

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Bioorgaanilise keemia õppetool

Johannes Murre

cAMP sõltuvat proteiinkinaasi proteolüüsi suunavate kimäärühendite süntees ja omaduste
iseloomustamine

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendaja: kaasprof. Erki Enkvist, PhD

Tartu 2025

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
1. Sissejuhatus.....	7
2. Kirjanduse ülevaade.....	8
2.1 Ubikvitiin-proteasoomi rada	8
2.2 Proteiinkinaasid.....	9
2.3 Proteiinkinaas A.....	9
2.4 Proteiinkinaaside inhibiitorid.....	10
2.5 Proteolüüsi suunavad kimäärühendid (PROTAC-id)	11
2.6 Fluorestsentsanisotroopia.....	13
2.7 SDS Page ja <i>western blot</i>	13
3. Eksperimentaalne osa.....	15
3.1 Kasutatud kemikaalid.....	15
3.2 Kasutatud aparatuur	15
3.3 Tahkefaasi peptiidsüntees	16
3.3.1 Kasutatud vaigud	16
3.3.2 Tahkekandja sünteesi protokoll	17
3.3.3 Tahkel kandjal sünteesitud ühendid.....	17
3.4 H9-inhibiitori süntees.....	18
3.5 Talidomiidi derivaatide süntees	19
3.6 ARC-2400 süntees	20
3.7 ARC-2403 süntees	20
3.8 ARC-2405 süntees	21
3.9 ARC-2406 kuni ARC-2408 sünteesid	22
3.10 PKAc _α aktiivse kontsentratsiooni määramine.....	22

3.11 Sünteesitud ühendite PKAc _α -ga seondumise iseloomustamine.....	23
3.12 ARC-ide proteolüüsi suunamise võimekuse analüüsimine <i>western blot</i> meetodiga	24
4. Tulemuste arutelu.....	26
4.1 Sünteesitud ühendite PKAc _α -ga seondumise iseloomustamine.....	29
4.2 Proteolüüsi suunamise määra hindamine.....	31
4.3 PROTAC-ide optimeerimine	33
5. Kokkuvõte.....	35
Abstract.....	36
Kirjanduse loetelu	37
Infoleht.....	40
Lisad.....	41
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	60

Kasutatud lühendid

5-TAMRA – 5-karboksütetrametüüldiamiin

ACN – Atsetonitril

AGC – proteiinkinaaside A, G ja C perekondade rühm.

Ahx – Aminoheksaanhape

AKAP – A-kinaasi ankurvalgud

Ala – Alaniin

AMTH – 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)-tiofeen-2-karboksüülhape

Anti-PKAc α – Proteiinkinaas A α katalüütilise alaühiku spetsiifiline antikeha

ARC – Adenosiini analoogist ja arginiine sisaldavast peptiidist koosnev molekul, kasutatakse Asko Uri tööühmas sünteesitud ainete nimetamisel

Arg – Arginiin

ARV – Arvinas (firma nimi)

ATP – Adenosiintrifosfaat

Boc – Tert-butüüloksükarbonüül

cAMP – Tsükline adenosiinmonofosfaat

cIAP – Apoptoosi inhibiitor

CL1 – Cereblon ligand 1, 2-[[2-(2,6-diokso-3-piperidinüül)-2,3-dihüdro-1,3-diokso-1h-isoindool-4-üül]oksü]-etaanhape, PROTAC-ühendites kasutatav ligand

CRBN – Cereblon

CRL – Cullin-Ring Ligase

DAD – Diodrividetektor

DCM – Diklorometaan

DIPEA – Diisopropüületüülamiin

DMEM – Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde (ingl. k Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMF – N,N-dimetüülformamiid

DMSO – Dimetüülsulfoksiid

DTT – Ditiotreitol

EI – Elektronionisatsioon

ES – Elektrosprei

FA – Fluorestsentsanisotroopia

FDA – Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Raviamet

Fmoc – Fluorenüülmetüüloksükarbonüül

FP – Fluorestsentspolarisatsioon

GTP – Guanosinotriifosfaat

H9 - N-(2-Aminoetüül)-5-isokinoliinsulfoonamiid

HBTU – O-bensotriasool-N,N,N',N'-tetrametüül-uroonium-heksafluorofosfaat

HECT – *Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*, Ubikvitiini ligaasi domeen

HeLa – Emakakaelavähi rakuliin

HEPES – 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape (HEPES)

HOBt – Hüdroksübensotriasool

HPLC – Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

IC₅₀ – Kontsentratsioon, mille juures toimub pool maksimaalsest inhibeerimisest

IV-Dde – 1-(4,4-dimetüül-2,6-dioksotsükloheksüülideen)-etüül

K_D – Ensüümi ja inhibiitori vahelise kompleksi dissotsiatsioonikonstant

LCMS – Vedelikkromatograafia massispektromeetria

Lys – Lüsiin

MBHA – Metüülbensühüdrüülamiin

MS – Massispektromeetria

NMM – N-metüülmorfoliin

PC3 - Inimese eesnäärmevähi rakuliin

Pbf – 2,2,4,6,7-pentametüüldihüdrobensofuraan-5-sulfonüül

PK – Proteiinkinaas

PKA – Proteiinkinaas A

PKAc_α – Proteiinkinaas A α katalüütiline alaühik

PRKACA – Proteiinkinaas A-d kodeeriv geen

PROTAC – proteolüüsi suunav kimäärühend (ingl. k. *PROteolysis TArgeting Chimera*)

PVDF – Polüvinüüldieenfluoriid

SDS-PAGE – Naatriumdodetsüülsulfaat-poliakrüülamiid geelelektroforees (ingl. k. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*)

S_NA_R – Nukleofiilne asendusreaktsioon aromaatses tuumas
TBME – Tert-butüülmetüüleeter
TFA – Trifluoroatsetaat
TGL – Aeglahutusega luminescents
THF – Tetrahüdrofuraan
TIPS – Triisopropüülsilaan
TMR – Tuumamagnetresonantsspektroskoopia
TMS – Tetrametüülsilaan
UIM – Ubikvitiiniga interakteeruv piirkond (ingl. k. *Ubiquitin-interacting motif*)
UV-Vis – Ultraviolet-nähtav
VHL – von Hippel-Lindau E3 ubikvitiini ligaas
WB – Immunoloogiline kapillaarülekanne (inglise keeles *western blot*)

1. Sissejuhatus

Viimase kahekümne aasta jooksul [1] on potentsiaalsete terapeutiliste omadustega ühendite hulka liitunud proteolüüsi sihtivad kimäärühendid (PROTAC). PROTAC-id on bifunktsionaalsed üendid, mis koosnevad sihtmärkvalguga interakteeruvast ligandist, linkerist ning ubikvitiini E3 ligaasiga interakteeruvast ligandist. Praeguseks on jõudnud kolmanda faasi kliiniliste uuringuteni kaks PROTAC-it, ARV-110 ja ARV-471, mis on ravimikandidaadid vastavalt eesnäärmevähile ja rinnavähile [2,3]. Nende ühendite edu võib olla aluseks ka teiste haiguste vastaste ravimite välja töötamiseks.

Antud töös on sihtmärgiks tsükliilise adenosiin monofosfaadi (cAMP) signaaliratta kuuluv proteiinkinaas A (PKA), mis on üks enim uuritud proteiinkinaase [4]. Töö eesmärk on valmistada ühend, mis oleks võimeline suunama rakusisest PKA proteolüüsi. Töötavat ühendit oleks võimalik tulevikus kasutada biokeemilistes uuringutes või mudelühendina uute ARC-idel põhinevate PROTAC-ide valmistamisel, mis degradeeriks ravimiarenduse seisukohast aktuaalsemaid proteiinkinaase.

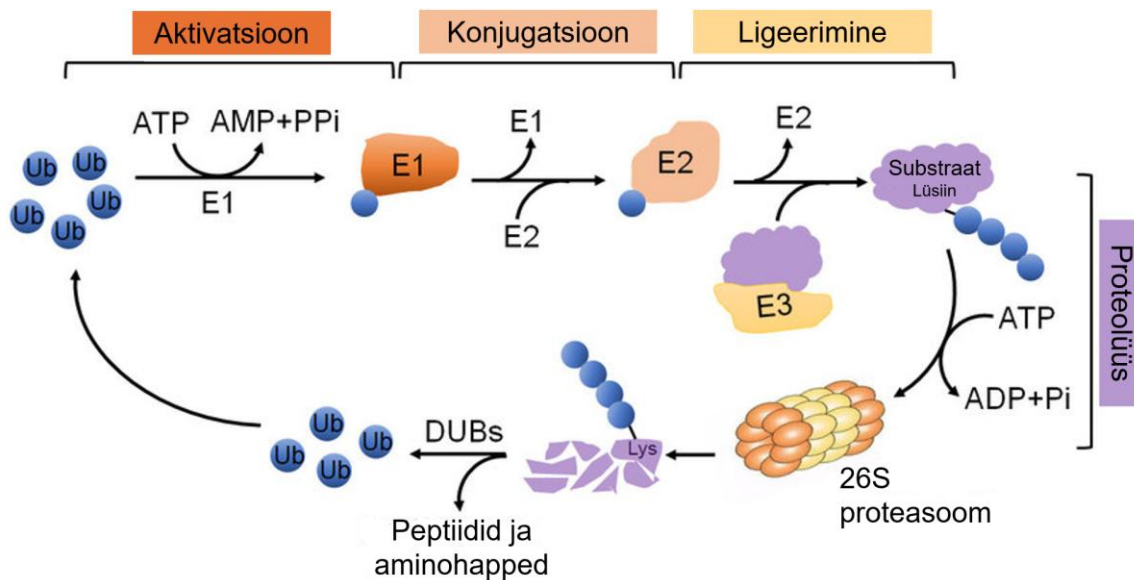
Töös kasutatakse PROTAC-i ehitusklotsina E3 ligaasi cereblon-i retseptoriga (CRBN) interakteeruvaid talidomiidi derivaate. Sünteesitavate ühendite põhjana kasutatakse erinevaid ARC-tüüpi ühendeid, mida on varasemalt Asko Uri tööühmas kasutatud.

Töö raames kasutati PROTAC-ide sünteesiks peamiselt tahkel kandjal sünteesi. Ühendite puhtus ja struktuur määrati vedelikkromatograafia ja massispektromeetriaga, ühendeid puhastati preparatiivse kromatograafiaga. Produktide kontsentratsioonid määrati UV-Vis neeldumiste põhjal. Sünteesitud ühendite PKA afiinsuse sihtmärkvalgu suhtes määrati fluorestsentsanisotroopia mõõtmise teel. Sünteesitud ühendite proteolüüsi suunamise võimekust määrati rakukatsetega, valgu kogust ühenditega töötlemise järel hinnati selektiivset antikeha kasutava *western blot* meetodiga.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Ubikvitiin-proteasoomi rada

Ubikvitiin-proteasoomi rada on rakusisest proteolüüsi reguleeriv süsteem, mis koosneb kahest põhietapist. Esimene on mitme ubikvitiini kovalentne sidumine (ubikvitinüülimine) sihtmärkvalguga ja teine on ubikvitinüülitud valgu degradeerimine 26S proteasoomi kompleksis, kus vabanevad valgu külge kinnitunud ubikvitiinid ja degradeeritud valgu aminohappejäägid peptiididena (Joonis 1). Vabanenud ubikvitiine on võimalik seejärel uuesti kasutada proteolüüsi algatamiseks. Ubikvitiin on 76-st aminohappejäägist koosnev valk. Selle aktiveerimine viiakse läbi E1 ensüümis, milles ubikvitiini C-terminaal asendatakse tioestriga. Aktiveeritud ubikvitiin on suunatud E3-ligaasi külge läbi E2 ensüümi, mida kutsutakse ubikvitiini konjugeerivaks ensüümiks. E3 kuulub ubikvitiin-valgu ligaaside alla. Läbi E3 ligaasi seotakse ubikvitiin kovalentselt valgus asuva lüsiini kõrvalahela aminorühmaga. Pärast esimese ubikvitiini kinnitumist valgu külge seonduvad järgnevad ubikvitiinid eelneva ubikvitiini lüsiini kõrvalahela aminorühmaga. Protsess kordub, kuni sihtmärkvalk on tuvastatav proteasoomi kompleksi poolt. Valgu küljes olevad ubikvitiinid seotakse proteasoomi C-terminaalil asuva ubikvitiiniga interakteeruva piirkonnaga (ingl. k. *ubiquitin-interacting motif*). Kui degradeeritav valk on positsioonis, kus proteasoom saab otseselt interakteeruda sihtmärkvalguga, algab proteolüüs. [5,6]



Joonis 1. Ubikvitiin-proteasoomi rada illustreeriv skeem. [7]

2.2 Proteiinkinaasid

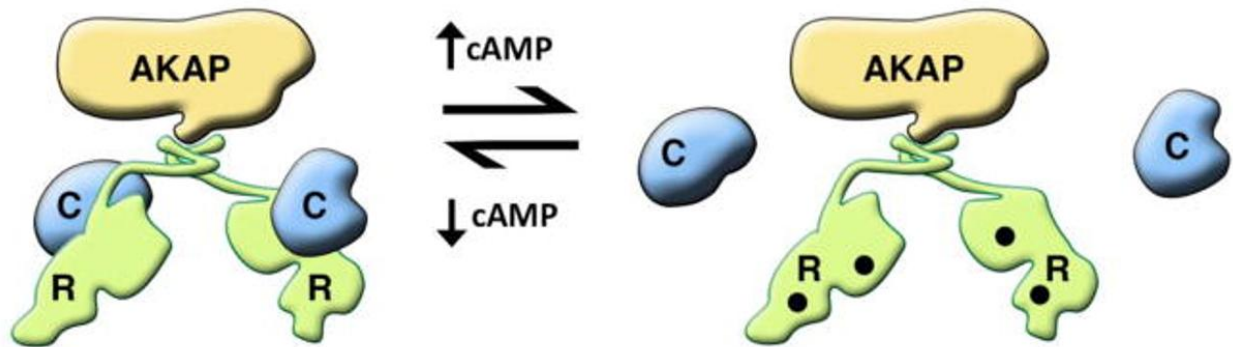
Proteiinkinaasid (PK) on ensüümide klass, mis katalüüsivad adenosiintrifosfaadi (ATP) ja guanosiintrifosfaadi (GTP) γ -fosfaatrühma ülekannet sihtmärkvalgule (substraadile) [8]. Fosforüülrühm viiakse aminohappele, mille kõrvalahelas leidub hüdroksüülrühm. Fosforüülitava aminohappe põhjal jagunevad proteiinkinaasid türosiini (1,8% PK-dest), treoniini (11,8% PK-dest) ja seriini (85% PK-dest) kinaasideks [9].

PK domeen on PK struktuuriosa, mis teostab ensümaatilise fosforüülimise. Domeeni kuuluvad ATP-d siduv sait ja substraati siduv sait. Aktiveeritud kinaasile on võimalik nii ATP-l kui substraadil siduda, võimaldades fosforüülimist. Substraadi spetsiifilisuse määrab domeeni struktuur, mis võimaldab vaid kindla struktuuriga substraate fosforüülida [10]. Inimese kinoom koosneb 538st proteiinkinaasist [11], mis jagunevad domeeni struktuuri põhjal kaheksasse suuremasse alagruppi: TK (*Tyrosine Kinase*), TKL (*Tyrosine Kinase Like*), STE (*homologs of yeast Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 kinases*), CK1 (*Casein Kinase 1*), AGC (PKA, PKG, PKC), CAMK (*Calcium / calmodulin-dependent Kinases*), CMGC (*Cyclin-dependant kinases*) ja RGC (*receptor guanylate cyclase*) [12].

2.3 Proteiinkinaas A

Proteiinkinaas A on AGC gruppi kuuluv seriini/treoniini proteiinkinaas. Rakus esineb PKA neljast alaühikust koosneva inaktiivse holoensüümina, millel on kaks regulaatorset (R) ja kaks katalüütilist (PKAc) alaühikut [13,14]. Kinaasi aktiivsus on sõltuv tsüklilise AMP (cAMP) olemasolust – kinaas aktiveerub cAMP juuresolekul (Joonis 2). cAMP seondub PKA reguleeriva alaühikuga, mille käigus valgukonformatsioon muutub ning katalüütilised alaühikud vabanevad ja saavad fosforüülida signaalraja järgmisi valke. PKA aktivatsioonimehhanismis mängivad olulist rolli A-kinaaside ankurvalgud (AKAP), millega seonduvad PKA reguleerivad alaühikud. Ankurvalgud võimaldavad luua klastreid teiste ensüümidega. [4]

PKA katalüütiline alaühik alfa (C_α) on PKAc isovorm, mis on kodeeritud PRKACA geeni põhjal. PKAc $_\alpha$ mass on kokku 40 kDa ning omab inimkehas kolme isovormi: C $_{\alpha 1}$, C $_{\alpha 2}$ ja C $_{\alpha 3}$. Nendest on üle inimkeha levinuim C $_{\alpha 1}$ isovorm, mis koosneb 351 aminohappejäägist. [4]



Joonis 2. PKA katalüütilise alavormi aktiveerimismehhanism [4]

cAMP signaalraja defektidega on seotud mitmed haigused, näiteks koronaararterite haigus ja kardiomiopaatia. PKA α mutatsioonid ja dereguleerimine on seotud mitmete haigustega, sealhulgas ka kasvaja tekkega. [4,15]

2.4 Proteiinkinaaside inhibiitorid

Inhibiitor on ühend, mis vähendab ensüümi aktiivsust. Ensüümi inhibiitorid jagunevad pöörduvateks ja pöördumatuteks inhibiitoriteks. Pöörduvad inhibiitorid jagunevad omakorda konkureerivateks, mittekonkureerivateks, ebakonkureerivateks ja segakonkureerivateks inhibiitoriteks. Ensüüm saab korraga aktiivtsentris siduda kas substraati, mille käigus tekib ensüüm-substraat (ES) kompleks, või inhibiitorit, millega tekib ensüüm-inhibiitor (EI) kompleks. Konkureerival inhibeerimisel seondub inhibiitor ensüümi aktiivtsentriga, takistades substraadi ligipääsu aktiivtsentri. Selle mehhanismiga aeglustatakse ensüümreaktsiooni, vähendades aktiivse ensüümi kontsentratsiooni. [16]

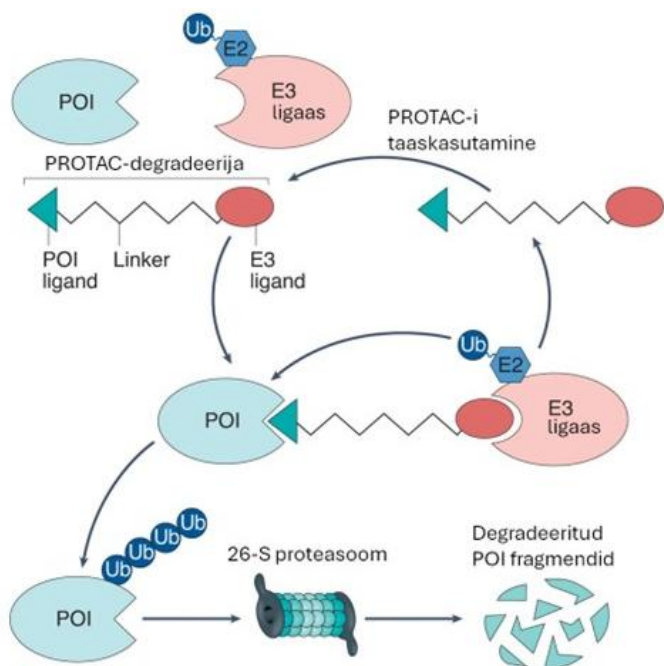
Proteiinkinaaside regulatsiooniga seotud häired, näiteks üleekspressioon ja mutatsioonid, on seotud mitmete haiguste tekkega, mistõttu on proteiinkinaasid muutunud ravimiarenduses oluliseks sihtmärgiks. Esimene proteiinkinaasi inhibiitorina FDA poolt kinnitatud ravim oli 2001. aastal kinnitatud imatinib, mida kasutatakse kroonilise müeloidse leukeemia ravimiseks. Tagantjärele teadmised on, et esimene madalmolekulaarne proteiinkinaasi inhibiitor, mis ravimina kasutusele võeti, oli imetajate rapamütsiini sihtmärk (mTOR) kinaasi inhibiitor rapamütsiin, mis sai 1999. aastal FDA poolt kasutusloa [17]. 2025. aasta alguse seisuga on FDA poolt kasutusloa saanud 85 madalmolekulaarset proteiinkinaasi inhibiitorit. [17]

2.5 Proteolüüsi suunavad kimäärühendid (PROTAC-id)

Ühe alternatiivse lähenemisena inhibiitoritele on hakatud välja töötama valgu proteolüüsi suunavaid ühendeid (PROTAC-eid). Esimest korda kirjeldas PROTAC-i toimemehhanismi Sakamoto aastal 2001 [1]. PROTAC on alternatiivne meetod valkude aktiivsuse vähendamiseks, erinevalt klassikalistest inhibiitoritest suunavad PROTAC-id sihtmärkvalgu rakusisesele proteolüüsile. PROTAC koosneb kolmest osast: sihtmärkvalgule kinnituvast osast (nt. ATP-konkurentne ligand), linkerist ja E3 ubikvitiini ligaasile kinnituvast osast [18].

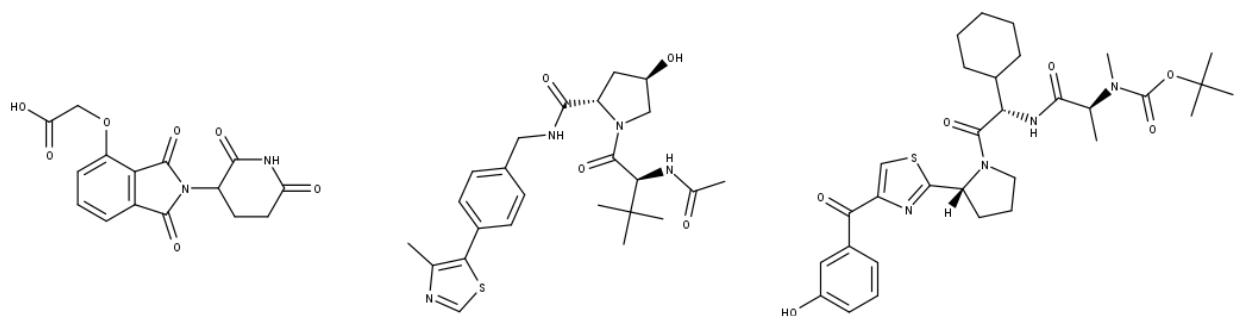
Hetkeseisuga on parimad potentsiaalsed PROTAC-id jõudnud kolmanda faasi kliiniliste uuringuteni. [19]. Sinna kuuluvad ARV-110 ja ARV-471, mis on ravimikandidaadid vastavalt eesnäärmevähile (androgeenireseptori PROTAC) ja rinnavähile (östrogeenireseptori PROTAC) [14]. Varasemalt ei ole veel välja töötatud PKA ATP-taskuga seonduvat PROTAC-it. Ainus avaldatud PKA-d sihtiv PROTAC on suhteliselt suure molekulmassiga ristseotud peptiid (*stapled protein*). [20]

PROTAC-ide töömehhanism seisneb ubikvitiin-proteasoomi raja katalüütilisel suunamisel – PROTAC-i sihtmärkvalguga seonduv ligand ja E3 ligaasi ligand interakteeruvad vastavalt sihtmärkvalgu ja E3 ligaasiga, luues valk-PROTAC-valk kompleksi, kus E3 ligaas ubikvitinüülib sihtmärkvalgu läbi E2 ja E1 ligaaside, millele järgneb valgu proteolüüs 26S proteasoomis. Proteolüüsi käigus vabaneb ka PROTAC ise, ehk sisuliselt on tegu katalüütilise protsessiga ja ühe PROTAC-i molekuliga on teoreetiliselt võimalik proteolüüsi suunata mitmeid sihtmärkvalgu molekule (Joonis 3. PROTAC-i toimemehhanism. POI – sihtmärkvalk, Ub – ubikvitiin [21]. [1,18,21]. Eelis antud mehhanismi puhul klassikaliste „aktiivtsentrit okupeerivate“ inhibiitoritega võrreldes on PROTAC-i sündmuspõhine interakteerumine, mille käigus käitub PROTAC katalüsaatorina, võimaldades ühendil efektiivne olla isegi väga madalate kontsentratsioonide juures [22].



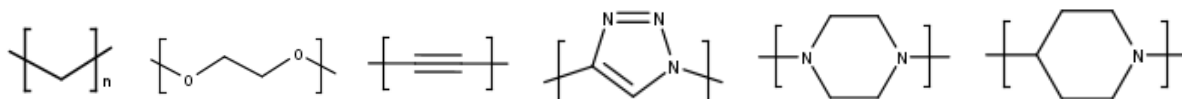
Joonis 3. PROTAC-i toimemehhanism. POI – sihtmärkvalk, Ub – ubikvitiin [21]

Inimkehas leidub ligikaudu 600 erinevat E3 ligaasi, mis jagunevad nelja kategooriasse – HECT, RING-finger, U-box ja PHD-finger. Nendest suurim kategooria on RING-finger, mis jaguneb CRL (*Cullin-RING Ligase*) ja mitte-CRL-ideks. [23]. E3 ligaasidest on PROTAC-ide arendamisel põhilisteks sihtmärkideks Cereblon (CRBN), von Hippel-Lindau (VHL) ja apoptoosi inhibiitorid (cIAP) (Joonis 4). Antud ligaasidel leiduvad madala molekulmassiga ligandid, mis on kasutusel enamuse uute PROTAC-ide arendamisel. Nende seast on suurimat kasutust leidnud CRBN, millega interakteeruvaid ligande on seni kasutatud ligikaudu 60% sünteesitud PROTAC-ides. Laialdase kasutuse põhjuseks on valguga siduvate ligandide stabiilsus ja kasutuse lihtsus – enamuse CRBN ligande on talidomiidi derivaadid [24].



Joonis 4. E3 ligaasi ligandid. Vasakult paremale: CRBN ligand 1 (CAS Nr. 1061605-21-7), VHL ligand VH32 (CAS Nr. 1448188-62-2), cIAP ligand 1 (CAS Nr. 2095244-42-9)

PROTAC-ide kujundamises mängib olulist rolli E3 ligaasi ja sihtmärkvalgu vaheline linker (Joonis 5), mis määrab ühendi jäikuse ja valkude vahelise kauguse. Linkeri disainimisel peab arvestama sihtmärkvalk-ligand kompleksi kujuga, et võimaldada sihtmärkvalgus asuva lüsiini kõrvalahela ubikvitinüülimist. Linkeriga on võimalik mõjutada nii PROTAC-i lahustuvust, rakumembraani läbitavust kui ka ühendi stabiilsust organismis [22].



Joonis 5. PROTAC-ide linkerites enimkasutatud struktuurielemendid. Vasakult paremale: alküül, polüetiüleenglükool, alküün, triasool, piperasiin, piperidiin

2.6 Fluorestsentsanisotroopia

Fluorestsentsanisotroopia (FA) on meetod biokeemias, kus kasutatakse polariseeritud valgust fluorofooride omaduste määramiseks. Meetodis kiiritatakse proovi polariseeritud valgusvooga, mis ergastab fluorofoore. Fluorofoorid, mille ülemineku dipoolmomendi nurk on polariseeritud valguse suuna suhtes väike, ergastuvad kergemini. Välja kiirguva valguse polarisatsioon sõltub fluorofooride keemilisest struktuurist (peamiselt ühendi suurusel). Suurematest molekulidest (näiteks fluorofoor-valk kompleksid) pärinev kiirgus depolariseerub aeglasemalt, mille käigus tõenäosus, et nad kiirgavad polariseeritud footonit, on kõrge. Väiksemad molekulid, näiteks vabad fluorofoorid, pöörlevad kiiremini ning kiirgavad peamiselt depolariseeritud valgust. Seda arvestades on võimalik ära kasutada fluorestsentsanisotroopiat, et määrata fluorofoor-valgu kompleksi sisaldust proovis. Fluorestsentsanisotroopiat on võimalik arvutada võrrandiga 1: [25]

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (\text{Võrrand 1})$$

Kus r on anisotroopia, $I_{||}$ on paralleelselt mõõdetud kiirguse intensiivsus ning I_{\perp} risti mõõdetud kiirguse intensiivsus. [25]

2.7 SDS Page ja western blot

Geelektroforees on analüütiline meetod valkude eraldamiseks molekulmassi põhjal. Meetodis suunatakse naatriumdodetsüülsulfaadiga töödeldud valgud läbi polümeerse geeli, rakendades geelile elektrivälja. Väiksema suurusega valgud läbivad geeli maatriksit kergemini ning liiguvad kaugemale, suuremad valgud püsivad alguspunktile lähemal. Meetodi kasutusel on võimalik elektroforeesi lõpus tuvastada erinevate molekulmassidega valkude asukohad, kasutades näiteks

erinevaid valke värvivaid ühendeid. Selleks, et valke oleks võimalik spetsiifiliselt tuvastada, on välja töötatud *western blot*-i (WB) meetod. Meetodis kasutatakse uuritavale valgule spetsiifilist markeriga modifitseeritud antikeha või antikehade komplekti, millega on võimalik värvida uuritavaid valke ning hinnata nende kogust. Meetodiga on võimalik uurida ka valgu hulga muutust rakuprotsessi käigus, näiteks ravimi lisamisel rakku [26]. PROTAC-ide uuringutes on *western blot* laialdaselt kasutatud, et määrata uuritava ühendi degradeerimisvõimekust: mida tugevam oli degradeerimine, seda vähem on antikehaga valku näha. Antud töös kasutatakse kahte spetsiifilist antikeha: PKA α spetsiifilist antikeha ning α -tubuliini spetsiifilist antikeha. Antikehade spetsiifilisus tuleneb paratoobi struktuurist, mis seondub spetsiifiliselt vastava valguga.

3. Eksperimentaalne osa

3.1 Kasutatud kemikaalid

Töös kasutati järgmisi kemikaale: Tetrahydrofuraan (THF) – Acros (Thermo Scientific Chemicals); Kaaliumhüdroksiid (KOH) – Akzo Nobel Eka Chemicals; Piperidiin – Alfa Aesar; Fmoc-d-Lys(Palmitaat)-OH – Bapeks; 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape (HEPES) – Calbiochem; talidomiid-4-hüdroksüatsetaat (Cereblon Ligand 1, CL1) – Cayman Chemical Company; Deuterioform (CDCl_3) – Deutero LOT B 18076; Trifluoroetaanhape (TFA), Ditiotreitol (DTT) – Fischer Scientific; Piperasiin, N-metüülmorfoliin (NMM), 1,2-diaminoetaan – Fluka; 5-fluorotalidomiid, 4-piperidiinkarboksüülhape – Fluorochem; Dietüüleeter (Et_2O), vesinikkloriidhape (HCl) – Honeywell; O-bensotriasool-N,N,N',N'-tetrametüül-uroonium-heksafluorofosfaat (HBTU), Fmoc-d-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-d-Lys(Boc)-OH, Fmoc-d-Lys(IV-Dde)-OH, Fmoc-6-Ahx-OH, 2-klorotritüülkloriid vaik, 1,1 mmol/g, Fmoc-d-Ala-OH, atsetonitriil (ACN), isopropanool (iPrOH), Diisopropüületüülamiin (DIPEA), RINK-Fmoc-amiid MBHA vaik (0,61 mmol/g) – Iris Biotech GmbH; Naatriumsulfaat (Na_2SO_4), naatriumhüdroksiid (NaOH) – Lachner PP; dimetüülformamiid (DMF), metanool (MeOH) – Merck; H_2O – eritakistus 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ – Millipore Simplicity 185; Hüdroksübensotriasool (HOBt) – NovaBiochem; NaCl – Riedel-de Haen; Diklorometaan (DCM), isokinoliin-5-sulfoonhape, Triisopropüülsilaan (TIPS), Tert-butüülmetüüleeter (TBME), Naatriumvesinikkarbonaat (NaHCO_3), Dimetüülsulfoksiid (DMSO), Etaanhape (AcOH), Polüsorbaat 20 (P20, Tween 20) – Sigma-Aldrich; Tionüülkloriid (SOCl_2) – Thermo Scientific; Rekombinantne cAMP-sõltuva proteiinkinaasi katalüütiline alaühik tüüp alfa (PKAc_α) – Toodetud Tanel Sõrmuse poolt; l-proliin – Tootja märgiseta purk; ARC-668, ARC-669, 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)-tiofeen-2-karboksüülhape (AMTH) – Teiste poolt varasemalt laboris sünteesitud

3.2 Kasutatud aparatuur

Lenduvate ühendite eemaldamiseks kasutati vaakumrotaatorit Büch Rotavapor R-200 ja Christ vaakumsentrifuugi ja lüofilisaatorit.

Sünteesitud ainete puhastamiseks ja puhtuse kontrollimiseks kasutati Shimadzu Prominence LC Solution HPLC kromatograafi SPD M20A. Pöördfaaskromatograafia jaoks kasutati kolonni Phenomenex Gemini C18 (250×4,6 mm) osakese suurusega 5 μm . Elueerimiseks kasutati

H₂O/ACN gradienti (0,1% TFA). Massispektreid mõõdeti positiivses ionisatsiooni mõõtmisrežiimis Shimadzu ESI LC/LCMS-2020 massispektromeetriga.

Sünteesitud ühendite sisaldust määrati NanoDrop 2000c UV-Vis spektrofotomeetriga, optiline teepikkus $l = 0,1$ cm. $\epsilon_{558\text{nm}}(\text{ARC-583(5-TAMRA)}) = 80\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{558\text{nm}}(\text{ARC-669(5-TAMRA)}) = 85\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{340\text{nm}}(\text{5-(2-aminopürimidiin-4-üül)-tiofeen-2-karboksüülhappet sisaldavad ühendid}) = 20\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{323\text{nm}}(\text{isokinoliin-sulfoonamiidi derivaate sisaldavad ühendid}) = 4400\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Kontsentratsioonid arvutati eksperimentaalsetest andmetest Beer-Lamberti seadusega $A = \epsilon cl$, kus A on neelduvus, ϵ neelduvustegur ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), c on kontsentratsioon (M), l on optiline teepikkus (cm).

Fluorestsentsi intensiivsuse ja fluorestsentsanisotroopia mõõtmised teostati PHERAstar mikroplaadilugejaga (BMG Labtech). Mõõdetavad lahused valmistati 384 süvikuga mikroitiiterplaatidele (Corning). Fluorestsentsi polarisatsiooni, intensiivsuse ja anisotroopia mõõtmisel kasutati FP 540-20 590-20 optilist moodulit (ergastus 540 nm, emissioon 590 nm), aeglahutusega luminescentsi mõõtmisel (TGL) kasutati TRF 337 590 545 moodulit (ergastus 337 nm, emissioon 590 nm). Arvutused kinaasi aktiivse kontsentratsiooni ja ühendite PKA α afiinsuse määramiseks viidi läbi GraphPad Prism andmetöötlusprogrammis. Samuti on PKA α afiinsust kirjeldavad graafikud samas programmis koostatud.

Tuumamagnetresonantsspektrid (TMR) mõõdeti spektromeetriga Bruker Avance III HD. ¹H TMR mõõdeti sagedusel 700 MHz. Sisestandardina kasutati tetrametüülsilaani (TMS).

Silikageeli kolonnkromatograafiaga ühendite puhastamisel kasutati REACH Devices RD2 UV detektorit.

3.3 Tahkefaasi peptiidsüntees

3.3.1 Kasutatud vaigud

Sünteesi käigus kasutati kahte vaiku – RINK-Fmoc-amiid MBHA vaiku (0,61 mmol/g) ja 2-klorotritüülkloriid vaiku (1,1 mmol/g).

Töös kasutatud 2-klorotritüülkloriid vaiku töödeldi eelnevalt piperasiiniga. 199 mg vaiku kaaluti süstlasse, kuhu lisati 4 ekvivalenti 1 ml THF-is lahustunud piperasiini. Vaigu ja diammiini vahelist reaktsiooni viidi läbi 2 tundi toatemperatuuril, mille järel pesti vaiku 3 korda DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) lahusega, siis 3 korda DCM-i, 2 korda DMF-i ja 2 korda DCM-

iga, mille järel vaik kuivatati vaakumis KOH all. Saadud vaigu mass oli 211 mg, mille põhjal määrati vaigu aktiivsuseks 65% (0,715 mmol/g). Ülejäänud sünteesivõtted olid mõlemal vaigul identsed.

3.3.2 Tahkekandja sünteesi protokoll

Sünteesile eelnevalt lasti kuival vaigul punduda sünteesisolvendis 45 min. Iga reaktsiooni järgselt pesti vaik läbi põhisolvendiga viis korda.

Aminohappe (3 ekvivalenti vaigu funktsionaalrühmade moolide arvu suhtes) aktiveerimiseks kasutati HOBt (2,94 ekv), HBTU (2,94 ekv) ja NMM (9 ekv) segu. Esimesena lisati aminohappe lahusele NMM, seejärel HOBt ja HBTU segu. Lahusel lasti 3 min inkubeerida, pärast mida pipeteeriti aktiveeritud ester vaigule. Atsüülimisreaktsiooni viidi läbi 60 minutit toatemperatuuril. Reaktsiooni järgselt eemaldati Fmoc-kaitserühm N-terminaalilt 20% piperidiini lahusega (DMF), kus pärast lahuse lisamist vaigule viidi reaktsiooni läbi 5 min, mille järel lahus eemaldati ning lisati uus lahus, reaktsiooni viidi seejärel 15 min läbi.

Nukleosiidi analoogi fragmendi, siin töös 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)-tiofeen-2-karboksüülhappe (edaspidi AMTH) ja tahkel kandjal sünteesitava ühendi vahelises reaktsioonis kasutati 1,5-2 ekv nukleosiidi, mille aktiveerimiseks kasutati 1,47 ekv HOBt, 1,47 ekv HBTU ja 5 ekv DIPEA segu. Esimesena lisati nukleosiidi analoogi lahusele DIPEA, seejärel HOBt ja HBTU segu. Pärast 3 minutit inkubeerimist pipeteeriti aktiveeritud ester vaigule.

Sünteesitud peptiid eraldati vaigult läbi kliivimise. Selleks kuivatati vaik, pestes vaiku 3 korda 2-propanooliga ja 3 korda DCM-iga. Seejärel kuivatati vaiku 1 h vaakumis. Kuival vaigult produkti kätte saamiseks kasutati TFA kliivimismeetodit, kus vaigule lisati 90/5/5 TFA/H₂O/TIPS lahus. Reaktsiooni viidi läbi 3 tundi, pärast mida koguti lahus eraldi kolbi, roteeriti kokku, roteeriti 2 korda kokku veega ning pesti 1 kord terbutüülmetüüleetri (TBME).

3.3.3 Tahkel kandjal sünteesitud ühendid

ARC-1102 (AMTH-Ahx-dLys-Ahx-(dArg)₂-NH₂). Kasutatud vaik: RINK-Fmoc-amiid MBHA, mida kaaluti 102 mg.

ARC-2404 (AMTH-Ahx-dLys(5-talidomiid)-NH₂). Kasutatud vaik: RINK-Fmoc-amiid MBHA, mida kaaluti 48,4 mg. Sünteesis kasutati (Fmoc)-d-Lys-(IV-Dde)-OH aminohapet. Pärast AMTH-Ahx- dLys(IV-Dde)-Vaik sünteesi eemaldati IV-Dde kaitserühm, töödeldes seda

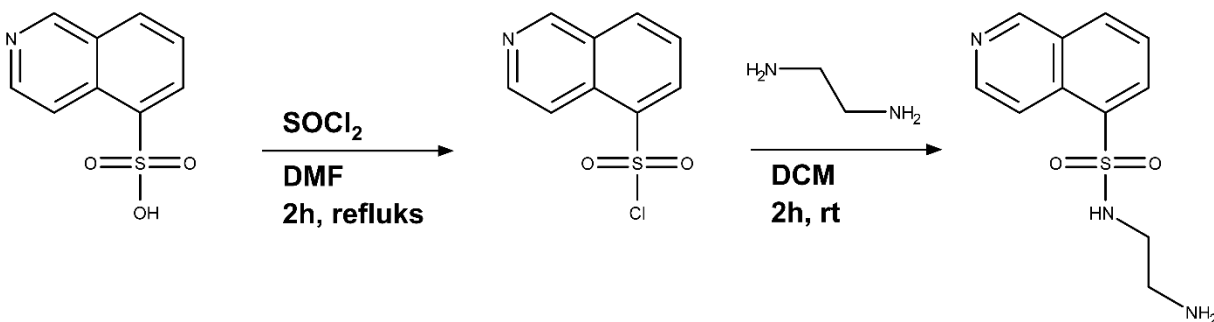
2% hüdrasiini lahusega 20 minutit. Seejärel pipeteeriti 5-fluorotalidomiidi (3 ekv) ja DIPEA (5 ekv) lahus vaigule. S_NAr reaktsiooni vaigu ja 5-fluorotalidomiidi vahel viidi läbi 70 °C juures üleöö.

M(C₃₄H₃₉N₉O₇S) = 718 Da, HPLC t_r = 10,56 min, ACN gradiendi kiirus: 5%-90% 20 minuti jooksul. Puhastatud ühendi kromatogramm ja massispekter on toodud Lisas 3.

ARC-2406-2408 prekursor (AMTH-Ahx-dAla-Ahx-Piperasiin). Kasutatud vaik: piperasiiniga töödeldud 2-klorotritüülpiperasiin vaik, mida kaaluti 15 mg. Produkti puhastati preparatiivse kromatograafia meetodil kokku 1 μmol, mis jaotati kolmeks 330 nmol portsuks. Puhastamata produkt kuivatati vaakumis ja hoiustati.

3.4 H9-inhibiitori süntees

1 g isokinoliin-5-sulfoonhapet, 7,5 g SOCl₂ ja 20 μl DMF-i refluksiti 2 tundi, millele järgnevalt SOCl₂ aurutati. Saadud toorproduktile lisati 15 ml deioniseeritud vett ning jahutati jäävannis. Jahutatud lahusele lisati 0,15 g NaHCO₃. Saadud lahust ekstraheeriti 2 korda 5 ml DCM-iga. Orgaaniline kiht kuivatati veevaba Na₂SO₄-ga ning pipeteeriti tilkhaaval jäävannis jahutatud 0,5 ml DCM-is lahustatud 0,57 mg 1,2-diaminoetaanile. Pipeteerimise järgselt eemaldati jäävann ning reaktsiooni viidi läbi toatemperatuuril 2 tundi (Joonis 6).



Joonis 6. H9 sünteesiskeem

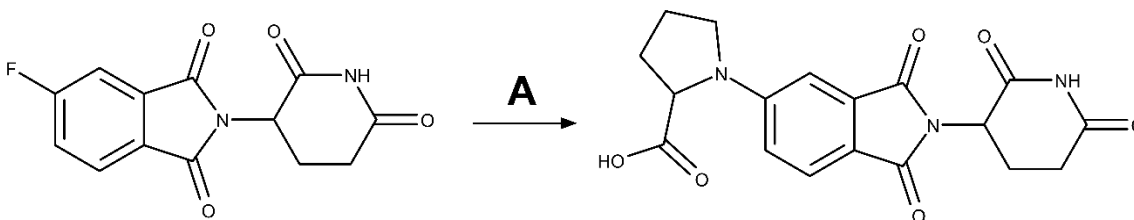
Reaktsioonisegu viidi üle jaotusletrisse, kus lisati 10% HCl vesilahust reaktsioonisegule ja veefaas eraldati. Veefaasile lisati seejärel 10% NaOH vesilahust kuni pH 10 saavutamiseni, mille järel ekstraheeriti produkt DCM-iga. Orgaaniline faas eraldati ning kuivatati, massi järgi saadi 40 mg produkti (4% saagis). Sünteesi läbi viimisel toetuti varasemalt koostatud eeskirjale [27].

^1H TMR (CDCl_3 , 700 MHz) δ 2,74 (2H, t, $J = 11,3$ Hz); 2,94 (2H, t, $J = 11,3$ Hz); 7,71 (1H, t, $J = 7,7$ Hz); 8,22 (1H, d, $J = 8,2$ Hz); 8,45 (2H, t, $J = 15,0$ Hz); 8,71 (1H, d, $J = 6,0$ Hz); 9,36 (1H, s) (Lisa 12)

3.5 Talidomiidi derivaatide süntees

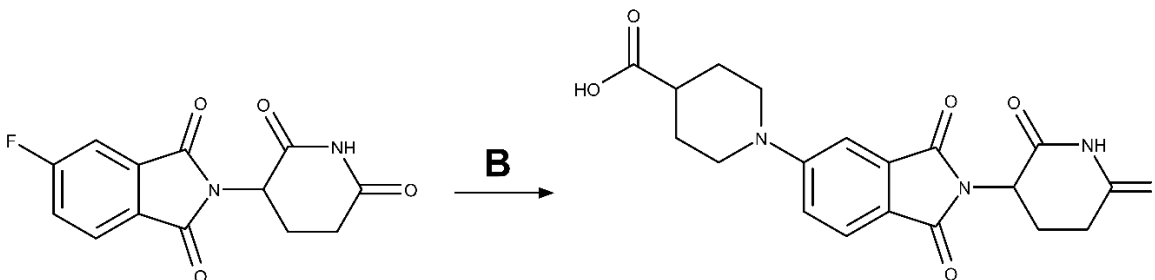
Paralleelselt viidi läbi kahe aine sünteesid: 5-(N-proliin)-talidomiid ja 5-(N-piperasiin-4-karboksüülhappe)-talidomiid. Reaktsioonid viidi läbi järgnevalt:

A) 100 mg 5-fluorotalidomiidi, 51 mg 4-piperidiinkarboksüülhapet, ja 300 μl DIPEA-d lahustati 4 ml DMSO-s. Reaktsioonisegu kuumutati 110 $^\circ\text{C}$ -ni ja hoiti temperatuuril 48 tundi (Joonis 7).



Joonis 7. talidomiid-5'-(l)-proliin sünteesiskeem. Reaktsioonitingimused toodud allpool

B) 100 mg 5-fluorotalidomiidi, 46 mg l-pirolini, ja 300 μl DIPEA-d lahustati 2 ml DMSO-s. Reaktsioonisegu kuumutati 110 $^\circ\text{C}$ -ni ja hoiti temperatuuril 24 tundi (Joonis 8).



Joonis 8. talidomiid-5'-piperidiinkarboksüülhappe sünteesiskeem. Reaktsioonitingimused toodud allpool

Saadud reaktsioonisegud lahjendati 30 ml DCM-is, saadud lahus pesti jaotuslehttris 3 korda läbi 6 ml küllastunud soolveega. Orgaaniline faas kuivatati veevaba Na_2SO_4 -ga ja kuivatati vaakumrotaatoris. Saadud toorprodukt puhastati silikageeli kromatograafia meetodiga, kasutades voolutiks 2:6:100 AcOH/MeOH/DCM lahust. Puhas produkt kuivatati vaakumrotaatoris. AcOH täielikuks eemaldamiseks puhastatud ainet roteeriti produkti veel kokku 3 korda tolueni ja 3

korda DCM-iga. $m_{(5-(N\text{-proliin})\text{-talidomiid})} = 5$ mg, saagis massi järgi 3,7%. $m_{(5-(N\text{-piperasiin-4-karboksüülhape})\text{-talidomiid})} = 40$ mg, saagis massi järgi 28,6%.

talidomiid-5'-(1)-proliin $^1\text{H TMR}$ (CDCl_3 , 700 MHz) δ 7,68 (1H, d, $J = 8,4$ Hz); 6,98 (1H, d, $J = 2,5$ Hz); 6,72 (1H, d, $J = 8,4$ Hz); 3,67 (1H, t, $J = 8,6$ Hz); 3,50 (1H, q, $J = 7,7$ Hz) (Lisa 13)

talidomiid-5'-piperidiinkarboksüülhape $^1\text{H TMR}$ (CDCl_3 , 700 MHz) δ 8 (1,5 H, s); 7,90 (1H, dd, $J = 8,1, 8,2$ Hz); 7,69 (1H, d, $J = 8,5$ Hz); 7,57 (1H, dd, $J = 6,8$ Hz, 6,8 Hz); 7,43 (1H, dt, $J = 2,1$ Hz, 8,5 Hz); 7,17 (1H, t, $J = 8,1$ Hz); 7,07 (1H, dd, $J = 2,1, 8,4$ Hz); 4,93 (1H, dd, $J = 7,4, 18,0$ Hz); 3,88 (2H, d, $J = 13,1$ Hz); 3,12 (2H, dt, $J = 2,4, 13,3$ Hz); 1,87 (2H, dq, $J = 16,9, 10,5$ Hz) (Lisa 14)

5-fluorotalidomiid $^1\text{H TMR}$ (CDCl_3 , 700 MHz) δ 7,99 (1H, s); 7,90 (1H, dd, $J = 8,1; 8,2$ Hz); 7,57 (1H, dd, $J = 6,8$ Hz, 6,8 Hz); 7,43 (1H, dt, $J = 2,1$ Hz, 8,5 Hz); 4,98 (1H, dd, $J = 5,4, 12,8$ Hz); 2,92 (1H, d, $J = 19,9$ Hz); 2,84 (1H, dq, $J = 4,3, 13,1$ Hz); 2,75 (1H, dt, $J = 5,1, 17,2$ Hz); 2,16 (1H) (Lisa 15)

3.6 ARC-2400 süntees

0,875 μmol HBTU-d, 1,5 talidomiid-4-hüdroksüatsetaati lahustati 200 μl DMF-is, millele lisati 4,7 μl 10% NMM lahust. Lahust inkubeeriti toatemperatuuril 3 minutit, seejärel pipeteeriti lahus 0,7 μmol ARC-668-le (AMTH-Ahx-dArg-Ahx-(dArg)₆-dLys-NH₂). Reaktsiooni viidi läbi toatemperatuuril 60 minutit, millele järgnevalt kuivatati reaktsioonisegu vaakumsentrifuugis. Produkt puhastati HPLC preparatiivse kromatograafia meetodil. Produkti (AMTH-Ahx-dArg-Ahx-dArg₆-dLys(CL1)-NH₂) saagis oli 350 nmol (50 %).

$M(\text{C}_{84}\text{H}_{136}\text{N}_{38}\text{O}_{17}\text{S}) = 1983$ Da, HPLC $t_r = 7,77$ min, ACN gradiendi kiirus: 5-70 % 16 minuti jooksul, 70-95% 16-26 minuti vahel, 95-10% 26-30 minuti vahel. Puhastatud ühendi kromatogramm ja massispekter on toodud Lisas 1.

ARC-2400 andis lisaks molekulaarioonile ($M + H^+$) ka mitmelaengulisi ioone ja TFA adukte: 813, 661, 1278.

3.7 ARC-2403 süntees

ARC-2403 (AMTH-Ahx-dLys[(CL1)dLys(Palmitaat)]-Ahx-dArg₂-NH₂) süntees viidi läbi kahes etapis.

Esimeses etapis lahustati 560 nmol HBTU-d, 600 nmol Fmoc-d-Lys-Palmitaati ja 1 µl NMM 100 µl DMF-is. Segu inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit, seejärel pipeteeriti kuivale 400 nmol ARC-1102-le. Reaktsiooni viidi läbi toatemperatuuril 90 minutit. Segu kuivatati vaakumsentrifuugis. Pärast kuivatamist lisati lahusele 0,2 ml 20% piperidiini lahust, kaitserühma eemaldusreaktsiooni viidi läbi 20 minutit toatemperatuuril, seejärel kuivatati reaktsioonisegu vaakumsentrifuugis. Saadud segu puhastati preparatiivse kromatograafia meetodiga. Puhastatud produkt kuivatati vaakumsentrifuugis.

Teises etapis lahustati 270 nmol talidomiid-4-hüdrosüatsetaat, 261,7 nmol HBTU ja 1 µl NMM 100 µl DMF-is. Lahust inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril, seejärel pipeteeriti 181,5 nmol ARC-1102-d-Lys-palmitaadile. Reaktsiooni viidi toatemperatuuril 90 minutit läbi, seejärel reaktsioonisegu kuivatati vaakumsentrifuugis.

Toorprodukt puhastati HPLC meetodil (DAD, $\lambda_{\max} = 320$ nm. Otsitav m/z väärtus: 785; lisa 2). Puhast produkti saadi 97,2 nmol (24,3 %). $M(C_76H_{117}N_{19}O_{15}S) = 1570$ Da, HPLC $t_r = 9,24$ min, ACN gradiendi kiirus: 30-75% 10 minuti jooksul, 75-30% 10-12 minuti vahel. Puhastatud ühendi kromatogramm ja massispekter on toodud Lisas 2.

3.8 ARC-2405 süntees

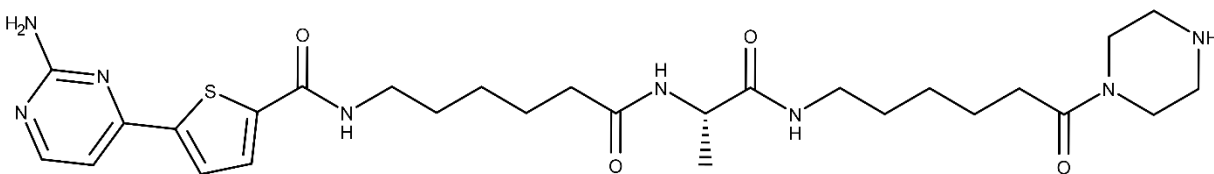
100 mg 5-fluorotalidomiidi ja 46,8 mg piperasiini lahustati 2 ml DMF-is. Reaktsiooni viidi läbi 100 °C juures üleöö. Seejärel reaktsioonisegu jahutati toatemperatuurini ning kuivatati vaakumis üle nädalavahetuse. Kontsentreeritud toorprodukti mass oli 394 mg, ruumala ligikaudu 410 µl.

4 mg 8-bromooktaanhapet lahustati 50 µl DMFis, kuhu lisati 16 µl DIPEA-d. Lahusele pipeteeriti 50 µl DMF-s lahustunud 6,45 mg HBTU-d, lahust inkubeeriti 5 minutit. Seejärel pipeteeriti lahusele 20 µl toorprodukti, reaktsioon viidi läbi toatemperatuuril 1 tund. Seejärel reaktsioonisegu kuivatati vaakumis. Saadud toorprodukt puhastati preparatiivse kromatograafia meetodil. Kokku puhastati 0,3 mg produkti. Puhast ühend lahustati DMF-is, lahusele lisati 0,5 µl DIPEA-d. Seejärel pipeteeriti lahusesse 1 mg lahustunud H9 inhibiitorit (N-(2-Aminoetüül)-5-isokinoliinsulfoonamiid), reaktsioonisegu kuumutati 70°C-ni, reaktsiooni viidi läbi 5 tundi. Seejärel reaktsioonisegu jahutati toatemperatuurini ning kuivatati vaakumis. Saadud toorsegu puhastati preparatiivse kromatograafia meetodiga. Puhta produkti (H9-Ahx-Piperasiin-(5-talidomiid)) saagis oli 75 nmol.

$M(C_{36}H_{43}N_7O_7S) = 718$ Da, HPLC $t_r = 15,22$ min, ACN gradiendi kiirus: 5-90% 16 minuti jooksul, 90-95% 16-19 minuti vahel. Puhastatud ühendi kromatogramm ja massispekter on toodud lisas 4.

3.9 ARC-2406 kuni ARC-2408 sünteesid

Ühendite peptiidse põhistruktuuri (Joonis 9) sünteesimiseks kasutati tahkefaasi peptiidsünteesi meetodit.



Joonis 9. Tahkefaasi sünteesi produkti graafilise kujutis

Puhastatud produktist (AMTH-Ahx-dAla-Ahx-Piperasiin) sünteesiti ARC-2406 [(4-piperidiinkarboksüülhappe)-5-talidomiid], ARC-2407 (AMTH-Ahx-dAla-Ahx-Piperasiin-[(1-Proliin)-5-talidomiid]) ja ARC-2408 (AMTH-Ahx-dAla-Ahx-Piperasiin-CL1). Sünteesis kasutati talidomiidi derivaate: talidomiid-5'-(1)-proliin, talidomiid-5'-piperidiinkarboksüülhappe ning talidomiid-4-hüdroksüatsetaat. Talidomiidi derivaadid (495 nmol) aktiveeriti 1:1 HBTU ja HOBt seguga (485.1 nmol) 1 μ l DIPEA-ga 1 ml DMF-is. Aktiveeritud ühendid pipeteeriti tahkefaasil sünteesitud 330 nmol prekursorile, reaktsioone viidi läbi 2 tundi. Seejärel reaktsioonisegud kuivatati vaakumtsentrifuugis, lahustati 20 μ l DMSO-s ning puhastati preparatiivse kromatograafia meetodil. Saadud produktide lahused kuivatati vaakumis. ARC-2406 saagis oli 252 nmol (76,3%), ARC-2407 saagis oli 240 nmol (72,7%) ja ARC-2408 saagis oli 135 nmol (40,9%).

ARC-2406: $M(C_{47}H_{59}N_{11}O_9S) = 955$ Da; $t_r = 12,83$ min. ARC-2407: $M(C_{46}H_{57}N_{11}O_9S) = 941$ Da; $t_r = 12,36$ min. ARC-2408: $M(C_{43}H_{52}N_{10}O_{10}S) = 901$ Da; $t_r = 11,74$ min. ACN gradiendi kiirus kõigi ühendite puhastamisel: 5-20 5 minuti jooksul, 20-75 5-20 minuti vahel. Puhastatud ühendite kromatogramm ja massispektrid on toodud lisades 5 kuni 7.

3.10 PKA $_{\alpha}$ aktiivse kontsentratsiooni määramine

PK aktiivset kontsentratsiooni saab määrata konstantse fluorestseeruva ARC-i kontsentratsiooni juures, kus ARC-i kontsentratsioon on 10-20 korda kõrgem kui kinaas-ARC kompleksi K_D .

ARC-i tiitritakse PK-ga kahekordsete seerialahjendustega. Tiitrimise fluorestsentsanisotroopia mittelineaarse regressiooni analüüsiga määratakse kinaasi aktiivsus (võrrandid 2-4):

$$Y = (1 - M) \cdot A_f + M \cdot A_b \quad (\text{Võrrand 2})$$

$$Z = \frac{L_t + K_D + k \cdot X - \sqrt{(L_t + K_D + k \cdot X)^2 - 4 \cdot k \cdot X \cdot L_t}}{2 \cdot L_t} \quad (\text{Võrrand 3})$$

$$M = \frac{Q \cdot Z}{(1 + Z \cdot (Q - 1))} \quad (\text{Võrrand 4})$$

Kus A_f on vaba ARC-i fluorestsentsanisotroopia, A_b on PK ja ARC-i kompleksi fluorestsentsanisotroopia, L_t ARC-i kontsentratsioon, K_D Kinaasi ja ARC-I vahelise kompleksi tasakaalukonstant, X on PK kontsentratsioon, Y on mõõdetud anisotroopia väärtus, Q on ARC-PK kompleksi ja vaba ARC-i fluorestsentskiirguse intensiivuste suhe ja k on aktiivse PK ning PK nominaalse kontsentratsiooni suhe.

3.11 Sünteesitud ühendite PKAc $_{\alpha}$ -ga seondumise iseloomustamine

Sünteesitud ühendite afiinsus PKAc $_{\alpha}$ suhtes määrati varasemalt välja töötatud meetodi põhjal väheste modifikatsioonidega [28].Töös on uuritavaks kinaasiks PKAc $_{\alpha}$, fluorestseeruva sondina olid töös kasutusel ARC-669 (AMTH-Ahx-(d-Arg)-Ahx-(d-Arg) $_6$ -[d-Lys(TAMRA)]-NH $_2$) ja ARC-583 (Adc-Ahx-dArg $_6$ -[d-Lys-(TAMRA)]-NH $_2$). Väljatõrjumiskatses kasutatavate ARC-ide algsed kontsentratsioonid on toodud Tabel 1.

Ühend	Ühendi algkontsentratsioon	Solvent	Kasutatav sond
ARC-2400	100 μ M	B4	ARC-669
ARC-2403	43 μ M	B4	ARC-669
ARC-2404	100 μ M	B4	ARC-669
ARC-2405	100 μ M	B4	ARC-583
ARC-2406	36 μ M	1:29 DMSO / B4	ARC-583
ARC-2407	35,6 μ M	1:29 DMSO / B4	ARC-583
ARC-2408	37,2 μ M	1:29 DMSO / B4	ARC-583

Tabel 1. ARC-ide algkontsentratsioonid (μ M) esimeses lahjenduses, kasutatud solvent ning kasutatud sond

Ühendid lahustati B4 puhvril (50 mM HEPES (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 0,005% P20, 5 mM DTT (0,77 mg/ml)). ARC-ide sidumiskatseteks tehti 13 kolmekordset ARC-i sarilahjendust.

3.12 ARC-ide proteolüüsi suunamise võimekuse analüüsimine *western blot* meetodiga

Sünteesitud ARC-ide võimekus suunata PKA α proteolüüsi määrati *western blot* analüüsi meetodil. Analüüsid on läbi viidud Dr. Darja Lavõgina poolt. Rakutöötluses kasutati BioLite™ Petri tasse (ThermoFisher Scientific). Töös kasutati PC3 (inimese eesnäärmevähi rakud) ja HeLa (emakakaelavähi rakud) rakuliine (mõlemad ostetud rakupangast American Type Culture Collection). Rakke töödeldi kasvusöötmes *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) allpool nimetatud ühenditega individuaalselt (Tabel 2).

Tabel 2. Rakkude töötlemisel kasutatud ühendid, töödeldud rakuliinid ja rakkude inkubeerimisperioodid

Kuupäev	10.10.2023	15.02.2024	09.05.2025
Inkubeerimis-periood, rakuliin	48 h, PC3	24 h, PC3	24 h, HeLa
Ühendid, millega rakke töödeldi	DMSO 0,1% (negatiivne kontroll) ARC-2400 (10 μ M) ARC-2400 (2 μ M) H89 (10 μ M)	DMSO 0,1% (negatiivne kontroll) ARC-2403 (10 μ M) H89 (50 μ M)	DMSO 0,1% (negatiivne kontroll) ARC-2404 (20 μ M) ARC-2405 (12,5 μ M) ARC-2406 (20 μ M) ARC-2407 (20 μ M) ARC-2408 (7,5 μ M)
Rakkude konfluentsus	80%	60%	80%

Rakud lüüsi jäe peal 1% Triton X-100, 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% P20 ja proteaaside inhibiitorite segu sisaldava puhvriga (pH 7,5). Membraanid sadestati tsentrifuugimisega (26 000 g, 20 min, 4 °C). Supernatant koguti ja hoiustati -20 C° juures hilisemaks kasutuseks.

SDS-PAGE proovid valmistati saadud supernatandist, segades seda ruumalasuhtes 3:1 kokku SDS-PAGE redutseeriva laadimispuhvriga (4x *Loading Buffer* + DTT) ning kuumutades saadud lahust 75 °C juures 15 minutit. Töötlusele eelnevalt lahjendati rekombinantne PKAc_α FA puhvriga sobiva kontsentratsioonini ning töödeldi samal meetodil kui lüsaati. Geelelektroforeesiks pipeteeriti igasse süvendisse 10 µL proovi ja eraldi süvendisse 4 µL teadaoleva molekulmassiga markerite segu (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Elektroforeesi järgselt viidi geelilt eraldatud valgud üle metanool-aktiveeritud polüvinüüldieenfluoriid membraanile (PVDF). Selleks rakendati voolu 12 minutit 12 V juures. Pärast voolu välja lülitamist membraan blokeeriti 1% BSA (PBS) lahuses ja töödeldi üleöö 4 °C juures PKAc_α-vastase antikehaga (sc-903, küülik, Santa Cruz Biotechnology), 1:15000 lahjendus. Seejärel membraan pesti 3 korda 0,1% Triton X lahusega PBS-is ja töödeldi 3-6 h jooksul 4 °C juures sekundaarse antikehaga (kitse antikeha küüliku IgG fragmendi vastu, konjugeeritud aluselise fosfataasiga; Life Technologies, lahjendus 1:2000). Pärast pesemisprotseduuri kordamist ilmutati PKAc_α asukoht membraanil, kasutades aluselise fosfataasi substraatide NBT (Sigma-Aldrich) ja BCIP (Thermo Fisher) segu lõppkontsentratsioonidega 0,3 mg/mL ja 0,15 mg/mL aluselise fosfataasi puhvris (pH 9,5; Thermo Scientific™). Lõpuks membraan kuivatati ja skaneeriti sisse. ARC-2404-2408 rakukatsetes värviti pärast anti PKAc_α-ga töötlust membraan ka α-tubuliini vastase antikehaga (DM1A, 1:2000 lahjendus, hiir) ning seejärel sekundaarse antikehaga (kitse antikeha hiire IgG fragmendi vastu, konjugeeritud aluselise fosfataasiga; Life Technologies, lahjendus 1:2000). Selleks membraan taasaktiveeriti, blokeeriti uuesti ning seejärel töödeldi antikehadega vastavalt eespool kirjeldatud protokollile. Antikehaga värvitud valkude pindalaid membraanil kvantifitseeriti ImageJ programmiga. Pindalade võrdlused viidi läbi Microsoft Excel tabelarvutusprogrammis.

4. Tulemuste arutelu

PROTAC-ide arengu jooksul on levinuim PROTAC-ide välja töötamise meetod olemasoleva valguga seostuva molekuli sidumine E3 ligaasi ligandiga läbi linkeri. Bakalaureusetöö raames uuriti võimalusi modifitseerida ARC-tüüpi inhibiitoreid ja nende ATP-konkurentseid fragmente eesmärgiga katalüüsida PKA α proteolüüsi. Töö käigus sünteesiti seitse PROTAC-it (Tabel 3).

Tabel 3. Sünteesitud ühendite koodid ja struktuurid. Graafilised struktuurid on reprodutseeritud Lisas 11

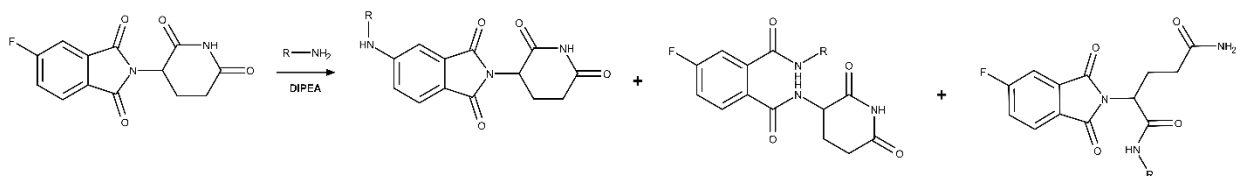
Ainekood	Aine struktuur
ARC-2400	AMTH-Ahx-dArg-Ahx-dArg ₆ -dLys(CL1)-NH ₂
ARC-2403	AMTH-Ahx-dLys[(CL1)dLys(Palmitaat)]-Ahx-dArg ₂ -NH ₂
ARC-2404	AMTH-Ahx-dLys(5-talidomiid)-NH ₂
ARC-2405	H9-Ahx-Piperasiin-(5-talidomiid)
ARC-2406	AMTH-Ahx-dAla-Ahx-Piperasiin-[(4-piperidiinkarboksüülhape)-5-talidomiid]
ARC-2407	AMTH-Ahx-dAla-Ahx-Piperasiin-[(1-Proliin)-5-talidomiid]
ARC-2408	AMTH-Ahx-dAla-Ahx-Piperasiin-CL1

ARC-tüüpi ühendite sünteesis on tahkefaasi süntees oluline: see võimaldab kiiret ja kõrge saagisega sünteesi. Sellel põhjusel rakendati töös valdavalt tahkekandja sünteesi meetodit.

ARC-2400 ja ARC-2403 sünteesiti vastavalt ARC-668 (AMTH-Ahx-dArg-Ahx-dArg₆-dLys-NH₂) (Lisa 8) ja ARC-1102 (AMTH-Ahx-dLys-Ahx-dArg₂-NH₂) (Lisa 9) põhjal, eesmärgiga hinnata ARC-tüüpi ühendi PROTAC-iks muutmise lihtsust ja ARC-i põhise PROTAC-i proteolüüsi suunamise võimekust. ARC-2400 sünteesis viidi läbi atsüülimisreaktsioon, mille saagis oli 50%. ARC-2403 sünteesi viidi läbi kahes etapis lahusefaasis, mille käigus viidi kahel korral läbi HPLC preparatiivse kromatograafia puhastamine. Puhastatud produkti saagis oli 24,3%. Ühendite eesmärk oli võrrelda E3 ligaasi potentsiaalset mõju ARC-i afiinsusele kinaasi suhtes, ühtlasi ka võimalikke erinevusi sihtmärkvalgu proteolüüsi määras sõltuvalt E3 ligaasi linkeri asukohast ARC-il ja oligoarginiini ahela pikkusest ARC-i peptiidses osas.

ARC-2400 struktuuris leidub kuue arginiini pikkune transportpeptiidi omadustega ahel, mis suurendab ühendi selektiivsust ja afiinsust kinaasi suhtes ning ühtlasi suurendab rakumembraani läbitavust. ARC-2403 sisaldab kahe arginiini pikkusele ahelale lisaks rasvhapet, mis peaks ühendi hüdrofoobsust ning rakumembraani läbitavust suurendama. Järgnevates ühendites need motiivid puuduvad, mistõttu on järgnevad ühendid väiksemad ning hüdrofoobsemad, et parendada rakumembraani läbitavust.

ARC-2404 (AMTH-Ahx-dLys(5-talidomiid)-NH₂) süntees järgnes ARC-2400 ja ARC-2403-ga negatiivsete proteolüüsi tulemuste kindlaksmääramisele. ARC-2404 on väiksem ühend, millel puudub oligoarginiini ahel, ja mis sarnaneb klassikalise PROTAC-i struktuuri valemile (kinaasi inhibeeriv ligand, linker, E3 ligaasi ligand). Ligandide lihtsamaks struktuuri integreerimiseks kasutati d-lüsiini, mille kaks aminorühma võimaldasid lihtsalt siduda nii ATP-konkurentset ligandit kui ka E3 ligaasi linkerit. Sünteesis kasutati 5-fluorotalidomiidi alternatiivina talidomiid-4-hüdroksüütsetaadile. Sünteesi käigus ilmnes, et 5-fluorotalidomiidi ja primaarse aminorühma vahel toimub kaks reaktsiooni: nukleofiilne asendusreaktsioon aromaatses tuumas (S_NAr) ning kõrvalreaktsioon talidomiidi ühe imiidrühmaga, mille käigus tsükel avanes (Joonis 10). Kromatogrammi põhjal hinnati toorsegu ja selgus, et reaktsioonisegus oli ARC-2404 ja kõrvalprodukti vahetegur ligikaudu 1:3.



Joonis 10. Talidomiidi ja primaarse amiini reaktsiooni produktid

Kõrvalreaktsiooni vältimiseks viidi edaspidi 5-fluorotalidomiidi ja aminorühma vahelised reaktsioonid läbi sekundaarse tsüklilise amiiniga. Selleks kasutati kokku kolme tsüklilist amiini. Esimene kandidaat oli piperasiin. Sekundaarse amiini sobivust hinnati ARC-2405 sünteesiga. Ühendi sünteesile eelnevalt sünteesiti H9-inhibiitor, et võrrelda erinevaid ATP-konkurentseid inhibiitoreid PROTAC-ides, sealhulgas nende sünteesimeetodite ning afiinsuste erinevusi. ARC-2405 süntees viidi läbi lahusefaasis. Sünteesi saagis oli väga madal, mis tekitas vajaduse uurida alternatiivseid meetodeid talidomiidi derivaatide sünteesiks ja kasutamiseks PROTAC-ides.

ARC-2406, ARC-2407 ja ARC-2408 sünteesiks kasutati ühendite peptiidse põhjana 2-klorotritüülkloriid vaigul sünteesitud diammiinse terminaalse otsaga peptiidi derivaati (AMTH-Ahx-dAla-Ahx-Piperasiin), mille sünteesis lähtuti ARC-1408 struktuurist (Lisa 10). Antud meetodiga on võimalik sünteesida traditsioonilise PROTAC-i struktuuriga ühendeid, kasutades tahkefaasi sünteesi meetodit ühendi põhistruktuuri loomiseks (kinaasi inhibiitor koos linkeriga) ja lahusefaasi sünteesi E3 ligaasi ligandi sidumiseks. Antud töös kasutati kolme talidomiidi derivaati: talidomiid-4-hüdroksüatsetaati, talidomiid-5'-(l)-proliini ja talidomiid-5'-piperidiinkarboksüülhapet. Talidomiidi derivaatide sünteesi käigus kõrvalreaktsioone ei toimunud, aga saagised olid ligikaudu 50%. Tõenäoliselt oli selle põhjuseks reagentide osakaal (1:1.1). Talidomiidi derivaatide tulevastel sünteesidel tuleks kasutada kõrgemat sekundaarse amiini kogust.

Tahkefaasi süntees viidi läbi kiirelt, sünteesiproducti puhtus oli kõrge ning selle puhastamine oli efektiivne. Sünteesitud peptiidi vaba aminorühm ning E3 ligaasi ligandi karboksüülrühm võimaldasid läbi viia kiiret ja spetsiifilist HBTU-HoBT aktiveeritud atsüülimist. Antud mehhanismiga ei esine kõrvalreaktsioone 5-fluorotalidomiidiga, mis võis püsida sünteesitud talidomiidi derivaatides ka pärast silikageeli kromatograafiaga tehtud puhastamist.

Töö käigus sünteesitud PROTAC-ides rakendati erinevaid sünteesimeetodeid, et oleks võimalik hinnata nii nende efektiivsust, kiirust kui ka piiranguid uute struktuuride loomisel. ARC-2400 ja ARC-2403 sünteesis oli peamine piirang E3 ligaasi ligandi ja ARC-i vahelise linkeri asukoha leidmine: ARC-668 ja ARC-1102 puhul sobis selleks d-lüsiini aminohappejäägi kõrvalahel. ARC-2404 sünteesi käigus kasutatud (Fmoc)-d-lüsiin-(IV-Dde)-OH võimaldas tahkel kandjal sünteesida PROTAC-i, mille linkeri pikkust ja kasutatavaid ligande oleks lihtne muuta.

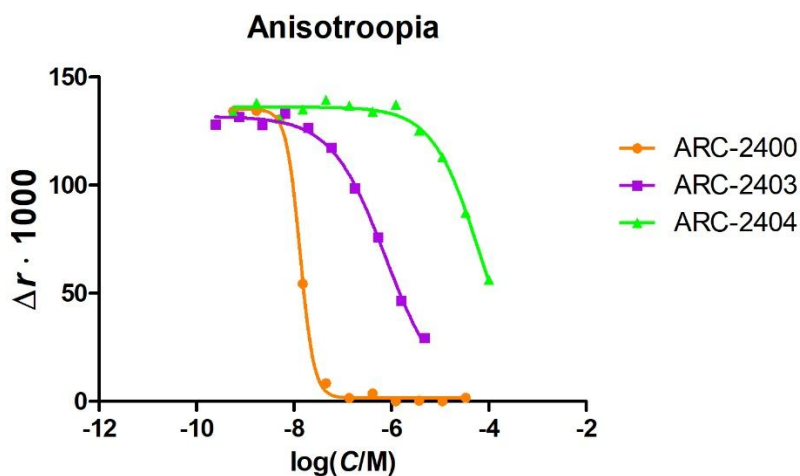
ARC-2405 sünteesi käigus leiti, et lahusefaasi süntees on antud ühendite arendamisel väga ebaefektiivne, nõudes preparatiivse HPLC puhastamist pea iga sünteesietapi järel, mistõttu pikenes süntees märgatavalt ning produkti saagis vähenes.

ARC-2406-2408 sünteesimeetod on tõenäoliselt kõige lootusrikkam, kuna sellega on võimalik läbi viia klassikalise PROTAC-i süntees. 2-klorotritüülkloriid vaiguga saab siduda diammiini, millele „ehitada“ linkeri koos E3 ligaasi ligandi või ATP-konkurentne ligandiga. Sünteesiproductile saab lahusefaasis vastava vastandligandi siduda. Meetod oleks kergelt ja kiirelt läbi viidav ja võimaldaks varieeruvate struktuuridega ühendite sünteesi.

4.1 Sünteesitud ühendite PKAc α -ga seondumise iseloomustamine

Kasutatud meetod mõõdab sondi ning uuritava ARC-i vahelist konkureerimist PKAc α sidumisel, mõõtes sondi fluorestsentsanisotroopiat. Inhibiitorite konkureeriva väljatõrjumise kirjeldamiseks tehti ARC-i seerjalahjendused püsiva aktiivse kinaasi ja sondi kontsentratsiooni juures. Töös kasutati kahte sondi (fluorestseeruvat ARC-i) – ARC-669 ja ARC-583. Sondid erinesid sond-kinaas kompleksi vahelise dissotsiatsioonikonstandi poolest, kus $K_{D \text{ ARC-669}} = 0,02 \text{ nM}$ ja $K_{D \text{ ARC-583}} = 0,5 \text{ nM}$.

ARC-669 sondi kasutati oligoariniini ahelaga ARC-de analüüsil ja ka ARC-2404 afiinsuse analüüsil (Graafik 1). Analüüsitud ühenditest tõrjus kasutatud sondi välja ARC-2400, ülejäänud ühendite puhul oli fluorestseeruva ARC-i väljatõrjumine osaline. Sõltumata mittetäielikust väljatõrjumisest oli analüüsitulemuste põhjal siiski võimalik arvutada ühendite IC_{50} ja K_D . Tulemuste põhjal võib järeldada, et ARC-2404 afiinsuse määramise puhul oleks efektiivsem kasutada ARC-583-e, mis on väiksema afiinsusega ($K_{D \text{ ARC-583}} = 0,5 \text{ nM}$) ja seega kergemini välja tõrjutav. Oligoariniini ahelata PROTAC-ide afiinsuste määramised viidi läbi ARC-583-ga.

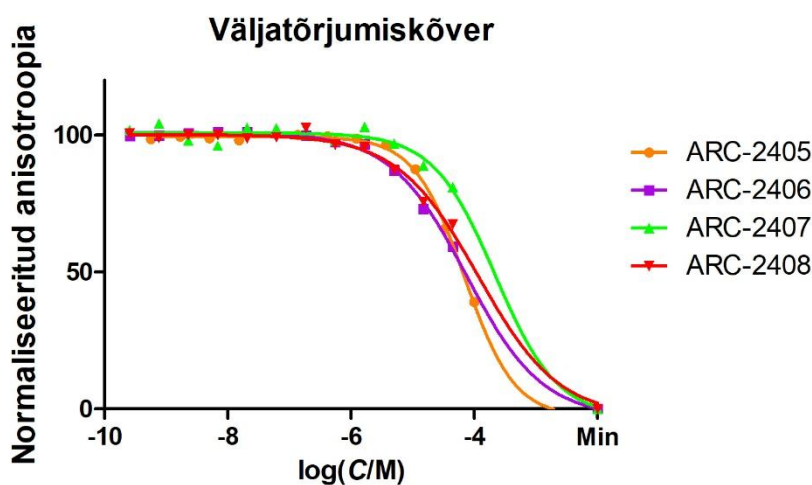


Graafik 1. ARC-2400, ARC-2403 ja ARC-2404 fluorestsentsanisotroopia väärtused sõltuvalt ühendite kontsentratsioonist.

Analüüsid viidi läbi B4 puhvris. ARC-2406, 2407 ja 2408 lahustuvust puhvris oli raske hinnata, mistõttu viidi katsed läbi DMSO-d sisaldavas lahuses. Küllastunud lahuse saamiseks tehti esmalt ARC-idest 10 mM lahused DMSO-s. DMSO lahustele tehti 90-kordne lahjendus B4 puhvris. Segu tsentrifuugiti ning lahustunud aine eraldati pipetiga teise anumasse. Kontsentratsioon määrati UV-Vis neelduvuse põhjal. Lahustunud ARC-ide kontsentratsioone kirjeldati

eksperimentaalses osas (Tabel 1). Sarnase struktuuriga ARC-2405, mille sünteesis kasutati H9 inhibiitorit, lahustus puhvis komplikatsioonideta. Parema lahustuvuse põhjuseks võib pidada H9 inhibiitori isokinoliinis asuva lämmastikuaatomi positiivset laengut puhvis.

ARC-2405 kuni ARC-2408 afiinsuse kirjeldamise katsetes ei omanud ükski ühend piisavalt kõrget afiinsust, et saavutada suurima kasutatud kontsentratsiooni juures täielik väljatõrjumine, seda isegi nõrgema afiinsusega fluorestseeruva ARC-583 juuresolekul. Ühendite afiinsuste selgemaks hindamiseks normaliseeriti saadud anisotroopia väärtuste ülemised platood sajani ja lähendamiseks kasutatud mudelis fikseeriti alumine platoo (Graafik 2).



Graafik 2. ARC-2405 kuni ARC-2408 normaliseeritud fluorestsentsanisotroopia väärtused sõltuvalt ühendite kontsentratsioonist. Ülemine platoo on normaliseeritud väärtuseni 100.

Allpool on toodud sünteesitud ühendite PKA α sidumiskatsetes kasutatud sondid, IC₅₀ ja K_D väärtused (Tabel 4).

Tabel 4. Sünteesitud ARC-ide väljatõrjumiskatsetes kasutatud sond, ARC-i IC₅₀ (μ M) ja K_D (nM) väärtused PKA α suhtes

Ühend	Sond	IC ₅₀	K _D
ARC-2400	ARC-669	13,4±0,4 nM	0,1±0,04 nM
ARC-2403	ARC-669	0,7±0,05 μ M	7,3±0,5 nM
ARC-2404	ARC-669	64±4 μ M	0,6±0,04 μ M
ARC-2405	ARC-583	15±10 μ M	0,6±1,0 μ M
ARC-2406	ARC-583	11±5 μ M	1,7±0,7 μ M

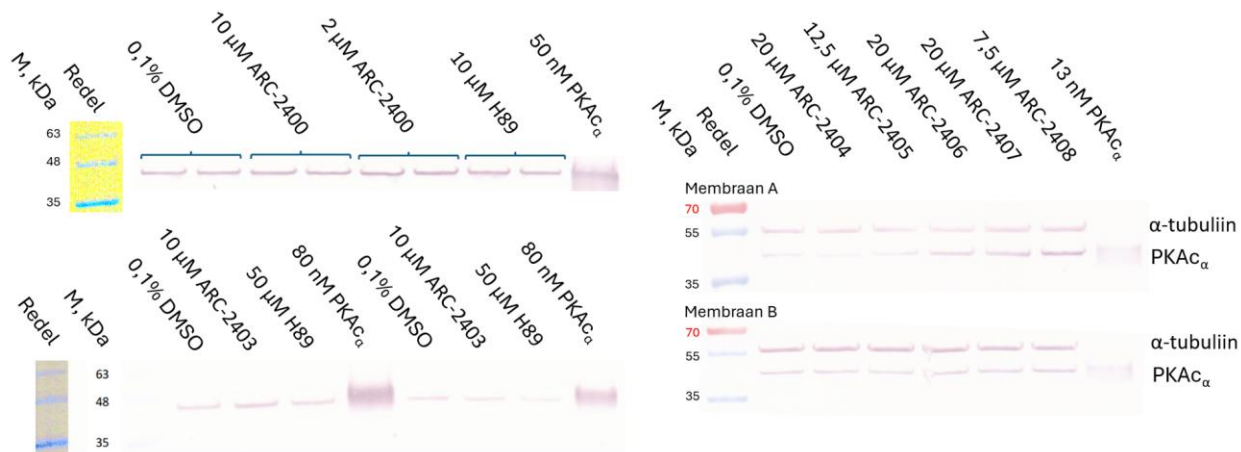
ARC-2407	ARC-583	60±35 µM	9±6 µM
ARC-2408	ARC-583	36±7 µM	2,2±1,1 µM

ARC-ide afiinsus PKAc_α suhtes varieerus tugevalt. ARC-2400 ja ARC-2403 afiinsused olid teiste ühenditega võrreldes mitukümmend korda kõrgemad, mida võib omistada ühendites leiduvale oligoarginiini ahelale. Ühenditel, millel ahel puudus, jäid IC₅₀-väärtused ja afiinsused suurusjärku 0,6-8,9 µM. Alla mikromolaarne afiinsus tuvastati ARC-2400, ARC-2403 ja ARC-2404 puhul. ARC-2405 kuni ARC-2408 IC₅₀ ja K_D väärtuste hälbed olid väga suured, mis võib tuleneda sellest, et ühendite nõrga afiinsuse ja madala kontsentratsiooni tõttu ei toimunud proovis piisavalt tugevat fluorestseeruva ARC-i väljatõrjumist, et koostada täielik väljatõrjumisgraafik; seega ei olnud võimalik ühendite afiinsuseid täpselt mõõta. Saadud tulemuste põhjal võib ka järeldada, et ARC-2406, ARC-2407 ja ARC-2408 afiinsus PKAc_α suhtes varieerub vähe, eriti kui sisse arvestada ka hälbeid, ehk muutused linkeri struktuuris ei tohiks omada tugevat mõju sama adenosiini analoogi kasutava PROTAC-i puhul ühendi ja kinaasi vahelisele afiinsusele.

Teoorias võimaldab PROTAC-ide toimemehhanism ka nõrgema afiinsusega ühenditel rakusisest toimet avaldada. Minimaalne afiinsus peab siiski olema kinaasi suhtes olemaas, et tekitada ubikvitinüülimiseks piisavalt tugev kompleks.

4.2 Proteolüüsi suunamise määra hindamine

Rakukatsetega määrati sünteesitud PROTAC-ide PKAc_α degradeerimisvõimet, mida hinnati *western blot* meetodiga. Degradatsioonimäära hinnati membraanil antikehaga märgistamisel saadud vöötide pindalade võrdlemisel. Hinnati paralleelselt tehtud negatiivse 0,1% DMSO kontrollproovi PKAc_α vöödi ning PROTAC-iga töödeldud rakukultuuri PKAc_α vöödi pindalade erinevusi. ARC-2404 kuni ARC-2408 WB-s normaliseeriti vöötide pindalad kõigepealt antikehaga värvitud α-tubuliini pindalade suhtes (Joonis 11), seejärel jagati normaliseeritud vöötide pindalad läbi negatiivse 0,1% DMSO kontrolli vöödi normaliseeritud pindalaga. Saadud vöötide pindalade suhetest leiti keskmine ning standardhälve. Pindalade tabel on leitav Lisas 16.



Joonis 11. Western blot-iga töödeldud rakuliisaadid, mida töödeldi sünteesitud ARC-idega. Joonisel on kolme katse tulemused. Üleval vasakul on katse 1 (ARC-2400), all vasakul katse 2 (ARC-2403) ning paremal katse 3 (ARC-2404 kuni ARC-2408), kus värviti valke kahel membraanil. Katsetes 1 ja 2 on värvitud PKAc_α vöödid, katsetes 3 on lisaks ka värvitud α-Tubuliini vöödid, mille abil normaliseeriti PKAc_α vöötide pindalad. M(α-tubuliin) = 55 kDa; M(PKAc_α) = 40,7 kDa. Suurendatud pildid on toodud Lisas 17.

Enamus sünteesitud ühendeid ei omanud PROTAC-i omadusi. ARC-2400, ARC-2403 ja ARC-2405 töödeldud rakkude PKAc_α vöödi suurus oli ligikaudu sama suur kui DMSO kontrollis. ARC-2406, ARC-2407 ja ARC-2408-ga läbi viidud katsetes oli antikehaga värvitud kinaasi vööt intensiivsem võrreldes DMSO kontrolliga (Tabel 5)

Aine	Rakuliin	c (μM)	Pindalade suhe (ARC/DMSO), %
ARC-2400	PC3	10; 2	115±6; 133±3
ARC-2403	PC3	10	130±70
ARC-2404	HeLa	20	84±9
ARC-2405	HeLa	12,5	115±50
ARC-2406	HeLa	20	190±120
ARC-2407	HeLa	20	170±90
ARC-2408	HeLa	7,5	190±90

Tabel 5. Rakukatsetes kasutatud ARC-id, rakuliinid, ühendite kontsentratsioon rakukatsetes ning WB vööide pindalade suhe 0,1% DMSO kontrolli suhtes

Analüüsitud ainetest oli ARC-2404 ainus, mis omas nähtavalt proteolüüsi suunavaid omadusi; ainega töödeldud rakkudes oli PKAc_α vöödi pindala 16±9% väiksem DMSO kontrolli vöödi pindalast.

Madalat või puuduvat proteolüüsi võivad põhjustada mitmed tegurid. Üheks põhjuseks võib olla PKA esinemine rakkudes inaktiivse tetrameerse holoensüümina, mis takistab ligandil aktiivtsentriga seostumist. Teiseks põhjuseks võib pidada ARC-ide madalat afiinsust PKAc_α suhtes: on võimalik, et tekkiv kompleks ei olnud piisavalt tugev, et ubikvitinüülimine toimuda jõuaks. Kolmas risk võib olla, et ühendid läbisid rakumembraani minimaalselt või üldse mitte, mistõttu ei oleks olnud võimalik proteolüüsi algatada. Neljandaks põhjuseks võib olla linkerikuju või pikkuse ebasobivus: tekkinud kolmikkompleksi kuju ei võimaldanud PKAc_α ubikvitinüülimist.

Ühendite omaduste täpsemaks kirjeldamiseks on vaja läbi viia teiste parameetritega korduskatseid, näiteks uurida erinevate PROTAC-i kontsentratsioonide mõju proteolüüsi määrale, ühtlasi värvida rakukatsete järgselt ka teisi AGC-rühma kinaase, et kindlaks määrata, kas sünteesitud ühendid suunavad ka teisi kinaase proteolüüsile. Tulevikus oleks vaja valida ka kindel rakuliin katsete läbiviimiseks, et katsete tulemused järjekindlamad oleksid.

4.3 PROTAC-ide optimeerimine

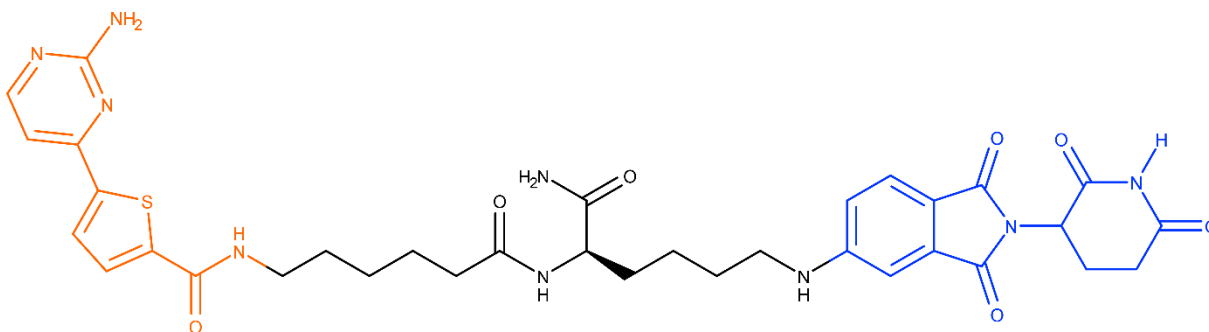
Töö käigus sünteesitud ühendite struktuurides esinesid selged erinevused. Järgnevalt kirjeldatakse struktuuriomadusi, mis võisid mõjutada ühendite omadusi PROTAC-ina.

Peptiidi derivaati AMTH-Ahx-dAla-Ahx-Piperasiin sisaldavate PROTAC-ide puhul võis struktuuri puuduseks olla nende suurus (~900 g/mol). Võrreldes ARC-2404 suurusega (718 g/mol) on võimalik, et ainete suurus ning madal lahustuvus vähendasid rakumembraani läbitavust. Tsüklid linkerites võisid samuti PKAc_α PROTAC-ide toimele negatiivselt mõjuda. Kui võrrelda ARC-2404 ja ARC-2405 struktuure, kus linkerite pikkused on sarnased ning kasutatud adenosiini analoogid on hea afiinsusega PKAc_α suhtes, siis suunas proteolüüsi ARC-2404, kuid tsüklit omava linkeriga ARC-2405 mitte.

Oligoarginiini ahelaga PROTAC-i disainis oleks parema arusaama jaoks vaja uurida varieeruva linkeriku pikkusega ühendite omadusi. Pikema linkeriga on E3 ligaasi ligandi liikuvus kinaas-PROTAC-kinaas kompleksis suurem; pikkuse varieerimine võimaldab leida sobivat linkeriku pikkust toimiva kolmikkompleksi moodustamiseks. Pikema linkeriku kasutamisel peab siiski arvestama ka molekulmassi suurenemisega, millega võib kaasnedada raskendatud rakumembraani läbitavus, kui ka risk, et tekkiv kolmikkompleks ei pruugi ubikvitinüülda kinaasi.

PKAc_α jaoks efektiivsemate PROTAC-ide disainimisel saaks kasutada optimeeritud või modifitseeritud ARC-2404 struktuuri (Joonis 12). PROTAC-i sünteesiks efektiivne meetodika oleks modifitseeritud peptiidi analoogi AMTH-Ahx-dAla-Ahx-Piperasiin sünteesimeetod, kus sünteesiti tahkel kandjal alifaatse aminorühmaga peptiidi derivaat. Asendades piperasiini alifaatse diamiiniga, oleks võimalik lühikese aja jooksul sünteesida mitu analoogse struktuuriga ühendit, mida saaks ühe reaktsiooniga vedelfaasis PROTAC-ideks muuta, viies läbi kas atsüülimisreaktsioone või nukleofiilseid asendusreaktsioone E3 ligaasi linkeriga.

Efektiivse PKAc_α PROTAC-i väljatöötamiseks peab läbi viima veel mitmeid süntese, mille käigus optimeeritaks linkeri pikkust ja struktuuri. Parema ülevaate jaoks oleks vaja uurida ka teiste E3 ligaasi ligandide kasutamise mõju. Ühtlasi peaks läbi viima korduskatseid erinevate PROTAC-i kontsentratsioonide juures, et määrata sobivad parameetrid proteolüüsi suunamiseks ja selle hindamiseks.



Joonis 12. ARC-2404 graafiline struktuur. Oranž – ATP-konkurentne ligand, sinine – E3 ligaasi ligand, must – linker.

5. Kokkuvõte

Bakalaureusetöö raames kujundati ja sünteesiti proteiinkinaas A katalüütilise alaühiku (PKAc_α) proteolüüsi suunavaid ühendeid (PROTAC-ideid). Kokku sünteesiti seitse potentsiaalset PROTAC-ideid.

Kirjanduse ülevaates kirjeldati PROTAC-ide disainimise põhimõtteid, toimemehhanismi ning bioloogilisi protsesse, mida PROTAC-ideid mõjutavad. Samuti tutvustati töös kasutatavate analüüsimeetodite teoreetilist tausta.

Eksperimentaalses osas protokolliti töö raames läbi viidud sünteesid. Kuus ühendit sünteesiti tahkel kandjal, üks ühend sünteesiti täies mahus lahusefaasis. Lisaks PROTAC-ide sünteesile viidi läbi kahe talidomiidi derivaadi ning ühe ATP-konkurentse inhibiitori süntees. Sünteesitud PROTAC-ide dissotsiatsioonikonstandid (K_D) PKAc_α suhtes määrati sidumiskatsetes, kus kasutati kahte fluorestseeruvat inhibiitorit ja fluorestsentsanisotroopia mõõtmisi. Proteolüüsi suunamise määra hindamiseks viidi läbi individuaalsed rakukatsed sünteesitud ühenditega. Proteolüüsi määra hinnati PROTAC-idega töödeldud rakkudes *western blot* meetodiga, kus mõõdeti rakulüsaadis oleva kinaasi kogust spetsiifilise antikehaga. Rakukatsetes kasutati PC3 ja HeLa rakuliine.

Sünteesitud PROTAC-ide afiinsus PKA suhtes varieerus tugevalt. Oligoarginiini ahelaga ühendite afiinsus oli mitu suurusjärku kõrgem võrreldes teiste ühendite afiinsustega: bisubstraatsete PROTAC-ide afiinsus PKA suhtes oli vastavalt 0,1 ja 7 nM. Oligoarginiini ahelata PROTAC-ide afiinsused jäid vahemikku 0,6-8,9 μM. PROTAC-ide omadused esinesid ühel ainel seitsmest. ARC-2404 (AMTH-Ahx-dLys(5-talidomiid)-NH₂) dissotsiatsioonikonstant PKAc_α suhtes oli alla mikromolaarse (K_D = 0,6±0,04 μM) ja see degradeeris läbi viidud rakukatsetes 16±9% rakus olevast PKAc_α kogusest. PROTAC-ide omaduste suurendamiseks pakuti sünteesitud ühendite põhjal välja erinevaid võimalusi PKAc_α degradeerimise edendamiseks, ühtlasi toodi soovitusi uute PROTAC-ide sünteesimise optimeerimiseks.

Abstract

The aim of this work was to design and synthesise proteolysis targeting compounds (PROTACs) for the catalytic subunit of protein kinase A (PKA c_α). A total of seven potential PROTACs were synthesised.

In the theoretical part of this work, the principles of PROTAC design, the mechanism of action and the biological processes affected by PROTACs were described. Additionally, the theoretical background of the analytical methods used in the work was presented.

In the experimental section, the protocols for the synthesis of PROTACs developed in this work were reported. Six compounds were synthesised by using solid phase peptide synthesis (SPPS), one compound was fully synthesised in the liquid phase. In addition to the synthesis of PROTACs, the syntheses of two thalidomide derivatives and one ATP-competitive inhibitor were carried out. The dissociation constants (K_D) of the synthesised PROTACs towards PKA c_α were determined in binding assays using two fluorescent inhibitors and fluorescence anisotropy measurements. Individual cell assays with the synthesised compounds were performed to assess the degree of proteolysis in the targeted protein. The extent of proteolysis was assessed in PROTAC-treated cells via western blot analysis, in which the amount of kinase present in the cell lysate was quantified with a kinase specific antibody. PC3 and HeLa cell lines were used in the experiments.

The affinity of the synthesised PROTACs for PKA varied widely. The affinities of the oligoarginine-chain containing compounds were several orders of magnitude higher compared to the affinities of the other compounds, ranging between 0,1 and 7 nM. The affinities of the PROTACs without the oligoarginine-chain ranged from 0.6 to 8.9 μ M. Some PROTAC properties were present in one out of the seven compounds. ARC-2404 (AMTH-Ahx-dLys(5-thalidomide)-NH₂) had a sub micromolar affinity towards PKA c_α ($K_D = 0,6\pm 0,04 \mu$ M) and degraded 16 \pm 9% of the cellular PKA c_α in the performed cell assays. To enhance the properties of PROTACs, different ways to improve the structure and synthesis methods were recommended based on the synthesised compounds.

Kirjanduse loetelu

1. K.M. Sakamoto, K.B. Kim, A. Kumagai, F. Mercurio, C.M. Crews, R.J. Deshaies, Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 8554–8559.
2. Arvinas Androgen Receptor, Inc., A Phase 1/2, Open-label, Dose Escalation, and Cohort Expansion Clinical Trial to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of ARV-110 in Patients With Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer, clinicaltrials.gov, 2024.
3. Arvinas Estrogen Receptor, Inc., A Phase 1/2, Open Label, Dose Escalation, and Cohort Expansion Clinical Trial to Evaluate the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of ARV-471 Alone and in Combination With Palbociclib (IBRANCE®) in Patients With Estrogen Receptor Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Negative (ER+/HER2-) Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer, Who Have Received Prior Hormonal Therapy and Chemotherapy in the Locally Advanced/Metastatic Setting, clinicaltrials.gov, 2024.
4. R.E. Turnham, J.D. Scott, Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; history, function and physiology, *Gene*. 577 (2016) 101–108.
5. A. Ciechanover, A.L. Schwartz, The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 2727–2730.
6. C. Davis, B.L. Spaller, A. Matouschek, Mechanisms of substrate recognition by the 26S proteasome, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 67 (2021) 161–169.
7. T. Zou, Z. Lin, The Involvement of Ubiquitination Machinery in Cell Cycle Regulation and Cancer Progression, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 5754.
8. L. Castelo-Soccio, H. Kim, M. Gadina, P.L. Schwartzberg, A. Laurence, J.J. O’Shea, Protein kinases: drug targets for immunological disorders, *Nat. Rev. Immunol.* 23 (2023) 787–806.
9. J.V. Olsen, B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, M. Mann, Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks, *Cell*. 127 (2006) 635–648.
10. C. Arter, L. Trask, S. Ward, S. Yeoh, R. Bayliss, Structural features of the protein kinase domain and targeted binding by small-molecule inhibitors, *J. Biol. Chem.* 298 (2022) 102247.

11. H. Zhang, X. Cao, M. Tang, G. Zhong, Y. Si, H. Li, F. Zhu, Q. Liao, L. Li, J. Zhao, J. Feng, S. Li, C. Wang, M. Kaulich, F. Wang, L. Chen, L. Li, Z. Xia, T. Liang, H. Lu, X.-H. Feng, B. Zhao, A subcellular map of the human kinome, *eLife*. 10 (2021) e64943.
12. G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The Protein Kinase Complement of the Human Genome, *Science*. 298 (2002) 1912–1934.
13. K.C. Duong-Ly, J.R. Peterson, The Human Kinome and Kinase Inhibition as a therapeutic strategy, *Curr. Protoc. Pharmacol.* Editor. Board SJ Enna Ed.--Chief Al. 0 2 (2013) Unit2.9.
14. K. Riegel, P. Vijayarangakannan, P. Kechagioglou, K. Bogucka, K. Rajalingam, Recent advances in targeting protein kinases and pseudokinases in cancer biology, *Front. Cell Dev. Biol.* 10 (2022) 942500.
15. L. Sapio, F. Di Maiolo, M. Illiano, A. Esposito, E. Chiosi, A. Spina, S. Naviglio, Targeting protein kinase A in cancer therapy: an update, *EXCLI J.* 13 (2014) 843–855.
16. John L. Tymoczko, Jeremy M. Berg, Lubert Stryker, *Biochemistry: A Short Course*, 2nd Edition, 2nd ed., W.H. Freeman and Company, New York, n.d.
17. R. Roskoski, Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2025 update, *Pharmacol. Res.* 216 (2025) 107723.
18. M. Békés, D.R. Langley, C.M. Crews, PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue, *Nat. Rev. Drug Discov.* 21 (2022) 181–200.
19. S. Silnitsky, S.J.S. Rubin, M. Zerihun, N. Qvit, An Update on Protein Kinases as Therapeutic Targets—Part I: Protein Kinase C Activation and Its Role in Cancer and Cardiovascular Diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 17600.
20. M.K. Whittaker, G.N. Bendzunas, M. Shirani, T.J. LeClair, B. Shebl, T.C. Dill, P. Coffino, S.M. Simon, E.J. Kennedy, Targeted Degradation of Protein Kinase A via a Stapled Peptide PROTAC, *ACS Chem. Biol.* 19 (2024) 1888–1895.
21. Z. Liu, M. Hu, Y. Yang, C. Du, H. Zhou, C. Liu, Y. Chen, L. Fan, H. Ma, Y. Gong, Y. Xie, An overview of PROTACs: a promising drug discovery paradigm, *Mol. Biomed.* 3 (2022) 46.
22. R.I. Troup, C. Fallan, M.G.J. Baud, Current strategies for the design of PROTAC linkers: a critical review, *Explor. Target. Anti-Tumor Ther.* 1 (2020) 273–312.
23. K.I. Nakayama, K. Nakayama, Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 6 (2006) 369–381.

24. C. E. Powell, G. Du, J. W. Bushman, Z. He, T. Zhang, E. S. Fischer, N. S. Gray, Selective degradation-inducing probes for studying cereblon (CRBN) biology, *RSC Med. Chem.* 12 (2021) 1381–1390.
25. Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, n.d.
26. T. Mahmood, P.-C. Yang, *Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting*, *North Am. J. Med. Sci.* 4 (2012) 429–434.
27. A. Ricouart, J.C. Gesquiere, A. Tartar, C. Sergheraert, Design of potent protein kinases inhibitors using the bisubstrate approach, *J. Med. Chem.* 34 (1991) 73–78.
28. 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, *Anal. Biochem.* 385 (2009) 85–93.

Infoleht

cAMP sõltuvad proteiinkinaasi proteolüüsi suunavate kimäärühendite süntees ja omaduste iseloomustamine

Bakalaureusetöö raames arendati PKAc_α proteolüüsi suunavat ühendit (PROTAC). Töö raames sünteesiti seitse PROTAC-i kandidaati, mille sobivust hinnati fluorestsentsanisotroopia ja *western blot* meetodiga vastavalt PROTAC-i ja PKAc_α vahelise afiinsuse määramiseks ja proteolüüsi määra hindamiseks. Töö käigus sünteesitud ühenditest omas PROTAC-i omadusi üks ühenditest, mis degradeeris läbi viidud rakukatsetes 16±9% rakus olevast PKAc_α-st.

Märksõnad: PROTAC, proteiinkinaas A (PKA), proteolüüsi suunamine, tahkefaasi süntees, bifunktsionaalsed molekulid, fluorestsentsanisotroopia, *western blot*, proteolüüs, ubikvitiin-proteasoomi rada, proteiinkinaasi inhibiitorid

CERCS koodid: P310: Proteiinid, ensümolooogia, B740: Farmakoloogia, farmakognoosia, farmaatsia, toksikoloogia

Synthesis and characterization of chimeric compounds targeting cAMP-dependent protein kinase proteolysis

In this work, a proteolysis targeting chimeric compound (PROTAC) was developed. During the work, seven PROTAC candidates were synthesised. The suitability of the compounds was determined using fluorescence anisotropy and western blot methods to assess the affinity and degree of proteolysis of the synthesised compounds towards PKAc_α. Out of the seven candidates, one the synthesised compounds showed potential as a PROTAC, degrading 16 ± 9% of the PKAc_α in treated cells.

Keywords: PROTAC, Protein Kinase A (PKA), targeted protein degradation, solid-phase synthesis, heterobifunctional molecules, fluorescence anisotropy, western blot, protein degradation, ubiquitin-proteasome system, kinase inhibitors

CERCS codes: P310: Proteins, enzymology, B740: Pharmacology, pharmacognosy, pharmacy, toxicology

Lisad

Lisa 1. Puhastatud ARC-2400 HPLC kromatogramm ja massispekter

Lisa 2. Puhastatud ARC-2403 HPLC kromatogramm ja massispekter

Lisa 3. Puhastatud ARC-2404 HPLC kromatogramm ja massispekter

Lisa 4. Puhastatud ARC-2405 HPLC kromatogramm ja massispekter

Lisa 5. Puhastatud ARC-2406 HPLC kromatogramm ja massispekter

Lisa 6. Puhastatud ARC-2407 HPLC kromatogramm ja massispekter

Lisa 7. Puhastatud ARC-2408 HPLC kromatogramm ja massispekter

Lisa 8. ARC-668 graafiline struktuur

Lisa 9. ARC-1102 graafiline struktuur

Lisa 10. ARC-1408 graafiline struktuur

Lisa 11. Sünteesitud ARC-ide struktuurid (mitmel lehel)

Lisa 12. Sünteesitud H9 inhibiitori ^1H NMR spekter (CDCl_3)

Lisa 13. Sünteesitud talidomiid-5'-(l)-proliini ^1H NMR spekter (CDCl_3)

Lisa 14. Sünteesitud talidomiid-5'-piperidiinkarboksüülhappe ^1H NMR spekter (CDCl_3)

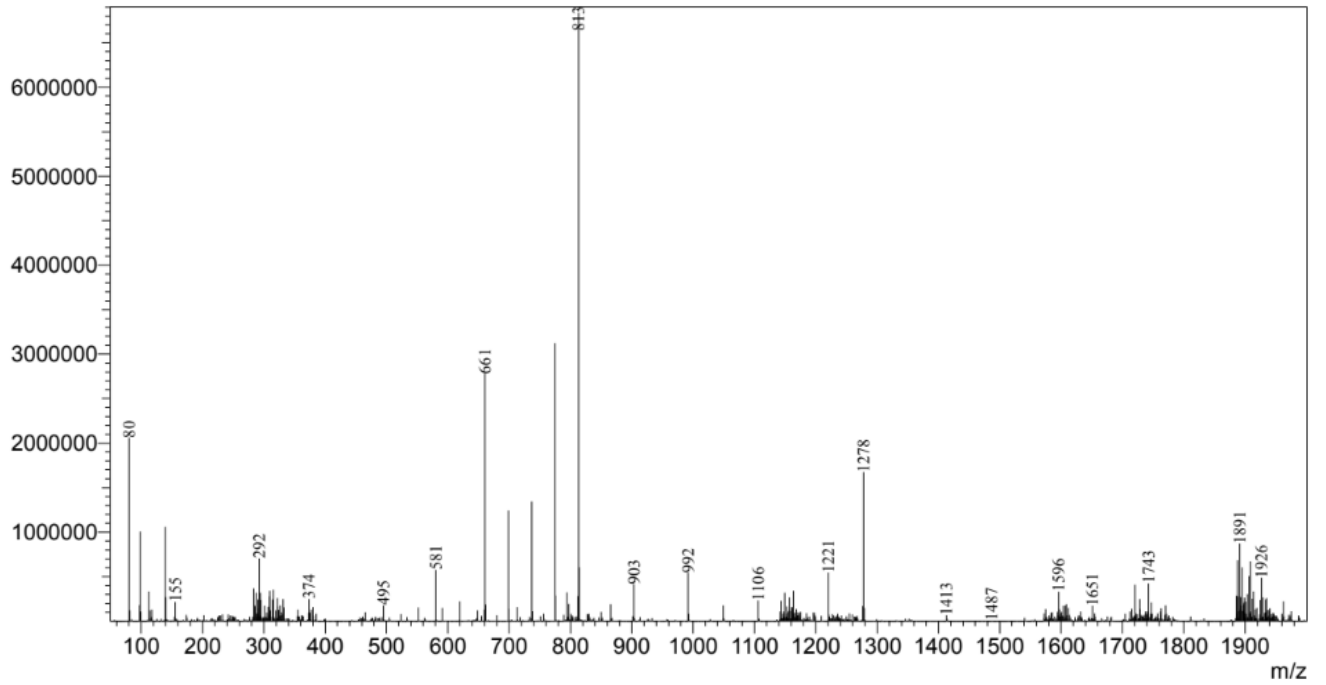
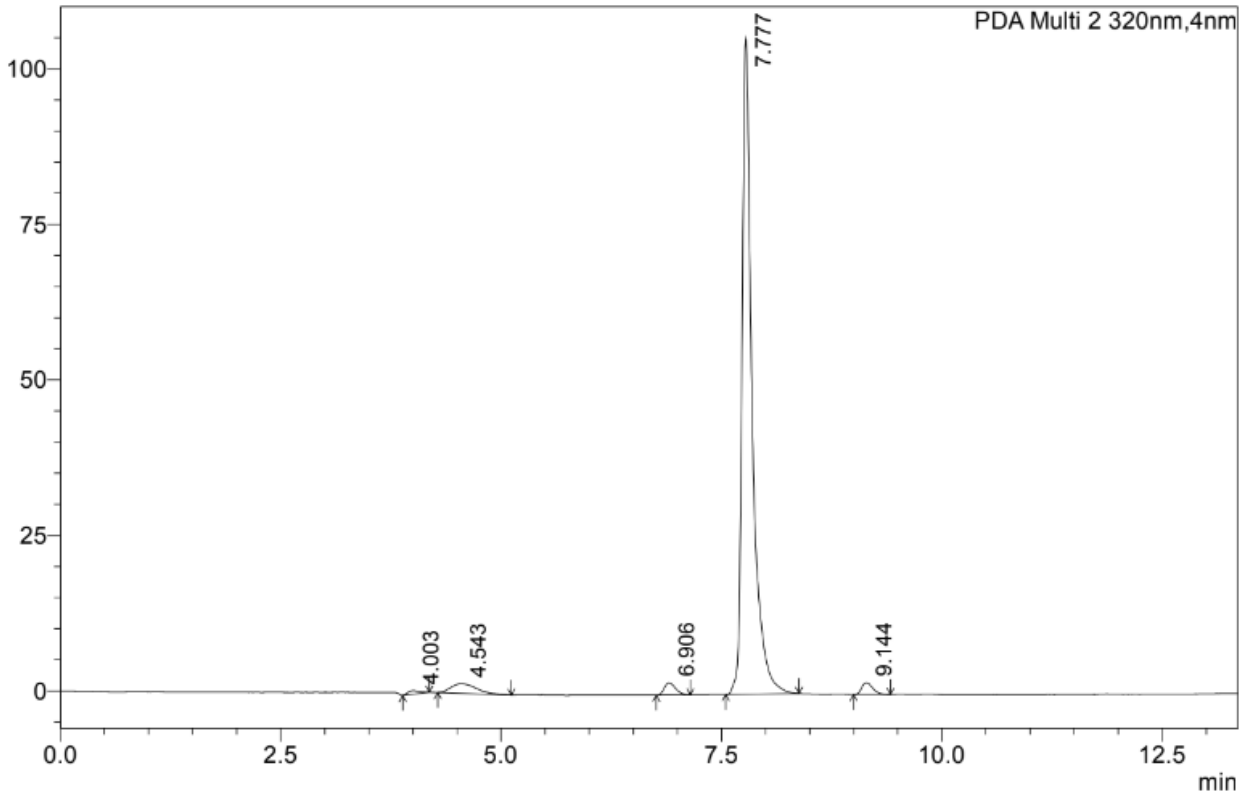
Lisa 15. 5-fluorotalidomiidi ^1H NMR spekter (CDCl_3)

Lisa 16. Rakukatsete *western blot*-i vöötide pindalad (mitmel lehel)

Lisa 17. Suurendatud pildid *western blot*-i vöötidest

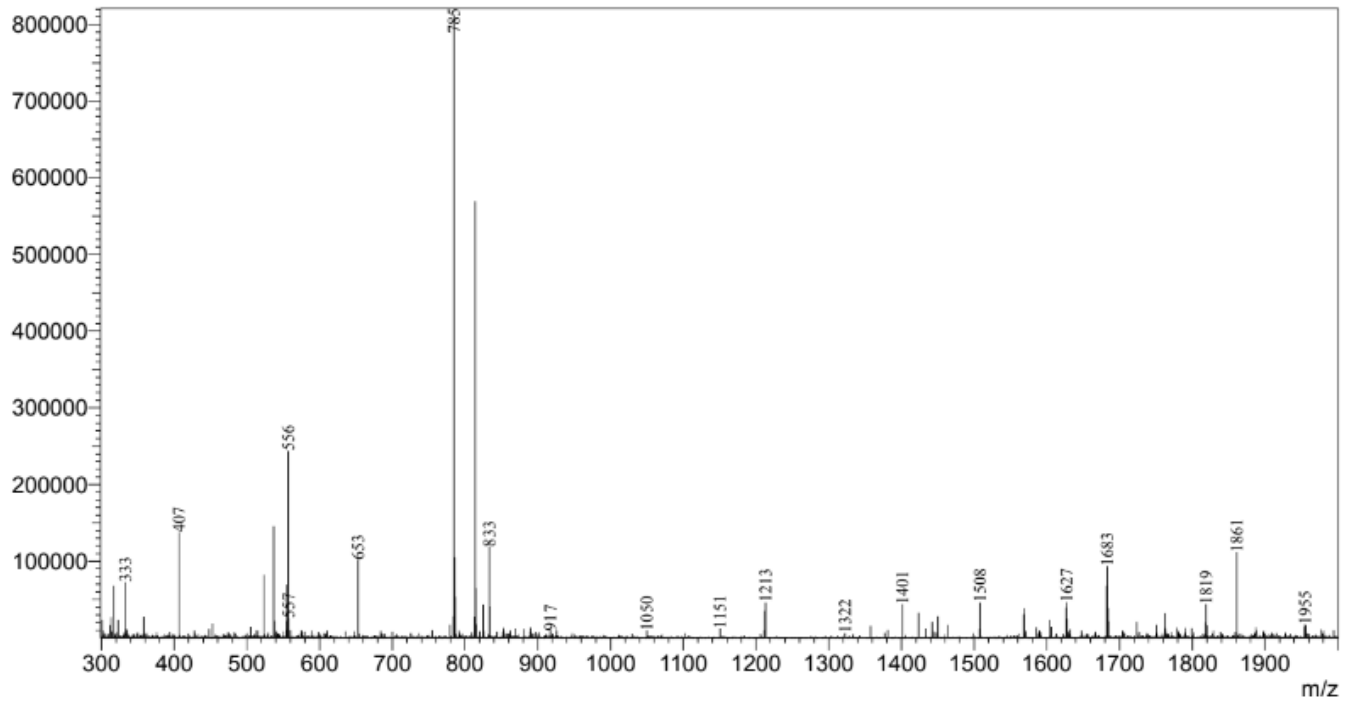
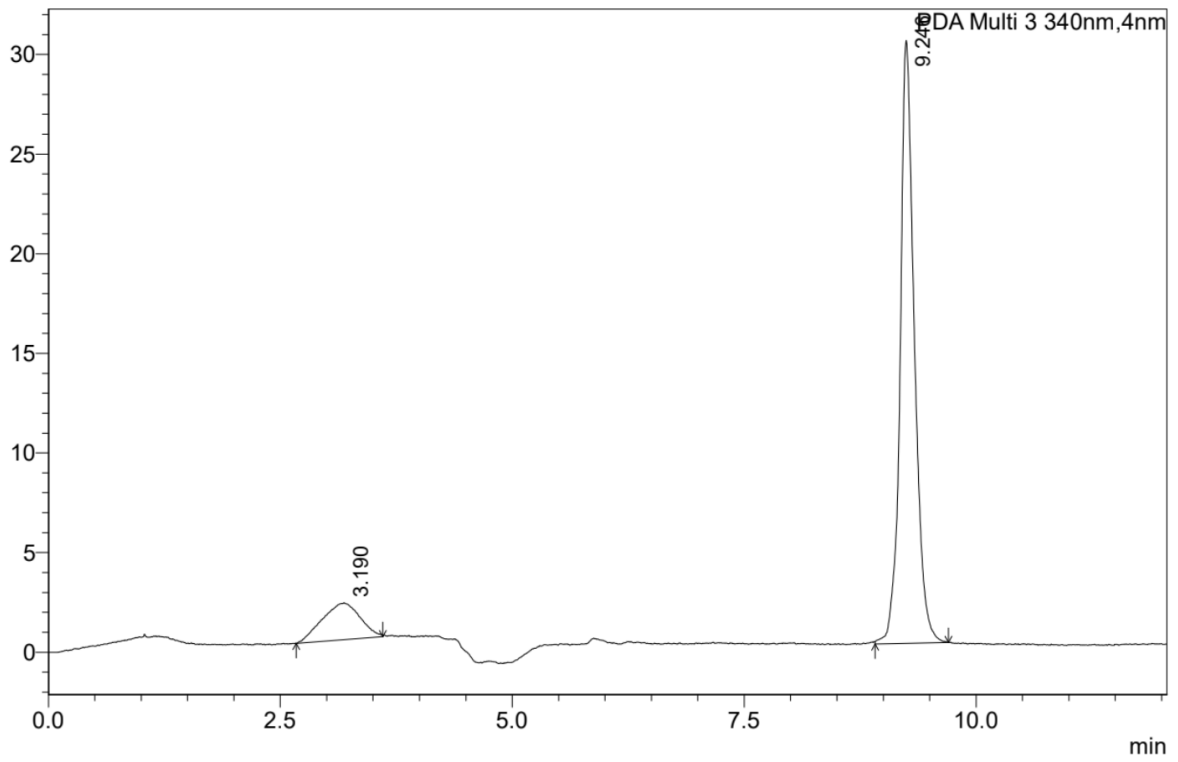
Lisa 1. Puhastatud ARC-2400 HPLC kromatogramm ja massispekter

mAU



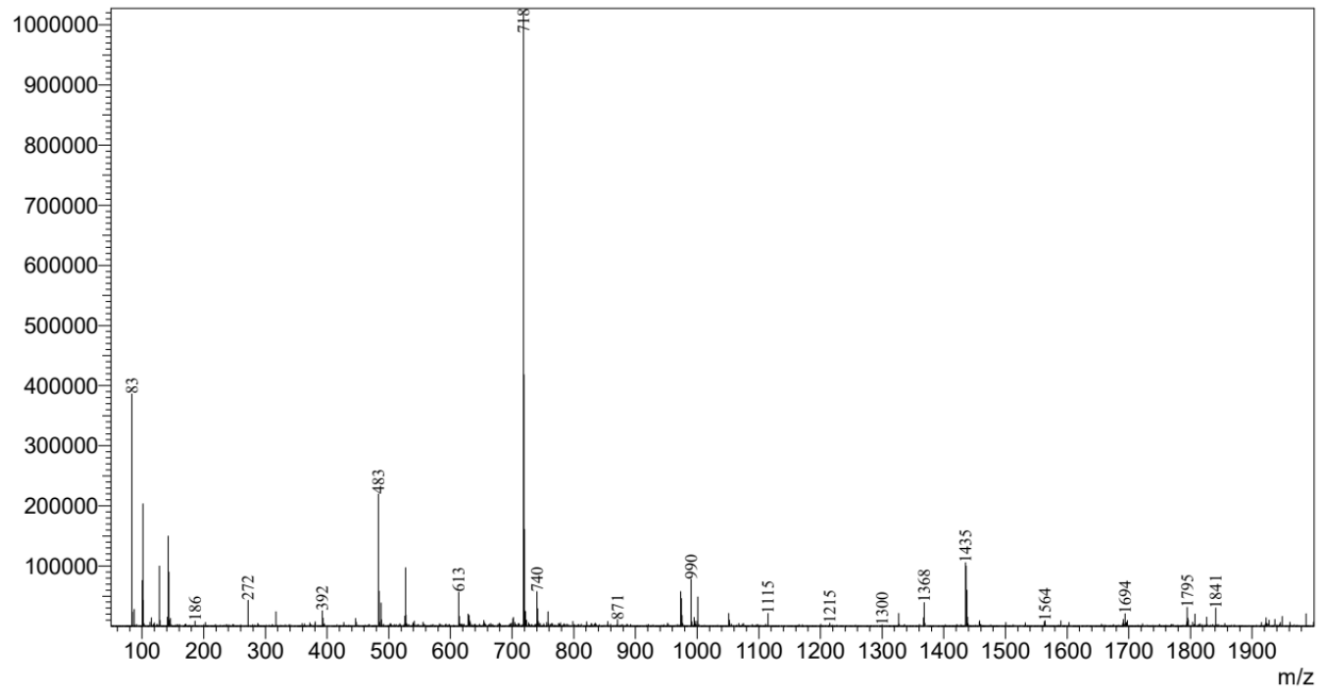
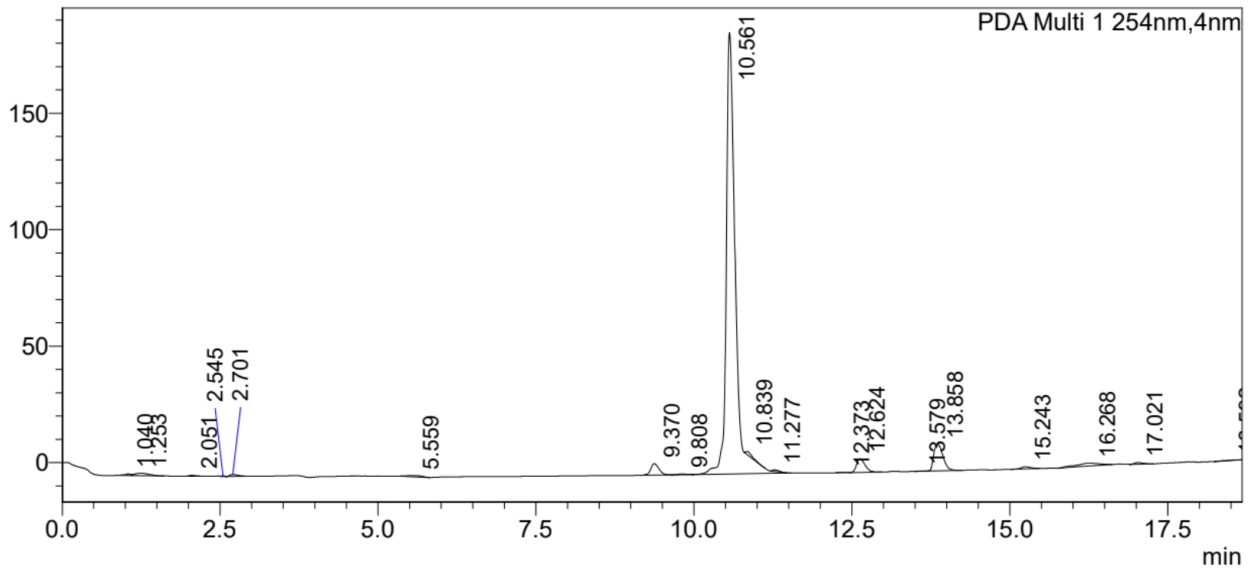
Lisa 2. Puhastatud ARC-2403 HPLC kromatogramm ja massispekter

mAU



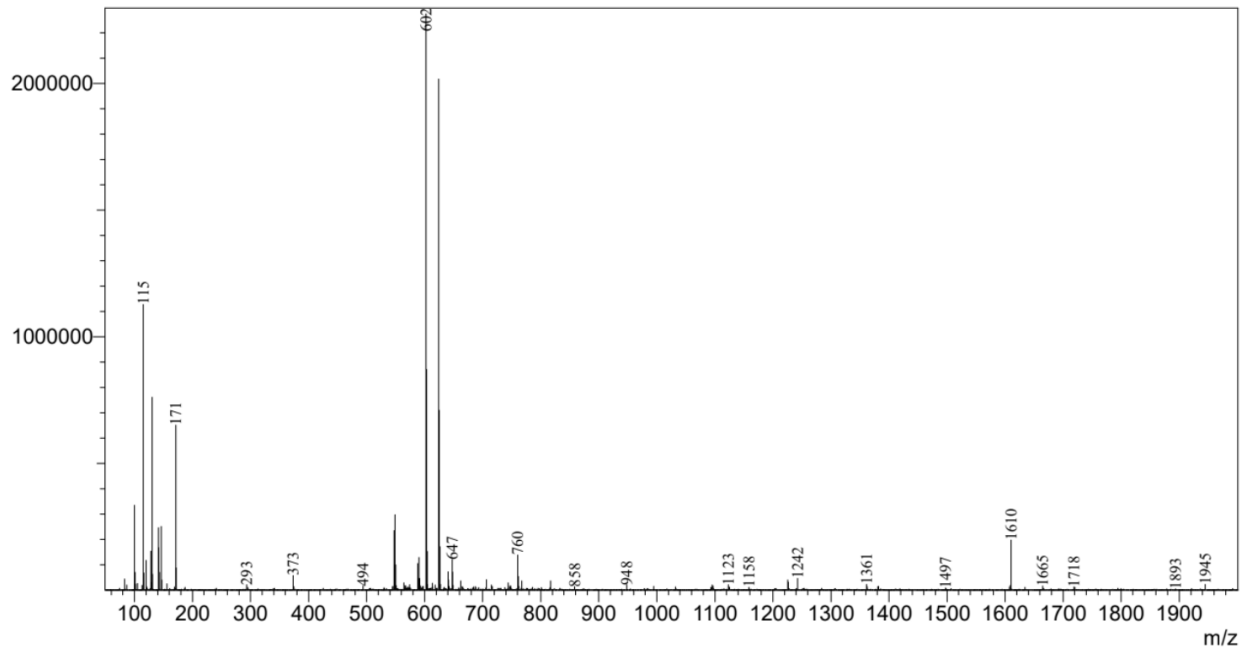
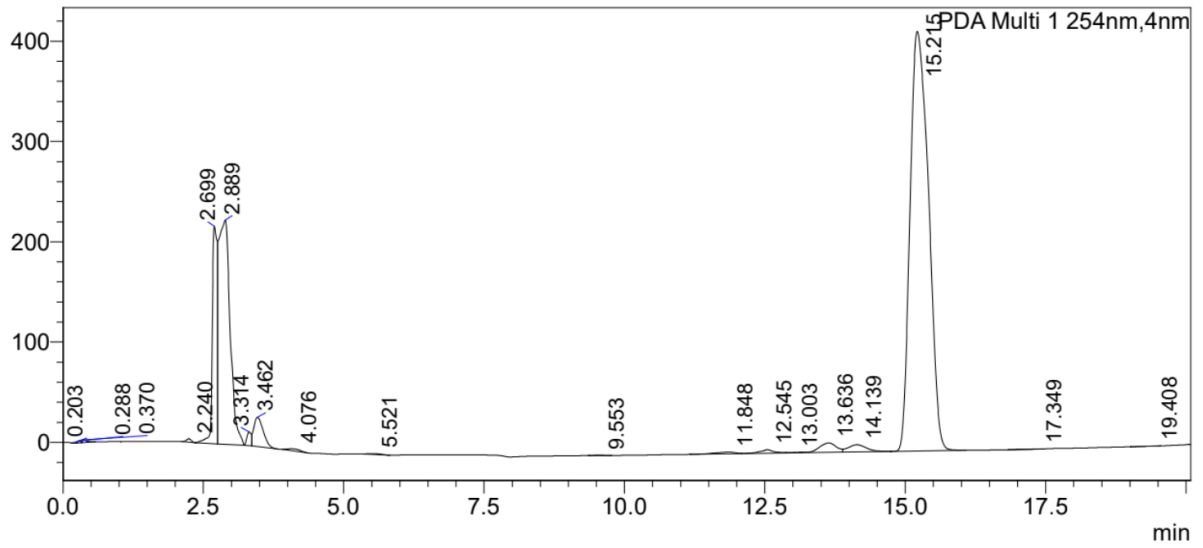
Lisa 3. Puhastatud ARC-2404 HPLC kromatogramm ja massispekter

mAU



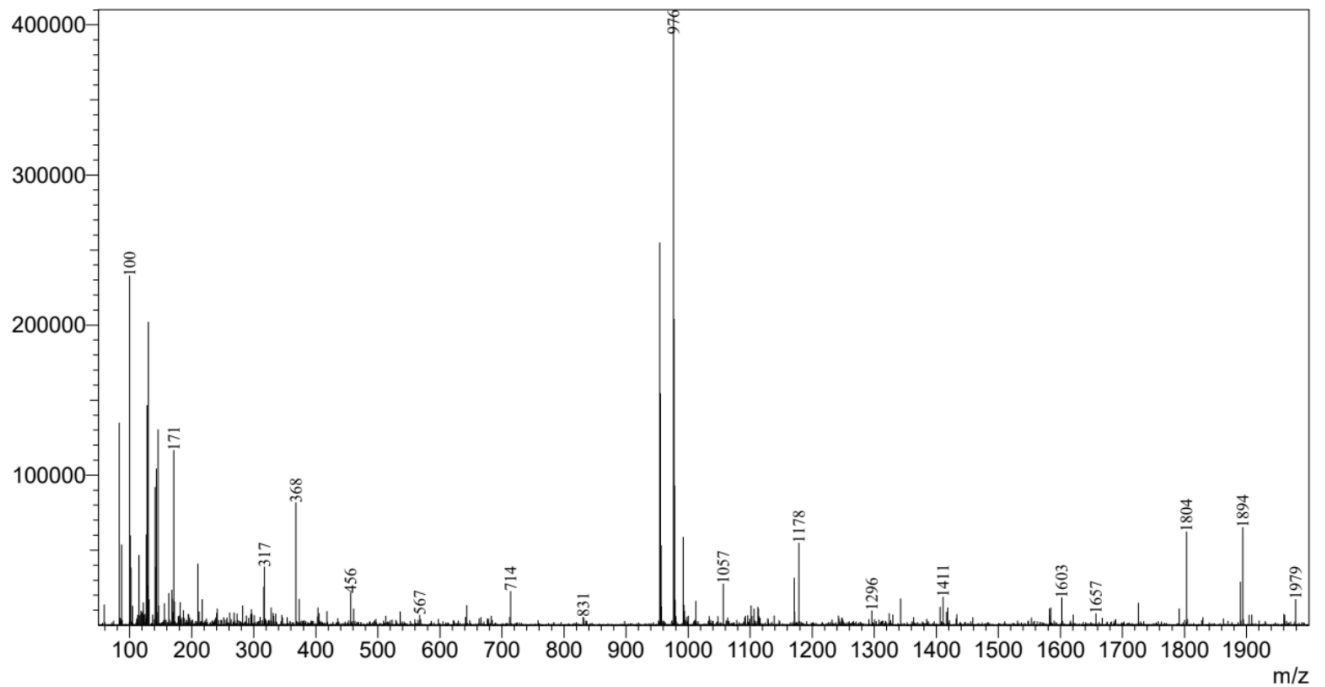
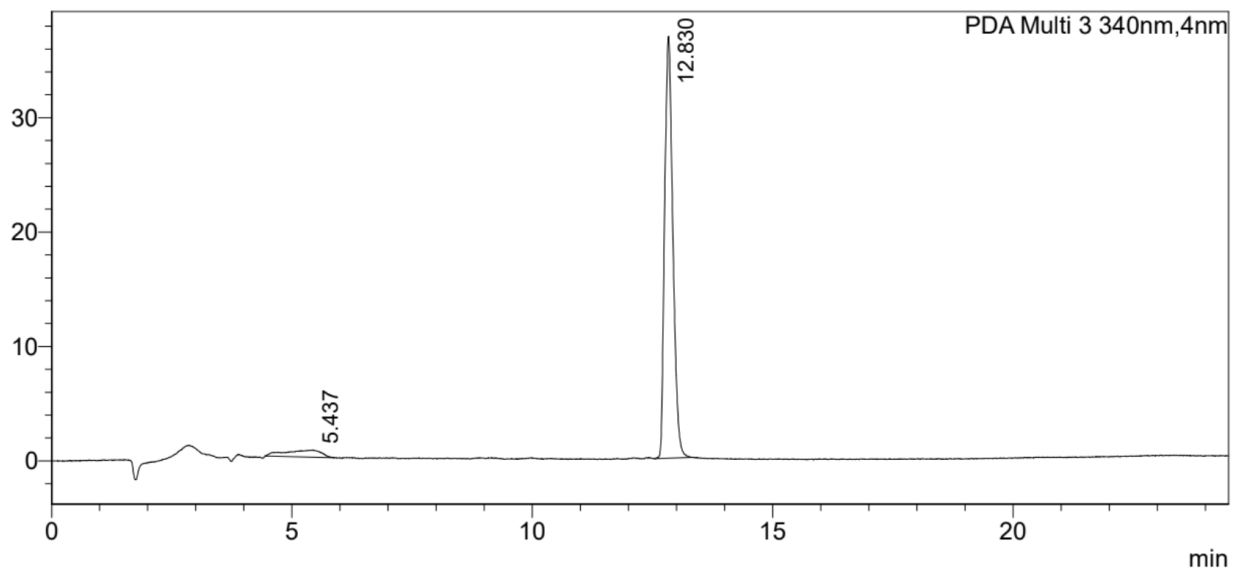
Lisa 4. Puhastatud ARC-2405 HPLC kromatogramm ja massispekter

mAU



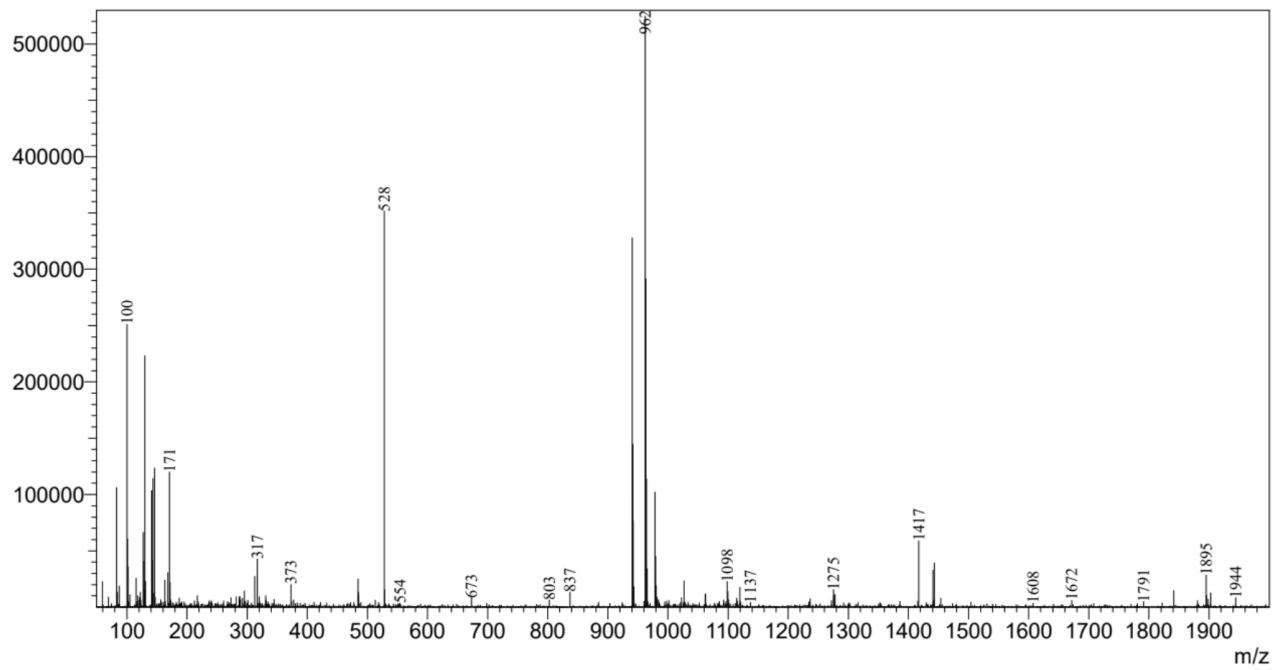
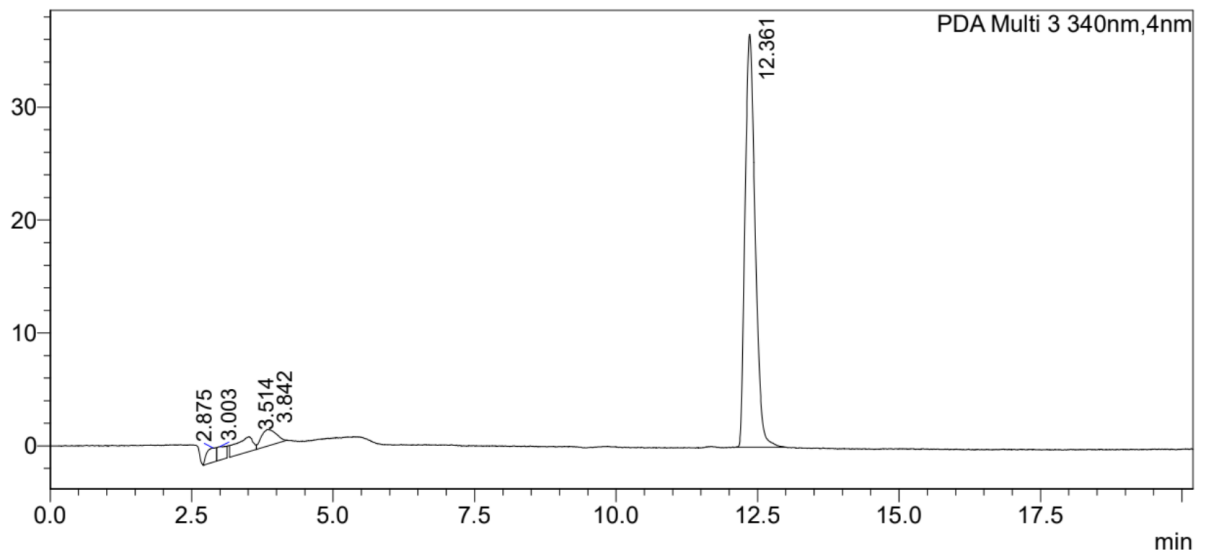
Lisa 5. Puhastatud ARC-2406 HPLC kromatogramm ja massispekter

mAU



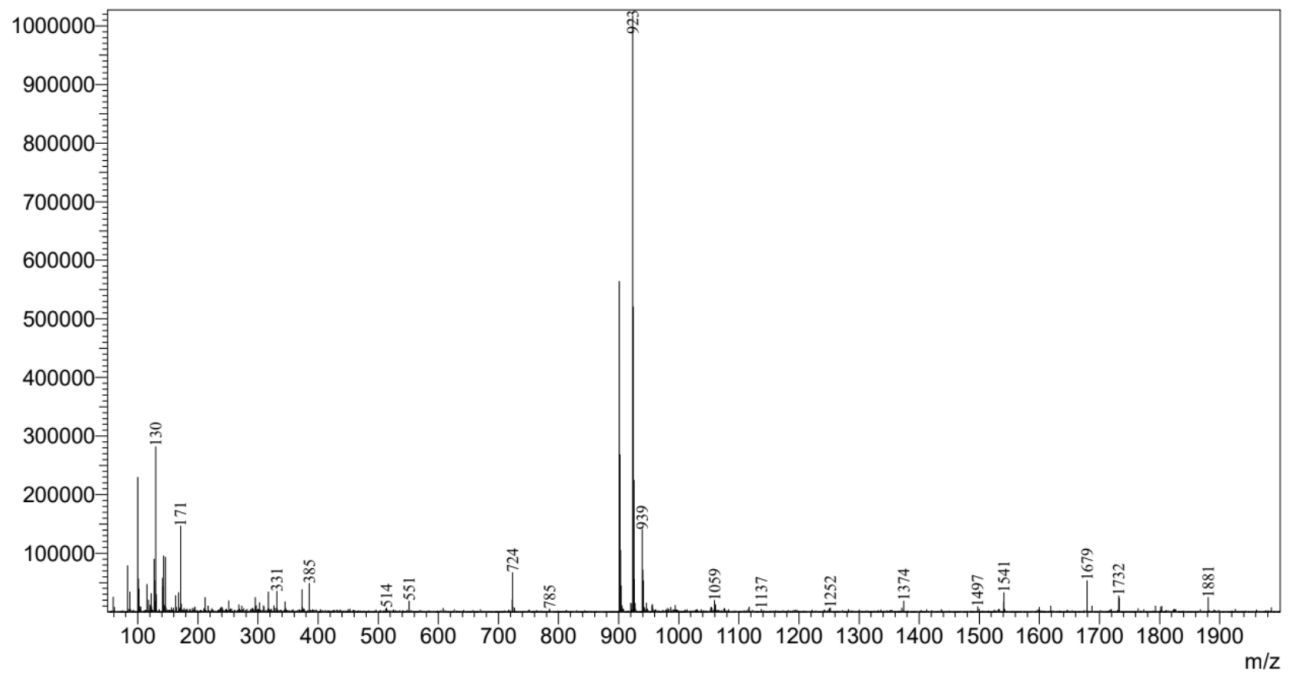
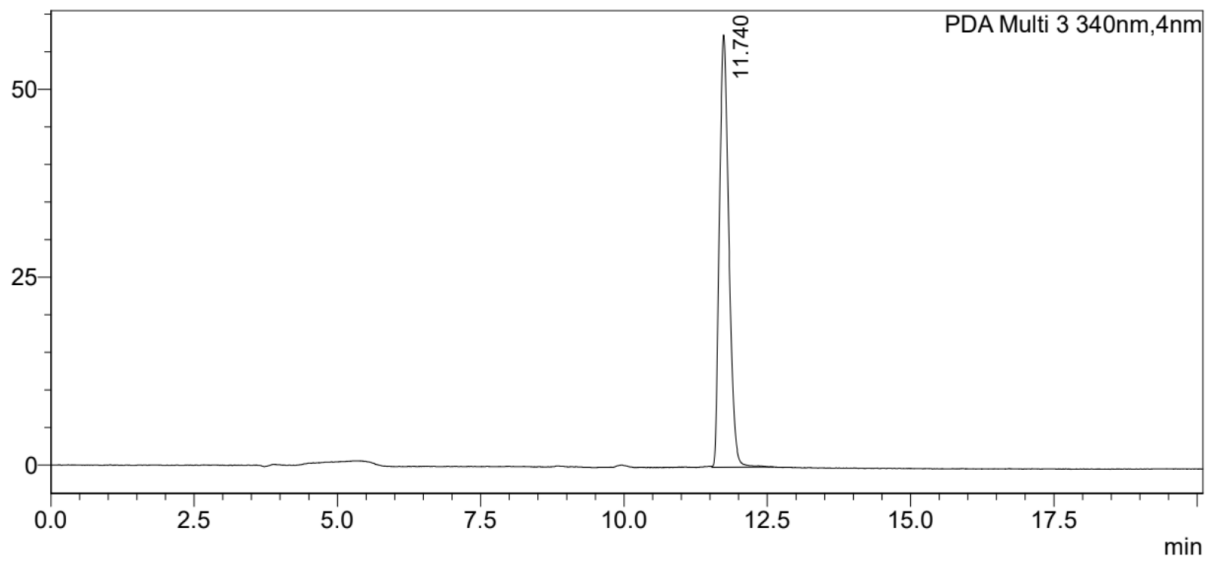
Lisa 6. Puhastatud ARC-2407 HPLC kromatogramm ja massispekter

mAU

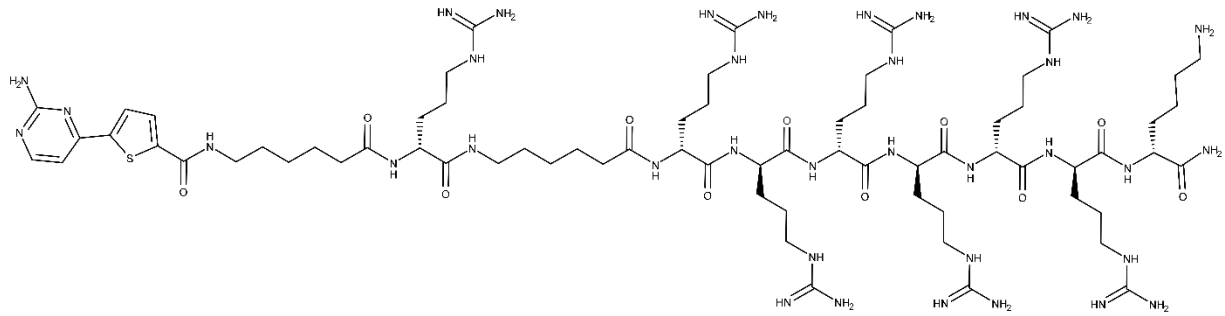


Lisa 7. Puhastatud ARC-2408 HPLC kromatogramm ja massispekter

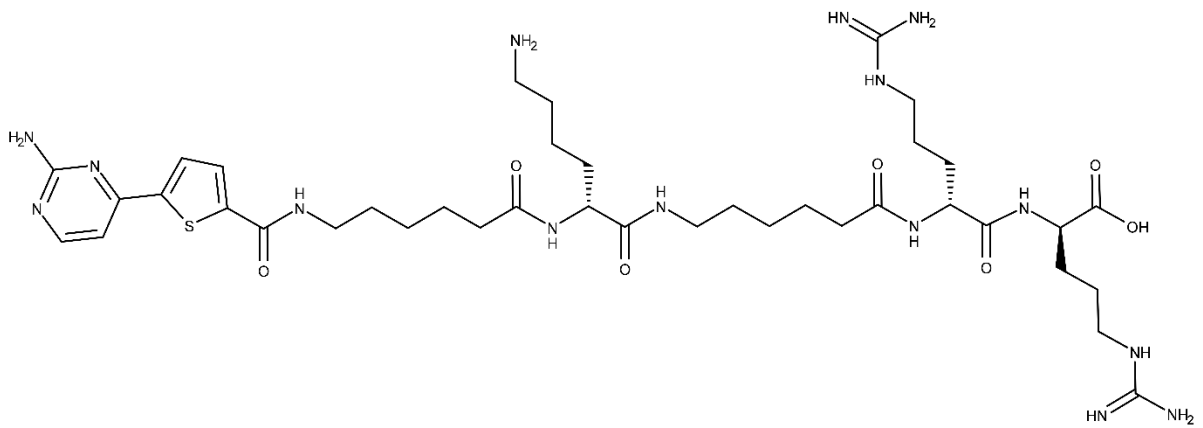
mAU



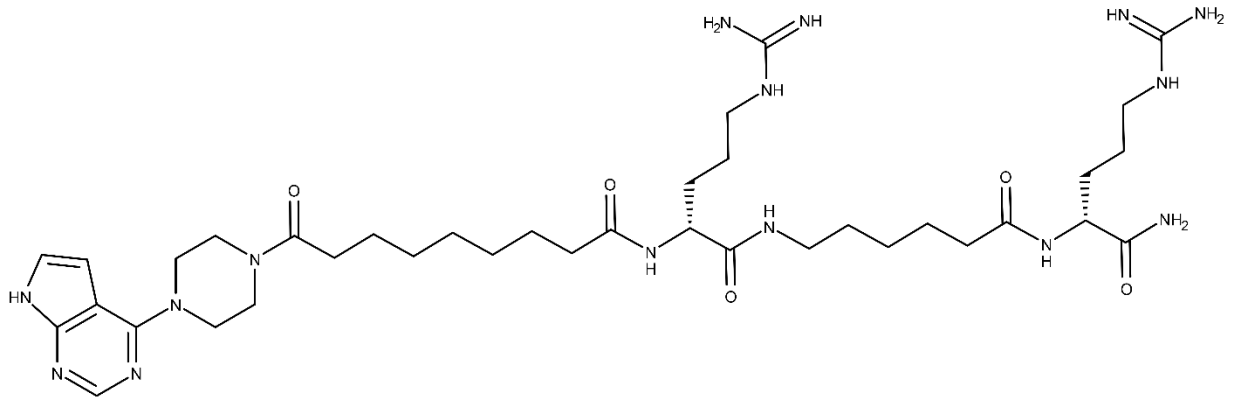
Lisa 8. ARC-668 graafiline struktuur



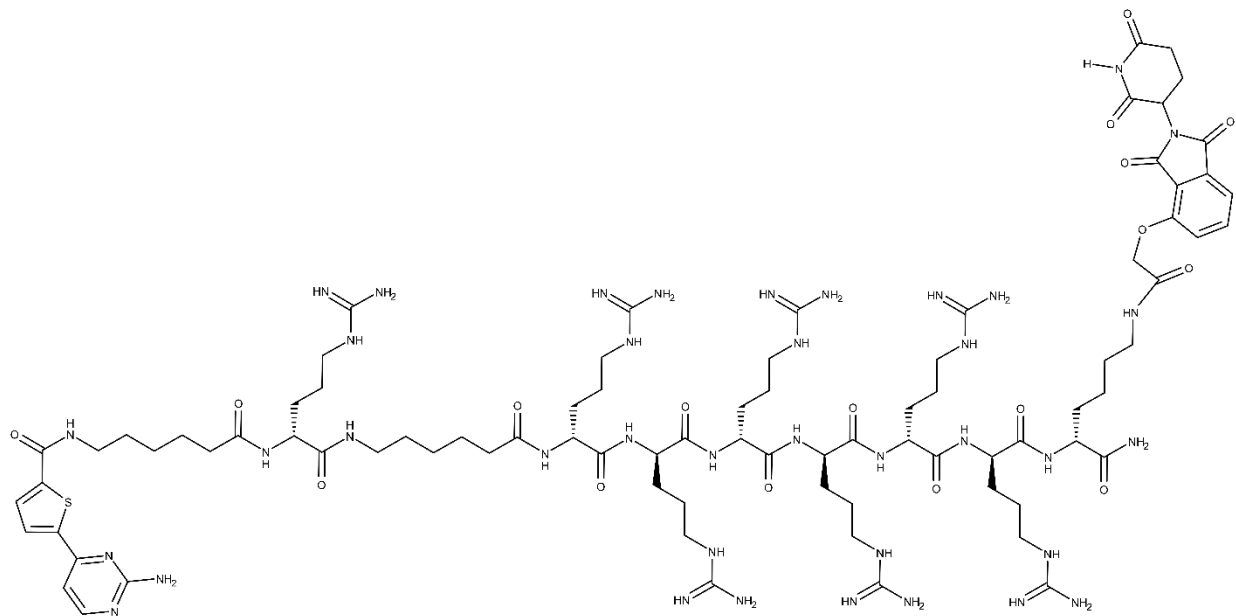
Lisa 9. ARC-1102 graafiline struktuur



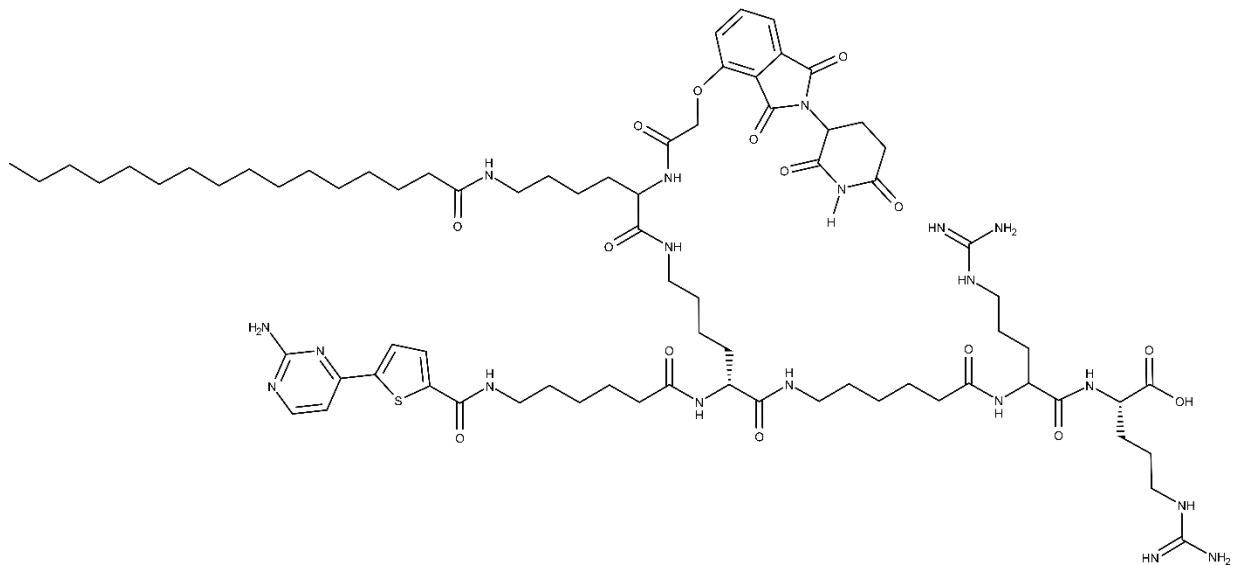
Lisa 10. ARC-1408 graafiline struktuur



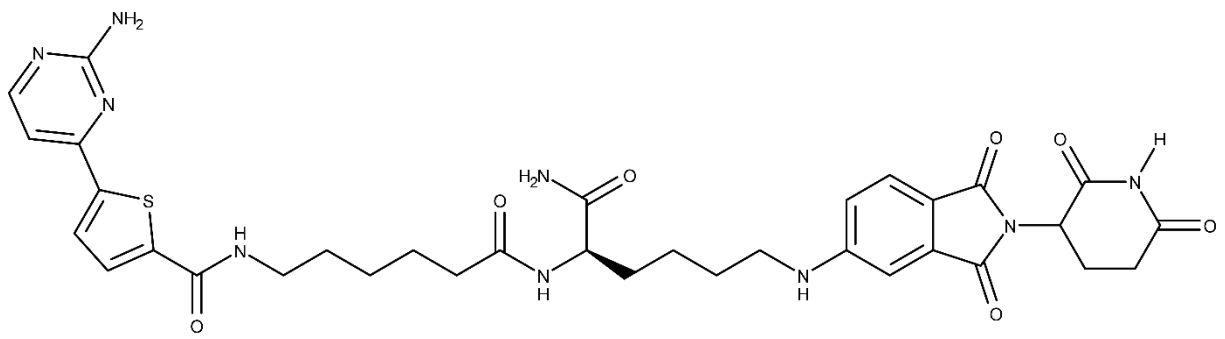
Lisa 11. Sünteesitud ARC-ide struktuurid (mitmel lehel)



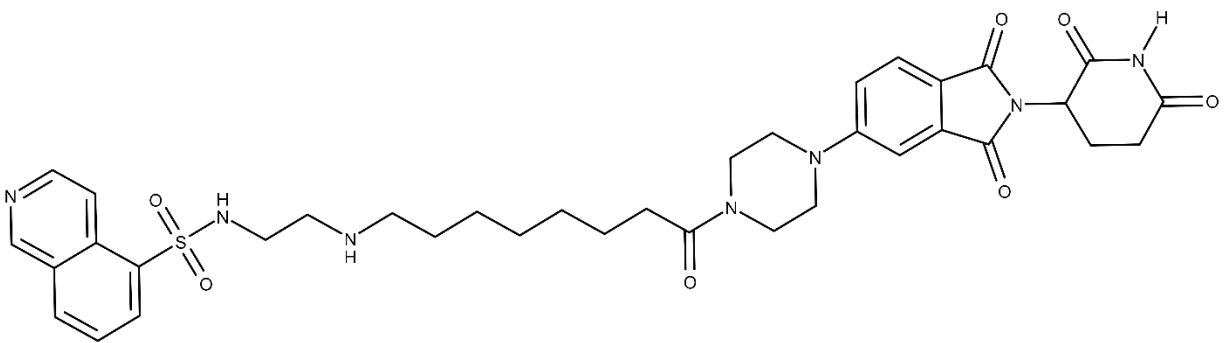
Lisa 11 a. ARC-2400 graafiline struktuur



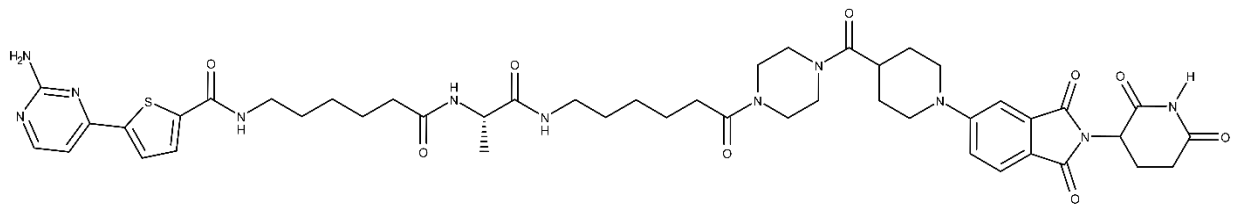
Lisa 11 b. ARC-2403 graafiline struktuur



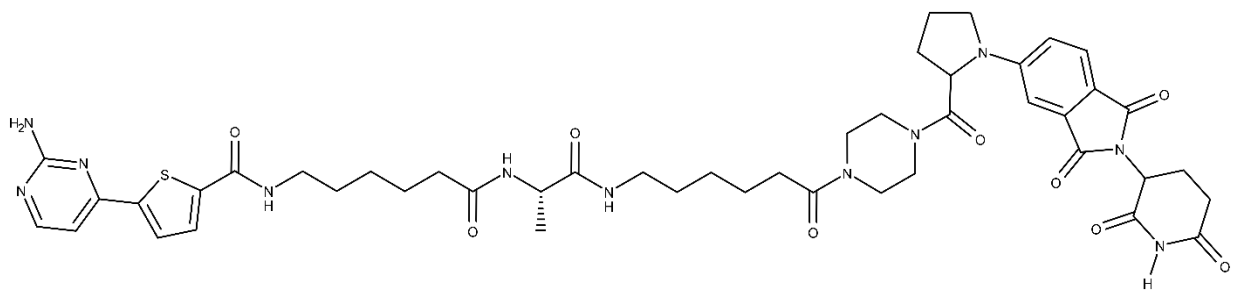
Lisa 11 c. ARC-2404 graafiline structuur



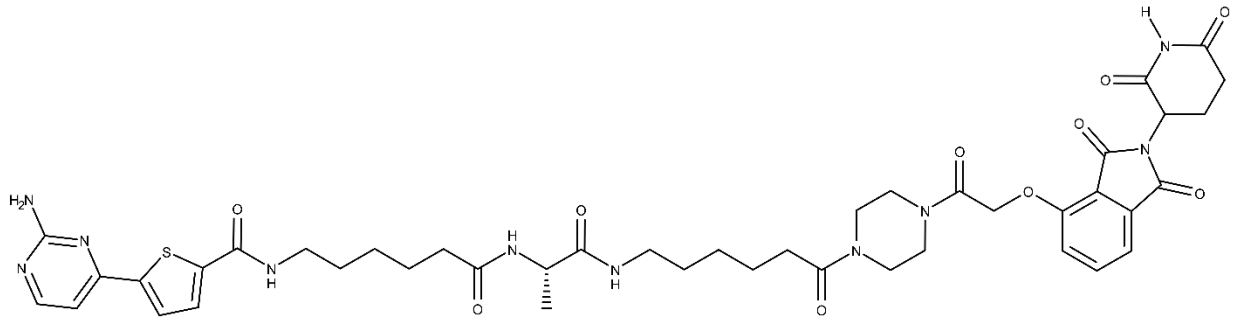
Lisa 11 d. ARC-2405 graafiline structuur



Lisa 11 e. ARC-2406 graafiline structuur

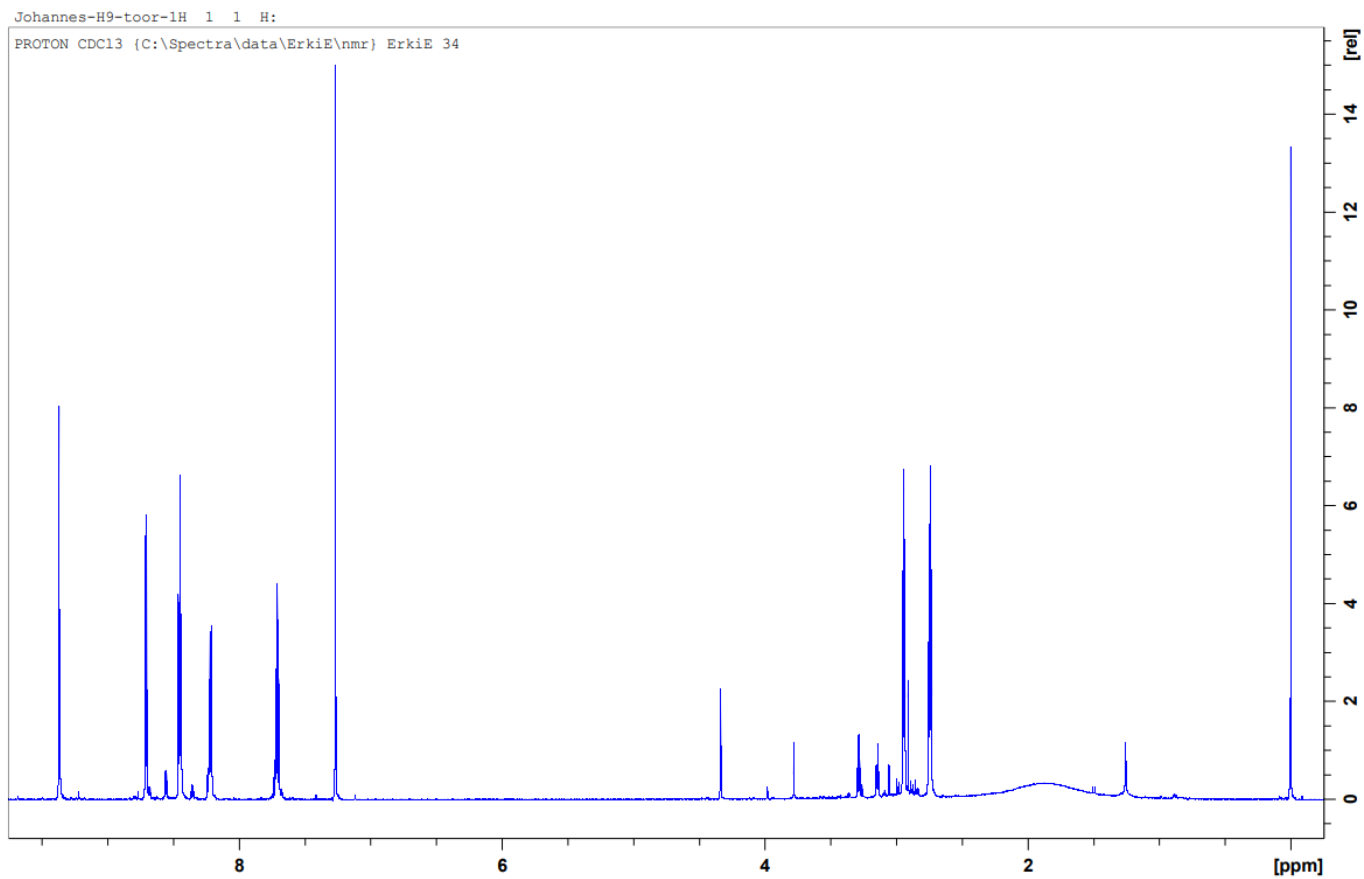


Lisa 11 f. ARC-2407 graafiline structuur

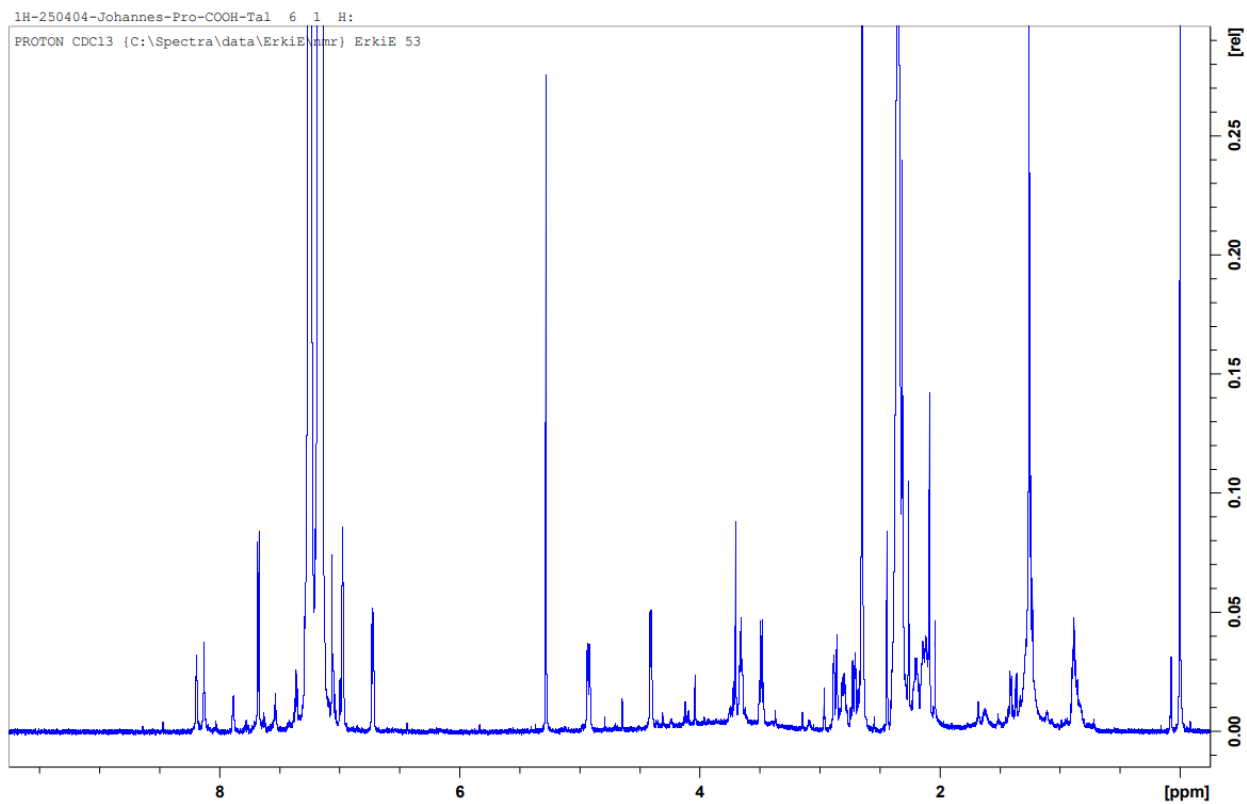


Lisa 11 g. ARC-2408 graafiline structuur

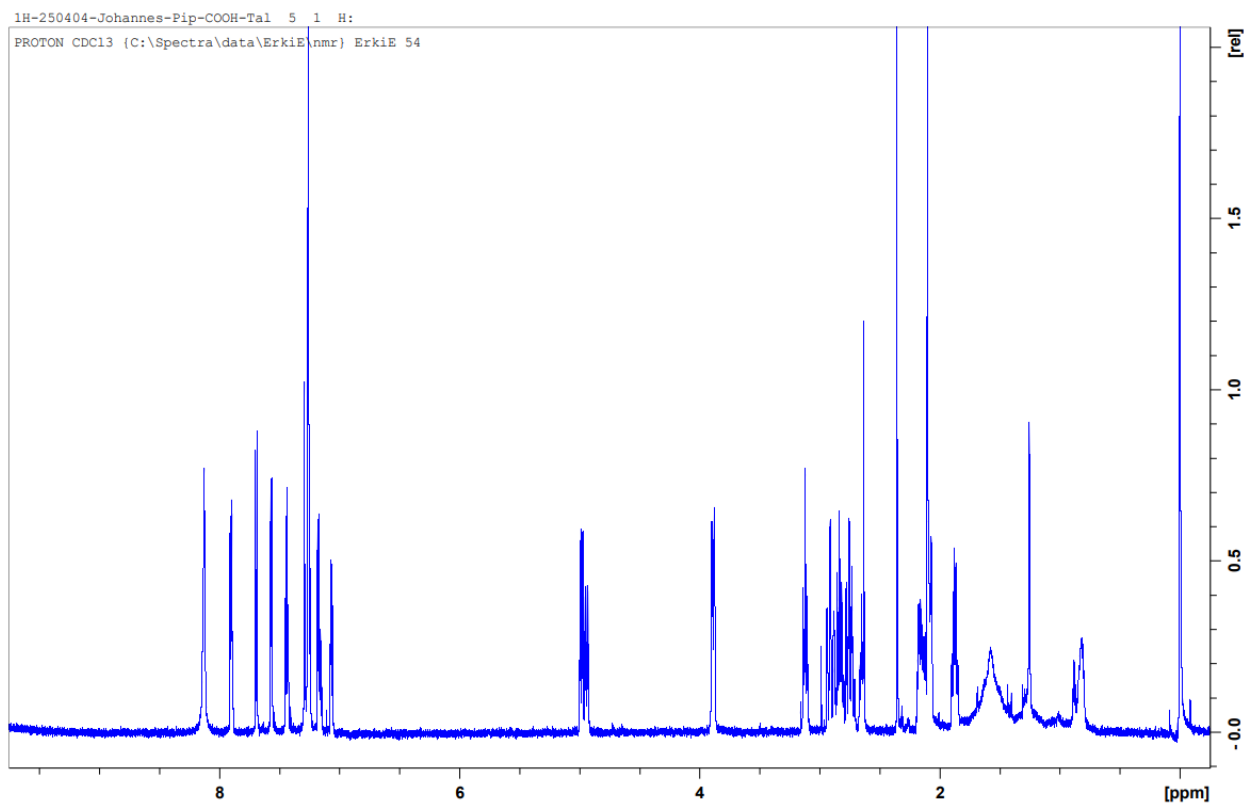
Lisa 12. Sünteesitud H9 inhibiitori ^1H NMR spekter (CDCl_3)



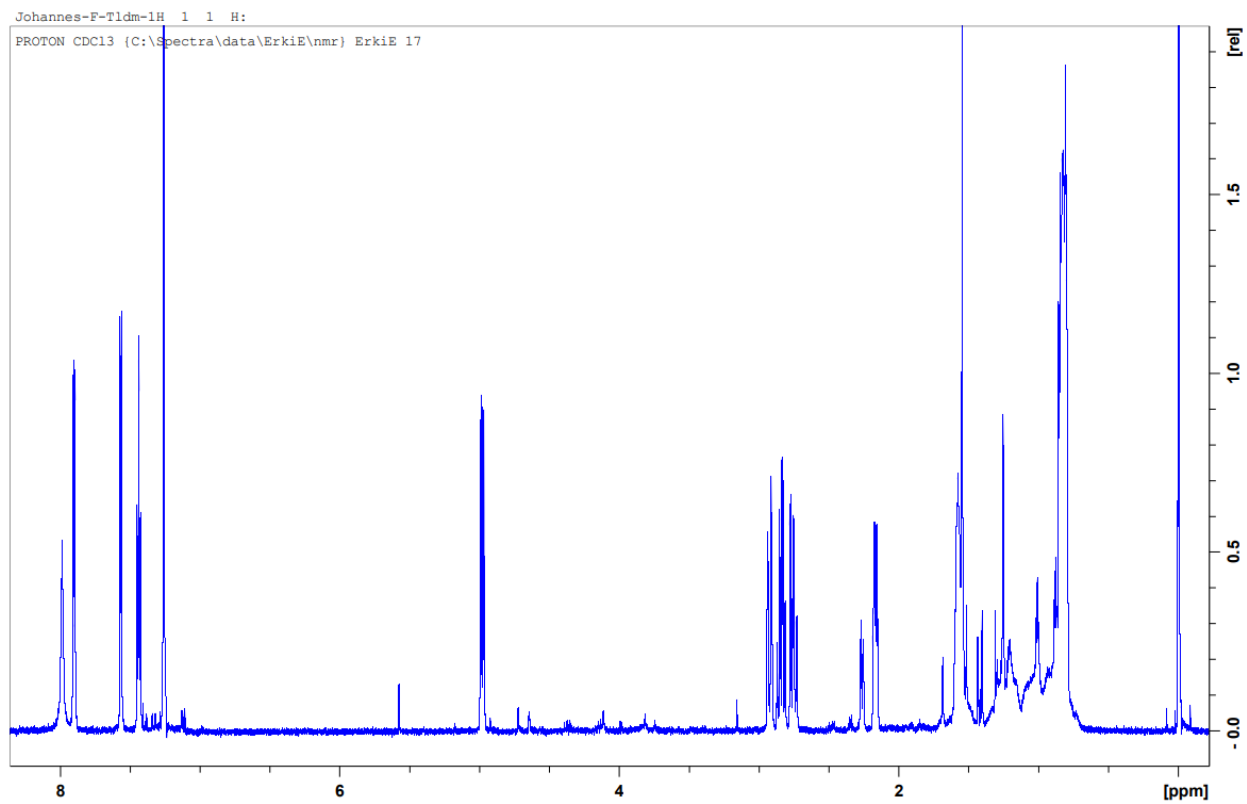
Lisa 13. Sünteesitud talidomiid-5'-(l)-proliini ^1H NMR spekter (CDCl_3)



Lisa 14. Sünteesitud talidomiid-5'-piperidiinkarboksüülhappe ^1H NMR spekter (CDCl_3)



Lisa 15. 5-fluorotalidomiidi ^1H NMR spekter (CDCl_3)

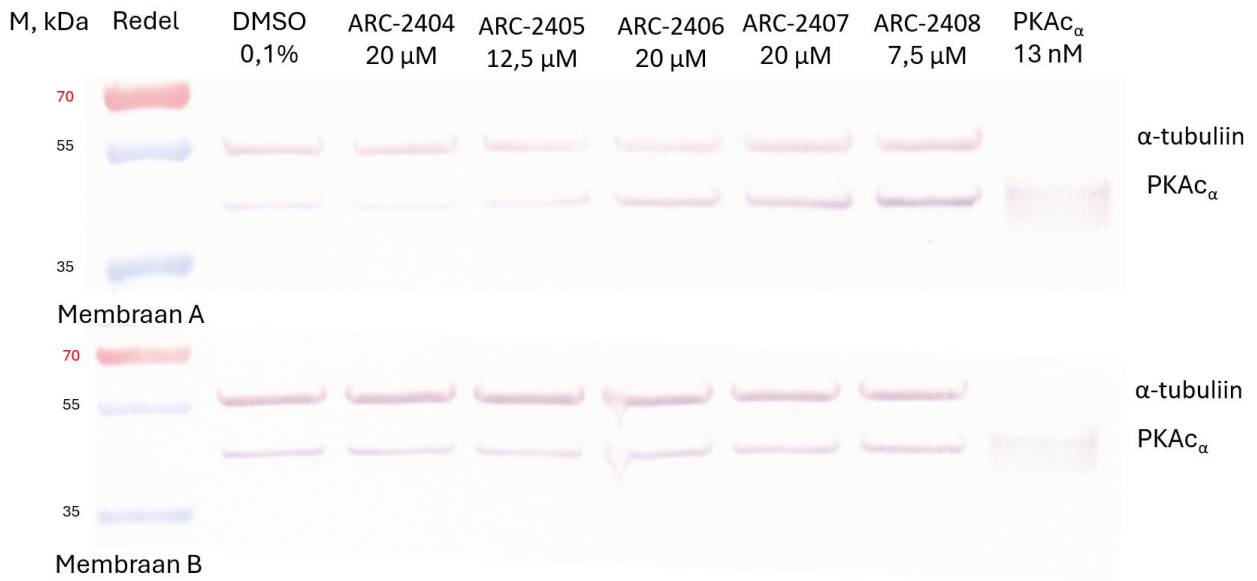
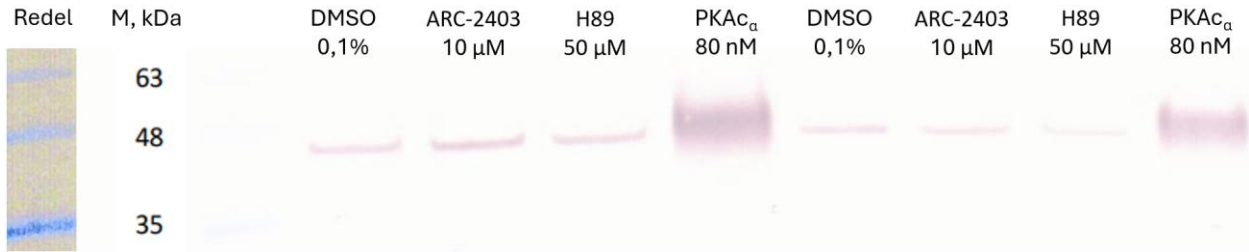
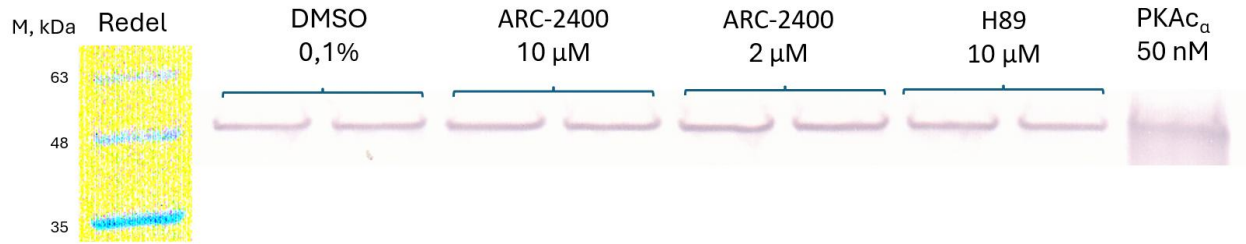


Lisa 16. Rakukatsete *western blot*-i vöötide pindalad (mitmel lehel)

Katse 1		
Aine	Süvend	anti-PKAc
0,1% DMSO	1	4381
0,1% DMSO	2	4349
10 µM ARC-2400	3	5208
10 µM ARC-2400	4	4862
2 µM ARC-2400	5	5887
2 µM ARC-2400	6	5707
10 µM H89	7	5329
10 µM H89	8	4098
50 nM PKAc _α	9	23331
Katse 2		
Aine	Süvend	anti-PKAc
0,1% DMSO	1	1177.355
10 µM ARC-2403	2	2085.891
50 µM H89	3	1397.062
80 nM PKAc _α	4	17589.91
0,1% DMSO	5	756.82
10 µM ARC-2403	6	610.799
50 µM H89	7	256.627
80 nM PKAc _α	8	8191.255

Katse 3			
Membraan A			
Aine	Süvend	anti-PKAc	anti-TubA
0,1% DMSO	1	1942.82	3408.305
20 µM ARC-2404	2	1447.82	3259.891
12,5 µM ARC-2405	3	2102.234	2470.062
20 µM ARC-2406	4	4196.598	2699.255
20 µM ARC-2407	5	5466.79	4184.083
7,5 µM ARC-2408	6	7270.154	5131.205
13 nM PKAc _α	7	8087.439	
Membraan B			
Aine	Süvend	anti-PKAc	anti-TubA
0,1% DMSO	1	7429.326	7418.033
20 µM ARC-2404	2	7493.569	8289.326
12,5 µM ARC-2405	3	6956.983	8973.326
20 µM ARC-2406	4	8520.439	8361.589
20 µM ARC-2407	5	7849.104	7334.79
7,5 µM ARC-2408	6	8924.347	6862.083
13 nM PKAc _α	7	13565.26	

Lisa 17. Suurendatud pildid *western blot*-i vöötidest



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Johannes Murre,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„cAMP sõltuvat proteiinkinaasi proteolüüsi suunavate kimäärühendite süntees ja omaduste iseloomustamine“

Mille juhendaja on Erki Enkvist

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi 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.

Johannes Murre

27.05.2025