063 TGL-signaali platoode kõrguses. Seega võib kolmikkompleksi tekkimist oletada ka rakulüsaadis.



Graafik 4: Fluorestsentsi anisotroopia signaali sõltuvus lüsaadi kontsentratsioonist.

Graafik 4 on ARC-2302 ja ARC-1063 anisotroopia signaal platool sarnase väärtusega. Selles katses võis monomeerse sondi kõrge anisotroopia põhjuseks olla mittespetsiifiline seondumine teiste lüsaadi komponentidega. Erinevad kompleksid varjastavad fluorestsentsmärgist erinevalt, mis mõjutab anisotroopia signaali. Seetõttu on kolmikkompleksi tekkimise tõestamine lüsaadis raskendatud.

5.2. ARC-2303 {[AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg)2-DLys(*)-NH2]2-PTCDA}

ARC-2300 märgistamisel dimeerse perüleenvärviga saadi dimeerne ARC-2303. ARC-2303 ei olnud võimalik lahustada B3 puhvrise ega DMSO lisandiga puhvrise, sest ühend oli liiga hüdrofoobne. Seetõttu ei saanud ARC-2303-ga läbi viia sidumiskatseid. Edaspidistes töodes võib proovida perüleenvärviga märgistada mõnd suurema polaarsuse (suure laenguga) inhibiitorit, nt ARC-668.

5.3. ARC-2305 {[AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg)2-DLys(Ahx*)-NH2]2-Sulfo-Cyanine5} ja ARC-2307 [AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg)2-DLys(Ahx-Sulfo-Cyanine5-OH)-NH2] võrdlus

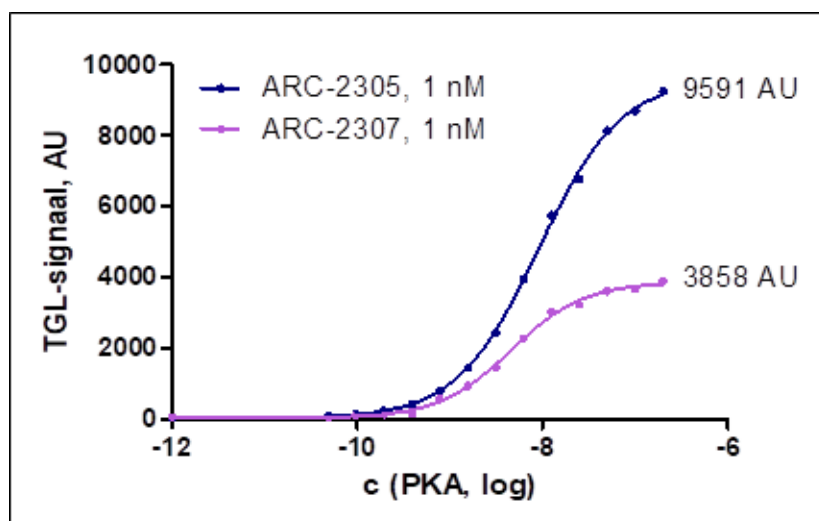
ARC-2304 sünteesimisel lisati ARC-2300 lüsiini vabale aminorühmale aminoheksaanhappe (Ahx) linker peptiidsidemega, et pikendada vahemaad molekuli inhibeeriva osa ja fluorestsentsmärgise vahel. Linkeri lisamine aitab vältida steerilisi takistusi kolmikkompleksi tekkimisel. ARC-2304 märgistamisel dimeerse Sulfo-Cyanine5 fluorestsentsvärviga saadi dimeerne ARC-2305 ja monomeerne ARC-2307. ARC-ide struktuurid on toodud Tabel 2.

Tabel 2: ARC-ide struktuurid. * – fluorestsentsvärvi liitumiskoht.

ARC kood	Struktuur
ARC-2300	AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg) ₂ -DLys-NH ₂
ARC-2304	AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg) ₂ -DLys(Ahx)-NH ₂
ARC-2305	[AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg) ₂ -DLys(Ahx*)-NH ₂] ₂ -Sulfo-Cyanine5
ARC-2307	AMTH-Ahx-DAla-Ahx-(DArg) ₂ -DLys(Ahx-Sulfo-Cyanine5-OH)-NH ₂

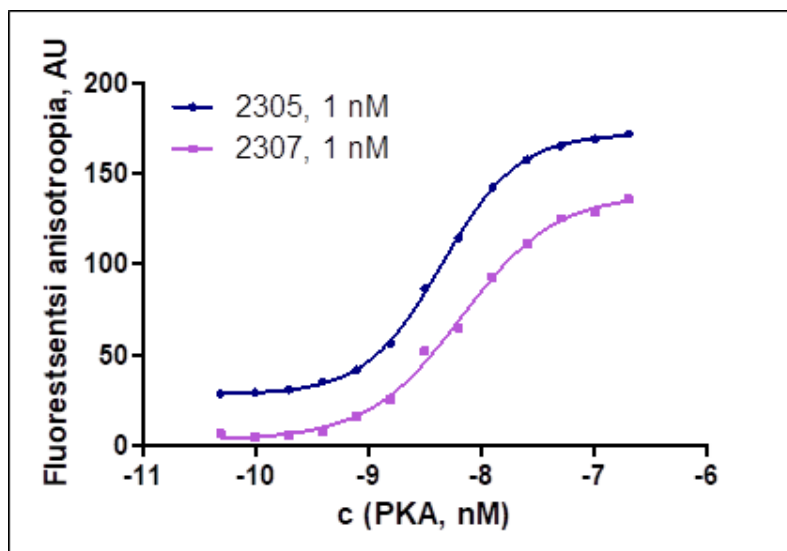
5.3.1. Sidumiskatse PKA-ga

Tehti sidumiskatse PKA lahjendusseeriaga, kus mõõdeti TGL-signaali (Graafik 5), fluorestsentsi anisotroopiat (Graafik 6). Lisaks mõõdeti fluorestsentsi intensiivsust (Lisa 3), millega tõestati, et sondide kontsentratsioonid süvendites on võrreldava väärtusega.



Graafik 5: TGL-signaali sõltuvus PKA kontsentratsioonist. Graafikul on toodud ülemiste platoode TGL-signaali väärtused.

Graafik 5 on näha, et dimeerse ARC-2305 kompleksi TGL-signaal ülemisel platool on ~2,49-kordne võrreldes vastava monomeerse ühendi ARC-2307-ga. See tõestab, et pea kogu ARC-2305 osaleb kolmikkomplekside moodustamises.



Graafik 6: Fluorestsentsi anisotroopia signaali sõltuvus PKA kontsentratsioonist.

Graafikul 6 on näha ARC-2305 ja ARC-2307 fluorestsentsi anisotroopia signaale. On näha, et kõvera ülemisel platool on dimeerse ARC-2305 kompleksi anisotroopia suurem kui monomeersel ARC-2307-l, mis tõestab samuti kolmikkompleksi tekkimist. ARC-2305 kõrgemat anisotroopiasignaali kõvera alumisel platool saab põhjendada sellega, et dimeerne ühend on ka vabalt lahuses olles suurem kui vastav monomeerne ühend.

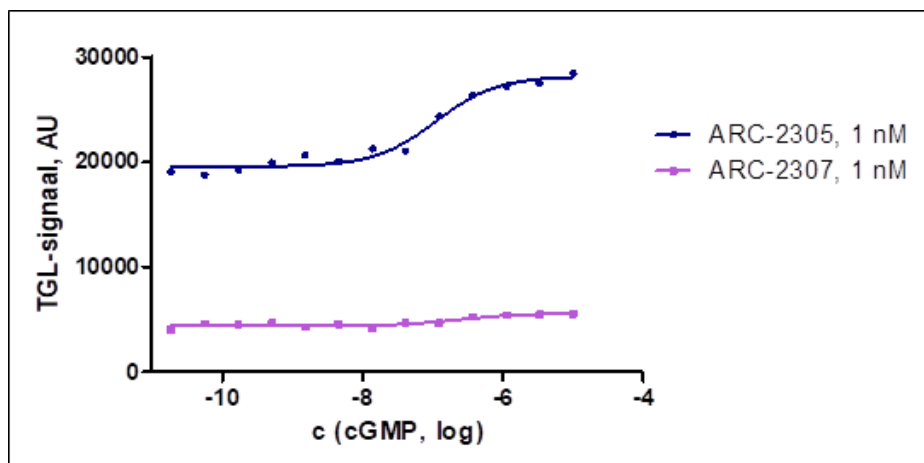
5.3.2. Luminestsentsi kustumine, algintensiivsuse ja eluea määramine

Mõõdeti ARC-2305 ja ARC-2307 komplekside luminestsentsi kustumist. Kustumiskõveraid analüüsiti ühefaasilise kustumise mudeli põhjal. Saadud funktsioonidest arvutati mõlema sondi jaoks keskmine luminestsentsi algintensiivsus (I_0) ja keskmine luminestsentsi eluiga (τ).

Leiti, et dimeerne ARC-2305 andis ligikaudu kaks korda kõrgema luminestsentsi algintensiivsuse võrreldes ARC-2307-ga (838 ± 47 AU vs. 409 ± 20 AU). Dimeerse ühendi keskmine luminestsentsi eluiga oli pisut pikem kui monomeersel ühendil (112 ± 11 μ s vs. 103 ± 5 μ s). Need tulemused kinnitavad püstitatud hüpoteesi. Enam kui kaks korda suurem algintensiivsus ja veidi pikem eluiga annavadki kokku üle kahe (antud juhul 2.5 korda) korra suurema intensiivsuse sidumiskatsete platoodel. See vihjab, et dimeersed sondid võiksid parandada ARC-lum sondidel põhinevate sidumiskatsete tundlikkust.

5.3.3. Lüsaadikatse cGMP lahjendusseeriaga

ARC-2305 ja ARC-2307-ga viidi läbi katse, kus sondi ja vereliistakute lüsaadi segu lisati cGMP lahjendusseeriale. Lüsaadi sisaldus segus oli 25%. On teada, et vereliistakute lüsaat sisaldab suures hulgas cGMP-sõltuvat proteiinkinaasi (PKG). PKG on dimeerne kinaas ja seepärast võiks see hästi seonduda dimeerse sondiga.



Graafik 7: TGL-signaali sõltuvus cGMP kontsentratsioonist.

Graafik 7 on näha, et kõrgemate cGMP kontsentratsioonide juures tõuseb dimeerse ühendi TGL-signaal suhteliselt rohkem kui monomeersel võrdlusainel. cGMP kontsentratsiooni tõusmisel aktiveerub lüsaadis olev PKG, mis seondub dimeerse sondiga, kompleksi tekkimine põhjustab TGL-signaali tõusu.

5.4. ARC-2306 {[AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg)₆-DLys(*)-NH₂]₂-Sulfo-Cyanine5} ja ARC-2308 [AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg)₆-DLys(Sulfo-Cyanine5-OH)-NH₂] võrdlus

Dimeerne ARC-2306 ja monomeerne ARC-2308 saadi ARC-668 märgistamisel Sulfo-Cyanine5 fluorestsentsvärviga. Sarnaselt ARC-2300 ja ARC-2304-ga on ARC-668 PKA inhibiitor, kuid erineb eelnevatest sellepolest, et ARC-668 peptiidiahelas on kahe arginiini asemel kuus arginiini (Tabel 3).

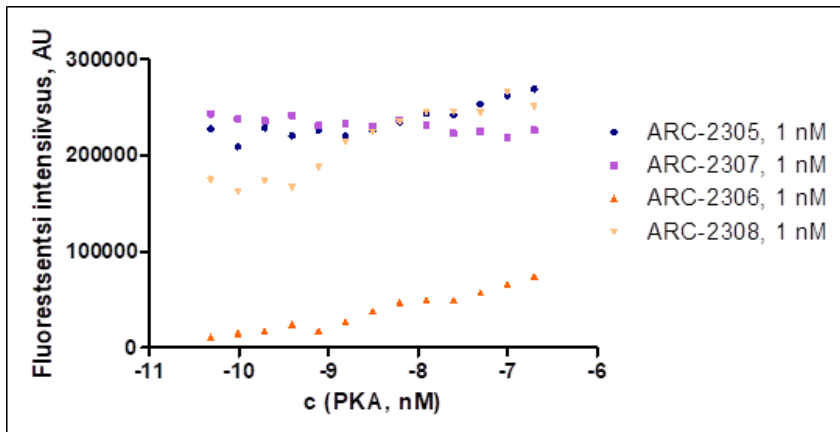
Tabel 3: ARC-ide struktuurid. * – fluorestsentsvärvi liitumiskoht.

ARC kood	Struktuur
ARC-668	AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg) ₆ -DLys-NH ₂
ARC-2306	[AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg) ₆ -DLys(*)-NH ₂] ₂ -Sulfo-Cyanine5
ARC-2308	AMTH-Ahx-DArg-Ahx-(DArg) ₆ -DLys(Sulfo-Cyanine5-OH)-NH ₂

5.4.1. Sidumiskatse PKA-ga

ARC-2306 ja ARC-2308 komplekse ei õnnestunud võrrelda TGL-signaali põhjal, kuna ARC-2306 kontsentratsioon süvendites oli oluliselt madalam võrdlusaine kontsentratsioonidest. See ilmneb fluorestsentsi intensiivsuse graafikult (Graafik 8), mis näitab sondi hulka süvendites. Seda põhjendatakse asjaoluga, et ARC-2306 on neutraalses lahuses tugevalt positiivselt laetud

(+13), mistõttu adsorbeerub sond lahjenduste tegemise käigus plastiku (katsutite, pipetiotsikute) pinnale ning sondi tegelik kontsentratsioon ei vasta oodatavale.



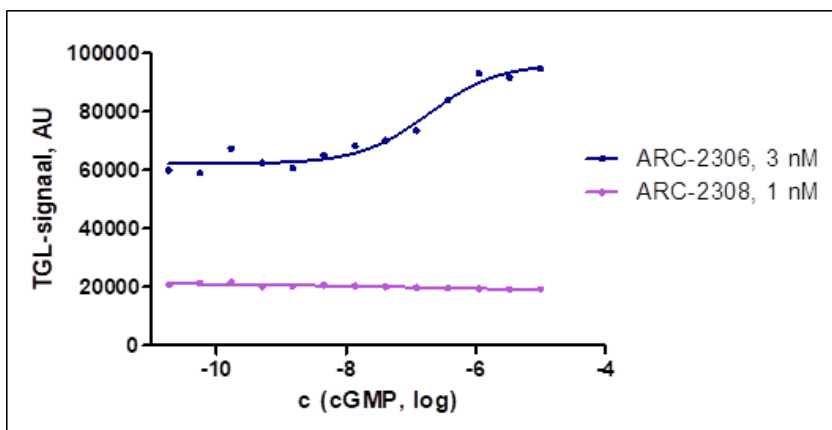
Graafik 8: Fluorestsentsi intensiivsuse sõltuvus PKA kontsentratsioonist.

5.4.2. Luminestsentsi kustumine, algintensiivsuse ja eluea määramine

ARC-2306 ja ARC-2308 luminestsentsi intensiivsusi ei saanud selle katse põhjal korrektselt võrrelda, sest sondide kontsentratsioonid süvendites olid erinevad. Kui fluorestsentsi intensiivsuste järgi signaale normeerida, siis võiks eeldada dimeerse sondi korral üle kahe korra tugevamat signaali. Luminestsentsi eluiga oli dimeerse ARC-2306 puhul pisut pikem monomeerse ARC-2308 puhul ($146 \pm 14 \mu\text{s}$ vs. $115 \pm 7 \mu\text{s}$).

5.4.3. Lüsaadikatse cGMP lahjendusseeriaga

Selles katses lisati sondi ja lüsaadi (25%) segu cGMP lahjendusseeriale (Graafik 9).



Graafik 9: TGL-signaali sõltuvus cGMP kontsentratsioonist.

ARC-2306 kao määra lahjenduste tegemisel püüti hinnata ja kompenseerida kontsentreerituma lahuse valmistamisega. Selle katse puhul sondi kadu ülehinnati ja lõppkontsentratsioon süvendis oli suurem kui võrdlusainel, mida on näha fluorestsentsi

intensiivsuse graafikult (Lisa 4). Siiski saab võrrelda cGMP kontsentratsiooni mõju kummagi sondi TGL-signaali. Nagu ARC-2305 korral (Graafik 7), on ka selles katses näha, et dimeerse sondi ARC-2308 korral TGL-signaali tõuseb suurte cGMP kontsentratsioonide juures, st PKG aktiveerumisel.

5.5. ARC-2309 {[ASB-Suc-Ahx-(LAsp)₆-LLys(*)]₂-Sulfo-Cyanine5} ja ARC-2310 [ASB-Suc-Ahx-(LAsp)₆-LLys(-Sulfo-Cyanine5-OH)] võrdlus

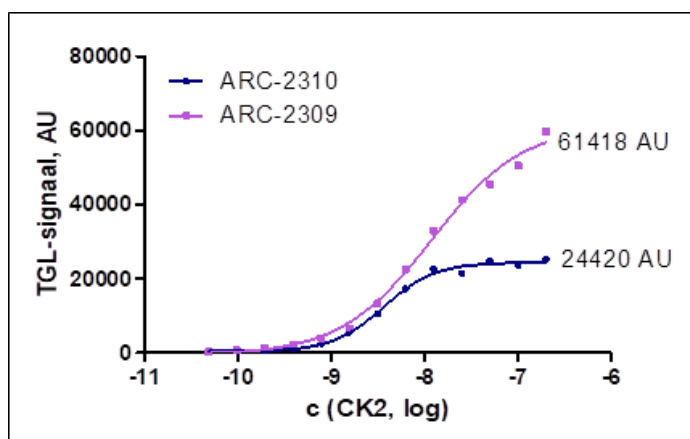
ARC-1529 on CK2 α inhibiitor, mille peptiidiahel koosneb kuuest aspargiinhappest ja lüsiinist ning adensiini analoogiks on ASB. ARC-1529 märgistamisel Sulfo-Cyanine5 fluorestsentsvärviga saadi dimeerne ARC-2309 ja monomeerne ARC-2310. ARC-ide struktuurid on toodud Tabel 4.

Tabel 4: ARC-ide struktuurid. * – fluorestsentsvärvi liitumiskoht.

ARC kood	Struktuur
ARC-1529	ASB-Suc-Ahx-(LAsp) ₆ -LLys
ARC-2309	[ASB-Suc-Ahx-(LAsp) ₆ -LLys(*)] ₂ -Sulfo-Cyanine5
ARC-2310	ASB-Suc-Ahx-(LAsp) ₆ -LLys(-Sulfo-Cyanine5-OH)

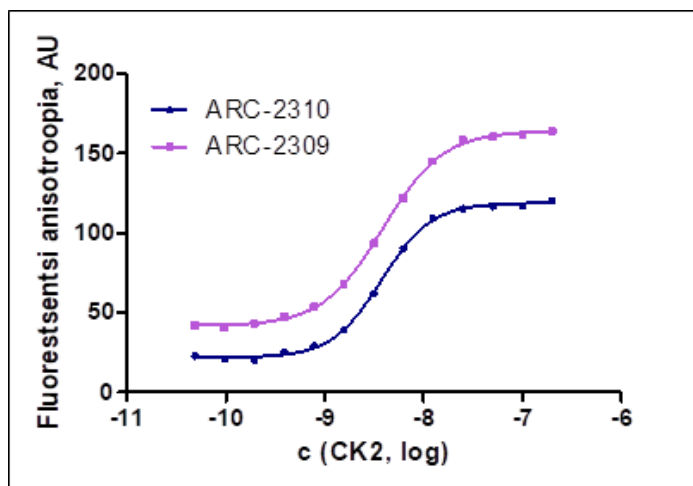
5.5.1. Sidumiskatse CK2 α -ga

ARC-2309 ja ARC-2310 võrreldi sidumiskatses CK2 α -ga. Mõõdeti TGL-signaali (Graafik 10) ja fluorestsentsi anisotroopiat (Graafik 11). Fluorestsentsi intensiivsuse mõõtmisega näidati, et sondide kontsentratsioonid süvendites olid võrreldava väärtusega (Lisa 5).



Graafik 10: TGL-signaali sõltuvus CK2 α kontsentratsioonist. Graafikul on toodud TGL-signaali väärtused ülemisel platool.

Graafik 10 on näha, et dimeerse ARC-2309 kompleksi TGL-signaali ülemisel platool on ~2,52 korda suurem kui monomeerse ARC-2310 kompleksi signaal. Seega saavad kolmikkompleksid moodustuda ka CK2 α -st ja selle inhibiitorist.



Graafik 11: Fluorestsentsi anisotroopia signaali sõltuvus CK2 α kontsentratsioonist

Kolmikkompleksi tekkimist on näha ka Graafik 11, kus dimeerse ARC-2309 kompleksi anisotroopia on kõrgem, kui monomeersel ARC-2310 kompleksil. Erinevus anisotroopia signaalide vahel on ülemisel platool kõrgem kui alumisel platool, sest suhteline suuruste erinevus kolmikkompleksi ja kaksikkompleksi vahel on suurem kui vaba dimeerse ja monomeerse sondi vahel.

5.5.2. Luminestsentsi kustumine, algintensiivsuse ja eluea määramine

Dimeerse ARC-2309 keskmine luminestsentsi algintensiivsus oli 350289 AU ja monomeerse ARC-2310 puhul 341011 AU. ARC-2309 keskmine eluiga oli $18 \pm 2 \mu\text{s}$ ja ARC-2310 eluiga $16 \pm 1 \mu\text{s}$. Seega mõlema sondi kompleksid CK2 α -ga andsid kõrge algintensiivsuse ja lühikese elueaga luminestsentssignaali. Leitud eluead olid madalamad võrreldes teise kirjanduses välja toodud ARC-Lum sondiga, kus ARC-1529 oli märgistatud fluorestsentsvärviga 5TAMRA (ARC-1530 $\tau = 39 \pm 6 \mu\text{s}$) [25]. Põhjuseks võib olla see, et FRET-i efektiivsus ASB ja 5TAMRA värvi vahel on suurem kui ASB ja Sulfo-Cyanine5 värvi vahel. CK2 α komplekside lühemat eluiga võrreldes PKA kompleksidega võib põhjustada see, et CK2 α kompleksis on ARC-Lum sond vähem varjatud luminestsentsi kustutajate eest. Usaldusväärsema tulemuse saamiseks võiks katset korrata suurema kontsentratsiooni juures ja hapnikuvabas keskkonnas.

6. Kokkuvõte

Selle magistritöö eesmärgiks oli sünteesida dimeerseid ARC-Lum sonde ja tõestada kolmikkomplekside tekkimist nende luminesentsomaduste uurimise kaudu. Püstitati hüpoteesid, et kolmikkompleksidel on kõrgem luminesentsi algintensiivsus ja pikem luminesentsi eluiga kui analoogsetel kaksikkompleksidel.

ARC-tüüpi inhibiitorite märgistamisel fluorestsentsvärviga saadi viis erinevat dimeerset ARC-Lum sondi. Dimeerseid sonde võrreldi vastavate monomeersete sondidega sidumiskatsetes, kus tekkinud komplekse uuriti luminesentsmeetodeid kasutades.

Katsete käigus leiti, et probleeme tekitas nii mittepolaarsest sondist (ARC-2303) kui ka tugeva positiivse laenguga sondist (ARC-2306) lahuste valmistamine. Tulevastes uurimistöodes võib proovida ühendada tugevalt laetud inhibiitori ja mittepolaarse fluorestsentsvärvi, et nende omadusi tasakaalustada.

Dimeersete ARC-2302, ARC-2305 ja ARC-2309 puhul tõestati kinaas-inhibiitor-kinaas kolmikkomplekside tekkimine nii TGL-signaali kui ka anisotroopia signaali analüüsimisel. Steerilise takistuse vähendamiseks ja kolmikkompleksi tekkimise soodustamiseks lisati ARC-2302 edasiarendusel ARC-2305-ks inhibiitoriosa ja fluorestsentsmärgise vahele vahelüli. Dimeerse ARC-2305 ja monomeerse ARC-2307 luminesentsi algintensiivsuse ja eluea võrdluses pidasid paika püstitatud hüpoteesid, et kolmikkompleksidel esineb kõrgem I_0 ja pikem τ kui kaksikkompleksidel. Seega võivad dimeersed sondid parandada ARC-lum sondidel põhinevate sidumiskatsete tundlikkust.

Lüsaadikatsetega kinnitati, et dimeersed ARC-Lum sondid sobivad kasutamiseks komplekssetes bioloogilistes segudes. cGMP lisamisel vereliistakute lüsaadi ja sondi segule leiti, et dimeersed ARC-2305 ja ARC-2306 seonduvad cGMP-sõltuva proteiinkinaasiga (PKG), mis on ka ise dimeerne ühend. Seetõttu võiks tulevikus edasi arendada dimeerseid PKG inhibiitoreid.

7. Summary

The aim of this master's thesis was to synthesize dimeric ARC-Lum probes and to prove the formation of triple complexes by studying their luminescence properties. It was hypothesized that triple complexes would exhibit a greater initial luminescence intensity (I_0) and lifetime (τ) compared to analogous dual complexes.

By labeling ARC-type inhibitors with fluorescent dyes, five different dimeric ARC-Lum probes were obtained. Dimeric probes were compared against their monomeric counterparts in binding experiments, where the complexes were studied using luminescence methods.

During the experimentation, preparing solutions of both a non-polar probe (ARC-2303) and a strongly positively charged probe (ARC-2306) proved to be challenging. In future studies, the non-polar fluorescent dye could be paired with the strongly charged inhibitor to balance their properties.

In dimeric ARC-2302, ARC-2305 and ARC-2309, the formation of a kinase-inhibitor-kinase triple complex was proven by analyzing the TGL signal and the anisotropy signal. To reduce steric hindrance and to promote the formation of a triple complex, a linker was added between the inhibiting part of the molecule and the fluorescent label, developing ARC-2302 to ARC-2305. Comparing the I_0 and τ of dimeric ARC-2305 and monomeric ARC-2307 confirmed the hypothesis that dimeric probes exhibit greater I_0 and τ than monomeric probes. Therefore, using dimeric probes may improve the sensitivity of ARC-Lum probe based binding assays.

The lysate experiments confirmed that dimeric ARC-Lum probes are suitable for using in complex biological mixtures. By adding cGMP to the mixture of a platelet lysate and a probe, it was found that dimeric ARC-2305 and ARC-2306 bind to cGMP-dependent protein kinase (PKG), which itself is dimeric. Therefore, the development of dimeric PKG inhibitors could be further explored in future studies.

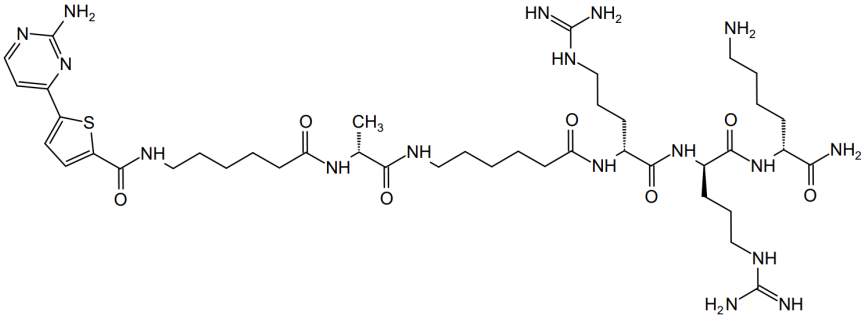
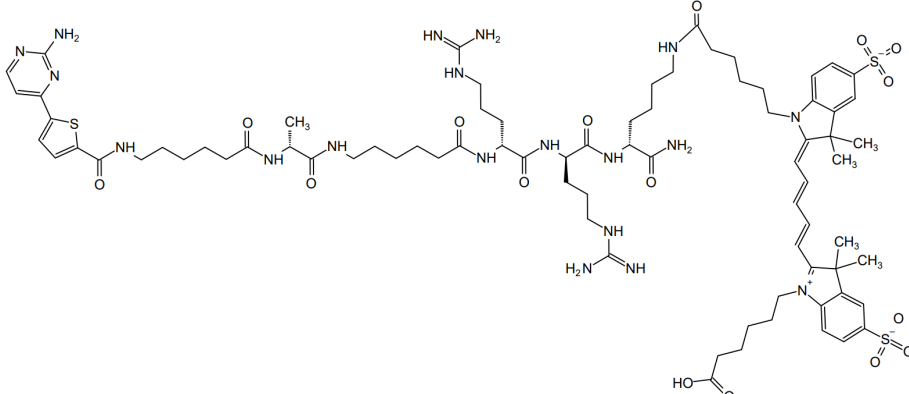
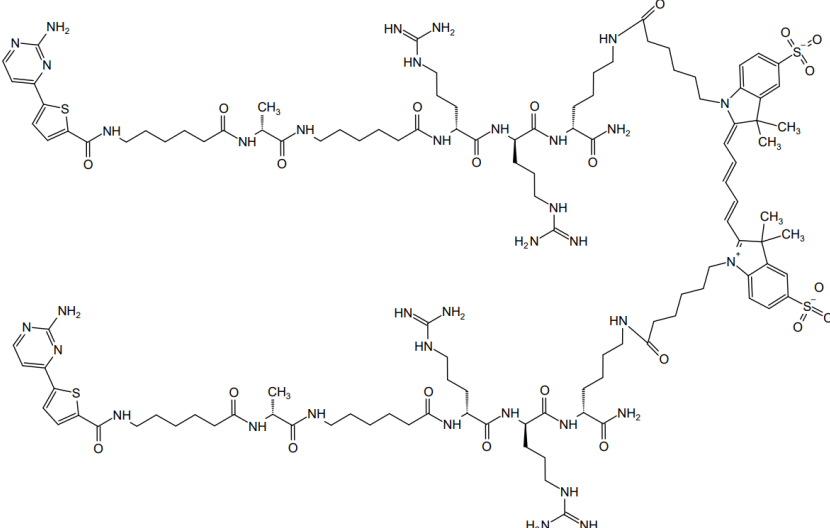
8. Allikad

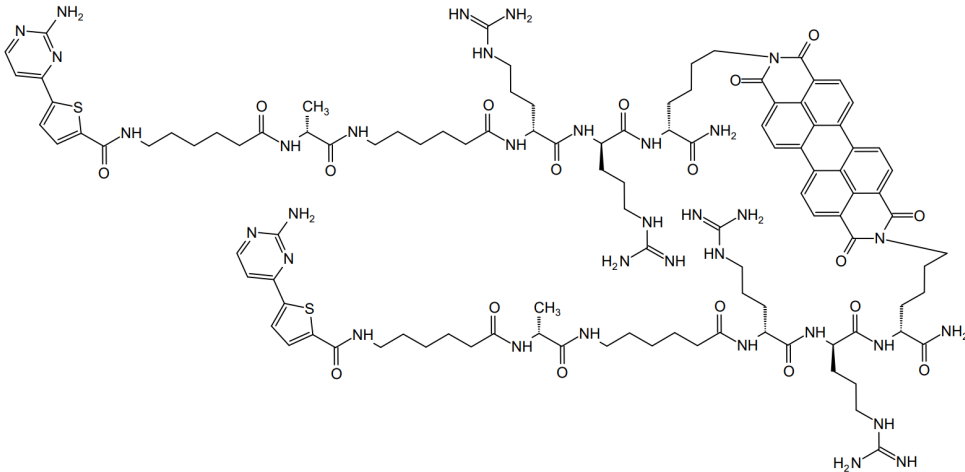
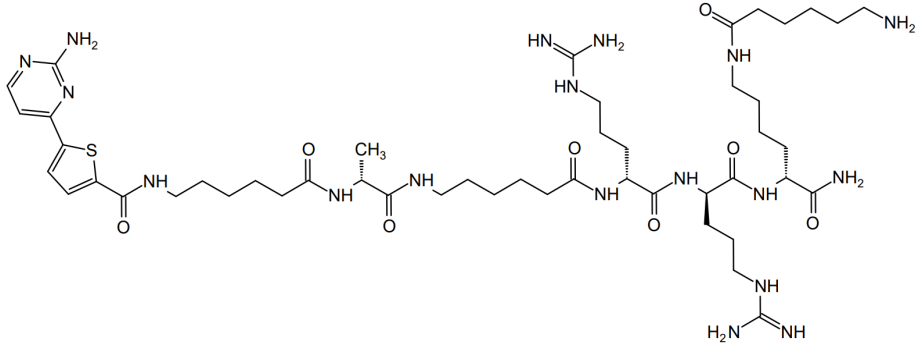
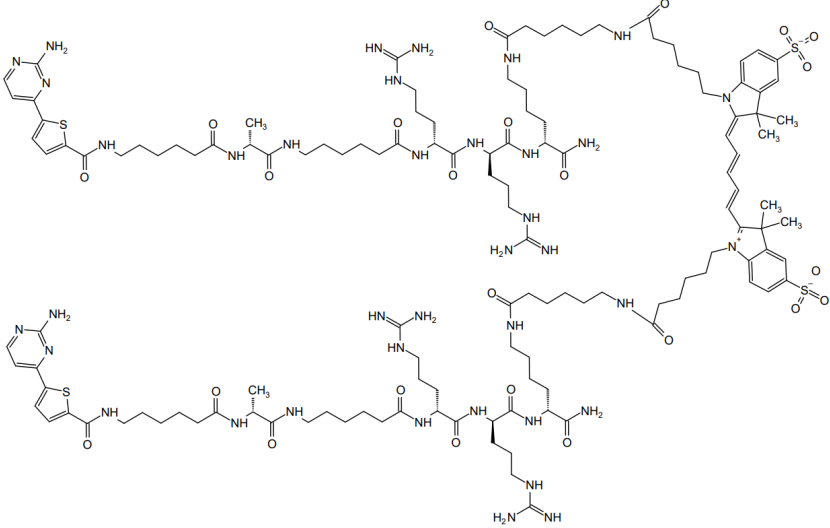
- [1] P. Cohen, The origins of protein phosphorylation, *Nature Cell Biology* 4 (2002) E127–E130.
- [2] H.-C. Cheng, R.Z. Qi, H. Paudel, H.-J. Zhu, Regulation and function of protein kinases and phosphatases, *Enzyme Research* 2011 (2011).
- [3] P. Cohen, Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century?, *Nature Reviews Drug Discovery* 1 (2002) 309–315.
- [4] M.A. Arslan, O. Kutuk, H. Basaga, Protein kinases as drug targets in cancer, *Current Cancer Drug Targets* 6 (2006) 623–634.
- [5] P. Gupta, A. Taiyab, M.I. Hassan, Emerging role of protein kinases in diabetes mellitus: From mechanism to therapy, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 124 (2021) 47–85.
- [6] Y. Liu, J. Chen, S.K. Fontes, E.N. Bautista, Z. Cheng, Physiological and pathological roles of protein kinase A in the heart, *Cardiovascular Research* 118 (2022) 386–398.
- [7] R. Roskoski Jr., Protein kinase inhibitors, (2024). <https://brimr.org/protein-kinase-inhibitors/> (accessed May 24, 2024).
- [8] D. Lavogina, E. Enkvist, A. Uri, Bisubstrate inhibitors of protein kinases: from principle to practical applications, *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery* 5 (2010) 23–34.
- [9] E. Enkvist, A. Vaasa, M. Kasari, M. Kriisa, T. Ivan, K. Ligi, G. Raidaru, A. Uri, Protein-induced long lifetime luminescence of nonmetal probes, *ACS Chemical Biology* 6 (2011) 1052–1062.
- [10] G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome, *Science* 298 (2002) 1912–1934.
- [11] N.C. Turner, M. Oliveira, S.J. Howell, F. Dalenc, J. Cortes, H.L. Gomez Moreno, X. Hu, K. Jhaveri, P. Krivorotko, S. Loibl, others, Capivasertib in hormone receptor–positive advanced breast cancer, *New England Journal of Medicine* 388 (2023) 2058–2070.
- [12] S.M. Usama, B. Zhao, K. Burgess, Fluorescent kinase inhibitors as probes in cancer, *Chemical Society Reviews* 50 (2021) 9794–9816.
- [13] C. Liu, Y. Zhang, W. Sun, H. Zhu, M. Su, X. Wang, X. Rong, K. Wang, M. Yu, W. Sheng, others, A novel GSH-activable theranostic probe containing kinase inhibitor for synergistic treatment and selective imaging of tumor cells, *Talanta* 260 (2023) 124567.
- [14] J. Inserte, D. Garcia-Dorado, The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism, *British Journal of Pharmacology* 172 (2015) 1996–2009.
- [15] T. Zhao, H. Jia, L. Li, G. Zhang, M. Zhao, Q. Cheng, J. Zheng, D. Li, Inhibition of CK2 enhances UV-triggered apoptotic cell death in lung cancer cell lines, *Oncology Reports* 30 (2013) 377–384.
- [16] A. Visentin, E. Ruggeri, F. Frezzato, M. Pizzi, A. Cellini, F. Angotzi, C.A. Cavarretta, V. Ruocco, S. Pravato, F. Severin, others, P054: The Kinase CK2 is deregulated and targetable in classical Hodgkin Lymphoma, *HemaSphere* 6 (2022) 24.
- [17] O.E. Nonga, D. Lavogina, E. Enkvist, K. Kestav, A. Chaikuad, S.E. Dixon-Clarke, A.N. Bullock, S. Kopanchuk, T. Ivan, R. Ekambaram, others, Crystal Structure-Guided Design of Bisubstrate Inhibitors and Photoluminescent Probes for Protein Kinases of the PIM Family, *Molecules* 26 (2021) 4353.
- [18] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer science & business media, 2013.
- [19] T. Förster, Transfer mechanisms of electronic excitation energy, *Radiation Research Supplement* (1960) 326–339.

- [20] M. Vestman, ARC-Lum(Fluo) ühendite sünteesimine suures skaalas, Tartu Ülikool, 2022. <http://hdl.handle.net/10062/85934>.
- [21] H. Kautsky, Quenching of luminescence by oxygen, *Transactions of the Faraday Society* 35 (1939) 216–219.
- [22] S. Mukherjee, P. Thilagar, Recent advances in purely organic phosphorescent materials, *Chemical Communications* 51 (2015) 10988–11003. <https://doi.org/10.1039/C5CC03114A>.
- [23] L. Zhang, X. Zheng, W. Deng, Y. Lu, S. Lechevallier, Z. Ye, E.M. Goldys, J.M. Dawes, J.A. Piper, J. Yuan, others, Practical implementation, characterization and applications of a multi-colour time-gated luminescence microscope, *Scientific Reports* 4 (2014) 6597.
- [24] A. Vaasa, I. Viil, E. Enkvist, K. Viht, G. Raidaru, D. Lavogina, A. Uri, High-affinity bisubstrate probe for fluorescence anisotropy binding/displacement assays with protein kinases PKA and ROCK, *Analytical Biochemistry* 385 (2009) 85–93.
- [25] J. Vahter, K. Viht, A. Uri, G. babu Manoharan, E. Enkvist, Thiazole-and selenazole-comprising high-affinity inhibitors possess bright microsecond-scale photoluminescence in complex with protein kinase CK2, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 26 (2018) 5062–5068.
- [26] E. Enkvist, M. Kriisa, M. Roben, G. Kadak, G. Raidaru, A. Uri, Effect of the structure of adenosine mimic of bisubstrate-analog inhibitors on their activity towards basophilic protein kinases, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (2009) 6098–6101.
- [27] sulfo-Cyanine5 bis-NHS ester, Lumiprobe (n.d.). <https://www.lumiprobe.com/p/sulfo-cy5-bis-nhs-ester> (accessed May 27, 2024).

9. Lisad

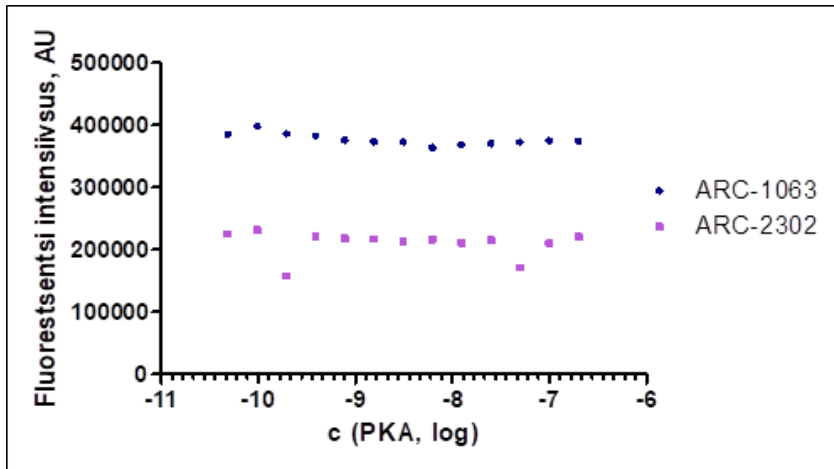
Lisa 1: ARC-ide ja ARC-Lum-ide struktuurid

Kood	Struktuur
ARC-2300	 <p>The structure of ARC-2300 is a long-chain polyamide. It begins with a 2-aminoimidazole ring system attached to a thiophene ring. This thiophene ring is linked via a carbonyl group to a long aliphatic chain. This chain is further extended by a series of amide linkages, including a methyl group and a guanidino group. The chain terminates in a primary amide group.</p>
ARC-2301	 <p>The structure of ARC-2301 is a complex polyamide. It features the same starting thiophene-imidazole chain as ARC-2300. This chain is linked to a long aliphatic chain, which is then connected to a guanidino group. The structure is highly branched, with multiple amide linkages and a terminal guanidino group. It also includes a methyl group and a sulfonamide group.</p>
ARC-2302	 <p>The structure of ARC-2302 is a complex polyamide, similar to ARC-2301. It features the same starting thiophene-imidazole chain. The structure is highly branched, with multiple amide linkages and a terminal guanidino group. It also includes a methyl group and a sulfonamide group.</p>

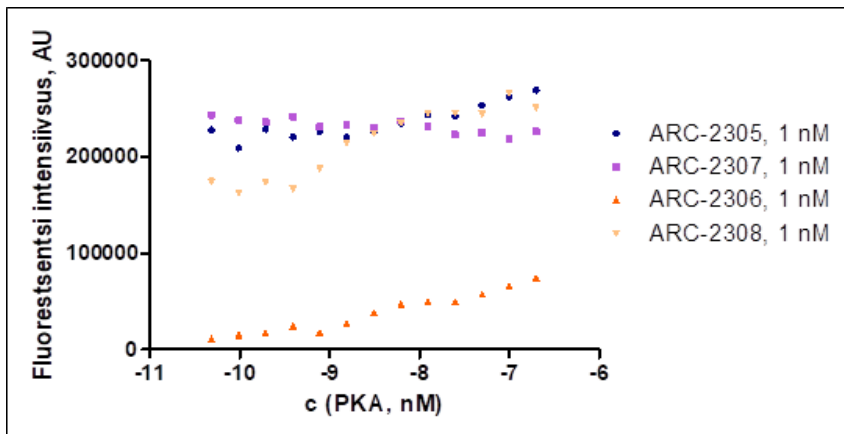
<p>ARC-2303</p>	 <p>The structure of ARC-2303 is a complex molecule featuring a central chain of amide linkages. It includes a 2-aminothiazole ring on the left, a methyl group (CH₃) on the second amide nitrogen, and a large, multi-ring system on the right that includes a benzimidazole-like core with a carbonyl group. Several guanidino groups (HN=C(NH₂)₂) are attached to the chain, and a long-chain primary amide is also present.</p>
<p>ARC-2304</p>	 <p>The structure of ARC-2304 is similar to ARC-2303 but lacks the large multi-ring system on the right. It features the 2-aminothiazole ring, the methyl group, and the guanidino groups, but instead has a long-chain primary amide (NH-(CH₂)₆-NH₂) attached to the chain.</p>
<p>ACR-2305</p>	 <p>The structure of ACR-2305 is a dimeric molecule consisting of two ARC-2304-like units. Each unit has the 2-aminothiazole ring, methyl group, and guanidino groups. The two units are linked to each other via a central chain that includes a bis-guanidino group and a bis-amine group. Additionally, each unit is linked to a large, complex polycyclic system on the right, which features a central nitrogen atom bonded to two methyl groups (CH₃) and two sulfonate groups (SO₃⁻).</p>

<p>ARC-2309</p>	
<p>ARC-2310</p>	
<p>ARC-668</p>	
<p>ARC-1529</p>	

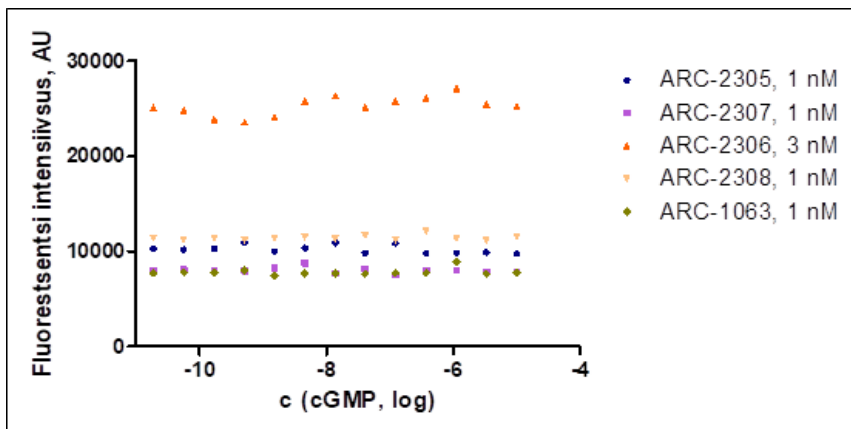
Lisa 2: Fluorestsentsi intensiivsuse sõltuvus PKA kontsentratsioonist ARC-1063 ja ARC-2302 sidumiskatses PKA-ga.



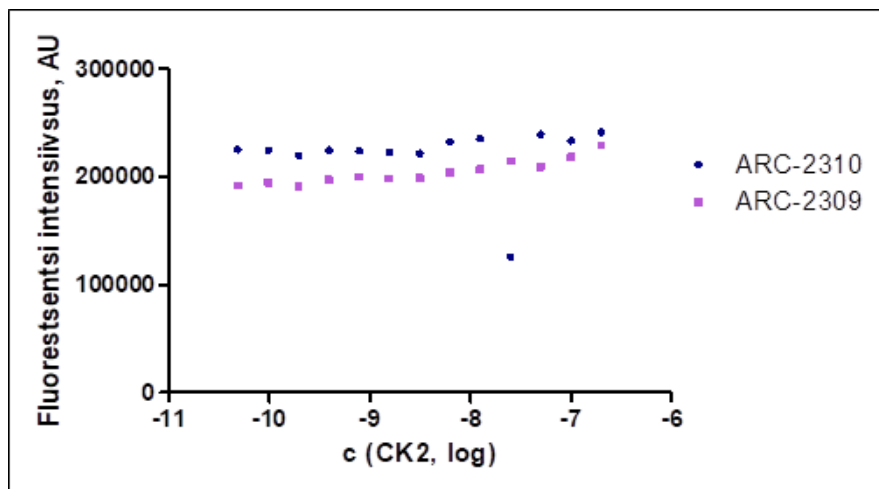
Lisa 3: Fluorestsentsi intensiivsuse sõltuvus PKA kontsentratsioonist ARC-2305, ARC-2307, ARC-2306 ja ARC-2308 sidumiskatses PKA-ga.



Lisa 4: Fluorestsentsi intensiivsuse sõltuvus cGMP kontsentratsioonist ARC-2305, ARC-2307, ARC-2306, ARC-2308 ja ARC-1063 sidumiskatses PKG-ga.



Lisa 5: Fluorestsentsi intensiivsuse sõltuvus CK2 α kontsentratsioonist ARC-2309 ja ARC-2310 sidumiskatses CK2 α -ga.



10. Infoleht

Dimeersete ARC-Lum sondide arendamine ja kinaas-inhibiitor-kinaas kolmikkomplekside uurimine

Selle töö eesmärgiks oli sünteesida dimeerseid ARC-Lum sonde ja tõestada kolmikkomplekside tekkimist nende luminesentsomaduste uurimise kaudu. Töö käigus sünteesiti viis dimeerset ARC-Lum sondi, mida võrreldi vastavate monomeersete sondidega. TGL- ja anisotroopia signaalide analüüsimisel tõestati kolmikkomplekside tekkimine. Näidati, et kolmikkomplekside luminesentsi algintensiivsus ja eluiga on pikem kui kaksikkompleksidel. Samuti näidati, et dimeersed ühendid seonduvad vereliistakute lüsaadis oleva PKG-ga.

Märksõnad: ARC-Lum, dimeer, kolmikkompleks

Development of dimeric ARC-Lum probes and study of kinase-inhibitor-kinase triple complexes

The aim of this thesis was to synthesize dimeric ARC-Lum probes and to prove the formation of triple complexes by studying their luminescence properties. Five dimeric ARC-Lum probes were synthesized and compared against their monomeric counterparts. By analyzing the TGL and anisotropy signals, the formation of triple complexes was proven. It was shown that triple complexes exhibit a greater initial luminescence intensity and lifetime compared to dual complexes. It was also shown that dimeric compounds bind to the PKG found in platelet lysate.

Keywords: ARC-Lum, dimer, triple complex

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Marju Vestman,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose Dimeersete ARC-Lum-sondide arendamine ja kinaas-inhibiitor-kinaas kolmikkomplekside uurimine,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Erki Enkvist,

(juhendaja nimi)

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Marju Vestman
27.05.2024