

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TEHNOLOOGIAINSTITUUT

CASC3 valgu järjestusest ennustatud rakku siseneva peptiidi toime rakkudele in vitro

Bakalaureusetöö

12 EAP

Krislin Raus

Juhendajad: *PhD* Piret Arukuusk

PhD Ly Porosk

TARTU 2021

INFOLEHT

CASC3 valgu järjestusest ennustatud rakku siseneva peptiidi toime rakkudele in vitro

Rakku sisenevad peptiidid on keskmiselt 5-30 aminohappest koosnevad peptiidid, mis on võimelised sisenema rakku ning mille põhjal on võimalik luua peptiidseid ravimeid. Peptiidsete ravimite eelisteks on nende suhteliselt lihtne sünteesimine ja võimalus tootmiseks suures skaalas. Kuna peptiidi koosnevad aminohapetest on need kehale tavapäraselt, ilma toksiliste vaheühendite tekketa, lagundatavad. Antud töös uuriti CASC3 valgu järjestusest ennustatud rakku siseneva peptiidi sisenemist rakkudesse ja toimet rakkudele in vitro. Töö eesmärk oli leida valgujärjestusest erinevate RSP ennustusprogrammide abil uued potentsiaalsed RSP järjestused ning neid in vitro testida.

Märksõnad: rakku sisenevad peptiidid, CASC3

CERCS: B220 Geneetika, tsütogeneetika

The effect of a cell penetrating peptide predicted from the CASC3 protein sequence on cells in vitro

Cell-entering peptides are peptides, typically made from 5-30 amino acids, that are capable of entering a cell and from which peptide based drugs can be further developed. The advantages of peptide based drugs are their relatively easy synthesis and the possibility of large-scale production. Because the peptides are composed of amino acids, they are normally degradable by the body without the formation of toxic intermediates. In this work, the effect of a cell penetrating peptide predicted from the CASC3 protein sequence on cells was studied in vitro. The aim of the study was to find new potential CPP sequences from the protein sequence using different CPP prediction programs and to test those CPPs in vitro.

Keywords: cell penetrating peptides, CASC3

CERCS: B220 Geneetika, tsütogeneetika

Sisukord

1. Sissejuhatus	7
2. Kirjanduslik ülevaade	8
2.1 CACS3 valk ning tema ülesanded rakus.....	8
2.2 Peptiididel põhinevad ravimid	12
2.3 Rakku sisenevad peptiidid	14
2.3.1 Motiivid valkudes	15
2.4 RSPde ennustusprogrammid.....	16
3. Uurimus	19
3.1 Töö eesmärgid.....	19
4. Materjal ja meetodika	20
4.2 Potentsiaalsete RSPde ennustamine valgu aminohappelisest järjestusest	20
4.3 Peptiidide süntees	21
4.3.1 Peptiidide puhastamine pöördfaasi-vedelikkromatograafiaga	23
4.4 Rakukultuuri kasvatus ning katsed	24
4.4.1 Peptiidide sisenemise hindamine – rakulüsaadist fluorestsentsmärgise detektsioon	24
4.4.2 Peptiidide sisenemise hindamine - konfokaalmikroskoopia	25
4.4.3 Geeniekspressiooni hindamine	25
5. Tulemused ja arutelu	27
5.1 CASC3 valgu valik ning järjestusest ennustatud rakku siseneva peptiidi järjestused	27

5.2	Valitud peptiidijärjestused	28
5.3	Valitud peptiidijärjestuste süntees	29
5.4	Sünteesitud peptiidi rakku sisenemise hindamine	30
5.5	CACS3 geenekspressiooni hindamine peale peptiidi lisamist rakkudele	31
5.6	Edasised etapid	32
6.	Kokkuvõte	33
	Summary	35
7.	Kasutatud kirjanduse loetelu	37
	7.1 Kasutatud veebiaadressid	43
8.	Lisad	44
	Lisa 1	44
9.	Lihtlitsents	49

Kasutatud lühendid

AcN –	<i>acetonitrile</i> , atseetronitriil
CASC3 –	<i>cancer susceptibility candidate gene 3 protein</i> , vähitundlikuse kandidaadi geeni valk, tuntud ka nimedega <i>Metastatic lymph node gene 51 protein</i> (MLN51) ja barentsz (Btz)
DCM –	<i>dichloromethane</i> , diklorometaan
DIEA –	N,N diisopropüületüülamiin
DMF –	N,Ndimetüülformamiid
DMSO –	dimetüülsulfoksiid
EDT –	1,2-etaanditiool
EJC –	<i>exon junction complex</i> , eksonühenduskompleks
FAM –	(5)(6)-karboksüfluorestsiin, flurestsentsmägis, mis on peptiidile lisatud sünteesi käigus
FBS –	<i>fetal bovine serum</i> , veise loote seerum
Fmoc –	9-fluoroenüülmetüüloskükarbonüül rühm
HBTU –	O-bensotriasool-N,N,N',N' - tetrametüülurooniumheksafluorofosfaat
HeLa –	inimese emakakaelavähi rakud
HObt –	1-hüdroksübensotriasool
KELM -	<i>kernel extreme learning machine</i> , ahendusruumi automaatõppe masin
MALDI-TOF –	<i>matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i> , maatriksi assisteeritud laserdesorptsioon-ionisatsioon lennuaja mass-spektromeeter
NES -	<i>nuclear export signal</i> , tuumast väljutamise signaaljärjestus
NLS -	<i>nuclear localization signal</i> , tuuma siirdumise signaaljärjestus
NMD -	<i>nonsense mediated decay</i> , jama vahendatud mRNA lagundamine
PC3 –	inimese eesnäärmevähi rakuliin
P-keha -	<i>processing body</i> , töötlemiskehake rakus, mis vastutab transkriptsioonijärgse regulatsiooni eest
RNP -	ribonukleoproteiini osake (<i>ribonucleoprotein particle</i>)
RSP –	cell penetrating peptide (CPP), protein transduction domain, rakku sisenev peptiid
RSP –	rakku sisenev peptiid
TAT -	transkriptsiooni trans-aktivaator, <i>trans-activator of transcription</i>
TFA –	trifluoroäädikhape
TIS –	triisopropüülsilaan

U87 – inimese glioblastoomi rakuliin

1. Sissejuhatus

Tänapäeval otsitakse üha uudsemaid meetodeid erinevate haiguste raviks ja leevendamiseks. Peptiidipõhiseid ravimeid on praeguseks kasutusel mitmeid, ning nende hulk suureneb jätkuvalt. Peptiidide peamiseks eelisteks on nende bioloogiline sobivus, kehaomased laguproduktid ning neid on võimalik keemiliselt sünteesida ning lisada erinevaid modifikatsioone. Rakku sisenevad peptiidid (RSP) on erilised selle poolest, et suudavad läbida rakumembraane ning endaga rakku kaasa viia ka endaga seotud lastmolekule. Lastmolekulideks võivad olla nii erinevad nukleiinhapped, ravimid, fluorestseeruvad määrgised, jt. Esimesed RSPd avastati juba enam kui 30 aastat tagasi ning praeguseks on RSPde baasil ravimid jõudnud ka kliiniliste uuringute faasi.

RSP-d jagatakse päritolu alusel valkudest tuletatud, sünteetilisteks ja kimäärseteks peptiidideks. Kuigi RSPde andmebaas CPPSite 2.0 peegeldab pea 2000 erineva RSP järjestust, on täiesti unikaalsete RSPde osakaal sellest väike.

Selle töö eesmärk oli leida uus rakku sisenev peptiid. Selleks valiti kirjandusest ning andmebaasidest Uniprot ja Human Protein Atlas leitava info põhjal üks inimese tuumas paiknev ning tuuma lokaliseerimise signaali sisaldav valk – *cancer susceptibility candidate gene 3 protein* (CASC3). CASC3 valgul on oluline roll splaissosoomi koosseisus ning tema düsregulatsiooni on seostatud erinevate haigusseisunditega, näiteks vähi tekkega. CASC3 valgu aminohappelisest järjestusest ennustati potentsiaalsed rakku sisenevad peptiidi järjestused ning sünteesiti kolm järjestust. Testiti peptiidi rakku sisenemise võimet võrreldes teadaoleva RSPga.

Töös läbiviidud ennustused, peptiidide süntees ning katsed on teostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.

2. Kirjanduslik ülevaade

Kirjanduse ülevaates tutvustatakse rakku siseneva peptiidi ennustamisel aluseks võetud CASC3 valgu rolli rakus ning selle düsregulatsiooniga seotud haigusi. Antakse lühike ülevaade peptiidipõhistest ravimitest, ning rakku sisenevatest peptiididest.

2.1 CACS3 valk ning tema ülesanded rakus

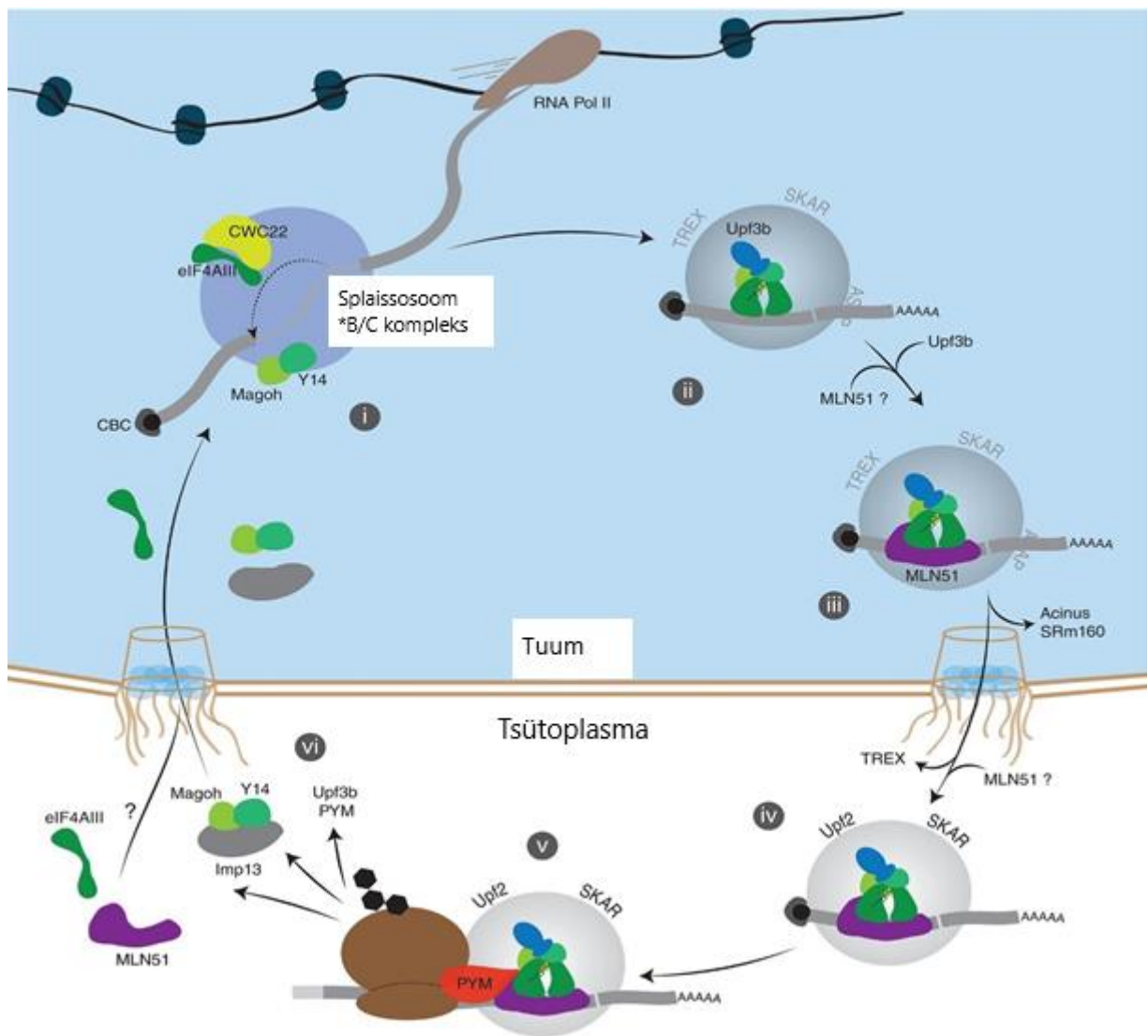
CASC3 (*cancer susceptibility candidate gene 3 protein*) valk on geeni CASC3 poolt kodeeritud valk inimese 17. kromosoomis. Tuntud ka nimedega *Metastatic lymph node gene 51 protein* (MLN51) ja barentsz (Btz). See geen on üks paljudest, mida praeguseks on seostatud vähiga. Täpsemalt seostatakse vähi tekkega CASC3 üleregulatsiooni (Bièche *et al.*, 1996). CACS3 valk paikneb rakus perinukleaarselt või tuuma tähnikeses (*nuclear speckle*). Tuuma tähnikesed on tuumades paiknevad regioonid, kus asub väga palju splaissimisfaktoreid, ehk siis regioonid tuumas, kus toimub aktiivne splaissimine ehk splaissing. Splaissing on rakutuumas toimiv protsess, mille käigus lõigatakse spetsiifilistelt RNA molekulidelt välja intronjärjestused ning allesjäänud eksonjärjestused ühendatakse omavahel. Produktina tekib mRNA, mida kasutatakse valgu sünteesiks. Eukarüootsetes rakkudes vahendab splaissimist splaissosoom, mis on oma olemuselt väikeste tuuma ribonukleoproteiinide kompleks (small nuclear ribonucleoprotein, snRNP). Täpsemalt on splaissosoom RNA-st ja valkudest koosnev kompleks, mille ülesandeks on tuumas DNA-lt transkribeeritud eel-mRNA-st (ingl.k. *pre-mRNA*) intronite väljalõikamine (ingl.k. *splicing*) ja eksonite kokku kleepimine (Will ja Lührmann, 2011). Introniks nimetatakse eel-mRNA nukleotiidses järjestuses olevat mittekodeeritavat osa, mis eemaldatakse splaissimise käigus. Intronid paiknevad eksonite vahel. Eksonid on eel-mRNA nukleotiidses järjestuse need osad, mis splaissimise käigus mRNA-ks kokku liidetakse (Wilkinson *et al.*, 2020). Splaissing on oluline, sest selle tulemusena saadud mRNA-d kasutatakse translatsioonil korrektse valgu sünteesiks (Gray ja Hentze, 1994). (Alternatiivne) splaissing võimaldab samalt DNA skriptilt sünteesida/kombineerida erinevaid variatsioone, mis omakorda saavad reguleerida/täita erinevaid funktsioone rakus. Valesti lõigatud eel-mRNA viib ka vale produkti tekkeni, seega antud geenilt produkti ei teki või tekib vale produkt. See omakorda võib viia haigusseisundi kujunemiseni või rakkude surmani.

CASC3 valk täidab rakus mitmeid olulisi ülesandeid, nagu splaissing, mRNA lokaliseerimine, translatsioon ning lisaks on ta ka snRNP komponent. Neid ülesandeid täidab ta splaissimisest sõltuval mitme valgu eksonühenduskompleksi (*exon junction complex* - EJC) koosseisus. Lisaks on tal oluline roll, EJC-st mittesõltuvalt, ka rakus stressigraanulite tekkes (Woodward *et al.*, 2017).

Nagu eelpool mainitud, täidab CASC3 valk rolli ühe osana splaissosoomist (Joonis 1). (Zhang *et al.* 2017) CASC3 valk on tsentraalseks osaks splaissimisest sõltuval mitme valgu EJC-l, mis on ladestunud splaissimispunktides mRNA-dele. EJC on dünaamiline struktuur eel-mRNA ahela kahe eksoni ristumiskohas, mis on RNA splaissimise ajal kokku ühendatud, see koosneb tuumavalkudest ja mitmetest erinevatest alamühikutest, mis liituvad kompleksiga vaid ajutiselt, kas EJC kokkupanekul või sellele järgneva mRNA lagundamise ajal. Ekson-ühendus kompleks moodustub samm-sammult koos splaissosoomiga. Esimese sammuna ühinevad CWC22 ja eIF4a3, neile omakorda seondub hiljem MAGOH/RBM8A heterodimeer. CWC22 mängib rolli splaissimisel ning osana EJC-st vastutab ta eIF4A3 splaissosoomi toomise eest. EIF4a3, RBM8A ja MAGOH on valgud, mis vastutavad kõigi EJC funktsioonide eest ning samuti tegeleb eIF4a3 ribosomaalse RNA biogeneesiga. CASC3 ühineb ekson-ühendus kompleksiga tuumas ning transporditakse sealt edasi tsütoplasmasse. EJC tähistab geeniekspressioonimasinade jaoks ekson-ekson-ristmiku positsiooni küpses mRNAs ja tuumakomponendid jäävad splaissitud mRNAdega seotuks kogu mRNA metabolismi etappideks, mõjutades seega päriivoolu protsesse, sealhulgas tuuma mRNA ekspordi, subtsellulaarse mRNA lokaliseerimist, translatsiooni efektiivsust ja jama vahendatud mRNA lagundamist (NMD- *nonsense mediated decay*). CASC3 valk stimuleerib eIF4a3 ATPaasi ja RNA-helikaasi aktiivsust. (Zhan *et al.*, 2018). Osana splaissosoomist aitab CASC3 kokku panna toimiva EJC ning vahendab mRNA kvaliteedi kontrolli. CASC3 ühineb EJCga ja moodustab seejärel silla mRNA kvaliteedikontrollimehanismiga, NMD rajaga. NMD raja ülesanne on lagundada mRNAd, milles leiduvad enneaegsed stopp-koodonid. Nii CASC3 kui EJC ühinemine aitab kindlaks teha mRNA stabiilsust ning seetõttu on mõlemad komponendid hädavajalikud mRNA kvaliteedi jälgimiseks. (Gehring *et al.*, 2009)

CASC3 üleregulatsiooniga on seostatud enim erinevad kartsinoomid, nt hepatotsellulaarne kartsinoom, mis on üks esmase maksavähi vorme (Xu *et al.*, 2016). CASC3 on seotud keha erinevate stressivastustega ning üheks P-kehade osaks. P-kehad (ingl. k - *processing bodies*) on mRNAst ja translatsiooni repressiooniga seotud valkudest koosnevad ribonukleoproteiini graanulid raku tsütoplasmas, mis osalevad 5'-3' mRNA lagundamises. Nad sarnanevad oma

olemuselt stressigraanulitega, kuid nende koostis ning funktsioon erinevad mõnevõrra (Luo *et al.*, 2018). Kui CASC3 on üle reguleeritud, koguneb see tsütoplasmaatilistesse rakukolletesse, mis on üheks esimeseks märgiks arenevast kasvajas. P-kehade vähenemist on seostatud ka CASC3 üle reguleerivate rinnavähirakkude puhul. See viitab, et P-kehade lagunemine ja sellele järgnev mRNA dereguleerimine on korrelatsioonis vähi edasi arenemisega (Cougot *et al.*, 2014). Samuti mängib CASC3 rolli stressireaktsioonis, osaledes tsütoplasmaatilistes stressigraanulite kokkupanemises ja soosides rakkude taastumist stressi tagajärjel. Stressigraanulid on transleerimata mRNPd, mis on moodustunud mRNA-dest, mis on seiskunud translatsiooni alguses ja nende olemasolu rakus tähendab, et rakus on kokku puutunud millegi stressi tekitavga (viirusnakkus, muud haigustekitajad vms) (Protter ja Parker, 2016). Lisaks on CASC3 dendriitsete ribonukleoproteiini osakeste (RNP- *ribonucleoprotein particle*) komponent hipokampuse neuronites. Samuti on leitud, et ta võib mängida rolli mRNA transpordis, sest ta seob splaissitud mRNA-d järjestusest sõltumatult, 20–24 nukleotiidi ülesvoolu mRNA ekson-eksoni ristmikest ning seob polü(G) ja polü(U) RNA homopolümeeri. (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108349-CASC3>)



Joonis 1. EJC tsütkel ning CACS3 valgu roll selles. Kohandatud Woodward 2017. (i) EJC allüksused ühinevad splaissosoomiga. (ii) eksonite ligeerimisel ja vabanemisel on EJC seotud stabiilselt mRNAga. (iii) Mõned perifeersed tegurid eemaldatakse enne eksportimist, teised jäävad seotuks ja liiguvad koos EJCga tsütoplasmasse. (iv) MLN1 (lilla) on koos kompleksiga tsütoplasmas. (v) PYM valk (punane) võimaldab EJC lagundamist. (vi) Peale lagundamist imporditakse Y14/MAGOH dimeer tuuma

2.2 Peptiididel põhinevad ravimid

Huvi peptiidide vastu on viimastel aastatel suurenenud tänu nende tõestatud selektiivsusele ja efektiivsusele (Craik *et al.*, 2013). Peptiidipõhiste ravimite eeliseks on nende suhteliselt lihtne sünteesimine ja võimalus tootmiseks suures skaalas. Praegu on turul üle 60 peptiidse ravimi ning lisaks üle 400 kandidaadi ka kliinilistes katsetes (Lee, *et al.*, 2015). Lisaks loetakse peptiide ka suhteliselt ohututeks ja hästi talutavateks organismi jaoks. Peptiidid koosnevad aminohapetest ning on kehale tavapäraselt lagundatavad, peptidaaside poolt, ilma toksiliste vaheühendite tekketa. Tänu sellele ei akumuleeru peptiidid kehas ega põhjusta seetõttu toksilisust. (Goodwin, Simerska ja Toth, 2012). Peptiidid lagundatakse kehas aminohapeteks, mis lagundatakse edasi α -ketohapeteks, mida keha saab uuesti kasutada energia, rasva või muude aminohapete tootmiseks. Praegu on kasutusel väga palju madalmolekulaarseid ühendeid, mille lagundamise tulemusena võib tekkida kehale kahjulikke ühendeid. (Crommelin *et al.*, 2003) Nii peptiidsetel ravimitel kui ka madalamolekulaarsetel ravimitel on oma laialdasemad puudused ja eelised (Tabel 1).

Tööstuslikult peptiidide tootmiseks on kaks võimalust - keemiline süntees ja bioloogiline tootmine. Keemilise sünteesi teel on loodud enamus peptiidipõhistest ravimitest. Bioloogilisel tootmisel kasutatakse ensümaatilist sünteesi, fermenteerimist, ning *in vivo* ja *in vitro* rekombineerimist. (Goodwin, Simerska ja Toth, 2012). Modifitseeritud peptiidide tööstuslik tootmine on lahendanud mitmeid probleeme, mis neil algselt ilmsesid. Natiivsetel, ilma terminaalsete modifikatsioonideta või modifitseerimata aminohapeteta peptiididel esines hulk teatud piiranguid, näiteks lühike poolestusaeg plasmas ning halb biosaadavus suukaudsel manustamisel. Seetõttu hakati kasutama erinevaid meditsiinilise keemia tehnikaid, saavutamaks pikemat poolestusaega, stabiilsust ja selektiivsust terapeutilise potentsiaaliga peptiididel (Lau ja Dunn, 2017). Ühe esimese peptiidipõhise ravimina võeti 1920-ndatel aastatel kasutusel insuliin diabeedi raviks. Insuliin eraldati koera ja lehma pankreasest (Banting *et al.*, 1922). Insuliini avastamiseni viis Minkowski ja von Meringi 1889 aasta uurimus, kus nad eemaldasid koertelt pankrease ning avastasid, et selle tagajärjel tekkis koertel diabeet mille tõttu nad varsti ka surid. Kliinilistes uuringutes on hetkel hinnanguliselt umbes 140 peptiidel põhinevat terapeutikumi (Fosgerau, *et al.*, 2015). Erilises huviorbiidis on anti-mikroobsed peptiidid (antimicrobial peptides, AMPd), samuti ka vähi ja ravimite transpordiga seotud peptiidid. Kasvav huvi AMPde vastu on tihedalt seotud antibiootikumiresistentsusega, mis kujutab kogu maailmas kohutavat majanduslikku, sotsiaalset ja tervisliku koormust ning on

lähitulevikus inimkonnale suur oht, nagu hiljuti tunnistas ka Maailma Terviseorganisatsioon. (Galdiero, Stefania, ja Paula Gomes, 2017).

Tabel 1. Peptiidide ja väikemolekulaarsete ravimite eelised ja puudused.

Ravimi klass	Eelised	Puudused
Peptiididel põhinevad ravimid	<ul style="list-style-type: none"> ● Kehaomased, sest koosnevad aminohapetest, mida keha suudab efektiivselt metaboliseerida. ● Keemiliselt ja bioloogiliselt suures skaalas sünteesitavad. ● Võimalik disainida väga spetsiifiliseks. ● Võimalik lisada erinevaid modifikatsioone näiteks stabiilsuse suurendamiseks. ● Ei kogune kudedesse ega põhjusta lagundamise käigus kahjulikke kõrvalprodukte. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Kuna koosnevad aminohapetest, siis lagundatakse kiirelt – madal metaboolne stabiilsus, mis teeb ka suukaudse manustamise väheefektiivseks. ● Ei suuda rakumembraane läbida. ● Lahustatavusprobleemi d olenevalt peptiidi järjestusest.
Madalmolekulaarsed ravimid	<ul style="list-style-type: none"> ● Väiksed, enamasti suudavad läbida ka erinevaid biobarjääre nagu rakumembraan. ● Stabiilsed lagundamisele. Palju farmakoloogilisi sihtmärke – võimalik ühe ravimi, mis on juba turul, kasutamine teasel eesmärgil (<i>repurposing</i>). ● Suukaudselt manustatavad. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Võivad anda toksilisi kõrvalprodukte kehas lagundamisel. ● Vähene selektiivsus – mis võib ka kõrvalmõjudeni viia. ● Tootmine võib olla kulukas. ● Modifitseerimine võib olla kulukas.

2.3 Rakku sisenevad peptiidid

Rakku sisenevateks peptiidideks (RSPd) loetakse keskmiselt 5-30 aminohappest koosnevaid peptiide, mis on võimelised sisenema rakku ning neid tuntakse ka valguga transduktsiooni domeenidena (Derakhshankhah ja Jafari, 2018). Nende eriliseks omaduseks on see, et nad on võimelehed sisenema rakkudesse ja endaga kaasa viima ka endaga kovalentselt või mittekovalentselt seotud lastmolekule. Lastmolekulideks võivad olla nii erinevad nukleiinhapped, fluoromürgised, liposoomid kui ka terved valgud. Need suured molekulid enamasti iseseisvalt rakkudesse ei jõua. (Bechara ja Sagan, 2013). Enamus RSPsid on CPPSite 2.0 andmetel lineaarsed, positiivselt laetud, L-aminohapetest koosnevad sünteetilised peptiidid (Agrawal *et al.*, 2016). Lisaks leidub ka anioonseid ja hüdrofoobseid RSPsid (Bechara ja Sagan, 2013).

Esimesed RSPd avastati 1988. aastal kui uuriti TAT (transkriptsiooni trans-aktivaator, *trans-activator of transcription*) valku, mis eraldati inimese HIV viirusest ning leiti, et see suudab läbida rakumembraane ning siseneda rakkudesse *in vitro*. Mõned aastad hiljem avastati ka, et äädikakärbe homeodomeenis pärinev 16-st aminohappest koosnev peptiid penetratiin on translokatsioonilise aktiivsusega ja võimeline rakkudesse sisenema (Koren ja Torchilin, 2012).

Rakku sisenevate peptiidide klassifikatsioone on erinevaid. Päritolu põhjal saab eristada kolme põhilist klassi: valkudest tuletatud peptiidid, kimäärsed peptiidid ja sünteetilised peptiidid (Bechara ja Sagan, 2013). Valkudest aminohappelisest järjestusest tuletatud RSPd on just RSPde esimestel aastatel olnud pigem juhuslikud avastused, kuid praegu kasutatakse üha enam ka erinevaid ennustusprogramme uute RSPde leidmiseks. Valkudest tuletatud on näiteks RSP Tat₄₈₋₆₀ ja penetratiin (Mäe ja Langel, 2006). Valkudest tuletatud peptiididele, millel on teadaolev interaktsioon või bioloogiline funktsioon, on võimalik lisada juba teadaolevaid RSPde järjestusi ning muuta need rakumembraane läbivateks (Fu *et al.*, 2015). Sellised RSPd on kiimäärsed, ehk koosnevad erinevat päritolu osadest. Näiteks RSP transportaan koosneb neuropeptiid galaninist ja vapsiku mürgist mastoparan aminohappelisest järjestusest pärit osadest, mis on ühendatud lüsiiniga (Pooga *et al.*, 1998). Kimäärseteks võib lugeda ka need RSPd, millele on lisatud ka nn tehislikke komponente, nagu rasvhapped või mittekodeeritud aminohappeid. Sünteetilised peptiidid on kunstlikult disainitud – nagu peptiid MAP (*model amphipatic peptide*) või polüarginiin (R8) (Milletti, 2012).

RSPd kasutavad rakku sisenemiseks erinevaid mehhanisme, kuid puudub konsensus nende täpses sisenemistees. Lisaks võib sama peptiid kasutada üheaegselt mitut sisenemisteed, mis

muudab nende uurimise keeruliseks. Kaheks levinuimaks ning enim dokumenteerituks on endotsütoos ning otsene transduktsioon läbi raku membraani. (Lindgren ja Langel, 2011). Enamasti, kui RSP on seotud suurema lastmolekuliga, kasutavad RPSga moodustatud nanopartiklid pigem endotsütoosi. On täheldatud ka energiast ning retseptoritest sõltumatut rakku sisenemist. (Wagstaff ja Jans, 2016). RSP interakteerub membraanis olevate lipiidide ja glükaanidega, mille tulemusena polaarsed aminohapped lahutatakse sekundaarsetest. See protsess viib fosfolipiidse kaksikkihi destabiliseerimiseni ning RSP saab rakku siseneda (Pae ja Pooga 2014). Nukleiinhapetega seotult kasutab näiteks RSP PepFect14 ja NickFect51 ka SCARA (scavenger receptor type A) retseptorite vahendatud sisenemist (Veiman *et al.*, 2013 ja Helmfors, *et al.* 2015)

Rakkudesse sisenevaid peptiide kasutatakse kõige sagedamini fluorestsentsmärgiste sisse viimiseks, kuid neid on võimalik kasutada ka terapeutiliste biomolekulide rakusiseseks manustamiseks (Derakhshankhah ja Jafari, 2018). Seetõttu nähakse neis suurt potentsiaali tuleviku meditsiinis. RSPd suudavad endaga siduda mitmeid erinevaid molekule, nende hulgas oligonukleotiide, plasmide, siRNA-d, antikehasid ja ravimeid (Cerrato *et al.*, 2014). Tänu nende omadustele on võimalik rakku sisenevaid peptiide rakendada selliste haiguste raviks nagu vähk, südamehaigused ning viiruslikud ja bakteriaalsed infektsioonid (Copolovici *et al.*, 2014). Praegu on RSPdega seotud ravimitest mitmed ka kliinilistes katsetes. Näiteks PsorBan, mis on konjugeeritud R7ga ja AM-11, mis on konjugeeritud TATiga (Habault ja Poyet, 2019).

2.3.1 Motiivid valkudes

Valkudes on erinevate funktsioonide täitmiseks järjestuses võrdlemisi universaalsed motiivid. Näiteks valkude järjestuses leiduvad tuuma siirdumise signaaljärjestused (NLS – *nuclear localization signal*) ja tuumast väljutamise signaaljärjestused (NES – *nuclear export signal*). Tuumas siirdumise signaalid on lühikesed aminohapete järjestused valgu struktuuris, mis suunavad lastvalke tuuma. Need signaaljärjestused sisaldavad tavaliselt kas ühte või mitut positiivselt laetud lüsiini või arginiini (Lange *et al.*, 2010). Tuumast väljutamise signaalid on olulised valkude subtsellulaarse asukoha regulaatorid, mis mõjutavad transkriptsiooni ja muidu tuumaprotsesse. Tuumast väljutamise signaalid sisaldavad 4 hüdfoobset jääki ja sisalduvad üksikute molekulide või nende komplekside struktuuris (Cour *et al.*, 2014). Tuumast väljutamise signaalide alusel toimub molekulide või nende komplekside transport tuumapoori kompleksi kaudu tuumast tsütosooli (Richards *et al.*, 1996). Tuumast väljutamise signaalide ülesanne on vastupidine tuuma siirdumise signaali ülesannetele. NLSide motiivid on sarnased

hiljuti täheldatud nn kelkpeptiididega. Kelkpeptiidideks nimetatakse lühikesi DNA-l libisevaid molekule, mis on väikeste mõõtmete ja kiire difusiooniga. Interaktsioonid molekulaarsete kelkude ja DNA vahel on järjestusespetsiifilised, DNAd suunavad fragmendid on väga väikesed ja reagentid on DNA matriitsil väga liikuvad (Xiong *et al.*, 2016). Esimene molekulaarne kelk, mida kirjeldati, oli pVIc. pVIc on 11 aminohapet pikk, ei moodusta iseseisvalt stabiilset struktuuri ning sellel on järjestikused laetud jäägid mis on ebasoodsad DNA sidumiseks alfa-heeliksina. See toimib adenoviiruse valgu pVI tuumalokalisatsiooni signaalina ja mängib rolli viiruse elutsükli, reguleerides DNAGA seotud viirusvalkude ühemõõtmelisi biokeemilisi koostoimeid. Leiti, et pisikesed molekulaarsed kelgud nagu pVIc libisevad mööda DNAd nii kiiresti kui $26,0 \pm 1,8$ M (bp²/s). (Xiong ja Blainey, 2016) Lisaks on kelkpeptiidid patenteeritud kui PCRi reaktsiooni kiirendajana (Turkin, *et al.* 2016).

Nii tuuma lokaliseerimise signaalid kui ka kelkpeptiididele omased järjestused on mitmeti sarnased ka RSPdes sagedasti leiduvatele järjestustele. Nende motiivide olemasolu RSPs või nende lisamine RSP järjestusele annab RSPdele funktsioonide lisamise võimaluse. Näiteks, kasutades RSPd nukleiinhappe transpordiks, võimaldaks kelkpeptiidile omase motiivi lisamine suurendada dünaamilisi interaktsioone DNA ja peptiidi vahel. Kui lastmolekul peab jõudma tuuma, näiteks kui lastiks on plasmid, siis võiks NLS motiivi lisamine soodustada RSP/plasmidi nanopartikli jõudmist tuuma.

2.4 RSPde ennustusprogrammid

Uute RSPde leidmine ainult eksperimentaalselt on ressursimahukas, seega on üha rohkem rakendatud RSPde ennustusprogrammid. RSPde ennustusprogrammide treeningjärjestused põhinevad eksperimentaasetel andmetel ning tänu juba olemasolevale informatsioonile on uute RSPde leidmine muutunud lihtsamaks, kiiremaks ja usaldusväärsemaks. Siiski tuleb ka ennustatud peptiidide puhul sobivaid kandidaate ka reaalselt sünteesida ja testida, et veenduda, kas pakutud peptiid on efektiivne RSP. Kuna ka eksperimentaalselt tõestatud RSPde hulk suureneb, on loodud mitmeid RSPde andmebaase, millest kõige paremini hallatud ning kasutajasõbralikum on CPPSite 2.0 (Kadani ja Bolhassani, 2020). Sellest andmebaasist on leitavad nii RSPde järjestused kui ka võimalik otsingut täpsustada ja sorteerida kas spetsiifilise järjestuste lõigu, sisalduvate AH-te või ka näiteks päritolu põhjal. Andmebaaside olemasolu aitab oluliselt kiirendada ja lihtsustada erinevate RSPde leidmist ja edasist disaini.

Praeguseks on välja töötatud mitmeid erinevaid ennustusprogramme ning HTS (*high throughput screening*) meetodeid. Esimene RSP ennustusprogramm on loodud Ülo Langelis labori teadlaste poolt aastal 2005 (Hällbrink *et al.*, 2005). Langelis laboris loodud programm põhineb 1998. aastal Sandbergi ja kolleegide poolt läbi viidud uuringul, kus kirjeldati 87-t aminohapet ning jagati need viide rühma, mida nimetati z-skaaladeks. (Sandberg, *et al.*, 1998) Programm kasutab nendest kolme- z1, z2 ja z3. Neid kolme rühma kirjeldasid kõige paremini lipofiilsus, sterilisus ja polaarsus. Z-skaalade põhjal koostati algoritm RSPde leidmiseks valkudes või juhuslikes peptiidjärjestustes (Hansen, *et al.*, 2008). Korraga saab programmi sisestada terve valgusjärjestuse ning seejärel antakse ette vahemik, millises pikkuses ennustatavaid RSP järjestusi soovitakse (näiteks 5-30 aminohappejääki). Seejärel teostab programm analüüsi, mille tulemuseks on ette antud pikkuste vahemikku jäävad erinevad järjestused skooriga 0-3. Skooriga 0 järjestus ei ole üldse rakku sisenev, skooriga 1 järjestus on kõige väiksema tõenäosusega RSP ning skooriga 3 järjestus kõige tõenäolisemalt RSP.

CPPpred on veebiserver RSPde ennustamiseks, kasutades *N-to-1* tehisnärvivõrku. Server võtab sisendina ühe või mitu peptiidjärjestust, pikkusega 5 kuni 30 aminohapet ning tagastab ennustuse selle kohta, kui tõenäoliselt iga peptiid rakku siseneks. Ka siin programmis antakse peptiidile skoor. Skoor 0 tähendab, et peptiid ei sisene rakku, skoorid 0.5-1 tähendavad, et peptiid siseneb rakku. (Holton, *et al.*, 2013). SkipCPP-Pred on järjestuspõhine ennustusprogramm kus kasutatakse adaptiivset k-skip-n-grammi mudelit, mis on lisatud otsustusmetsale (Random Forest Classifier). Sisestatud peptiid teisendatakse 400-dimensioonilisteks tunnusvektoriteks, mis seejärel suunatakse edasi otsustusmetsa, et teha lõplik otsus. Lõpptulemusena antakse ennustus, kas sisestatud peptiid on RSP või mitte ning samuti antakse hinnang saadud ennustuse korrektsusele (Wei *et al.*, 2017)

CellPPD põhineb tugivektorimasinal (TVM), mis hindab iga aminohappejäägi järjestust TVM skooriga. (Gautam *et al.*, 2013). SVM skoor >0 loetakse RSPks. Sellel ennustusprogrammil on kolm järjestusepõhist ennustusmudelit: aminohapete koostisel põhinev mudel, dipeptiidide koostisel põhinev mudel ja binaarsel profiilil põhinev mudel (Wei *et al.*, 2017). CellPPD tehtavad ennustused põhinevad füüsikalise-keemilistel omadustel nagu hüdrofoobsus, amfiipaatus, steeriline takistus, laeng ja molekulmass (Lee *et al.*, 2019).

Lisaks eelmainitule on olemas ka teisi ennustusprogramme, nende hulgas CPPred-RF, MLCPP ja KELM-CPPpred. (Su *et al.*, 2020) CPPred-RF on kahekihiline otsustusmetsal põhinev ennustusprogramm millega saab ennustada RSPd ning selle omastamise efektiivsust

samaaegselt. Samuti saab seda kasutada mitmete järjestuste üheaegseks ennustamiseks (Wei *et al.*, 2017). MLCPP on sarnasel eelmainitud CPPred-RF-le kahekihiline programm CPPde ja nende omastamise efektiivsuse ennustamiseks. Antud peptiidijärjestusest ennustab esimene kiht, kas tegu on RSPga või mitte ning teine kiht ennustab RSP omastamise efektiivsuse (Manavalan *et al.*, 2018). KELM-CPPpred on KELM-il (*kernel extreme learning machine*) põhinev ennustustööriist. Server pakub RSP ennustamiseks kuut erinevat mudelit ning kasutaja saab valida enda jaoks sobiva. KELM-CPPpred võimaldab ennustada mitut RSP-d korraga ning sisestada 5-30 AH pikkuseid järjestusi (Pandey *et al.*, 2018).

3. Uurimus

3.1 Töö eesmärgid

Töö eesmärk oli leida valgujärjestusest erinevate RSP ennustusprogrammide abil uued potentsiaalsed RSP järjestused.

Eesmärgi täitmiseks viidi läbi järgmised etapid:

1. Tuginedes kirjandusele valiti üks inimese raku tuumas lokaliseeruv kandidaatvalk, millel oli valgundmebaasides olemas teadaolev valgujärjestus ning seos haiguse tekkega.
2. Valgujärjestuse põhjal ennustati RSP ennustusprogrammide abil potentsiaalsed RSPd.
3. Sünteesiti tahke faasi peptiidisünteesi meetodit kasutades kolm fluorestsentsmärgisega peptiidijärjestust.
4. Testiti puhastamise järel peptiidi sisenemisvõimet, võrreldes teadaoleva fluorestsentsmärgisega RSPga NickFect51-ga.
5. Testiti peptiidi mõju rakkudes CASC3 ekspressioonile, võrreldes teadaoleva RSP Tat₄₈₋₆₀-ga.

4. Materjal ja metoodika

Materjalide ja metoodika osa jaguneb kolmeks peamiseks osaks a) valgust peptiidide ennustamine, b) valitud peptiidide süntees ja puhastamine ja c) katsed eukarüootsetel rakkudel.

4.2 Potentsiaalsete RSPde ennustamine valgu aminohappelisest järjestusest

Ennustamisel võeti aluseks CACS3 valgu aminohappeline järjestus (Tabel 2). Järjestus korrastati programmile sobivasse formaati (ilma tühikuteta, ühel real, txt fail) ning parameetritena ennustati kogu valgu järjestusest 5 kuni 30 aminohappe pikkused RSPd. Ennustusprogrammi (Hälbrink 2005, Hansen 2008) põhjal valiti kõrgema skooriga (skoorid 2 ja 3) järjestused ning kasutati sisendina CellPPD ja CPPSkip-Pred ennustustele. CellPPD ning CPPSkip-Pred nõuavad erinevat sisendit ning seetõttu oli kummagi ennustuse jaoks vajalik eraldi järjestuste korrastamine. Skoorid koos korrastatud järjestustega on toodud lisas 1. CellPPD parameetrid ennustamisel: SVM (*support vector machine*) baasil ennustus, lävend hinnangul 0.0.

Tabel 2. CACS3 valgu aminohappeline järjestus, mida kasutati ennustusprogrammi sisendina. FASTA formaadis fail alla laaditud Uniprot andmebaasist.

I	>sp O15234 CASC3_HUMAN Protein CASC3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CASC3
D	PE=1 SV=2
Jä rj es tu s	MADRRRQRASQDTEDEESGASGSDSGGSPLRGGGSCSGSAGGGGSGSLPSQRGGR TGALHLRRVESGGAKSAEESCESEDGIEGDAVLSDYESAEDSEGEEGEYSEEENS KVELKSEANDAVNSSTKEEKGEEKPDTKSTVTGERQSGDQESTEPVENKVGKKG PKHLDDDEDKRNPAIYPRKGLFFEHLRGQTQEEEVPRKGRQRKLWKDEGRWEH DKFREDEQAPKSRQELIALYGYDIRSAHNPD DIKPRRIRKPRYGSPPQRDPNWN GE RLNKSHRHQGLGGTLPPRTFINRNAAGTGRMSAPRNYSRSGGFKEGRAGFRPVEA GGQHGGRSGETVKHEISYRSRRLEQTSVRDPSPEADAPVLGSPEKEEAASEPPAAA PDAAPPPDRPIEKKSYSRARRTRTKVGDAVKLAEEVPPPPEGLIPAPPVPETTPTP TKTGTWEAPVDSSTSGLEQDVAQLNIAEQNWSPGQPSFLQPRELRGMPNHIHMGA GPPPQFNRMEEVQGGRAKRYSSQRQRPVPEPPAPPVHISIMEGHYYDPLQFQGP IYTHGDSAPLPPQGMLVQPGMNLPHPLHPHQTAPLPNPNGLYPPPVSMSPGQPP PQQLLAPTYFSAPGVMNFGNPSYPYAPGALPPPPPHLYPNTQAPSQVYGGVTTYN PAQQQVQPKSPRRRTPQPVTIKPPPPEVVSRRGSS

4.3 Peptiidide süntees

Peptiidid (järjestused Tabelis 3) sünteesiti käsitsi, kasutades 9-fluorenüülmetüüloksükarbonüülbaasil (Fmoc) tahke faasi peptiidi sünteesi meetodit. Tahke kandjana kasutati MBHA rinkaamiid vaiku, mille puhul jääb peptiididele vaigult lõikamise järel C-terminaalne NH₂. Tahkel kandjal peptiidisüntees võimaldab kiiret ning efektiivset peptiidi sünteesi, kus saab kasutada aktiveeritud aminohapet ning reagente liias ning iga etapi järel saab üleliigse välja pesta. Aminohappe liias kasutamine aitab iga sidumisreaktsioonil saavutada peaaegu täieliku sidumise. See omakorda on oluline, et saavutada korrekse järjestusega peptiidi võimalikult suur saagis. Tahkel kandjal peptiidsünteesi meetodit nimetatakse ka Merrifieldi sünteesi meetodiks, selle looja R. Bruce Merrifieldi järgi. Tahkel kandjal peptiidisünteesi meetod jaguneb kaheks suuremaks meetodiks, mis erinevad teineteisest sünteesi käigus eemaldatava kaitserühma ja peptiidi vaigult eemaldamiseks kasutatava lahuse poolest. Fmoc-baasil peptiidisünteesil eemaldatakse peamine kaitserühm alusega (20% piperidiin) ja peptiid vaigult happega (trifluoroäädikhappega). Tahke faasi peptiidisünteesi eelisteks on see, et see võimaldab etapiviisilist lähenemist, kus iga aminohape lisatakse ükshaaval ning tänu erinevatele kaitserühmadele on võimalik ka ortogonaalne süntees. Lisaks on see ka lihtsasti automatiseeritav ning võimaldab järjestusse lisada ka aminohappeid või modifikatsioone, mida bakterid või imetaja rakud valkudesse tavapäraselt ei lisa. Sünteesi põhietapid ning skemaatiline ülevaade on Joonisel 2.

Tabel 3. Antud töö raames sünteesitud peptiidid ning nende järjestused.

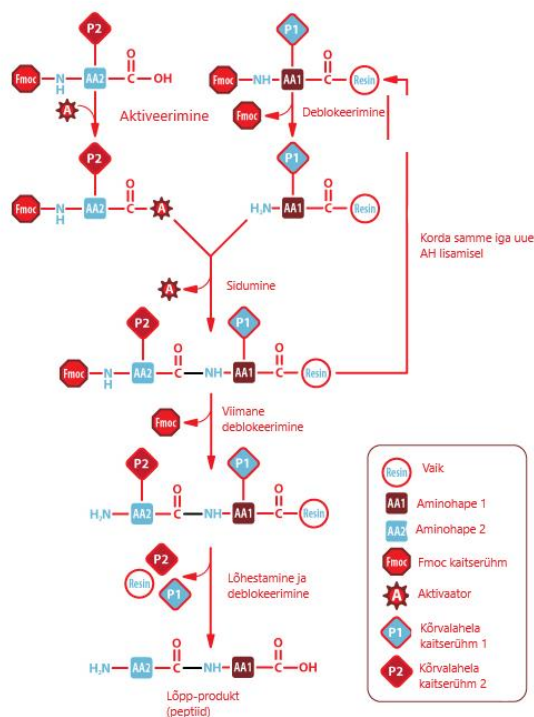
Peptiid	Järjestus
TAT 48-60	GRKKRRQRRRPPQ-NH ₂
CASC3 250-264	PDDIKPRRIRKPRY-NH ₂
CASC3 192-210	DLRGQTQEEVVRPKGRQRK-NH ₂
CASC3 402-421	KSYSRARRTRTKVGDAVKLA-NH ₂
CASC3 402-421 (KK)	KSYSRARRTRTKVGDAVKLAKK-NH ₂

Vaik kaaluti ning viidi filtriga reaktsiooninõusse. Vajaliku koguse arvutamiseks kasutati vajalikku skaalat (0.125 mmol) ja vaigu reageerivate rühmade arvu (*loading*). Vaigu pundumiseks lisati diklorometaani (DCM) ning inkubeeriti toatemperatuuril loksutil 20 minutit.

Samal ajal segati kokku aminohappe sidumiseks vajalikud lahused. Ühe osa vaigu kohta arvestati 5 kordses üle hulgas Fmoc-rühmaga kaitstud aminohapet, 0.5 M Oxyma lahustatud DMFis, 0.5 M DIC lahustatud DMFis ja 2 M DIEA lahustatud NMPs. Vaigult eemaldati DCM lahus ning lisati Fmoc-kaitserühma eemaldamiseks 20% piperidiini lahus DMFis. Seejärel pesti vaik 5 x DMFiga ning 1 x DCMiga. Pesu on vajalik vaigult eelneva reaktsiooni lahuste ja kõrvalproduktide eemaldamiseks. Pesu järel aktiveeriti aminohape ja lisati aminohappe sidumiseks vaigule ka vajalikud lahused, mis eelnevalt valmistati. Sidumisreaktsiooni ajal loksutati vaiku toatemperatuuril 2 h ning seejärel pesti 3 x DMFiga, 3 x DCMiga ja 3 x DMFiga. Väikse koguse vaiguga viidi läbi ninhüdriintest, mis võimaldab detekteerida reageerimata amiinrühmasid – vaiguterad lahuses muutuvad kuumutamise järel siniseks kui vabasid rühmasid on ning jäävad kollaseks, kui rühmadele on seondunud aminohape. Kui vabasid rühmasid oli palju, siis viidi uuesti läbi aminohappe sidumine. Selleks, et vähendada kõrvalproduktide tekke võimalust, viidi sidumise järel läbi ka seondumata amiinrühmade inaktiveerimine (*capping*) äädikhapetega. Seejärel pesti 3 x DMFiga, 3 x DCMiga ja 3 x DMFiga ning korrati Fmoc eemaldamise, aminohappe sidumise ja seondumata amiinrühmade inaktiveerimise etappe kuni kõik vajalikud aminohapped olid tahkel kandjal peptiidile lisatud. Viimase etapina eemaldati Fmoc kaitserühm ning jagati vaik pooleks. Poolele vaigust lisati ka N-terminaalne fluoretsentsmärgis ja teisele poolele ei lisatud N-terminusse midagi. Fluoretsentsmärgise lisamiseks lahustati 113 mg fluoretsentsmärgist FAM 200µl DMSO-s ja 400µl DMF-is ning jäeti kaheks minutiks loksuma. Loksunud lahus lisati resinile koos 47µl DICiga, 600µl 0,5M HOBtiga, 105µl DIEAga ning natukese DCMiga. Reaktsioon toimus üleöö toatemperatuuril, pimedas (fooliumisse mähitult), loksutil. Seejärel pesti 3 x DMFiga, 3 x DCMiga ja 3 x DMFiga.

Peptiidi eemaldamiseks vaigult pandi nii fluoretsentsmärgisega kui ka märgiseta peptiidid eraldi filtriga süstaldesse, kuivatati lüofilisaatoris ning seejärel valmistati lõhustamisegu. Selleks segati eraldi tuubi lahus, mis sisaldas 94% TFA / 2.5% ülipuhast vett / 2.5% EDT / 1% TIS. Ettevaatlikult lisati segu süstaldesse ning loksutati 2 h toatemperatuuril. Seejärel viidi peptiidi sisaldav lahus puhtasse 50 ml tuubi ning lisati 40 ml sügavkülmas hoitud eetrit, loksutati ettevaatlikult ning fuugiti 2000 x g juures 5 minuti, +4°C juures. Seejärel valati eeter ettevaatlikult kogusminõusse. Tuubi jäänud sademele lisati uuesti 40 ml eetrit, segati, fuugiti, eeter valati ära ning korrati protseduuri. Seejärel lisati sademele 20 ml ülipuhast vett ning segati. Peptiidi sisaldav vesilahus külmutati -80 °C juures täielikult ning lüofiliseeriti.

Sejärel puhastati peptiid RP-HPLC-ga ja fraktsioonid kontrolliti mass-spektromeetriaga (MALDI-TOF).



Joonis 2. Tahke faasi peptiidsünteesi skeem (kohandatud <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/solid-phase-synthesis.html>)

4.3.1 Peptiidide puhastamine pöördfaasi-vedelikkromatograafiaga

Pöördfaasi-vedelikkromatograafia (RP-HPLC) on levinud kromatograafia meetod, mille käigus lahutatakse molekulid üksteisest vastavalt nende hüdrofoobsusele (Kumar ja Kumar, 2012).

Seda saab efektiivselt kasutada ka peptiidide puhastamiseks sünteesil tekkinud kõrvalproduktidest (peptiididest, milles sidumisreaktsioon ei õnnestunud). Põhimõtte sellel puhastusmeetodil seisneb selles, et peptiidilahus juhitakse läbi statsionaarse faasi (kolonni, milles paikuvad siduvad rühmad tahkel kandjal, silikaadil). Selleks kasutatakse mobiilse faasina polaarseid lahusteid, näiteks vett ja atsetonitriili (AcN). Vastavalt oma hüdrofoobsusele on peptiid kas seotud statsionaarses faasis või liigub statsionaarsest faasist mobiilsesse faasi. Esimesena väljuvad hüdrofiilsemad peptiidid ning atsetonitriili protsendi suurenedes hüdrofoobsemad peptiidid. Atsetonitriili lisamine muudab mobiilset faasi vähem polaarseks

ning seetõttu elueerimistugevus suureneb ning hüdrofoobsemad ühendid väljutatakse kolonnist (Kumar ja Kumar, 2012).

Peptiidide puhastamiseks kõrvalproduktidest lahustati 10 mg peptiidi 1.8 ml lahuses, mis koosnes 20% AcN-st, 0,1% TFAst ja ülipuhtast veest. Gradiendi parameetrid: 20% AcN kuni 100% AcN lineaarselt 45 minuti jooksul, voolukiirusega 5 ml/min. Koguti kõik fraktsioonid, kus detekteeriti signaal. Puhastamise järel kontrolliti peptiidi olemasolu kogutud fraktsioonis ka MALDI-TOF meetodil. Kontrolli teostas Piret Arukuusk. MALDI-TOF (Maatriksi assisteeritud laserdesorptsioon-ionisatsioon) massispektromeetria võimaldab kiiresti ning täpselt kindlaks teha erineva suurusega makromolekulide molekulmassid ning iseloomustada nende struktuure. Külmuivatatud peptiidid lahustati vees 1 mM kontsentratsioonil ja säilitati sügavkülmas.

4.4 Rakukultuuri kasvatus ning katsed

Töös kasutati kolme rakuliini - inimese glioblastoomi rakud (U87), inimese eesnäärme kasvaja rakud (PC3) ja inimese emakakaela kasvaja rakud (HeLa). Need kolm rakuliini valiti, sest CASC3 valku on seostatud glioomi ja testiste kasvajatega (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108349-CASC3/pathology>).

Rakke kasvatati 37 °C juures 5% CO₂ keskkonnas. U87 ja HeLa rakkude kasvatamiseks kasutati Dulbecco *Minimum Essential Medium Eagle* (DMEM) söödet ning PC3 rakkude kasvatamiseks kasutati *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium* (RPMI) söödet. Söötmetele lisati 10% veise loote seerumit (FBS), 100 U/ml penitsilliini ja 100 mg/ml streptomütsiini, lisaks ka naatrium püruvaat ja glutaMAX. U87 rakkude kasvatamiseks kasutati eelnevalt 0,1% želatiiniga töödeldud tassi. Iga paari päeva tagant passeeriti rakke, et säilitada nende tihedus kuni 90% juures.

4.4.1 Peptiidide sisenemise hindamine – rakulüsaadist fluorestsentsmärgise detektsioon

Peptiidi sisenemise hindamiseks kasutati ühe katsena rakulüsaadist fluorestsentsmärgise detektsiooni. Peptiidile lisati fluorestsentsmärgisena fluorestseerin ning saadud fluorestsentsmärgisega peptiidilt mõõdeti fluorestsentsi raku sisenemisel 2h peale peptiidi lisamist rakkudele raku söötmes. Peptiidi lisati rakkudele kontsentratsioonivahemikus 1 – 10 µM. Fluorestsentsi mõõdeti fluoromeetriga.

4.4.2 Peptiidide sisenemise hindamine - konfokaalmikroskoopia

Peptiidide sisenemise hindamiseks kasutati veel ka konfokaalmikroskoopiat. Konfokaalmikroskoopia võimaldab detekteerida fluorestsentsmärgisega peptiidi elusatest rakkudest.

25000 rakku kaevu kohta külvati 8-kaevulistele mikroskoopiaks sobilikele klaaspõhjaga NUNC plaatidele. Katse päeval vahetati sööde rakkudel ning lisati 1-10 µM kontsentratsioonis fluorestsentsmärgisega peptiidi. Kontrollidena kasutati fluorestsentsmärgisega RSPd 2 µM lõppkontsentratsiooniga NickFect51 ja peptiidilisandita töötlemata rakke. Fluorestsentsmärgis detekteeriti ergastades proovi lainepikkusel 488 nm ning emissioon detekteeriti rohelises kanalis (emissioonimaksimum 520 nm).

4.4.3 Geeniekspressiooni hindamine

Geeniekspressiooni hindamiseks kasutati q-RT-PCR meetodit ning praimeritena kasutati all tabelis toodud järjestusi (Tabel 4). Praimerite disainil arvestati sellega, et praimer on mõeldud kasutamiseks inimrakkudes ning valiti need, mis annaks soovitud produkti ilma lisaproduktideta. Praimerid disainiti tuginedes mRNA-le. Esmases praimerite testis kasutati viit erinevaid disainitud praimerpaari ning nende seast valiti välja sobivaim. Valimi eeldusteks olid: amplifikatsioon Ct väärtuse 20-25 juures, ei anna lisaprodukte, protokoll peab sobima kontrollgrupi protokolliga. Kontrollina kasutati glütseeraldehüüd-3-fosfaat dehüdrogenaasi ekspressioonitaset (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*, GABDH), mis kuulub koduhoidja geenide hulka. Koduhoidjateks (*housekeeper*) nimetatakse gene, mille produkte vajab rakk pidevalt funktsioneerimiseks ja mis hoiavad raku taset stabiilsena.

Tabel 4. Kasutatud praimerpaaride järjestused.

Sihtmärk	Paar	Päripidine	Äraspidine
CACS3	1	TGAGAAAGGGATGGTGGAG	GGAAAAGGGGTGTAGCAAG
CACS3	2	TGAGAAAGGGATGGTGGAG	GAAAAGGGGTGTAGCAAGAAG
CACS3	3	TGAGAAAGGGATGGTGGAG	GGGTGTAGCAAGAAGAATGG
CACS3	4	TGAGAAAGGGATGGTGGAG	ATGGAAAGAAGAGAAGCAAG G
CACS3	5	AAAGGGATGGTGGAGTGAG	GGAAAAGGGGTGTAGCAAG

GABDH	5'-ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC A-3'	5'-CGT CAA AGG TGG AGG AGT GG-3'
-------	--	-------------------------------------

Reaalaja kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (q-RT-PCR) meetod põhineb polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR), kuid tema eeliseks on see, et produktide detekteerimine ja mõõtmine toimub peale igat tsüklit vastupidiselt PCR meetodile, kus analüüs toimub kõikide tsüklite lõppedes. Q-RT-PCR läbiviimiseks kasutatakse TaqMan sonde, mille ühes otsas on fluorestsentsreporter ning teises otsas kustutaja. TaqMan proov hübridiseerib märklaudjärjestusele ning tänu üksteise lähedal olekule takistab kustutaja valgussignaali teket. Seejärel TaqMan proov lagundatakse tänu polümeraasi 5'-3' aktiivsusele ning vabanenud reporterimolekul emiteerib ergastamisel valgust.

U87 rakud külvati 6-kaevulistele plaatidele, 600000 raku kaevu kohta 2 ml söötmes. Päev hiljem sööde vahetati ning lisati peptiid. Peptiidide lisamise järel inkubeeriti rakke 24 h inkubaatoris 37°C juures, 5% CO₂ juures. Seejärel rakud pesti jääkülma PBS lahusega ning lisati TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific). Rakud pesti koos reagentiga rakuplaatidelt ning viidi 1.5 ml tuubidesse. Seejärel jätkati tootjapoolse protokolliga RNA eraldamiseks (mõningate modifikatsioonidega). RNA lahustati ülipuhtas vees ning mõõdeti RNA kogus proovis ning määrati puhtus NanoDrop2000 instrumendiga. Seejärel sünteesiti komplementaarne DNA (cDNA), kasutades SuperScriptIV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) vastavalt tootja protokollile 0.5 x skaalas. Sünteesitud cDNA kasutati qPCRi jaoks, kasutades 5 x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis Biodyne, Eesti), vastavalt tootja protokollile. Saadud andmed normaliseeriti peptiidiga töötlemata rakkude ekspressioonitasemete vastu. Kontrolliks kasutati lisaks GABDH ekspressiooni. Analüüs teostati kasutades $2^{-\Delta\Delta CT}$ meetodit. q-RT-PCR ga valideeriti erinevate praimerpaaride sobivus ning parimat kasutati CASC3 valgu ekspressioonitaseme määramiseks. GABDH oli juba eelnevalt valideeritud Kristina Kiisholtsi poolt.

5. Tulemused ja arutelu

5.1 CASC3 valgu valik ning järjestusest ennustatud rakku siseneva peptiidi järjestused

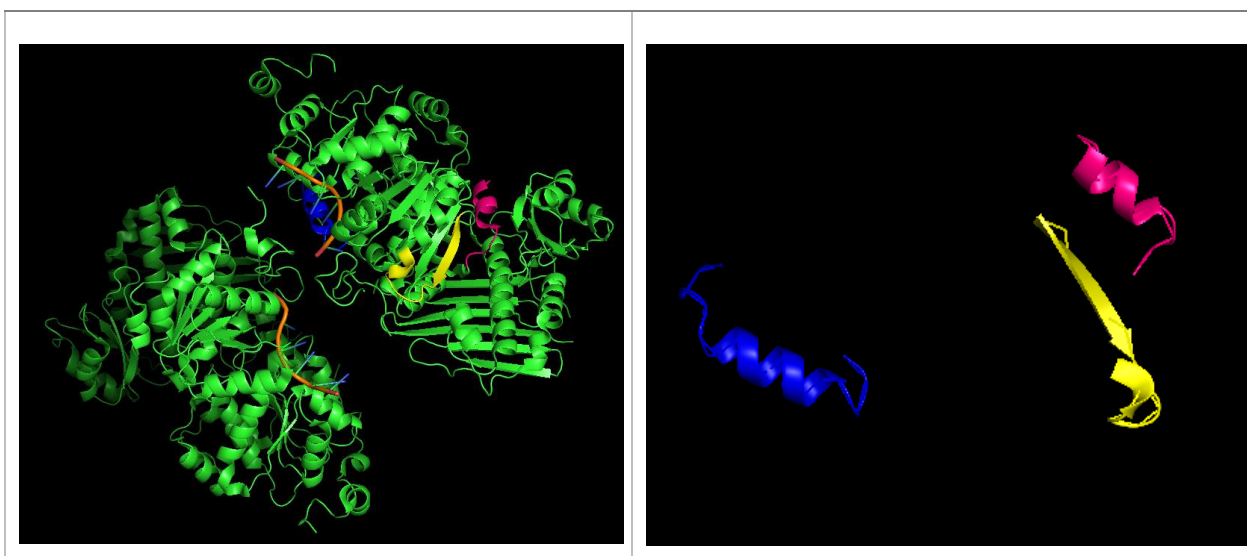
CASC3 valk valiti andud uurimuse jaoks, sest tegemist on tuumas paikneva valguga, millel on teadaolev funktsioon splaissosoomi koosseisus. Tema düsregulatsiooni on seostatud haisusseisundite tekkega. Kui kunagi arvati, et CASC3 valk on eksonühenduskompleksi keskseks osaks, siis hilisemate uuringute käigus on leitud, et CASC3 on pigem perifeerne eksonühenduskompleksi valk, mis kohandab transkriptomit, soodustades EJC-st sõltuvate NMD substraatide lagundamist (Gerbracht *et al.*, 2020). CASC3 valk mõjutab mRNA töötlemist, mRNA splaissimist, mRNA transporti, NMD substraatide lagundamist, stressvastuseid, transkriptsiooni regulatsiooni ja transporti. Samuti on CASC3 düsregulatsiooni seostatud erinevate haigusseisunditega, nagu näiteks glioom, testiste vähk jpt (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108349-CASC3/pathology>). CASC3 sisaldab NLS järjestust ning on inimese valk, millel on juba andmebaasides olemas tema aminohappeline järjestus. Samuti on CASC3 seotud splaissosoomiga, mis on oluline selleks, et panna kokku toimiv EJC ja kontrollida mRNA kvaliteeti. CASC3 roll, osana splaissosoomist, on splaissida eel-mRNA-d. Valisin selle valgu ja antud regioonid, sest need regioonid on kas vajalikud RNA-ga seondumiseks, interaktsiooniks MAGOH-ga või lokaliseerumiseks tuumatähniketes. Samuti sisaldavad valitud regioonid NLS järjestusi või moodustavad heeliks struktuure. Ennustuse tulemuste koondtabel on ära toodud lisas 1.

Uurimuses leiti CASC3 regioonid, mis ennustuste kohaselt sisaldasid kõige enam potentsiaalselt RSP-sid. Nendeks regioonideks osutusid regioonid 50-70, 200-250 ning 400-450. Samuti on teada, et CASC3 valgus regioonid 226-228 ja 230-240 moodustavad heeliksstruktuuri ning regioon 377-703 sisaldab NLS järjestust. Peale ennustusprogrammidega ennustamist saadi kokku skooriga 3 järjestusi 86 ning summaarselt skooriga 2 ja 3 järjestusi kokku 521. Kõigist nendest järjestustest 28 sisaldasid ka NLS järjestust. CASC3st ennustatud potentsiaalsetele RSPdele viidi läbi ka teise ringi ennustamised, kasutades programme SkipCPP-Pred (<http://server.malab.cn/SkipCPP-Pred/Index.html>) ja CellPPD (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/cellppd/algo.php>). Nende programmidega olid ennustatud peptiidid, mis olid pikemad kui 10 aminohapet ning olid ka teiste ennustusprogrammide alusel potentsiaalsed RSP-d. Langel ennustusprogrammi eeliseks eelmainitud SkipCPP-Pred ja CellPPD ees on võimalus kasutada sisendina FASTA formaadis täispikka valgujärjestust. Teistel ennustusprogrammidel on suurused limiteeritud. CellPPD eeliseks on, et lisaks

ennustusskoorile annab ta kaasa ka arvutuslikud parameetrid, nagu molekulmass, pI ning võimaluse ennustada nendes järjestustes ühe aminohappe muutusest tulenevaid erinevusi. See tähendab seda, et kui näiteks teha mõnes positsioonis aminohappe muutus, kas see võimaldaks ennustuse alusel saavutada oluliselt parema ennustusskooriga peptiidjärjestuse. Samuti saab CellPPD-ga korruga ennustada palju erinevaid peptiide. SkipCPP-Pred omakorda nõuab sisendiks väga konkreetselt esitatud järjestusi, mis muudab suure hulga peptiidide ennustamise mõnevõrra ajakulukaks.

5.2 Valitud peptiidjärjestused

Sünteesiks valiti kolm CASC3 järjestusel põhinevat ennustatud RSP järjestust: CASC3 regioonid 250-264, 192-210 ja 402-421 (märgitud Joonisel 3). Kontrolliks valiti lisaks ka RSP Tat₄₈₋₆₀.



Joonis 3. PyMOL programmiga visualiseeritud CASC3 (homo sapiens) valgu struktuur - <https://www.rcsb.org/3d-view/3EX7/1> Märgitud need osad, kust on ennustatud peptiidid: Kollane CACS3₂₅₀₋₂₆₃; sinine CACS3₁₉₂₋₂₁₀, roosa CASC3₄₀₂₋₄₂₁. Parempoolsel joonisel on ära märgitud positsioon terves järjestuses, teisel pildil on ära märgitud vaid ennustatud RSP osad.

CASC3 regioonis 254-262 asub teadaolev NLS. Peptiid sai erinevatelt programmideelt paljutõotavad skoorid, vastavalt Hansen *et al.* programmilt skoori 3, SkipCPP-Pred programmilt skoori 0,787 ning CellPPD programmilt skoori 0,24. Kahe CASC3 peptiidi edasiarenduse puhul said valituks regionoid 192-210 ning 402-421. Esimene sai Hansen *et al.* ennustusprogrammilt skooriks 2/3 ja SkipCPP-Pred programmilt skooriks 0,653/0,733. Teine

CASC3 edasiarendus, regiooniga 402-421 koos C-terminaalsete lüsiinidega, sai aga üle ootuste head skoorid. Hansen *et al.* programmist 3 ning SkipCPP-Pred programmist 0,913. (Tabel 5)

Tabel 5. Sünteesil aluseks võetud peptiidjärjestused ja nende ennustusskoorid. Langeli labori ennustusprogramm annab skoorid 1, 2 ja 3, kus 2 ja 3 on ennustuse põhjal tõenäolisemalt RSP. SkipCPP-Pred skaala on 0-1, kus 1 on tõenäolisemalt RSP. CellPPD annab skoori 0-1, kus 1 on tõenäolisemalt RSP. * Kuna Tat RSP on ka ennustusprogrammi treeningsetis, siis on skoor >1.

Peptiid	Järjestus	Hansen <i>et al</i> 2008 programmi skoor (0-3)	SkipCPP -Pred (0- 1)	CellPPD SVM skoor (0- 1)
TAT ₄₈₋₆₀	GRKKRRQRRRPPQ-NH ₂	3	0,98	1,37*/RSP
CASC 3 ₂₅₀₋₂₆₄	PDDIKPRRIRKPRY-NH ₂	3	0,787	0,24/RSP
CASC 3 ₁₉₂₋₂₁₀	DLRGQTQEEVVRPKGRQRK-NH ₂	2	0,653	0,15/mitte -RSP
CASC 3 ₁₉₂₋₂₁₀ (KK)	DLRGQTQEEVVRPKGRQRKKK-NH ₂	3	0,733	0,07/RSP
CASC 3 ₄₀₂₋₄₂₁	KSYSRARRTRTKVGDAVKLA-NH ₂	3	0,913	0,02/RSP

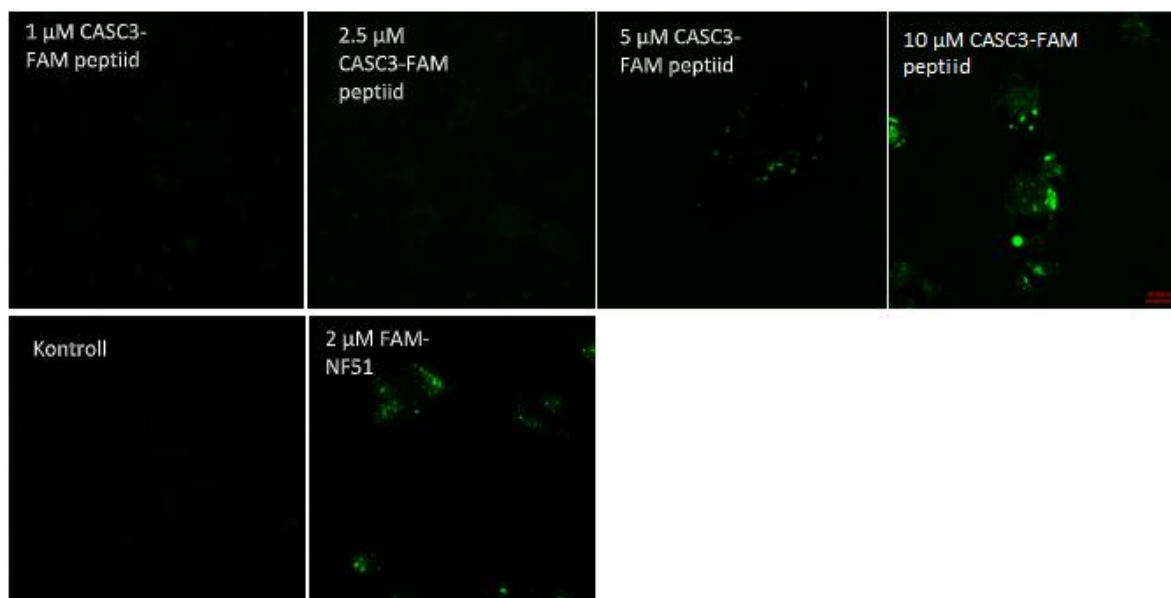
5.3 Valitud peptiidjärjestuste süntees

Valituks osutunud CASC3 peptiidid sünteesiti käsitsi ning kontrollpeptiid TAT₄₈₋₆₀ sünteesiti masinaga. Fluorestsentsmärgisega NickFect51 oli juba varasemalt sünteesitud. Süntees õnnestus kahe peptiidi puhul, TAT₄₈₋₆₀ ja CASC₃₂₅₀₋₂₆₄. Nende puhul oli saagis piisavalt suur, et viia läbi ka rakukultuuri katsed. Kolme ülejäänud peptiidi süntees ebaõnnestus ka peale sünteesi kordamist ja puhastusprotokolli modifitseerimist. Nende peptiidide puhul püsis lahustuvusprobleem ning ei olnud võimalik saada piisavalt saagist viimaks läbi rakukultuuri katseid.

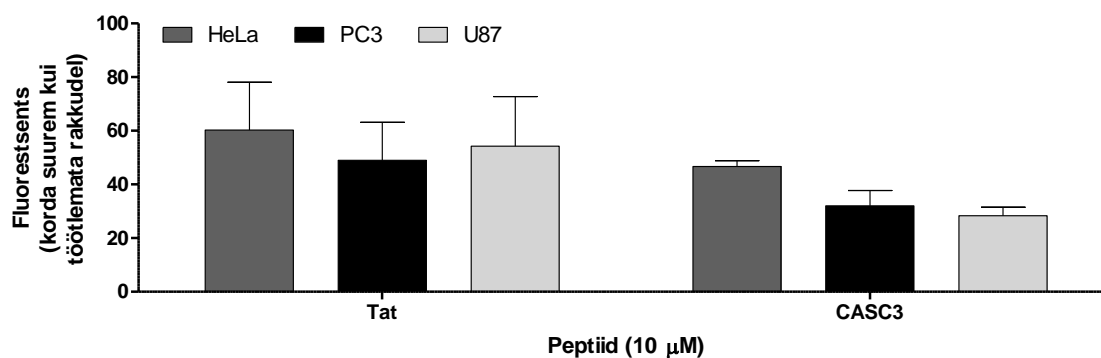
5.4 Sünteesitud peptiidi rakku sisenemise hindamine

Sünteesitud peptiidi rakku sisenemist hinnati rakulüsaadist ning ka konfokaalmikroskoopiaga. Fluorestsentsmärgisega peptiidilt mõõdeti fluorestsentsi rakku sisenemisel 2h peale peptiidi lisamist rakkudele rakusöötmes. Testiti kontsentratsioonivahemikku 1 – 10 μM . Nii 5 kui ka 10 μM peptiidi lisamise järel oli fluorestsents detekteeritav rakus saame järeldada, et peptiidi rakku sisenemine on olnud edukas. (Joonis 4A). Rakku sisenemist kontrolliti ka rakulüsaadist fluorestsentssignaali detekteerimisega (Joonis 4B) kolmest erinevast rakuliinist, kaasa arvatud raskesti transfekteeritavast PC3 ja U87 rakkudest. HeLa rakkude puhul oli CASC3 rakkude fluorestsents ~50x suurem, kui töötlemata rakkude puhul (kontrollgrupp TAT₄₈₋₆₀₋₁ ~60x suurem). PC3 rakkude puhul oli CASC3 rakkude fluorestsents ~40x suurem, kui töötlemata rakkude puhul (kontrollgrupp TAT₄₈₋₆₀₋₁ ~50x suurem) ning kasutades U87 rakke, oli CASC3 fluorestsents ~30x kõrgem, kui töötlemata rakkude puhul (kontrollgrupp TAT₄₈₋₆₀₋₁ ~55x suurem). Siit järeldub, et parimaid tulemusi andis HeLa rakkude kasutamine. Nii konfokaalmikroskoopiast kui ka rakulüsaadist mõõtmisel on CASC3-st ennustatud ja katseks sünteesitud peptiid tõesti RSP, sest on võimeline sisenema rakkudesse ning võimaldab signaali detekteerida ka rakus sees. Kuigi rakulüsaadist mõõdetult oli signaal madalam kui Tat₄₈₋₆₀ RSP-l, on võimalik CASC3 tuletatud peptiidi muuta efektiivsemaks RSP-ks.

A)



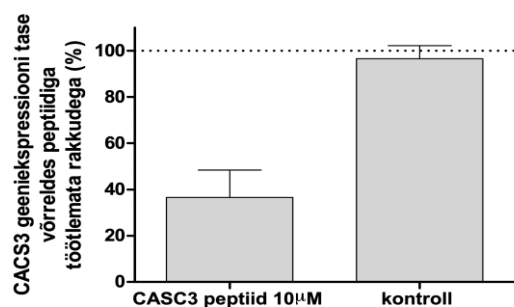
B)



Joonis 4. Peptiidi sisenemine raku ja interaktsioon rakumembraanidega. A) Fluorestsents fluorestsentsmärgisega peptiidilt. Signaal detekteeritud rakulüsaadist 2 h peale peptiidi (lõppkontsentratsioon 10 µM) lisamist rakkudele rakusöötmes. Rakud seerumiga söötmes (10 % FBS). Mõõdetud HeLa, PC3 ja U87 rakulüsaadist. B) Konfokaalmikroskoopia 4 h peale peptiidi pealekandmist. U87 rakud. Fluorestsentsmärgisega peptiidid

5.5 CASC3 geenekspressiooni hindamine peale peptiidi lisamist rakkudele

Peptiidide puhul on oluline nende ohtutus. Joonisel 5 on näidatud CASC3 geeni ekspresioonitase U87 rakkudes peale peptiidi lisamist, võrreldes töötlemata rakkudega. Katsegrupina kasutati U87 rakke, millele lisatud peptiidi vesilahus lõppkontsentratsiooniga 10 µM. Kontrollgrupiks olid U87 rakud millele lisatud samas ruumalas ülipuhast vett. CASC3 peptiidi geeniekspressiooni tase võrreldes kontrolliga on küllaltki madal. Antud tulemustest ei ole võimalik järeldada, kas tegemist on toksilise efektiga rakkudele või spetsiifilise CASC3 ekspresioonitaseme mõjutamisega peptiidi poolt. Selle täpsustamiseks oleks võimalik kasutada erinevaid toksilisuse määramise meetodeid, näiteks totaalvalgu või DNA määramist peale inkubatsiooni peptiidiga, või ka toksilisuse määramise komplekte, millest levinuim MTS, kus sõltuvalt raku metaboolsest aktiivsusest konverteeritakse tetrasoolium formasaaniks, mida on võimalik mõõta 490 lainepikkusel absorptsioonina.



Joonis 5. U87 rakkudes CASC3 geeni ekspressioonitase. Kontrollgrupile lisatud samas ruumalal MQ vett. Katsegrupile lisatud peptiidi vesilahus, lõppkontsentratsiooniga 10 μM. Tulemused on normaliseeritud töötlemata rakkude suhtes (kontrollgrupp vs katsegrupp). qRT-PCR $\Delta\Delta t$ väärtused. Erinevus aktiin beeta ning CASC3 geeniekspressiooni vahel on võrreldud katsegrupi sama väärtusega. Praimerpaar 3.

5.6 Edasised etapid

RSP ennustusprogrammidega oli võimalik CASC3-st ennustada suurel hulgal potentsiaalseid RSPsid, mida saab kasutada edasiseks tööks ning peptiidide valikuks. Neid järjestusi on võimalik edaspidi kasutada ka sisendada võimalike potentsiaaste interaktsioonide selgitamiseks.

Üheks peamiseks probleemiks antud töö raames oli ebaõnnestunud peptiidisüntees. Kuna tegemist oli käsitsisünteesiga, siis oli see väga ajamahukas. Kuigi MALDI tulemused peale sünteesi produktide detektsioonil olid lubavad, osutus peale HPLC-ga puhastus saagis niivõrd väikseks, et peptiide ei olnud võimalik rakukatseteks kasutada. Kuna CellPPD ning CPPSkip-Pred andsid kõigile peptiididele erinevad hinnagud, oleks olnud huvitav näha kuidas nende intensiivsused nii konfokaalikatses kui ka rakulüsaadist detektsioonil oleks erinenud CASC3₂₅₀₋₂₆₄ peptiidist. Lisaks oleks vajalik täpsustada antud peptiidide võimalik toime rakkude elumisele ning spetsiifilise interaktsiooni võimalikkus.

6. Kokkuvõte

Töös anti kirjanduslik ülevaade CASC3 valgust ja tema ülesannetest. CASC3 valk on geeni CASC3 poolt kodeeritud valk inimese 17. kromosoomis ning tema üleregulatsiooni on seostatud erinevate haigusseisundite tekkega. Enim on CASC3 üleregulatsiooniga on seostatud erinevad kartsinoomid, nt hepatotsellulaarne kartsinoom, mis on üks esmase maksavähi vorme (Xu *et al.*, 2016). CASC3 on osaks splaissosoomist ning selle ülesanne on panna kokku toimiv ekson-ühendus kompleks ja kontrollida seeläbi mRNA kvaliteeti.

Samuti tehti ülevaade rakku sisenevatest peptiididest ning erinevatest RSP-de ennustusprogrammidest. Rakku sisenevad peptiidid on keskmiselt 5-30 aminohappest koosnevaid peptiidid, mis on võimelised sisenema rakku ja endaga kaasa viima kas endaga kovalentselt või mitte-kovalentselt seotud lastmolekule. RSP-de ennustusprogrammid millest tehti ülevaade olid: CPPpred, CPPSkip-Pred, CellPPd ning põgus ülevaade tehti ka CPPred-RF, MLCPP ja KELM-CPPpred programmidest.

Töö esimene eesmärk oli valida üks tuumas lokaliseeruv kandidaatvalk, millel on valguandmebaasides olemas teadaolev valgujärjestus ning seos haiguse tekkega. Selleks kandidaatvalguks osutus CASC3 valk. Järgmine eesmärk oli valitud valgujärjestuse põhjal ennustada RSP ennustusprogrammide abil potentsiaalsed RSPd. Nendeks potentsiaalseteks RSP-deks osutusid CASC3₂₅₀₋₂₆₄, CASC3₁₉₂₋₂₁₀, CASC3₄₀₂₋₄₂₁ ja CASC3₄₀₂₋₄₂₁ (KK) ning kontrollpeptiid TAT₄₈₋₆₀. Kolmandaks eesmärgiks oli valitud peptiidid ka sünteesida. Rakukatseteks piisava saagisega õnnestus süntees kahe peptiidi puhul, TAT₄₈₋₆₀ ja CASC3₂₅₀₋₂₆₄. Teiste peptiidide puhul jäi saagikus ka peale kordussünteesi ja puhastusprotokoll muudatust liiga madalaks. Neljas töö eesmärk oli testida peptiidi sisenemisvõimet, võrreldes teadaoleva fluorestsentsmärgisega RSPdega. Peptiidi sisenemisvõimet testides jõuti järelduseni, et peptiid on võimeline rakku sisenema ning parimaid tulemusi andis HeLa rakkude kasutamine. Viimaseks eesmärgiks oli testida ka peptiidi mõju rakkudes CASC3 ekspressioonile, võrreldes töötlemata rakkudega. Katsest selgus, et CASC3 peptiidi geeniekspressiooni tase võrreldes kontrolliga oli küllaltki madal. Samas oli tegu alles esimese etapiga ning ei saa väita, et CASC3 toksilisus oli see faktor, mis tõmbas aktiivust liialt alla. Kokkuvõtvalt saab öelda, et RSP-de ennustamine valgu täisjärjestusest pakub uusi võimalusi RSPde rakendamiseks ning multifunktsionaalsete peptiidide loomiseks ja on kindlasti huvitav ja edasiviiv suund geneetika ning meditsiini valdkonnas. Kindlasti tasub seda teemat edasi

uurida, sest ka antud uuringu lühikestest katsetest nähtub, et potentsiaali töötavate RSP-de leidmiseks on.

Peptiidid võimaldaksid PPI modulatsiooni - praeguse töö eesmärk oli disainida RSP, järgmiseks sammuks oleks leida peptiid, mis oleks nii RSP kui ka PPI modulaator

The effect of a cell penetrating peptide predicted from the CASC3 protein sequence on cells in vitro

Krislin Raus

Summary

This thesis gave a literary review of the CASC3 protein and its functions. The CASC3 protein is a protein encoded by the CASC3 gene on the human chromosome 17 and its upregulation has been associated with a variety of diseases. Various carcinomas, such as hepatocellular carcinoma, a form of primary liver cancer, have been most commonly associated with CASC3 overregulation (Xu *et al.*, 2016). CASC3 is part of the spliceosome and its function is to assemble a functional exon-junction complex and thereby control the quality of mRNA.

Cell penetrating peptides and various CPP prediction programs were also reviewed. Cell penetrating peptides are on average of 5-30 amino acids long. They are capable of entering a cell and carrying with them covalently or non-covalently linked cargo molecules. The CPP prediction programs reviewed were: CPPpred, CPPSkip-Pred, CellPPd, and a brief overview of the CPPred-RF, MLCPP, and KELM-CPPpred programs was also provided.

The first objective of the study was to select one candidate protein localized in the nucleus, which has a known protein sequence in protein databases and is associated with disease development. The CASC3 protein proved to be this candidate protein. Another objective was to predict potential CPPs using CPP prediction programs based on the selected protein sequence. These potential CPPs were CASC3₂₅₀₋₂₆₄, CASC3₁₉₂₋₂₁₀, CASC3₄₀₂₋₄₂₁ and CASC3₄₀₂₋₄₂₁ (KK) and the control peptide TAT₄₈₋₆₀. A third objective was to synthesize the selected peptides. Synthesis with a sufficient yield for cell experiments was successful for two of the peptides, TAT₄₈₋₆₀ and CASC3₂₅₀₋₂₆₄. For the other peptides, the yield remained too low even after resynthesis and modification of the purification protocol. The fourth objective was to test the ability of the peptide to enter a cell against known CPPs with a fluorescent label. After testing it was concluded that the peptide is able to enter the cell, and the use of HeLa cells gave the best results. The final objective was to test the effect of the peptide on CASC3 expression in cells compared to untreated cells. The experiment showed that the level of gene expression of the CASC3 peptide was rather low compared to the control. However, this was

only the first step and it cannot be said that the toxicity of CASC3 was the factor that reduced the activity. In summary, predicting CPPs from the full sequence of a protein offers new opportunities for the application of CPPs and the creation of multifunctional peptides, and is certainly an interesting and forward-looking direction in genetics and medicine. It is definitely worth exploring this topic further, as the brief experiments in this study also show that there is potential to find working CPPs.

Peptides would allow for PPI modulation - the aim of the current work was to design a CPP, the next step would be to find a peptide that would be a modulator of both CPP-s and PPI.

7. Kasutatud kirjanduse loetelu

1. Agrawal, Piyush, Sherry Bhalla, Salman Sadullah Usmani, Sandeep Singh, Kumardeep Chaudhary, Gajendra P. S. Raghava, and Ankur Gautam. "CPPsite 2.0: A Repository of Experimentally Validated Cell-Penetrating Peptides." *Nucleic Acids Research* 44, no. D1 (January 4, 2016): D1098–1103. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1266>.
2. Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science, 2002.
3. Banting, F. G., C. H. Best, J. B. Collip, W. R. Campbell, ja A. A. Fletcher. „Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus“. *Canadian Medical Association Journal* 12, nr 3 (märts 1922): 141–46.
4. Bechara, Chérine, and Sagan, Sandrine. (2013) Cell-Penetrating Peptides: 20 years later, Where Do We Stand? *FEBS Letters* 587, no. 12: 1693–1702. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>.
5. Bièche, I., C. Tomasetto, C. H. Régnier, C. Moog-Lutz, M. C. Rio, ja R. Lidereau. „Two Distinct Amplified Regions at 17q11-Q21 Involved in Human Primary Breast Cancer“. *Cancer Research* 56, nr 17 (1. september 1996): 3886–90.
6. Cerrato, Carmine Pasquale, Tõnis Lehto, and Ülo Langel. "Peptide-Based Vectors: Recent Developments." *Biomolecular Concepts* 5, no. 6 (December 1, 2014): 479–88. <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0024>.
7. Copolovici, D.M., Langel, Kent, Eriste, Elo and Langel, Ülo. (2014) Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications. *ACS Nano* 8, no. 3: 1972–94. <https://doi.org/10.1021/nn4057269>.
8. Cougot, Nicolas, Elisabeth Daguinet, Aurélie Baguet, Annie Cavalier, Daniel Thomas, Pascale Bellaud, Alain Fautrel, *et al.* "Overexpression of MLN51 Triggers P-Body Disassembly and Formation of a New Type of RNA Granules." *Journal of Cell Science* 127, no. Pt 21 (November 1, 2014): 4692–4701. <https://doi.org/10.1242/jcs.154500>.
9. Cour, Tanja la, Lars Kiemer, Anne Mølgaard, Ramneek Gupta, Karen Skriver, and Søren Brunak. "Analysis and Prediction of Leucine-Rich Nuclear Export Signals." *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS* 17, no. 6 (June 2004): 527–36. <https://doi.org/10.1093/protein/gzh062>.

10. Craik, David J., David P. Fairlie, Spiros Liras, and David Price. "The Future of Peptide-Based Drugs." *Chemical Biology & Drug Design* 81, no. 1 (2013): 136–47.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.12055>.
11. Crommelin, Daan J. A., Gert Storm, Ruud Verrijck, Leo de Leede, Wim Jiskoot, ja Wim E. Hennink. „Shifting Paradigms: Biopharmaceuticals versus Low Molecular Weight Drugs“. *International Journal of Pharmaceutics*, A Special Issue for Professor Hans E. Junginger on the occasion of his 60th birthday, 266, nr 1 (6. november 2003): 3–16.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00376-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00376-4).
12. D, Sanjay Kumar and D. R. Harish Kumar. „Importance of RP-HPLC in Analytical Method Development: A Review.“ *IJPSR* (2012), Vol. 3, Issue 12
13. Derakhshankhah, Hossein, and Samira Jafari. "Cell Penetrating Peptides: A Concise Review with Emphasis on Biomedical Applications." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 108 (December 1, 2018): 1090–96. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.097>.
14. Ezzat, Kariem, Samir E. L. Andaloussi, Eman M. Zaghloul, Taavi Lehto, Staffan Lindberg, Pedro M. D. Moreno, Joana R. Viola, *et al.* "PepFect 14, a Novel Cell-Penetrating Peptide for Oligonucleotide Delivery in Solution and as Solid Formulation." *Nucleic Acids Research* 39, no. 12 (July 2011): 5284–98.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr072>.
15. Fosgerau, Keld, ja Torsten Hoffmann. „Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions“. *Drug Discovery Today* 20, nr 1 (jaanuar 2015): 122–28.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>.
16. Fu, Bo, Wei Long, Ying Zhang, Aifeng Zhang, Fengqin Miao, Yuqing Shen, Ning Pan, *et al.* "Enhanced Antitumor Effects of the BRBP1 Compound Peptide BRBP1-TAT-KLA on Human Brain Metastatic Breast Cancer." *Scientific Reports* 5, no. 1 (January 26, 2015): 8029. <https://doi.org/10.1038/srep08029>.
17. Galdiero, Stefania, ja Paula Gomes. „Peptide-Based Drugs and Drug Delivery Systems“. *Molecules* 22, nr 12 (8. detsember 2017): 2185.
<https://doi.org/10.3390/molecules22122185>.
18. Gautam, Ankur, Kumardeep Chaudhary, Rahul Kumar, Arun Sharma, Pallavi Kapoor, Atul Tyagi, Open source drug discovery consortium, ja Gajendra P. S. Raghava. „In Silico Approaches for Designing Highly Effective Cell Penetrating Peptides“. *Journal of Translational Medicine* 11 (22. märts 2013): 74. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-74>.
19. Gehring, Niels H., Styliani Lamprinaki, Matthias W. Hentze, and Andreas E. Kulozik. "The Hierarchy of Exon-Junction Complex Assembly by the Spliceosome Explains Key

- Features of Mammalian Nonsense-Mediated mRNA Decay.” *PLOS Biology* 7, no. 5 (May 26, 2009): e1000120. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000120>.
20. Gerbracht, Jennifer V, Volker Boehm, Thiago Britto-Borges, Sebastian Kallabis, Janica L Wiederstein, Simona Ciriello, Dominik U Aschemeier, *et al.* “CASC3 Promotes Transcriptome-Wide Activation of Nonsense-Mediated Decay by the Exon Junction Complex.” *Nucleic Acids Research* 48, no. 15 (September 4, 2020): 8626–44. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa564>.
 21. Goodwin, D., P. Simerska, ja I. Toth. „Peptides As Therapeutics with Enhanced Bioactivity“. *Current Medicinal Chemistry* 19, nr 26 (1. september 2012): 4451–61. <https://doi.org/10.2174/092986712803251548>.
 22. Gray, Nicola K., and Mattias W. Hentze. “Regulation of Protein Synthesis by mRNA Structure.” *Molecular Biology Reports* 19, no. 3 (May 1, 1994): 195–200. <https://doi.org/10.1007/BF00986961>.
 23. Habault, Justine, and Jean-Luc Poyet. “Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies.” *Molecules (Basel, Switzerland)* 24, no. 5 (March 7, 2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24050927>.
 24. Holton, Thérèse A., Gianluca Pollastri, Denis C. Shields, ja Catherine Mooney. „CPPpred: Prediction of Cell Penetrating Peptides“. *Bioinformatics* 29, nr 23 (1. detsember 2013): 3094–96. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt518>.
 25. Hällbrink, Mattias, Kalle Kilk, Anna Elmquist, Pontus Lundberg, Maria Lindgren, Yang Jiang, Margus Pooga, Ursel Soomets, ja Ülo Langel. „Prediction of Cell-Penetrating Peptides“. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 11, nr 4 (detsember 2005): 249–59. <https://doi.org/10.1007/s10989-005-9393-1>.
 26. Khalil, I. A., Kentaro Kogure, Hidetaka Akita, and Hideyoshi Harashima. (2006) Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery. *Pharmacological Reviews* 58, no. 1: 32–45. <https://doi.org/10.1124/pr.58.1.8>.
 27. Koren, Erez, and Torchilin, V.P. (2012) Cell-Penetrating Peptides: Breaking through to the Other Side. *Trends in Molecular Medicine* 18, no. 7: 385–93. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.012>.
 28. Lange, Allison, Laura M. McLane, Ryan E. Mills, Scott E. Devine, and Anita H. Corbett. “Expanding the Definition of the Classical Bipartite Nuclear Localization Signal.” *Traffic* 11, no. 3 (2010): 311–23. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.01028.x>.

29. Lau, Jolene L., ja Michael K. Dunn. „Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions“. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 26, nr 10 (juuni 2018): 2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>.
30. Lee, Andy Chi-Lung, Janelle Louise Harris, Kum Kum Khanna, ja Ji-Hong Hong. „A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design“. *International Journal of Molecular Sciences* 20, nr 10 (14. mai 2019): 2383. <https://doi.org/10.3390/ijms20102383>.
31. Lindgren, Maria, and Langel, Ülo. (2011) Classes and Prediction of Cell-Penetrating Peptides. In *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols*, edited by Ülo Langel, 3–19. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-919-2_1.
32. Lu, Haiying, Qiaodan Zhou, Jun He, Zhongliang Jiang, Cheng Peng, Rongsheng Tong, and Jianyou Shi. “Recent Advances in the Development of Protein–Protein Interactions Modulators: Mechanisms and Clinical Trials.” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5, no. 1 (September 23, 2020): 1–23. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00315-3>.
33. Luo, Yang, Zhenkun Na, and Sarah A. Slavoff. “P-Bodies: Composition, Properties, and Functions.” *Biochemistry* 57, no. 17 (May 1, 2018): 2424–31. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01162>.
34. Milletti, Francesca. „Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape“. *Drug Discovery Today* 17, nr 15 (1. august 2012): 850–60. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002>.
35. Mäe, Maarja, ja Ülo Langel. „Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery“. *Current Opinion in Pharmacology, Anti-infectives/New Technologies*, 6, nr 5 (1. oktoober 2006): 509–14. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.004>.
36. Pae, Janely and Pooga, Margus. (2014) Peptide-Mediated Delivery: An Overview of Pathways for Efficient Internalization. *Therapeutic Delivery* 5, no. 11: 1203–22. <https://doi.org/10.4155/tde.14.72>.
37. Pan, Chensong, Songyun Xu, Houjiang Zhou, Yu Fu, Mingliang Ye, and Hanfa Zou. “Recent Developments in Methods and Technology for Analysis of Biological Samples by MALDI-TOF-MS.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, no. 1 (January 1, 2007): 193–204. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0905-4>.

38. Pooga, Margus, Mattias Hällbrink, Matjal Zorko, and Ülo Langel. "Cell Penetration by Transportan." *The FASEB Journal* 12, no. 1 (1998): 67–77.
<https://doi.org/10.1096/fsb2fasebj.12.1.67>.
39. Protter, David S. W., and Roy Parker. "Principles and Properties of Stress Granules." *Trends in Cell Biology* 26, no. 9 (September 1, 2016): 668–79.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.004>.
40. Richards, S. A., K. M. Lounsbury, K. L. Carey, and I. G. Macara. "A Nuclear Export Signal Is Essential for the Cytosolic Localization of the Ran Binding Protein, RanBP1." *The Journal of Cell Biology* 134, no. 5 (September 1996): 1157–68.
<https://doi.org/10.1083/jcb.134.5.1157>.
41. Sandberg, Maria, Lennart Eriksson, Jörgen Jonsson, Michael Sjöström, ja Svante Wold. „New Chemical Descriptors Relevant for the Design of Biologically Active Peptides. A Multivariate Characterization of 87 Amino Acids“. *Journal of Medicinal Chemistry* 41, nr 14 (1. juuli 1998): 2481–91. <https://doi.org/10.1021/jm9700575>.
42. Singhal, Neelja, Manish Kumar, Pawan K. Kanaujia, and Jugsharan S. Viridi. "MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Emerging Technology for Microbial Identification and Diagnosis." *Frontiers in Microbiology* 6 (August 5, 2015).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>.
43. Zhan, Xiechao, Chuangye Yan, Xiaofeng Zhang, Jianlin Lei, ja Yigong Shi. „Structure of a Human Catalytic Step I Spliceosome“. *Science (New York, N.Y.)* 359, nr 6375 (02 2018): 537–45. <https://doi.org/10.1126/science.aar6401>.
44. Zhang, Xiaofeng, Chuangye Yan, Jing Hang, Lorenzo I. Finci, Jianlin Lei, ja Yigong Shi. „An Atomic Structure of the Human Spliceosome“. *Cell* 169, nr 5 (18. mai 2017): 918-929.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.033>.
45. Turkin, Alexander, Lei Zhang, Alessio Marozzi, Walter F. Mangel, Andreas Herrmann, and Antoine M. van Oijen. "Speeding up Biomolecular Interactions by Molecular Sledding." *Chemical Science* 7, no. 2 (January 26, 2016): 916–20.
<https://doi.org/10.1039/C5SC03063C>.
46. Wagstaff, Kylie M., and David A. Jans. "Protein Transduction: Cell Penetrating Peptides and Their Therapeutic Applications." *Current Medicinal Chemistry* 13, no. 12 (2006): 1371–87. <https://doi.org/10.2174/092986706776872871>.
47. Wang, Feihu, Wang, Yun, Zhang, Xiao, Zhang, Wenjun, Guo, Shengrong and Jin, Fang. (2014) Recent Progress of Cell-Penetrating Peptides as New Carriers for Intracellular

- Cargo Delivery. *Journal of Controlled Release* 174: 126–36.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.11.020>.
48. Wei, Leyi, Jijun Tang, and Quan Zou. “SkipCPP-Pred: An Improved and Promising Sequence-Based Predictor for Predicting Cell-Penetrating Peptides.” *BMC Genomics* 18, no. 7 (October 16, 2017): 742. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4128-1>.
49. Wei, Leyi, PengWei Xing, Ran Su, Gaotao Shi, Zhanshan Sam Ma, ja Quan Zou. „CPPred-RF: A Sequence-based Predictor for Identifying Cell-Penetrating Peptides and Their Uptake Efficiency“. *Journal of Proteome Research* 16, nr 5 (5. mai 2017): 2044–53. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00019>.
50. Wilkinson, Max E., Clément Charenton, and Kiyoshi Nagai. “RNA Splicing by the Spliceosome.” *Annual Review of Biochemistry* 89, no. 1 (2020): 359–88. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-091719-064225>.
51. Will, Cindy L., ja Reinhard Lührmann. „Spliceosome Structure and Function“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, nr 7 (juuli 2011). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>.
52. Von Mering, J., ja O. Minkowski. "Diabetes mellitus after pancreas extirpation." *Arch Exp Pathol Pharmacol* 26 (1889): 111.
53. Woodward, Lauren A., Justin W. Mabin, Pooja Gangras, and Guramrit Singh. “The Exon Junction Complex: A Lifelong Guardian of mRNA Fate.” *WIREs RNA* 8, no. 3 (2017): e1411. <https://doi.org/10.1002/wrna.1411>.
54. Xiong, Kan, Graham S. Erwin, Aseem Z. Ansari, ja Paul C. Blainey. „Sliding on DNA: from peptides to small molecules“. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 55, nr 48 (21. november 2016): 15110–14. <https://doi.org/10.1002/anie.201606768>.
55. Xiong, Kan, ja Paul C. Blainey. „Molecular Sled Sequences Are Common in Mammalian Proteins“. *Nucleic Acids Research* 44, nr 5 (18. märts 2016): 2266–73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw035>.
56. Xu, Ling, Weiqi Dai, JingJing Li, Lei He, Fan Wang, Yujing Xia, Kan Chen, *et al.* “Methylation-Regulated MiR-124-1 Suppresses Tumorigenesis in Hepatocellular Carcinoma by Targeting CASC3.” *Oncotarget* 7, no. 18 (May 3, 2016): 26027–41. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8266>.

7.1 Kasutatud veebiaadressid

1. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108349-CASC3#gene_information
(28.05.2020)
2. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108349-CASC3/pathology> (28.05.2020)
3. <https://www.uniprot.org/uniprot/O15234> (18.05.2020)
4. Cell PPD - <http://crdd.osdd.net/raghava/cellppd/>
5. CPPpred - http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server_pages/cpppred.php
6. CPPred-RF - <http://server.malab.cn/CPPred-RF/>
7. MLCPP - <http://www.thegleelab.org/MLCPP/>
8. KELM-CPPpred - <http://sairam.people.iitgn.ac.in/KELM-CPPpred.html>
9. <https://term.eki.ee/termbase/view/9054712/> (04.05.2021)
10. <https://www.uniprot.org/uniprot/J3KSY7#function> (28.05.2020)

8. Lisad

Lisa 1

Langeli labori ennustusprogramm (Hällbrink et al 2005 ja Hansen et al 2008)	CellPPD (Gautam et al 2013)	SkipRSP-Pred (Wei et al, 2017)
Järjestused skooriga 2	SVM skoor, tõenäosus olla RSP	Usaldusväärsus RSPle
ALHLRR		
QRKLWKD		
DIKPRRIR		
PKGRQRKLW		
GRQRKLWKD		
RQRKLWKDE		
RKLWKDEGR		
DDIKPRRIR		
DIKPRRIRK		
ARRTRTKVG		
RAKRYSSQR		
EVRPKGRQRK	0.58	0.8733333333333333
KGRQRKLWKD	0.58	0.88
GRQRKLWKDE	0.58	0.7666666666666667
RQRKLWKDEG	0.58	0.7333333333333333
QRKLWKDEGR	0.58	0.7666666666666667
RKLWKDEGRW	0.58	0.7333333333333333
DDIKPRRIRK	0.58	0.8666666666666667
DIKPRRIRKP	0.58	0.8933333333333333
KKSYSRARRT	0.58	0.98
RAKRYSSQRQ	0.58	0.94
AKRYSSQRQR	0.58	0.94
EVRPKGRQRKL	0.58	0.8866666666666667
PKGRQRKLWKD	0.58	0.88
KGRQRKLWKDE	0.58	0.8333333333333334
GRQRKLWKDEG	0.58	0.7666666666666667
RQRKLWKDEGR	0.58	0.84
QRKLWKDEGRW	0.58	0.6733333333333333
RKLWKDEGRWE	0.58	0.7133333333333334
PDDIKPRRIRK	0.58	0.8533333333333334
DDIKPRRIRKP	0.58	0.8533333333333334
IEKSYSRARR	0.58	0.8866666666666667
SRARRTRTKVG	0.58	0.94
EVRPKGRQRKLW	0.58	0.86
RPKGRQRKLWKD	0.58	0.9066666666666666
PKGRQRKLWKDE	0.58	0.78
KGRQRKLWKDEG	0.58	0.7933333333333333

GRQRKLWKDEGR	0.58	0.8466666666666667
RQRKLWKDEGRW	0.58	0.7133333333333334
QRKLWKDEGRWE	0.58	0.6466666666666666
DDIKPRRIRKPR	0.58	0.86
DIKPRRIRKPRY	0.58	0.8333333333333334
KKSYSRARRTRT	0.58	0.98
KSYSRARRTRTK	0.58	0.9866666666666667
RAKRYSSQRQRP	0.58	0.9133333333333333
EVRPKGRQRKLWK	0.58	0.8933333333333333
VRPKGRQRKLWKD	0.58	0.8866666666666667
RPKGRQRKLWKDE	0.58	0.8333333333333334
PKGRQRKLWKDEG	0.58	0.74
KGRQRKLWKDEGR	0.58	0.86
GRQRKLWKDEGRW	0.58	0.7333333333333333
RQRKLWKDEGRWE	0.58	0.6933333333333334
PDDIKPRRIRKPR	0.58	0.8466666666666667
DDIKPRRIRKPRY	0.58	0.8
DIKPRRIRKPRYG	0.58	0.8266666666666667
RPIEKSYSRARR	0.58	0.92
IEKSYSRARRTR	0.58	0.8466666666666667
KKSYSRARRTRTK	0.58	0.9733333333333334
EEVRPKGRQRKLWK	0.58	0.8733333333333333
EVRPKGRQRKLWKD	0.58	0.8
VRPKGRQRKLWKDE	0.58	0.76
RPKGRQRKLWKDEG	0.58	0.8066666666666666
PKGRQRKLWKDEGR	0.58	0.8466666666666667
KGRQRKLWKDEGRW	0.58	0.7666666666666667
GRQRKLWKDEGRWE	0.58	0.7133333333333334
RQRKLWKDEGRWEH	0.58	0.6133333333333333
IEKSYSRARRTRT	0.58	0.8466666666666667
KKSYSRARRTRTKV	0.58	0.9533333333333334
EEEVRPKGRQRKLWK	0.58	0.88
EEVRPKGRQRKLWKD	0.58	0.78
EVRPKGRQRKLWKDE	0.58	0.7466666666666667
VRPKGRQRKLWKDEG	0.58	0.76
RPKGRQRKLWKDEGR	0.58	0.8533333333333334
PKGRQRKLWKDEGRW	0.58	0.7533333333333333
KGRQRKLWKDEGRWE	0.58	0.7533333333333333
RPIEKSYSRARRTR	0.58	0.8866666666666667
IEKSYSRARRTRTK	0.58	0.8933333333333333
EKSYSRARRTRTKV	0.58	0.8733333333333333
KKSYSRARRTRTKVG	0.58	0.96
QEEEVRPKGRQRKLWK	0.58	0.8133333333333334
VRPKGRQRKLWKDEGR	0.58	0.82
RPKGRQRKLWKDEGRW	0.58	0.7666666666666667
PKGRQRKLWKDEGRWE	0.58	0.7333333333333333

KGRQRKLWKDEGRWEH	0.58	0.7066666666666667
RQRKLWKDEGRWEHDK	0.58	0.5133333333333333
DRPIEKKSYSRARRTR	0.58	0.7333333333333333
RPIEKKSYSRARRTRT	0.58	0.8466666666666667
PIEKKSYSRARRTRTK	0.58	0.88
IEKKSYSRARRTRTKV	0.58	0.8466666666666667
EVRPKGRQRKLWKDEGR	0.58	0.7466666666666667
VRPKGRQRKLWKDEGRW	0.58	0.7133333333333334
RPKGRQRKLWKDEGRWE	0.58	0.74
KGRQRKLWKDEGRWEHD	0.58	0.5866666666666667
GRQRKLWKDEGRWEHDK	0.58	0.5333333333333333
RPIEKKSYSRARRTRTK	0.58	0.9
EVRPKGRQRKLWKDEGRW	0.58	0.7066666666666667
VRPKGRQRKLWKDEGRWE	0.58	0.7
RPKGRQRKLWKDEGRWEH	0.58	0.68
KGRQRKLWKDEGRWEHDK	0.58	0.62
RQRKLWKDEGRWEHDKFR	0.58	0.5933333333333334
DRPIEKKSYSRARRTRTK	0.58	0.8
RPIEKKSYSRARRTRTKV	0.58	0.8466666666666667
EEVRPKGRQRKLWKDEGRW	0.58	0.72
EVRPKGRQRKLWKDEGRWE	0.58	0.7
RPKGRQRKLWKDEGRWEHD	0.58	0.6
PKGRQRKLWKDEGRWEHDK	0.58	0.5733333333333334
KGRQRKLWKDEGRWEHDKF	0.58	0.5933333333333334
GRQRKLWKDEGRWEHDKFR	0.58	0.64
RGQTQEEVVRPKGRQRKLWK	0.58	0.76
RPKGRQRKLWKDEGRWEHDK	0.58	0.62
KGRQRKLWKDEGRWEHDKFR	0.58	0.6666666666666666
LRGQTQEEVVRPKGRQRKLWK	0.58	0.82
VRPKGRQRKLWKDEGRWEHDK	0.58	0.5933333333333334
RPKGRQRKLWKDEGRWEHDKF	0.58	0.6133333333333333
PKGRQRKLWKDEGRWEHDKFR	0.58	0.66
KGRQRKLWKDEGRWEHDKFRE	0.58	0.6466666666666666
DLRGQTQEEVVRPKGRQRKLWK	0.58	0.6533333333333333
LRGQTQEEVVRPKGRQRKLWKD	0.58	0.74
RPKGRQRKLWKDEGRWEHDKFR	0.58	0.6666666666666666
VRPKGRQRKLWKDEGRWEHDKFR	0.58	0.64
RPKGRQRKLWKDEGRWEHDKFRE	0.58	0.6466666666666666
RPIEKKSYSRARRTRTKVGDVAVKL	0.58	0.8466666666666667
RPIEKKSYSRARRTRTKVGDVAVKLA	0.58	0.8466666666666667
KGRQRKLWKDEGRWEHDKFREDEQ APKSRQ	0.58	0.52
Järjestused skooriga 3		
NKVGKK		
GALHLRR		
ALHLRRV		

KVGKKGPK		
RTGALHLRR		
GRTGALHLRR	0.58	0.96
RTGALHLRRV	0.58	0.94
ARRTRTKVGD	0.58	0.8533333333333334
RRTRTKVGDA	0.58	0.82
RGGRTGALHLR	0.58	0.9666666666666667
GGRTGALHLRR	0.58	0.9666666666666667
ARRTRTKVGDA	0.58	0.8866666666666667
QGGRTGALHLR	0.58	0.9466666666666667
RGGRTGALHLRR	0.58	0.9666666666666667
RARRTRTKVGDA	0.58	0.8733333333333333
ARRTRTKVGDAV	0.58	0.8666666666666667
RRTRTKVGDAVK	0.58	0.88
RTRTKVGDAVKL	0.58	0.84
QGGRAKRYSSQR	0.58	0.9066666666666666
GGRAKRYSSQRQ	0.58	0.9533333333333334
QGGRTGALHLRR	0.58	0.9733333333333334
RGGRTGALHLRRV	0.58	0.94
SRARRTRTKVGDA	0.58	0.8733333333333333
RARRTRTKVGDAV	0.58	0.88
ARRTRTKVGDAVK	0.58	0.9066666666666666
RRTRTKVGDAVKL	0.58	0.8933333333333333
RTRTKVGDAVKLA	0.58	0.7866666666666666
QGGRAKRYSSQRQ	0.58	0.9
SQRGGRTGALHLRR	0.58	0.9666666666666667
QGGRTGALHLRRV	0.58	0.9133333333333333
YSRARRTRTKVGDA	0.58	0.8266666666666667
SRARRTRTKVGDAV	0.58	0.8533333333333334
RARRTRTKVGDAVK	0.58	0.9
ARRTRTKVGDAVKL	0.58	0.9133333333333333
RRTRTKVGDAVKLA	0.58	0.8533333333333334
SRARRTRTKVGDAVK	0.58	0.8866666666666667
RARRTRTKVGDAVKL	0.58	0.8866666666666667
ARRTRTKVGDAVKLA	0.58	0.8866666666666667
RRTRTKVGDAVKLAE	0.58	0.8
VQGGRAKRYSSQRQR	0.58	0.8733333333333333
EKKSYSRARRTRTKVG	0.58	0.8666666666666667
KSYSRARRTRTKVGDA	0.58	0.86
YSRARRTRTKVGDAVK	0.58	0.84
SRARRTRTKVGDAVKL	0.58	0.88
RARRTRTKVGDAVKLA	0.58	0.8666666666666667
ARRTRTKVGDAVKLAE	0.58	0.8133333333333334
IEKKSYSRARRTRTKVG	0.58	0.8466666666666667
KKSYSRARRTRTKVGDA	0.58	0.8733333333333333
YSRARRTRTKVGDAVKL	0.58	0.8466666666666667

SRARRTRTKVGDAVKLA	0.58	0.88
RARRTRTKVGDAVKLAE	0.58	0.8066666666666666
IEKKSYSRARRTRTKVGD	0.58	0.76
EKKSYSRARRTRTKVGDA	0.58	0.8066666666666666
KKSYSRARRTRTKVGDAV	0.58	0.88
KSYSRARRTRTKVGDAVK	0.58	0.8933333333333333
YSRARRTRTKVGDAVKLA	0.58	0.86
SRARRTRTKVGDAVKLAE	0.58	0.7866666666666666
RARRTRTKVGDAVKLAEE	0.58	0.78
LRGQTQEEVVRPKGRQRKL	0.58	0.8466666666666667
IEKKSYSRARRTRTKVGDA	0.58	0.7933333333333333
KKSYSRARRTRTKVGDAVK	0.58	0.8866666666666667
KSYSRARRTRTKVGDAVKL	0.58	0.8933333333333333
SYSRARRTRTKVGDAVKLA	0.58	0.86
YSRARRTRTKVGDAVKLAE	0.58	0.7933333333333333
SRARRTRTKVGDAVKLAEE	0.58	0.8066666666666666
RARRTRTKVGDAVKLAEEV	0.58	0.8
DLRGQTQEEVVRPKGRQRKL	0.58	0.6866666666666666
EKKSYSRARRTRTKVGDAVK	0.58	0.8266666666666667
KKSYSRARRTRTKVGDAVKL	0.58	0.9
KSYSRARRTRTKVGDAVKLA	0.58	0.9133333333333333
RPIEKKSYSRARRTRTKVGDA	0.58	0.8133333333333334
IEKKSYSRARRTRTKVGDAVK	0.58	0.82
EKKSYSRARRTRTKVGDAVKL	0.58	0.8666666666666667
KKSYSRARRTRTKVGDAVKLA	0.58	0.9333333333333333
KSYSRARRTRTKVGDAVKLAE	0.58	0.8533333333333334
IEKKSYSRARRTRTKVGDAVKL	0.58	0.88
EKKSYSRARRTRTKVGDAVKLA	0.58	0.9
KKSYSRARRTRTKVGDAVKLAE	0.58	0.88
IEKKSYSRARRTRTKVGDAVKLA	0.58	0.8733333333333333
EKKSYSRARRTRTKVGDAVKLAE	0.58	0.8266666666666667
KKSYSRARRTRTKVGDAVKLAEE	0.58	0.8266666666666667
DRPIEKKSYSRARRTRTKVGDAVK	0.58	0.7866666666666666
PIEKKSYSRARRTRTKVGDAVKLA	0.58	0.8
IEKKSYSRARRTRTKVGDAVKLAE	0.58	0.76
EKKSYSRARRTRTKVGDAVKLAEE	0.58	0.7733333333333333
DRPIEKKSYSRARRTRTKVGDAVKL	0.58	0.78
IEKKSYSRARRTRTKVGDAVKLAEE	0.58	0.7066666666666667
DRPIEKKSYSRARRTRTKVGDAVKLA	0.58	0.7733333333333333
RPIEKKSYSRARRTRTKVGDAVKLAE	0.58	0.7866666666666666
DRPIEKKSYSRARRTRTKVGDAVKLAE	0.58	0.7066666666666667
RPIEKKSYSRARRTRTKVGDAVKLAEE	0.58	0.76

9. Lihtlitsents

Mina, Krislin Raus,

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „CASC3 valgu järjestusest ennustatud rakku siseneva peptiidi toime rakkudele in vitro”, mille juhendajad on Piret Arukuusk ja Ly Porosk, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 3.0, 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.

Krislin Raus

27.05.2021