

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOIGA INSTITUUT
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
TÄPPIS- JA NAOMEDITSIINI LABORATOORIUM

Hematoentsefaalbarjääri penetreerivate peptiidide avastamine ja iseloomustamine

Bakalaureusetöö
12 EAP
Hanka Karmen Nõmmik

Juhendajad
MSc Kristina Põšnograjeva
Ph.D. Tambet Teesalu
Ph.D. Juhan Sedman

TARTU 2025

INFOLEHT

Hematoentsefaalbarjääri penetreerivate peptiidide avastamine ja iseloomustamine

Vere-aju barjäär (HEB) kaitseb kesknärvisüsteemi erinevate kahjulike ühendite ja patogeenide eest ning on oluline aju homöostaasi säilitamiseks. HEB tõttu on blokeeritud paljude ravimite transport kesknärvisüsteemi. Üheks võimaluseks HEB ületamiseks ja selleks, et parandada ravimite transporti aju ja seeläbi ka nende efektiivsust, on kasutada HEB-läbivaid kullerpeptiide. Ravimisuunajatena on kullerpeptiidide eelisteks kõrge bioohutus, sünteesimise lihtsus ja siirdemeditiiniline asjakohasus. Kasutades faagidisplei tehnoloogiaid, avastati Teesalu laboris hiljuti uudne HEB-i penetreeriv kullerpeptiid, mille ajuakumulatsiooniks on eeltingimuseks kompleksi moodustamine plasma adaptervalguga. Käesolevas bakalaureusetöös viidi läbi rakuvaba faagidisplei skriinid, et leida adaptervalguga seonduvaid uusi peptiide ning viidi läbi nende esmased validatsioonikatsed.

Märksõnad: HEB, faagidisplei, kullerpeptiidid

CERCS kood: B640 neuroloogia, neuropsühholoogia, neurofüsioloogia B200 tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia

Discovery and characterization of blood-brain barrier-penetrating peptides

The blood-brain barrier (BBB) protects the central nervous system from various harmful compounds and pathogens, it is also important for maintaining brain homeostasis. Due to the BBB, the transport of many drugs into the central nervous system is blocked. One possibility to overcome the BBB, also to improve the transport of drugs into the brain and thereby their efficacy is to use BBB-penetrating messenger peptides. As drug delivery vehicles, the advantages of messenger peptides are high biosafety, ease of synthesis and translational medical relevance. Using phage display technologies, a novel BBB-penetrating messenger peptide was recently discovered in Teesalu's laboratory. Its accumulation requires the formation of complex with a plasma adaptor protein. In this bachelor's thesis cell-free phage display screens were performed to find new peptides that bind to the adaptor protein and their initial validation experiments were performed.

Keywords: blood-brain barrier, phage display, homing peptides,

CERCS code: B640 neurology, neuropsychology, psychosomatics B200 cytology, oncology, cancerology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Hematoentsefaalbarjäär	6
1.1.1. Hematoentsefaalbarjääri omadused ja struktuur.....	6
1.1. HEB-i läbivad peptiidid.....	7
1.2. Transpordimehhanismid HEB-i ületamiseks.....	8
1.2.1. Retseptorvahendatud mehhanism	9
1.2.1.1. Madala tihedusega lipoproteiini retseptoriga seotud valk 1 (LRP-1).....	9
1.2.1.2. Transferriini retseptor	11
1.2.1.3. Adaptervalgu poolt vahendatud HEBi transsütoos.....	12
1.3. Faagidisplei.....	12
1.3.1. Bakteriofaagid	13
2. EKSPERIMENTAALOSA	15
2.1. Töö eesmärgid	15
2.2. Materjal ja meetodika	15
2.2.1. Faagi ja faagiraamatukogu amplifitseerimine ja puhastamine	15
2.2.2. Dialüüs ja tiitrimine	16
2.2.3. Rakuvaba faagidisplei.....	17
2.2.4. Amplifikatsioon vedelsöötmes	18
2.2.5. Sanger sekveneerimine	19
2.2.6. Faagide kloonimine ja seondumiskatse magentkerakestel	20
2.2.7. Biodistributsiooniuringud hiirtes	20
2.2.8. Andmeanalüüs	21
2.3. Tulemused	22
2.3.1. Rakuvaba faagidisplei CX7C ja B raamatukogudega	22
2.3.2. Kandidaatpeptiidide seondumine adaptervalgu fragmendiga 2b.....	24
2.3.3. In vivo faagidisplei ja kandidaatpeptiidide testimine	26
2.4. Arutelu	29
KOKKUVÕTE	32
SUMMARY.....	33
TÄNUSÕNAD	34
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	35
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	41
LISAD	42
LIHTLITSENTS.....	44

KASUTATUD LÜHENDID

A β	amüloid- β (ingl k <i>amyloid beta</i>)
BBTB	vere-aju kasvaja barjäär (ingl k <i>blood-brain tumour barrier</i>)
CBP	kesknärvisüsteemi peptiid (ingl k <i>CNS-Bridge peptide</i>)
CSF	tserebrospinaalvedelik (ingl k <i>cerebrospinal fluid</i>)
HEB	hematoentsefaalbarjäär (ingl k <i>blood brain barrier</i>)
HTS	kõrge läbilaskvusega sekveneerimine (ingl k <i>high-throughput sequencing</i>)
IPTG	isopropüül- β -tiogalaktoosiid (ingl k <i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>)
LRP-1	madala tihedusega lipoproteiini retseptoriga seotud valk 1 (ingl k <i>low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>)
MRP	multiravimiresistentsuse valgud (ingl k <i>multidrug resistance proteins</i>)
OD	optiline tihedus (ingl k <i>optical density</i>)
PFU	faagilaikude arv (ingl k <i>plaque forming unit</i>)
RMT	retseptorvahendatud transtsütoos (ingl k <i>receptor-mediated transcytosis</i>)

SISSEJUHATUS

Ülemaailmselt kannatab neuroloogiliste häirete all 2021. aasta uuringu tulemuste järgi 3,4 miljardit inimest. Viimase 30 aasta jooksul on see arv nähtavalt tõusnud kasvava elanikkonna, vananemise ja elustiili tõttu (Steinmetz jt, 2024).

Ajuga seotud haiguste, sealhulgas neurodegeneratiivsete ja geneetiliste kesknärvisüsteemi haiguste raviks töötatakse pidevalt välja uusi ravimikandidaate. Paljude ravimikandidaatide kliiniline edukus on piiratud, kuna need ei suuda jõuda oma sihtmärgini hematoentsefaalbarjääri (HEB) ehk vere-aju barjääri tõttu. HEB on tihedalt organiseeritud struktuur ajukapillaaride endoteelirakkudest koos toetavate gliiarakkude ja peritsüütidega. HEB täidab olulist kaitsefunktsiooni, piirates potentsiaalselt kahjulike ainete juurdepääsu ajukoele, kuid samas takistab see ka paljude terapeutiliste ühendite, sealhulgas antikehade, ensüümide ja väikemolekulide, efektiivset transpordi ajju. HEB ületamiseks on välja töötatud mitmeid lähenemisviise, sealhulgas HEB-i läbivad kullerpeptiidid – lühikesed aminohappejärjestused, mis läbivad barjääri, kas transstoosi või teiste mehhanismide kaudu.

Täppis- ja nanomediitsiini laboris on kirjeldatud uudne ajuselektiivne kullerpeptiid, mis seondub veres ringleva niinimetatud adaptervalguga. Seejärel moodustub peptiidi ja adaptervalguga kompleks, mis seondub ühe aju veresoonte endoteelirakkudel ekspresseeruva retseptoriga. Selle seondumise tulemusel transporditakse peptiid läbi HEB-i aju parenhüümi. Tegemist on põhimõtteliselt uue ajutranspordi rajaga, mis erineb seni tuntud HEB-i läbimise mehhanismidest ja võib pakkuda uusi võimalusi terapeutiliste ühendite efektiivseks viimiseks kesknärvisüsteemi. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli avastada uusi peptiide, mis seonduvad selle adaptervalguga, ning hinnata nende võimet akumulioneeruda ajukoes. Selleks viidi läbi rakuvabad faagidisplei skriinid ning *in vivo* faagidisplei biojaotuvuskatsed hiirtes, et luua alus tulevastele arendustele selle uudse transpordiraja rakendamisel ravimikandjate suunamiseks ajju.

Antud bakalaureusetöö tehti Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemediitsiini instituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Hematoentsefaalbarjäär

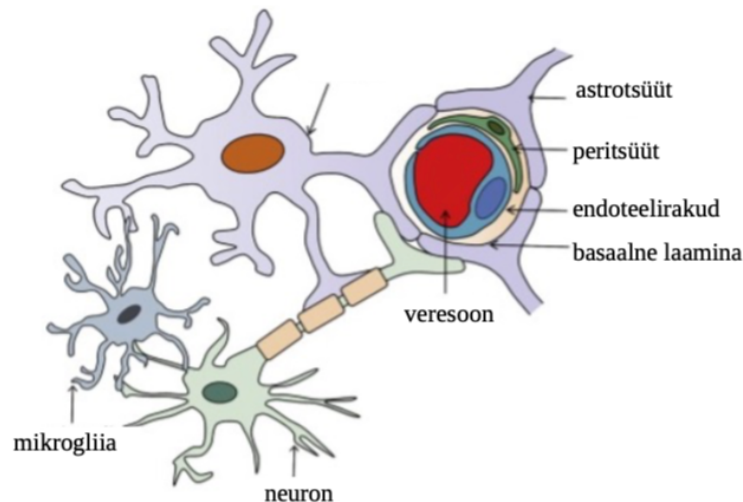
1880. aastatel demonstreeris Paul Ehrlich, et vere ja aju vahel eksisteerib selektiivne barjäär, mis reguleerib erinevate ainete sisenemist aju. Katsetes süstiti rotti intravenoosselt Evani sinist värvi (Ingl k *Evan's blue dye*) ning täheldati, et värvuvad kõik organid peale aju ning seljaaju (Ehrlich, 1885). Aju kapillaaridel on väga olulised barjääriomadused, mis suudavad välistada organismile mürgiseid aineid ja kaitsta sellega ka närvikudesid (Choi ja Kim, 2008). Neli peamist ajubarjääri on hematoentsefaalbarjäär (HEB), vere-tserebrospinaalvedeliku (CSF) barjäär, vere-seljaaju barjäär (Cipolla, 2009) ja vere-retinaal barjäär (Choi ja Kim, 2008), millest kõige ulatuslikum ja selektiivsem on HEB (Saraiva jt, 2016).

1.1.1. Hematoentsefaalbarjääri omadused ja struktuur

HEB reguleerib ionide ja molekulide vahetust vereringe ja ajukoe vahel, tagades seeläbi kontrollitud mikrokeskkonna (Wu jt, 2023). HEB vastutab peamiselt homöostaasi loomise ja säilitamise eest, kaitseb aju toksiliste ühendite ning patogeenide eest ning varustab aju toitainetega (Bellettato ja Scarpa, 2018). Homöostaasi säilitamisel reguleeritakse ionikanaleid ja spetsiifilisi transportereid, nagu Na^+ , K^+ ja Cl^- -ioone, mida tuleb hoida neuraalsete ja sünaptiliste signaalide jaoks optimaalsel tasemel. Ioonid on jaotunud aga luminaalsete ja abluminaalsete membraanide vahel, mille välja- ja sissevool sõltuvad vere-aju barjääri ionitransporteritest (Wu jt, 2023).

HEB-i moodustavad ajukapillaaride endoteelirakud neid ümbritseva basaalmembraani, peritsüütide ja astrotsüütide jätketega (Joonis 1) (Copur ja Öner, 2017). Aju endoteelirakkudel on omadused, mis aitavad sel säilitada aju-vere barjääri terviklikkust ja funktsioone. Näiteks on endoteelirakkude vahel tiheliidused, mis takistavad enamikul vere kaudu levivatel ainetel ajju sisenemast ning blokeerivad külgnevate endoteelirakkude vahelisi paratsellulaarseid difusiooniteid (Dotiwala jt, 2023). Tiheliidused koosnevad membraanivalkude ja tsütoplasmaatiliste adaptervalkude kompleksidest, mis on omavahel seotud aktiiniga ja stabiliseerivad seeläbi endoteeli struktuuri (Ballabh jt, 2004). Astrotsüütide jätked ümbritsevad aju veresoone ning tagavad ajuveresoonkonna struktuurse terviklikkuse (El-Khoury jt, 2006). Astrotsüüdid reguleerivad ka vee ja ionset homöostaasi ajus, (Stokum jt, 2015). Peritsüüdid ümbritsevad endoteelirakke ja pakuvad sellega struktuurset tuge ja aitavad reguleerida veresoonte laienemist ja ahenemist (Ballabh jt, 2004). Peritsüütide katvuse vähenemine on

seotud tiheliiduste kadumisega endoteelirakkude vahel, mislõbi HEB-i läbilaskmisvõime suureneb (Sengillo jt, 2013). Samuti on peritsüütidel oluline roll ajuveresoonte parandamisel ja angiogeneesi soodustamisel. Kuna kõik soliidtuumorid sõltuvad suuremal või väiksemal määral angiogeneesist, on peritsüütide indutseeritud angiogeneesi alla surumine oluline terapeutiline sihtmärk (Brown jt, 2019). Ajukasvajates on HEB-i struktuur ja funktsioon oluliselt muutunud ning seda nimetatakse vere-aju kasvaja barjääriks (BBTB). Kuigi BBTB-d peetakse lekkivaks, siis on see suuremalt jaolt, eriti madalama astme difuussete glioomide puhul, sarnane tavalise HEB-ga ning takistab vähivastaste ravimite juurdepääsu kasvajatele (Van Tellingen jt, 2015).



Joonis 1. HEB koosneb luminaalsest endoteelirakkude kihist, mis on omavahel ühendatud tihedaliidustega. HEB struktuuri toetavad veel peritsüüdid ja astrotsüüdid. Joonis on muudatustega artiklist Nishanth ja Schlüter (2019) ja selle tegemiseks on kasutatud Biorender programmi (BioRender.com).

1.1. HEB-i läbivad peptiidid

Ravimite aju transportimine on väljakutseks ajukasvajate ja neurodegeneratiivsete haiguste ravimite väljatöötamisel, kuna suur osa ravimitest ja suurtest molekulidest ei ole võimelised läbima hematoentsefaalbarjääri (Ma'arik jt, 2024). Neuroterapeutiliste molekulide (väikeste molekulide, valkude või nanoosakeste) transportimiseks aju töötatakse välja vektoreid, mis läbiksid HEB-i, kas transsütoosi või teiste mehhanismide kaudu. Sellised vektorid võivad olla näiteks antikehad ja kullerpeptiidid.

Kullerpeptiidid on tõhusad tööriistad suunatud ravimite täppis-suunamisel, pakkudes suurt potentsiaali terapeutilistes rakendustes, sealhulgas soliidtuumorite, põletikuliste haiguste ja neurodegeneratiivsete seisundite ravis. Tänu oma väiksusele, hea läbitungimisvõimele ja keemilisele modifitseeritavusele võimaldavad need peptiidid ravimite toimetamist sihtkudedesse, suurendades raviefektiivsust ja vähendades süsteemsete kõrvaltoimete riski. Kullerpeptiidide kasutamise eeliseks on nende lihtne süntees ja modifitseerimine. HEB-i suhtes

selektiivsetel kullerpeptiididel on afiinsus retseptorite suhtes, mis ekspresseeruvad veresoonkonna luminaalsel poolel, näiteks transferriini retseptor ja madala tihedusega lipoproteiini retseptori sarnane valk 1 (LDL receptor-related protein-1, LRP-1) (Andre jt, 2022). Sellised peptiidid läbivad HEB retseptor-vahendatud transtsütoosi abil (Zhou jt, 2021) ja on rakendatavad mitteinvasiivseks ravimite ajju suunamiseks (Kumar jt, 2021). Sageli on HEB penetreerivad peptiidid väikesed, hüdrofoobsed ja kergelt positiivse laenguga (Cavaco jt, 2024). Mitmed HEB-i penetreerivad peptiidid on tsüklilised, mis saavutatakse disulfiidsideme abil kahe tsüsteiini jäägi vahel (Kapoor jt, 2012).

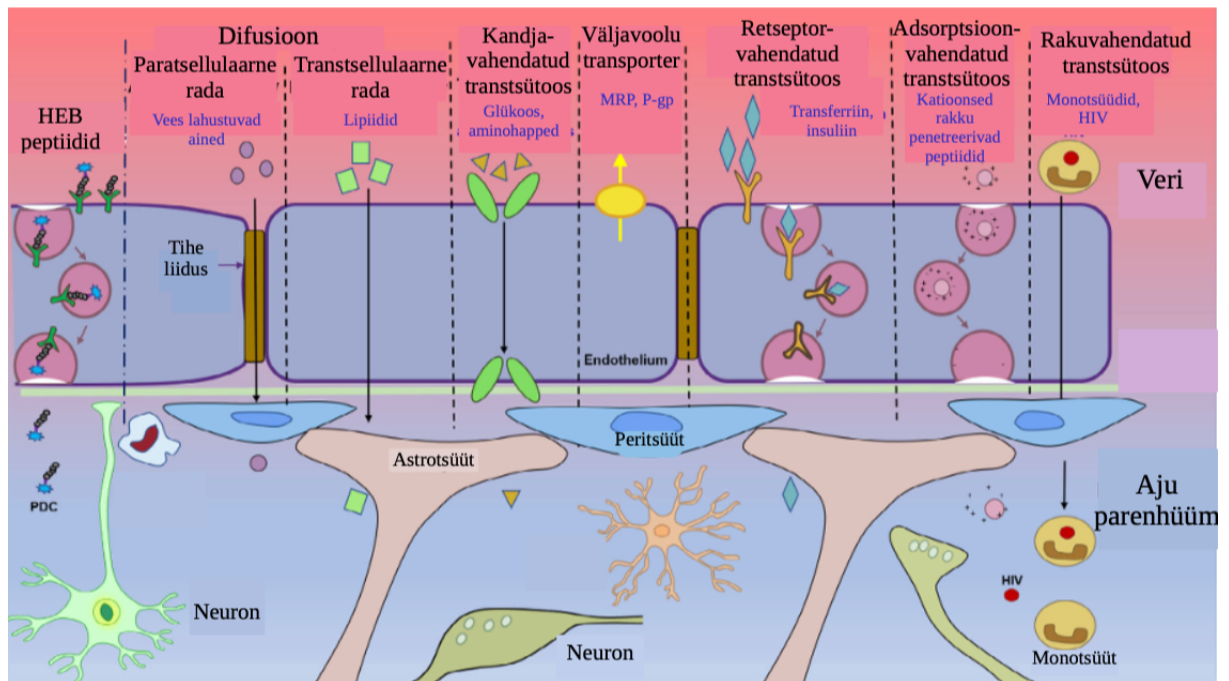
Lisaks ajuselektiivsetele kullerpeptiididele kasutatakse HEB-i ületamiseks ka rakku penetreerivaid peptiide (CPP), mis ei seostu spetsiifilise retseptoriga ja tungivad paljudesse rakkudesse (Sharma jt, 2016). Rakku penetreerivad peptiidid on lühikesed katioonsed või amfipaatilised peptiidid (Sharma jt, 2012). Evolutsioon on andnud osadele valkudele võime läbida rakumembraani kindlate peptiidijärjestuste alusel, neid nimetatakse valgu transduktsioondomeenideks (Schmidt jt, 2010). Huvi CPP-de vastu suurendab ka nende omadus tõhusalt biomolekule kohale transportida nii, et see ei kahjustaks biomolekulide terviklikkust (Trabulo jt, 2010). Rakku tungivaid peptiide kasutatakse valkude, nukleiinhapete ja nanoosakeste viimiseks läbi HEB ajukoesse (Blades jt, 2023). Rakku penetreerivatel peptiidide oluliseks puuduseks on see, et nad ei ole koespetsiifilised (Derakhshankhah ja Jafari, 2018).

1.2. Transpordimehhanismid HEB-i ületamiseks

HEB-i tõttu on molekulide transport verest ajukoesse minimaalne. Selle läbimiseks on mitmeid võimalikke mehhanisme – passiivne difusioon, kandja-vahendatud transport, retseptorvahendatud transtsütoos, adsorptsioon-vahendatud transtsütoos ja raku vahendatud transtsütoos (Joonis 2) (Zhou jt, 2021). Passiivne difusioon ei vaja energiat selleks, et keemilised ühendid liiguksid kontsentratsioonigradiendi vastu (Copur ja Öner, 2017). Väiksemate molekulide lipofiilsuse suurendamine aitab aga suurendada HEB-i läbilaskvust (Ohtsuki ja Terasaki, 2007). Ajukapillaaride endoteelirakud ekspresseerivad väljavoolu transportereid, nagu P-glükoproteiini ja multiravimiresistentsuse valke (MRP), mis transpordivad kahjulikke hüdrofiilseid ja hüdrofoobseid molekule kesknärvisüsteemist välja (Zhou jt, 2021, Wong jt, 2013).

Väikesed hüdrofiilsed molekulid, näiteks glükoos ja aminohapped, kasutavad endoteelirakkude luminaalsel ja basolateraalsel küljel asuvaid transportereid (Gabathuler, 2010). Transportervalk

tunneb ära substraadi ja tekib kompleks, mis käivitab valgu konformatsioonilise muutuse, mille tulemusena jõuab substraat membraani abluminaalsele poolele kontsentratsioonigradiendi kaudu (Zhou jt, 2021).



Joonis 2. Peamised transpordiviisid läbi HEBi. Joonis on muudatustega artiklist Zhou jt (2021) ja selle tegemiseks on kasutatud Biorender programmi (BioRender.com).

1.2.1. Retseptorvahendatud mehhanism

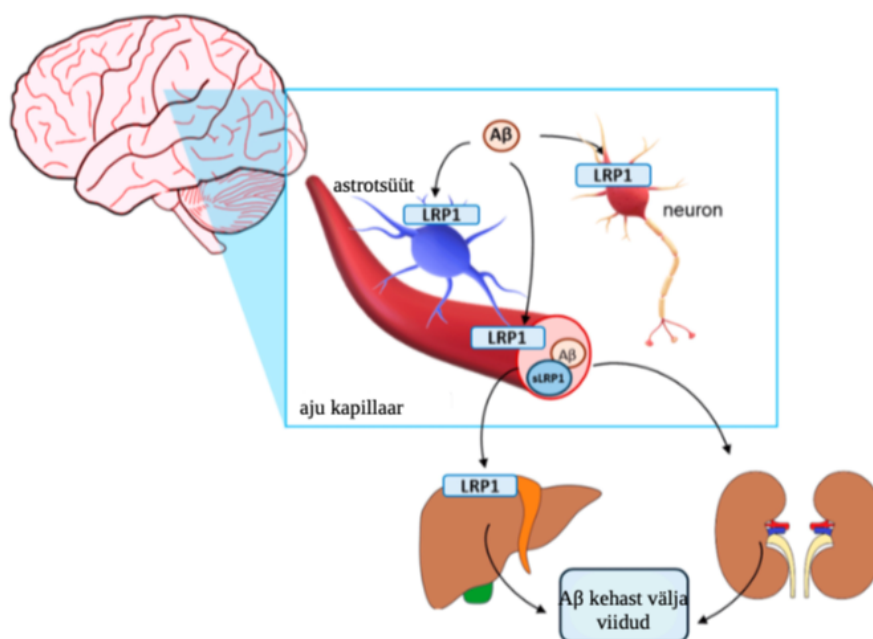
Retseptorvahendatud transtsütoos (RMT) on protsess, mis toimub polariseeritud rakkudes ja mida endogeensed makromolekulid kasutavad füsioloogiliste barjäärade ületamiseks (Haqqani jt, 2024). Suuremad ja hüdrofiilsemad molekulid, nagu hormoonid, transferriin ja lipoproteiinid kasutavad HEB-i läbimiseks spetsiaalseid endoteelirakkude luminaalsel küljel ekspresseeritud retseptoreid (Gabathuler, 2010). Ligandid seonduvad retseptoriga raku pinnal ja seejärel toimub retseptor-vahendatud endotsütoos, endosomaalne sorteerimine ja eksotsütoos. RMT retseptorid on nende spetsiifilisuse ja toime tõttu atraktiivsed märklauad antikehade ja peptiidide väljatöötamiseks, et viia ravimeid aju (Haqqani jt, 2024).

1.2.1.1. Madala tihedusega lipoproteiini retseptoriga seotud valk 1 (LRP-1)

Ravimite aju viimisel on üheks võimaluseks lähenemisviis, mis kasutab vere-aju barjääril ekspresseeritud retseptorite transtsütoosivõimet. Selliseks retseptoriks on näiteks madala tihedusega lipoproteiini retseptoriga seotud valk 1 (LRP-1) (Gabathuler, 2010). LRP-1 on multifunktsionaalne endotsüütiline retseptor, mis vahendab erinevates metaboolsetes radades ligandide internaliseerumist ja lagunemist (Kounnas jt, 1995). LRP-1 interakteerub erinevate

sekreteeritavate valkude ja rakupinna molekulidega, näiteks apolipoproteiin E-ga (apoE), vahendades nende endotsütoosi või aktiveerides signaaliülekanne radu (Gabathuler, 2010). Näiteks seondub LRP-1-ga peptiid Angiopep-2 (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY), mis transpordib kovalentselt konjugeeritud ravimeid kesknärvisüsteemi (Guo jt, 2019, Sakamoto jt, 2017).

LRP-1 valku ekspresseeritakse paljudes kudedes ja kesknärvisüsteemis (eriti väikeaju neuronites) (Rebeck jt, 1993, Gabathuler, 2010). LRP-1 osaleb mitmete erinevate ligandide (sh lipoproteiinid, proteaasid, proteaasi inhibiitorid, apoptootilised rakud) sidumises ja endotsütoosis. Aju astrotsüütides, neuronites ja veresoonte silelihastes vahendab LRP-1 amüloid- β (A β) omastamist, suunates selle edasiseks lagundamiseks vereringesse ning seejärel perifeersetesse organitesse, nagu maksa, kus molekul elimineeritakse. Nii aitab LRP-1 kaasa A β neurotoksilise akumulatsiooni vältimisele (Joonis 3) (Petralla jt, 2024). Alzheimeri tõve korral on LRP-1 ekspressioon vähenenud, mis viib A β akumulatsioonile (Shibata jt, 2000, Yamamoto jt, 1997).

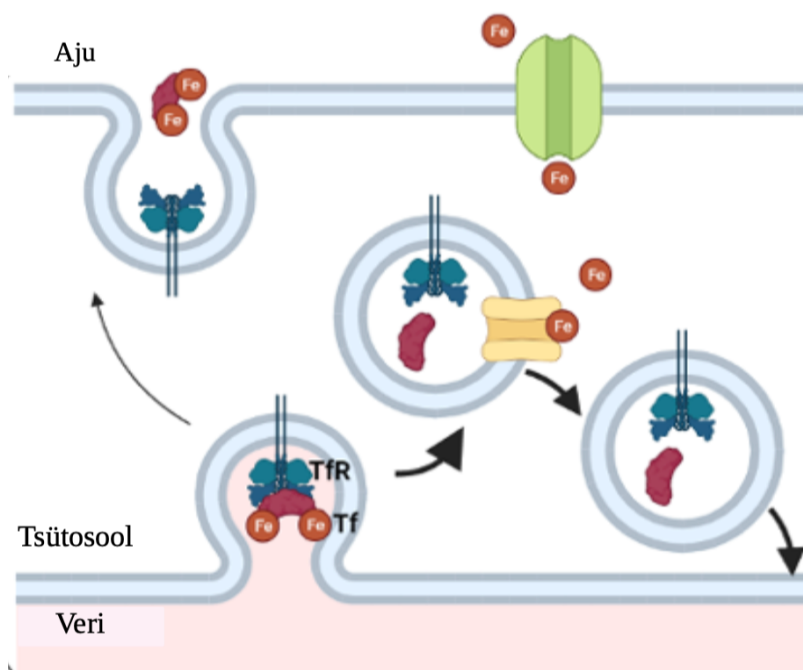


Joonis 3. A β väljutamine ajust ja LRP1 roll selles protsessis. Astrotsüütides vahendab LRP-1 amüloid- β omastamist, võimaldades selle transporti vereringesse. Vereringe kaudu suunatakse A β perifeersetesse organitesse, nagu maks, kus toimub selle edasine lagundamine ja organismist eemaldamine. Joonis on muudetud kujul pärit artiklist Petralla jt (2024) ja selle tegemiseks on kasutatud Biorender programmi (BioRender.com).

1.2.1.2. Transferrini retseptor

Transferrini retseptor (TfR) on üks paremini kirjeldatud retseptoreid HEB-s (Chen ja Liu, 2012). TfR on membraani glükoproteiin, mille funktsioon on reguleerida raua omastamist ja homöostaasi (Aisen, 2004). Raua aatomiga seondunud transferrin seondub TfR-ga ja kompleks endotsütoositakse. TfR-i ekspresseeritakse enamikus tuumaga rakkudes (Chandramohan jt, 2017). TfR-vahendatud mehhanism võimaldab viia rauaga seotud transferrini üle HEB-i aju interstitsiaalsesse ruumi (Joonis 4) (Baringer, 2022, Pardridge jt, 1987).

Halvaloomulistel rakkudel on kõrgem transferrini retseptori ekspressioonitase, kuna need vajavad kõrget rauasisaldust (Qian jt, 2002). TfR ekspressioon on kõrgem ka ajuisheemia korral (Moos ja Morgan, 2004). Alzheimeri tõvega inimestel on täheldatud transferrini retseptori ekspressiooni vähenemist (Kalaria jt, 1992). Kuna transferrini retseptorit ekspresseerivad aju kapillaaride endoteelirakud, mis moodustavad HEB-i, siis peetakse seda ravimite kohaletoimetamise võimalikuks sihtmärgiks (Bourassa jt, 2019). Transferrini retseptoriga seondub näiteks T7 peptiid (HAIYPRH) (Kuang jt, 2013).



Joonis 4. TfR-vahendatud HEB-i ületamine. Transferrini ja raua kompleks seondub transferrini retseptoriga ning kompleks endotsütoositakse. Raua transport ajju võib toimuda kahel viisil: (1) kompleks lagundatakse endosoomis, rauaioonid vabanevad ning transferrin-retseptori kompleks suunatakse tagasi rakumembraanile, või (2) kogu kompleks transporditakse tervikuna läbi rakukihi ajju.

Joonis on muudetud kujul pärit artiklist Baringer (2022) ja selle tegemiseks on kasutatud Biorender programmi (BioRender.com).

1.2.1.3. Adaptervalguga poolt vahendatud HEBi transtsuutoos

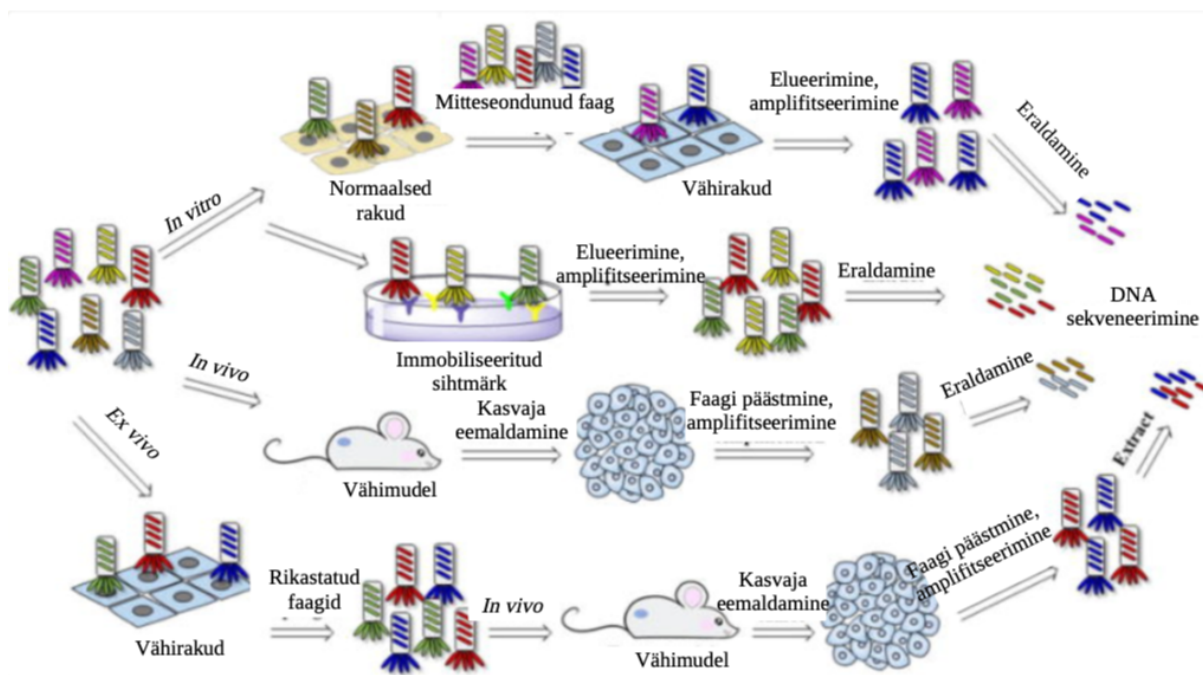
Nano- ja täppismeditsiini laboris on avastatud HEB-i läbiv peptiid CBP, mis ei seonu otseselt aju kapillaaride endoteelis ekspresseeritud retseptoritega, vaid interakteerub hoopis veres tsirkuleeriva niinimetatud „adaptervalguga“. Moodustunud peptiidi–adaptervalguga kompleks seondub seejärel retseptoritele, mis paiknevad aju kapillaaride endoteelil, võimaldades peptiidi transporti läbi HEB aju parenhüümi (avaldamata andmed). Käesoleva töö eesmärk tuvastada täiendavaid peptiide, mis seonduvad nimetatud adaptervalguga, ning hinnata nende võimet akumulereuda hiire ajus. Sellised uued peptiidid võimaldaksid kinnitada adaptervalguga rolli HEB-i ületamises ning omaksid potentsiaalseid rakendusi suunatud ravimite kohaletoimetamisel kesknärvisüsteemi.

1.3. Faagidisplei

1985. aastal kirjeldas George Smith faagidisplei meetodit, mis võimaldab ekspresseerida (polü)peptiide lüsogeensete bakteriofaagide pinnal fusioonina kapsiidivalguga. Meetodi aluseks on fenotüübi ja genotüübi seos: iga faagi osake kannab endas DNA-d, mis kodeerib pinnal ekspresseeritavat peptiidi või valku. Faagidisplei on osutunud äärmiselt oluliseks tööriistaks mitmetes biotehnoloogia ja meditsiini valdkondades, sealhulgas monoklonaalsete antikehade valikul ja nende afiinsuse parandamisel (Bazan jt, 2012).

Faagidispleis kasutatakse faage, mis nakatavad oma rekombinantse DNA-ga peremeesorganismi, näiteks *Eschericia coli*'t. Rekombinantsete DNA vektorite põhiomadus on mahutada võõrast DNA segmenti, mis suudaks replitseeruda ka peremeesorganismis. Faagidisplei vektor hakkab *E. coli* peremeesrakus sünteesima võõrpeptiidi, mille aminohappeline järjestus määratakse faagi genoomi sisestatud nukleotiidjärjestuse alusel ning ekspresseeritakse liitvalguna kapsiidil. Meetod erineb teistest ekspressioonsüsteemidest, nagu pärmi ja bakteri displeist selle poolest, et võõrgeenijärjestus on liidetud ühe faagi kapsiidivalgu geeniga ning saadakse hübriidne sulandvalk (Smith ja Petrenko, 1997, Liu jt, 2017). Selle meetodiga on võimalik genereerida suures hulgas erinevaid peptiide või valke, mida ekspresseeritakse faagide pinnal. Faagidisplei raamatukogud on faagikloonide heterogeenne segu, millest igaüks sisaldab erinevat võõr-DNA fragmenti, mis kodeerib erinevat peptiidi järjestust, mida ekspresseeritakse kapsiidivalgu fusioonina. Kõik raamatukogus olevad peptiid-faagi kloonid replitseeruvad ja toodavad viiruseosakesi, mille pinnal on sama peptiid. Samuti võib esineda mutatsioone peptiidi kodeerivad järjestuses, mis võib muuta peptiidide struktuuri (Smith ja Petrenko, 1997). Raamatukogudest selekteeritakse välja uuritavad peptiidid, mis seonduvad märklauaga. Seondumata faagid eemaldatakse ning seondunud faage saab järgnevalt

paljundada. Kõikide meetodite puhul on võimalik läbi viia mitmeid selektsiooniringe, mille käigus toimub sihtmärgiga seonduvate faagide rikastumine.



Joonis 5. Faagidisplei meetodid. Faagidispleid saab kasutada *in vitro*, et leida peptiide või valke, mis seonduvad märklaud-rakkudega. *In vivo* puhul seonduvad uuritavad peptiidid/valgud spetsiifilisele organile või kasvajale loomudel. *Ex vivo* meetodil seonduvad peptiidid/valgud koest isoleeritud rakkudele. Joonis on muudatustega artiklist Liu (2017) ja selle tegemiseks on kasutatud Biorender programmi (BioRender.com).

Sihtmärgiga seonduvaid peptiide avastatakse *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* ja rakuvaba meetoditel (Liu jt, 2017). Faagidispleid saab kasutada *in vitro*, et leida peptiide või valke, mis seonduvad märklaudrakkudega. *In vivo* puhul seonduvad uuritavad peptiidid/valgud spetsiifilisele organile või kasvajale loomudel. Looma vereringesse süstitakse faagiraamatukogu, hiljem eemaldatakse seonduvaid faagid perfusiooni teel ning amplifitseeritakse kudedes olevad faagid. *Ex vivo* meetodil seonduvad peptiidid/valgud varem eraldatud koe rakkudele (Joonis 5). Rakuvaba meetodi puhul kasutatakse sihtmärgina rekombinantset retseptorit või valku.

1.3.1. Bakteriofaagid

Bakteriofaagid on viirused, mis nakatavad ja replitseeruvad vaid bakterirakkudes. Nagu kõik viirused, on ka faagid selektiivsed oma peremeesorganismide suhtes ja nakatavad üldjuhul ainult ühte bakteriliiki või -tüve (Kasman ja Porter, 2022). Faagiosakeste vabanemise viisi järgi jagunevad faagid kahte gruppi – lüütilised ja lüsogeensed. Lüütilise replikatsioonitsükli puhul viib faag oma genoomi peremeesbakteri tsütoplasmasse ja kasutab valkude tootmiseks tema

ribosoomi, misjärel peremeesrakk lüüsib ja vabanevad uued faagid. Lüsogeense tsükli puhul viib faag samuti oma genoomi peremeesrakku, kuid selle asemel, et kohe replitseeruda ja rakku lüüsida, integreerub faagi DNA peremeesraku kromosoomi. Nii kandub faagi genoom edasi koos bakteriraku jagunemisega, olles inaktiivses olekus (profaagina), kuni teatud tingimustel võib lüsogeenne tsükkel üle minna lüütiliseks.

Faagidispleis kasutavate raamatukogude koostamisel kasutatakse erinevaid faage. Kõige rohkem on kasutatud filamentseid faage, nagu M13, f1 ja fd (Smith ja Petrenko, 1997). Filamentne bakteriofaag on viiruste grupp, mis nakatab F-plasmiidi sisaldavaid gramnegatiivseid baktereid, näiteks *E. coli*'t. Tavaliselt ei ole filamentne faag lüütiline, seega võivad faagiga nakatunud *E. coli* tüved vabastada uusi faagiosakesi nii, et ei toimu bakteriaalset lüüsi (Hamzeh-Mivehroud jt, 2013). Filamentsete faagide pinnal peptidiraamatukogude displeiks saab kasutada kahte kapsiidivalgu. Esimene on pIII, mille abil saab faagi pinnal kuvada 3-5 peptiidi koopiat, ja teine, pVIII, mille abil saab kuvada 2700 peptiidi koopiat. Rohkem kasutatakse pIII kattevalgu, kuna see võimaldab avastada suurema afiinsusega ligande (Diaz-Perlas jt, 2016).

Ühe enam kasutatakse faagidispleiks lüütilisi faage, nagu λ , T7 või T4 (Yue jt, 2021). T7 on dsDNA bakteriviirus, mis paljuneb nakatades *E. coli* rakke ja väljub bakterist selle lüüsimisel. T7 faagi on võimalik geneetiliselt muundada nii, et peptiide ekspresseeritakse peamise kapsiidivalgu C-terminaalse liitvalguna (Yue jt, 2021, Teesalu jt, 2012). Täppis- ja nanomeditiini laboris kasutatakse faagidispleis T7 bakteriofaagil põhinevaid raamatukogusid, näiteks CX7C raamatukogu, mis koosneb peptiididest, mille seitsmest juhuslikust aminohappest moodustuvad peptiidide vahele kahe tsüsteiini vahel disulfiidsillad, mis stabiliseerivad tsüklilist peptiidstruktuuri (Torvinen jt, 2002).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Bakalaureusetöö eesmärk oli leida faagidisplei meetodil peptiide, mis seonduvad adaptervalgu fragmentidega ning kindlaks teha, kas need peptiidid akumuleeruvad hiire ajus.

2.2. Materjal ja metoodika

Käesolevas töös kasutati järgmiseid adaptervalgu fragmente: 1, 2 ja 2b, mis on toodetud Icosagenis. Samuti kasutati töös nano- ja täppismeditsiini laboratooriumis konstrueeritud kahte faagiraamatukogu – CX7C (CXXXXXXXXC, kus C on tsüsteiin ja X on juhuslik aminohape) ja B raamatukogu, mis on konstrueeritud HEB penetreeriva kullerpeptiidi CBP järjestuse põhjal – see sisaldab aminohappeid, mis on olulised CBP faagi akumuleerumiseks ajukoes ning 5 varieeruvat positsiooni (X). Faagiraamatukogu amplifitseerimine ja puhastamine viidi läbi järgides Põšnograjeva ja kolleegide protokoll (Põšnograjeva jt, 2022).

2.2.1. Faagi ja faagiraamatukogu amplifitseerimine ja puhastamine

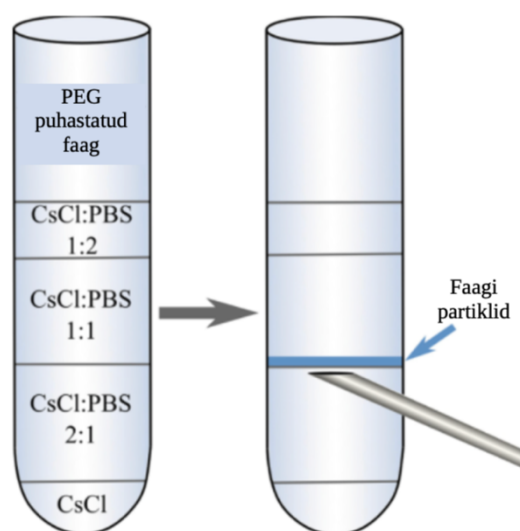
Antud töö jaoks kasvatati *E. coli* BLT5403 kultuuri (Novagen, USA) faagi ja faagiraamatukogu amplifitseerimiseks ning BLT5615 kultuuri (Novagen, USA) faagi tiitrimiseks. Mõlemat tüve külvati ampitsilliiniga (50 µg/ml) LB-tardsöötme tassile ning kasvatati üleöö 37°C juures. Järgmisel päeval võeti mõlemalt tassilt üks koloonia ning mõlemat inokuleeriti 25 ml LB-vedelsöötmesse, mis sisaldas karbenitsilliini (50 mg/ml). Kultuure kasvatati bakteriloksutis (Eppendorf, USA) 200 rpm 37°C juures üleöö.

Järgmisel hommikul lahjendati *E. coli* BLT5403 ning *E. coli* BLT5615 üleööökultuuri 1:100 eelsoojendatud LB-söötmega ja kasvatati loksutil 200 rpm 37°C juures, kuni mõõdeti OD₆₀₀ väärtuseks 0,5 (ingl k *optical density*, OD). *E. coli* BLT5615 kultuuri hoiustati kuni üks kuu 4°C juures. *E. coli* BLT5403 kasutati edasi faagi amplifikatsioonil. Kultuuride optilist tihedust mõõdeti spektrofotomeetriaga (BioPhotometer Plus, Eppendorf, USA).

Iga faagiklooni või faagiraamatukogu amplifitseerimiseks valati kolbi 100 ml eelnevalt valmistatud *E. coli* BLT5403 OD₆₀₀=0,5 kultuuri ning 100 µl vastavat faagiklooni või faagikloonide segu. Igat kolbi inkubeeriti loksutil 200 rpm 37°C juures ca 1,5 h või kuni tekkisid lüüsiniidid ja segu oli vähem hägune.

Iga faagi või faagiraamatukogu lüsaat jaotati kolme 50 ml tuubi – 26 ml valminud lüsaati segati 3 ml 5M NaCl-ga. Seejärel tsentrifuugiti segu 10 minutit kiirusel 8000 x g 4°C juures (Eppendorf 5810R, rootor F-34-6-38). Peale tsentrifuugimist valati supernatant uude 50 ml plastikutuubi ning lisati 9 ml 50% PEG8000, segati ja inkubeeriti jääl vähemalt 30 minutit. Tsentrifugiti kiirusel 8000 x g 10 minutit 4°C juures, seejärel eemaldati supernatant ning sademel lasti kuivada 15 minutit. Tuubi küljel olev sade suspendeeriti 1,8 ml 1x PBS-s.

62,5% CsCl alglahusest tehti 3 erineva kontsentratsiooniga PBS:CsCl lahust. Kõik lahused pipeteeriti kindlas järjekorras ultratsentrifuugi tuubi. Esimese kihi tase märgiti tuubile, peale ultratsentrifuugimist tekib sinna õhuke sinine faagide kiht. Proove tsentrifuugiti 45 minutit SW60Ti pendelrootoriga (Beckman Coulter) 40000 rpm 22°C juures. Peale ultratsentrifuugimist torgati 3 ml süstal läbi plastikutuubi seina ja koguti vähemalt 1 ml faagi (Joonis 6).



Joonis 6. CsCl-puhastamise kihtide jaotus. Kõige peamisele kihile jäävad lüüsitud *E. coli* jäägid ja sinine joon näitab faagi asukohta. Joonis on muudatustega artiklist Põšnograjeva jt (2022) ja selle tegemiseks on kasutatud Biorender programmi (BioRender.com).

2.2.2. Dialüüs ja tiitrimine

1 ml CsCl-puhastatud faagi süstiti 3500 kDa MWCO-ga dialüüsikasetti (Thermo Fisher Scientific, USA). Faage dialüüsiti 2 liitris 1x PBS-s magnetsegajal 1 h toatemperatuuril. Seejärel vahetati dialüüsipuhver ning dialüüsiti veel 1 h. Peale dialüüsi tõmmati süstlaga puhas faagisuspensioon dialüüsikasetist välja ning määrati selle tiiter.

Faagisegu tiitrimiseks valmistati lahjenduste rida LB söötmes, mis võimaldas määrata faagi tiitri vahemikus 10^3 kuni 10^{12} faagilaiku moodustavat ühikut (PFU)/ml. Tiitrite määramiseks kasutati eelnevalt kasvatatud *E. coli* bakteritüve BLT5615 kultuuri. 15 ml uubi lisati 500 µl bakterit, 100 µl lahjendatud faagisegu ja 5 ml top-agarit (0,7% agari lahus LB-s), millele oli eelnevalt lisatud 1M isopropüül-β-tiogalaktosiidi (IPTG). Segati ja valati LB tardsöötmega Petri tassile ning inkubeeriti üleöö toatemperatuuril või 4+ tundi 37°C juures, kuni faagilaigud olid tassil nähtavad. Seejärel loeti kokku faagi lüüsilaigud ning arvutati faagide tiiter alglahuses.

2.2.3. Rakuvaba faagidisplei

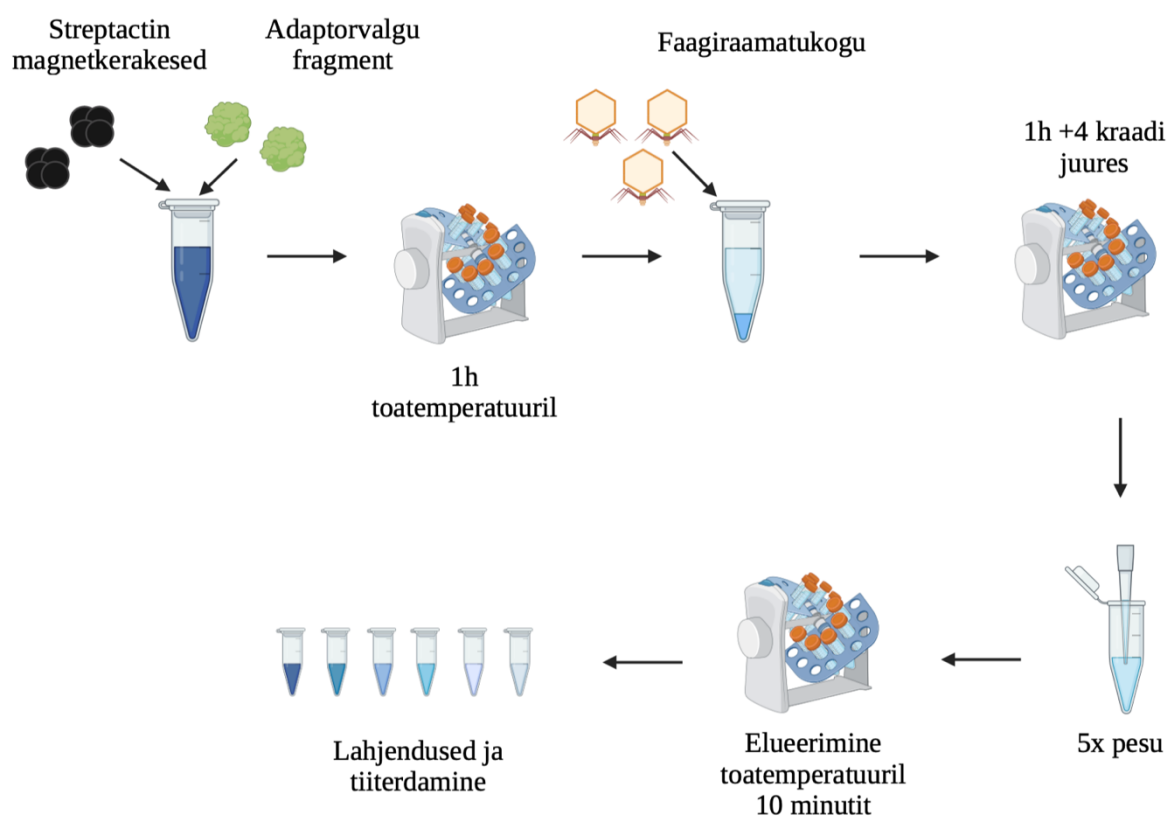
Faagidispleis kasutati Strep-Tactin magnetkerakesi (#5090-0038, Cube Biotech, Germany), mis sobivad töötamiseks valkudega, mis on fuseeritud Strep-tag II või Twin-Strep-tag-ga. IcoSageni toodetud adaptervalgu fragmentide N-terminuses ekspresseeritakse Strep-tag II. Töös kasutati ühte positiivset kontrolli, mis seondub adaptervalgu 2b fragmendiga ja akumulereb hiire ajus (CBP) ja negatiivset kontrolli, mis ei seonu adaptorvalguga ning ei akumulereu hiire ajus (G7), kahte faagiraamatukogu (CX7C ja B raamatukogu) ning 3 adaptervalgu fragmenti (1, 2 ja 2b). Katseid tehti kolmes voorus.

Ühte 1,5 ml tuubi pipeteeriti 80 µl magnetkerakesi, ühe reaktsiooni kohta 10 µl kerakesi. Neid pesti kolm korda 1 ml pesupuhvriga 1 (1x PBS, 0,1% NP40) magnetilisel eraldajal. Peale viimast pesu resuspendeeriti magnetkerakesed 1,6 ml puhvril ja jagati 8 tuubi vahel. Igale tuubile lisati veel 200 µl pesupuhvrit, et lõppmaht oleks 400 µl. Igasse tuubi lisati 40 µg kindlat adaptervalgu fragmenti.

Esimene inkubatsioon toimus pöörleval segajal 1h toatemperatuuril. Peale inkubatsiooni tsentrifuugiti tuube lauatsentrifuugis ja inkubeeriti 1 minut magnetilisel eraldajal. Seejärel pesti kerakesi 3 korda pesupuhvriga 2 (pesupuhver 1+1% BSA). Kerakesed resuspendeeriti esimeses voorus 400 µl pesupuhvril, välja arvatud reaktsioonides G7 ja CBP, kus kerakesed suspendeeriti 250 µl puhvril. Teises ja kolmandas voorus suspendeeriti kõik reaktsioonid 400 µl.

Esimeses voorus lisati 400 ja 250 µl kerakestele vastavalt 100 µl ja 250 µl faagi või faagiraamatukogu, et lõppmaht oleks 500 µl. Faagi lõppkogus tuubis oli 2.5×10^9 pfu. Teises ja kolmandas voorus lisati 400 µl kerakestele sõltuvalt faagilahuse algkontsentratsioonist reaktsioonile kindel kogus faagi või faagiraamatukogu (lisa 1). Teises ja kolmandas voorus oli

lõppmaht samuti 500 µl. Tuube inkubeeriti pöörleval segajal 1 tund 4°C juures. Peale inkubatsiooni tsentrifuugiti tuube lauatsentrifuugis ning inkubeeriti magneteraldajal 1 minut. Järgnevalt tehti iga reaktsiooniga 5 pesu ning iga pesu korral vahetati tuube, kuna faagid on „kleepuvad“ ning valgule mitte kinnitunud faag võib seonduda tuubi seinale. Seejärel lisati igale reaktsioonile 1 ml elueerimispuhvrit (#1042-0140, Cube Biotech, Germany) ja proove inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Inkubatsiooni järel tsentrifuugiti tuube lauatsentrifuugis, eraldati kerakesed magneteraldajal ja koguti 1 ml eluaati uude tuubi. Viimaseks, igast reaktsioonist 10 µl kasutati tiiterdamiseks. Tiiterdamine toimus peatüki 2.2.2. järgi.



Joonis 7. Skemaatiline joonis rakuvaba faagidisplei meetodist. Strep-Tactin magnetkerakesed inkubeeriti adaptervalgu fragmendiga ning seejärel faagiraamatukoguga, et faagid seonduksid sihtmärgiga. Seondumata faagid eemaldatakse pesudega ning seondunud faagid elueeritakse ja hiljem tiiterdatakse. Saadud eluaat on algmaterjaliks järgmises voorus. Joonis on tehtud Biorender programmis (BioRender.com).

2.2.4. Amplifikatsioon vedelsöötmes

Faagidispleis alles jäänud eluaati (990 µl) kasutati edasi preamplifikatsioonis. Kuna faagitiiter oli suurusjärgus 10^2 – 10^6 pfu/ml, siis lisandub preamplifikatsiooni samm, kus faagi paljundatakse väikesed kogused ja madalama tihedusega kultuuris. Seda sammu vahele jättes ei toimu faagi amplifikatsioon efektiivselt. Preamplifikatsiooniks lahjendati *E. coli* tüve

BLT5403 üleöökultuuri 1:100 eelsoojendatud LB-söötmega ning kasvatati lokustil 200 rpm 37°C juures kuni OD₆₀₀ väärtus oli 0,1. 50 ml Falconi tuubi lisati 990 µl eluaati ja 1 ml *E. coli* tüve BLT5403 OD=0,1. *E. coli* tüve BLT5403 kultuuri OD₆₀₀ väärtusega 0,1 kasvatati edasi, kuni OD₆₀₀ väärtus oli 0,5. Preamplifikatsiooni segud inkubeeriti loksutis 1,5 tundi. Peale preamplifikatsiooni lisati igasse tuubi 26 ml *E. coli* tüve BLT5403 (OD=0,5) ning igat tuubi inkubeeriti loksutil kuni lüüsiniitide tekkimiseni. Järgnevalt puhastati proove ja tiiterdati peatükkide 2.2.2. ja 2.2.3. järgi. Saadud faagitiitrite järgi arvutati, kui palju faagi või faagiraamatukogu tuleb lisada teises ja kolmandas voorus, lõppkontsentratsiooni valimisel lähtuti kõige madalamast faagikontsentratsioonist.

2.2.5. Sangeri sekveneerimine

Kolmanda vooru kahest proovist (CX7C+2b adaptervalgu fragment ja B raamatukogu+2b adaptervalgu fragment) sekveneeriti faagide peptiidi kodeerivad järjestused kasutades Sangeri sekveneerimist. Mõlema proovi jaoks valmistati lahjenduste rida ja tiiterdati. Järgmisel päeval sekveneeriti iga proovi kohta 48 faagilaigu DNA, milleks puudutati laiku pipetiotsikuga ja asetati otsik 30 µl 1x PBS-i. Valmistati reaktsioonisegu, mis sisaldas 1 reaktsiooni kohta: 3 µl 5x HOT FIREPOL Blend Master Mix (Solis BioDyne, Eesti), 0,075 µl Forward T7 upstream praimerit (järjestus 5'-TAATACGACTCACTATAGGG- 3'), 0,075 µl Forward T7 downstream praimerit (järjestus 5' -GCTAGTTATTGCTCAGCGG- 3') (Integrated DNA Technologies, Belgia), 10,85 µl MQ vett. Viimasena lisati 2 µl faagi DNA-d PBS-is. Polümeraasi ahelareaktsiooni (PCR) läbiviimiseks kasutati termotsüklerit (Eppendorf Master Cycler Nexus, USA) ja programmi:

95°C	12 min	} 20 tsükli
95°C	20 sek	
62°C	20 sek	
72°C	10 sek	
72°C	10 min	
4°C	Stopp	

Proovid sekveneeriti Sangeri meetodil Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklaboris.

Mõlema proovi tulemuste seast valiti kokku 14 peptiidi järjestust, mida esines kõige rohkem või milles oli esindatud korduv aminohappeline motiiv. Huvipakkuvate peptiide seondumist adaptervalgu 2b fragmendile uuriti rakuvabas seondumiskatses.

2.2.6. Faagide kloneerimine ja seondumiskatse magentkerakestel

Peptiide kodeerivad nukleotiidsed järjestused klooniti T7 415-1b (Novagen, USA) faagi genoomi, et neid hakataks ekspresseerima bakteriofaagi pinnal. Komplementaarsed oligonukleotiidid valmistati Jasper August Tootsi tehtud programmis (<https://phages.streamlit.app/phage-sequencing>). Alguses lahjendati komplementaarsed oligonukleotiidid MQ vees lõppkontsentratsiooniga 80 nM ning kuumutati termoblokis (Biosan TDB-120, Läti) temperatuuril 80°C juures 10 minutit. Peale kuumutamist lülitati termoblokk välja ja proovidel lasti toatemperatuurini jahtuda, et komplementaarsed oligonukleotiidid anniiluks. Järgnevalt segati jääl kokku ligeerimisegu (Tabel 1). Ligeerimisegule lisati viimasena 1 µl anniilunud oligonukleotiide ning ligatsioon toimus 2h toatemperatuuril.

Tabel 1. Ligeerimisegu.

Reagent	1 reaktsiooni kohta
Vector arms (Novagen) (lahjendamata: 0,5 µg/µl)	1 µl
T4 DNA ligaasi puhver (NEB)	0,5 µl
T4 DNA puhver (NEB)	0,2 µl
MQ vesi	2,3 µl

Seejärel segati 1,5 ml Eppendorfi tuubis kokku 0,5 µl ligeerimisegu ja 2,5 µl pakkimisegu (Novagen) ja inkubeeriti 2 h toatemperatuuril. Järgnevalt lisati pakkimisegule 120 µl LB-söödet ja valmistati lahjenduste rida ning tiiterdati. Järgmisel päeval sekveneeriti iga faagiklooni kohta nelja plaagi DNA peatüki 2.2.5. järgi.

Kandidaatpeptiide testiti rakuvaba faagidisplei meetodil, mis on kirjeldatud peatükis 2.2.3. Enne rakuvaba faagidispleid amplifitseeriti ja puhastati kloneeritud faage peatüki 2.2.1. järgi.

2.2.7. Biodistributsiooniuringud hiirtes

Lõputöös kirjeldatud loomkatseid viidi läbi järgides loomkatse läbiviimise luba nr 299 (lisa 2) ning loomkatseid viidi läbi bakalaureuse töö autori juhendaja Kristina Põšnograjeva juhendamisel. Katsete käigus kasutati 16 isast Balb/c albiino immuunpuudulikkusega hiirt, kelle vanus oli 8-16 nädalat ja kehakaal 25-30 grammi. Katsed viidi läbi Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudi katseloomakeskuses.

In vivo faagidispleis süstiti hiiri intravenoosselt ehk sabaveeni bakteriofaage sisaldava füsioloogilise lahusega, mille maht oli 100 µl. *In vivo* faagidispleis kasutatakse kolmandas voorus elueeritud faagisegu ning algset CX7C raamatukogu (CX7C+2b, B raamatukogu+2b, CX7C raamatukogu), mis olid eelnevalt PEG8000 sadestamise, tseesium gradient-tsentrifuugimise ja dialüüsi abil puhastatud, et eemaldada lipopolüsahhariidid jt kontaminandid. Iga raamatukogu testimiseks kasutati kahte looma ning üksikute faagikloonide testimiseks kasutati kolme looma ja kontrollfaagide testimiseks kahte looma. Faagidel lasti tsirkuleerida 30 minutit ning sellel ajal katseloomalt proove ei võetud. Peale faagi tsirkulatsiooni viidi loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi deksmedetomidini (0,1 mg/kg) ja ketamiini (75 mg/kg), mida süstiti katselooma kõhuõõnde. Hiir fikseeriti alusele ja avati kõhuõõs ning diafragma. Südame paremasse kambrisse tehti väike sisselõige ning südame vasakusse vatsakesse torgati perfusiooninõel. Veretustamine viidi läbi perfusiooni teel 20 ml PBS-ga. Perfusioon viidi läbi kuni maks ja neerud olid muutunud heledaks. Loomadelt võeti maks ja aju, mis kaaluti ning asetati 14 ml Falconi tuubi, kuhu oli varasemalt lisatud 1 ml LB+ 1% NP40. Koed homogeniseeriti (OMNI International, USA) ning tiiterdati.

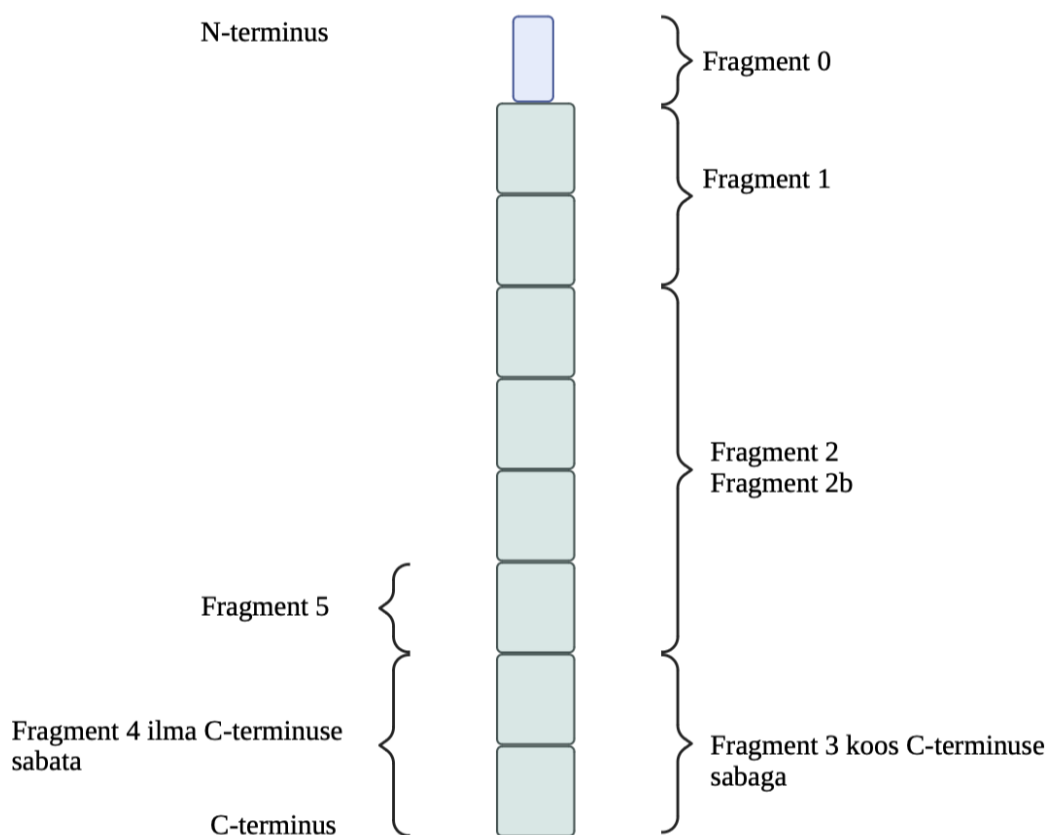
2.2.8. Andmeanalüüs

Kogu andmeanalüüs viidi läbi kasutades Prism tarkvara (GraphPad, versioon 10) ning programmi Microsoft Excel. Graafikutel näidatud katsepunktid on saadud katsekorduste arvu aritmeetilise keskmisena ja tulpadel olevad vearistid näitavad standardhälvet (SD). Statistiliseks andmeanalüüsiks kasutati Kruskal-Wallise testi ning erinevused loeti oluliseks, kui p oli väiksem kui 0,05.

2.3. Tulemused

2.3.1. Rakuvaba faagidisplei CX7C ja B raamatukogudega

Töö esimese poole eesmärk oli leida kandidaatpeptiide, mis seonduksid adaptervalguga kasutades rakuvaba faagidispleid. Adaptervalk on suur valk ning tervikliku valguga tootmine ja puhastamine osutus võimatuks, selle asemel jagati valk kuueks väiksemaks fragmendiks – 0, 1, 2, 2b, 3 ja 5 – kusjuures fragment 2b on fragmendi 2 mutant (Joonis 8). Adaptervalguga fragmendid toodeti ja puhastati Icosagenis. Antud töös kasutati rakuvabas faagidispleis kolme adaptervalguga fragmenti – 1, 2 ja 2b. 2b fragmendile seondub täppis- ja nanomeditiini laboris varasemalt kirjeldatud HEB penetreeriv peptiid CBP (publitseerimata andmed). Seega püstitati hüpotees, et ka teised peptiidid, mis seonduvad adaptervalguga 2b fragmendile, võivad akumulereeruda ajukoes. Paralleelselt kasutati ka fragmente 1 ja 2, et uurida, kas ka nende fragmentidega seonduvad ligandid on võimalised läbima HEB-i ja akumulereeruma ajus.

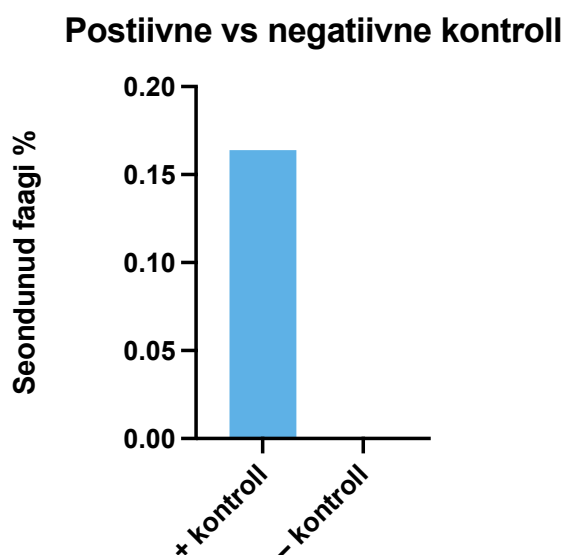


Joonis 8. Adaptervalguga fragmentide skeem. Fragmentide N-terminuses on Twin-Strep Tag, mis seondub kõige tugevamalt Strep-Tactin'ga. Joonis on tehtud Biorender programmis (BioRender.com).

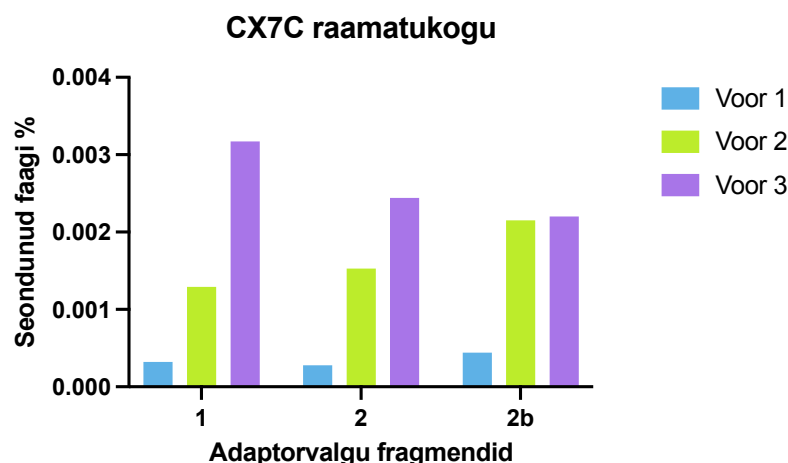
Faagidispleis kasutati kahte tsirkulaarset faagiraamatukogu, mis on valmistatud täppis- ja nanomeditiini laboris. CX7C (CXXXXXXXXC, kus C on tsüsteiin ja X on juhuslik aminohape) on raamatukogu, kus on seitse varieeruvat aminohappe positsiooni. Teine raamatukogu (B) on

disainitud HEB penetreeriva peptiidi CBP adaptervalguga seondumise motiivi põhjal – see sisaldab kolme fikseeritud aminohapet ning viite varieeruvat positsiooni (X).

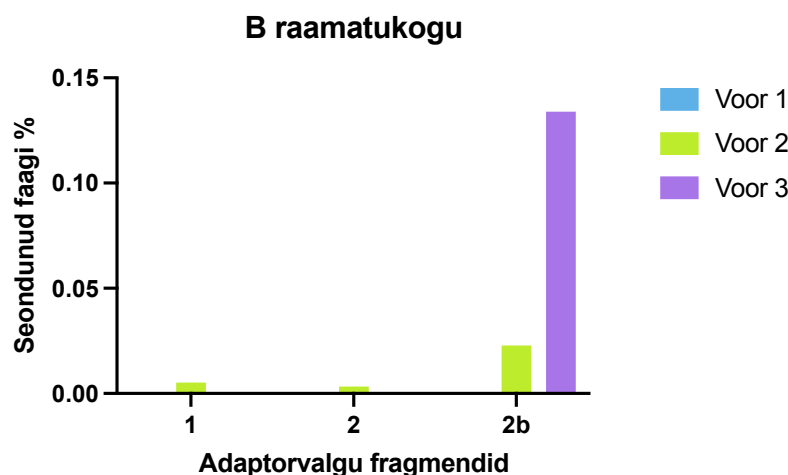
Rakuvaba faagidisplei esimeseks sammuks oli magnetkerakeste funktsionaliseerimine adaptervalguga fragmendiga. Seejärel lisati magnetkerakestele faagiraamatukogu, positiivne kontroll CBP (seondub adaptervalguga fragmendiga 2b) või negatiivne kontroll G7 (ei seonu ühegi adaptervalguga fragmendiga) (Joonis 9). Seondumata faagid pesti magnetkerakestelt maha ning seondunud faagid elueeriti ning määrati eluaadi tiiter. Faagiraamatukogu eluaati kasutati järgnevas selektsioonivoorus. Kokku tehti kolm voolu. CX7C raamatukogu korral kasvas seondunud faagi % esimese ja kolmanda voolu vahel kõigi kolme fragmendi puhul, mis viitab sellele, et faagidisplei käigus toimus faagiraamatukogus adaptervalguga fragmendile seonduvate peptiidide rikastumine. Fragment 1 puhul oli seondunud faagi % kolmandas voolus peaaegu 10 korda kõrgem võrreldes esimese vooluga ja fragment 2 puhul 8 korda kõrgem. Fragment 2b puhul oli seondunud faagi % teises voolus 7 korda kõrgem võrreldes esimese vooluga, kuid teise ja kolmanda voolu vahel seondunud faagi % ei kasvanud (Joonis 10). B raamatukogu puhul oli kolme voolu tulemusena seondunud faagi % kasvanud ainult adaptervalguga fragmendiga 2b – kolmandas voolus oli seondunud faagi % 620 korda kõrgem võrreldes esimese vooluga (Joonis 11). Kolmanda voolu proovidele, kus kasutati adaptervalgu 2b, tehti ka Sangeri sekveneerimine ning tulemuste põhjal valiti edasiseks testimiseks 14 peptiidi, mida esines kõige rohkem või milles oli esindatud korduv aminohappeline motiiv.



Joonis 9. Positiivse (CBP) ja negatiivse (G7) kontrolli seondumine adaptervalguga. Diagrammil on katse käigus saadud tulemused esitatud valgule seondunud faagi protsendina $\{[\text{elueeritud faag (pfu)}/\text{kerakestele lisatud faag (pfu)}] \cdot 100\%$. CBP seondumine adaptervalguga fragmendiga 2b on 264 korda kõrgem kui negatiivse kontrolli seondumine.



Joonis 10. CX7C raamatukogu rikastumine faagidisplei voorudes 1-3. Diagrammil on katse käigus saadud tulemused esitatud valgule seondunud faagi protsendina. Kõige kõrgemat rikastumist näitab fragment 1.

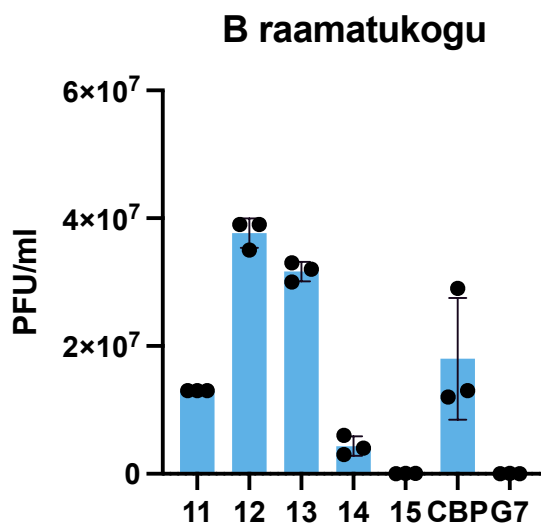


Joonis 11. B raamatukogu rikastumine faagidisplei voorudes 1-3. Diagrammil on katse käigus saadud tulemused esitatud valgule seondunud faagi protsendina. Fragment 2b puhul on rikastumine esimese ja kolmanda vooru vahel 620-kordne.

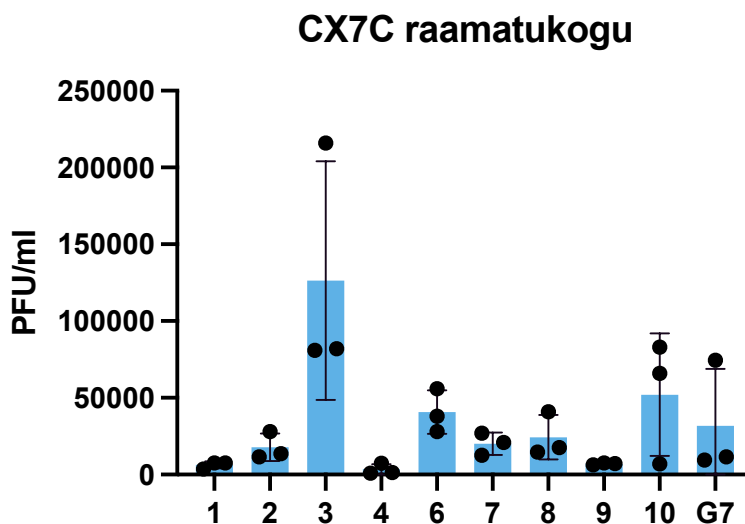
2.2.2. Kandidaatpeptiidide seondumine adaptervalgu fragmendiga 2b

Faagidisplei kolmandast voorust välja valitud kandidaatpeptiidide ja kontrollpeptiididega viidi läbi seondumiskatse Strep-Tactin magnetkerakestel. Kandidaatpeptiidid 1-10 on CX7C raamatukogust ja 11-15 on pärit B raamatukogust. Peptiide kodeerivad järjestused kloneeriti T7 faagi genoomi, misjärel peptiidid ekspresseerusid faagi pinnal faagi pinnavalgu fusioonina. 14 kandidaatpeptiidi seondumist adaptervalgu 2b fragmendile võrreldi CBP-ga (positiivne kontroll) ja G7-ga (negatiivne kontroll). Kaks peptiidi (12 ja 13), mis on pärit B raamatukogust, näitasid kõrgemat seondumist adaptervalgu fragmendiga 2b kui CBP, kuid erinevus ei olnud statistiliselt oluline ($P > 0,05$). Samas, peptiidide 12 ja 13 seondumine fragmendile 2b oli statistiliselt oluliselt kõrgem võrreldes negatiivse kontrolliga G7 ($P < 0,05$) (Joonis 12). CX7C raamatukogust valitud peptiididest ei olnudki ühegi seondumine tugevam

kui võrreldava CBP-ga. Üks peptiid CX7C raamatukogust seondus adaptervalgu 2b fragmendiga 4 korda paremini kui negatiivne kontroll G7, kuid erinevus ei olnud statistiliselt oluline ($P>0,05$) (Joonis 13).



Joonis 12. B raamatukogu kandidaatpeptiidide seondumine adaptervalgu 2b fragmendiga. Kõige tugevamat seondumist adaptervalgu fragmendiga 2b näitasid peptiidid 12 ja 13. Võrreldes G7 kontroll-peptiidiga, oli mõlema seondumine statistiliselt oluliselt tugevam peptiid 12 puhul ($P<0,01$) ja 13 puhul ($P<0,05$). Võrreldes CBP-ga ei olnud kummagi peptiidi seondumine statistiliselt oluliselt erinev. Tulpadel olevad vearistid näitavad standarddiga.



Joonis 13. CX7C kandidaatpeptiidide seondumine adaptervalgu 2b fragmendiga. Kõige tugevam seondumine oli peptiidiga number 3, mis seondus fragmendiga 2b 4 korda paremini kui G7. Kruskal-Wallise testi tulemusena ei ole aga ühegi peptiidi seondumine 2b fragmendiga statistiliselt oluliselt erinev võrreldes negatiivse kontrolliga ($P>0,05$). Tulpadel olevad vearistid näitavad standarddiga.

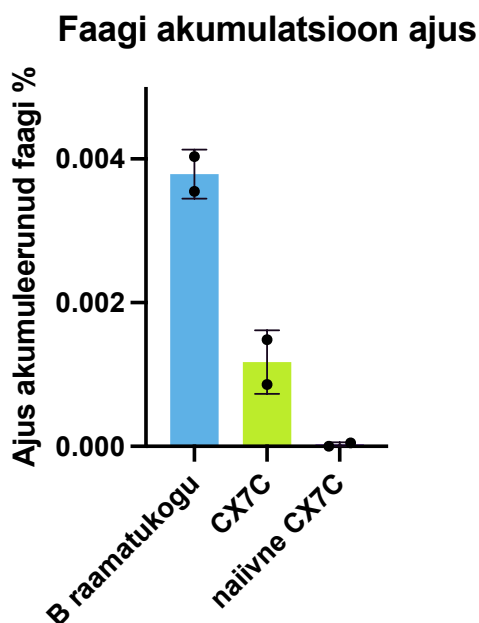
2.3.3. *In vivo* faagidisplei ja kandidaatpeptiidide testimine

In vivo katsetega sooviti hinnata, kas rakuvaba faagidisplei käigus on toimunud faagiraamatukogus selliste peptiidide rikastumine, mis akumulereuvad ajus. Samuti uuriti kahe uue kandidaatpeptiidi akumulereumist ajus.

Hiirte sabaveeni süstiti faagidisplei 3. vooru proove, mis olid selekteeritud adaptervalgu 2b fragmendi vastu. Kontrollina süstiti esialgset CX7C raamatukogu (naiivne CX7C). Faagidel lasti tsirkuleerida 1 tund. Igas rühmas kasutati kahte looma. Peale tsirkuleerimist hiired anesteseeriti ja perfuseeriti PBS-iga. Hiirtelt eemaldati aju ja kontrollorganina maks. Koed homogeniseeriti ja määrati, kui palju faagi akumulereus hiire aju ja maksas. Seejärel arvutati, kui suur osa kogu süstitud faagist akumulereus hiire aju:

$$\frac{\text{aju akumulereunud faag (PFU)}}{\text{süstitud faag (PFU)}} * 100\%$$

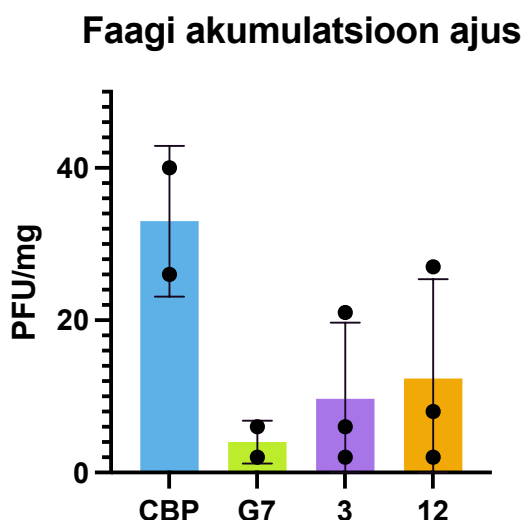
Faagidisplei 3. vooru faagiraamatukogude akumulatsioon hiire aju oli kõrgem võrreldes esialgse CX7C raamatukoguga – CX7C raamatukogu puhul oli akumulatsioon keskmiselt 47 korda kõrgem ja B raamatukogu puhul 150 korda kõrgem, kuid erinevused ei olnud statistiliselt oluliselt erinevad.



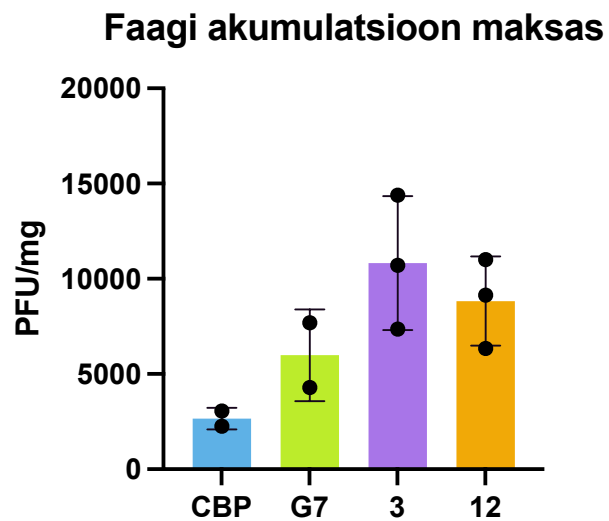
Joonis 14. 3. vooru 2b fragmendiga seondunud faagiraamatukogude akumulereumine aju. Diagrammil on katse käigus saadud tulemused esitatud protsendina tagasisaadud faagist. Tulpadel olevad vearistid näitavad standardviga. Kruskal-Wallise testi põhjal ei ole B raamatukogu ja CX7C raamatukogu 3. vooru proovidel statistiliselt olulist erinevust võrreldes CX7C algraamatukoguga ($P > 0,05$).

Hiire sabaveeni süstiti kummastki raamatukogust pärit üks kandidaatpeptiid, mille seundumine adaptervalgu 2b fragmendiga oli tugevaim – kandidaatpeptiid 3 CX7C raamatukogust ja 12 B raamatukogust. Kummagi kandidaatpeptiidi testimiseks kasutati kolme katselooma. Positiivse kontrollpeptiidina kasutati CBP, kuna see läbib HEB ja akumulereub hiire aju (publitseerimata andmed) ja negatiivse kontrollpeptiidina kasutati G7, kuna see ei läbi HEB ja ei akumulereeru aju. Mõlema peptiidi testimiseks kasutati kahte looma. Faagide tsirkulatsiooniaeg oli 1 tund, peale mida hiired viidi sügavasse anesteesiasse ja seundumata faagid eemaldati perfusiooniga. Hiirtelt eemaldati aju ja kontrollkoena maks. Koed homogeniseeriti ja määrati iga koe faagitiiter.

CBP akumulatsioon aju oli kõrgem võrreldes negatiivse kontrolliga, mis on kooskõlas varasemalt meie uurimisrühmas tehtud katsetega (publitseerimata andmed). Kandidaatpeptiidide 3 ja 12 akumulatsioon aju oli keskmiselt kõrgem võrreldes negatiivse kontrolliga, kuid varieeruvus katseloomade vahel oli kõrge, seega ei ole erinevus statistiliselt oluline.



Joonis 15. Kandidaatpeptiidide ja kontrollpeptiidide akumulatsioon aju. Diagrammil näitab Y-telg faagi tiitrit koe massi kohta. Tulpadel olevad vearistid näitavad standardviga. Kruskal-Wallise testi tulemusena ei ole ükski peptiid võrreldes G7-ga statistiliselt oluline ($P > 0,05$).



Joonis 16. Kandidaatpeptiidide ja kontrollpeptiidide akumulatsioon maksas. Diagrammil näitab Y-telg faagi tiitrit koe massi kohta. Tulpadel olevad vearistid näitavad standardviga. Kruskal-Wallise testi tulemusena ei ole ükski peptiid võrreldes G7-ga statistiliselt oluline ($P > 0,05$).

2.4. Arutelu

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli leida kandidaatpeptiide, mis seonduksid adaptervalgu fragmendiga 2b ja testida nende akumulatsiooni ajukoes ja kontrollorganites. Varasemalt avastatud HEB-i penetreerivad peptiidid pääsevad ajju, sidudes end otse kapillaarides paiknevatele retseptoritele, mis võimaldab nende transporti retseptorvahendatud transsütoosi kaudu. Näiteks laialdaselt kasutatav peptiid Angiopep-2 (peatükk 1.2.2.1.) seondub retseptoriga LRP-1, mis ekspresseerub HEB-i endoteelirakkude pinnal. Pärast seondumist internaliseeritakse kompleks endotsütoosi teel ning transporditakse edasi aju parenhüümi. Nano- ja täppismeditsiini laboris avastatud peptiid CBP transporditakse ajju veres tsirkuleeruva adaptervalgu vahendusel, mis moodustab silla peptiidi ja HEB-i transsütoosi retseptorite vahel. Tekkinud kompleks seondub kapillaaridel ekspresseeritavatele retseptoritele ning võimaldab peptiidi läbipääsu HEB-i (publitseerimata andmed). Sellist HEB läbimise mehhanismi pole varem kirjeldatud. Käesoleva uurimistöö eesmärk oli testida, kas ka teised adaptervalguga seonduvad peptiidid suudavad akumuleeruda ajus. Kui see kinnitust leiab, võiks adaptervalgu potentsiaalselt kasutada sihtmärgina erinevate afiinsusligandide – näiteks antikehade või aptameeride – väljatöötamiseks, et parandada HEB-i penetratsiooni.

Bakalaureusetöö käigus viidi läbi rakuvaba faagidisplei, et leida uusi peptiide, mis seonduksid adaptervalgu fragmentidega. Esiteks kasutati faagiraamatukogu, kus faagide pinnal ekspresseeritakse seitsmest juhuslikust aminohappest koosnevaid tsüklilisi peptiide (CX7C). Selle raamatukoguga nägime, et faagide seondumine adaptervalgu fragmentidega (1, 2 ja 2b) oli voorus 3 kõrgem kui voorus 1. See viitab, et igas voorus on kasvanud selliste faagide arv, mis ekspresseerivad pinnal adaptervalgu fragmendiga seonduvat peptiidi. Seega on seondumise kasv voorude vahel esmaseks märgiks, et faagidisplei oli edukas (Prakash jt, 2019). Kuna CBP seondub 2b fragmendile, otsustati lähemalt uurida peptiidijärjestusi, mis seonduvad just sellele fragmendile, kuigi tulevikus oleks oluline teada, kas ka teistele adaptervalgu fragmentidele seonduvad peptiidid akumulatsioon ajus, või peab ligand HEB läbimiseks seonduma just adaptervalgu 2b fragmendile.

Määrati ka adaptervalgu 2b fragmendi 3. vooru proovide akumulatsioon ajus ja võrreldi seda esialgse raamatukogu akumulatsiooniga ajus. See aitab hinnata, kas kolme faagidisplei vooru järel on faagiraamatukogus peptiide, mis akumulatsioon ajus. Nii CX7C kui ka B raamatukogu 3. vooru proovide akumulatsioon ajus oli kõrgem kui esialgse raamatukogu akumulatsioon, mis viitab sellele, et kolme rakuvaba faagidisplei vooru järel võib kumbki raamatukogu sisaldada peptiide, mis läbivad HEB ja akumulatsioon ajus. Järgmiseks eesmärgiks oli tuvastada

faagiraamatukogudest need peptiidijärjestused, mis seonduvad 2b fragmendile ja testida, kas need akumulatuurivad ajus.

Sangeri sekveneerimise abil tuvastati 3. vooru faagiraamatukogudest peptiidid, mis on ekspresseerunud 2b fragmendiga seondunud faagide pinnal. Edasiseks testimiseks valiti 14 kandidaatpeptiidi. Peptiidid 1-10 olid pärit CX7C raamatukogust, mille seondumine 2b fragmendiga oli võrreldes positiivse kontrolliga (CBP) kuni 142 korda madalam. Rakuvabas seondumiskatses oli kõigi kandidaatpeptiidide vahel väike erinevus võrreldes negatiivse kontrolliga. *In vivo* katsete jaoks valiti üks peptiid (number 3), mille seondumine adaptervalgu 2b fragmendile oli kõige kõrgem. Loomkatses nähti, kandidaatpeptiidi 3 keskmine akumulatsioon ajus on kõrgem võrreldes negatiivse kontrollpeptiidiga ja madalam võrreldes positiivse kontrollpeptiidiga CBP, kuigi erinevused ei ole statistiliselt olulised. Kõrge varieeruvus loomade vahel võib tuleneda nii katse läbiviimisest – erinevustest intravenoossel süstimisel ja perfusioonil – kui ka füsioloogilistest erinevustest loomade vahel.

B raamatukogu oli disainitud CBP peptiidi põhjal – see sisaldab fikseeritud aminohappeid (3 aminohapet), mis on olulised CBP transportimiseks läbi HEB-i (publitseerimata andmed). Samuti sisaldab raamatukogu 5 varieeruvat positsiooni. Rakuvabas faagidisplei kolme vooru jooksul kasvas B raamatukogu seondumine 2b fragmendile, kuid mitte teistele adaptervalgu fragmentidele. See oli oodatav tulemus, kuna raamatukogu sisaldab sama aminohappelise motiivi kui CBP peptiid, mis seondub 2b fragmendile. Viis peptiidi (11-15) B raamatukogust valiti testimiseks rakuvabas seondumiskatses ning selle tulemusena tuvastati kaks peptiidi (12 ja 13), mille seondumine adaptervalgu fragmendiga 2b oli kuni 2 korda kõrgem võrreldes CBP-ga. *In vivo* testimiseks valiti B raamatukogust üks peptiid (12), kuna peptiidide 12 ja 13 vahe seisnes ainult ühes aminohappes. Loomkatses nähti sarnaselt esimese kandidaatpeptiidiga, et peptiidi 12 keskmine akumulatsioon ajus on kõrgem võrreldes negatiivse kontrollpeptiidiga ja madalam võrreldes positiivse kontrollpeptiidiga CBP, kuigi erinevused ei ole statistiliselt olulised.

Käesolevas töös määrati uute kandidaatpeptiidide ekspresseerivate faagide akumulatsiooni ajus. Kuigi veres ringlevad seondumata faagid eemaldatai ajukoest perfusiooni teel, siis antud töös kasutatud meetodiga (kogu aju purustamine ja faagititri määramine) ei ole võimalik eristada HEB läbinud faage nendest faagidest, mis on seondunud aju veresoonte endoteelirakkudega, kuid pole HEB läbinud. Sellist nähtust on täheldatud Alzheimeri ravimite puhul, kus antikeha võib seonduda veresoonte pinnal paikneva amüloid- β -ga, mis takistab neil aga HEB-i ületamist

(Makin, 2025). Kandidaatpeptiidide jõudmistaju parenhüümi saab uurida konfokaalmikroskoopia abil – kasutades veresoonte ja faagide detekteerimiseks antikehi on võimalik määrata faagide asukoht. Kõige rohkem ajus akumulunud peptiide oleks hea testida sellisel viisil, et näha, kas peptiid ületab ka HEB-i.

Käesoleva töö käigus avastati mitmeid peptiide, mis seonduvad adaptervalgu fragmendiga 2b ning nende peptiidide akumulatsioon ajus oli kõrgem võrreldes negatiivse kontrollpeptiidiga, samas erinevus ei olnud statistiliselt oluline. Lõpliku arusaamise kujundamiseks võiks *in vivo* katsetes kasutada rohkem loomi ühe rühma kohta ($n=3$). Sellega oleks võimalik kitsendada varieeruvust ühes grupis ja saada täpsema ülevaate, millised peptiidid akumuluvad ajus. Samuti võiks lisaks Sangeri sekveneerimisele teha kõrge läbilaskevõimega sekveneerimist (HTS) kõikidele faagidisplei vooru proovidele, kuna kõiki häid kandidaatpeptiide ei ole võimalik Sangeri sekveneerimisega tuvastada. Järgnevalt võiks testida ka pikemaid ja lineaarseid faagiraamatukogusid, mis annaks rohkem vabadust selle üle, milline on peptiidi järjestus.

Peptiid, mis on võimeline seonduma adaptervalgu 2b fragmendiga ja ületama HEB-i, pakub paljulubavat platvormi sihipäraseks ravimite ja nanoosakeste transpordiks ajju. Kuna HEB on molekulide suhtes selektiivsuse tõttu võib selline sihitud transpordisüsteem pakkuda uusi võimalusi neurodegeneratiivsete haiguste ja ajukasvajate tõhusamaks raviks.

KOKKUVÕTE

Käesoleva uurimistöö eesmärk oli leida kullerpeptiid, mis seonduks adaptervalgu fragmendiga ja akumul eeruks ajus. Varasemate tulemuste põhjal teame, et täppis- ja nanomedit siini laboris avastatud peptiid seondub adaptervalgu fragmendiga 2b, mis on võimeline ületama HEB-i.

Töö praktilise osa esimeses pooles testiti kahte faagiraamatukogu seondumist kolme erineva adaptervalgu fragmendiga. Rakuvaba faagidisplei tulemuste põhjal oli tugevaim seondumine adaptervalgu 2b fragmendiga. Järgnevalt valiti Sanger sekveneerimise tulemuste alusel 14 kandidaatpeptiidi edasiseks testimiseks, millest kõige paremini seondusid B raamatukogust pärit peptiidijärjestused. Bakalaureuse töö praktilise osa teiseks eesmärgiks oli testida, kas kandidaatpeptiidid akumul eeruvad ajus. *In vivo* uuriti mõlemast raamatukogust pärit ühte kandidaatpeptiidi, millel oli tugevaim seondumine 2b fragmendiga. Rakuvaba faagidisplei katsete tulemusena osutus kõige paremaks peptiidiks nr 12. *In vivo* katsete tulemusena ei olnud uute kandidaatpeptiide akumulatsioon ajus kõrgem kui positiivsel kontrollil. Võrreldes negatiivse kontrolliga oli peptiidide akumulatsioon kõrgem, kuid erinevus ei olnud statistiliselt oluline. Seega vajab adaptervalgu fragment edasist uurimist – kas see on hea sihtmärk, mida kasutada erinevate ravimite transportimiseks ajju.

Käesoleva töö käigus kasutati rakuvaba faagidisplei meetodit, millega saab välja sõeluda peptiide, mis seonduvad adaptervalgu fragmentidega. Samasugust süsteemi on võimalik kasutada ka teiste adaptervalgu fragmentidega ja faagiraamatukogudega, et leida peptiide, mis akumul eeruksid ajus ja suudaksid ületada HEB-i.

SUMMARY

„Discovery and characterization of blood-brain barrier-penetrating peptides“

Hanka Karmen Nõmmik

Summary

Globally there are 3,4 billion people that suffer from different neurological disorders, which has increased significantly over the past 30 years due to the growing population, aging and lifestyle. Although drug candidates are being constantly developed, majority of them are ineffective or aren't able to cross the blood-brain barrier (BBB). The BBB is a structural unit in the brain that regulates the entry of various substances, including neurotherapeutic drugs, into the central nervous system. Blood-brain barrier penetrating peptides are one promising strategy, as they are able to cross the BBB and deliver drugs to brain parenchyma.

Researchers have focused on developing new technologies, such as phage display, to improve the efficacy of drugs and their potential delivery to the brain. Phage display can identify and optimize peptides that can cross the BBB. Accordingly, various transport systems are also being investigated that would facilitate the transport of drugs to the brain.

The aim of this study was to find a peptide that would bind to an adaptor protein fragment and accumulate in a mouse brain. Based on previous results, we know that fragment 2b binds to a peptide named CBP, discovered in the Laboratory of Precision and Nanomedicine, which also crosses the blood-brain barrier.

Based on cell-free phage display, two different phage libraries were studied and their binding to three different adaptor protein fragments. Subsequently 14 candidate peptides were selected for further testing, of which 2 candidate peptides from the B library showed higher binding to fragment 2b than previously described CBP. For animal studies, one candidate peptide with highest binding to adaptor protein fragment 2b was selected from either phage libraries. *In vivo* tests showed the candidate peptides had higher accumulation in brain compared to the negative control, but the results are not statistically significant. Therefore, the adaptor protein fragment needs further testing – whether it is a good target to use for transporting various drugs to the brain.

TÄNUSÕNAD

Suurimad tänud Kristinale, juhendajale, kes oli mulle kogu bakalaureusetöö vältel suureks toeks. Maailma kõige parem juhendaja!

Samuti soovin tänada Tambetit, kes andis võimaluse teha oma bakalaureusetöö just nano- ja täppismeditsiini laboris ja nii meeldivas kollektiivis. Lisaks tänan oma kaasjuhendajat Juhan Sedmani heade nõuannete eest lõputöö vormistamisel.

Soovin tänada ka enda vanemaid, kes on minusse alati uskunud ja motiveerinud viimase kolme aasta jooksul. Eriti kui olen olnud mõtteis, mida sissejuhatusse kirjutada.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Aisen, P. (2004). Transferrin receptor 1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(11), 2137–2143. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.007>
- André, S., Larbanoix, L., Verteneuil, S., Stanicki, D., Nonclercq, D., Vander Elst, L., Laurent, S., Muller, R. N., & Burté, C. (2022). Development of an LDL Receptor-Targeted Peptide Susceptible to Facilitate the Brain Access of Diagnostic or Therapeutic Agents. *Biology*, 9(7), 161. <https://doi.org/10.3390/biology9070161>
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood–brain barrier: An overview. *Neurobiology of Disease*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.12.016>
- Bazan, J., Całkosiński, I., & Gamian, A. (2012). Phage display--a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 8(12), 1817–1828. <https://doi.org/10.4161/hv.21703>
- Bellettato, C. M., & Scarpa, M. (2018). Possible strategies to cross the blood–brain barrier. *Italian Journal of Pediatrics*, 44(S2), 131. <https://doi.org/10.1186/s13052-018-0563-0>
- Blades, R., Ittner, L. M., & Tietz, O. (2023). Peptides for trans-blood–brain barrier delivery. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 66(9), 237–248. <https://doi.org/10.1002/jlcr.4023>
- Bourassa, P., Alata, W., Tremblay, C., Paris-Robidas, S., & Calon, F. (2019). Transferrin Receptor-Mediated Uptake at the Blood–Brain Barrier Is Not Impaired by Alzheimer’s Disease Neuropathology. *Molecular Pharmaceutics*, 16(2), 583–594. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00870>
- Brown, L. S., Foster, C. G., Courtney, J.-M., King, N. E., Howells, D. W., & Sutherland, B. A. (2019). Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 282. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00282>
- Cavaco, M., Fraga, P., Valle, J., Silva, R. D. M., Gano, L., Correia, J. D. G., Andreu, D., Castanho, M. A. R. B., & Neves, V. (2024). Molecular determinants for brain targeting by peptides: A meta-analysis approach with experimental validation. *Fluids and Barriers of the CNS*, 21(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12987-024-00545-5>
- Chandramohan, V., Sampson, J. H., Pastan, I. H., Bigner, D. D. (2017) Immunotoxin Therapy for Brain Tumors. *Translational Immunotherapy of Brain Tumors*, 227-260. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802420-1.00010-7>
- Chen, Y., & Liu, L. (2012). Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7), 640–665. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.010>

- Choi, Y. K., & Kim, K. W. (2008). Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB reports*, 41(5), 345–352. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2008.41.5.345>
- Cipolla, M. J. (2009). The Cerebral Circulation. *Morgan & Claypool Life Sciences*, 33–42.
- Copur, T & Öner, L. (2017) Drug Delivery to the Brain: Pharmacokinetic Concepts. *Nanotechnology Methods for Neurological Diseases and Brain Tumors*, 69–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803796-6.00004-6>
- Derakhshankhah, H., & Jafari, S. (2018). Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 108, 1090–1096. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.097>
- Díaz-Perlas, C., Sánchez-Navarro, M., Oller-Salvia, B., Moreno, M., Teixidó, M., & Giralt, E. (2017). Phage display as a tool to discover blood-brain barrier (BBB)-shuttle peptides: panning against a human BBB cellular model. *Biopolymers*, 108(1), <https://doi.org/10.1002/bip.22928>
- Dotiwala, A. K., McCausland, C., & Samra, N. S. (2023). Anatomy, Head and Neck: Blood Brain Barrier. *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Ehrlich, P. (2013). Über die Beziehungen von chemischer Constitution, Vertheilung und pharmakologischer Wirkung. *The Collected Papers of Paul Ehrlich*, (Elsevier), pp. 570–595.
- El-Khoury, N., Braun, A., Hu, F., Pandey, M., Nedergaard, M., Lagamma, E. F., & Ballabh, P. (2006). Astrocyte End-Feet in Germinal Matrix, Cerebral Cortex, and White Matter in Developing Infants. *Pediatric Research*, 59(5), 673–679. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000214975.85311.9c>
- Gabathuler R. (2010). Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of disease*, 37(1), 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.028>
- Guo, Q., Zhu, Q., Miao, T., Tao, J., Ju, X., Sun, Z., Li, H., Xu, G., Chen, H., & Han, L. (2019). LRP1-upregulated nanoparticles for efficiently conquering the blood-brain barrier and targetedly suppressing multifocal and infiltrative brain metastases. *Journal of Controlled Release*, 303, 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.031>
- Hamzeh-Mivehroud, M., Alizadeh, A. A., Morris, M. B., Bret Church, W., & Dastmalchi, S. (2013). Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(23–24), 1144–1157. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.09.001>

- Haqqani, A. S., Bélanger, K., & Stanimirovic, D. B. (2024). Receptor-mediated transcytosis for brain delivery of therapeutics: Receptor classes and criteria. *Frontiers in Drug Delivery*, 4, 1360302. <https://doi.org/10.3389/fddev.2024.1360302>
- Kalaria, R. N., Sromek, S. M., Grahovac, I., & Harik, S. I. (1992). Transferrin receptors of rat and human brain and cerebral microvessels and their status in Alzheimer's disease. *Brain research*, 585(1-2), 87–93. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91193-i](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91193-i)
- Kapoor, P., Singh, H., Gautam, A., Chaudhary, K., Kumar, R., & Raghava, G. P. S. (2012). TumorHoPe: A Database of Tumor Homing Peptides. *PLoS ONE*, 7(4), e35187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035187>
- Kasman, L. M., & Porter, L. D. (2022). Bacteriophages. *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Konthur, Z., & Cramer, R. (2003). High-throughput applications of phage display in proteomic analyses. *TARGETS*, 2(6), 261–270. [https://doi.org/10.1016/S1477-3627\(03\)02383-3](https://doi.org/10.1016/S1477-3627(03)02383-3)
- Kounnas, M. Z., Moir, R. D., Rebeck, G. W., Bush, A. I., Argraves, W. S., Tanzi, R. E., Hyman, B. T., & Strickland, D. K. (1995). LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell*, 82(2), 331–340. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90320-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90320-8)
- Kuang, Y., An, S., Guo, Y., Huang, S., Shao, K., Liu, Y., Li, J., Ma, H., & Jiang, C. (2013). T7 peptide-functionalized nanoparticles utilizing RNA interference for glioma dual targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 454(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.019>
- Kumar, V., Patiyal, S., Kumar, R., Sahai, S., Kaur, D., Lathwal, A., & Raghava, G. P. S. (2021). B3Pdb: An archive of blood–brain barrier-penetrating peptides. *Brain Structure and Function*, 226(8), 2489–2495. <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02341-5>
- Lakatosova, S., & Ostatnikova, D. (2012). Reelin and its complex involvement in brain development and function. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(9), 1501–1504. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.002>
- Liu, R., Li, X., Xiao, W., & Lam, K. S. (2017). Tumor-targeting peptides from combinatorial libraries. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 110–111, 13–37. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.009>
- Maľarik T., Bhide K., Talpašová L., Bhide M. (2024) Mphages and the blood-brain barrier: A review. *Folia Veterinaria*, 68(1), 15-21. doi: 10.2478/fv-2024-0002
- Makin, S. (2025). The next generation of Alzheimer's drugs. *Nature*, 640. [doi:https://doi.org/10.1038/d41586-025-01102-2](https://doi.org/10.1038/d41586-025-01102-2)

- Moos, T., & Morgan, E. H. (2004). The Metabolism of Neuronal Iron and Its Pathogenic Role in Neurological Disease: Review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012(1), 14–26. <https://doi.org/10.1196/annals.1306.002>
- Nishanth, G., & Schlüter, D. (2019). Blood-Brain Barrier in Cerebral Malaria: Pathogenesis and Therapeutic Intervention. *Trends in parasitology*, 35(7), 516–528. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.04.010>
- Ohtsuki, S., & Terasaki, T. (2007). Contribution of Carrier-Mediated Transport Systems to the Blood–Brain Barrier as a Supporting and Protecting Interface for the Brain; Importance for CNS Drug Discovery and Development. *Pharmaceutical Research*, 24(9), 1745–1758. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9374-5>
- Pardridge, W. M., Eisenberg, J., & Yang, J. (1987). Human blood-brain barrier transferrin receptor. *Metabolism: clinical and experimental*, 36(9), 892–895. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(87\)90099-0](https://doi.org/10.1016/0026-0495(87)90099-0)
- Parrasia, S., Szabò, I., Zoratti, M., & Biasutto, L. (2022). Peptides as Pharmacological Carriers to the Brain: Promises, Shortcomings and Challenges. *Molecular Pharmaceutics*, 19(11), 3700–3729. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00523>
- Petralla, S., Panayotova, M., Franchina, E., Fricker, G., & Puris, E. (2024). Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 as a Potential Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Pharmaceutics*, 16(7), 948. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16070948>
- Lingasamy, P., Tobi, A., Haugas, M., Hunt, H., Paiste, P., Asser, T., Rätsep, T., Kotamraju, V. R., Bjerkvig, R., & Teesalu, T. (2019). Bi-specific tenascin-C and fibronectin targeted peptide for solid tumor delivery. *Biomaterials*, 219, 119373. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119373>
- Pöšnograjeva, K., Pleiko, K., Haugas, M., & Teesalu, T. (2022). New Tools for Streamlined In Vivo Homing Peptide Identification. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2383, 385–412. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1752-6_25
- Qian, Z. M., Li, H., Sun, H., & Ho, K. (2002). Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacological reviews*, 54(4), 561–587. <https://doi.org/10.1124/pr.54.4.561>
- Rebeck, G. W., Reiter, J. S., Strickland, D. K., & Hyman, B. T. (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron*, 11(4), 575–580. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90070-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90070-8)

- Sakamoto, K., Shinohara, T., Adachi, Y., Asami, T., & Ohtaki, T. (2017). A novel LRP1-binding peptide L57 that crosses the blood brain barrier. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12, 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.07.003>
- Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., & Bernardino, L. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*, 235, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.044>
- Schmidt, N., Mishra, A., Lai, G. H., & Wong, G. C. L. (2010). Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Letters*, 584(9), 1806–1813. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.046>
- Sengillo, J. D., Winkler, E. A., Walker, C. T., Sullivan, J. S., Johnson, M., & Zlokovic, B. V. (2013). Deficiency in Mural Vascular Cells Coincides with Blood–Brain Barrier Disruption in Alzheimer’s Disease. *Brain Pathology*, 23(3), 303–310. <https://doi.org/10.1111/bpa.12004>
- Sharma, G., Modgil, A., Sun, C., & Singh, J. (2012). Grafting of cell-penetrating peptide to receptor-targeted liposomes improves their transfection efficiency and transport across blood-brain barrier model. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(7), 2468–2478. <https://doi.org/10.1002/jps.23152>
- Sharma, G., Lakkadwala, S., Modgil, A., & Singh, J. (2016). The Role of Cell-Penetrating Peptide and Transferrin on Enhanced Delivery of Drug to Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 806. <https://doi.org/10.3390/ijms17060806>
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S. R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D. M., Miller, C. A., Strickland, D. K., Ghiso, J., & Zlokovic, B. V. (2000). Clearance of Alzheimer’s amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor–related protein-1 at the blood-brain barrier. *Journal of Clinical Investigation*, 106(12), 1489–1499. <https://doi.org/10.1172/JCI10498>
- Smith, G. P., & Petrenko, V. A. (1997). Phage Display. *Chemical reviews*, 97(2), 391–410. <https://doi.org/10.1021/cr960065d>
- Steinmetz, J. D., Secher, K. M., Schiess, N., Nichols, E., Cao, B., Servili, C., Cavallera, V., Cousin, E., Hagins, H., Moberg, M. E., Mehlman, M. L., Abate, Y. H., Abbas, J., Abbasi, M. A., Abbasian, M., Abbastabar, H., Abdelmasseh, M., Abdollahi, M., Abdollahi, M., ... Dua, T. (2024). Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990–2021: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Neurology*, 23(4), 344–381. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(24\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(24)00038-3)

- Stokum, J. A., Kurland, D. B., Gerzanich, V., & Simard, J. M. (2015). Mechanisms of Astrocyte-Mediated Cerebral Edema. *Neurochemical Research*, 40(2), 317–328. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1374-3>
- Teesalu, T., Sugahara, K. N., & Ruoslahti, E. (2012). 2 Mapping of Vascular ZIP Codes by Phage Display. *Methods in enzymology*, 503, 35.
- Temsamani, J., & Vidal, P. (2004). The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Drug Discovery Today*, 9(23), 1012–1019. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03279-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03279-9)
- Torvinen, S., Sievänen, H., Järvinen, T. A., Pasanen, M., Kontulainen, S., & Kannus, P. (2002). Effect of 4-min vertical whole body vibration on muscle performance and body balance: a randomized cross-over study. *International journal of sports medicine*, 23(5), 374–379. <https://doi.org/10.1055/s-2002-33148>
- Trabulo, S., Cardoso, A. L., Mano, M., & De Lima, M. C. P. (2010). Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals*, 3(4), 961–993. <https://doi.org/10.3390/ph3040961>
- Van Tellingen, O., Yetkin-Arik, B., De Gooijer, M. C., Wesseling, P., Wurdinger, T., & De Vries, H. E. (2015). Overcoming the blood–brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resistance Updates*, 19, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.02.002>
- Wong, A. D., Ye, M., Levy, A. F., Rothstein, J. D., Bergles, D. E., & Searson, P. C. (2013). The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Frontiers in neuroengineering*, 6, 7. <https://doi.org/10.3389/fneng.2013.00007>
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2023). The blood–brain barrier: Structure, regulation and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 217. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>
- Yamamoto, M., Ikeda, K., Ohshima, K., Tsugu, H., Kimura, H., & Tomonaga, M. (1997). *Increased Expression of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein/a2-Macroglobulin Receptor in Human Malignant Astrocytomas.*
- Yue, H., Li, Y., Yang, M., & Mao, C. (2022). T7 Phage as an Emerging Nanobiomaterial with Genetically Tunable Target Specificity. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, 9(4), e2103645. <https://doi.org/10.1002/advs.202103645>
- Zhou, X., Smith, Q. R., & Liu, X. (2021). Brain penetrating peptides and peptide–drug conjugates to overcome the blood–brain barrier and target CNS diseases. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 13(4), e1695. <https://doi.org/10.1002/wnan.169>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Baringer, S. (2022). How Tf do we get this drug in the brain? *Lionstalkscience*. Kasutatud 13.04.2025 <https://lions-talk-science.org/2022/07/27/how-tf-do-we-get-this-drug-in-the-brain/>

Biorender. Kasutatud 25.04.2025 <https://www.biorender.com>

Streamlit. Kasutatud 10.04.2025 <https://phages.streamlit.app/phage-sequencing>

LISAD

Lisa 1. Rakuvaba faagidispleis lisatud faagi hulk igas voorus.

	Faagi hulk μ l		
	1. voor	2. voor	3. voor
CBP	250	50	4
G7	250	50	4
Cx7C + fragment 1	100	100	91
Cx7C + fragment 2	100	77	100
Cx7C + fragment 2b	100	78	43
B + fragment 1	100	50	41
B + fragment 2	100	78	43
B + fragment 2b	100	56	14

Lisa 2. Katselooma luba



PÕLLUMAJANDUS- JA TOIDUAMET

ASUTUS ESISEKS KASUTAMISEKS

Märge tehtud: 02.04.2025

Kehtib kuni: 02.04.2030

Alus: Avaliku teabe seaduse § 35 lg 1 p 17

Teabevaldaja: Põllumajandus- ja Toiduamet

OTSUS

Loomkatseprojekti luba nr 299

02.04.2025 nr 1.2-13/25

Loomakaitseseaduse § 45 lõike 2 ning loomkatseprojekti hindamiskomisjoni 25.03.2025 – 01.04.2025 toimunud elektroonilise istungi protokoll nr 45 alusel otsustas Põllumajandus- ja Toiduamet järgmist:

Anda luba Tambet Teesalu loomkatseprojektile, kokkuvõtva nimetusega „**Vähi- ja koeselektiivsete kullerpeptiidide väljatöötamine ja iseloomustamine**“ („Identification and characterization of novel tumor and tissue specific homing peptides“) järgmistel tingimustel:

- loomkatseprojekti loa omanik, kavandaja, vastutav isik ja ülesannete täitmist kontrolliv juhendaja: Tambet Teesalu (sündinud 24.01.1969, Ravila 14B, 50411 Tartu);
- loomkatseprojekti kaasatud isikud: Kristina Põšnograjeva (sündinud 12.07.1995, Ravila 14B, 50411 Tartu), Jorgen Holm (sündinud 16.06.1992, Ravila 14B, 50411 Tartu), Rasmus Erno (sündinud 15.11.2000, Ravila 14B, 50411 Tartu), Jhalak Sethi (sündinud 25.06.2000, Ravila 14B, 50411 Tartu), Karlis Pleiko (sündinud 21.04.1992, Ravila 14B, 50411 Tartu), Luca Marchetti (sündinud 06.04.1991, Ravila 14B, 50411 Tartu), Vladimirs Pilpenko (sündinud 05.06.1990, Ravila 14B, 50411 Tartu), Jasper August Tootsi (sündinud 03.04.1998, Ravila 14B, 50411 Tartu);
- loomkatseprojekti läbiviimise koht: Tartu Ülikooli bio-ja sirdemeditsiini instituudi katseloomakeskus, tegevusloa number KL1210;
- katseloomade liik ja arv: hiir (*Mus musculus*), kokku 2574 katselooma;
- loa kehtivus: **02.04.2025-01.04.2030**
- loomkatseprojekti hindamisest tulenevad eritingimused:
 - loomkatseprojekti tuleb kooskõlas loomakaitseseaduse §-ga 51¹ järelehinna: Ei;
- muud loomkatseprojekti läbiviimise tingimused:
 - loomkatse käik

Loomkatseprojekt koosneb järgnevatest osadest:

- Vähimudelite genereerimine vähirakkude transplantatsioonil sihtmärkorganisse
- Ex vivo* ja *in vivo* faagidisplei (a) kasvajaga hiirtele kasvajaspetsiifiliste peptiidide ning aptameeride leidmiseks ja (b) *wild-type* hiirtele hematoentsefaalbarjääri (HEB)

LIHTLITSENTS

Lihtslitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Hanka Karmen Nõmmik,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „HEB-ipenetreerivate peptiidide avastamine ja iseloomustamine“, mille juhendajad on Kristina Põšnograjeva, Tambet Teesalu ja Juhan Sedman, 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 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.

Hanka Karmen Nõmmik

14.05.2025