

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Keemia instituut

Dmitri Solntsev

**cAMP-SÕLTUVA PROTEIINKINAASI INHIBEERIMINE MÕNINGATE
FOSFAATRÜHMA SISALDAVATE LIGANDIDEGA**

Magistritöö

Juhendajad: Aleksei Kuznetsov, PhD

Jaak Järv, professor

Tartu 2011

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	3
1. SISSEJUHATUS.....	4
2. ÜLEVAADE KIRJANDUSEST.....	6
2.1 Proteiinkinaaside liigitus.....	6
2.2 cAMP–sõltuv proteiinkinaas.....	7
2.2.1 Aktiveerimise mehhanism.....	7
2.2.2 Katalüütilise alaühiku struktuur.....	7
2.2.3 Fosforüleerimise kineetiline mehhanism.....	10
2.2.4 C–alaühiku aktiivsuse regulatsiooni võimalusi.....	10
2.3 Proteiinkinaas A inhibiitorid.....	11
2.3.1 Inhibiitorite toime iseloomustamine.....	11
2.3.2 Proteiinkinaaside inhibiitorid.....	12
3. TÖÖ EESMÄRGID.....	14
4. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	15
4.1 Kemikaalid.....	15
4.2 Proteiinkinaasi aktiivsuse määramine ja inhibeerimine.....	15
4.3 Andmetöötlus.....	16
5. TULEMUSED JA ARUTELU.....	17
KOKKUVÕTE.....	23
SUMMARY.....	24
TÄNUAVALDUS.....	25
KASUTATUD KIRJANDUS.....	26

KASUTATUD LÜHENDID

ADP	adenosiin-5'-difosfaat
AMP	adenosiin-5'-monofosfaat
AMP-PNP	5'-adenüülilimido-difosfaat
ATP	adenosiin-5'-trifosfaat
BSA	bovine serum albumin
C	proteiinkinaasi A katalüütiline alaühik
cAMP	tsükliiline adenosin-3',5'-monofosfaat
FBP	fruktoos 1,6-bisfosfaat
LRRASLG	kemptiid, Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly
PEP	fosfoenoolpüruvaat
PKA, cAPK	proteiinkinaas A, cAMP-sõltuv proteiinkinaas
PKI	termostabiilne proteiinkinaasi inhibiitor
R	proteiinkinaas A regulatoorne alaühik
TRIS	tris(hüdroksümetüül)-aminmetaan

1. SISSEJUHATUS

Rakkude võime võtta vastu väliskeskkonnast saabuvald signaale ning neile reageerida on nende elutegevuseks tarvilik fundamentaalne omadus ning tagab paljurakulistes organismide erinevate osade kooskõlastatud tegevuse. Kuigi signaalide ja neile antavate vastuste arv on suur, kasutavad rakud ainult piiratud hulka signaalide keemilise ülekande viise. Neist viisidest on kõige enam levinud valkude reguleerimine fosforüleerimise. Selle reguleerimismehhanismi aluseks on valgumolekuli kovalentne modifitseerimine ühe või enama fosfaatühme poolt, mis omakorda muudab valgumolekuli aktiivsust. Selle reguleerimismehhanismi toimimise eest vastutavad proteiinkinaasid (või ATP-fosfotransferaasid), mis liidavad valguga fosfaadi ning fosfataasid, mis muudavad selle signaalsüsteemimehhanismi pöörduvaks. Neist esimesed ensüümid kannavad ATP molekulis gamma asendis oleva fosfaatühme üle erinevatele valkudele (Nelson and Cox 2009) ja teised ensüümid eemaldavad fosfaatühme. On kindlaks määratud, et 30 – 50% eukariotiliste rakkude valkudest on *in vivo* süsteemis fosforüleeritavad ja seega toimub nende aktiivsuse reguleerimine läbi reguleeriva fosforüleerimise mehhanismi (Pinna and Ruzzene 1996). Seetõttu on need proteiinkinaasid ja fosfataasid muutunud selle signaali ülekande mehhanismi uurimise võtmeobjektideks.

Reguleeriva fosforüleerimise abil kontrollitakse ainevahetust (süsivesikute ja lipiidide metabolismi), DNA transkriptsiooni ja replikatsiooni, organelide liikumist rakus ja lihaste kontraktsiooni (Hunter 1994). Mõiste “reguleeriva” tähendab seda, et reaktsioonide ahela üldist kiirust limiteerib ühe teatud valgumolekuli aktiivsus, mida reguleeritakse fosforüleerimise kaudu. Fosforüleerimise kiirus ja täpsus määravad seega kogu reguleerimismehhanismi toimimise.

Nagu märgitud, on proteiinkinaaside toimimise põhimõtteks ATP γ -fosfaatühme ülekande reguleeritavate valkude seriini, treoniini või türosiini jäägile, mis põhjustab muutuse valgumolekuli struktuuris, funktsioonides või aktiivsuses. Peale nende klassikaliste fosforüleerimise kohtade on tuntud ka mõned teised variandid, mis on aga tunduvalt vähem levinud. See, millisele valgumolekulile fosfaatühme üle kantakse, on aga määratud fosforüleerimise koha struktuuri poolt, millise tunneb ära proteiinkinaasi peptiidi sidumise tsenter. Kuna see molekulaarne äratundmine on kriitilise tähtsusega, on seda tagavaid spetsiifilisuse mehhanisme ka põhjalikult uuritud.

Teine reaktsioonis osalev substraat on ATP, mis peab olema kompleksis Mg^{2+} -ioonidega (Adams 2001). See substraat osaleb kõikide proteiinkinaaside korral ning on seega nn universaalne substraat. Seetõttu selle ligandi sidumist on sageli vaadeldud kui erinevate proteiinkinaaside jaoks sarnast protsessi. See asjaolu põhjendab ka seda, et ATP analoogide seostumist proteiinkinaasidega on uuritud oluliselt vähem, kui seda on tehtud peptiidide sidumise

korral. See asjaolu suunas meie uuringud veel kord käsitlema fosfaatrühma sisaldavate ligandide seostumist proteiinkinaasidega, kasutades selleks tuntud mudelobjekti, milleks on proteiinkinaas A. Uuringud teostati klassikalist viisi kasutades, kus mõõdetakse proteiinkinaas A poolt katalüüsitud substraatreaktsiooni pidurdamist lisatavate ligandide poolt. Samas on see meetod hea selle poolest, et võimaldab iseloomustada katalüütilises tsentris toimuvat sidumist.

Uuritud ainete nimekiri on toodud Tabelis 1. Lisaks ATP otsestele analoogidele on selles tabelis ka mitmeid muid fosfaatrühma sisaldavaid lihtsaid aineid. On oluline, et mõned neist molekulidest osalevad ka rakus toimuvates bioloogilistes protsessides. Seepärast on nende ainete inhibeerimisomaduste uurimine huvitav ka võimaliku alternatiivse proteiinkinaas A regulatsioonimehhanismi seisukohast, millest senini meie andmetel juttu ei ole olnud.

2. ÜLEVAADE KIRJANDUSEST

2.1 Proteiinkinaaside liigitus

Proteiinkinaaside liigituse ja definitsiooni päristuumsete rakkude jaoks esitasid Hanks, Quinn ja Hunter (Hanks *et al.* 1988 ja 1995). Ühine tunnusjoon, mis ühendab ja seob kõiki proteiinkinaase, on homoloogiline „kinaasidomään“ ehk „katalüütiline domään“. Esitatud klassifikatsioon põhineb kinaasidomääni aminohapete järjestusel. Leiti, et kinaasi domäänis on aminohappe järjestuses teatud sarnasused, mis olid heaks aluseks teiste tunnusjoonte võrdlemisel:

- 1) sarnasus üldises valgu struktuuris;
- 2) sarnasus ensüümi aktiivsuse reguleerimise viisides;
- 3) sarnasus substraatide molekulaarses äratundmises.

Järgmisena on esitatud viis peamist kinaaside gruppi (Hanks *et al.* 1988 and 1995):

- 1) AGC grupp; tsükliilisest nukleotiidist sõltuvad kinaasid (PKA, PKG, PKC)
- 2) CaMK grupp; kaltsium/kalmoduliin poolt reguleeritud kinaasid (Snf1/AMPK perekond ja teised sarnased)
- 3) CMGC grupp; tsükliin-sõltuvad kinaasid, MAP kinaasid ja GSK3 perekond ja teised sarnased. Nende aktiivsus on reguleeritud siserakkuliste metaboliitidega, isefosforüleerimisega või teiste proteiinkinaasidega
- 4) PTK grupp; türosiinkinaasid
- 5) OPK grupp; tavaliselt monomeersed valgud, mis on reguleeritavad madalmolekulaarsete metaboliitidega

Antud töös on kasutatud hästi uuritud cAMP-sõltuvat proteiinkinaasi (proteiinkinaas A, EC 2.7.11.1), mis on üks esimestest avatud proteiinkinaasidest (Walsh *et al.* 1968) ja mis oli ka esimesena sekveneeritud (Shoji *et al.* 1981), esimesena kloneeritud (Uhler *et al.* 1986) ja on laialdaselt tunnustatud kui oma grupi proteiinkinaaside „mudelvalk“. Sageli on selle ensüümi uurimisel saadud tulemused üle kantavad teiste proteiinkinaaside jaoks.

2.2 cAMP–sõltuv proteiinkinaas

2.2.1 Aktiveerimise mehhanism

Superperekonna esindajana on cAMP–sõltuv proteiinkinaas kõige enam uuritud ja seetõttu on hästi teada mitmed katalüüsiga seotud mehhanismid (Adams 2001). PKA on heterotetrameerne valk, mille koosseisus on regulatoorne dimeer (R_2) ja kaks katalüütilist alaühikut (2C). Fosfaatrühma ülekannet ATP–lt substraadile teostab katalüütiline alaühik C. C–alaühik vabaneb ja aktiveerub cAMP kontsentratsiooni tõusu korral rakus. cAMP seostub regulatoorse alaühikuga, mis omakorda põhjustab selle konformatsiooni muutuse ja tetrameeri dissotsiatsiooni (Tao *et al.* 1970):



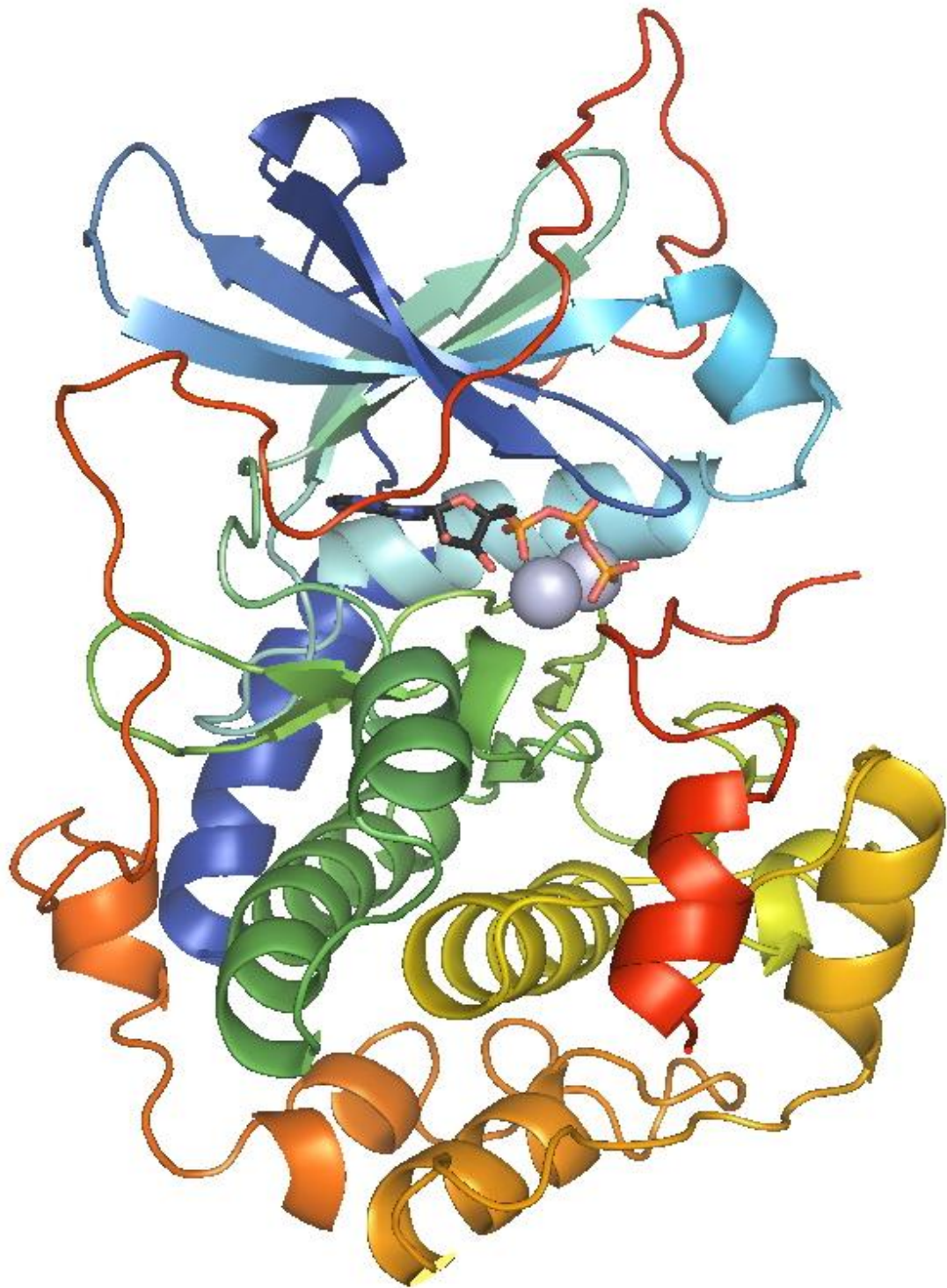
Antud mehhanismi unikaalsus seisneb selles, et regulatoorne ja katalüütiline alaühik moodustavad kompleksi, mis on võimeline dissotsieeruma. Teistel kinaasidel on need alaühikud liidetud üheks valgukuks (Slice and Taylor 1989; Yonemoto *et al.* 1991). Seetõttu on PKA korral võimalik uurida katalüüsi ja regulatoorseid protsesse ainult katalüütilise alaühiku korral, ilma regulatoorse alaühiku mõjuta.

2.2.2 Katalüütilise alaühiku struktuur

Imetajate PKA monomeerse katalüütilise alaühiku molekulmass on 38 kDa (Beebe *et al.* 1986; Erlichman *et al.* 1973; Zoller *et al.* 1979). Esimene kolmedimensionaalne ensüümi struktuur töötati välja MgATP ja peptiid–inhibiitori PKI kompleksi jaoks (Knighton *et al.* 1991). Ilmnes, et katalüütiline alaühik koosneb kahest alamdomäänist, mille üldine struktuur on iseloomulik ka kõikidele teistele proteiinkinaasidele (Taylor and Radzio-Andzelm 1994). Väikses alamdomäänis (N–terminaal) asetseb MgATP seondumisregioon ja koosneb peamiselt β struktuurist (strands), suurem alamdomään (C–terminaal) on substraadi seondumisregiooniks ja koosneb põhiliselt α –heeliksist. C–PKA ja peptiidi kompleksi struktuur on toodud Joonisel 1 (PDB ID: 1ATP; Zheng *et al.* 1993). Peptiidne inhibiitor PKI[5–24], mis on seostunud substraatpeptiidi asemel, on sellel joonisel märgitud punase värviga. Kahe alamdomääni vahel asetseb sügav lõhe. See on aktiivtsenter, mille põhjas asub adensiini seondumiskoht. ATP molekuli adensiini ring seostub tugevasti katalüütilise alaühikuga, võimalik et kolme vesiniksideme kaudu (Bossemeyer *et al.* 1993). ATP fosfaatide seondumine toimub lõhe äärel. Selle koha lähedal, aga teisel alamdomäänil, asetseb peptiidi või valgusidumise piirkond ning

samas toimub fosfaatrühma ülekanne (Zheng *et al.* 1993). Aktiivtsentri ümbruses asub ka hulgaliselt kõikides proteiinkinaasides konserveerunud aminohappeid (Madhusudan *et al.* 1994).

Proteiinkinaasi struktuuri uuringud näitasid seda, et katalüütilise aktiivsuse jaoks on väga olulisel kohal ensüümi konformatsiooni muutused (Taylor *et al.* 2004). Aktiivtsentri äärel asetsev nn aktivatsioonisilmus peab olema õiges asendis, et substraadid saaksid seostuda ensüümiga (DeBont *et al.* 1993; Jeffrey *et al.* 1995). Paljudel juhtudel on selleks vajalik proteiinkinaasi Ser või Thr jääkide fosforüleerimine. PKA korral toimub see fosforüleerimine Thr-197 juures ja see protsess on autokatalüütiline (Johnson 2001).



Joonis 1. cAMP-sõltuva proteiinkinaasi katalüütilise alaühiku ruumiline struktuur koos kahte mangaani ioniga (tähistatud kui helesinised kerad) ATP (näidatud on molekuli struktuur) sidumiskohas. Seostunud on ka peptiidne inhibiitor PKI [5–24] (punane), mis markeerib peptiidi sidumiskoha (PDB ID: 1ATP; Zheng *et al.* 1993).

2.2.3. Fosforüleerimise kineetiline mehhanism

Sünteesilise peptiidse substraadi (kemptiidi) fosforüleerimise reaktsiooni vaadeldakse kui kolmeastmelist protsessi, mis koosneb substraadi seondumisest, fosfaatrühma ülekandest ja produkti vabanemisest (Adams and Taylor 1992; Grant and Adams 1996). Statsionaarses olekus toimub substraatide sidumine tõenäoliselt juhuslikus järjestuses. Samas kohtab aga ka väiteid, et eelistatud on ATP seondumine esimese substraadina. Pärast kahe substraadi seondumist toimub kemptiidi fosforüleerimine ja fosforüleeritud kemptiidi ja ADP vabanemine. Reaktsiooniks on vaja Mg^{2+} -ioonide olemasolu reaktsioonikeskkonnas (Cook *et al.* 1982; Kong and Cook 1988; Whitehouse *et al.* 1983). Ühe ATP molekuli jaoks on vaja kaks Mg^{2+} -iooni, mis omakorda mängivad ilmselt olulist rolli ATP molekuli reaktsiooniks sobiva konformatsiooni moodustumises, selle koordineerimises seondumisel ensüümi alatsentriga ja katalüütilise alaühiku konformatsiooni muutustes (Zimmermann *et al.* 2008).

Viskoossuse mõju uuringud on näidanud, et reaktsiooni kiirust limiteerivaks staadiumiks võib olla produktide difusioon ensüümilt, sest fosfaatgrupi ülekanne toimub vähemalt 10 korda kiiremini kui produkti vabanemine. Selleks produktiks, mille vabanemine on kiirust limiteerivaks staadiumiks, on peetud ADP-d (Adams and Taylor 1992). Hiljem, kasutades nn kustutatud joa meetodit, on aga näidatud, et kiiruskonstant 500 s^{-1} võib siiski iseloomustada fosfaatrühma ülekannet (Grant and Adams 1996).

2.2.4 C–alaühiku aktiivsuse regulatsiooni võimalusi

Ennustatakse, et imetajate genoomist umbes 2% kodeerib kinaase. Inimese genoomi korral on see arv suurem, moodustades umbes 2.8% valkude arvust. Nende andmete põhjal võib oletada, et olemas on rohkem kui 500 kinaasi (Venter *et al.* 2001). Samas on vaatamata kinaaside suurele arvule ja mitmekesisusele võimalik märgata olulisi sarnasusi nende struktuuris, funktsioneerimises ja regulatsiooni mehhanismides.

PKA aktiivsust kontrollib peamiselt kaks mehhanismi. Esimene nendest ja kõige tähtsam on regulatoorse alamdomääni dissotsiatsioon mitte-aktiivsest kompleksist. Regulaatorne alaühik sisaldab pseudosubstraadi järjestust RRGAI, mis hõivab substraadi seondumiskohta ja takistab fosfaatrühma ülekannet substraadile. Teiseks mehhanismiks on ensüümi katalüütilise alamdomääni isefosforüleerimine Thr–197 juures (Johnson *et al.* 1996). Seda alamdomääni nimetatakse “aktivatsiooni segmendiks” ja temale vastavad aminohapete jäägid 184–208 (Taylor and Radzio-Andzelm 1994). Aktivatsiooni segmendis oleva Thr–197 fosforüleerimine muundab ensüümi geomeetriat, mis omakorda mõjub PKA aktiivsusele.

Huvipakkuv on ka lahuse pH mõju PKA aktiivsusele. pH-väärtus mõjub substraatide seondumisele fosforüleerimise reaktsioonis ja on väikese mõjuga katalüütilisele staadiumile.

Teada on, et pH muutused mõjuvad aminohapete jääkide protonisatsioonile, seekord ilmselt nii substraadiks oleva peptiidi või valgu molekulis kui ka ensüümi molekulis (Yoon and Cook 1987).

2.3 Proteiinkinaas A inhibiitorid

2.3.1 Inhibiitorite toime iseloomustamine

Inhibiitorite toime iseloomustamiseks uuritakse katalüüsi algkiiruse (v) sõltuvust inhibiitori kontsentratsioonist $[I]$:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{[I]}{IC_{50}}} \quad (2)$$

Suurus IC_{50} iseloomustab inhibiitori võimet pidurdada reaktsiooni ehk vähendada ensüümi mõõdetavat aktiivsust. See suurus näitab inhibiitori kontsentratsiooni $[I]$, mille juures katalüüsi kiirus v on 50% algkiirusest (V). Selles võrrandis ei ole arvestatud asjaolu, et inhibiitori toime oleneb uurimiseks kasutatava substraadi kontsentratsioonist. Substraadi toimet arvestab lihtsamal juhul Cheng–Prusoffi võrrand (Cheng and Prusoff 1973), mis seob IC_{50} väärtuse ligandi tegelikku afiinsust iseloomustava suurusega K_i :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (3)$$

Cheng–Prusoffi võrrandi kasutamine on õigustatud, kui inhibeerimine toimub konkurentse mehhanismi kohaselt ning teada on K_m väärtus substraadi jaoks. Proteiinkinaas A korral tuleb arvestada aga kahe substraadiga, mis muudab oluliselt keerukamaks nii parandusliikme arvutuse kui ka inhibeerimise mehhanismi uuringud. Seetõttu piirduvad paljud tööd IC_{50} väärtuse määramisega. Seejuures on kindlaks kujunenud katsetingimused, mille juures IC_{50} väärtust määratakse. Kui tegu on ATP tsentrisse suunatud inhibiitoritega, siis on oluline eelkõige ATP kontsentratsioon. Proteiinkinaas A korral kasutatakse tavaliselt katsetes 100 μ M ATP kontsentratsiooni, mis ületab K_m väärtuse ca 4 korda (Lew *et al.* 1997). Seega muutuvad IC_{50} väärtused ca 5 korda väiksemaks. Kuna see muutus on sarnane kõikide ühendite jaoks, siis reaktsiooniseeria piires inhibiitorite suhteline toimerida ei muutu. Sellest lähtudes on kasulik K_i väärtuse arvutamine juhul, kui andmeid võrreldakse teiste kirjanduses toodud andmetega, mis tavaliselt on teisendatud Cheng–Prusoffi võrrandi abil.

2.3.2 Proteiinkinaaside inhibiitorid

Ülevaate järgmine osa kirjeldab proteiinkinaaside inhibiitoreid, mida on senini uuritud ning millest mitmed võivad huvi pakkuda kui lähteained tulevaste ravimite loomisel.

Esimene inhibiitorite rühm on suunatud substraadiks oleva peptiidi või valgu sidumiskohale, st need ained konkureerivad selle sidumiskoha pärast ja takistavad reaktsiooni. Tavaliselt on need inhibiitorid peptiidid või nende analoogid ning nad sisaldavad sarnaseid või samasuguseid aminohapete järjestusi kui spetsiifilised substraadid. Näiteks PKA korral on selliseks motiiviks järjestus RRXS (Kemp and Pearson 1990). Juba 1970–ndatel avastati, et PKA-d inhibeerib R–alaühik ja proteiinkinaasi inhibiitor PKI (ka tuntud kui Walsh'i inhibiitor) (Walsh *et al.* 1971). Samuti toimivad inhibiitoritena sünteetilised peptiidid, milles fosfaadi aktseptor on asendatudalaniiniga (Kemp *et al.* 1976). Võrreldes ATP-analoogidega pole peptiidide analoogid efektiivsed inhibiitorid (Walsh and Glass 1991).

Teine inhibiitorite rühm on suunatud ATP sidumiskohale. Üldiselt on nendel ainetel suur afiinsus, aga mitte eriti oluline selektiivsus. Selle põhjuseks on erinevate proteiinkinaaside ATP sidumiskohtade suur homoloogia (Fischer 2004; Knight and Shokat 2005). Esimene selline ATP sidumiskoha inhibiitor oli mikroobne alkaloid staurosporiin (Tamaoki *et al.* 1986). See inhibiitor pidurdab paljude proteiinkinaaside reaktsiooni ning tema jaoks on määratud IC₅₀ väärtused 3 – 30 nM. Võib väita, et selle inhibiitori toimemehhanism ei ole lõplikult selge (Meggio *et al.* 1995).

Samasse inhibiitorite klassi kuuluvad ka nn Hidaka või H–seeria inhibiitorid, mis on erinevad isokinoliinsulfoonamiidid (Hidaka *et al.* 1984). Kõik need ühendid konkureerivad eeldatavasti ATP-ga selle sidumiskoha pärast. Samas on mõned H–seeria inhibiitorid ka selektiivse toimega, seondudes erineva efektiivsusega erinevatele ensüümidele. Selliseks ühendiks on näiteks H89. See on huvitav asjaolu, kuna ATP sidumist erinevate proteiinkinaasidega kirjeldab reeglina sarnane K_m väärtus (Engh *et al.* 1996). See annab võimaluse ennustada, et erinevates proteiinkinaasides olevates ATP–sidumiskohtades on olemas ka teatud erinevused, mis omakorda võivad olla uute proteiinkinaaside inhibiitorite loomise aluseks.

Eraldi klassina võib vaadelda ka bifunktsionaalseid inhibiitoreid. Nende inhibiitorite kontseptsioon oli töötanud välja lähtudes varem tuntud üleminekukompleksi–analooginhibiitorite kontseptsioonist (Wolfenden 1971). Kuigi bifunktsionaalsete inhibiitorite toime põhimõtted formuleeriti Broomi poolt 1989 aastal (Broom 1989), sünteesiti esimesed inhibiitorid mitu aastat hiljem (Ricouart *et al.* 1991). Nende inhibiitorite korral püütakse imiteerida mõlemat substraati – nii peptiidi kui ATP-d. Selline molekul toimib eeldatavalt nii peptiidi sidumiskohaga kui ka ATP sidumiskohaga, mis peaks tagama nii sidumise efektiivsuse kui ka selektiivsuse.

Üks võimalus sellist molekuli saada on ühendada ATP oma fosfaatgruppi kaudu peptiidsubstraadi fosforüleeritava OH-rühmaga. Vaatamata ootustele osutusid sellised inhibiitorid enamasti nõrgaks ning nende IC_{50} väärtused olid mikromolaarse kontsentratsiooni vahemikus. Küsimuse all on ka nende ainete stabiilsus proteiinkinaaside juuresolekul – molekuli koostises on mitu fosfaatgruppi, mis on substraadiks kinaasidele. Bifunktsionaalsete inhibiitorite näiteks on ka kemptiidi ühendamine adensiinnukleotiididega (ADP, ATP, AP_4) üle fosfordiestersideme. Parim neist kompleksidest oli adensiin-5'-tetrafosfaadi ja kemptiidi konjugaat (kemptiid- AP_4), mille jaoks määrati PKA korral $IC_{50}=68 \mu M$ (Medzihradzky *et al.* 1994).

Teine võimalus on ühendada substraate imiteerivaid fragmente mittefosfaatse grupiga, milleks on tavaliselt esterrühm. Selline molekul peaks olema stabiilsem, kui fosfaatgrupiga analoog. Seda tüüpi ained on sünteesitud ka meie instituudis (Loog *et al.* 1999; Pehk and Uri 1997; Uri *et al.* 1994). Kõige paremad nendest on adensiini konjugaadid heksa-D-arginiiniga, mis omavad K_i väärtusi vahemikus 5 – 10 nM (Enkvist *et al.* 2006).

Kolmandaks bisubstraatsete inhibiitorite rühmaks on ained, mille koostises on adensiini fragment. Kuna adensiin on ATP molekuliga võrreldes väiksema afiinsusega ligand, siis ka inhibiitori afiinsus väheheb. See asjaolu nõuab “paremat” peptiidi fragmenti. Sellepärast on sellist tüüpi inhibiitorite loomine keerukas ülesanne. Esimene edukas näide oli isokinoliini-5-sulfoonamiidi ja peptiidi Ser-Arg₆ kompleks (Ricouart *et al.* 1991), kus need molekulid olid omavahel seotud grupiga $-NH(CH_2)_2NH(CH_2)_2CO-$. Selle kompleksi jaoks saadi PKA korral $K_i=0.004 \mu M$ ja PKC korral $K_i=0.1 \mu M$. Selline inhibiitor oli konkurentne ATP suhtes, kuid mittekonkurentne peptiidsubstraadi suhtes (Parang and Cole 2002).

Viimane inhibiitorite rühm on nn “biligand-inhibiitorid”, mis üldisel juhul seonduvad ensüümiga kahes kohas, aga mittekohustuslikult ATP ja substraat seondumiskohas (Lavõgina *et al.* 2010).

3. TÖÖ EESMÄRGID

Töö planeerimisel püstitati eesmärgid, mida sõnastati järgnevalt:

1. Kirjandusliku osa vormistamisel tutvuda PKA kohta olemas oleva kirjandusega ning proteiinkinaaside kineetika määramise viisidega.
2. Omandada proteiinkinaas A substraatreaktsiooni kineetika määramise meetodika ning kasutada seda inhibiitorite toime kirjeldamiseks.
3. Määrata seeria fosfaatrühma sisaldavate ligandide jaoks IC_{50} väärtused ning analüüsida seda, kuidas nende ainet sidumine oleneb nende struktuurist.

4. EKSPERIMENTAALNE OSA

4.1 Kemikaalid

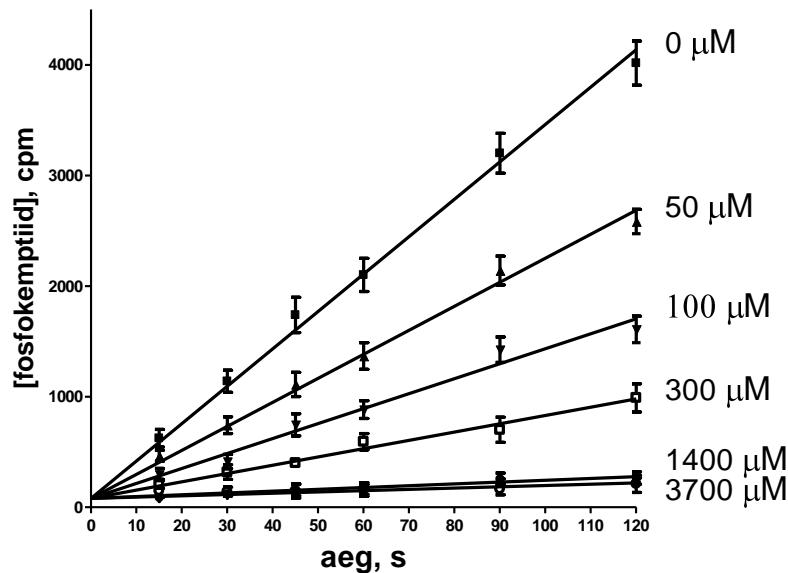
γ -[³²P]ATP on ostetud firmast Amersham (UK). Peptiidid LRRASLG (kemtiid) on sünteesitud ja kirjeldatud varasemas meie labori töös (Kuznetsov *et al.* 2003). RRAS(P_i)VA telliti firmast GL Biochem Ltd (Shanghai) ning oli puhtusega >95%. Adenosiin, ATP, ADP, cAMP, AMP, TRIS/HCl, BSA, FBP, PEP, H₃PO₄ ja D-riboos-5'-fosfaat on pärit firmast Sigma-Aldrich (USA). MgCl₂ on pärit firmast Acros (Saksamaa). Fosfotselluloospaber P81 on pärit firmast Whatman (UK). Proteiinkinaasi A katalüütiline alaühik C_{alpha} osteti firmast Biaffin GmbH & Co KG (Saksamaa) ning see on ekspresseeritud *E.coli* rakkudes hiire cDNA-d kasutades, 30 U/mg, 0.1 mg/ml, lot 040916.

4.2 Proteiinkinaasi aktiivsuse määramine ja inhibeerimine

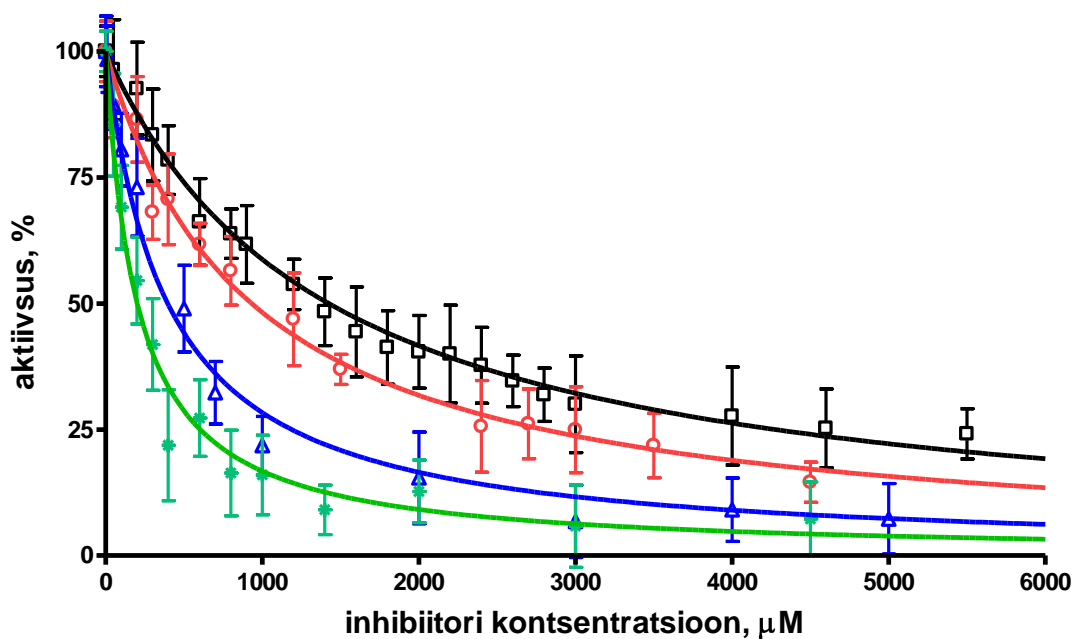
Peptiidi fosforüleerimist proteiinkinaas A poolt teostati 30°C juures 70 µl reaktsioonisegus, mis sisaldas: 50 mM TRIS/HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, peptiid-substraat LRRASLG (kemtiid) kontsentratsiooniga 60 µM (alglahus valmistati 50 mM TRIS/HCl, pH 7.4); inhibiitorite kontsentratsioonid valiti IC₅₀ väärtuse määramise vajalikus vahemikus; γ -[³²P]ATP kontsentratsiooniga 100 µM (eriradioaktiivsus jäi vahemikku 60 – 200 cpm/pmol); 10 µl PKA lahust. See lahus valmistati vahetult enne eksperimendi algust 500 kordse PKA alglahuse lahjendamise teel 50 mM TRIS/HCl puhvril, pH 7.4 ja 1 mg/ml BSA.

Fosforüleerimisprotsess käivitub koheselt kui reaktsioonisegusse lisatakse ensüüm. Seejärel võetakse reaktsioonisegust erinevatel ajahetkedel 10 µl kaupa lahust fosfotselluloospaberile, mis seejärel asetatakse külma 75 mM fosforhappe lahusesse, kus reaktsioon koheselt peatub. Fosfotselluloosipaberi tükke pestakse neli korda külma 75 mM H₃PO₄ lahuses, iga kord 10 minutit. Sellise töötamise tulemusena eemaldati γ -[³²P]ATP liig. Pärast seda kuivatatakse paberid 120°C juures 25 minutit. Radioaktiivsust paberil mõõdeti Beckman LS 7500 radioaktiivsuse loendurit kasutades.

Fosforüleerimisreaktsiooni algkiiruse väärtused arvutati produkti moodustumise järgi, mõõtes selle konstantartsiooni muutuse sõltuvust ajast (Joonis 2). Inhibeerimise kirjeldamiseks uuriti edasi algkiiruste sõltuvust inhibiitori kontsentratsioonist ning saadud sõltuvusest arvutati IC₅₀ väärtused (Joonis 3).



Joonis 2. Peptiidi fosforüleerimise algiirused proteiinkinaas A poolt. Inhibiitori ADP kontsentratsioonid on näidatud joonisel, ATP kontsentratsioon on 100 μM , pH 7.4, temp. 30 °C, 50 mM TRIS/HCl puhver, 10 mM MgCl_2 . Algiiruse väärtused on arvatud sirgjoonte tõusust.



Joonis 3. PKA aktiivsuse vähenemine fosfaatiooni (\square), D-riboos-5'-fosfaadi (\circ), PEP-i (Δ) ja FBP (*) toime tõttu. ATP kontsentratsioon on 100 μM , kemptiidi – 60 μM , pH 7.4, temp. 30°C, 50 mM TRIS/HCl puhver, 10 mM MgCl_2 .

4.3 Andmetöötlus

Andmete analüüs tehti programmiga GraphPad Prism™ versioon 4.0 (GraphPad Software Inc., USA). Katsete tulemused on esitatud kujul: keskmine väärtus \pm standardviga.

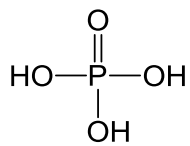
5. TULEMUSED JA ARUTELU

Selles töös uuriti mitmete fosfaatühma sisaldavate ainete võimet inhibeerida PKA poolt katalüüsitud kemptiidi fosforüleerimise reaktsiooni ning iseloomustati seda võimet IC_{50} väärtustega. Katsete tulemused on toodud Tabelis 1. Sealt on näha ka uuritud ainete nimekiri. Nende ainete valemid on esitatud Joonisel 4. Nimekirjast on näha, et uuritud ained sisaldasid kas üks, kaks või kolm fosfaatühma. Kuna kineetilised mõõtmised viidi läbi tingimustes, kus reaktsioonikeskkonnas oli 10 mM $MgCl_2$, siis ensüümiga toimusid tegelikult nende fosfaatide Mg^{2+} -soolad. Nii on näiteks teada, et $MgHPO_4$ dissotsiatsioonikonstant on neutraalsel pH väärtusel 0.003 – 0.006 M (Greenwald 1940). Seega esineb see aine lahuses peamiselt dissotsieerumata soolana. Sama järeldus on võimalik teha ka asendatud fosfaatide ning di- ja trifosfaatide jaoks.

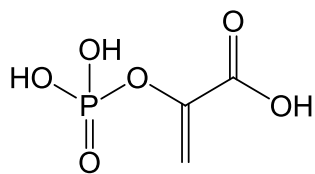
Kahe Tabelis 1 toodud aine (AMP ja ADP) inhibeerimisomadusi on uuritud ka varasemates töödes, kus eksperimentaalselt saadud IC_{50} väärtused on Cheng–Prusoffi võrrandi (Cheng and Prusoff 1973) abil ümber arvatud K_i väärtusteks lähtudes seisukohast, et need inhibiitorid konkureerivad ATP sidumiskoha pärast. Nii on AMP jaoks määratud K_i väärtus 0.6 mM (Cook *et al.* 1982) ning ADP jaoks 20 μM (Lew *et al.* 1997). Meie poolt saadud tulemuste ümberarvutus Cheng–Prusoffi valemi abil annab AMP jaoks $K_i = 369 \mu M$ ja ADP jaoks 22 μM . On näha, et need tulemused on hästi kokku langevad kirjanduse andmetega.

Tabel 1. Uuritud inhibiitorite K_i väärtused, mis on arvatud proteiinkinaas A poolt katalüüsitud kemptiidi fosforüleerimise reaktsiooni pidurdamise andmetest (ATP 100 μM , kemptiid 60 μM).

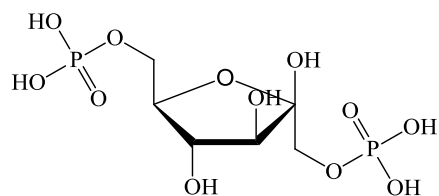
Number	Inhibiitor	K_i , μM
I	fosfaatioon	254±86
II	PEP	76±20
III	FBP	36±8
IV	D-riboos-5'-fosfaat	192±4
V	adenosiin	102±18
VI	cAMP	235±19
VII	AMP	369±40
VIII	ADP	22±3
IX	RRAS(P _i)VA	208±37



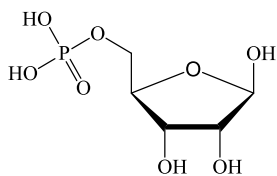
fosforhape



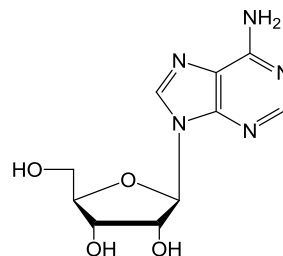
PEP



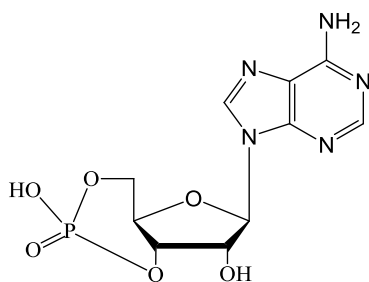
FBP



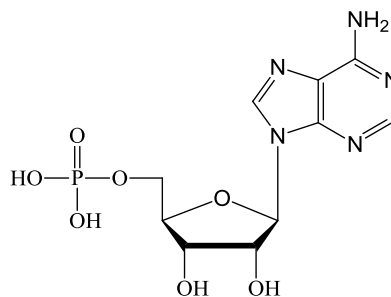
D-riboos-5'-fosfaat



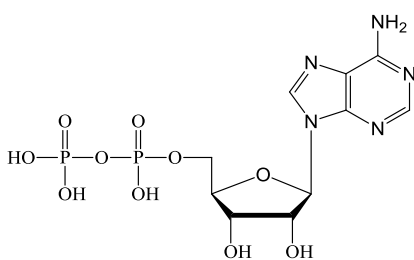
adenosiin



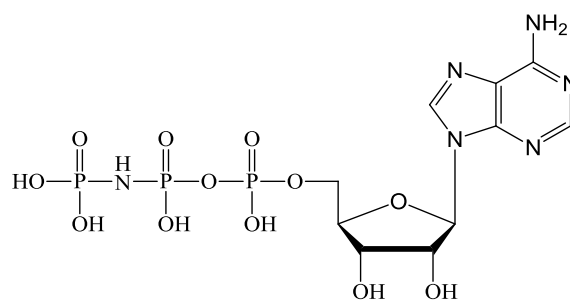
cAMP



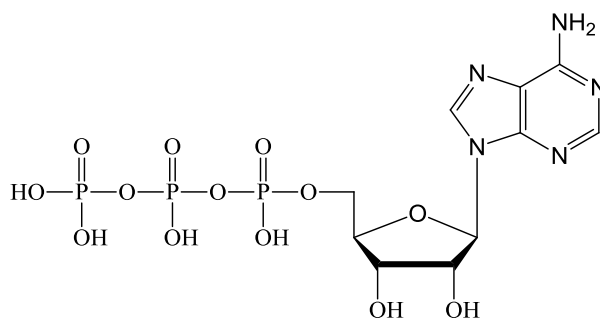
AMP



ADP



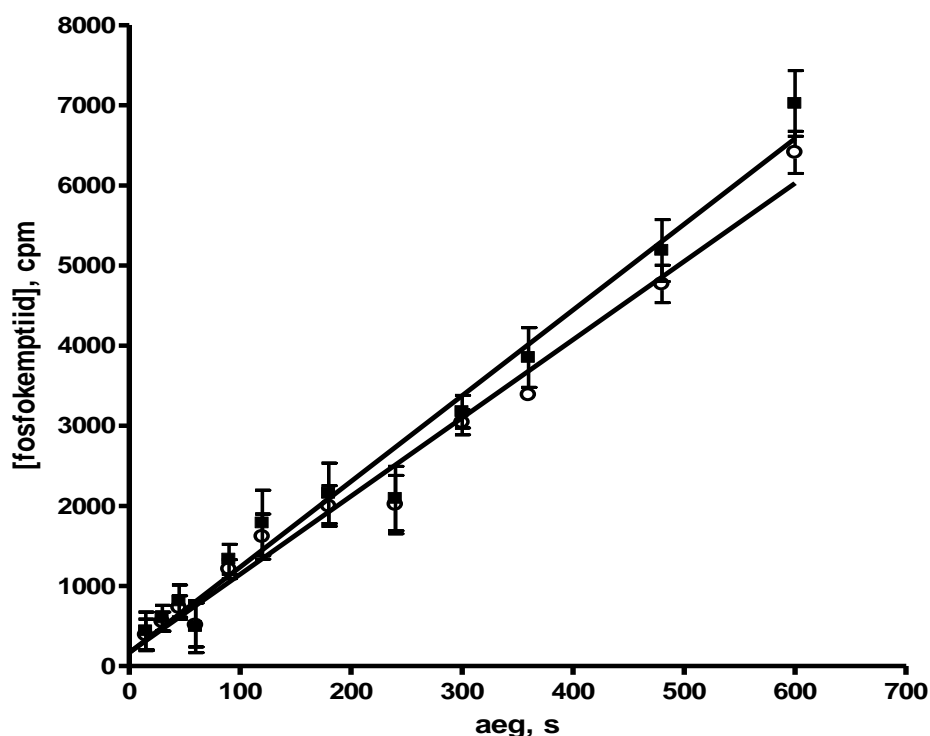
AMP-PNP



ATP

Joonis 4. Uuritud ligandide struktuurid

Eraldi tähelepanu väärivad tulemused, mis saadi MgHPO_4 kui inhibiitori omaduste kohta. See ligand on tegelikult minimaalne fragment ATP molekulist, mille sidumist ensüümiga on võimalik iseseisvalt uurida. Meie poolt määratud IC_{50} väärtus 1.27 mM annab selle ligandi jaoks K_i väärtuse 254 μM . See väärtus on oluliselt suurem, kui kõikide teiste meie poolt ja ka varem kirjanduses uuritud ainete K_i väärtused. Seetõttu oli vajalik katseid teha suhteliselt kõrgetel inhibiitori kontsentratsioonidel. Töös kasutati kontsentratsioone kuni 6 mM (Joonis 3). Nendel tingimustel muutub aga reaktsioonisegu ioontugevus, mis omakorda võib mõjutada peptiidi fosforüleerimise kiirust. Ioontugevuse mõju hindamiseks tehti kontrollkatse, kus reaktsioonisegusse lisati NaCl 15 mM kontsentratsioonil. Leiti, et PKA aktiivsus tavalises reaktsioonisegus oli 10.7 ± 0.5 cpm/s ja koos 15 mM NaCl lisandiga 9.8 ± 0.4 cpm/s. Nende väärtuste vahe on 9%. Sellest järeldati, et ioontugevuse mõju (nn mittespetsiifiline soolaefekt) on selles reaktsioonis suhteliselt väike. Pealegi ei ole inhibeerimiskatses lisatud fosfaat-ioonid täielikult dissotsieerunud, mistõttu on tegelik ioontugevus isegi väiksem, kui arvutuslik. Seetõttu võib ioontugevuse muutusest tingitud reaktsioonikiiruse muutuse arvestamata jätta. Samad katseandmed on illustreeritud ka Joonisel 5.



Joonis 5. Produkti moodustumise sõltuvus ajast reaktsioonisegu erineval koostisel. Andmed standardtingimustel (■) ja andmed 15 mM NaCl lisamisel (○). Tõusud on vastavalt 10.7 ± 0.5 ja 9.8 ± 0.4 cpm/s.

Teine oluline faktor, mida selles katses rangelt kontrolliti, oli reaktsioonikeskkonna pH, sest PKA aktiivsus sõltub sellest parameetrist (Yoon and Cook 1987). Kokkuvõtteks võib seega väita, et esmakordselt on õnnestunud iseloomustada fosfaatrühma toimet proteiinkinaas A katalüütilise tsentriga.

Esmakordselt on uuritud ka madalmolekulaarsete fosfaatide PEP ja FBP inhibeerivat toimet proteiinkinaas A katalüüsile. Nendes molekulides on fosfaatrühmale lisatud asendusrühmad, mis muudavad inhibeerimise efektiivsust: FBP jaoks on K_i väärtus $36 \pm 8 \mu\text{M}$ ja PEP jaoks $76 \pm 20 \mu\text{M}$. See selgub ka Jooniselt 3, kus on toodud PKA reaktsiooni kiiruste sõltuvus nende ainete kontsentratsioonist. On huvitav, et orgaanilise asendusrühma lisamine suurendab ligandi sidumise efektiivsust, sest võrreldes fosfaatiooni sidumisega paraneb PEP ja eriti FBP sidumise efektiivsus mitu korda. Samuti on nendest andmetest näha, et kahe fosfaatrühma olemasolu parandab sidumist võrreldes ühe rühma olemasoluga.

Nendel andmetel võib olla oluline tähendus ka ainevahetuse reguleerimise seisukohast. Nimelt on mõlemad ligandid seotud glükolüüsi ainemetabolismi rajaga. Samas on teada, et proteiinkinaas A osaleb selle kaskaadi regulatsioonil maksas, kus L-tüüpi püruvaadi kinaasi fosforüleerimise teel aeglustatakse seda protsessi (Munoz and Ponce 2003; Metzler and Metzler 2001). Kui PEP on võimeline efektiivselt pidurdama seda regulatiivse fosforüleerimise protsessi, siis võib sellel olla oluline, aga seni tundmatuks jäänud regulatoorne tähendus.

On huvitav lisada, et fosfaatrühmaga seotud molekuli osa suurus ei oma erilist tähtsust sidumisomaduste määramisel. Selle väite tõestuseks võib vaadata andmeid fosforüleeritud peptiidsubstraadi RRAS(P_i)VA sidumise kohta. Selle aine jaoks saab hinnata K_i väärtuseks $208 \mu\text{M}$, mis ei erine väga oluliselt teist eelpoolvaadeldud fosfaatide sidumisomadustest, kuigi fosfaatrühmaga on liidetud peptiid.

Adenosiini derivaatide AMP, cAMP ja ADP toime proteiinkinaasidega pakuvad erilist huvi, kuna nad on sarnased substraadi ATP molekuliga ja seega saavad mõjutada tema sidumist. Nagu selgub toodud andmetest, on meie poolt uuritud seerias kõige tugevamaks inhibiitoriks ADP. Selle aine jaoks on K_i väärtus $22 \mu\text{M}$. Ühe fosfaatgrupi eemaldamisel ADP molekulist inhibeerimiseefekt tundub nõrgeneb. Nii on AMP jaoks inhibeerimiseefekt kirjeldatav K_i väärtusega $369 \mu\text{M}$. Kui ainukene fosforgrupp muutub aga tsükliliseks, nii nagu see on cAMP korral, läheb inhibeerimine veidi paremaks ja selle aine jaoks on K_i kirjeldatav väärtusega $235 \mu\text{M}$.

Seda ATP-sarnaste ligandide rida saab jätkata, sest kirjanduses on mitmel korral uuritud ATP-analoogina tuntud inhibiitorit AMP-PNP. Selle aine jaoks on avaldatud K_i väärtus $70 \mu\text{M}$ (Whitehouse and Walsh 1983), mis on lähedane ADP jaoks saadud tulemusega, aga halvem ATP jaoks saadud dissotsiatsioonikonstandist $25 \mu\text{M}$ (Lew *et al.* 1997).

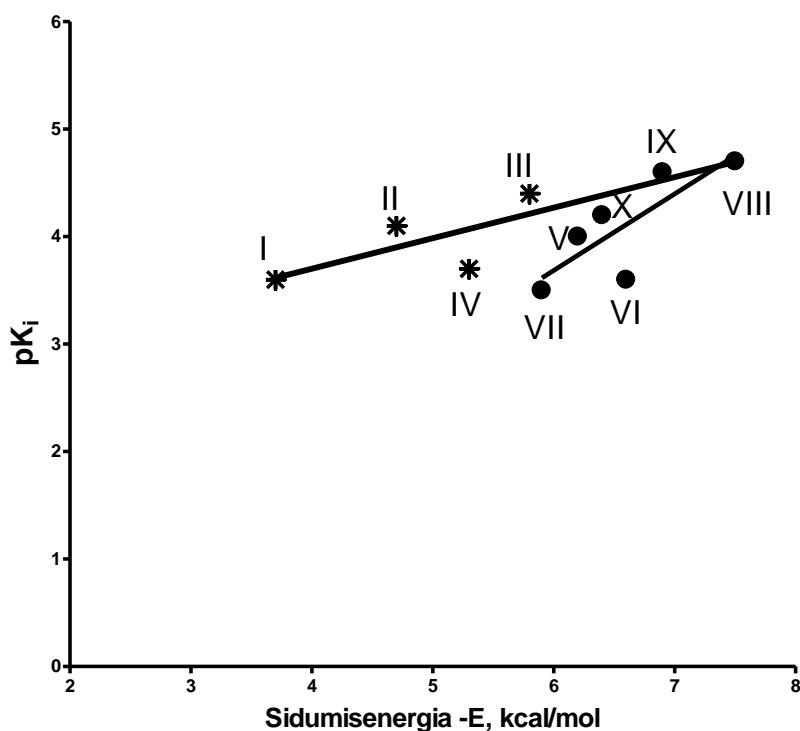
Kokkuvõtteks oleme koostanud uuritud ainete ja ka kirjanduse andmete baasil järgmise ülevaatliku Tabeli 2. Selles tabelis on toodud eksperimentaalsed pK_i väärtused inhibiitorite kohta, mis vastavalt meie töö eesmärgile sisaldavad fosfaatrühmi. Samas tabelis on toodud ka A. Kuznetsovi poolt samade inhibiitorite jaoks tehtud arvutuste tulemused, kus ligandi seostumise arvutimudeli abil on hinnatud optimaalsete ensüüm–ligand komplekside tekkeenergiat. Seejuures on käsitletud ainult ensüümi aktiivtsentris tekkivaid komplekse. Käesoleva töö tulemused võimaldavad neid andmeid võrrelda eksperimentaalsete pK_i väärtustega. Selle võrdluse tulemused on toodud Joonisel 6. Sellelt jooniselt on näha, et teatud ainegruppide piires esineb selge korrelatsioon eksperimentaalse pK_i väärtuste ja arvutuslike sidumisenergiate vahel.

Tabel 2. Uuritud inhibiitorite pK_i väärtused ja ATP pK_d väärtus võrrelduna nende ligandide arvutusliku sidumisenergiatega

Number	Ligand	pK_i	Sidumisenergia –E, kcal/mol
I	fosfaatioon	3.6	3.7
II	PEP	4.1	4.7
III	FBP	4.4	5.8
IV	D–riboos–5’–fosfaat	3.7	5.3
V	adenosiin	4.0	6.2
VI	cAMP	3.6	6.6
VII	AMP	3.4	5.9
VIII	ADP	4.7	7.5
IX	ATP	4.6*	6.9
X	AMP–PNP	4.2**	6.4

*Lew *et al.* 1997

**Whitehouse *et al.* 1983



Joonis 6. Sõltuvus inhibiitorite aktiivsus pK_i sidumisenergiatest E , mis kirjeldab kompleksi moodustumise energiat. ATP jaoks oli kasutatud pK_d väärtust.

Samas on huvitav, et uuritud ained jagunevad kahte gruppi. Esimese grupi moodustavad ained, kus üks või kaks fosfaatgrupp on liidetud orgaanilise molekuli fragmendile või peptiidile. Sealhulgas on ka fosforüleeritud D-riboosi punkt. Teises grupis on ained, mis sisaldavad adensiini jääki. Seega muudab adensiinijäägi viimine inhibiitori molekuli ligandi sidumise mehhanismi, mis ei ole aga ka üllatav, arvestades proteiinkinaaside spetsialiseerumist ome teise loodusliku substraadi ATP suhtes.

KOKKUVÕTE

Magistritöö „cAMP–sõltuva proteiinkinaasi inhibeerimine mõningate fosfaatrühma sisaldavate ligandidega“, Dmitri Solntsev

Käesolevas töös on uuritud 8 fosfaatrühma sisaldava ligandi inhibeerivat toimet proteiinkinaas A katalüüsil ja määrati nende ainete jaoks IC_{50} väärtused ning neist arvutati ka K_i väärtused. Inhibiitorite seeria algab fosfaatioonist, mille Mg-kompleks omab ka inhibeerivat toimet. Esmakordselt kirjeldati fruktoosfosfaadi ja fosfoenoolpüruvaadi inhibeerivat toimet. Uuritud fosfopeptiidi RRAS(P_i)VA inhibeeriv toime oli ootuspäraselt nõrk. Inhibiitorite seostumine paranes adensiini rühma juuresolekul, mida näitavad AMP, cAMP ja ADP IC_{50} väärtuste kohta saadud andmed.

SUMMARY

TÄNUAVALDUS

Antud töö oli teostatud TÜ Keemia Instituudis.

Tahaksin tänada minu prof. Jaak Järve tema nõusoleku eest minuga töötada ja tema kannatlikkuse, kaastundlikkuse ja lojaalsuse eest magistritöö valmimise ajal. Samuti sooviksin avaldada tänu minu teisele juhendajale – Aleksei Kuznetsovile. Kõik katsed oli tehtud tema järeelvaatusel ja pideva ning asjaliku kriitika tingimustes, mis oli ka mõjusaim tegur aitamaks katseid läbi viia ja neist aru saada.

Tänan ka kõiki Keemia Instituudi inimesi nõuannete eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

Adams J. A. (2001) Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.* **101**, 2271-2290.

Adams J. A., Taylor S. S. (1992) Energetic limits of phosphotransfer in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase as measured by viscosity experiments. *Biochemistry.* **31**, 8516-22.

Beebe S. J., Corbin J. D. (1986) *The enzymes.* **17**, 44-100.

Bossemeyer D., Engh R. A., Kinzel V., Ponstingl H., Huber R. (1993) Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn²⁺ adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5–24). *EMBO.* **12**, 849-859.

Broom A. D. (1989) Rational design of enzyme inhibitors: multisubstrate analogue inhibitors. *J. Med. Chem.* **32**, 2-7.

Cheng Y. C., Prusoff W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmac.* **22**, 3099-3108.

Cook P. F., Neville M. E., Jr., Vrana K. E., Hartl F. T., Roskoski R. Jr. (1982) Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: kinetic mechanism for the bovine skeletal muscle catalytic subunit. *Biochemistry.* **21**, 5794-9.

DeBont H. L., Rosenblatt J., Jancarik J., Jones H. D., Morgan D. O., Kim S. H. (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature.* **363**, 595-602.

Engh R. A., Girod A., Kinzel V., Huber R., Bossemeyer D. (1996) Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8 and H89. Structural implications for selectivity. *J. Biol. Chem.* **271**, 26157-64.

Enkvist E., Lavogina D., Raidaru G., Vaasa A., Viil I., Lust M., Viht K., Uri A. (2006) Conjugation of adenosine and hexa-(D-arginine) leads to a nanomolar bisubstrate-analog inhibitor of basophilic protein kinases. *J. Med. Chem.* **49**, 7150–7159.

Erlichman J., Rubin C. S., Rosen O. M. (1973) Physical properties of a purified cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine heart muscle. *J. Biol. Chem.* **248**, 7607-9.

Fischer P. M. (2004) The design of drug candidate molecules as selective inhibitors of therapeutically relevant protein kinases. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1563-83.

- Grant B., Adams J. A. (1996) Pre-steady-state kinetic analysis of cAMP-dependent protein kinase using rapid quench flow techniques. *Biochemistry*. **35**, 2022-2029.
- Greenwald I., Redish J. and Kibrick A. C. (1940) The dissociation of calcium and magnesium phosphates. *J. Biol. Chem.* **135**, 65-76.
- Hanks S. K., Hunter T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576-96.
- Hanks S. K., Quinn A. M., Hunter T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*. **241**, 42-52.
- Hidaka H., Inagaki M., Kawamoto S. and Sasaki Y. (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry*. **23**, 5036-41.
- Hunter T. (1994) 1001 protein kinases redux – towards 2000. *Seminars in Cell Biology*. **5**, 367-376.
- Jeffrey P. D., Russo A. A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J., Pavletich N. P. (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*. **376**, 313-320.
- Johnson L. N. (2001) Structural basis for substrate recognition and control in protein kinases. *Ernst Schering Res. Found Workshop*. **34**, 47-69.
- Johnson L. N., Noble M. E., Owen D. J. (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*. **85**, 149-58.
- Kemp B. E., Benjamini E., Krebs E. G. (1976) Synthetic hexapeptide substrates and inhibitors of 3':5'-cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **73**, 1038-42.
- Kemp B. E., Pearson R. B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 342-6.
- Knight Z. A., Shokat K. M. (2005) Features of selective kinase inhibitors. *Chem. Biol.* **12**, 621-637.
- Knighton D. R., Zheng J., Ten Eyck L. F., Ashford V. A., Xuong N.-h., Taylor S. S., Sowadski J. M. (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*. **253**, 407-14.
- Kong C.-T., Cook P. F. (1988) Isotope partitioning in the adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase reaction indicates a steady-state random kinetic mechanism. *Biochemistry*. **27**, 4795-99.

Kuznetsov A., Oskolkov N., Hansen M., Jarv J. (2003) Steady-state kinetic analysis of protein kinase A interaction with peptide and ATP. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* **52**, 165-177.

Lavogina D., Enkvist E., Uri A. (2010) Bisubstrate inhibitors of protein kinases: from principle to practical applications. *ChemMedChem.* **5**, 23-34.

Lew J., Coruh N., Tsigelny I., Garrod S. and Taylor S. S. (1997) Synergistic binding of nucleotides and inhibitors to cAMP-dependent protein kinase examined by acrylodan fluorescence spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **272**, 1507-1513.

Lew J., Taylor S. S. and Adams J. A. (1997) Identification of a partially rate-determining step in the catalytic mechanism of cAMP-dependent protein kinase: a transient kinetic study using stopped-flow fluorescence spectroscopy. *Biochemistry.* **36**, 6717-6724.

Loog M., Uri A., Raidaru G., Järvi J., Ek P. (1999) Adenosine-5'-carboxylic acid peptidyl derivatives as inhibitors of protein kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1447-52.

Madhusudan, Trafny E. A., Xuong N.-h., Adams J. A., Ten Eyck L. F., Taylor S. S., Sowadski J. M. (1994) cAMP-dependent protein kinase: Crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer. *Protein Sci.* **3**, 176-187.

Medzihradzky D., Chen S. L., Kenyon G. L., Gibson B. (1994) Solid-phase synthesis of adenosine phosphopeptides as potential bisubstrate inhibitors of protein kinases. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9413-9.

Meggio F., Donella Deana A., Ruzzene M., Brunati A. M., Cesaro L., Guerra B., Meyer T., Mett H., Fabbro D., Furet P., Dobrowolska G., Pinna L. A. (1995) Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eur. J. Biochem.* **234**, 317-22.

Metzler D. E. and Metzler C. M. (2001) *Biochemistry*, 2nd Ed., Vol. 1, pp. 508-511, Harcourt/Academic press, San Diego, Boston.

Munoz M. E. and Ponce E. (2003) Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **135**, 197 – 218.

Nelson D. L. and Cox M. M. (2009) *Lehninger principles of biochemistry*, 5th Ed. Freeman, New York.

Parang K., Cole P. A. (2002) Designing bisubstrate analog inhibitors for protein kinases. *Pharmacology & Therapeutics.* **93**, 145-157.

Pehk T., Uri A. (1997) Synthesis and structural characterization of conjugates of adenosine and tetra-aspartate, novel analogs of ATP. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 2159-2164.

Pinna L. A., Ruzzene M. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta.* **1314**, 191-225.

Ricouart A., Gesquiere J. C., Tartar A., Sergheraert C. (1991) Design of potent protein kinase inhibitors using the bisubstrate approach. *J. Med. Chem.* **34**, 73-8.

Shoji S., Parmelee D.C., Wade R.D., Kumar S., Ericsson L.H., Walsh K.A., Neurath H., Long G.L., Demaille J.G., Fischer E.H., Titani K. (1981) Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 848-851.

Slice L. W. and Taylor S. S. (1989) Expression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 20940-20946.

Tamaoki T., Nomoto H., Takahashi I., Kato Y., Morimoto M. and Tomita, F. (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 397-402.

Tao M., Salas M. L., Lipmann F. (1970) Mechanism of activation by adenosine 3':5'-cyclic monophosphate of a protein phosphokinase from rabbit reticulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **67**, 408-14.

Taylor S. S., Radzio-Andzelm E. (1994) Three protein kinase structures define a common motif. *Structure.* **2**, 345-55.

Taylor S. S., Radzio-Andzelm E., Knighton D. R., Ten Eyck L. F., Sowadski J. M., Herberg F. W., Yonemoto W., Zheng J. (1993) Crystal structures of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal general features of the protein kinase family. *Receptor.* **3**, 165-72.

Taylor S. S., Yang J., Wu J., Haste N. M., Radzio-Andzelm E., Anand G. (2004) PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1697**, 259-269.

Uhler M.D., Carmichael D.F., Lee D.C., Chrivia J.C., Krebs E.G., McKnight G.S. (1986) Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 1300-1304.

Uri A., Jarlebark L., von Kugelgen I., Schonberg T., Uden A., Heilbronn E. (1994) A new class of compounds, peptide derivatives of adenosine 5'-carboxylic acid, includes inhibitors of ATP receptor-mediated responses. *Bioorg Med Chem.* **2**, 1099-1105.

Venter J. C. *et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science.* **291**, 1304-1351.

Walsh D. A., Ashby C. D., Gonzalez C., Calkins D., Fischer E. H. and Krebs E. G. (1971) Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* **246**, 1977-1985.

Walsh D. A., Glass D. B. (1991) Utilization of the inhibitor protein of adenosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase, and peptides derived from it, as tools to study adenosine cyclic monophosphate-mediated cellular processes. *Methods Enzymol.* **201**, 304-16.

Walsh D. A., Perkins J. P., Krebs E. G. (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **243**, 3763-65.

Whitehouse S., Feramisco J. R., Casnellie J. E., Krebs E. G. and Walsh D. A. (1983) Studies on the kinetic mechanism of the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **258**, 3693-3701.

Whitehouse S., Walsh D. A. (1983) Mg•ATP²⁻-dependent interaction of the inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase with the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* **258**, 3682-92.

Wolfenden R. (1972) Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions. *Acc. Chem. Res.* **5**, 10-18.

Yonemoto W. M., McGlone M. L., Slice L. W., Taylor S. S. (1991) Prokaryotic expression of catalytic subunit of adenosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Methods Enzymol.* **200**, 581-96.

Yoon M. Y., Cook P. F. (1987) Chemical mechanism of the adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase from pH studies. *Biochemistry.* **26**, 4118-4125.

Zheng J., Knighton D. R., Ten Eyck L. F., Karlsson R., Xuong N.-h., Taylor S. S., Sowadski J. M. (1993) Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry.* **32**, 2154-2161.

Zheng J., Trafny E. A., Knighton D. R., Xuong N. H., Taylor S. S., Ten Eyck L. F., Sowadski J.M. (1993) 2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Crystallogr.* **49**, 362-365.

Zimmermann B., Schweinsberg S., Drewianka S., Herberg F. W. (2008) Effect of metal ions on high-affinity binding of pseudosubstrate inhibitors to PKA. *Biochem. J.* **413**, 93-101.

Zoller M. J., Taylor S. S. (1979) Affinity labeling of the nucleotide binding site of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase using p-fluorosulfonyl-[¹⁴C]benzoyl 5'-adenosine. Identification of a modified lysine residue. *J. Biol. Chem.* **254**, 8363-8.