

TARTU ÜLIKOOL
Arstiteaduskond
Biokeemia Instituut

Kersti Ehrlich

UPF peptiidid – glutatiooni antioksidantsed analoogid

Magistriväitekirj biomeditsiini erialal

Juhendajad: *Ph.D.* Ursel Soomets
prof. Mihkel Zilmer

Tartu 2007

SISUKORD

PUBLIKATSIOONIDE LOETELU.....	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
Oksüdatiivne stress ja vabad radikaalid	7
Antioksidantsed kaitsemehhanismid	8
Glutatiooni süsteem.....	8
Glutatiooni analoogid.....	11
TÖÖ EESMÄRGID	13
MATERJALID JA MEETODID	14
Peptiidi süntees.....	14
Hüdroksüülradikaali eliminatsioonivõime määramine	14
DPPH radikaali eliminatsioonivõime määramine	14
UPF peptiidide dimerisatsioon	15
Rakukultuurid.....	15
UPF1, UPF6, UPF17 ja UPF19 mõju K562 rakkude eluvõimelisusele.....	16
UPF1, UPF6, UPF17 ja UPF19 toime K562 rakkude plasmamembraanile.....	16
Andmete analüüs	17
TULEMUSED.....	18
UPF peptiidide lahustuvus	18
UPF peptiidide hüdroksüülradikaali eliminatsioonivõime.....	18
UPF peptiidide DPPH radikaali eliminatsioonivõime	21
UPF peptiidide dimerisatsioon	22
UPF peptiidide efekt K562 erütroleukeemia rakkude eluvõimelisusele ja membraani terviklikkusele	23
ARUTELU	25
JÄRELDUSED	28
KOKKUVÕTE	29
KASUTATUD KIRJANDUS	31
SUMMARY.....	36
TÄNUAVALDUSED.....	37
PUBLIKATSIOONID.....	38

PUBLIKATSIOONIDE LOETELU

1. Design, synthesis and properties of novel powerful antioxidants, glutathione analogues.
Kersti Ehrlich, Säde Viirlaid, Riina Mahlapuu, Külliki Saar, Tiiu Kullisaar, Mihkel Zilmer,
Ülo Langel, Ursel Soomets. Free Radical Research, in press.

KASUTATUD LÜHENDID

CAT - katalaas
DCC - ditsükloheksüülkarbodiimid
DCM - diklorometaan
DIEA - N,N-diisopropüületüülamiin
DMF - N,N-dimetüülformamiid
DMSO - dimetüülsulfoksiid
DPPH[•] - α,α -difenüül- β -pikrüülhüdrasüül radikaal
EDT - 1,2-etaanditool
Fmoc - 9-fluorenüülmetoksükarbonüül
GCL - glutamaat-tsüsteiini ligaas
GCS - γ -glutamüülsüsteiin süntetaas
 γ GT - γ -glutamüültransferaas
GPx - glutatiooni peroksüdaas
GR - glutatiooni reduktaas
GS - glutatiooni süntetaas
GSH - glutatiooni redutseeritud (monomeerne) vorm
GSSG - glutatiooni oksüdeeritud (dimeerne) vorm
GST - glutatiooni S-transferaas
HF - vesinikfluoriidhape
HKR - HEPES Krebs Ringer lahus
HOBt - 1-hüdroksübensotriasool
LDH - laktaadi dehüdrogenaas
MALDI-TOF - *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*
MAP - *model amphipathic peptide*
MBHA - 4-metüülbenshüdrüülamiin
MTX - metotreksaat
 $O_2^{\cdot-}$ - superoksiidi radikaal
 $OH^{\cdot}$ - hüdroksüülradikaal
 $ONOO^-$ - peroksünitrit
RNS - reaktiivsed lämmastiku osakesed
ROS - reaktiivsed hapniku osakesed

SOD - superoksiidi dismutaas

TBTU - 2-(1H-bensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüüluroonium tetrafluoroboraat

TFA - trifluoroäädikhape

THA - tereftaalhape

TIS - triisopropüülsilaan

SISSEJUHATUS

Inimorganismi elutegevuse käigus tekib pidevalt nii hapniku kui lämmastiku reaktiivseid osakesi (vesinikperoksiid, H_2O_2 ; peroksünitrit, ONOO^- ; hüpokloorishape, HClO). Reaktiivsete osakeste alaliigiks on vabad radikaalid, mis omavad vähemalt ühte paardumata elektroni (superoksiidi radikaal, $\text{O}_2^{\cdot-}$; hüdroksüülradikaal, $\text{OH}^{\cdot}$). Väga väikestes kontrollitud kogustes on nad vajalikud füsioloogiliste funktsioonide täitmiseks ning nende hulk on rangelt kontrollitud antioksidatiivsete kaitsemehhanismide poolt. Olukorda, kus organismi antioksidatiivsed kaitsemehhanismid ei ole enam võimelised hoidma reaktiivsete osakeste taset normis, nimetatakse oksüdatiivseks stressiks. Sel juhul hakkavad reaktiivsed osakesed kahjustama organismi biomolekule, nagu valgud, lipiidid ja DNA ning nihutavad rakkude redokstasakaalu oksüdeerituse suunas, mis omakorda võib käivitada patoloogilisi mehhanisme. Sügav kestev oksüdatiivne stress (*high grade oxidative stress*) omab rolli mitmete haiguste patogeneesis nagu kardiovaskulaarsed haigused, neurodegeneratiivsed haigused, teatud tüüpi vähkkasvajad, infektsioonid ning on tõenäoliselt seotud ka stressi, vananemise ja kurnavate füüsiliste pingutuste käigus tekkivate kahjustustega. Antioksidatiivne kaitseüsteem koosneb reaktiivseid osakesi kahjutuks tegevatest ensüümidest (superoksiidi dismutaas, katalaas, glutatioon peroksüdaas) ning madalamolekulaarsetest ühenditest (glutatioon, vitamiin C, vitamiin E, ubikinoon, karotenoidid, kusihape, flavonoidid), mis on võimelised elimineerima vabu radikaale [1]. Sealjuures on glutatioon tähtsaim rakusisene veeslahustuv antioksidant ning glutatiooni taseme langus on oluliseks riskifaktoriks oksüdatiivsest stressist tingitud haiguste väljakujunemisel. Seetõttu otsitakse lahendusi, kuidas kompenseerida glutatiooni süsteemi funktsionaalsuse langust. Perspektiivne võimalus selleks on glutatiooni analoogide kasutamine, see tähendab, et on vajalik nende disain ja süntees.

Käeolevas töös on uuritud Biokeemia Instituudis disainitud ja sünteesitud glutatiooni peptiidsete analoogide raamatukogu. Testiti antud peptiidide stabiilsust, mittetoksilisust rakukultuurile ning võimet elimineerida hüdroksüülradikaali ja DPPH radikaali. Eesmärgiks oli disainida ühendid, mis oleks efektiivsemad antioksidandid kui glutatioon ja selgitada struktuurseid iseärasusi, mis on aluseks tugevale antioksidatiivsuse tõusule. Käesoleva töö käigus kogutud teadusinformatsioon aitab UPF peptiidide raamatukogust valida välja sobivaimad ühendid, mida uuritakse edasi erinevates loomkatse mudelites.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

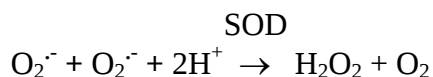
Oksüdatiivne stress ja vabad radikaalid

Organismi elutegevuse käigus tekib pidevalt hapniku ja lämmastiku reaktiivseid osakesi. Kitsam mõiste on vabad radikaalid - ülireaktiivsed lühikese elueaga osakesed, mis omavad vähemalt ühte paardumata elektroni välisel elektronihil. Väga väikestes kontrollitud hulkades on reaktiivsed osakesed vajalikud füsioloogiliste funktsioonide täitmiseks nagu mikroorganismide vastane kaitse, kehavõõraste ainete detoksifikatsioon, signaalide vahendamine ja mitmed biosünteesi reaktsioonid. Reaktiivsete osakeste tase on hoolikalt kontrollitud antioksidantse regulatsioonisüsteemi poolt. Olukorda kus organismi antioksidantne kaitsesüsteem ei ole võimeline hoidma reaktiivsete osakeste hulka allpool kahjustavat taset, nimetatakse oksüdatiivseks stressiks. Reaktiivsete hapniku osakeste (ROS) tähtsaimad allikad on mitokondriaalne elektronide transpordi ahel, ksenobiootikumide metabolism ja põletik. Peamised ROS on superoksiidi radikaal ($O_2^{\cdot-}$), hüdroksüülradikaal ($OH^{\cdot}$) ning vesinikperoksiid (H_2O_2) [1].

Superoksiidi radikaal tekib elektroni lisandumisel hapniku molekulile. $O_2^{\cdot-}$ reaktiivsus võrreldes teiste ROS-ga on madal, aga ta on primaarne vaba radikaal – üks esmaseid, mis füsioloogiliste reaktsioonide käigus tekib ja millest tekivad edasi teised reaktiivsed osakesed. $O_2^{\cdot-}$ produtseerib suurimates kogustes fagotsüütide NAD(P)H oksüdaas kaitseks võõrorganismide vastu [2]. Lisaks tekib superoksiidi radikaali puriinide katabolismi ensüüm ksantiini oksüdaasi töös ja neid vabaneb mitokondriaalsest hingamisahelast.

Hüdroksüülradikaal on inimorganismi reaktiivseim vaba radikaal. Ta tekib Fentoni või Haber-Weiss'i reaktsiooni käigus muutuva oksüdatsiooniastmega metalliioonide toimetel (raua ja vase ioonid) aga ka ioniseeriva γ -kiirguse toimetel [3]. Fentoni reaktsioonis on lähteaineks vajalik H_2O_2 , Haber-Weiss'i reaktsioonis $O_2^{\cdot-}$ ja H_2O_2 . $OH^{\cdot}$ ründab kõiki tüüpe biomolekule: süsivesikuid, lipiide, valke ja DNA-d [4]. Sealjuures on $OH^{\cdot}$ üks tähtsaimaid lipiidide peroksüdatsiooni initsiaatoreid, eemaldades polüküllastamata rasvhappelt (peamiselt membraani fosfolipiidilt) vesinikuaatomi ning käivitades vabaradikaalse ahelreaktsiooni [4,5].

Vesinikperoksiid tekib peamiselt $O_2^{\cdot-}$ eliminatsiooni käigus ensüüm superoksiidi dismutaasi (SOD) toimetel. Vesinikperoksiid on vähereaktiivne enamuste biomolekulide suhtes, kuid tal on hea difusioonivõime ja omadus läbida rakkude membraane [3].



Lämmastikoksiidi radikaal (NO $\cdot$) ja peroksünitrit (ONOO $^-$) on tähtsaimad reaktiivsed lämmastiku osakesed (RNS). Kuna lämmastikoksiid omab paardumata elektroni, siis on ta vaadeldav vaba radikaalina. Lämmastikoksiidi produtseerib L-arginiinist lämmastikoksiidi süntaaside perekond ning ta töötab organismis veresoonte lõõgastajana ja sekundaarse vahendajana [3]. NO $\cdot$ reaktiivsus mitteradikaalsete molekulide suhtes on madal, kuid reageerib kiiresti teiste reaktiivsete osakestega. NO $\cdot$ ja O $_2^{\cdot-}$ vahelisel reaktsioonil tekib peroksünitrit (ONOO $^-$). Tekib tugevam oksüdeeriv ühend ja lämmastikoksiidi ära kasutamine, mille tõttu väheneb veresoonte lõõgastatus [6].

Antioksidantsed kaitsemehhanismid

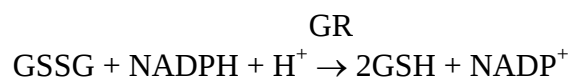
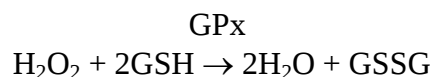
Antioksidandid on ühendid ja ensüümid mis juba väga madalas kontsentratsioonis on suutelised takistama, vältima või likvideerima vabade radikaalide jt. reaktiivsete osakeste kahjulikke toimeid. Organismi antioksidatiivne kaitsesüsteem koosneb järgmistest osadest, mis täidavad oma rolli koostöös üksteisega:

- Antioksidantsed ensüümid: superoksiidi dismutaas - O $_2^{\cdot-}$ eliminatsioon, tekib H $_2$ O $_2$; katalaas (CAT) - H $_2$ O $_2$ eliminatsioon; glutatiooni peroksüdaas (GPx) - H $_2$ O $_2$ ja lipiidsete peroksiidide eliminatsioon.
- Reaktiivsete osakeste püüdjad/kõrvaldajad: glutatioon, vitamiin C, vitamiin E, ubikinoon, karotenoidid, kusihape, flavonoidid.
- Preventiivsed valgulised antioksidandid – raua ja vase sidujad (apotransferriin, tseruloplasmiin).
- Reparatsiooniensüümid, mis kõrvaldavad juba tekkinud kahjustusi (DNA oksukahjustused).

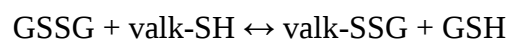
Glutatiooni süsteem

Glutatioon (GSH) omab keskset rolli inimkeha antioksidatiivses kaitsesüsteemis, olles kõige laialdasemalt esinev madala molekulmassiga tiool rakkudes, mida esineb millimolaarsetes kontsentratsioonides (1-8 mM). Glutatioon on tripeptiid, mis koosneb aminohapetest glutamaat, tsüsteiin ja glütsiin (γ -L-Glu-L-Cys-Gly) ning tal on kaks struktuurset iseärasust: γ -

glutamüülside ja sulfüdrüülrühm (Joonis 1). Glutatiooni süsteemiga seotud ensüüme kirjeldab joonis 2. GSH oksüdeerub dimeersesse vormi (GSSG) reageerides mitteensümaatiliselt teatud reaktiivsete osakestega (hüdroksüülradikaal, hüpokloorishape, peroksünitrit) [1,3]. GSH on kofaktor seleen-sõltuval ensüümil glutatiooni peroksüdaasile, mis on üks peamisi vesinikperoksiidi ja rasvhapete hüdroperoksiidide elimineerijaid. GSH kasutamine muudab glutatiooni redoksstaatus rakus, mis on defineeritud kui GSH/GSSG suhe (normaalses seisundis 100 või rohkem) [7,8]. Glutatiooni redokssuhe on paljude raku metaboolsete protsesside regulatsiooni ja redokstundlike transkriptsioonielementide aktivatsioonis printsiipiaalne faktor [9]. Pikaajaline tugev oksüdatiivne stress, millega kaasneb GSH varu vähenemine, viib rakusurmani. Vastuseks oksüdatiivsele stressile kasutab rakk erinevaid meetodeid, et hoida seda suhet normaalsena. Tähtsaim on glutatiooni reduktaas (GR), mis redutseerib tekkinud intratsellulaarse GSSG glutatiooniks.

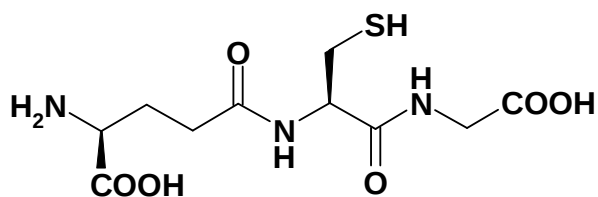


Kuigi GR töötab suhteliselt kiiresti, võib GSSG reageerida valkude sulfüdrüülrühmadega, andes valk-glutatioon segadisulfiide. Segadisulfiidid omavad pikemat eluiga kui GSSG ja neid on rakus märkimisväärne tase. See vahetusreaktsioon on üks mehhanisme, kuidas glutatioon osaleb rakkude signalisatsioonis [10].



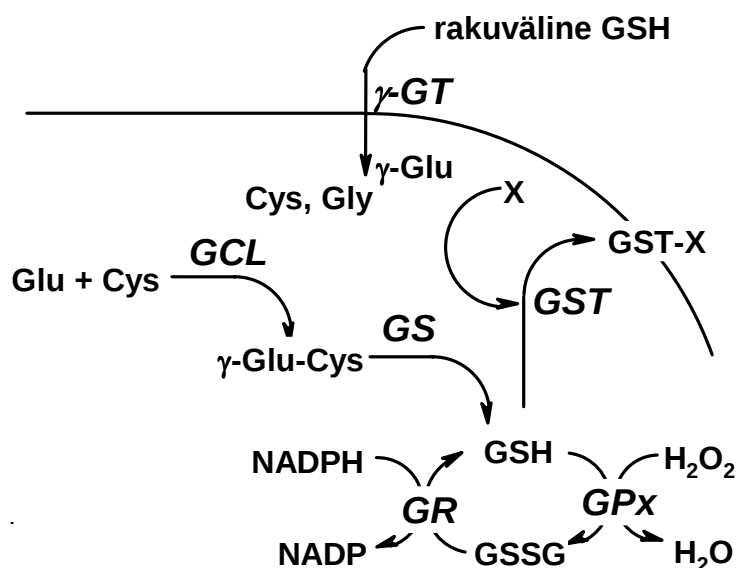
Normaalse rakusisese GSH/GSSG taseme säilitamiseks toimub ka ATP-sõltuv GSSG transport rakust välja. Ekstratsellulaarne GSH ja tema konjugaadid on substraadiks ektoensüüm γ -glutamüültransferaasile (γ GT), mis katalüüsib γ -glutamaadi ja CysGly teket. CysGly hüdrolyüsib ektopeptidaasi toimel tsüsteiiniks ja glütsiiniks, mis uuesti võetakse rakku ning tarvitatakse glutatiooni resünteeks. Glutatioon kui nukleofiil reageerib endogeensete ja eksogeensete elektrofiilsete ühenditega ning enamuse nendest detoksifikatsioonireaktsioonidest on vahendatud glutatiooni S-transferaaside (GST) poolt [11]. Lisaks aitab glutatioon taastada/säilitada valkude sulfüdrüülrühmi funktsionaalses redutseeritud seisundis. Glutatiooni konjugatsioon teiste molekulidega ja GSSG transport

rakust välja kulutavad raku glutatiooni varusid, mis taastatakse glutatiooni *de novo* sünteesi abil.



Joonis 1. Glutatiooni valem (L- γ -glutamüül-L-tsüsteinüül-glütsiin)

Glutatiooni sünteesis osalevad kaks ATP energiat kasutavat tsütosoolis paiknevat ensüümi. Raskest katalüütilisest subühikust ja kergest regulatoorsest subühikust koosnev glutamaat-tsüsteiin ligaas (GCL), varasema nimetusega γ -glutamüültsüsteiin süntetaas (GCS) liidab esmalt γ -glutamaadi ja tsüsteiini. Seejärel lisab homodimeerne glutatiooni süntetaas (GS) saadud dipeptiidile (γ Glu-Cys) glütsiini. Glutatiooni *de novo* sünteesi tähtsaimad regulaatorid on GCL tase rakus, substraatide (eriti Cys) kättesaadavus ja GSH vahendatud negatiivne tagasiside [7].



Joonis 2. Glutatiooni metabolismiga seotud ensüümid. GPx - glutatiooni peroksüdaas, GR- glutatiooni reduktaas, GST - glutatiooni S-transferaas, GCL - glutamaattsüsteiini ligaas, GS- glutatiooni süntetaas ja γ GT - γ -glutamüültransferaas.

Nii GSH varude vähenemine kui ka sügav kestev (*high grade*) oksüdatiivne stress osalevad mitmesuguste haiguste patogeneesis. Siia hulka kuuluvad mitmed kroonilised (kardiovaskulaarsed ja neurodegeneratiivsed haigused, vähkkasvajate teke, HIV) ja akuutsed haiguslikud seisundid (põletik, infarkt, insult, organite transplantatsioon, isheemia-reperfusioonikahjustus, neerupuudulikkus, kopsukahjustused ja kirurgiliste operatsioonide komplikatsioonid). Samuti seostatakse seda stressi, vananemise ja ekstreemse füüsilise pingutusega [4,12-15]. Oksüdatiivse stressi roll paljude patoloogiate kujunemises ja GSH keskene roll rakusisese antioksidandina loob vajaduse efektiivsete antioksidatiivsete molekulide järele.

Glutatiooni analoogid

Lähtuvalt glutatiooni erinevatest rollidest on kasutatud erinevaid strateegiaid glutatiooni analoogide disainis. Piisavate rakusiseste GSH kontsentratsioonide saavutamine glutatiooni enda manustamisega on probleemne, kuna ta laguneb kiiresti seedetraktis ja on halvasti omandatav enamuse rakkude poolt. Siiski on saavutatud mõningaid positiivseid tulemusi eksogeense glutatiooni manustamisega, nagu neerufunktsiooni säilitamine pärast isheemilist neerude kahjustust [16]. Tsüsteiini saadavus on peamine GSH *de novo* sünteesi limiteeriv faktor. Kuna tüsteiini suurte dooside manustamine on toksiline [17], kasutatakse tsüsteiini eelühendeid nagu N-atsetüül-L-tsüsteiin [18,19].

Maailmas on sünteesitud suur hulk erinevate funktsioonidega glutatiooni analooge [20]. Glutatiooni molekuliga on sooritatud mitmesuguseid manipulatsioone, et parandada tema stabiilsust ja penetratsiooni rakkudesse. GSH analoog YM737 [N-(N-R-L-glutamüül-L-tsüsteinüül)-glütsiin-1-isopropüülestersulfaat monohüdraat] omab rakke kaitsvaid omadusi tserebraalse isheemia korral, inhibeerides lipiidide peroksüdatsiooni [21]. GSH molekuli N-terminaalses otsas asetseva aminogrupi asendamine pürrooliga annab uued antioksidandid, mis tänu steriilisele takistusele ei inhibeeri glutatiooni reduktaasi ega glutatiooni peroksüdaasi [22]. Natiivse γ -glutamüül jäägi asendamine *cis*- või *trans*-4-karboksüül-L-proliini jäägiga annab ühendile jäiga skeleti ja teeb selle resistentseks lammutamisele γ -glutamüültransferaasi (γ GT) poolt [23]. Silmapaistev grupp GSH analooge on tsüsteiin-asendatud S-nitrosoglutatioonid, mida uuritakse lähtuvalt nii lämmastikoksiidi kui ka glutatiooni füsioloogilistest rollidest (vaata ülevaade [24]).

Mõningates situatsioonides, nagu vähiravi, on eesmärgiks GSH taseme langetamine. GST üleekspressiooni on kirjeldatud kui ühte võimalikku mehhanismi, mis on vastutav vähirakkude ravimiresistentsuse eest. GST osaleb vähiravis kasutatavate alküülivate ravimite deaktivatsioonis [25]. Seetõttu on disainitud hulk GSH analooge, mis inhibeeriks erinevaid GST isoensüüme: fosfonoanaloogid [26] ja peptidomeetilised analoogid, mis on stabiilsed peamise glutatiooni lammutava ensüümi, γ GT suhtes. TLK 286, üks hiljutisemaid ja edukamaid GSH analooge vähiravis, on jõudnud kliiniliste katsetusteni [27]. Mõned glutatiooni analoogid käituvad kui ensüüm glükotsalaasi inhibiitorid ja on näidanud potentsiaalseid kasvajatevastaseid ja antiproliferatiivseid omadusi [28]. Kuid endiselt on glutatiooni analoogide disaini ja sünteesi võtmeküsimusi bioloogilise aktiivsuse kõrval nende stabiilsuse parandamine peptidaaside ja proteaaside suhtes. Üks võimalik lahendus sellele probleemile on GSH molekuli tsükliseerimine. Sellised GSH analoogid omavad kasvajate vastast aktiivsust [29].

Tartu Ülikooli Biokeemia Instituudis disainiti ja sünteesiti glutatiooni analoog UPF1 (Tyr(Me)- γ -Glu-Cys-Gly) (Joonis 3a). Näidati, et UPF1 on 60-korda parem hüdroksüülradikaali püüdja kui GSH [30] ja võib ühtlasi käituda kui G valkude modulaator aju eeskoore rakumembraanides [31]. UPF1 on ka uuritud erinevates *in vivo* eksperimentaalsetes mudelites, kus ta on näidanud protektiivset efekti: globaalne ajuisheemia [30], Langendorff'i mudel isoleeritud roti südamega [32] ja 5/6 nefrektoomia mudel (avaldamata andmed).

TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva töö eesmärgid olid järgmised:

1. Disainida ja sünteesida peptiidsed glutatiooni analoogid (UPF peptiidid), mis oleks tugevamad antioksüdandid kui glutatioon ise.
2. Uurida UPF peptiidide võimet elimineerida hüdroksüülradikaali võrrelduna glutatiooniga.
3. Uurida UPF peptiidide võimet elimineerida DPPH radikaali võrrelduna glutatiooniga.
4. Selgitada struktuur-aktiivsuse seoseid, vastavalt analoogsete UPF peptiidide võimetele elimineerida vabu radikaale.
5. Uurida UPF peptiidide dimerisatsioon vees ja füsioloogilises NaCl vesilahuses.
6. Testida UPF peptiidide toksilisust, uurides inimese erütroleukeemia K562 rakkude eluvõimet ja rakumembraanide stabiilsust.

MATERJALID JA MEETODID

Peptiidi süntees

Glutatiooni analoogid sünteesiti käsitsi kasutades Fmoc-meetodit [33]. Manuaalseks peptiidide sünteesiks kasutati Gly-Wang kandjat. 9-florenüülmetoksükarbonüül (Fmoc) kaitstud aminohapped liideti ahelaks ühe aminohappe kaupa kasutades standardset TBTU ja HOBt aktivatsiooni kasutades DMF lahustina. Kaitsvate rühmade eemaldamiseks ja peptiidi eraldamiseks kandjalt kasutati TFA-d, 2% vee (v/v), 2% EDT (v/v) ja 2.5% TIS (v/v) seguga, sünteesi produkti töödeldi 90 min toatemperatuuril. Peptiid puhastati HPLC meetodil kasutades analüütilist pöördfaasi kolonni Nucleosil 120-3 (0.4 cm x 10 cm), peptiidide puhtus >99%. Peptiidide molekulmasside määramiseks kasutati MALDI-TOF mass-spektromeetrilist meetodit (Voyager DE Pro, Applied Biosystems) ja saadud tulemusi võrreldi vastava ühendi arvutatud molekulmassidega.

Hüdroksüülradikaali eliminatsioonivõime määramine

UPF peptiidide võime määramiseks elimineerida hüdroksüülradikaali kasutati Barreto *et al.* poolt kirjeldatud tereftaalhappe (THA) meetodit, kus THA käitub kui keemiline dosimeeter [34]. THA lõppkontsentratsioon oli 10 mM ja hüdroksüülradikaal genereeriti Fentoni-laadse reaktsiooniga CuSO_4 ja H_2O_2 vahel, lõppkontsentratsioonidega vastavalt 10 μM ja 1mM. Kõik lahused valmistati 14.75 mM naatrium-fosfaatpuhvis, pH 7.5. Hüdroksüülradikaali eliminatsiooni mõõdeti spektrofluorestsentsmeetodil, 312 nm eksitatsiooni ja 426 nm emissiooni lainepikkuse juures (Perkin-Elmer LS50B). Mõõtmised sooritati 4-5 paralleelina. Hüdroksüülradikaali eliminatsiooni väljendati EC_{50} väärtustena, mis leiti graafikult (Joonis 4).

DPPH radikaali eliminatsioonivõime määramine

Peptiidide võime püüda α,α -difenüül- β -pikrüülhüdrasüül (DPPH) radikaali määratati spektrofotomeetriliselt (Jenway 6405 UV/Vis spektrofotomeeter, Jenway Ltd.). Valmistati 0,1 ml peptiidi lahust 0.9% NaCl-s kontsentratsiooniga 5 μM kuni 200 μM , mis lisati 0.1 ml 0.1 mM DPPH $^\bullet$ lahusele 95% etanoolis. Segu loksutati. Uuritava aine absorptsiooni määratati 517 nm juures ning näit registreeriti 30 iga sekundi järel, kuni stabiilse näiduni. Kõik mõõtmised

sooritati 5-6 paralleelina. Madalam absorptsioon näitab kõrgemat DPPH[•] püüdmise aktiivust. Erinevate peptiidi kontsentratsioonide juures järele jäänud DPPH[•] hulk protsentides kanti graafikule, et saada antioksidandi kontsentratsioon, mis on vajalik produtseeritud DPPH[•] kontsentratsiooni vähenemiseks 50% võrra (EC₅₀). T_{EC50} on aeg, mis kulus vastaval peptiidi kontsentratsioonil stabiilse absorptsiooni saavutamiseks. EC₅₀ kontsentratsiooni jaoks leiti T_{EC50} graafikult, kuhu olid kantud kõik mõõdetud peptiidi kontsentratsioonid ja neile vastavad T_{EC50} väärtused. Superoksiidi radikaali eliminatsiooni väljendati antiradikaalse efektiivsusena (AE). AE on 1/EC₅₀T_{EC50} [35,36].

UPF peptiidide dimerisatsioon

Dimerisatsiooni kiiruse määramiseks valiti peptiidid UPF1 ja UPF17. UPF1 on γ -glutamaati sisaldavate peptiidide perekonna põhiesindaja ning UPF17 on α -glutamaati sisaldava alarühma põhiesindaja. Määramine toimus vesi ja 0.9% NaCl lahuses. Peptiidide 1 mM lahuseid hoiti toatemperatuuril ja kindlatel ajahetkedel 14 päeva jooksul võeti proov suurusega 100 μ l. Proove analüüsiti pöördfaasi HPLC meetodil (kolonn ZORBAX 300 SB-C18 4.6 mm x 15 cm) kasutades lineaarset atsetonitriil-vesi gradienti. Mõlemad lahused sisaldasid 0,1% TFA-d (v/v). Atsetonitriili sisaldus tõusis gradiendi käigus 50 min jooksul 20%-lt 90%-ni (0,1% TFA). Voolukiirus oli 2 ml/min ning määramine toimus peptiidsideme järgi lainepikkusel 220 nm (UV detektor). Piigi pindalad saadi integreerimisel kasutades Hewlett Packard HPLC (mudel 1100) tarkvara ChemStation. Uuritud glutatiooni analoogide redutseeritud ja oksüdeeritud vormide kogused väljendati protsentides. Monomeeri ja dimeeri piikide summa oli konstantne ning seda loeti saajaks protsendiks. Piikide tuvastamiseks koguti fraktsioonid ja määrati molekulmassid kasutades MALDI-TOF mass-spektromeetrit (Voyager DE Pro, Applied Biosystems).

Rakukultuurid

Rakke kasvatati 37°C ja 5% CO₂ sisalduse juures. Plastnõud (Corning®) olid ostetud firmalt Labdesign AB (Täby, Rootsi) ja rakukultuuri reagentid (GIBCO™) Invitrogen AB (Lidingö, Rootsi) käest. Inimese erütroleukeemia rakke K562 (kingitus Dr. T. Land'ilt, Neurokeemia ja Neurotoksikoloogia osakond, Stockholmi Ülikool, Rootsi) kasvatati suspensioonina kasutades RPMI-1640 söödet järgmiste lisanditega: GlutaMAX™-I, penitsilliin (100 ühikut/ml),

sterptomütsiin (100 µg/ml) ja termiliselt inaktiveeritud veiseloote seerum (*heat-inactivated foetal bovine serum*) (7.5 %). Rakkude tihedust hoiti vahemikus 10^5 - 10^6 rakku/ml.

UPF1, UPF6, UPF17 ja UPF19 mõju K562 rakkude eluvõimelisusele

UPF1, UPF6, UPF17 ja UPF19 mõju K562 rakkude eluvõimelisusele määrati kasutades CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI) reaktiivide komplekti, mis põhineb ATP produktsiooni määramisel. K562 rakud kanti 48-auguga plaadile: 37 500 rakku 0.25 ml söötmes. Seejärel lisati 5 µl uuritava peptiidi lahust. Vahelahuste kontsentratsioonid olid: 10 mM UPF peptiidide vesilahusel ning 1 mM MTX lahustatuna DMSO:H₂O (10/90) segus. Lõppkontsentratsioonid olid: 200 µM UPF peptiidid, 20 µM MTX. Peale 24 h kultivatsiooni rakukultuuri inkubaatoris, lasti plaadil jahtuda ligikaudu 30 min ja lisati igale proovile 0.25 ml CellTiter-Glo™ reagenti (valmistatud tootja juhiste järgi). Pärast 10 min õrna loksutamist, kanti proovid (400 µl) üle valgele polüpropüleenplaadile LumiNunc™ (Nunc A/S, Roskilde, Denmark). Lahuse luminesstsents mõõdeti spektrofloreomeetriga SPECTRAmax® GEMINI XS, Molecular Devices (Sunnyvale, CA).

UPF1, UPF6, UPF17 ja UPF19 toime K562 rakkude plasmamembraanile

UPF1, UPF6, UPF17 ja UPF19 mõju hindamiseks K562 rakkude membraani terviklikusele kasutati CytoTox-One™ Homogenous Membrane Integrity Assay (Promega, Madison, WI) reaktiivide komplekti. See meetod põhineb laktaadi dehüdrogenaasi (LDH) hulga mõõtmisel, mis vabaneb kahjustatud membraaniga rakkudest. 15 ml rakke ($\leq 10^6$ rakku /ml) tsentrifuugiti 5 min 500 x g juures. Rakke pesti kaks korda 10 ml HEPES Krebs-Ringer lahusega (HKR: 5.5 mM HEPES, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5.6 mM glükoosi, pH 7.4). Rakud resuspendeeriti tihedusega 1×10^6 rakku/ml (loetud hematsütoomeetriga). 200 µl seda suspensiooni viidi viaali, mis juba sisaldas 200 µl peptiidi või Triton X-100 lahust HKR-s. Lõppkontsentratsioonid olid järgmised: 100 µM UPF peptiidid, 10 µM MAP and 0.1 % Triton X-100. Peale 10 min inkubatsiooni juures 37°C ja tsentrifuugimist kiirusega 300 rpm (Thermomixer, Eppendorf AG, Hamburg, Germany), tsentrifuugiti viaale 2 min 500 x g juures. Seejärel viidi 100 µl supernatanti mustale polüpropüleenist FluoroNunc™ plaadile (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) ning lisati 100 µl CytoTox-One™ reagenti (valmistatud vastavalt tootja eeskirjale). Peale 10 min inkubatsiooni

toatemperatuuril, lisati igale proovile 50 µl reaktsiooni peatamiseks ette nähtud lahust ja mõõdeti fluorestsents 560 nm eksitatsiooni ja 590 nm emissiooni lainepikkustel kasutades sepketrofluoromeetrit SPECTRAmax® GEMINI XS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Andmete analüüs

Kõikide andmete analüüsiks kasutati programmi GraphPad Prism, versioon 4.00 Windows'i jaoks (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Tulemused tabelites on esitatud kui keskmine $\pm$ keskmise standardviga (SEM).

TULEMUSED

UPF peptiidide lahustuvus

Kõik sünteesitud peptiidid lahustusid vees vähemalt kontsentratsioonini 1mM, välja arvatud biotinüleeritud analoog UPF7. UPF7 disainiti eesmärgiga uurida UPF peptiidide rakusiseseid interaktisioone, kuid hüdrofoobne biotiini jääk vähendas märkimisväärselt lahustuvust vees ja seetõttu UPF7 ei kasutatud käesolevas töös kirjeldatud eksperimentides.

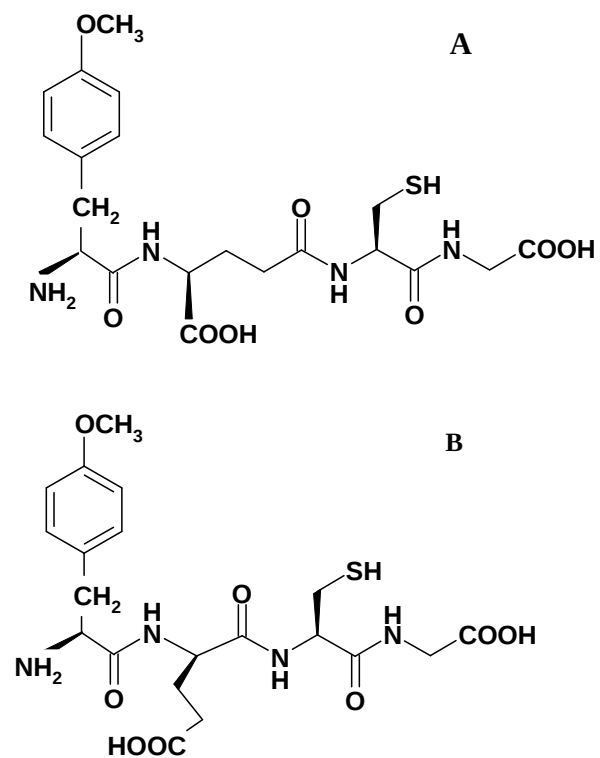
UPF peptiidide hüdroksüülradikaali eliminatsioonivõime

UPF peptiidide võimet elimineerida hüdroksüülradikaali kasutati kui esmast disainitud ühendite antioksidatiivse aktiivsuse määramise kriteeriumit. Hüdroksüülradikaalid genereeriti Cu^{2+} ja H_2O_2 vahelisel reaktsioonil ja määrati fluorestsentsmeetodil kasutades tereftaalhapet kui dosimeetrit. UPF peptiidide hüdroksüülradikaali püüdmisvõime EC_{50} on näidatud tabelis I. Selgus, et kõik disainitud peptiidid olid märkimisväärselt tugevamad hüdroksüülradikaali elimineerijad kui GSH (Tabel I). Peptiidid, kus esines γ -peptiidside omasid EC_{50} väärtust vahemikus 17-35 μM , GSH EC_{50} oli aga $1231.0 \pm 311.8 \mu\text{M}$. Kõigi või ainult N-terminaalse otsa L-aminohappe asendamine vastava D-enantiomeeriga ei muutunud hüdroksüülradikaali püüdmisvõimet. Peptiidide vabade radikaalide eliminatsioonivõimet võrreldi sõltuvalt sellest, kas nad omasid C-terminaalses otsas vaba karboksüülhappe rühma või amiidset lõppu. Vastavad ühendite paarid mida võrreldi olid järgmised: UPF1 ja UPF 8, UPF 14 ja UPF10, UPF6 ja UPF27, UPF 17 ja UPF 25. Ilmnes tendents, et amiidse lõpuga peptiidid olid kergelt nõrgemad hüdroksüülradikaali elimineerijad kui vaba karboksüülgruppi omavad peptiidid. Üllatuslikult ei muutnud tsüsteiini asendamine seriiniga hüdroksüülradikaali eliminatsioonivõimet (UPF26), viidates asjaolule, et mitte ainult SH rühm ei ole seotud vabade radikaalide kahjutuks muutmisega.

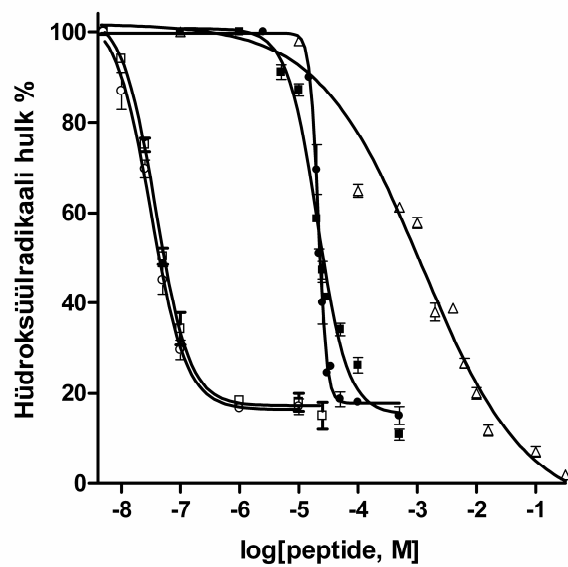
Tabel I. Sünteesitud glutatiooni analoogide raamatukogu ja nende hüdroksüülradikaali eliminatsioonivõime.

Nr.	Valem	MW	EC₅₀ ± SEM μM
UPF1	H ₂ N-Tyr(Me)-(γ-Glu)-Cys-Gly-COOH	484.5	20.5 ± 1.3
UPF2	H ₂ N-(γ-Glu)-Cys-Gly-Tyr(Me)-COOH	484.5	19.8 ± 0.8
UPF5	H ₂ N-D-Asp-(γ-Glu)-Cys-Gly-COOH	421.4	34.7 ± 0.9
UPF6	H ₂ N-D-Ser-(γ-Glu)-Cys-Gly-COOH	394.4	21.2 ± 0.4
UPF7	Biotinyl-Tyr(Me)-(γ-Glu)-Cys-Gly-COOH	710.5	*
UPF8	H ₂ N-Tyr(Me)-(γ-Glu)-Cys-Gly-CONH ₂	483.5	24.4 ± 0.4
UPF10	H ₂ N-D-Tyr(Me)-D-(γ-Glu)-D-Cys-Gly-CONH ₂	483.5	25.5 ± 0.6
UPF14	H ₂ N-D-Tyr(Me)-D-(γ-Glu)-D-Cys-Gly-COOH	484.5	19.6 ± 0.8
UPF15	H ₂ N-Tyr-(γ-Glu)-Cys-Gly-COOH	469.4	19.0 ± 1.0
UPF16	H ₂ N-Ser-(γ-Glu)-Cys-Gly-COOH	394.4	17.3 ± 1.1
UPF17	H ₂ N-Tyr(Me)-Glu-Cys-Gly-COOH	484.5	0.038 ± 0.003
UPF18	H ₂ N-D-Tyr(Me)-Glu-Cys-Gly-COOH	484.5	0.044 ± 0.007
UPF19	H ₂ N-D-Ser-Glu-Cys-Gly-COOH	394.4	0.031 ± 0.004
UPF24	H ₂ N-Ser-Glu-Cys-Gly-COOH	394.4	0.046 ± 0.003
UPF25	H ₂ N-Tyr(Me)-Glu-Cys-Gly-CONH ₂	483.5	0.032 ± 0.006
UPF26	H ₂ N-Tyr(Me)-Glu-Ser-Gly-COOH	468.5	21.1 ± 0.9
UPF27	H ₂ N-D-Ser-(γ-Glu)-Cys-Gly-CONH ₂	393.4	22.1 ± 0.9
GSH	(γ-Glu)-Cys-Gly-COOH	307.3	1231.0 ± 311.8

* ei lahustunud



Joonis 3. UPF1 (A) ja UPF17 (B) struktuurvalemid.



Joonis 4. UPF1 (■), UPF6 (●), UPF17 (□), UPF19 (○) ja GSH (△) kontsentratsioon-sõltuv hüdroksüülradikaali elimineeriv efekt *in vitro*.

Kõige tugevamad antioksidandid hüdroksüülradikaali eliminatsioonivõime määramise järgi olid ühendid kus γ -glutamaat oli asendatud α -glutamaadiga (UPF17-UPF25) (Joonis 3b). Nende analoogide EC_{50} oli vahemikus 30–50 nM ja peptiidide lahused kontsentratsiooniga 1 μ M saavutasid ligikaudu 80% maksimaalsest inhibeerivast efektist (Joonis 4). Täpseid EC_{50} mõõtmisi α -glutamaati sisaldavat peptiidide puhul segas kerge radikaalide produktsiooni tõus mõõtmise lõpufaasis, kui kasutati kontsentratsioone mis olid madalamad kui 0.5 μ M. Üks võimalik seletus on, et see on tingitud äärmiselt madalast peptiidi kontsentratsioonist.

UPF peptiidide DPPH radikaali eliminatsioonivõime

See meetod põhineb stabiilse DPPH radikaali redutseerumisel. DPPH[•] omab tugevat absorptsiooni 517 nm juures ja kui toimub redutseerimine vabu radikaale elimineeriva antioksidandi poolt, siis absorptsioon väheneb. Selle meetodiga uuriti enim huvi pakkuvaid glutatiooni analooge ja leiti, et nad kõik püüavad DPPH radikaali. Tabelis II on ära toodud EC_{50} kontsentratsioonid, aeg mis kulub EC_{50} -le vastaval kontsentratsioonil stabiilse absorptsiooni väärtuseni jõudmiseks (T_{EC50}) ja antiradikaalne efektiivsus (AE, $1/EC_{50}T_{EC50}$). Võrreldes glutatiooniga omasid kõik disainitud molekulid sarnast pisut suuremat EC_{50} kontsentratsiooni mis on vajalik, 50% DPPH radikaalide eliminatsiooniks. Võrreldes EC_{50} väärtusi omas GSH kergelt paremat DPPH radikaalide elimineerimisvõimet kui UPF peptiidid. Samas disainitud molekulid jõudsid stabiilse absorptsioonini (T_{EC50}) kiiremini ja seega andsid parema antiradikaalse efektiivsuse kui GSH. α -glutamaati sisaldavad peptiidid UPF17 ja UPF19 andsid kõrgeimad antiradikaalsed efektiivsused, sealjuures UPF17 oli efektiivseim. Glutatiooni T_{EC50} oli 10 korda kõrgem kui UPF17 ja UPF17 antiradikaalne efektiivsus oli 8.3-korda suurem kui glutatioonil. Võrreldes omavahel peptiidide T_{EC50} väärtusi järgmistes paarides - UPF1 ja UPF8, UPF17 ja UPF25 selgus, et C-terminaalselt amideeritud peptiidid vajasis umbes kaks korda rohkem aega, et jõuda stabiilsete absorptsiooni väärtusteni kui vastavad vaba C-terminaalset karboksüülhappe rühma omavad UPF peptiidid, T_{EC50} vastavalt 10 ja 20, 4 ja 7 min.

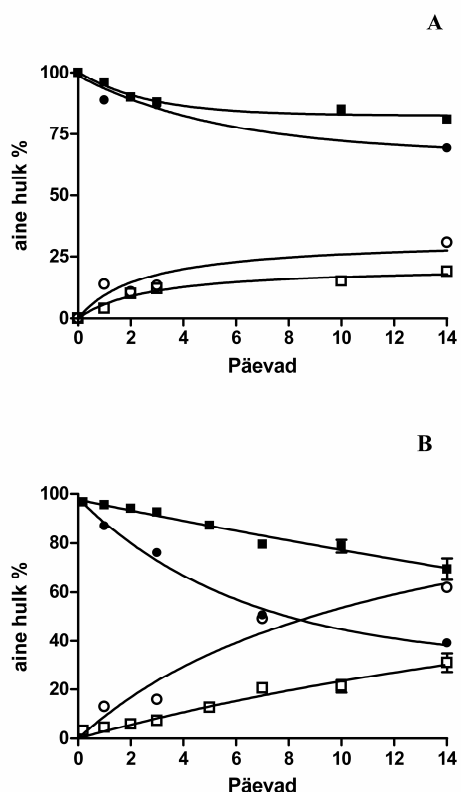
Tabel II. DPPH stabiilse vaba radikaali eliminatsioon - antiradikaalsed efektiivsused (AE).

AE on $1/EC_{50}T_{EC50}$.

Peptiid	EC ₅₀ (μM)	T _{EC50} (min)	AE (× 10 ⁻³)
GSH	23.6 ± 2.1	40	1.06
UPF1	28.1 ± 1.6	10	3.56
UPF6	29.0 ± 1.5	21	1.64
UPF17	28.3 ± 1.7	4	8.83
UPF19	27.0 ± 0.9	9	4.12
UPF8 (UPF1 amiid)	29.3 ± 2.0	20	1.71
UPF25 (UPF17 amiid)	36.4 ± 1.8	7	3.89

UPF peptiidide dimerisatsioon

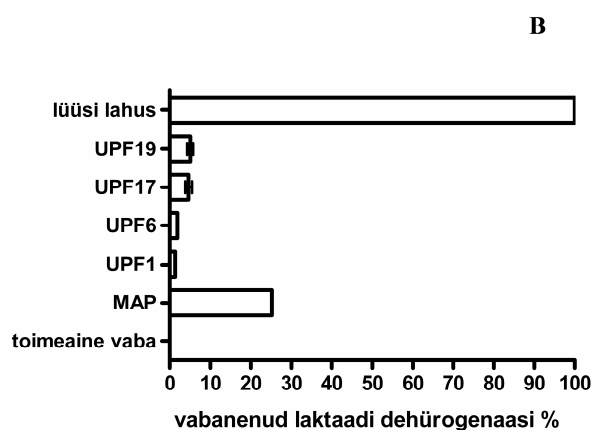
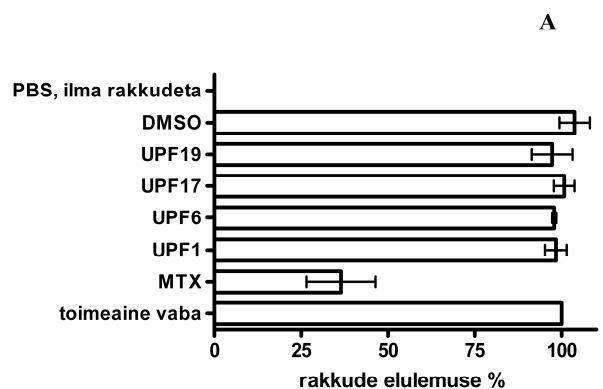
Uuriti valitud UPF peptiidide (UPF1, UPF17) dimerisatsiooni kiirust vees ja füsioloogilises lahuses (0.9% NaCl), et selgitada molekulide olekut töös läbiviidud eksperimentides. 1 mM kontsentratsioonis näitasid ühendid erinevat dimerisatsiooni määra vees ja füsioloogilises lahuses (Joonis 5). Teostades MALDI-TOF analüüsi, ilmneseid esimesed märgid molekulide dimerisatsioonist teisel inkubatsioonipäeval. Kõigi uuritud peptiidide puhul toimus dimerisatsioon kiiremini soola kui vesilahuses. Näiteks vees lahustatuna oli peale 14ndat päeva 27.5% UPF1 peptiidist dimeerses vormis. Sama hulk UPF1 dimeeri tekkis soolalahuses juba neljandaks päevaks. 14ndal päeval oli UPF17 dimeeri protsent vesilahuses 17.9%, kusjuures sama hulk dimeerset vormi tekkis soolalahusesse seitsmendaks päevaks.



Joonis 5. UPF1 ja UPF17 dimerisatsioon vees ja 0.9% NaCl lahuses toatemperatuuril. UPF1 monomeerse (●) ja dimeese (○) vormi ning UPF17 monomeerse (■) ja dimeerse (□) vormi sisaldus vees (A) ja 0.9% NaCl lahuses (B).

UPF peptiidide efekt K562 erütroleukeemia rakkude eluvõimelisusele ja membraani terviklikkusele

Hiljuti on näidatud, et 100 μM kontsentratsiooniga UPF1 ei häiri aju primaarsete granulaarrakkude eluvõimelisust. UPF peptiidide toksiliste efektide edasiseks uurimiseks valiti inimese erütroleukeemia rakud K562. K562 rakke kasutatakse laialdaselt leukeemiarakkude diferentseerumise seaduspärasuste uurimisel ja vähivastaste ravimite testimisel. Käesolevas töös võrreldi erinevate UPF peptiidide mõju K562 rakkude eluvõimelisusele ja rakumembraani terviklikkusele (Joonis 6). Eluvõimelisuse eksperimendis võrreldi 200 μM kontsentratsiooniga UPF peptiidilahuste ja 20 μM MTX lahuse mõju K562 rakkudele pärast 24 h inkubatsiooni. UPF1, UPF6, UPF17 ja UPF19 ei näidanud mingit toksilist efekti K562 rakkude eluvõimelisusele, samas kui töötlemisel MTX-ga vähenes rakkude eluvõimelisus 65%.



Joonis 6. UPF1, UPF6, UPF17 ja UPF19 mõju inimese erütroleukeemia rakkudele K562. **A** - UPF 200 μ M, MXT 20 μ M; **B** - UPF 100 μ M, MAP 10 μ M.

Järgmiseks uuriti UPF peptiidide mõju K562 rakkude membraani terviklikkusele, määrates LDH leket rakkudest. Nendes katsetes võrreldi UPF peptiidide mõju MAP lahusega. MAP efekte on hiljuti uuritud [37]. Kui baasfluorestsents võeti 0% ja Triton X-100 indutseeritud signaal 100%-ks, siis LDH leke K562 rakkudest pärast MAP töötlemist oli 25%. Mitte ükski UPF peptiididest ei põhjustanud märkimisväärset LDH vabanemist K562 rakkudest. Samas UPF17 and UPF19 häirisid rakumembraane rohkem kui γ -peptiidsidet sisaldavad peptiidid (UPF1 and UPF6).

ARUTELU

Mitmesugused madalamolekulaarsed antioksidandid, kaasaarvatud melatoniin, karvedilool ja tema metaboliit SB211475 omavad aromaatses struktuuriga seotud metoksuühendi. On näidatud, et metoksuühendi suurendab ühendite antioksidatiivset aktiivsust [38]. Metoksuühendi mõju uurimiseks disainiti esmalt tetrapeptiid UPF1, mille puhul lisati glutatiooni N-terminaalsesse otsa O-metüül-L-türosiin. See muudatus suurendas 60-korda hüdroksüülradikaali elimineerimisvõimet *in vitro* võrreldes glutatiooniga [30]. Sellest lähtuvalt disainiti ja sünteesiti rida UPF peptiide, et uurida nende struktuuri ja aktiivsuse seoseid (Tabel I). Glutatiooni molekulile lisati erinevaid aminohappeid ning enamasti toimus lisamine N-terminaalsesse otsa, kuid prooviti ka aminohappe lisamist C-terminaalsesse otsa (UPF2). Osa ühendite raamatukogust sünteesiti nii, et γ -glutamaat asendati α -glutamaadiga (UPF17-UPF25). Mitmetel peptiididel asendati kõik L-aminohapped (UPF10, UPF14) või ainult esimene N-terminaalne L-aminohape vastava D-isomeeriga (UPF5, UPF6, UPF18, UPF19, UPF27), et kontrollida nii stereoisomeeria mõju antioksidatiivsele aktiivsusele kui ka parandada ühendite vastupidavust endogeensetele peptidaasidele. Amiidset C-terminust otsas (UPF8, UPF10, UPF25 and UPF27) kasutati samal eesmärgil. UPF26 oli ainuke peptiid kus tüsteiin oli asendatud seriiniga, et jälgida sulfüülrühma eemaldamise mõju.

GSH ja UPF peptiidide võime elimineerida hüdroksüülradikaali näitab, et nad käituvad kui elektroni doonorid, mis reageerides vabade radikaalidega muudavad nad stabiilsemateks osakesteks ja lõpetavad vabaradikaalse ahelreaktsiooni. Vabade radikaalide eliminatsiooniuringud näitasid, et erinevate aminohappejääkide lisamine glutatiooni N- või C-terminaalsesse otsa, L-aminohapete asendamine D-isomeeridega, amiidne C-terminus otsas ja isegi Cys asendamine Ser ei mõjutanud drastiliselt UPF peptiidide hüdroksüülradikaali elimineerivaid omadusi võrreldes UPF1. γ -glutamaati sisaldavad UPF peptiidid omasid EC_{50} vahemikus 17-35 μ M sealjuures γ -glutamaadi asendamine α -glutamaadiga vähendas EC_{50} väärtusi märkimisväärselt (100 korda). Selline oluline tõus antioksidatiivses aktiivsuses on seletatav paremini ligipäätava karboksüülhappe rühmaga peptiidi ja radikaali vahel moodustunud aktiivses kompleksis. Võrreldes hüdroksüülradikaali eliminatsiooni EC_{50} väärtuseid mõõdetuna THA meetodi abil, ületasid α -glutamaati sisaldavad UPF peptiidid isegi põhjalikult testitud antioksidandi melatoniini vastavaid näitajaid (N-atsetüül-5-metoksütrüptamiin; EC_{50} $11.4 \pm 1 \mu$ M) [39].

Ühtlasi uuriti UPF peptiidide võimet püüda DPPH radikaali rakuvabas süsteemis ja võrreldi seda glutatiooniga. Uuritavateks peptiidideks olid UPF1, UPF6, UPF8, UPF17, UPF19 ja UPF25. Sanchez-Moreno *et al.* klassifitseerivad antioksidante T_{EC50} väärtustest lähtuvalt järgmiselt: <5 min (kiire), 5-30 min (keskmine) ja >30 min (aeglane) [35]. Selle klassifikatsiooni järgi oli UPF17 kiire; UPF1, UPF6, UPF8, UPF19 ja UPF25 keskmised ning GSH oli aeglane antioksidant. T_{EC50} ehk aeg mis kulus EC_{50} saavutamiseks oli UPF1 jaoks 4-korda ja UPF6 puhul 2-korda lühem kui glutatiooni vastav näitaja. UPF17 ja UPF19 T_{EC50} oli omakorda 2.5-korda lühem kui UPF1 ja UPF6. GSH ja UPF peptiidid elimineerivad DPPH radikaali olles vesiniku doonorid moodustades stabiilse ühendi DPPH-H. Kirjeldatud tulemused näitavad et metoksügrupp suurendab tõenäosust, et ühendid reageerivad vabade radikaalidega [38]. DPPH radikaali püüdmisel ei tulnud tulemuste erinevus niivõrd ülekaalukalt α -glutamaati sisaldavate UPF peptiidide kasuks kui hüdroksüülradikaali eliminatsioonil. Selline tulemus on põhjendatav asjaoluga, et DPPH radikaal omab suuremat steerilist takistust ning samas on ta märksa vähemreaktiivne kui hüdroksüülradikaal.

Nagu eeldatud, ainult glutatiooni ja UPF peptiidide redutseeritud vormid reageerivad vabade radikaalidega. Hiljuti uuriti UPF peptiidide stabiilsust kapillaarelektroforeesi meetodil [40,41]. Testitud glutatiooni analoogid näitasid aeglast dimerisatsiooni kineetikat nii vees kui ka soolalahuses. Leiti, et dimerisatsioon on aeglane protsess, märkimisväärse koguse dimeeri tekkeks kulub päevi. Sealjuures on dimerisatsioon soolalahuses kiirem kui vesilahuses.

Uuriti ka disainitud peptiidide toksilisi efekte. UPF peptiidid ei avaldanud negatiivset mõju K562 rakkude eluvõimelisusele isegi mitte 200 μ M kontsentratsioonis ega häirinud plasmamembraani terviklikkust. Rakumembraanidele mõjumiseks on meie disainitud peptiidid liiga lühikesed, kuid α -peptiidsidet sisaldavad analoogid omasid häirivat mõju rakumembraanidele mõnevõrra enam kui γ -peptiidsidemega UPF peptiidid. Samas hüdrofoobsema jäägi lisamine molekul ei mõjutanud rakumembraanide terviklikkust. UPF peptiidide mittetoksilisust on kinnitatud ka varem: UPF1 oli mittetoksiline närvikoele kontsentratsioonis 100 μ M [30].

UPF peptiidide täpsed toimemehhanismid vajavad veel selgitamist. Lisaks juba tõestatud omadustele nagu vabade radikaalide püüdmine ja aju eeskoore G valkude moduleerimine [31], uuritakse järgnevalt UPF peptiidide võimet tõsta rakusisest glutatiooni taset ja normaliseerida GSH/GSSG suhet.

Kokkuvõtvalt, disainisime ja süntesisime uute mittetoksiliste antioksidantide raamatukogu, mis näitasid väga head antioksidatiivset potentsiaali võrrelduna glutatiooniga. UPF peptiidid võivad tulevikus kasutust leida nii protektormolekulidena kui ka eelühenditena

mittepeptiidsete antioksidantide disainimisel, et korrigeerida sügava ja kestva oksüdatiivse stressi poolt põhjustatud kahjustusi.

JÄRELDUSED

1. Disainiti ja sünteesiti 17 glutatiooni analoogist koosnev UPF peptiidide raamatukogu.
2. γ -glutamaati sisaldavad UPF peptiidid omasid hüdroksüülradikaali eliminatsiooni EC_{50} väärtust vahemikus 17-35 μM . γ -glutamaadi asendamine α -glutamaadiga parandas märkimisväärselt UPF peptiidide hüdroksüülradikaali püüdmisvõimet (EC_{50} 30–50 nM). Seega kõik disainitud ühendid olid efektiivsemad hüdroksüülradikaali elimineerijad kui glutatioon (EC_{50} 1231.0 $\pm$ 311.8 μM).
3. Kõrvutades EC_{50} väärtusi oli glutatioon pisut parem DPPH radikaali elimineerija. UPF peptiidid elimineerisid aga vabu radikaale oluliselt kiiremini ning see asjaolu andis tulemuseks parema antiradikaalse efektiivsuse (AE, $1/EC_{50}T_{EC50}$).
4. C-terminaalses otsas asetseva karboksüülrühma amideerimine pigem halvendas UPF peptiidide vabu radikaale elimineerivaid omadusi. L-aminohapete asendamine ahelas vastavate D-enantiomeeridega ei mõjutanud oluliselt vabade radikaalide eliminatsioonivõimet. γ -glutamaadi asendamine ahelas α -glutamaadiga parandas oluliselt nii hüdroksüülradikaalide eliminatsiooni kui ka antiradikaalset efektiivsust DPPH vaba radikaali suhtes.
5. γ -glutamaati sisaldav UPF1 dimeriseerus kiiremini kui α -glutamaati sisaldav UPF17. Mõlema ühendi korral oli dimerisatsioon 0.9% NaCl lahuses kiirem kui vesilahuses.
6. UPF peptiidid ei avaldanud 200 μM kontsentratsioonis pärssivat mõju K562 rakkude eluvõimelisusele ega häirinud 100 μM kontsentratsioonis rakumembraanide terviklikkust.

KOKKUVÕTE

Glutatioon (γ -L-Glu-L-Cys-Gly) on inimorganismi tähtsaim madalamolekulaarne rakusisene antioksidant ning selle tiolrühma sisaldava ühendi kontsentratsioon rakkudes ulatub millimoolideni. Arvestades sügava kestva (*high grade*) oksüdatiivse stressi rolli paljude haiguste patogeneesis (südame-veresoonkonna haigused, neurodegeneratiivsed haigused, vähkkasvajad, kirurgiliste operatsioonide komplikatsioonid), omavad perspektiivi uute glutatiooni analoogide otsingud, mis oleks eksogeensel manustamisel efektiivsemad antioksidandid kui glutatioon ise. Käesoleva töö käigus disainiti ja sünteesiti seitsmeteistkümnest glutatiooni analoogist koosnev UPF peptiidide raamatukogu. UPF peptiidid on tetrapeptiidid kus glutatioonile või glutatiooni laadsele kolmest aminohappest koosnevale tüvele on lisatud antioksidatiivsete omaduste ja stabiilsuse parandamise eesmärgil neljas komponent. Töö eesmärgiks oli määrata disainitud ühendite võime elimineerida vabu radikaale, selgitada struktuuri ja aktiivsuse seoseid ning uurida UPF peptiidide stabiilsust ning toksilisust rakukultuurile.

γ -glutamaati sisaldavad UPF peptiidid omasid hüdroksüülradikaali eliminatsiooni EC_{50} väärtust vahemikus 17-35 μ M, α -glutamaati sisaldavad UPF peptiidid olid märkimisväärselt efektiivsemad ja nende vastav näitaja oli 30–50 nM. Seega kõik disainitud ühendid olid efektiivsemad hüdroksüülradikaali elimineerijad kui glutatioon (EC_{50} 1231.0 $\pm$ 311.8 μ M). Kõrvutades EC_{50} väärtusi, oli glutatioon mõnevõrra parem DPPH radikaali elimineerija kui UPF peptiidid (GSH: EC_{50} 23.6 $\pm$ 2.1 μ M; UPF peptiidid: EC_{50} 28.1 kuni 36.4 μ M). Samas UPF peptiidid elimineerisid DPPH radikaale kiiremini ning see asjaolu andis tulemuseks parema antiradikaalse efektiivsuse (AE, $1/EC_{50}T_{EC50}$) võrreldes glutatiooniga. Nii hüdroksüülradikaali kui ka DPPH radikaali eliminatsiooni tulemusi kokku võttes võib öelda, et karboksüülrühma asendamine C-terminaalses otsas amiidgrupiga pigem halvendas UPF peptiidide võimet elimineerida vabu radikaale ning L-aminohapete asendamine vastavate D-enatiomeeridega ei muutnud oluliselt antiradikaalset toimet. Glutatioonile omase γ -glutamaadi asendamine ahelas α -glutamaadiga parandas oluliselt nii hüdroksüülradikaalide eliminatsiooni kui ka antiradikaalset efektiivsust DPPH vaba radikaali suhtes.

UPF peptiidide stabiilsuse seisukohalt on kõige kriitilisem kahe molekuli ühinemine neis sisalduvate sulfüdrüülrühmade kaudu dimeerseks vormiks. Märkimisväärse protsendi dimeerse vormi tekkeks (vastavalt 27,5% ja 17,9%) kulus kaks nädalat, sealjuures γ -

glutamaati sisaldava UPF1 (Tyr(Me)- γ -Glu-Cys-Gly) vesilahus dimeriseerus kiiremini kui α -glutamaati sisaldava UPF17 vesilahus (Tyr(Me)- α -Glu-Cys-Gly). Mõlema ühendi korral oli dimerisatsioon 0.9% NaCl lahuses kiirem kui vesilahuses. Käesolevas töös ei näidanud UPF peptiidid toksilisi efekte katsetes inimese K562 erütroleukeemia rakkudega: nad ei avaldanud 200 μ M kontsentratsioonis pärssivat mõju rakkude eluvõimelisusele ega häirinud 100 μ M kontsentratsioonis rakumembraanide terviklikkust.

Kõrge antiradikaalne aktiivsus ja mittetoksilisus võimaldavad UPF peptiide potentsiaalselt kasutada protektormolekulidena või eelühenditena nende disainis. Seda kinnitavad ka juba UPF1 sooritatud katsed roti mudelitel [30,32].

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, van Zanden J, van Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001;10:141-152.
- [2] Cross AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 2004;1657:1-22.
- [3] Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press Inc.; 1999.
- [4] Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 1999;53:169-180.
- [5] Tejero I, Gonzalez-Lafont A, Lluch JM, Eriksson LA. Theoretical Modeling of Hydroxyl-Radical-Induced Lipid Peroxidation Reactions. *J Phys Chem B* 2007.
- [6] Lassegue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens* 2004;17:852-860.
- [7] Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999;27:922-935.
- [8] Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003;333:19-39.
- [9] Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC. Glutathione. *ANZ J Surg* 2003;73:517-522.
- [10] Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem.Pharmacol.* 2002;64:1057-1064.
- [11] Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1019-1026.

- [12] Droge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol* 2002;37:1333-1345.
- [13] Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 2004;58:39-46.
- [14] Sastre J, Asensi M, Gasco E, Pallardo FV, Ferrero JA, Furukawa T, Vina J. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* 1992;263:R992-995.
- [15] Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 2003;57:145-155.
- [16] Amano J, Suzuki A, Sunamori M. Salutory effect of reduced glutathione on renal function in coronary artery bypass operation. *J Am Coll Surg* 1994;179:714-720.
- [17] Olney JW, Zorumski C, Price MT, Labruyere J. L-cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin. *Science* 1990;248:596-599.
- [18] Bernard GR. N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Med* 1991;91:54S-59S.
- [19] Ortolani O, Conti A, De Gaudio AR, Moraldi E, Cantini Q, Novelli G. The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1907-1911.
- [20] Lucente G, Luisi G, Pinnen F. Design and synthesis of glutathione analogues. *Farmaco* 1998;53:721-735.
- [21] Yamamoto M, Sakamoto N, Iwai A, Yatsugi S, Hidaka K, Noguchi K, Yuasa T. Protective actions of YM737, a new glutathione analog, against cerebral ischemia in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993;81:221-232.

- [22] Gaullier JM, Lafontant P, Valla A, Bazin M, Giraud M, Santus R. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities towards glutathione-derived antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:1668-1674.
- [23] Paradisi MP, Mollica A, Cacciatore I, Di Stefano A, Pinnen F, Caccuri AM, Ricci G, Dupre S, Spirito A, Lucente G. Proline-glutamate chimeras in isopeptides. Synthesis and biological evaluation of conformationally restricted glutathione analogues. *Bioorg Med Chem* 2003;11:1677-1683.
- [24] Richardson G, Benjamin N. Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols. *Clin.Sci.(Lond)* 2002;102:99-105.
- [25] Wu Z, Minhas GS, Wen D, Jiang H, Chen K, Zimniak P, Zheng J. Design, synthesis, and structure-activity relationships of haloenol lactones: site-directed and isozyme-selective glutathione S-transferase inhibitors. *J Med Chem* 2004;47:3282-3294.
- [26] Kunze T, Heps S. Phosphono analogs of glutathione: inhibition of glutathione transferases, metabolic stability, and uptake by cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2000;59:973-981.
- [27] Rosen LS, Brown J, Laxa B, Boulos L, Reiswig L, Henner WD, Lum RT, Schow SR, Maack CA, Keck JG, Mascavage JC, Dombroski JA, Gomez RF, Brown GL. Phase I study of TLK286 (glutathione S-transferase P1-1 activated glutathione analogue) in advanced refractory solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2003;9:1628-1638.
- [28] Lo TW, Thornalley PJ. Inhibition of proliferation of human leukaemia 60 cells by diethyl esters of glyoxalase inhibitors in vitro. *Biochem Pharmacol* 1992;44:2357-2363.
- [29] Sheh L, Chen BL, Chen CF. Synthesis of cyclic peptide homologs of glutathione as potential antitumor agents. *Int J Pept Protein Res* 1990;35:55-62.
- [30] Põder P, Zilmer M, Starkopf J, Kals J, Talonpoika A, Pulges A, Langel Ü, Kullisaar T, Viirlaid S, Mahlapuu R, Zarkovski A, Arend A, Soomets U. An antioxidant tetrapeptide

UPF1 in rats has a neuroprotective effect in transient global brain ischemia. *Neurosci Lett* 2004;370:45-50.

[31] Karelson E, Mahlapuu R, Zilmer M, Soomets U, Bogdanovic N, Langel Ü. Possible signaling by glutathione and its novel analogue through potent stimulation of frontocortical G proteins in normal aging and in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002;973:537-540.

[32] Kals J, Starkopf J, Zilmer M, Pruler T, Pulges K, Hallaste M, Kals M, Pulges A, Soomets U. Antioxidant UPF1 attenuates myocardial stunning in isolated rat hearts. *Int J Cardiol* 2007;in press.

[33] Soomets U, Zilmer M, Langel Ü. Manual Solid-Phase Synthesis of Glutathione analogues: A Laboratory-Based short course. In: Howl J, editors. *Peptide Synthesis and Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2006. p 241 -257.

[34] Barreto JC, Smith GS, Strobel NH, McQuillin PA, Miller TA. Terephthalic acid: a dosimeter for the detection of hydroxyl radicals in vitro. *Life Sci* 1995;56:PL89-96.

[35] Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 1998;76:270-276.

[36] Jimenez-Escrig A, Jimenez-Jimenez I, Sanchez-Moreno C, Saura-Calixto F. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Sci Food Agric* 2000;80:1686-1690.

[37] Saar K, Langel Ü. Toxicity Methods in Cell-penetrating peptides. *Handbook of Cell Penetrating Peptides*. CRC Press; 2006. p 553-565.

[38] Gozzo A, Lesieur D, Duriez P, Fruchart JC, Teissier E. Structure-activity relationships in a series of melatonin analogues with the low-density lipoprotein oxidation model. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1538-1543.

[39] Pähkla R, Zilmer M, Kullisaar T, Rägo L. Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro. *J Pineal Res* 1998;24:96-101.

[40] Mahlapuu R, Vaher M, Ehrlich K, Kaljurand M, Soomets U. Comparison of the stability of glutathione and related synthetic tetrapeptides by HPLC and capillary electrophoresis. *J Pept Sci* 2006;12:796-799.

[41] Vaher M, Viirlaid S, Ehrlich K, Mahlapuu R, Jarvet J, Soomets U, Kaljurand M. Characterization of the antioxidative activity of novel nontoxic neuropeptides by using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2006;27:2582-2589.

SUMMARY

Glutathione (γ -L-Glu-L-Cys-Gly) is the most important intracellular low-molecular antioxidant in human body. This thiol group containing substance is represented in millimolar concentration range in most cells. Considering the role of oxidative stress in a large number of pathologies (cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, cancer, complications of surgical operations), the searches of new glutathione analogues, which would be more effective than glutathione in the case of exogenous administration, have a clinical perspective. In this work, library containing seventeen UPF peptides were designed and synthesized. UPF peptides are tetrapeptides with additional amino acid linked to glutathione or to a glutathione-like backbone with purpose to achieve better antioxidativity and stability. The purpose of this study was to estimate the free radical elimination ability of UPF peptides, explain the structure-activity relations, stability and toxicity to cell culture.

UPF peptides with γ -glutamate in their backbone had EC_{50} of hydroxyl radical elimination in the range of 17-35 μ M, respective value of α -glutamate containing molecules was remarkably better and was in nanomolar range (30–50 nM). It means that all designed peptides were better hydroxyl radical scavengers than glutathione (EC_{50} 1231.0 $\pm$ 311.8 μ M). Comparing EC_{50} values, glutathione was slightly better in elimination of DPPH radicals (GSH: EC_{50} 23.6 μ M; UPF peptides: EC_{50} 28.1 - 36.4 μ M). But UPF peptides scavenged free radicals faster ($T_{EC_{50}}$ was smaller), which results in better antiradical efficiency (AE, $1/EC_{50}T_{EC_{50}}$). DPPH and hydroxyl radical scavenging assays showed that changing C-terminal carboxyl group to amide rather decreased and replacing the L-amino acid with its D-enantiomer did not affect the free radical elimination ability of UPF peptides. The critical aspect of the stability of UPF peptides is the reaction between two molecules via sulphydryl group resulting in dimeric form. It took a couple of weeks until the quantity of dimeric form reach up to 27.5% in the case of UPF1 (Tyr(Me)- γ -Glu-Cys-Gly) and for UPF17 up to 17.9% (Tyr(Me)- α -Glu-Cys-Gly). Both of the molecules had quicker dimerization in saline solution (0.9% NaCl) than in water. UPF peptides did not show toxic effects on human K562 erythroleucemia cells: they affect neither viability nor integrity of the cell membranes in concentrations 200 μ M and 100 μ M respectively.

High antiradical efficiency and non-toxicity makes UPF peptides possible to use as protector molecules or as leads in their further design.

TÄNUAVALDUSED

Täna oma kolleege TÜ Biokeemia Instituudist abi ja nõuannete eest ning artikli kaasautoreid tehtud töö eest.

Suur tänu juhendajatele *Ph.D.* Ursel Soometsale ja prof. Mihkel Zilmerile.

PUBLIKATSIOONID

Design, synthesis and properties of novel powerful antioxidants, glutathione analogues

KERSTI EHRLICH^{1,†}, SÄDE VIIRLAID^{1,2,†}, RIINA MAHLAPUU¹, KÜLLIKI SAAR^{3,4}, TIJU KULLISAAR¹, MIHKEL ZILMER¹, ÜLO LANGE^{3,5}, & URSEL SOOMETS¹

¹Department of Biochemistry, National and European Centre of Excellence of Molecular and Clinical Medicine, University of Tartu, Ravila 19, 51014 Tartu, Estonia, ²Department of Organic and Bioorganic Chemistry, University of Tartu, Jakobi 2, 51013 Tartu, Estonia, ³Department of Neurochemistry, Stockholm University, Svante Arrhenius väg 21A, S-10691, Stockholm, Sweden, ⁴Department of Developmental Biology, University of Tartu, Vanemuise 46, 51014 Tartu, Estonia, and ⁵Laboratory of Molecular Biology, Institute of Technology, University of Tartu, Nooruse 1, 50411 Tartu, Estonia

Accepted by Professor R. Brigelius-Flohe

(Received 18 January 2007; in revised form 21 February 2007)

Abstract

Glutathione (GSH) is the major low-molecular weight antioxidant in mammalian cells. Thus, its analogues carrying similar and/or additional positive properties might have clinical perspectives. Here, we report the design and synthesis of a library of tetrapeptidic GSH analogues called UPF peptides. Compared to cellular GSH our designed peptidic analogues showed remarkably higher hydroxyl radical scavenging ability (EC₅₀ of GSH: 1231.0 ± 311.8 µM; EC₅₀ of UPF peptides: from 0.03 to 35 µM) and improved antiradical efficiency towards a stable α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) radical. The best of UPF peptides was 370-fold effective hydroxyl radical scavengers than melatonin (EC₅₀: 11.4 ± 1.0 µM). We also found that UPF peptides do not influence the viability and membrane integrity of K562 human erythroleukemia cells even at 200 µM concentration. Dimerization of GSH and UPF peptides was compared in water and in 0.9% saline solutions. The results, together with an earlier finding that UPF1 showed protective effects in global cerebral ischemia model in rats, suggest that UPF peptides might serve both as potent antioxidants as well as leads for design of powerful non-peptidic antioxidants that correct oxidative stress-driven events.

Keywords: Oxidative stress, glutathione, free radicals, hydroxyl radical, DPPH

Abbreviations: DCC, dicyclohexylcarbodiimide; DCM, dichloromethane; DIEA, N,N-diisopropylethylamine; DMF, N,N-dimethylformamide; DMSO, dimethylsulphoxide; DPPH, α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl; EDT, 1,2-ethanedithiol; EMS, ethylmethylsulfide; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl; GGT, γ-glutamyltransferase; GSH, reduced (monomeric) form of glutathione; GSSG, oxidized (dimeric) form glutathione; GST, glutathione S-transferase; HF, hydrofluoric acid; HKR, HEPES-buffered Krebs-Ringer solution; HOBt, 1-hydroxybenzotriazole; LDH, lactate dehydrogenase; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; MAP, model amphipathic peptide; MBHA, 4-methylbenzhydrylamine; MTX, methotrexate; TBTU, 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate; tert-Boc, tert-butyloxycarbonyl; TFA, trifluoroacetic acid; THA, terephthalic acid; TIS, triisopropylsilane; UPFs, UPF peptides

Introduction

Glutathione (GSH) carries an important role in the human body antioxidant defense system, as it is the most

prominent low-molecular weight thiol that occurs in millimolar range in cells. GSH is a tripeptide composed of amino acids glutamate, cysteine and glycine (γ-L-Glu-L-Cys-Gly) and it has two characteristic structural

Correspondence: K. Ehrlich, Department of Biochemistry, University of Tartu, Ravila 19, 51014 Tartu, Estonia. Tel: 372 737 4313. Fax: 372 737 4312. E-mail: kersti.ehrlich@ut.ee

[†]Contributed equally.

features: a γ -glutamyl linkage and a sulphhydryl group. GSH as a nucleophile reacts with endogenous and exogenous electrophile compounds, a majority of these detoxification reactions are mediated by glutathione S-transferases (GST) [1]. In addition GSH helps to maintain the sulphhydryl groups of many proteins in the functional, reduced form. GSH oxidizes to dimeric form (GSSG) via reacting non-enzymatically with certain reactive species (hydroxyl radical, hypochlorous acid and peroxynitrite) or during the elimination of peroxides being a co-factor in glutathione peroxidase [2,3]. GSH depletion changes the GSH redox status in the cell, which is defined as the GSH/GSSG ratio (at normal conditions 100 or more) [4,5]. This redox ratio is involved in the regulation of most cellular metabolic processes and in the activation of the redox-sensitive transcriptional elements [6].

Both GSH depletion and the high-grade oxidative stress occur in a wide variety of conditions. It includes several chronic diseases (cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, cancer formation and HIV) and acute clinical conditions (inflammation, infarction, stroke, organ transplantation, ischemia/reperfusion injury, renal failure, lung injury and complications of surgical operations). Stress, aging and strenuous physical exercises have also been considered [7–11]. Participation of high grade oxidative stress in many pathological events creates a requirement for new molecules with improved antioxidant activities.

Due to the versatile role of GSH, different strategies have been applied to maintain the functionality of the GSH system. One of the research objectives is how to restore the intracellular GSH level that may be potentially useful in different clinical conditions named above. Reaching the sufficient cellular GSH concentration (up to some millimolar) by administering GSH itself is complicated, because of its rapid degradation in the digestive system and the difficulties with direct uptake into different cell types. Some positive results with administering of exogenous GSH have been shown, like the preservation of the renal function after ischemic renal injury [12]. The bioavailability of cysteine has been determined as the main limiting factor of the *de novo* synthesis of GSH. As the application of high doses of cysteine has toxicity problems [13], the cysteine precursors, for example, *N*-acetyl-L-cysteine have been used [14,15]. Due to versatile roles of GSH, the great number of GSH analogues with extremely different properties have been synthesized [16].

Various modifications of GSH molecule have been performed to improve its stability and cellular uptake. A GSH analogue YM737 [*N*-(*N*- γ -L-glutamyl-L-cysteinyl) glycine 1-isopropyl ester sulfate monohydrate] has been shown to have protective qualities in rats cerebral ischemia by inhibiting lipid peroxidation [17]. Substitution of the amino group at the GSH molecule N-terminus with pyrrole ring gives new antioxidants that due to steric hindrance do not

inhibit the GSH reductase nor the glutathione peroxidase [18]. Replacing the native γ -glutamyl moiety with the *cis*- or *trans*-4-carboxyl-L-proline residue gives conformationally-rigid skeleton and makes this GSH analogue resistant to γ -glutamyltransferase (GGT) degradation [19]. The outstanding group of GSH analogues are cysteine-substituted S-nitroso-glutathiones that have been investigated based on physiological roles of both GSH and nitric oxide, for review see Ref. [20].

In some clinical situations like cancer therapies, diminishing the GSH level is the goal. Overexpression of GST has been reported to be one of the responsible biochemical mechanisms of drug resistance in cancer cells. GST plays an important role in the deactivation of a number of alkylating agents used in cancer therapies [21]. In this way, a large number of GSH analogues have been designed to inhibit different GST isoenzymes: the phosphono analogues [22] and the peptidomimetic analogues that are stable towards GGT, the main enzyme of GSH breakdown [23]. One of the latest and more successful GSH analogues in cancer therapy TLK 286, is in clinical trials [24]. Some designed GSH analogues act as glyoxalase inhibitors and have shown potent anti-proliferative and anti-tumour activity [25]. Still, the improvement of GSH analogues stability towards peptidases and proteases stands as general problem. One possible solution to overcome this problem is through the cyclization of GSH molecule. Such analogues have been tested for antitumor activity [26].

Previously, we have designed UPF1 peptide by adding the non-coded amino acid *O*-methyl-L-tyrosine (Tyr(Me)) to the N-terminus of GSH

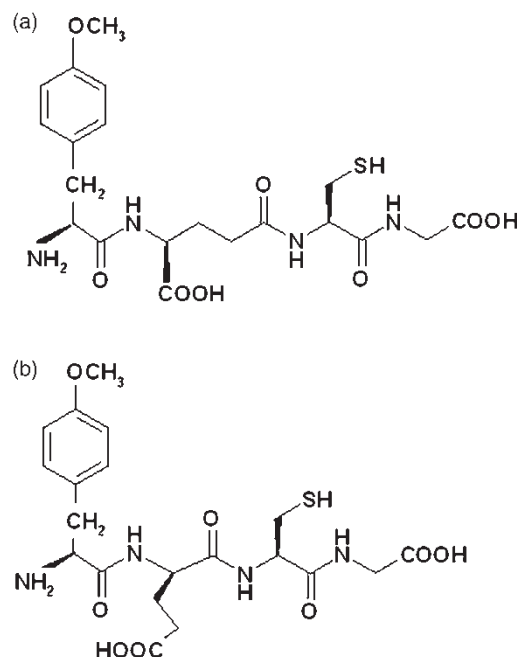


Figure 1. General structure of UPF1 (a) and UPF17 (b).

(Figure 1(a)). We have shown that UPF1 is 60-fold better hydroxyl radical scavenger than GSH [27] and may also act as a modulator of G proteins in frontocortical membrane [28]. UPF1 has been already investigated in different *in vivo* experimental models in rats: global brain ischemia [27], Langendorff model with isolated heart [29], 5/6 nephrectomia model (unpublished data), and it has been shown to have protective effect. On the basis of gathered information the aim of the present study was to design a small library of more powerful antioxidants than GSH, find structural features of compounds that are responsible for increase in antioxidativity and investigate stability and toxicity of the UPF peptides, to find the most promising analogues for the *in vivo* experiments. By determining the reactivity of UPF peptides *in vitro*, this study is the first stage to create presumption for following functional studies using animal models.

Materials and methods

Reagents and solvents

9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Gly-Wang resin, Rink Amide MBHA (*p*-methylbenzhydrylamine) resin, Fmoc-protected amino acids, Boc-protected amino acids, dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) were purchased from Novabiochem, Switzerland; *N,N*-dimethylformamide (DMF), dichloromethane (DCM), dimethylsulphoxide (DMSO), *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA), acetonitrile from BDH Laboratory Supplies, England; trifluoroacetic acid (TFA), ethylmethylsulfide (EMS), triisopropylsilane (TIS) from Fluka; hydrofluoric acid (HF) from AGA, Sweden; 1,2-ethanedithiol (EDT), terephthalic acid (THA), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, disodiumphosphate, hydrogen peroxide 30% (w/w, water solution), α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH radical) from Sigma-Aldrich, Germany. Methotrexate (MTX) was from Amersham Biosciences AB (Uppsala, Sweden), model amphipathic peptide (MAP) was from AC Scientific Inc. (Duluth, GA, USA). DMF and DCM were stored on molecular sieves ($\text{\AA}$ 4, Merck, Germany).

Peptide synthesis

The GSH analogues were synthesized manually using Fmoc-chemistry and by machine using *tert*-Boc-chemistry [30,31]. For the manual peptide synthesis we used Gly-Wang resin or on Rink Amide MBHA resin. Couplings of Fmoc protected amino acids were carried out in a stepwise manner using the standard TBTU and HOBt activation in DMF. The peptides were removed from the resin and simultaneously deprotected with TFA in the presence of scavengers,

water 2% (v/v), EDT 2% (v/v) and TIS 2.5% (v/v) for 90 min at room temperature.

The automated synthesis of UPF peptides was carried out in a stepwise manner in a 0.1 mmol scale on an Applied Biosystem Model 431A peptide synthesizer on a solid support using DCC/HOBt activation strategy. *tert*-Butyloxycarbonyl (*tert*-Boc) amino acids were coupled as hydroxybenzotriazole esters to a phenylacetamidomethyl-resin (0.6 mmol/g, Novabiochem, Switzerland) to achieve the C-terminal free carboxylic acid or to a *p*-methylbenzhydrylamine (MBHA) resin (1.1 mmol/g, Bachem, Switzerland) to obtain C-terminally amidated peptides. The peptides were finally cleaved from the resin with liquid HF at 0°C for 30 min. Deprotection of the side chains, cleavage of the peptides and purification on HPLC have been described in detail earlier [32].

The purity of the peptides was >99% as demonstrated by HPLC on an analytical Nucleosil 120-3 C18 reversed-phase column (0.4×10 cm). The molecular masses of the peptides were determined by a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass-spectrometry (Voyager DE Pro, Applied Biosystems) and the calculated values were obtained in each case.

Hydroxyl radical scavenging ability

The hydroxyl radical scavenging ability of UPF peptides was measured as described by Barreto et al. using THA as a chemical dosimeter [33]. The final concentration of THA was 10 mM and hydroxyl radical was generated via Fenton-like reaction between CuSO_4 and H_2O_2 with final concentrations of 10 μM and 1 mM, respectively. All the solutions used were prepared in 14.75 mM sodium phosphate buffer at pH 7.5. The hydroxyl radical suppression was measured by a spectrofluorescence method at 312 nm excitation and at 426 nm emission (Perkin-Elmer LS50B). The hydroxyl radical elimination was expressed in EC_{50} values determined by sigmoid dose-response (viable slope) analysis.

DPPH radical scavenging assay

The scavenging effect of the peptides on DPPH radical was measured spectrophotometrically (Jenway 6405 UV/Vis spectrophotometer, Jenway Ltd., England). 0.1 ml of peptide solution in saline (0.9% NaCl) in a concentration range from 2.5 to 200 μM was added to 0.1 ml of 0.1 mM DPPH in 95% ethanol. The mixture was shaken. Absorbances at 517 nm were recorded from 0.5 min up to the time when a steady state was reached. A lower absorbance represented a higher DPPH scavenging activity. The percentage of remaining DPPH against the peptide concentration was plotted to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease by 50% the initial

DPPH[•] concentration (EC_{50}). The time needed to reach the steady state to EC_{50} concentration ($T_{EC_{50}}$) was calculated graphically. The scavenging effect was expressed as antiradical efficiency (AE). AE is $1/EC_{50}T_{EC_{50}}$ [34,35].

Dimerization of UPF peptides

The dimerization rate of UPF1 and UPF17 as the representatives of UPF peptides with the two different GSH backbones containing γ - and α -glutamate, respectively, was followed in water and in saline (0.9% NaCl) solutions. 1 mM solutions of peptides were kept at room temperature and at certain time points during 14 days, 100 μ l samples were taken and analysed on analytical HPLC (ZORBAX 300 SB-C18 4.6 mm $\times$ 15 cm) using a linear acetonitrile–water gradient from 20 to 90% acetonitrile (v/v) (0.1% TFA) at a flow rate of 2 ml/min. The wavelength of peak detection was 220 nm. Peak areas were calculated by the ChemStation software of Hewlett Packard HPLC system (model 1100). The quantities of reduced and oxidized forms of studied analogues in the sample were expressed in percents. Summarized areas of the peaks of monomeric and dimeric forms of UPF peptides were constant and were considered as 100% through all experiments. Fractions were collected and molecular masses of peptides (monomeric and dimeric forms) were determined by a MALDI-TOF mass-spectrometry (Voyager DE Pro, Applied Biosystems).

Cell culture

The cells were cultured at 37°C in 5% CO₂. The plastic labware (Corning®) was from Labdesign AB (Täby, Sweden) and cell culture reagents (GIBCO™) from Invitrogen AB (Lidingö, Sweden).

K562 human erythroleukemia cells (a kind gift from Dr T. Land, Department of Neurochemistry and Neurotoxicology, Stockholm University, Stockholm, Sweden) were propagated in suspension using RPMI-1640 medium supplemented with GlutaMAX™ I, penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 μ g/ml) and heat-inactivated foetal bovine serum (7.5%). Cell density was kept between 10^5 and 10^6 cells/ml.

Effects of UPF1, UPF6, UPF17, UPF19 on viability of K562 cells

CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA) was used to estimate effects of UPF1, UPF6, UPF17 and UPF19 on K562 cell viability via the quantification of ATP production.

K562 cells were suspended into wells of a 48-well-plate: 37,500 cells in 0.25 ml medium. Then 5 μ l of drug stock solution was added. Stock solution concentrations were as follows: 10 mM in water for

UPF1, UPF6, UPF17, UPF19 and 1 mM in DMSO:H₂O (10/90) for MTX. The final concentrations were as follows: 200 μ M for UPFs, 20 μ M for MTX. After 24 h of exposure in the cell culture incubator, the plate was removed from the incubator and equilibrated to room temperature for approximately 30 min. Then 0.25 ml CellTiter-Glo™ reagent (prepared according to manufacturer's instructions) was added to each well. After 10 min of gentle shaking, 400 μ l of the content from each well was transferred to respective well on a white polypropylene LumiNunc™ plate (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) and the luminescence was recorded on a dual-scanning microplate spectrofluorometer SPECTRAMax® GEMINI XS from Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA).

Effects of UPF1, UPF6, UPF17 and UPF19 on the membrane integrity of K562 cells

CytoTox-One™ Homogenous Membrane Integrity Assay (Promega) was used to estimate the effects of UPF1, UPF6, UPF17 and UPF19 on the membrane integrity of K562 cells. This assay is based on the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) release from cells with a damaged membrane. About 15 ml of cells ($\leq 10^6$ cells/ml) were centrifuged for 5 min at 500g. The cell pellet was washed twice with 10 ml HEPES-buffered Krebs-Ringer solution (HKR: 5.5 mM HEPES, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, pH 7.4). The cells were then resuspended at a density of 1×10^6 cells/ml (counted with hemacytometer). About 200 μ l of this suspension was transferred to a vial which already contained 200 μ l of peptide or Triton X-100 solution in HKR. The final concentrations were as follows: 100 μ M for UPFs, 10 μ M for MAP and 0.1% for Triton X-100. After 10 min of incubation at 37°C at 300 rpm in a Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) the vials were centrifuged for 2 min at 500g. Then 100 μ l of the supernatant was transferred to a black polypropylene FluoroNunc™ plate (Nunc A/S, Roskilde, Denmark). About 100 μ l of CytoTox-One™ Reagent (prepared according to the manufacturer's instructions) was added to each well. After 10 min of incubation at room temperature, 50 μ l of stop solution was added to each well and the fluorescence was recorded on a dual-scanning microplate spectrofluorometer SPECTRAMax® GEMINI XS from Molecular Devices (Sunnyvale) using following wavelengths: 560 nm excitation and 590 nm emission.

Data analysis

All the data was analysed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results in the tables are

presented as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

Results

Solubility of peptides

All the synthesized peptides were readily soluble in water solutions up to 1 mM, except the biotinylated analogue, UPF7. UPF7 was designed to study intracellular interactions of UPF1 but hydrophobic biotinyl moiety significantly decreased solubility of the analogue in water solutions and therefore UPF7 was not used in the following experiments.

Hydroxyl radical scavenging assay

The hydroxyl radical scavenging assay was used as the first estimation criteria of the antioxidative activity of the designed peptides. The hydroxyl radicals were generated via reaction between Cu^{2+} and H_2O_2 and detected with a fluorescence method using THA as a probe. The EC_{50} of the hydroxyl radical scavenging reaction for UPF peptides are shown in Table I. The results showed that all designed peptidic molecules were remarkably stronger hydroxyl radical scavengers, than GSH (Table I). Peptides with γ -peptide linkage in backbone showed the EC_{50} between 17 and 35 μM compare to GSH $1231.0 \pm 311.8 \mu\text{M}$, respectively. The substitution of the all or only N-terminal L-amino acid to D-enantiomer did not change the hydroxyl radical scavenging abilities. The comparison of radical scavenging properties of free acid and amidated form in the next pairs of peptides—UPF1 and UPF 8, UPF 14 and UPF10, UPF6 and UPF27, UPF 17 and UPF 25 revealed a tendency that peptide amides were slightly weaker hydroxyl radical scavengers than free

acids. Surprisingly, the substitution of cysteine with serine residue in UPF26 sequence did not reduce the hydroxyl radical scavenging ability, suggesting that not only SH group is involved in radical depletion reaction.

Most powerful antioxidants in the hydroxyl radical scavenging assay turned out to be the sequences where γ -glutamate residue was replaced with α -glutamate residue (UPF17–UPF25) (Figure 1b). These analogues showed EC_{50} of scavenging reaction in the submicromolar range (EC_{50} was between 30 and 50 nM) and peptide solution with concentration 1 μM achieved approximately 80% from the maximal inhibiting effect (Figure 2). Exact EC_{50} measurements in case of α -glutamate containing peptides were disturbed by a slight elevation of the radical production in the end of the run if concentrations below 0.5 μM were used, probably caused by extremely small amount of peptides.

DPPH radical scavenging assay

This assay is based on the reduction of DPPH $^{\cdot}$, a stable free radical. DPPH $^{\cdot}$ has a strong absorption at 517 nm and upon reduction by a free radical scavenging antioxidant, this absorption is decreased. We studied the effects of the most interesting GSH analogues and we found that they all exhibited free radical scavenging activity against the stable free radical DPPH. Table II summarizes the EC_{50} concentrations, the time needed to reach the steady state EC_{50} concentrations ($T_{\text{EC}_{50}}$) and antiradical efficiency (AE, $1/\text{EC}_{50}T_{\text{EC}_{50}}$). Compared to GSH all designed molecules have similar approximately 1.2-fold greater EC_{50} concentrations required to scavenge 50% of the DPPH stable free radical. Although GSH was a slightly better DPPH radical scavenger by

Table I. Library of designed and synthesized GSH analogues and their hydroxyl radical scavenging ability.

Nr.	Sequence	MW	$\text{EC}_{50} \pm \text{SEM} (\mu\text{M})$
UPF1	$\text{H}_2\text{N-Tyr(Me)}-(\gamma\text{-Glu})-\text{Cys-Gly-COOH}$	484.5	20.5 ± 1.3
UPF2	$\text{H}_2\text{N}-(\gamma\text{-Glu})-\text{Cys-Gly-Tyr(Me)-COOH}$	484.5	19.8 ± 0.8
UPF5	$\text{H}_2\text{N-D-Asp}-(\gamma\text{-Glu})-\text{Cys-Gly-COOH}$	421.4	34.7 ± 0.9
UPF6	$\text{H}_2\text{N-D-Ser}-(\gamma\text{-Glu})-\text{Cys-Gly-COOH}$	394.4	21.2 ± 0.4
UPF7	Biotinyl-Tyr(Me) $-(\gamma\text{-Glu})-\text{Cys-Gly-COOH}$	710.5	ND*
UPF8	$\text{H}_2\text{N-Tyr(Me)}-(\gamma\text{-Glu})-\text{Cys-Gly-CONH}_2$	483.5	24.4 ± 0.4
UPF10	$\text{H}_2\text{N-D-Tyr(Me)-D}-(\gamma\text{-Glu})-\text{D-Cys-Gly-CONH}_2$	483.5	25.5 ± 0.6
UPF14	$\text{H}_2\text{N-D-Tyr(Me)-D}-(\gamma\text{-Glu})-\text{D-Cys-Gly-COOH}$	484.5	19.6 ± 0.8
UPF15	$\text{H}_2\text{N-Tyr}-(\gamma\text{-Glu})-\text{Cys-Gly-COOH}$	469.4	19.0 ± 1
UPF16	$\text{H}_2\text{N-Ser}-(\gamma\text{-Glu})-\text{Cys-Gly-COOH}$	394.4	17.3 ± 1.1
UPF17	$\text{H}_2\text{N-Tyr(Me)-Glu-Cys-Gly-COOH}$	484.5	0.038 ± 0.003
UPF18	$\text{H}_2\text{N-D-Tyr(Me)-Glu-Cys-Gly-COOH}$	484.5	0.044 ± 0.007
UPF19	$\text{H}_2\text{N-D-Ser-Glu-Cys-Gly-COOH}$	394.4	0.031 ± 0.004
UPF24	$\text{H}_2\text{N-Ser-Glu-Cys-Gly-COOH}$	394.4	0.046 ± 0.003
UPF25	$\text{H}_2\text{N-Tyr(Me)-Glu-Cys-Gly-CONH}_2$	483.5	0.032 ± 0.006
UPF26	$\text{H}_2\text{N-Tyr(Me)-Glu-Ser-Gly-COOH}$	468.5	21.1 ± 0.9
UPF27	$\text{H}_2\text{N-D-Ser}-(\gamma\text{-Glu})-\text{Cys-Gly-CONH}_2$	393.4	22.1 ± 0.9
GSH	$(\gamma\text{-Glu})-\text{Cys-Gly-COOH}$	307.3	1231.0 ± 311.8

*ND, not determined.

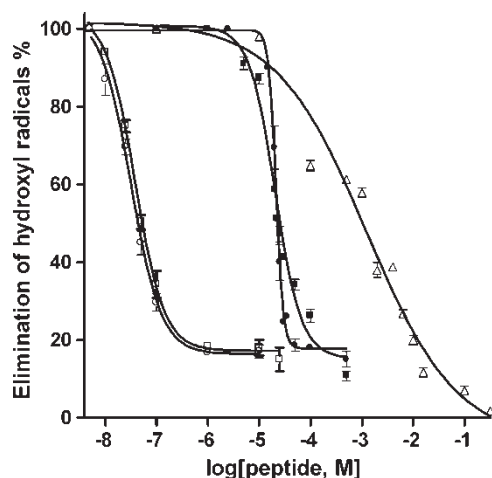


Figure 2. Concentration dependent hydroxyl radical scavenging effects of UPF1 (■), UPF6 (●), UPF17 (□), UPF19 (○) and GSH (Δ) *in vitro*.

comparing EC_{50} values, all designed molecules achieved their steady state EC_{50} with shorter time (T_{EC50}) and thereby gave better antiradical efficiency than GSH. Peptides with α -glutamate in backbone (UPF17 and UPF19) gave the highest antiradical efficiencies, whereas UPF17 was the best. The T_{EC50} of GSH was ten times higher than for UPF17 and the antiradical efficiency of UPF17 was 8.3-fold greater than GSH. Comparison of T_{EC50} in pairs of peptides UPF1 and UPF8, UPF17 and UPF25 revealed that amidated peptides need about 2-fold more time to reach steady state than the similar free acid peptides, T_{EC50} 10 and 20, 4 and 7 min, respectively.

Dimerization of UPF peptides

We studied the rate of dimerization of the selected UPF peptides (UPF1 and UPF17) in water and in saline solutions to clarify the state of molecules in our other experiments. In water and physiological solution analogues showed different dimerization rate at 1 mM concentration (Figure 3). Performing MALDI-TOF analysis, we found the first signs of dimerization in the solution on the 2nd-day of incubation. For all peptides studied dimerization occurred quicker in the saline

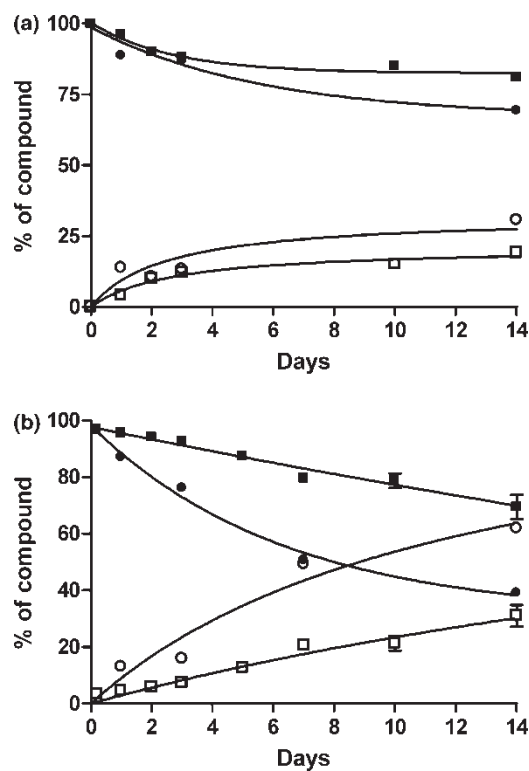


Figure 3. Dimerization of UPF1 and UPF17 in water and in 0.9% NaCl solution at room temperature. Content of monomeric (●) and dimeric (○) form of UPF1 and of monomeric (■) and dimeric (□) form of UPF17 in water (a) and in 0.9% NaCl solution (b).

solution than in water. For example, after the 14th-day, 27.5% of UPF1 was dimerized in water when in saline the same amount of UPF1 dimer was detected on the 4th-day. On the 14th-day UPF17 showed 17.9% of dimers in water solution whereas the same amount of dimer in saline was detected on the 7th-day.

Effects of UPF peptides on the viability and membrane integrity of K562 erythroleukemia cells

We have previously shown that UPF1 did not affect viability of primary cerebellar granule cells at 100 μ M concentration. To study further toxic effects of UPF peptides we choose to work with K562 human erythroleukemia cells. K562 cells are widely used in differentiation studies and are often selected for studies of anticancer drugs. We compared the effects of different UPF peptides on the viability and on the membrane integrity of K562 cells (Figure 4). In the viability experiments, we compared effects of 200 μ M solutions of peptides and 20 μ M MTX on K562 cells after 24 h. UPF1, UPF6, UPF17 and UPF19 did not show any toxic effects on the viability of K562 cells, whereas only 35% of cells survived MTX treatment.

Furthermore, we studied the effects of the same set of peptides on the integrity of K562 cells membrane in LDH leakage assays. In these experiments we compared the effects of UPF peptides with the effect of MAP.

Table II. DPPH stable free radical scavenging capacity—antiradical efficiencies (AE). AE is $1/EC_{50}T_{EC50}$.

Compounds	EC_{50} (μ M)	T_{EC50} (min)	AE ($\times 10^{-3}$)
GSH	23.6 ± 2.1	40	1.06
UPF1	28.1 ± 1.6	10	3.56
UPF6	29.0 ± 1.5	21	1.64
UPF17	28.3 ± 1.7	4	8.83
UPF19	27.0 ± 0.9	9	4.12
UPF8 (UPF1 amide)	29.3 ± 2.0	20	1.71
UPF25 (UPF17 amide)	36.4 ± 1.8	7	3.89

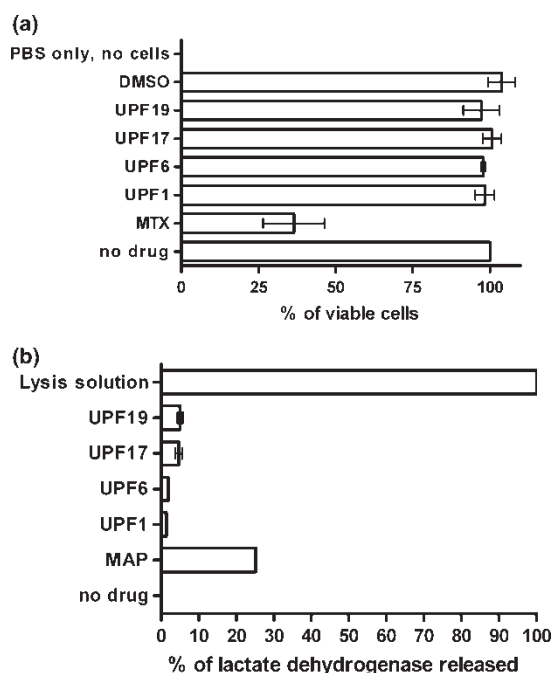


Figure 4. The toxicity test. The influence of UPF1, UPF6, UPF17 and UPF19 to K562 human erythroleucemia cells. (a) UPF 200 μ M, MTX 20 μ M; (b) UPF 100 μ M, MAP 10 μ M.

The effects of MAP have been previously studied [36]. When the background fluorescence (“no drug”) was taken as 0% and the Triton X-100-induced signal was taken as 100%, the total cellular LDH leaked from K562 cells after MAP treatment was 25%. None of the UPF peptides caused significant LDH leakage from K562 cells. Interestingly, UPF17 and UPF19 disturbed membranes more than peptides with γ -peptide linkage (UPF1 and UPF6).

Discussion

Various low-molecular antioxidants, including melatonin, carvedilol and its metabolite SB211475, have a methoxy moiety in their aromatic structures. It has been shown that the methoxy group increases the antioxidative activity of different compounds [37]. To study the effect of the methoxy moiety we first designed the tetrapeptide UPF1, where we added *O*-methyl-L-tyrosine to the N-terminus of GSH. We have shown that this change increased the hydroxyl radical scavenging ability 60-fold compared to GSH itself *in vitro* [27]. Taken that into account and to investigate the structure-related effects on activities of UPF1 we prepared a series of UPF peptides (Table I). Different amino acids were added to a GSH molecule via a peptide bond, resulting in tetrapeptides. Mainly, the additional unit was added to the N-terminus, but positioning in the C-terminus was also investigated (UPF2). Part of the library was synthesized so that α -glutamate was used instead

of γ -glutamate (UPF17–UPF25). In the case of several peptides, all L-amino acids (UPF10 and UPF14) or only the first N-terminal L-amino acid were substituted with their D-analogues (UPF5, UPF6, UPF18, UPF19 and UPF27) to both control stereoisomeric impact on antioxidative properties and to improve their resistance towards endogenous peptidases. The amidation of the C-terminus (UPF8, UPF10, UPF25 and UPF27) was used with the same purpose. UPF26 was the only peptide where cysteine was replaced with serine to observe the influence caused by the removal of the sulphhydryl group.

The ability of GSH and UPFs to scavenge hydroxyl radicals suggests that UPFs are electron donors, which can react with free radicals to convert them to more stable products and terminate a radical chain reaction. Radical scavenging assays revealed very interesting results—the addition of different moieties to the N- or C-terminus of GSH, the exchange of L-amino acids to D-forms, the amidation of peptides or even the change of Cys to Ser did not influence drastically hydroxyl radical scavenging properties of peptides compared to UPF1. All these analogues had EC_{50} values between 17 and 35 μ M whereas the change of γ -glutamate to the α -glutamate drastically decreased EC_{50} by approximately 100 times. Such a remarkable elevation of antioxidant activity can be explained by the participation of the more available carboxylic acid group in the active state complex, between the peptide and the radical. When comparing EC_{50} values of hydroxyl radical elimination measured by THA method, UPF peptides with α -glutamate in their backbone exceeded even the respective property of an exhaustively tested antioxidant melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine; EC_{50} 11.4 $\pm$ 1 μ M) [38].

We also tested the ability of GSH and UPF peptides to scavenge DPPH radicals. We determined the scavenging activity of UPF1, UPF6, UPF8, UPF17, UPF19 and UPF25 in cell free systems using DPPH $\cdot$ and compared their activity with that of GSH. Based on the T_{EC50} Sanchez-Moreno et al. classified the kinetic behaviour of the antioxidant compound as follows: < 5 min (rapid), 5–30 min (intermediate), and > 30 min (slow) [34]. According to this classification UPF17 was rapid; UPF1, UPF6, UPF8, UPF19 and UPF25 were intermediate; and GSH was a slow antioxidant. The comparison of times required for half reaction, T_{EC50} , of the tested compounds showed that T_{EC50} for UPF1 was 4-fold and for UPF6 2-fold shorter than that required for GSH. T_{EC50} for UPF17 and UPF19 were 2.5-fold shorter than UPF1 and UPF6, respectively. The DPPH radical was scavenged by GSH and UPF peptides through donation of hydrogen to form the stable DPPH-H. The results showed that the methoxy group makes the compounds more likely to react with free radicals [37].

As expected only reduced forms of GSH and UPF peptides can react with other compounds/radicals. Previously we have studied the stability of UPF peptides by capillary electrophoresis [39,40]. All active analogues showed slow dimerization kinetics in water and saline solution. We found that dimerization is slow (days) process, but occurs faster in presence of salt.

We also studied the toxicity of designed peptides. UPF peptides did not show any influence on the viability of K562 cells even at 200 μ M concentration. Also they practically did not disturb the plasma membrane structure of the cells. For disturbance of membranes, our designed peptides are too short, but again, slightly more effect had the peptides which included α -peptide bond in the structure. At the same time, addition of more hydrophobic moiety into the sequence did not influence the membrane perturbation. The non-toxic influence of UPF peptides is also confirmed with the results of previous work: UPF1 was not toxic to nervous tissue up to 100 μ M concentration [27].

The action mechanism of UPF peptides still need to be clarified. In addition to the proven qualities like the free radical scavenging effect as well as the modulation of the G proteins in frontocortical membrane, their ability to increase the intracellular GSH level and normalize the GSH/GSSG ratio will be investigated in the near future. In conclusion, we have designed and synthesized the library of novel nontoxic antioxidants, which showed very potent antioxidativity when compared with GSH and they have impact both as potent antioxidants and provide promising leads for design of powerful non-peptidic antioxidants for correction of oxidative stress-driven events.

Acknowledgements

This work was supported by grants No.6503 and 6588 from the Estonian Science Foundation, by targeted financing PARBK 0906 from University of Tartu and by research grant from the Swedish Research Council (VR-NT). We thank M. Cronander for the advice on language matters.

References

- [1] Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1019–1026.
- [2] Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, van Zanden J, van Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001;10:141–152.
- [3] Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press Inc. 1999.
- [4] Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999;27:922–935.
- [5] Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003;333:19–39.
- [6] Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC. Glutathione. *ANZ J Surg* 2003;73:517–522.
- [7] Droge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: Implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol* 2002;37:1333–1345.
- [8] Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 2004;58:39–46.
- [9] Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 1999;53:169–180.
- [10] Sastre J, Asensi M, Gasco E, Pallardo FV, Ferrero JA, Furukawa T, Vina J. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: Prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* 1992;263:R992–R995.
- [11] Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 2003;57:145–155.
- [12] Amano J, Suzuki A, Sunamori M. Salutary effect of reduced glutathione on renal function in coronary artery bypass operation. *J Am Coll Surg* 1994;179:714–720.
- [13] Olney JW, Zorumski C, Price MT, Labruyere J. L-Cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin. *Science* 1990;248:596–599.
- [14] Bernard GR. N-Acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Med* 1991;91:54S–59S.
- [15] Ortolani O, Conti A, De Gaudio AR, Moraldi E, Cantini Q, Novelli G. The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1907–1911.
- [16] Lucente G, Luisi G, Pinnen F. Design and synthesis of glutathione analogues. *Farmaco* 1998;53:721–735.
- [17] Yamamoto M, Sakamoto N, Iwai A, Yatsugi S, Hidaka K, Noguchi K, Yuasa T. Protective actions of YM737, a new glutathione analog, against cerebral ischemia in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993;81:221–232.
- [18] Gaullier JM, Lafontant P, Valla A, Bazin M, Giraud M, Santus R. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities towards glutathione-derived antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:1668–1674.
- [19] Paradisi MP, Mollica A, Cacciatore I, Di Stefano A, Pinnen F, Caccuri AM, Ricci G, Dupre S, Spirito A, Lucente G. Proline–glutamate chimeras in isopeptides. Synthesis and biological evaluation of conformationally restricted glutathione analogues. *Bioorg Med Chem* 2003;11:1677–1683.
- [20] Richardson G, Benjamin N. Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols. *Clin Sci (Lond)* 2002;102:99–105.
- [21] Wu Z, Minhas GS, Wen D, Jiang H, Chen K, Zimniak P, Zheng J. Design, synthesis, and structure–activity relationships of haloenol lactones: Site-directed and isozyme-selective glutathione S-transferase inhibitors. *J Med Chem* 2004;47:3282–3294.
- [22] Kunze T, Heps S. Phosphono analogs of glutathione: Inhibition of glutathione transferases, metabolic stability, and uptake by cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2000;59:973–981.
- [23] Burg D, Filippov DV, Hermanns R, van der Marel GA, van Boom JH, Mulder GJ. Peptidomimetic glutathione analogues as novel gammaGT stable GST inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2002;10:195–205.
- [24] Rosen LS, Brown J, Laxa B, Boulous L, Reiswig L, Henner WD, Lum RT, Schow SR, Maack CA, Keck JG, Mascavage JC, Dombroski JA, Gomez RF, Brown GL. Phase I study of TLK286 (glutathione S-transferase P1-1 activated glutathione

- analogue) in advanced refractory solid malignancies. Clin Cancer Res 2003;9:1628–1638.
- [25] Lo TW, Thornalley PJ. Inhibition of proliferation of human leukaemia 60 cells by diethyl esters of glyoxalase inhibitors *in vitro*. Biochem Pharmacol 1992;44:2357–2363.
- [26] Sheh L, Chen BL, Chen CF. Synthesis of cyclic peptide homologs of glutathione as potential antitumor agents. Int J Pept Protein Res 1990;35:55–62.
- [27] Põder P, Zilmer M, Starkopf J, Kals J, Talonpoika A, Pulges A, Langel Ü, Kullisaar T, Viiriald S, Mahlapuu R, Zarkovski A, Arend A, Soomets U. An antioxidant tetrapeptide UPF1 in rats has a neuroprotective effect in transient global brain ischemia. Neurosci Lett 2004;370:45–50.
- [28] Karelson E, Mahlapuu R, Zilmer M, Soomets U, Bogdanovic N, Langel Ü. Possible signaling by glutathione and its novel analogue through potent stimulation of frontocortical G proteins in normal aging and in Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci 2002;973:537–540.
- [29] Kals J, Starkopf J, Zilmer M, Pruler T, Pulges K, Hallaste M, Kals M, Pulges A, Soomets U. Antioxidant UPF1 attenuates myocardial stunning in isolated rat hearts. Int J Cardiol 2007; in press.
- [30] Land T, Langel Ü, Low M, Berthold M, Uuden A, Bartfai T. Linear and cyclic N-terminal galanin fragments and analogs as ligands at the hypothalamic galanin receptor. Int J Pept Protein Res 1991;38:267–272.
- [31] Langel Ü, Land T, Bartfai T. Design of chimeric peptide ligands to galanin receptors and substance P receptors. Int J Pept Protein Res 1992;39:516–522.
- [32] Soomets U, Zilmer M, Langel Ü. Manual solid-phase synthesis of glutathione analogues: A laboratory-based short course. In: Howl J, editor. Peptide synthesis and applications. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 2006. p 241–257.
- [33] Barreto JC, Smith GS, Strobel NH, McQuillin PA, Miller TA. Terephthalic acid: A dosimeter for the detection of hydroxyl radicals *in vitro*. Life Sci 1995;56:PL89–96.
- [34] Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J Sci Food Agric 1998;76:270–276.
- [35] Jimenez-Escrig A, Jimenez-Jimenez I, Sanchez-Moreno C, Saura-Calixto F. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. J Sci Food Agric 2000;80:1686–1690.
- [36] Saar K, Langel Ü. Toxicity methods in cell-penetrating peptides Handbook of cell penetrating peptides. CRC Press; 2006. p 553–565.
- [37] Gozzo A, Lesieur D, Duriez P, Fruchart JC, Teissier E. Structure–activity relationships in a series of melatonin analogues with the low-density lipoprotein oxidation model. Free Radic Biol Med 1999;26:1538–1543.
- [38] Pähkla R, Zilmer M, Kullisaar T, Rägo L. Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline *in vitro*. J Pineal Res 1998;24:96–101.
- [39] Mahlapuu R, Vaheer M, Ehrlich K, Kaljurand M, Soomets U. Comparison of the stability of glutathione and related synthetic tetrapeptides by HPLC and capillary electrophoresis. J Pept Sci 2006;12:796–799.
- [40] Vaheer M, Viiriald S, Ehrlich K, Mahlapuu R, Jarvet J, Soomets U, Kaljurand M. Characterization of the antioxidative activity of novel nontoxic neuropeptides by using capillary electrophoresis. Electrophoresis 2006;27:2582–2589.