

KJ2900 BACHELOREMNET I KJEMI

Er fullstendig selektiv inhibering av CLK1 en mulighet?

Renate Lokøy

Veileder: Bård Helge Hoff

30. april 2021



Institutt for Kjemi

Fakultet for naturvitenskap

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Sammendrag

Cdc2-like kinase 1 (CLK1) er en proteinkinase som er involvert i pre-mRNA spleising. Den er sammenkoblet med flere sykdommer. Derfor er inhibering av CLK1 er et svært aktuelt tema, da dette kan forhindre flere lidelser. Ved å gjøre et litteratursøk blir det forsøkt å svare på problemstillingen: *Er selektiv inhibering av CLK1 mulig, og hvis det er mulig, hvilken inhibitor er best for CLK1?*. Dette blir gjort ved å først se på CLK1 sin funksjon i cellen, og ulike inhibitorer til CLK1. I diskusjonen blir teorien brukt for å svare på problemstillingen. For å finne ut hvor selektiv inhibitorene er blir IC₅₀-verdiene for CLK1 og DYRK1A sammenlignet. Videre blir det konkludert med at selektiv inhibering av CLK1 ikke er et enkelt mål, hvor forbindelse **5** er den som så langt har best dokumentert effekt. Selektiv inhibering er vanskelig å få til siden CLK1 deler egenskaper med andre enzymer, som DYRK1A.

Innhold

Sammendrag	2
1 Introduksjon	4
2 Teori	5
2.1 Proteinkinaser og CLK	5
2.2 SR-proteiner	5
2.3 Spleising av pre-mRNA	6
2.4 Strukturen til CLK1	6
2.5 Bioinformatikk	8
2.6 Mekanistiske studier	9
2.6.1 Inhibering	9
2.6.2 Grad av inhibering	14
3 Diskusjon	15
Konklusjon	18

1 Introduksjon

Proteinkinaser tar del i omtrent alle de viktigste funksjonene i en celle. Proteinkinaser fosforylerer hydroksylgrupper på proteiner slik at de kan aktiveres eller deaktiveres. Fosforylering vil si at en fosfatgruppe fra nukleosidtrifosfat, ofte ATP, overføres til hydroksylgruppen. Cdc2-like kinase 1 (CLK1) er en protein kinase som tar del i spleising av pre-mRNA. Spleising er en prosess der ikke-kodende sekvenser av pre-mRNA klippes ut slik at de kodende sekvensene kan limes sammen til mRNA. Alternativ spleising gir opphav til mangfold i gener hos levende organismer^[1]. Et eksempel på mangfold i gener er ulike øyefarger hos mennesker. Det er vist sammenhenger mellom CLK1 og flere sykdommer som alzheimers^[2], influensa^[3] og magekreft^[4]. Det er sykdommer som disse som er inspirasjonen for inhibering av CLK1 i håp om å kunne kurere sykdommene. Dette er et lite utforsket område, så det finnes foreløpig begrenset litteratur om temaet.

Problemstillingen for denne oppgaven er følgende: *Er selektiv inhibering av CLK1 mulig, og hvis det er mulig, hvilken inhibitor er best for CLK1?* Det er gjennomført et litteratursøk for å undersøke hvilken funksjon CLK1 har i cellen og innsamling av ulike inhibitorer som er blitt utviklet de ti siste årene. For å finne ut hvor selektive disse inhibitorene er, blir de sammenlignet med DYRK1A, en kinase som deler ganske lik aminosyresekvens som CLK1. CLK1 og DYRK1A er blitt mest sammenlignet da det var inhibering av disse to som det var mest litteratur på.

Litteratursøket ble gjennomført ved å søke i databasene Oria, Google Scholar og Science direct i perioden januar 2021-april 2021. Artiklene ble valgt ut ved å se på sammendragene, og basert på disse velge ut de som er mest relevant for problemstillingen.

Det første kapittelet er introduksjonen til oppgaven hvor temaet blir satt i dagsaktuell kontekst og hvilken metode som blir brukt. Det andre kapittelet tar for seg teori relevant for problemstillingen. Det tredje kapittelet inneholder diskusjon hvor teori blir knyttet til problemstillingen, og drøfting problemstillingen. Til slutt kommer det en konklusjon som presenterer funnene fra oppgaven.

2 Teori

2.1 Proteinkinaser og CLK

Proteinkinaser er enzymer som fosforylerer spesifikke aminosyrer i et protein. Fosfatet kommer ofte fra γ -fosforyl gruppen på nukleosidtrifosfat, oftest fra adenosintrifosfat (ATP). γ -Fosforyl gruppen overføres til serin (Ser), treonin (Thr), tyrosin (Tyr) og noen ganger histidin (His). Denne fosforyleringen gjør at det blir ladning på en del av proteinet som var moderat polart. Fosfatgrupper kan danne hydrogenbindinger innad i proteinet, i tillegg vil fosforylerte aminosyrer frastøte aminosyrer med negativt ladde sidekjerder^[5]. Proteinkinaser er en viktig del av signalkaskader som strekker seg fra membran reseptorer til intracellulære reseptorer og enzymer. Mekanismen for hvordan substrat bindes til proteinkinaser er todelt. Det aktive setet gjenkjenner lokasjonen som skal fosforyleres, mens en “forankringsgrop” gjenkjenner selve substratet til CLK1^[6].

CMGC er en proteinkinase gruppe bestående av “cyclin-dependent kinase” (CDK), “mitogen-activated protein kinase” (MAPK), “glycogen syntase kinase” (GSK3) og “Cdc2-like kinase” (CLK)^[7]. CMGC får navnet sitt etter første bokstav av hovedkinasene^[1]. CLK-familien av kinaser består av fire kinaser; CLK1, CLK2, CLK3 og CLK4, hvor CLK1 og CLK4 er mest like^[1]. I motsetning til andre proteinkinaser mangler CLK-enzymene en “forankringsgrop”. Hvordan det er mulig for CLK å hyperfosforylere uten en “forankringsgrop” er så langt ukjent^[6].

I tillegg til å ha likheter med enzymene innad i CMGC-gruppen, er CLK-familien nært beslektet med en dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DYRK). CLK og DYRK ligner på hverandre både i struktur og i funksjon^[8].

2.2 SR-proteiner

CLK-enzymene sin funksjon er å katalysere hyper-fosforylering av proteiner rik på repeterende serin-arginin (SR) dipeptider, forkortet SR-proteiner^[6]. SR-proteiner er en gruppe spleising-faktorer bestående av 12 medlemmer, som alle har ganske lik struktur med ett eller to RNA gjenkjennende motiv (RRM)^[9]. De forkortes SRSF 1-12. SR-proteiner befinner seg i cellekjernen i membranfrie lagringskomponenter, kalt interchromatingranuler^[10]. SR-proteiner interagerer med RNA og andre proteiner i cellen, og er assosiert med spleising av forløper-mRNA (pre-mRNA)^[1].

Etter at SR-proteinet er blitt fosforylert av CLK1 kan proteinet bevege seg innad i nukleoplasma, og så binde seg til nærliggende store nukleære ribonukleoproteiner. Disse ribonukleoproteinene er involvert i spleising. SR-proteinet kan bindes til fremhevende spleisingfaktorer^[2].

Det er ikke bare SR-dipeptider som blir fosforylert av CLK1; også serin-prolin (SP) dipeptider kan fosforyleres^[11]. Fosforylering av SP-dipeptider gjør at SR-proteinet kan frigjøres fra interchromatin granuler. Dersom CLK1 mister sin evne til å fosforylere SP-dipeptider vil det resultere

i at over 100 gener ikke lenger blir uttrykt^[9]. Dette vil bli diskutert senere.

2.3 Spleising av pre-mRNA

Spleising av pre-mRNA er en prosess der introner fjernes fra pre-mRNA. Deretter vil exoner kunne limes sammen til modent mRNA^[12]. Intron er den sekvensen som ikke koder for proteiner, mens exon er den kodende sekvensen^[5]. Spleising blir for det meste regulert av proteinkinaser, som CLK1, ved at kinasene fosforylerer spleisingfaktorer, som SR-proteiner^[1]. Montering og seleksjon av exonene til modent mRNA avhenger av spleising faktorene^[10] i den forstand at de påser at exonene blir riktig sammenkoblet, fra 5-ende til 3-ende på mRNA^[6].

pre-mRNA blir modifisert av spleisosomer^[8]. Spleisosomer er store proteinkomplekser som består av flere spesialiserte RNA-proteinkomplekser kalt små nukleære ribonukleoproteiner (snRNP). Spleising av introner skjer inni spleisosomene^[5]. Fosforylering av SR-proteiner gjør at de kan bevege seg fra interchromatingranuler til nukleoplasmaen^[10]. I nukleoplasmaen binder SR-proteinene seg til pre-mRNA, slik at interaksjonene mellom ulike komponenter av spleisosomer stabiliseres. Denne stabiliseringen gjør at spleisosomene kan monteres sammen til modent mRNA^[1]. Etter at modent mRNA er blitt montert, transporteres det til cytoplasma og er klar for å bli translatert til proteiner^[10].

2.4 Strukturen til CLK1

Strukturen til CLK-enzymene er generelt ganske like. Krystallstrukturen til CLK1 er vist i Figur 2.1. De består av en N- og C-terminal, som er tilkoblet via ATP-bindingssetet. I den bakre delen av ATP-bindingssetet danner en glutaminsyre og et lysin et ionepar. Det er denne delen av bindingssetet som hjelper til med å overføre γ -fosfat fra ATP over på enzymet. ATP binder seg til enzymet med en hydrogenbinding til NH og CO på ryggraden til enzymet^[1].

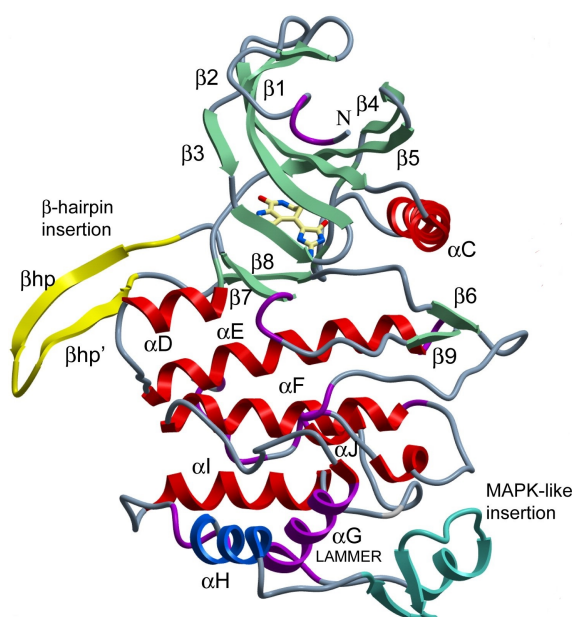
Innad i CLK-familien er det CLK1 og CLK4 som har flest likheter. I ATP-bindingssetet har de helt lik aminosyresekvens. I tillegg er bindingssete lokalisert nærmest identisk; På CLK1 er det lokalisert på aminosyrene 167-175, på CLK4 er det plassert på aminosyrene 165-173^[1]. ATP-bindingssetet til CLK1 og DYRK1A har ganske lik sekvens av aminosyrer, og har tilnærmet lik utfoming^[8]. I tillegg har CLK1 og DYRK1A 70,4% lik aminosyresekvens^[13]. I CLK1 følger det katalytiske domenet en ordinær proteinkinase fold^[2].

N-terminalen til CLK1 er lange og fleksible, og består av omtrent 140-300 aminosyrer^[6], med en serin-arginin repeterende sekvens, kalt et RS-domene^[9]. N-terminalen består av tre β -tråder etterfulgt av en α -heliks og to ekstra β -tråder. På figur 2.1 er N-terminalen den øverste delen. β -Trådene er β 1-3. α -helixen er navngitt α C, og de to siste β -trådene er β 4-5^[14].

N-terminalen fungerer som et anker til substratet, og regulerer CLK1 sin aktivitet^[2]. Ved fjerning

av N-terminalen, fant Aubol et al.^[6] at færre serin-enheter blir fosforylert. Derfor er det dratt den konklusjon at for å optimalt fosforylere SR-proteiner er det viktig med tilstedeværelse av N-terminalen^[6]. Det er vist at CLK1 i mus bruker N-terminalen til å binde RS domenet og føre dipeptider inn til det aktive setet. I human CLK1 brukes N-terminalen til å lede enzymet mot SRSF1^[11].

C-terminalen til CLK1 er det katalyserende domenet^[9], og består av flere motiv som er spesielt for CLK-familien^[14]. Det er en fordypning mellom to β -flak som danner en utvidet β -hårnål struktur^[2], vist i gul på figur 2.1. Den er lokalisert på aminosyrene 409-418^[14]. β -hårnålen er pakket mot en grop laget av to α -helikser. En tredje α -heliks, kalt α G på Figur 2.1, består av et LAMMER motiv^[2] og er lokalisert på aminosyrene 386-396. α G-heliksen befinner seg på bunnen av C-terminalen^[14]. LAMMER motivet består av aminosyrene EHLAMMERIL, og er et vanlig motiv innen proteinkinaser i CMGC-familien^[15]. Tilstedeværelse av LAMMER-motivet indikerer at det er tre ulike mekanismer som regulerer CLK1. En av de tre mekanismene er positiv regulering, de resterende to er negativ regulering, både negativt og positivt^[2]. Den positive reguleringen av enzymet kommer av at det blir fosforylert på enten tyrosin enheter eller på serin/threosin enheter. De negative reguleringsmekanismene har to årsaker. Den ene er at N-terminalen sterisk hindrer enzymet. Den andre er når en subdel av serin/threonin-enheter i det katalytiske domenet blir fosforylert^[2]. På Figur 2.1 er det også illustrert en MAPK-lik fordypning på C-terminalen. Denne fordypningen er en heliks-loop-heliks som er svært typisk for MAPK-familien. På CLK1 befinner dette motivet seg på samme plass som det gjør MAPK-familien^[14].

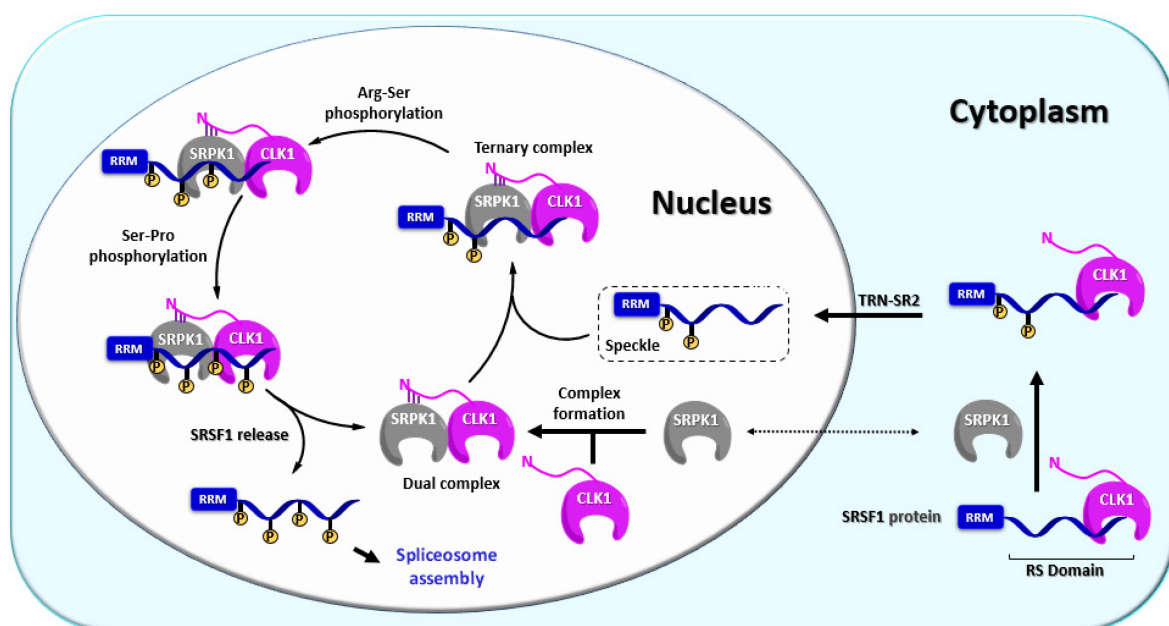


Figur 2.1: Krystallstruktur av CLK1 med inhibitor debromohymenialdisin vist med strukturformel. Den øverst, grønne delen er N-terminalen. Det gule området viser β -hårnål strukturen. Nederst på enzymet er LAMMER-motivet og MAPK-lik fordypning. α heliksene og β flakene er navngitt. Reprintet med tillatelse fra Cell Reports^[14].

2.5 Bioinformatikk

For det meste er de ulike isoformene av CLK lokalisert i cellekjernen^[1]. Siden CLK-enzymet også kan fosforylere serin-prolin dipeptider på SR-proteiner er det mulig for proteinet å bevege seg fra interchromatin granuler til transkripsjon- og spleising-lokasjoner i cellekjernen. Dette resulterer i at alternativ genspleising er avhengig av CLK^[11].

CLK1 kan ikke fritt diffundere gjennom cellekjernemembranen. For å komme seg fra cytoplasma til cellekjernen bruker den SR-proteiner. Dette skjer ved at den fester sin N-terminal på den RS-rike delen av SRSF1. Ved at et annet enzym, kalt SRPK1, fosforylerer flere serin-enheter, som fører til at en import reseptor kalt TRN-SR2, kan binde seg og transporterer CLK1-SRSF1 komplekset inn i cellekjernen^[10]. TRN-SR2 gjenkjenner SR-proteiner og importerer de inn i cellekjernen^[16]. I cellekjernen blir CLK1 og SRSF1 skilt fra hverandre ved hjelp av SRPK1. Da er SRSF1 fosforylert og er klar til å bidra i spleising^[10]. O i cellekjernen kan CLK1 og SRPK1 samarbeide ved å danne et kompleks som kan ta imot hyperfosforylert SR-proteiner fra interchromatingranuler. Dette danner et CLK1-SRPK1-SRSF1 kompleks. SR-proteinet blir fullstendig fosforylert og frigjort, slik at det kan ta del i spleising^[1]. En skjematisk gjennomgang av import av CLK1 til cellekjernen, og funksjon i cellekjernen er vist i Figur 2.2.



Figur 2.2: En skjematisk oversikt over import av CLK1 til cellekjernen. CLK1 og SRSF1 kobles sammen i cytoplasma. SRSF1 blir fosforylert av SRPK1 og transporteres inn i cellen ved bruk av TRN-SR2. I cellekjernen kan CLK1 og SRPK1 danne et kompleks som hyperfosforylerer SR-protein. Reprintet med tillatelse fra International Journal of Molecular Sciences^[1].

CLK1 er høyt uttrykt i svulster i nervesystemet og i tumorer på nervene^[9]. I magekreftceller er mengden CLK1 uttrykt mellom 10 og 30%, mens det i vanlige mageceller normalt er under 10% CLK1^[4]. Ved influensainfeksjon og -replikasjon, er det vist at CLK1 i vertscellen er ansvarlig

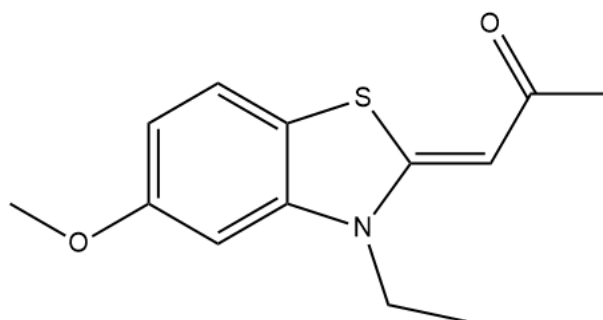
for at det skjer alternativ spleising på influensaviruset i cellen. Det er med dette som bakgrunn at CLK1 er et tenkt mål for medisiner mot influensa^[3]

2.6 Mekanistiske studier

2.6.1 Inhibering

Selektiv inhibering av ett enzym i CMGC er ofte vanskelig, siden det er flere enzymer i denne gruppen som ligner på hverandre. Dermed vil en forbindelse som inhiberer CLK1 også kunne inhibere lignende enzym, som for eksempel DYRK1A og CLK4^[17].

Den mest kjente inhibitoren av CLK1 er (Z)-1-(3-etyl-5-metoxybenzo[d]thiazol-2(3H)-yliden)-propan-2-on, kalt TG003^[13], et benzothiazole derivat^[2]. Strukturformelen er vist i Figur 2.3. Den er en konkurrerende inhibitor som binder seg til ATP-bindingssetet på CLK1^[2]. Den er også vist å ha inhiberende effekt på DYRK1A^[18].

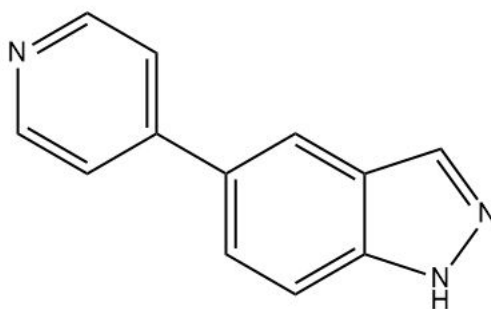


Figur 2.3: Strukturformel av TG003

En studie av Babu et al. viste at inhibering av CLK1 med 5 og 10 μM av TG003 reduserte levetiden til celler, og også antall cellekolonier i en cellelinje. I tillegg indikerte studien at inhibering av CLK1 minsker evnen til å lage flere magekreftceller. Det ble også vanskeligere for disse kreftcellene å kunne spre seg^[4].

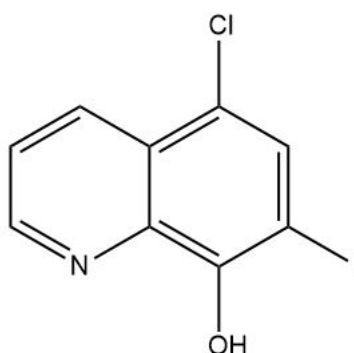
Sako et al. fant, ved å gjøre forsøk på mus, at TG003 er metabolsk ustabil i blodplasma^[19]. Til gjengjeld fant de at en annen inhibitor, kalt TG693 (5-(4-pyridinyl)-1H-indazole), er en metabolsk stabil inhibitor. Strukturformelen er vist i Figur 2.4. Da de ga musene TG693 oralt, ble SR-proteinene i musklene i mye mindre grad fosforylert. Det er også en konkurrerende inhibitor, som konkurrerer om ett enkelt sete på CLK1. Både TG693 og TG003 følger samme biokjemiske mekanisme^[19].

Clioquinol (5-klor-7-jod-quinolin-8-ol) er en metallchelator som er blitt mye brukt i behandling av Alzheimer^[2]. Ved å behandle cellekulturer, rundormer og mus med clioquinol, ble mengden



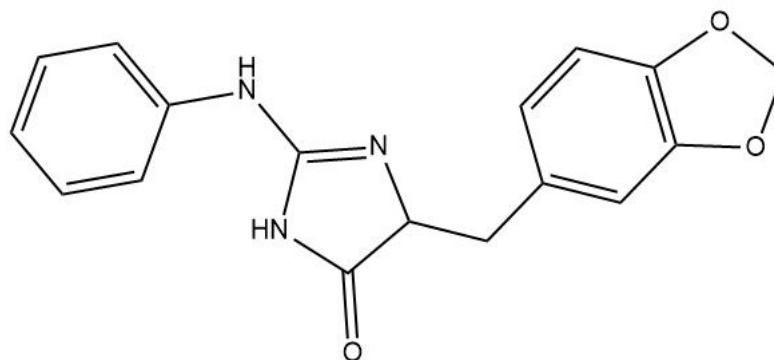
Figur 2.4: Strukturformel av TG693

CLK1 protein redusert og aldrig ble forsinket i cellene^[20]. Tilstedeværelsen av jern- eller koboltkationer blokkerte den beskyttende effekten av clioquinol på CLK1 mot aldrig. Metallkationene okkuperte clioquinol bindingssete på CLK1, som antyder at chelateringen er en del av mekanismen til clioquinol. Hvilken mekanisme clioquinol følger, er fortsatt uklart^[2]. Strukturformel til clioquinol er vist i Figur 2.5.



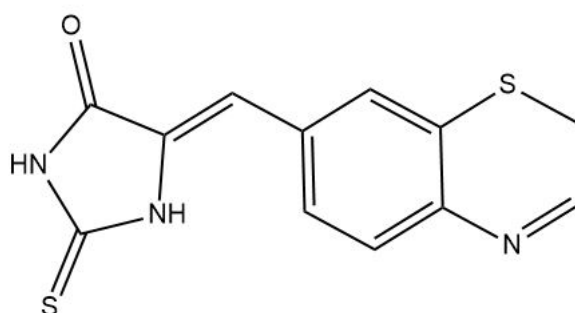
Figur 2.5: Strukturformelen til clioquinol

Fant et al.^[21] viste at leucetinner generelt modifierer mønsteret av spleising av pre-mRNA som fører til en endring i proporsjonene av spleising variantene. Av leucetinnene er leucettine L41 (L41) en inhibitor av både DYRK- og CLK-enzymene. Strukturformel er vist i Figur 2.6. Den har vist seg å ha en lav grad av toksisitet. Dette ble avklart ved å måle hvor mye laktatdehydrogenase som har lekket ut i cytoplasmaen etter 24 timer. L41 er mer spesifikk mot CLK-enzymene enn mot DYRK-enzymene. Ved å teste L41 på menneskelige benkreftceller ble CLK mer inhibert enn DYRK. Dette førte til autofagi^[21]. Autofagi er en prosess der cellen bryter ned skadde eller ubrukelige proteiner og organeller for å forhindre celledød^[13]. Inhibering av CLK fører altså til mer autofagi enn ved inhibering av DYRK^[21].



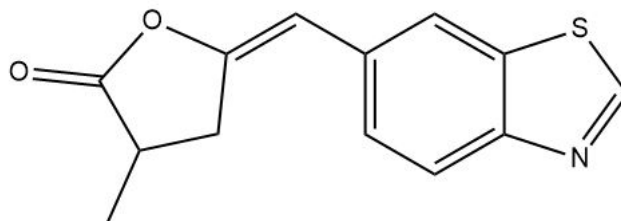
Figur 2.6: Strukturformel av leucettine L41 (L41)

En studie hvor de brukte ulike derivater av benzyliden thioxothiazolidinon fant at (Z)-5-(quinoxalin-6-ylmetylen)-2-thioximidazolidin-4-on, heretter kalt forbindelse **1**, var veldig selektiv mot CLK1 i forhold til DYRK1A, hvor den var 30 ganger mer selektiv mot CLK1. Aktiviteten til forbindelse **1** ble kun målt i enzymnivå, og ikke i celler^[18]. Forbindelse **1** er vist i Figur 2.7.



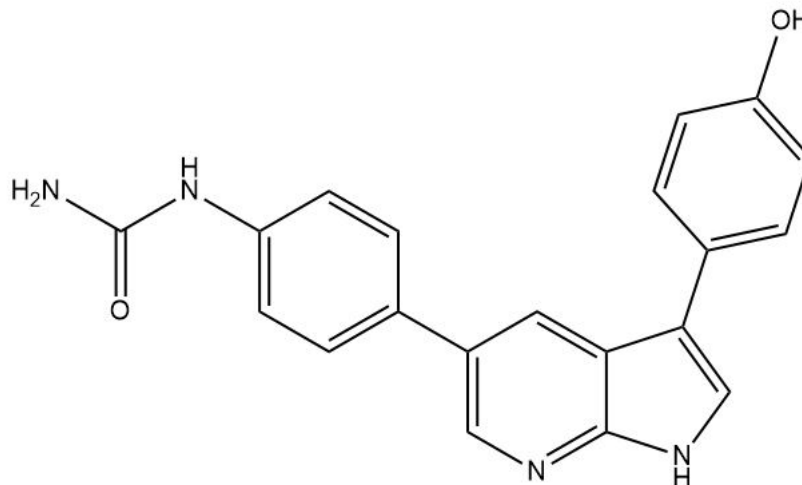
Figur 2.7: Strukturformel til forbindelse **1**

I samme studie brukte de α -benzylidin- γ -butyrolakton derivater, og fant at ved å introdusere en benzothiazole gruppe på benzylidin-moetieten og en metylgruppe på butyrolakton-delen ble CLK1 og DYRK1A inhibert. Dette ga forbindelse **2** vist i Figur 2.8. Av de ulike derivatene laget av α -benzylidin- γ -butyrolakton var forbindelse **2** den som hadde høyest selektivitet mot CLK1, selv om enzymet bare ble moderat inhibert. Forbindelse **2** ble i likhet med forbindelse **1** kun studert på enzymnivå, og ikke på cellulært nivå^[18].



Figur 2.8: Strukturformel til forbindelse 2

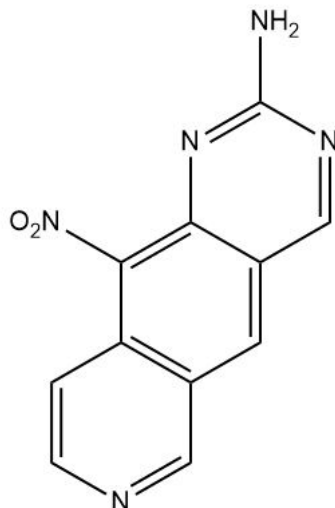
Ved å lage derivater av 7-azaindol fant Zhou et al.^[17] at en indolanalog inhiberte CLK1 og DYRK1B bedre enn DYRK1A. De fant også at flere inhibitorer av DYRK1A også kan bindes til og inhibere kinasene i CLK-familien. Ved å substituere C3 på 7-azaindol med en fenol og 1-fenylurea på C5 kom de frem til forbindelse 3, vist i Figur 2.9. I hjernekreftceller viste forbindelse 3 dobbelt så stor inhiberende effekt på CLK1 enn DYRK1A og DYRK1B^[17].



Figur 2.9: Strukturformel til forbindelse 3

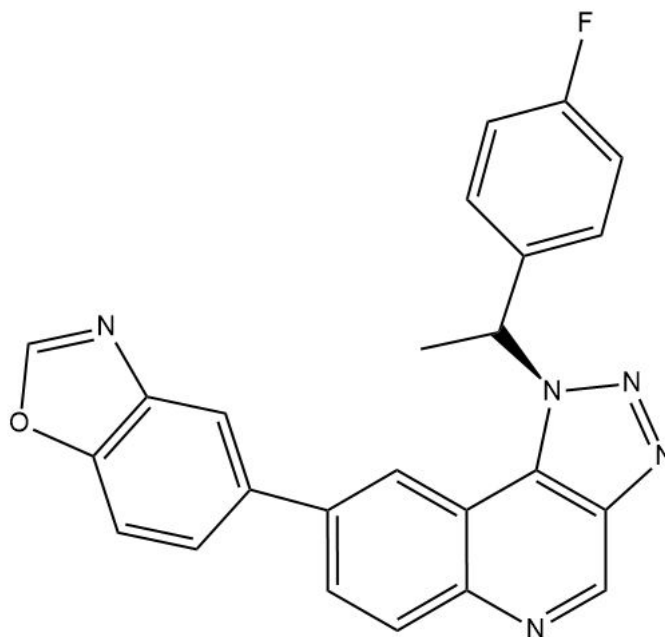
En studie gjort av Esvan et al.^[22] ville finne nye inhibitorer fra pyrido[3,4-g]quinazolin-derivater. De fant at ved å ha en aminopyrimidin substituent ble stoffklassen mer effektiv mot CLK1. Aminopyrimidin substituenten var da orientert mot bunnen av ATP-bindingssete, og dannet en hydrogenbinding med NH og karbonyl på ryggraden til aminosyren Leu244. Nitrogenet på pyridindelen danner hydrogenbinding til sidegruppen på aminosyren Lys191. I tillegg viste de at tilstedeværelsen av en nitro- eller aminogruppe var spesielt viktig for å inhibere CLK1 og

DYRK1A. Forbindelsen med nitrogruppe på C10, heretter kalt forbindelse **4**, viste seg å ha 10 ganger bedre aktivitet mot CLK1 enn mot DYRK1A. Effektivitet og selektivitet ble studert på enzymnivå, og ikke cellulært. Strukturformel til forbindelse **4** er vist i Figur 2.10^[22]



Figur 2.10: Strukturformel til forbindelse **4**

Ved å lage derivater av 1-metyl-8-(2-metylpyridin-4-yl)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-c]quinolin ble det forsøkt å finne en god inhibitor av CLK1. To ulike lokasjoner på startmolekylet ble substituert. På første substituent viste det seg at en (*S*)-1-(4-fluor-phenyl)etyl hadde høyest selektivitet og var mest reaktiv med CLK1. På den andre substituenten var benzo[*d*]oxazol-5-yl den som ga best inhibering. Sun et al.^[13] kom dermed frem til forbindelse **5**, vist i Figur 2.11, som beste inhibitor for CLK1. I ATP-bindingssetet til CLK1 danner nitrogen på quinolingruppen og Lys191 en hydrogenbinding. Oxazole oksygen og Leu244 danner en hydrogenbinding, hvor oksygenatomet er akseptor. Forbindelse **5** hadde også inhiberende effekt på CLK2 og CLK4, hvor CLK4 var den som ble mest inhibert. DYRK1A ble ikke nevneverdig inhibert. Behandling av embryoniske leverceller fra mus med forbindelse **5** viste at SR-proteiner ble redistribuert fra nukleoplasmaen til interchromatingranuler. Effekten av forbindelse **5** ble sjekket mot en positiv kontroll; 10 μ M ATP. Både forbindelse **5** og ATP redistribuerte SR-proteinene. Med bakgrunn i dette ble det konkludert at forbindelse **5** effektivt kan inhibere CLK1 i intakte celler. Til slutt fant Sun et al. at for å best effekt, var det 10 μ M av forbindelse **5** som kom best ut^[13]



Figur 2.11: Strukturformel til forbindelse 5

2.6.2 Grad av inhibering

IC_{50} er et mål på hvilken konsentrasjon av inhibitor som gir 50% av total inhibering på enzymet^[23].

IC_{50} -verdiene til inhibitorene nevnt over er gitt i tabell 2.1

Tabell 2.1: IC_{50} -verdier av enzymene CLK1 og DYRK1A, for inhibitorene TG003, TG693, clioquinol, L41, forbindelse 1, forbindelse 2, forbindelse 3, forbindelse 4 og forbindelse 5. Verdiene er gitt i μM

Inhibitor	IC_{50} -verdier [μM] av enzymene:	
	CLK1	DYRK1A
TG003	0.0081 ^[3]	0.800 ^[24]
TG693	Ikke gitt	Ikke gitt
Clioquinol	Ikke gitt	Ikke gitt
L41	0.015 ^[21]	0.040 ^[21]
Forbindelse 1	0.020 ^[18]	0.700 ^[18]
Forbindelse 2	0.170 ^[18]	1.080 ^[18]
Forbindelse 3	0.0096 ^[17]	0.031 ^[17]
Forbindelse 4	0.069 ^[22]	0.620 ^[22]
Forbindelse 5	0.002 ^[13]	0.138 ^[13]

3 Diskusjon

CLK1 deltar i spleising av pre-mRNA ved å fosforylere spleisingfaktorer. Spleising gjør at forskjellige gener blir uttrykt i forskjellig grad. Ved å inhibere CLK1 er det dermed mulig å påvirke hvilke gener som blir uttrykt, eller om gener som har for stort uttrykk skal bli mindre uttrykt. Inhibering av CLK1 kan derfor være svært nyttig for å finne medisiner mot genavhengige sykdommer. CLK1 har også vært linket til sykdommer som ikke er avhengig av hvilke gener som blir uttrykt, men heller hvordan virus angriper cellen. For eksempel er det funnet flere forbindelser som kan ha effekt mot influensavirus. Siden CLK1 er blitt koblet til så mange sykdommer, er det å forske på inhibering av CLK1 ikke forgjeves.

CLK1 arbeider med SRPK1 i cellekjernen for å få fosforylert SR-proteinene. Selv om CLK1 blir inhibert er det ikke usannsynlig at det finnes andre enzymer som kan fosforylere SR-proteinene og føre til spleising. Det er ikke usannsynlig at genene fortsatt blir uttrykt, men kanskje i svakere grad enn dersom CLK1 ikke hadde blitt inhibert.

Hvordan inhibitorene reagerer med CLK1 er blitt undersøkt på ulike nivå; enzymnivå, cellulært nivå og i enkelte tilfeller i mus. TG003, TG693 og clioquinol har blitt brukt i eksperimenter med mus. Av disse tre er det TG003 som har vist seg å være metabolsk ustabil. Forbindelse **1**, **2** og **4** ble ikke studert på cellulært nivå, kun på enzymnivå. Dette kan gi et falskt bilde av hvor effektiv inhibitorene egentlig er, da det i celler finnes flere enzymer som kan bli inhibert. Ved å se hvordan inhibitorene påvirker CLK1 sine ulike mekanismer i cellen vil det kunne gi et bedre bilde på hvordan inhiberingen påvirker CLK1.

Forbindelse **3** og **5** har blitt studert på cellulært nivå, da henholdsvis menneskelige hjernekreftceller og leverceller fra mus. Av disse to er det forbindelse **5** som har blitt vist til å ha bedre selektivitet mot CLK1. Når det er sagt, er forbindelse **5** brukt på friske celler fra mus, mens forbindelse **3** er brukt på syke celler fra mennesker. Det er derfor litt vanskelig å sammenligne hvilken som er best for videre bruk i forskning. Forbindelse **5** burde bli studert i humane celler for å kunne sammenligne disse to.

Siden CLK1 fosforylerer SP-dipeptider på SR-proteiner fører til frigjøring av SR-proteinene fra interchromatingranuler, kan det tenkes at ved å inhibere CLK1 vil færre SR-proteiner transporteres ut til nukleoplasmaen. Dette vil påvirke spleising ved at det er færre SR-proteiner til å montere exonene til modent mRNA. Ved å ikke ha alle gener uttrykt kan genavhengige sykdommer bli mindre alvorlig, eventuelt helt fjernes.

Ved å inhibere spleising er det ikke usannsynlig at andre viktige gener ikke lenger blir uttrykt. Hvordan det skal kontrolleres hvilke gener som ikke skal bli uttrykt var det vanskelig å finne relevant litteratur. Siden inhibering av CLK1 kan gjøre at 100 gener ikke lenger blir uttrykt kan det være vanskelig å kontrollere at livsviktige gener ikke forsvinner. Hvor trygt det er å hindre

spleising gjenstår å se. Det er muligens tryggere å inhibere CLK1 i farlige celler, slik som i kreftceller. Det er ikke ønskelig at kreftceller skal bli uttrykt, så ved å hindre spleising i disse kan det tenkes at det vil være mindre farlig enn å inhibere andre celler. Hvor enkelt og mulig det er å kun inhibere CLK1 i kreftceller er det vanskelig å si noe om. I Babu et al.^[4] sitt forsøk ble det vanskeligere for magekreftceller å spre seg, og det ble dannet færre kreftceller. Dette indikerer at dersom det er mulig å bare inhibere CLK1 i kreftceller vil det kunne hindre spredning av disse kreftcellene. Det er da viktig å se på hvilke kreftceller som har størst uttrykk av CLK1. Hvor realistisk det er å kun inhibere en type celle er vanskelig å si noe om. Litteraturen har generelt ikke kommentert hvilke andre funksjoner som forsvinner når CLK1 inhiberes, derfor er det vanskelig å kommentere på.

Inhibert CLK1 i benkreftceller har vist seg å gi mer autofagi^[21]. Økt autofagi kan hjelpe i tilfeller der cellen ikke utfører autofagi slik den skal^[13]. Siden leucettiner har vist seg å en effekt på forholdet av spleisingvarianter, og det er vist at ved bruk av leucettiner øker autofagi, kan det tenkes at spleising av pre-mRNA koder for autofagi^[21]. Dersom dette stemmer er det ikke usannsynlig at ved å inhibering av CLK1 vil gjøre at introner som koder for autofagi ikke lenger blir klippet ut, slik at tilfeller av autofagi i cellen øker. Forbindelse 5 har også vist at den kan inducere autofagi ved å øke syntesen av autofagosomer i menneskelige eggstokkkreftceller^[13]. Fra litteraturen er det kun Fant et al.^[21] og Sun et al.^[13] som har kommentert på om deres inhibitorene har induisert autofagi. Dette er ikke nok til å kommentere på om det er trend at inhibering av CLK1 inducerer autofagi.

Inhibering av CLK1 har fått økt fokus de siste årene, med flere ulike forbindelser. Det å kun inhibere CLK1 har vist seg å være vanskelig. Flere studier er blitt gjennomført ved å bruke TG003, som har en god effekt på CLK1. Ulempen er at den ikke bare inhiberer CLK1, men også andre enzymer deriblant DYRK1A. Som nevnt tidligere er det vist at TG003 er metabolsk ustabil. Basert på dette kan videre bruk av TG003 være problematisk, og ikke gi et godt bilde av hvordan inhibering av CLK1 vil påvirke mekanismer i cellen.

Det er ingen av inhibitorene som er kommet så lang i testingen at det er blitt gjort forsøk på mennesker. Dette gjerne fordi forbindelsene som har effektiv inhibering ikke er metabolsk stabil, eller at de kan være for giftige mot mennesker. I tillegg er inhibering av CLK1 et relativt ferskt tema, hvor de fleste artiklene er publisert etter 2010. Hva som skal til for at en forbindelse kan bli testet på mennesker er ikke undersøkt i denne artikkelen, men det stilles veldig strenge krav, og inhibitorene som er funnet møter ikke disse kravene.

Et fellestrekk med alle studiene er at det ikke er mulig å kun inhibere CLK1, men det er oppdaget flere inhibitorer som har stor selektivitet mot CLK1. De fleste, om ikke alle, studiene har optimalisert inhibitoren ved å introdusere substituenten på en allerede kjent forbindelse. Det kan ikke dras noen konklusjon av hvilke substituenten som vil gi den beste inhibitoren av CLK1. De av artiklene som har nevnt hvordan inhibitorene binder seg til ATP-bindingsetet har

dokumentert at bindingene mellom inhibitorene og ATP-bindingssetet er hydrogenbindinger. Basert på dette kan det være lurt å se på substituenten som kan danne hydrogenbindinger med aminosyrene i ATP-bindingssetet.

En grunn til at det er vanskelig å finne en inhibitor som bare hemmer CLK1 er at den har ganske lik aminosyresekvens med både DYRK1A og de andre isoformene innenfor CLK-familien. Spesielt CLK1 og CLK4 ligner veldig i aminosyresekvens, hvor det er liten forskjell på hvor ATP-bindingssetet ligger. Generelt har de studiene som er nevnt vist at det er spesielt DYRK1 og CLK4 som blir inhibert samtidig som CLK1.

Ved bruk av forbindelse **5** ble SR-proteiner redistribuert fra cellekjernen tilbake til interchromatin-granuler^[13]. Dette vil gi færre SR-proteiner som er aktive, og klare til å bli fosforylert. Færre SR-proteiner, vil som nevnt, påvirke spleising slik at færre gener blir uttrykt.

IC₅₀-verdiene til clioquinol og TG693 var ikke beskrevet i litteraturen. Basert på dette er det vanskelig å vite hvor selektiv og hvor godt de inhiberer CLK1. Per 2017^[13] var forbindelse **5** den beste inhibitoren for CLK1, med best selektivitet og inhiberende effekt. Dette er vist i Tabell 2.1, hvor forbindelse **5** har lavest IC₅₀-verdi (0,002 µM). Forbindelse **2** var den med høyest IC₅₀-verdi, og hadde dermed dårligst inhiberende effekt på CLK1. Den hadde derimot god selektivitet mot CLK1 sammenlignet med DYRK1A. En annen forbindelse som hadde god selektivitet er Forbindelse **1**. For å inhibere DYRK1A må det være 35 ganger så mye av inhibitoren, enn det CLK1 vil behøve.

Generelt har inhibitorene god selektivitet mot CLK1, bortsett fra L41, hvor IC₅₀-verdiene for CLK1 og DYRK1A ligger nærmere hverandre. Bare 25 µM skiller verdiene. Sammenlignet med IC₅₀-verdiene til de andre inhibitorene er dette en veldig liten forskjell. For å videre studere effekten av inhibering vil ikke L41 være den mest pålitelige inhibitoren, da det ikke skal så mye til for å også inhibere DYRK1A. Den inhibitoren med størst forskjell i IC₅₀-verdi for CLK1 og DYRK1A er forbindelse **5**. Der er IC₅₀-verdien for DYRK1A 69 ganger større enn den er for CLK1. Dette vil si at forbindelse **5** er mest selektiv for CLK1.

Konklusjon

Målet med denne oppgaven har vært å svare på problemstillingen Er selektiv inhibering av CLK1 mulig, og hvis det er mulig, hvilken inhibitor er best for CLK1? Inhibering av CLK1 er et relativt ferskt tema innenfor forskning. Det er fortsatt en lang vei å gå for å finne inhibitor som bare inhiberer CLK1. Så langt er det bare forbindelse **5** som er kommet nærmest. Tanken bak inhibering av CLK1 er å finne medisiner for sykdommer som alzheimers, influensa og magekreft, og har derfor vært et interessant tema å studere nærmere.

De siste årene er det blitt utviklet mange inhibitorer for CLK1, deriblant TG003, L41 og forbindelse **5**. Et problem som oppstår ved inhibering av CLK1 er at det er vanskelig å få selektivitet mot CLK1. Så langt er det forbindelse **5** som har vist seg å ha størst selektivitet mot CLK1 med en IC_{50} -verdi på $0.002 \mu\text{M}$.

Celle- og dyreforsøk indikerer at for å få en stabil inhibitor er det en lang vei å gå. TG003 er den eneste inhibitoren som har vist seg å være metabolsk ustabil. Kun TG693 er vist å være metabolsk stabil i mus, mens forbindelse **5** har vist seg å være stabil i intakte leverceller i mus. TG693 er den eneste som er blitt testet på dyr, resten av inhibitorene er testet i celleforsøk.

En grunn til at det er vanskelig å få god selektivitet mot CLK1, er at CLK1 deler mange likheter med enzymer innad i CMGC-familien og DYRK1A. I tillegg arbeider CLK1 med andre enzymer, som SRPK1, i cellen for å få fosforylert SR-proteiner. Dette kan føre til at gener som ikke ønskes uttrykt, likevel blir uttrykt.

Generelt fører inhibering av CLK1 til en nedregulering av splicing som hindrer at gener blir uttrykt. Dette er det forbundet både fordeler og ulemper til. Fordelene er at det er mulig å hindre at enkelte sykdommer blir uttrykt, og det er mulig å hindre at enkelte kreftceller formerer seg like raskt. Ulempene er at det er vanskelig å kontrollere hvilke gener som skal bli uttrykkes, og at viktige funksjoner kan forsvinne.

Inhibering av CLK1 kan også føre til autofagi. Men det er bare inhibitorene L41 og forbindelse **5** som har vist denne effekten. Autofagi i cellen gjør at skadde eller ubrukte proteiner og organeller i cellen blir nedbrutt. Økt autofagi redder celler som ellers ville dødd.

Referanser

- [1] P. Moyano, V. Němec, and K. Paruch, “Cdc-like kinases (clks): Biology, chemical probes, and therapeutic potential,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, pp. 1–31, 2020.
- [2] P. Jain, C. Karthikeyan, N. H. Moorthy, D. Waiker, A. K. Jain, and P. Trivedi, “Human cdc2-like kinase 1 (clk1): A novel target for alzheimer’s disease,” *Current drug targets*, vol. 15, pp. 539–550, 02 2014.
- [3] M. Zu, C. Li, J.-S. Fang, W.-W. Lian, A.-L. Liu, L.-S. Zheng, and G.-H. Du, “Drug discovery of host clk1 inhibitors for influenza treatment,” *Molecules*, vol. 20, no. 11, pp. 19735–19747, 2015.
- [4] N. Babu, S. M. Pinto, M. Biswas, T. Subbannayya, M. Rajappa, S. V. Mohan, J. Advani, P. Rajagopalan, G. Sathe, N. Syed, V. D. Radhakrishna, O. Muthusamy, S. Navani, R. V. Kumar, G. Gopisetty, T. Rajkumar, P. Radhakrishnan, S. Thiyagarajan, A. Pandey, H. Gowda, P. Majumder, and A. Chatterjee, “Phosphoproteomic analysis identifies clk1 as a novel therapeutic target in gastric cancer,” *Gastric Cancer*, vol. 23, no. 5, pp. 796–810, 2020.
- [5] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H Freeman and Company, 7th ed., 2017. s. 229
- [6] B. E. Aubol, R. M. Plocinik, M. M. Keshwani, M. L. McGlone, J. C. Hagopian, G. Ghosh, X.-D. Fu, and J. A. Adams, “N-terminus of the protein kinase clk1 induces sr protein hyperphosphorylation,” *The Biochemical Journal*, vol. 462, no. 1, pp. 143–152, 2014.
- [7] M. Varjosalo, S. Keskitalo, A. Van Drogen, H. Nurkkala, A. Vichalkovski, R. Aebersold, and M. Gstaiger, “The protein interaction landscape of the human cmgc kinase group,” *Cell Reports*, vol. 3, no. 4, pp. 1306–1320, 2013.
- [8] A. Walter, A. Chaikuad, R. Helmer, N. Loaëc, L. Preu, I. Ott, S. Knapp, L. Meijer, and C. Kunick, “Molecular structures of cdc2-like kinases in complex with a new inhibitor chemotype,” *PloS one*, vol. 13, no. 5, pp. 1–29, 2018.
- [9] A. Czuby and A. Piekiełko-Witkowska, “Protein kinases that phosphorylate splicing factors: Roles in cancer development, progression and possible therapeutic options,” *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, vol. 91, pp. 102–115, 2017.
- [10] A. George, B. E. Aubol, L. Fattet, and J. A. Adams, “Disordered protein interactions for an ordered cellular transition: Cdc2-like kinase 1 is transported to the nucleus via its ser–arg protein substrate,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 294, no. 24, pp. 9631–9641, 2019.

- [11] M. M. Keshwani, K. L. Hailey, B. E. Aubol, L. Fattet, M. L. McGlone, P. A. Jennings, and J. A. Adams, “Nuclear protein kinase *clk1* uses a non-traditional docking mechanism to select physiological substrates.” *Biochemical Journal*, vol. 472, no. 3, pp. 329 – 338, 2015.
- [12] E. Bowler, S. Porazinski, S. Uzor, P. Thibault, M. Durand, E. Lapointe, K. M. Rouschop, J. Hancock, I. Wilson, and M. Landomery, “Hypoxia leads to significant changes in alternative splicing and elevated expression of *clk* splice factor kinases in *pc3* prostate cancer cells,” *BMC Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 355–366, 2018.
- [13] Q.-Z. Sun, G.-F. Lin, L.-L. Li, X.-T. Jin, L.-Y. Huang, G. Zhang, W. Yang, K. Chen, R. Xiang, C. Chen, Y.-Q. Wei, G.-W. Lu, and S.-Y. Yang, “Discovery of potent and selective inhibitors of *cdc2*-like kinase 1 (*clk1*) as a new class of autophagy inducers,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 60, no. 14, pp. 6337–6352, 2017.
- [14] A. N. Bullock, S. Das, J. Debreczeni, P. Rellos, O. Fedorov, F. H. Niesen, K. Guo, E. Papagrigoriou, A. L. Amos, S. Cho, B. E. Turk, G. Ghosh, and S. Knapp, “Kinase domain insertions define distinct roles of *clk* kinases in *sr* protein phosphorylation,” *Structure*, vol. 17, no. 3, pp. 352–362, 2009.
- [15] L. Rabinow, *CLK*, pp. 431–441. New York, NY: Springer New York, 2012.
- [16] N. Kataoka, J. L. Bachorik, and G. Dreyfuss, “Transportin-*sr*, a nuclear import receptor for *sr* proteins,” *The Journal of cell biology*, vol. 145, no. 6, pp. 1145–1152, 1999.
- [17] Q. Zhou, A. F. Phoa, R. H. Abbassi, M. Hoque, T. A. Reekie, J. S. Font, R. M. Ryan, B. W. Stringer, B. W. Day, T. G. Johns, L. Munoz, and M. Kassiou, “Structural optimization and pharmacological evaluation of inhibitors targeting dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases (*dyrk*) and *cdc*-like kinases (*clk*) in glioblastoma,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 60, no. 5, pp. 2052–2070, 2017.
- [18] M. Mariano, R. W. Hartmann, and M. Engel, “Systematic diversification of benzylidene heterocycles yields novel inhibitor scaffolds selective for *dyrk1a*, *clk1* and *ck2*,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 112, pp. 209–216, 2016.
- [19] Y. Sako, K. Ninomiya, Y. Okuno, M. Toyomoto, A. Nishida, Y. Koike, K. Ohe, I. Kii, S. Yoshida, N. Hashimoto, T. Hosoya, M. Matsuo, and M. Hagiwara, “Development of an orally available inhibitor of *clk1* for skipping a mutated dystrophin exon in duchenne muscular dystrophy,” *Scientific Reports*, vol. 7, p. 46126, 05 2017.
- [20] S. Ayton, P. Lei, and A. I. Bush, “Metallostasis in alzheimer’s disease,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 62, pp. 76–89, 2013. Neurodegeneration.
- [21] X. Fant, E. Durieu, G. Chicanne, B. Parastre, D. Sbrissa, A. Shisheva, E. Limantano,

- F. Carreaux, J.-P. Bazureau, and L. Meijer, “cdc-like/dual-specificity tyrosine phosphorylation–regulated kinases inhibitor leucettine 141 induces mtor-dependent autophagy: Implication for alzheimer’s disease,” *Molecular Pharmacology*, vol. 85, no. 3, pp. 441–450, 2014. 2018.
- [22] Y. J. Esvan, W. Zeinyeh, T. Boibessot, L. Nauton, V. Théry, S. Knapp, A. Chaikuad, N. Loaëc, L. Meijer, F. Anizon, F. Giraud, and P. Moreau, “Discovery of pyrido[3,4-g]quinazoline derivatives as cmgc family protein kinase inhibitors: Design, synthesis, inhibitory potency and x-ray co–crystal structure,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 118, pp. 170–177, 2016.
- [23] E. MarÉchal, *Measuring Bioactivity: KI, IC50 and EC50*. 2011.
- [24] Y. Ogawa, Y. Nonaka, T. Goto, E. Ohnishi, T. Hiramatsu, I. Kii, M. Yoshida, T. Ikura, H. Onogi, H. Shibuya, T. Hosoya, N. Ito, and M. Hagiwara, “Development of a novel selective inhibitor of the down syndrome-related kinase dyrk1a,” *Nature communications*, vol. 1, p. 86, 2010.