

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
KEEMIA INSTITUUT

Janely Sojone

**Rakku siseneva peptiidi PepFect14 rasvhappejäägita analoogide süntees ja  
testimine *in vitro***

Bakalaureusetöö, keemia (12 EAP)

Juhendajad: Ly Pärnaste, *PhD*

Kadri Künnapuu, *MSc*

TARTU 2017

## **Infoleht**

### **Rakku siseneva peptiidi PepFect14 rasvhappejäägita analoogide süntees ja testimine *in vitro***

Lõputöös disainiti PF14 alusel sarnase kalkuleeritud hüdrofoobsusega (log P väärtusega) peptiidid (L)<sub>10</sub>-PF14 ja (W)<sub>6</sub>-PF14, mis sisaldasid stearoüülrühma asemel hüdrofoobseid aminohappeid. Sünteesiti PF14 analoogid (L)<sub>10</sub>-PF14 ja (W)<sub>6</sub>-PF14 ning kontrollpeptiidid staPF14 ja PF14 Fmoc tahke faasi peptiidsünteesi meetodil. Hinnati mittekovalentse kompleksimoodustamise efektiivsust ja stabiilsust aluseks võetud peptiidiga PF14. Võrreldi ka rakku transporditud plasmiidilt saadud bioloogilist aktiivsust (reportergeeni ekspressiooni) erinevatel kompleksimoodustamise laengu suhetel.

Märksõnad: rakku sisenev peptiid, tahke faasi peptiidsüntees, PepFect14, log P, bioloogiline aktiivsus

CERCS kood: T490 biotehnoloogia

### **Synthesis of cell-penetrating peptide PepFect14 analogues without fatty acid residue and testing them *in vitro***

In this study, two new PepFect14 (PF14) analogues (W)<sub>6</sub>-PF14 and (L)<sub>10</sub>-PF14 were designed. Those analogues have almost the same calculated hydrophobicity values (log P) with the PF14. Two analogues (W)<sub>6</sub>-PF14, (L)<sub>10</sub>-PF14, the control peptides stearylated PF14, non-stearylated PF14 were synthesised using the solid-phase peptide synthesis strategy. It was determined whether CPPs form nanoparticles with pDNA using different N/P ratios for the formation of nanoparticles. In addition, expression of genes from the pDNA in cells was examined.

Keywords: cell-penetrating peptide, solid-phase peptide synthesis, PepFect14, log P, biological activity

CERCS code: T490 biotechnology

# Sisukord

Infoleht .....	2
Kasutatud lühendid.....	5
1. Sissejuhatus .....	7
2. Kirjanduse ülevaade .....	8
2.1 Rakku sisenevad peptiidid .....	8
2.1.1 PepFectid ja tema analoogid .....	10
2.2 Tahke faasi peptidisüntees (TFPS).....	10
2.2.1 Tahked kandjad .....	11
2.2.2 Aminohapete kaitserühmad: Fmoc ning t-Boc strateegia .....	12
2.2.3 Aminohappe aktivatsioon ja peptiidi pikenemine.....	13
2.2.4 Peptiidi lõikamine tahkelt kandjalt ning kõrvalkaitserühmade eemaldamine .....	15
2.3 Peptiidide puhastamine ning detekteerimine .....	15
2.3.1 Peptiidide puhastamine pöördfaas kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga.....	15
2.3.2 Massispektromeetria põhimõtted .....	16
2.4 Nukleiinhapetel põhinevad terapeutilised molekulid ja nende transport rakku .....	16
2.4.1 Terapeutiliselt kasutatavad nukleiinhapped .....	16
2.4.2 RSP/last sidumise strateegiad .....	17
2.4.3 Nanokomplekside rakku sisenemine.....	17
3. Eksperimentaalne osa .....	19
3.1 Töö eesmärgid .....	19
3.2 Reagendid ja aparatuur .....	20
3.3 Peptiidi süntees tahkel kandjal .....	20
3.4 Peptiidi eemaldamine tahkelt kandjalt.....	22
3.5 Peptiidi puhastamine ja massispektromeetria.....	22
3.6 Komplekside moodustamine peptiidi ja nukleiinhappemolekulide vahel .....	23
3.7 Komplekside moodustumise kontroll .....	23
3.7.1 Agaroosgeelelektroforees.....	23

3.7.2 Komplekside disintegratsiooni analüüs .....	24
3.8 In vitro rakkude kasvatus ja katsed rakkudel.....	24
4. Tulemused ja arutelu .....	26
4.1 Peptiidi logP kalkulatsiooni alusel on sarnase hüdrofoobsuse saavutamiseks vajalik lisada kümme leutsiini või kuus trüptofaani .....	26
4.2 Järjestikune hüdrofoobsete aminohapete lisamine vähendab oluliselt peptiidi saagist ..	27
4.3 Stearoüülrühmata analoogid ei suuda moodustada RSP/pDNA partikleid .....	27
4.4 Stearoüülita analoogid suudavad viia plasmidi rakku ning võimaldavad reportergeeni ekspressiooni .....	30
5. Kokkuvõte .....	32
6. Summary .....	34
7. Kasutatud kirjandus.....	35
Tänuõnad .....	40
8. LISAD .....	41
LISA 1 .....	42
LISA 2 .....	43
LISA 3 .....	45

## Kasutatud lühendid

Bzl	bensüülrühm
CHCA	$\alpha$ -tsüano-4-hüdrosükaneelhape
CHO	hiina hamstri munasarjarakud ( <i>chinese hamster ovary cells</i> )
DBU	1,8-diasabitsüklo(5,4,0)undek-7-een
DCC	ditsükloheksüülkarbodiimid
DIEA	diisopropüületüülamiin
DMF	N,N-dimetüülformamiid
EtBr	etiidiumbromiid, nukleiinhappespetsiifiline fluorestseeruv ühend
FBS	veise loote seerum ( <i>fetal bovine serum</i> )
Fmoc	9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüülrühm
HBTU	N-[1H-bensotriasool-1-üül](dimetüülamino)metüleen]-N-metüülmetaanamiinium heksaflorofosfaat N-oksiid
HOBt	1-hüdrosübensotriasool
K	töötlemata kontrollrakud
Leu, L	aminohape leutsiin
MALDI-TOF	maatriks-assisteeritud laserdesorptsioonionisatsioon-lennuaja massispektroskoopia ( <i>matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry</i> )
MBHA	tahke kandja, 4-metüülbenshüdrüülamiin
Mtt	aminohappele lisatav kaitserühm, 4-metüültritüül
N/P	N/P laengu suhe, peptiidi positiivsete lämmastike suhe nukleiinhappe negatiivsetesse fosforühma laengutesse
pDNA	plasmiidne DNA ( <i>plasmid DNA</i> )
PF14	PepFect14, rakku sisenev peptiid

PyBOP	bensotriasool-1-üül-oksü-tris-pürrolidino-fosfoonium heksafluorofosfaat
RP-HPLC	pöördfaas kõrgefektiivne vedelikkromatograafia ( <i>reversed-phase high performance liquid chromatography</i> )
RSP	Rakku sisenev peptiid ( <i>cell-penetrating peptide, CPP</i> )
SLU	suhteline luminesentsiühik
staPF14	stearoüülrühmata rakku siseneva peptiidi PepFect14 analoog, millel on sama peptiidne osa
t-Boc	tert-butüüloksükarbonüülrühm
tBu	tert-butüülrühm, aminohappe kaitserühm
TFA	trifluoroäädikhape
TFPS	tahkel faasil peptiidisüntees, ( <i>solid-phase peptide synthesis, SPPS</i> )
TIS	triisopropüülsilaan
TP10	Transportaani analoog 10, rakku sisenev peptiid
Trp, W	aminohape trüptofaan

# 1. Sissejuhatus

Tänapäeval kasutatavate terapeutiliste ja biotehnoloogiliselt rakendatavate molekulide hulk on piiratud. Näiteks ka enamik turule tulevatest uutest ravimitest on tegelikult juba olemasolevate modifitseeritud variandid. Täiesti uute molekulide rakendamist raskendavad nende füüsikaliskemilised omadused, mis limiteerivad jõudmist rakusisestesse sihtmärkidesse. Üheks suurimaks barjääriks on neile raku fosfolipiidne kaksikkiht, mida tavaliselt suured ja laenguga biomolekulid, näiteks valgud ja nukleiinhapped ei läbi. Selleks, et praegu väherakendatud, kuid suure potentsiaaliga molekule saaks kasutada, oleks vajalik efektiivne ning ohutu transpordimeetod.

Terapeutiliste molekulide viimiseks rakku ja rakusisestesse sihtmärkideni on praegu välja töötatud ning edasi arendamisel erinevad transportmeetodid, mille alla kuuluvad ka transportvektorid. Transportvektorid soodustavad molekulide jõudmist rakku ning rakusiseste sihtmärkideni, ilma nende bioloogilist efektiivsust oluliselt vähendamata.

Üheks perspektiivikaks transporteriks on rakku sisenevad peptiidid, mis suudavad rakumembraani kahjustamata viia rakku erinevaid laste, näiteks RNA ja DNA molekule. Selleks seotakse peptiid lastmolekuliga kovalentse või mitte-kovalentse kompleksi moodustamise teel ning saadakse nanosuurusel osakesed. Praeguseks on disainitud pea kaks tuhat erinevat peptiidest transportvektorit. Nende ning uute peptiidide kohandamine võimaldab suurendada nende efektiivsust ja spetsiifilisust. Selleks, et osata rakku sisenevaid peptiide ratsionaalselt disainida, on vajalik uurida, millist mõju avaldab peptiidi omadustele kindla modifikatsiooni lisamine järjestusse.

Antud töö peaesmärgiks oli sünteesida tahke faasi peptiidisünteesi meetodil rakku siseneva peptiidi PepFect14 rasvhappejäägita analoogid (W)<sub>6</sub>-PF14 ja (L)<sub>10</sub>-PF14, millel on sama kalkuleeritud hüdrofoobsus kui nende disainil aluseks võetud stearüülühmaga peptiidil. Lisaks võrreldi antud analoogide võimet mitte-kovalentselt kondenseerida plasmiidset DNA-d kompleksideks ning transpordijärgset ekspressiooni reporter-geeniga plasmiidilt.

Antud uurimistöö jaoks läbi viidud katsed teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laborites.

## 2. Kirjanduse ülevaade

Kirjanduse ülevaade on jagatud neljaks suuremaks osaks. Esimeses osas tutvustatakse rakku sisenevaid peptiide (RSP), nende omadusi ning lühidalt ka ajalugu. Lisaks tutvustatakse PepFectide perekonda kuuluvaid RSP-sid ja antud töös uute analoogide disainil aluseks võetud PepFect14-t (PF14). RSP-de modifitseerimise teeb lihtsaks see, et neid on võimalik edukalt sünteesida tahke faasi peptiidisünteesi meetodil. Teine osa tutvustab tahke faasi peptiidisünteesi ja sellega seotud erinevaid aspekte. Kirjanduse ülevaate kolmas osa tutvustab lühidalt sünteesijärgset produkti puhastamist ning detekteerimist. Neljandas osas kirjeldatakse ühte võimalikku rakku siseneva peptiidi lastmolekulide gruppi, milleks on nukleiinhapped ja tutvustatakse RSP-i ja lastmolekuli komplekside moodustamise strateegiaid ning rakku sisenemist.

### 2.1 Rakku sisenevad peptiidid

Aminohapped koosnevad kesksest süsinikuaatomist, mille küljes on aminorühm, karboksüülrühm, vesinikuaatom ning aminohappeid teineteisest eristav kõrvalrühm. Aminohapete liitumisel peptiidideme abil tekib peptiid, mille koostisse lülitudes muutuvad aminohapped aminohappejääkideks. Oligopeptiid (ka lihtsalt peptiid) on lineaarne ahel, mis koosneb vähestest aminohappejääkidest, polüpeptiid koosneb paljudest aminohappejääkidest ning enamik looduslikke polüpeptiide koosneb 50...2000 aminohappejäägist. Ühest või enamast polüpeptiidist koosnevat makromolekuli nimetatakse valgukuks. Suurimaks valgukuks inimkehas on südamelihases esinev titiin, mis sisaldab 27 000 aminohappejääki (Tymoczko *et al.* 2016). Enamus valke ning peptiide ei ole võimelised iseseisvalt läbima rakumembraane.

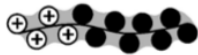
Aastal 1988 avastati Frankeli ja Pabo uurimisgrupi poolt, et polükatioonne proteiin, HIV-i transkriptsiooni transaktiveeriv valk Tat, läbib efektiivselt rakumembraani (Frankel *et al.* 1988). 1991. aastal näitas Prochiantzi uurimisgrupp, et 60- aminohappe pikkune *Drosophila* Antennapedia homeodomään on võimeline sisenema närvirakku (Joliot *et al.* 1991). See pani aluse 1994. aasta avastusele, kus leiti, et Antennapedia kolmanda heeliksi homeodomäänist saadud peptiid on suuteline rakumembraani läbima. Antud peptiidi järjestust hakati kutsuma Penetratiiniks (RQIKIYFQNRMKWKK) (Derossi *et al.* 1994). Lebleu uurimisgrupp identifitseeris minimaalse vajaliku TAT-i järjestuse membraani läbimiseks (Vives *et al.* 1997). 1997. aastal loodi strateegia oligonukleotiidi transportimiseks rakku, kus kasutati väikest peptiidi (MPG-g) vektorina, mis sisaldas nii hüdrofoobset N-terminuse kui ka hüdrofiilset C-

terminuse domeeni (Morris *et al.* 1997). Suure läbimurde RSP-de alal tegi Dowdy uurimisgrupp, kus transporditi väikeseid peptiide ja suuri valgumolekule HIV-1 Tat valgust pärit järjestuse abil hiire kõikidesse kudedesse, sealjuures ka aju (in vivo). Transporditavaks valguks oli  $\beta$ -galaktosidaasi valk, mis säilitas bioloogilise aktiivsuse ka RSP-ga komplekseeritult (Schwarze *et al.* 1999). Vastavalt RSP andmebaasile, mille andmed on kogutud teadustööde ning avaldatud patentide järgi, on tänaseks avastatud üle 1850 erineva peptiidi, millel on rakku siseneva peptiidi omadused (Agrawal *et al.* 2016).

Rakku sisenevad peptiidid (RSP-d) on suhteliselt lühikese järjestusega peptiidid, mis koosnevad kuni 40 aminohappejäägist (Copolovici *et al.* 2014). RSP-id erinevad üksteisest pikkuse ning aminohappelise järjestuse poolest, seetõttu on neil erinevad füüsikalised-keemilised omadused. Enamik RSP-dest sisaldavad katioonseid aminohappeid ning on ka seetõttu positiivse üldlaenguga laetud füsioloogilise pH juures (Zorko *et al.* 2005). RSP-d kasutavad sisenemiseks kas otsest translokatsiooni läbi rakumembraani või sisenevad endotsütoosi abil. Seotult lastmolekulidega toimub sisenemine peamiselt kasutades erinevaid endotsütoosi radasid. Rakku sisenevaid peptiide saab kasutada nii kovalentselt lastmolekuliga seotult kui ka mittekovalentselt komplekseeritud nanosuurusel osakestena (Copolovici *et al.* 2014).

Rakku sisenevate peptiidide valdkond on sellest alates kiirelt arenenud, disainitud on järjest uusi peptiide, mida kasutatakse transportvektoritena erinevate molekulide rakku viimiseks. Järjest suurenev RSP-de arv muudab nende liigitamise keeruliseks, kuid klassifitseerimisel eelistatakse peamiselt kahte lähenemist. Päritolu alusel jagatakse nad järgmiselt: looduslikult valkudes esinevatest järjestustest tuletatud peptiidid (näiteks TAT peptiid), kimäärsed (näiteks transportaan) ning sünteetilised (näiteks oligoarginiin, MAP) peptiidid (Langel 2015). Teine liigitus, mis on välja toodud joonisel 1, põhineb RSP füüsikalised-keemilistel omadustel. Selle alusel jaotatakse RSP-d kolme kategooriasse: primaarsed amfipaatsed, sekundaarsed amfipaatsed ning mitteamfipaatsed RSP-d. Mitteamfipaatsed peptiidid on enamasti kõige lühemad ja koosnevad peaaegu kogus ulatuses katioonsetest aminohappejääkidest, näiteks polüarginiin R9. Mitteamfipaatsed peptiide iseloomustab ka see, et nad ei seostu lipiidmembraaniga (Ziegler 2008). Amfipaatsed RSP-id sisaldavad nii hüdrofiilseid kui ka hüdrofoobseid osi (Ziegler 2008), ning vastavalt nende paigutusele eristatakse primaarse- ja sekundaarse amfipaatsusega RSP-sid. Primaarsetes amfipaatses RSP-ides on katioonsed ning hüdrofoobsed aminohapped järjestatud nii, et on näha selget eristatavust peptiidi struktuuri hüdrofiilsete ning hüdrofoobsete osade vahel primaarstruktuuris. Positiivse laenguga hüdrofiilne osa soodustab peptiidi vees lahustumist ning interakteerub membraanis negatiivselt

laetud rühmadega. Hüdrofoobne osa interakteerub lipiididega (Deshayes *et al.* 2004). Üheks näiteks primaarsest amfipaatses RSP-st on Transportaan (Ziegler 2008). Sekundaarsetel amfipaatsel RSP-idel ei ole eristatavaid hüdrofiilseid ning hüdrofoobseid segmente. Peptiidi amfipaatsed omadused avalduvad pärast lipiidiga seostumist läbi peptiidi sekundaarstruktuuri muutuste. Kõige enam tuntud ning põhjalikult uuritud sekundaarne amfipaatne RSP on Penetratiin (Ziegler 2008).



Primaarne amfipaatne RSP    Sekundaarne amfipaatne RSP    Mitteamfipaatne RSP

- – hüdrofoobne aminohape peptiidis; (+) – katioonne aminohape peptiidis

**Joonis 1.** Rakku sisenevate peptiidide liigitus. Primaarne amfipaatne RSP, sekundaarne amfipaatne RSP, mitteamfipaatne RSP (Ziegler 2008).

### 2.1.1 PepFectid ja tema analoogid

Transportaan on 27-st aminohappes koosnev peptiid, mille N-terminaalse osa 12 aminohapet pärinevad neuropeptiid galaniini järjestusest ning C-terminaalne osa on 13 aminohappelise vapsiku mürgi mastoparaanijärjestus. Need kaks on ühendatud omavahel läbi lüsiini (Pooga *et al.* 1998). Selleks, et suurendada peptiidi RSP omadusi ning vähendada kõrvalmõjusid, lühendati Transportaani järjestust N-terminaalse galaniini osast 6 aminohappe võrra. Saadud peptiidi nimetatakse Transportaan 10-ks (Soomets *et al.* 2000) ning seda N-terminaalselt stearoüülrühmaga modifitseerituna stearoüül-TP10-ks ehk PepFect3-ks (Mäe *et al.* 2009). PepFect14 on PepFect3 analoog, mis sisaldab samuti stearoüülrühma, sama N-terminaalset osa, kuid PepFect14-l asendati C-terminaalses osas lüsiinid ja isoleutsiinid ornitiinide ning leutsiinidega. PepFect14 osutus efektiivseks transportvektoriks mitte-kovalentselt komplekseeritud splaissingut korrigeerivatele oligonukleotiididele (Ezzat *et al.* 2011) ja plasmiididele (Veiman *et al.* 2013).

## 2.2 Tahke faasi peptiidsüntees (TFPS)

Levinuim meetod peptiidide sünteesimiseks on Bruce Merrifield (Merrifield 1969) loodud peptiidsüntees tahkel faasil (TFPS). Võrreldes vedelas faasis sünteesiga ei vaja tahke faasi süntees iga etapi järel produkti väljapuhastamist. Tahke kandja võimaldab kasutada sünteesil

reagente ülehulgas ning kõik sünteesi etapid läbi viia samas reaktsiooninõus, kasutada aineid ülehulgas ning vahepeal regente ning kõrvalprodukte välja pesta (Chan *et al* 2000).

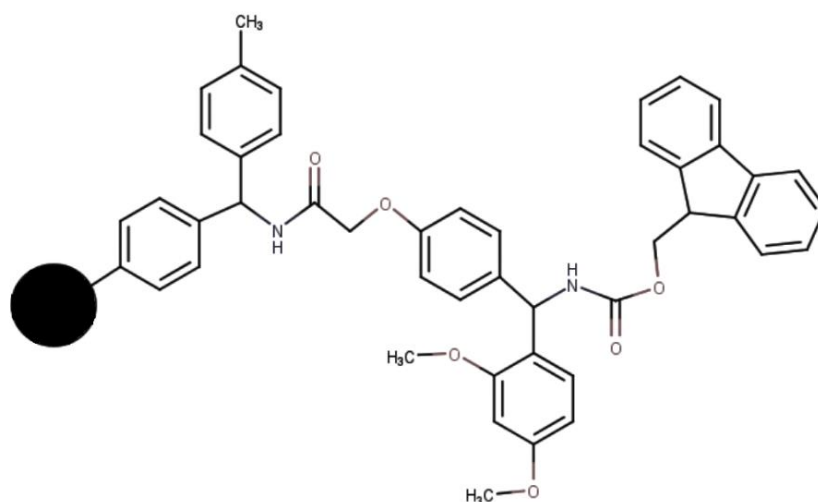
See meetod on üles ehitatud järgnevatele etappidele:

- 1) esimese C-terminaalse aminohappe sidumine tahkele kandjale;
- 2) viimasena lisatud aminohappelt ajutise kaitserühma eemaldamine;
- 3) lisatava aminohappe aktivatsioon ja peptiidsideme moodustumine lisatava aminohappe ja tahkel kandjal oleva viimase kaitserühmata aminohappe vahele;
- 4) viimase etapina peptiidi aminohappejääkidelt kõrval-kaitserühmade eemaldamine ja peptiidi lõikamine tahkelt kandjalt (Howl 2005).

### **2.2.1 Tahked kandjad**

Tahke kandja on lahustumatu polümeer, millel toimub süntees. Tahke kandja ei tohi lahustuda üheski sünteesil kasutatavas solvendis, peab olema keemiliselt ja füüsikaliselt vastupidav ja stabiilne. TFPS esimeseks sammuks on aminohappe sidumine C-terminaalse otsa kaudu läbi vahelüli tahkele kandjale. Vahelüli kaitseb peptiidi C-terminaalset C<sup>α</sup> karboksüülrühma. Selleks on vajalik tahke kandja vahelülide kättesaadavuse suurendamine ehk tahke kandja „pundumine“. Vahelülide arv kandjal on oluline parameeter ning näiteks keerukamate sünteeside korral vähendatakse aktiivsete vahelülide (*loading*) hulka nn alla-laadimisega (*down-loading*). Üheks mooduseks vähendada teoreetiliste peptiidide arvu ühel kandjal on lisada kindel hulk esimest aminohapet ning deaktiveerida reageerimata amiinid kandjal. Sellisel juhul saab järgmises etapis reageerida ainult see osa, millele on esimene aminohape kinnitunud. Vahelüli määrab C-terminuse funktsionaalrühma peptiidis. Olenevalt kandjast on võimalik tekitada erineva C-terminaalse osaga peptiide, näiteks C-terminaalselt amideeritud või atsetüleeritud peptiid. Peptiidsünteesis kasutatakse tihti tahke kandjana rink-amiid MBHA vaiku (näide joonisel 2). Sellega jääb pärast peptiidi lõikamist tahkelt kandjalt C-terminaalsesse otsa vaba amiidrühm (Howl 2005).

Tänapäeval tuntakse peamiselt kolme klassi tahkeid kandjaid: polüstüreenkandja, polüetüleenglükooliga (PEG) funktsioneeritud polüstüreenkandja ja PEG-l baseeruv kandja (Howl 2005).



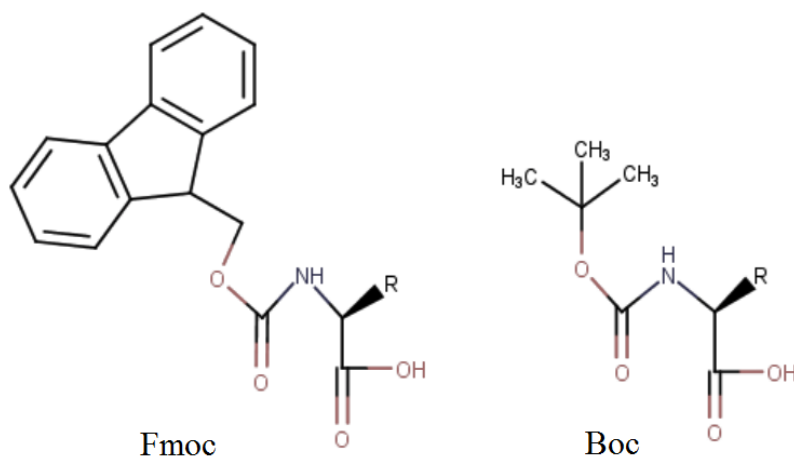
**Joonis 2.** Peptiidisünteesis sageli tahke kandjana kasutusel olev rink-amiid MBHA (kaitstud Fmoc kaitserühmaga). ● – tahke kandja osa, millele kinnitub funktsionaalne vahelüli

### 2.2.2 Aminohapete kaitserühmad: Fmoc ning t-Boc strateegia

Tahke faasi peptiidisünteesi saab ajutiste kaitserühmade alusel jaotada kaheks. Fmoc ja Boc tähistavad  $N^\alpha$ -kaitserühma (joonis 3). Kõrvalahelate kaitserühmadena kasutatakse näiteks tBu, Bzl, Boc, Mtt $^\alpha$  kaitserühmasid. Tänu sellele, et TFPS-l lisatakse aminohapped ükshaaval tahkel kandjal peptiidile ning iga aminohappe lisamisel on korduvad etapid, saab sellist peptiidisünteesi meetodit edukalt ka automatiseerida (Howl 2005).

Fmoc meetod põhineb ortogonaalsel kaitserühmade kasutamisel. Aminohappe  $N^\alpha$  kaitstakse alus-labiilse N-Fmoc kaitserühmaga, kõrvalrühmad kaitstakse happelabiilsete kaitserühmaga ja peptiidi eemaldamine tahkelt kandjalt toimub samuti happelises keskkonnas. Näiteks Fmoc peptiidi süneesis on võimalik ajutiste kaitserühmade eemaldamine läbi viia aluselises keskkonnas 20% piperidiiniga või 1-5% DBU-ga DMF-is. Vaigult peptiidi lõikamine ning püsivate kaitserühmade eemaldamine viiakse läbi aga 95% TFA lahuses (Chan *et al.* 2000).

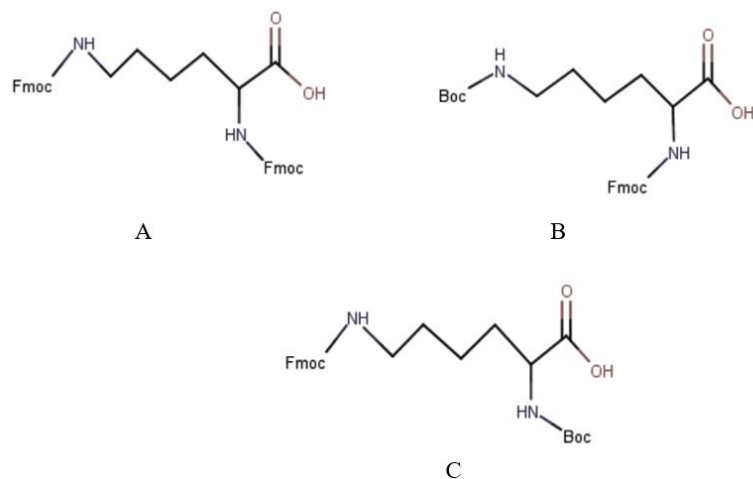
Algne Merrifield'i tahke faasi peptiidisüntees põhines tBoc ajutise kaitserühma meetodil. tBoc meetod põhineb happelabiilsete kõrvalahelate kaitserühmadel. TFA abil eemaldatakse kaitserühm t-Boc. Peptiidi eemaldamiseks vaigu küljest ning kõrvalahelate kaitserühmade eemaldamiseks kasutatakse veevaba vesinikfluoriidhapet. Selle meetodi saagikus on küll kõrge, kuid HF toksilisuse ning korrosiivse toime tõttu kasutatakse seda meetodit tänapäeval harva ja pigem keerukamate sünteeside korral (Mäde *et al.* 2014).



**Joonis 3.** Tahke faasi peptiidisünteesil kahes strateegias kasutatavad aminohappe kaitserühmad aluslabiilne Fmoc ja happelabiilne Boc.

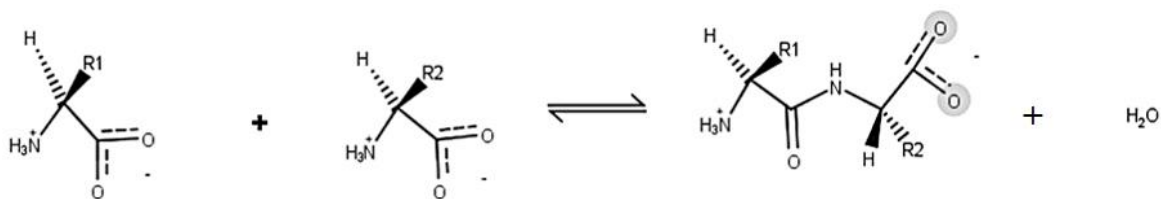
### 2.2.3 Aminohappe aktivatsioon ja peptiidi pikenemine

Peptiidi sünteesitakse C-terminusest N-terminuse suunas, vastupidiselt biosünteesile rakkudes. Seotava aminohappe N<sup>α</sup> rühm ning funktsionaalsed kõrvalrühmad on enamasti kaitstud erinevate kaitserühmade abil. Viimasena lisatud aminohappelt eemaldatakse aminorühma kaitserühm. Lisaks N<sup>α</sup> ja C<sup>α</sup> kasutamisele peptiidi sünteesiks võimaldab tahkel kandjal süntees sobivate kaitserühmade kasutamisel jätkata sünteesi ka kõrvalahela aminorühmalt (lüsiinilt, arginiinilt, ornitiinilt) (joonis 4). Lisaks sellele on võimalik tekitada ka hargnevaid peptiide, kui kahe aminorühmaga aminohappel kasutada mõlemal sama kaitserühma ning eemaldada nad samadel tingimustel (Chan *et al* 2000).



**Joonis 4.** Võimalikud kaitserühmade paigutused Fmoc sünteesistrateegias lüsiini näitel. A) Kahe sama kaitserühmaga aminohape lüsiin, mis võimaldab sünteesi jätkata mõlemalt aminorühmalt. B) Kahe erineva kaitserühmaga aminohape lüsiin, mille puhul saab Fmoc sünteesistrateegiat kasutades jätkata sünteesi  $\alpha$ -aminorühmalt. C) Kahe erineva kaitserühmaga aminohape lüsiin, mille puhul saab Fmoc sünteesistrateegiat kasutades jätkata sünteesi kõrvalahela-aminorühmalt.

Järgnevalt eemaldatakse aminohappelt  $N^\alpha$ -kaitserühm vastavalt valitud strateegiale ja lisatakse uus aminohape, mille  $C^\alpha$  karboksüülrühm on eelnevalt aktiveeritud. Tahkel kandjal oleva peptiidi viimase aminohape N-terminus liitub vaba aminohape C-terminusega, tekitades peptiidsideme (Chan *et al.* 2000).



**Joonis 5.** Peptiidsideme moodustumine. Peptiidsünteesil seostub ühe aminohape  $\alpha$ -karboksüülrühm teise aminohape  $\alpha$ -aminorühmaga ning nende vahel moodustub kovalentne peptiidside ehk amiidside. Kahe aminohape liitumisel eraldub veemolekul.

Põhiliselt kasutatakse Fmoc põhises sünteesis fosfoonium aktivaatoreid, näiteks PyBOP ning uroonium aktivaatoreid, näiteks DMF-s lahustatud HBTU. Lisaks neile kasutatakse aktivaatoritena karboimiide, näiteks DCC. Aktivaatorid muudavad  $N^\alpha$ -kaitstud aminohapped estriteks. Uroonium aktivaatoritele lisatakse tihti triasooli, näiteks HOBt'i, mis toimib reaktsiooni katalüsaatorina ehk aitab kiirendada aktiivestri moodustumist (Montalbetti *et al.*

2005). Aktivaatoriga reageeriva N<sup>α</sup>-kaitstud aminohappe karboksülaadi tekkimiseks kasutatakse tertsiaarset amiini, näiteks diisopropüületüülamiini (DIEA) (Howl 2005).

#### **2.2.4 Peptiidi lõikamine tahkelt kandjalt ning kõrvalkaitserühmade eemaldamine**

Kui on sünteesitud sobiva pikkuse ja järjestusega peptiid, tuleb ka viimaselt aminohappelt eemaldada ajutine kaitserühm ja eemaldada peptiid tahkelt kandjalt. Enamasti valitakse kõrvalahelate kaitserühmad sellised, et ka need eemalduksid peptiidi vaigult lõikamise etapis. Segusse lisatakse tioole või silaane, näiteks triisopropüülsilaani, mis takistab kõrvalkaitserühmade tagasi seondumist peptiidile. Peale peptiidi vaigult eemaldamist ekstraheeritakse peptiid eetri abil eemaldamisega lahusest (*cleavage solution*) (Howl 2005). Tahke faasi peptiidisünteesi üldskeem on välja toodud bakalaureusetöö lisas 1.

### **2.3 Peptiidide puhastamine ning detekteerimine**

#### **2.3.1 Peptiidide puhastamine pöördfaas kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga**

Peptiidi sünteesi korral ei toimu reaktsioonid täielikult. Ka näiteks 99,9%-lise reaktsiooniedukuse korral igas etapis on sünteesil lõpliku õige peptiidi saagis alati väiksem kui 99,9%. Sünteesijärgne peptiidipuhastus on vajalik selleks, et eraldada õigest peptiidist kõrvalprodukte, näiteks eemaldamata kaitserühmadega produktid või lühemad peptiidid. Kõige levinumaks meetodiks vedelikes leiduvate molekulide teineteisest eraldamiseks ja analüüsimiseks on vedelikkromatograafia. Peptiidisünteesi järgselt lahutatav peptiid elueeritakse statsionaarsest faasist orgaaniliste solventidega ning lisaks orgaanilisele solvendile on veel vesi (Aguilar 2004).

Pöördfaas vedelikkromatograafia (RP-HPLC) meetodit kasutatakse laialdaselt molekulide eraldamiseks, näiteks peptiidi puhastamiseks kõrvalproduktidest. RP-HPLC põhineb mobiilse faasi ja statsionaarse faasi hüdrofoobsetel interaktsioonidel. Statsionaarne faas sisaldab kovalentselt seotud mittepolaarsete alküülahelatega silikageeli. Mobiilseks faasiks on polaarsed solvendid, näiteks vee ja atsetonitriili segu. Puhtal veel on väga nõrk elueeriv jõud veemolekulide vahel olevate vesikinsidemete tõttu. Veemolekulid tõukavad uuritava proovi molekulid mittepolaarse sorbendi vahele ning sellega ei lase veemolekulid uuritaval proovil mobiilsesse faasi siseneda. Proovi elueerimiseks kasutatakse atsetonitriili gradienti. Esimesena elueeruvad välja hüdrofiilsemad ühendid. Gradiendi kontsentratsiooni tõstmine vähendab mobiilses faasis vesiniksidemete hulka ning soodustab hüdrofoobsemate ühendite eraldumist

(Aguilar 2004). Kolonnist väljuvate ainete detekteerimiseks kasutatakse põhiliselt UV-VIS detektorit. Uuritavad ained detekteeritakse nähtavas või ultravioletses spektrialas.

### **2.3.2 Massispektromeetria põhimõtted**

MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) massispektromeetria on kiire ja võimas vahend varieeruva suurusega molekulmassi määramiseks. Molekulmassi määramiseks segatakse väike kogus uuritavat ühendit maatriksiga ja pipeteeritakse spetsiaalsele plaadile. Sageli kasutatakse maatriksina  $\alpha$ -tsüano-4-hüdroksükaneel hapet (CHCA). Maatriks eraldab analüüdi molekulid üksteisest ja kaitseb analüüti fragmentatsiooni eest. Maatriks peab olema tugevate absorbeeruvate omadustega kiirgust neelaval lainepikkusel (Pan *et al.* 2006). Proov kuivatatakse ning plaat asetatakse massispektromeetrisse ning uuritav aine ioniseeritakse laserkiirguse abil. Analüüdi molekulid kiirendatakse elektriväljas, lahutatakse lennutorus vastavalt lennuajale ning lennutoru lõpus asetseval detektoril registreeritakse elektriline signaal. Detektorini jõudmise aeg sõltub massi ja laengu suhtest, iga detekteeritud iooni järel saadakse registreering spektris piigina (Croxatto *et al.* 2012).

## **2.4 Nukleiinhapetel põhinevad terapeutilised molekulid ja nende transport rakku**

### **2.4.1 Terapeutiliselt kasutatavad nukleiinhapped**

Nukleiinhapped omavad nii terapeutilist kui ka biotehnoloogilist võimekust. Siiski, kuna nad on negatiivselt laetud, suhteliselt suured ning lagunevad rakuvälises ja –siseses keskkonnas kiirelt, ei ole nad saavutanud oma täielikku rakenduslikku potentsiaali. Lisaks sellele ei ole enamikel rakkudel ka endal looduslikult väljakujunenud nukleiinhappemolekulide rakku sisse transportimise teid (Lehto *et al.* 2016). Nukleiinhapped jagunevad peamiselt DNA ja RNA põhisteks molekulideks, kuid on olemas ka modifitseeritud variante, näiteks peptiid-nukleiinhapped. DNA ja RNA molekulidele on, nagu ka peptiididele, võimalik astmeliselt sünteesida, mis teeb neist väga mitmekülgsed ja suure varieeritavusega molekulid (Paulasova *et al.* 2004). Nukleiinhapetel põhinevaid molekulid saab kasutada nii rakkudes puuduva geeni ekspressiooniks, valessti ekspresseeritud produkti korrigeerimiseks kui ka erinevate geenide vaigistamiseks (Järver *et al.* 2004).

Plasmiidid on suured tsirkulaarsed kaheahelalise DNA molekulid, mis bakterites paiknevad genoomsest DNA-st eraldi. Viies plasmiidi eukarüootse raku tuuma on võimalik sellelt õigesti

valitud promotori korral ekspresseerida produkt. Plasmiide loetakse mitte-toksiliseks geeni vektoriks, mis enamasti ei integreeru peremeesraku genoomi. Baasuuringutes kasutatakse plasmiide kõige enam reportergeeni ekspressiooniks. Reportergeen on geen, millelt ekspresseeritakse produkt, mida on võimalik lihtsalt detekteerida. Enamasti kasutatakse luminescentsil või fluorestsentsil põhinevaid meetodeid (Hardee et al. 2017).

#### **2.4.2 RSP/last sidumise strateegiad**

Rakku siseneva peptiidi ja lastmolekuli sidumiseks on kaks peamist moodust: mittekovalentne ning kovalentne sidumine. Kovalentsel sidumisel seotakse biomolekul rakku siseneva peptiidiga enamasti disulfiid või tioester sidemega. Kovalentse sidumise korral liidetakse enamasti üks lastmolekul ühe RSP-ga. Tekib defineeritud RSP-last kompleks. Kovalentse sidumise eelisteks on see, et kõrvalproduktide väljapuhastamisel on lahuses ainult RSP-last homogeenid molekulid. Lisaks sellele ei ole komplekside moodustamiseks oluline lasti ega RSP laeng, kuigi see võib mõjutada hilisemat lasti bioaktiivsust. Kovalentsel sidumisel on täpselt defineeritud lastimolekulide arv RSP kohta, kuid peamiseks puuduseks on see, et kovalentselt seotud RSP-last molekulide puhul tuleb iga uue lasti sidumiseks läbi viia eraldi süntees. Lisaks sellele võib kovalentne sidumine ebasoodsalt mõjuda nii RSP kui ka lasti efektiivsusele (Heitz *et al.* 2009).

Mittekovalentse kompleksimoodustamise strateegia on võrreldes eelnimetatuga palju mitmekülgsem. Ühe ja sama peptiidiga saame siduda erinevaid lastmolekule ning vajadusel kasutada ka erinevaid RSPsid ja lastmolekule samas kompleksis. Kompleksi moodustumise põhieeldusteks on see, et oleksid optimaalsed elektrostaatilisid ja hüdrofoobsid interaktsioonid lasti ja RSP vahel. Enamasti kasutatakse mittekovalentset strateegiat positiivse üldlaenguga RSP ja negatiivse üldlaenguga nukleiinhapete komplekseerimiseks (Pai *et al.* 2012). Plasmiidi puhul on mittekovalentne komplekseerimine eelistatud, sest plasmiidi rõngasmolekulil puudub vaba ots, kuhu RSP kovalentselt siduda.

#### **2.4.3 Nanokomplekside rakku sisenemine**

Lastmolekuli bioloogiline aktiivsus sõltub väga mitmest etapist. Esiteks on tähtis see, kui hästi suudab RSP moodustada komplekse nukleiinhappelastiga, et teda kaitsta lagundamise eest. Samuti sõltub transfektsiooniefektiivsusest ehk sellest, kui edukalt toimetab vektor nukleiinhappe rakku ja sellest, kui palju nukleiinhappemolekule jõuab rakusisestesse sihtmärkidesse ja vabaneb kandjavektorist.

Peptiidide sisenemismehhanism rakkudesse pole täpselt defineeritud. Rakku sisenevad peptiidid sisenevad rakku põhiliselt endotsütootiliste radade vahendusel või rakuenergiast sõltumata otse läbi membraani (penetratsiooni teel). Makromolekulid, sh rakku sisenevad peptiidid koos lastiga transporditakse rakku erinevate endotsütoosi radade vahendusel, millest peamised on makropinotsütoos, klatriin-sõltuv ja kaveoliin-sõltuv endotsütoos (Kumari *et al.* 2010). Rakku sisenev peptiid on võimeline kasutama mitut erinevat sisenemismehhanismi, mille valikut võivad mõjutada peptiidi pikkus ja konformatsioon, laeng, lastmolekuli suurus (Mueller *et al.* 2008). Endotsütoosi teel moodustub plasmamembraani sissesopistumisel vesiikul, mis liigub edasi tsütosooli. RSP ja lastmolekuli kompleks jääb vesiikuli sisemusse (Doherty *et al.* 2009). Nanokompleksi transpordi piiravaks teguriks on selle kinnijäämine endotsütootilistesse vesiikulitesse, seega tuleb tagada komplekside kiire vabanemine endosoomist tsütoplasmasse (Madani *et al.* 2011).

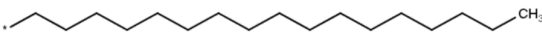
Rakku sisenevad peptiidid võivad rakkudesse siseneda ka otsese penetratsiooni teel, millest tuntuimad mehhanismid on pööratud mitselli mudel, pooride moodustamine, membraani õhenemise mudel. Esimeseks sammuks on positiivse laenguga RSP-i ja negatiivse laenguga membraani komponentide (näiteks fosfolipiidne kaksikkiht) vahelise interaktsiooni teke. Järgmiseks sammuks on rakumembraani läbimine ning vabanemine tsütoplasmasse.

### 3. Eksperimentaalne osa

#### 3.1 Töö eesmärgid

- Disainida RSP PF14-le sarnase kalkuleeritud hüdrofoobsusega peptiidijärjestused, mis sisaldavad stearoüülhappe asemel hüdrofoobseid aminohappeid, võttes aluseks looduses leiduvaid aminohappejärjestuse motiive (10x L) ja varasemalt näidatud RSP efektiivsuse suurenemist spetsiifilise aminohappe järjestusse lisamisel (6x W sisaldav peptiid).
- Sünteesida Fmoc tahke faasi peptiidisünteesi strateegiat kasutades peptiidid, mille järjestused on toodud tabelis 1.
- Puhastada sünteesitud peptiidid pöördfaas kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga (RP-HPLC) ja õiged produktid kindlaks teha MALDI-TOF massispektromeetria abil
- Hinnata disainitud peptiidide mittekovalentse kompleksi moodustumise efektiivsust ja stabiilsust polüanioonile, võrreldes disainil aluseks võetud RSP PF14-ga.
- Võrrelda disainitud peptiididega rakku transporditud plasmiidilt saadud bioloogilist aktiivsust (reportergeeni ekspressioon) samal kompleksimoodustumise laengusuhtel.

**Tabel 1.** Töökärs sünteesitud peptiidide nimetused ning järjestused. <sup>a</sup>logP – kalkuleeritud programmiga MarvinSketch'i 17.2.27; M<sub>w</sub> – molekulmass (g/mol).

Peptiidi nimetus	Järjestus	<sup>a</sup> logP	M <sub>w</sub>
PF14	Stearoüül*-AGYLLGKLLLOOLAAAALOOLL-NH <sub>2</sub>	3,6	2136,6
staPF14	AGYLLGKLLLOOLAAAALOOLL-NH <sub>2</sub>	-3.6	2421,1
(W) <sub>6</sub> -PF14	(W) <sub>6</sub> -AGYLLGKLLLOOLAAAALOOLL-NH <sub>2</sub>	3,7	3253,9
(L) <sub>10</sub> -PF14	(L) <sub>10</sub> -AGYLLGKLLLOOLAAAALOOLL-NH <sub>2</sub>	3,6	3268,2
*Stearoüülrühma süsivesinikahel			
			

### 3.2 Reagendid ja aparatuur

DMF, DCM, piperidiin, atsetonitril, TIS, HOBt, HBTU, DIEA, hepariini sool, Triton X, stearoüülhape, TFA olid saadud Sigma-Aldrichist. Rink-amiid MBHA vaik oli saadud Biotagest ning kõik aminohapped saadi Iris Biotech GMBH-st.

Peptiidide sünteesimiseks kasutati lisaks käsitsisünteesile ka automaatset peptiidisüntesaatorit Biotage<sup>®</sup> Initiator+ Altra<sup>™</sup>. Peptiidide puhastamine teostati kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (Agilent Technologies) abil (C3 pöördfaaskolonn parameetriga 250 mm \* 10 mm). Mass-spektrid mõõdeti MALDI-TOF mass-spektromeetriga Voyager DE-Pro (Applied Biosystems).

Rakusöötmed ning PBS saadi Naxost, lutsiferaasi substraat Promegast, PicoGreen<sup>®</sup> Life Technology'st, valgumääramise komplekt (*DC protein assay*) Bioradist. Söötmetesse lisati 0,1 mM asendatavaid aminohappeid, 0,1 mM naatriumpüruvaati, 10% veise looteserumit (FBS), 100 U/ml penitsilliini (PAA Laboratories GmbH, Saksamaa).

Mõõtmised tehti GLOMAX<sup>™</sup> 96 mikroplaadi luminomeetriga (Promega, Rootsi) ning saadud tulemused normaliseeriti valgu sisalduse vastu (Biorad Protein Assay, USA). Fluorestsentsi mõõtmiseks kasutati Synergy Mx monokromaatoriga mikroplaadilugejat (Biotek).

### 3.3 Peptiidi süntees tahkel kandjal

Antud bakalaureusetöö raames sünteesiti kaks PepFect14 analoogi: (W)<sub>6</sub>-PepFect14, (L)<sub>10</sub>-PepFect14 ning kontrollpeptiidid: ilma stearoüülrühmata PepFect14 ning N-terminaalsesse otsa lisatud stearoüülrühmaga PepFect14. Sünteesitud peptiidide järjestused on toodud tabelis 1. Peptiidide sünteesiks kasutati Fmoc TFPS strateegiat.

**Tabel 2.** Sünteesil kasutatud reagentid, tahke kandja ja aminohapped.

Aminohape		Kaitserühmad		Aminohappejäagi molaarmass peptiidahelas (g/mol)
		N <sup>α</sup>	kõrvalahelal	
A	Alaniin	Fmoc		71
G	Glütsiin	Fmoc		57
Y	Türosiin	Fmoc	tBu	163
L	Leutsiin	Fmoc		113
K	Lüsiin	Fmoc	Boc	128
O	Ornitiin	Fmoc	Boc	114
W	Trüptofaan	Fmoc	Boc	186
Reagent		Funktsioon		Tootja
HBTU		Karboksüülrühma aktiveerimine		Sigma-Aldrich
HOBt		Karboksüülrühma aktiveerimine		Sigma-Aldrich
DIEA		N-kaitstud aminohappe karboksülaadi tekkimine		Sigma-Aldrich
Piperidiin		Ajutise N <sup>α</sup> kaitserühma eemaldamine		Sigma-Aldrich
TFA		Peptiidi lõikamine tahkelt kandjalt, kõrvalahelate kaitserühmade eemaldamine		Sigma-Aldrich
Tahke kandja		Funktsionaalrühm		Peptiidi C-terminaalne osa peale peptiidi lõikamist kandjalt
Rink-amiid MBHA		-NH <sub>2</sub>		-NH <sub>2</sub>

Peptiidid sünteesiti 0,1 mmol skaalas. (W)<sub>6</sub>-PepFect14 sünteesiti käsitsi ning (L)<sub>10</sub>-PepFect14, stearoüül-PepFect14 ja ilma stearoüülrühmata PepFect14 sünteesiti automatiseeritud peptiidisüntesaatoriga. Sünteesiks kasutasin tahke kandjana Fmoc Rink-amiid MBHA vaiku 0,5 mmol/g funktsionaalsete rühmadega. Aminohappeid võeti 5-kordses ühelgus nii käsitsi

kui ka masinaga sünteesil ehk iga mooli funktsionaalse rühma kohta kasutati 5 korda rohkem aminohapet. Kõik aminohapped sisaldasid Fmoc ajutist kaitserühma ning püsikaitserühmad on toodud tabelis 2. Aminohapped aktiveeriti 0,5 M HOBt, 0,5 M HBTU ning 2 M DIEA-ga. Aminohappe ajutised kaitserühmad eemaldati 20% piperidiini lahusega DMF-s ning pesti puhta DMFi ning DCMiga. Kaitserühma vabanemist aminohappelt kontrolliti Kaiseri meetodil, mille teostamiseks võeti prooviks reaktsioonisegust mõned vaiguterad, võetud proovile lisati paar tilka lahust A (KCN, püridiin, fenooli ja etanooli segu) ning lahust B (5% nihüdriin etanoolis). Lahust inkubeeriti 105 °C juures. Kaitserühma edukal vabanemisel värvusid terad tumesiniseks. Igale kaitserühma eemaldamisele järgnes pesu DMF-ga. Lisatav aminohape kaaluti, sellele lisati aktiveerimislahust (aktivaatoritena kasutati 0,5 M HOBt, 0,5 M HBTU ning 2 M DIEA-d) ning kanti pestud vaigule. Peale iga aminohappe seostamist kontrolliti reaktsiooni toimumise efektiivsust Kaiseri testiga. Juhul kui Kaiseri testi järel jäid terad siniseks (vabade -NH<sub>2</sub> rühmade olemasolu), korrati aminohappe sidumist või viidi läbi atsüülimisreaktsioon (*capping*). Juhul kui uue aminohappe seondumine toimus edukalt, jäid terad testis kollaseks. Aminohappe lisamisele või atsüülimisreaktsioonile järgnes Fmoc-kaitserühma eemaldamine peptiidahela kõige N-terminaalsemalt aminohappelt. Seejärel algas uue aminohappe sidumine vajaliku järjestuseni.

Reagentide juurdepääsu tagamiseks tahkes kandjas olevate vahelülideni kasutatakse diklorometaani (DCM) ja dimetüülformamiidi (DMF). DCM paneb tahke kandja punduma ning DMF parandab reagentide lahustuvust. Tahkele kandjale kinnituvad funktsionaalrühmadega vahelülid (0,5-0,8 mmol/g tahke kandja kohta).

### **3.4 Peptiidi eemaldamine tahkelt kandjalt**

Enne peptiidi eemaldamist tahkelt kandjalt kuivatati tahkel kandjal peptiid lüofilisaatoris. Peptiidi eemaldamiseks tahkelt kandjalt valmistati 95% TFA lahus, mis sisaldas lisaks 2,5% TIS-i ning 2,5% milliQ vett. Peptiidiga vaik lisati plastikust, filtriga süstlasse ning eelnevalt valmistatud segu lisati süstlasse. Reaktsioon kestis kuni 3 tundi ning peptiidi sisaldavat TFA-lahust ekstraheeriti eetriga. Seejärel külmutati lahus vesifaasi jäätumiseni, eeter eemaldati ning vesifaasi jäänud peptiid lüofiliseeriti.

### **3.5 Peptiidi puhastamine ja massispektromeetria**

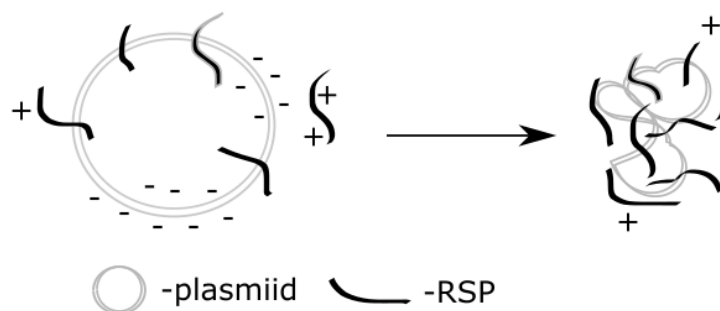
Peale peptiidi lüofiliseerimist puhastati see kõrvalproduktidest HPLC-ga (lisa 2). Peptiid lahustati atsetonitriili ja vee segus, mis sisaldas 20% atsetonitriili ja 0,1% TFA-d. Puhastamisel

kasutati 20-100% atsetonitriili/H<sub>2</sub>O gradienti. Voolukoorus oli 5 ml/min. Fraktsioonid korjati käsitsi. Kolonnist väljuvaid aineid detekteeris UV detektor nende ainete ultravioletses spektrialas asuvate neeldumismaksimumide järgi.

Saadud produktide molekulmassi määramiseks kasutati MALDI-TOF massispektromeetriat (lisa 3), maatriksina kasutati  $\alpha$ -tsüano-4-hüdrokükaneeelhapet (CHCA) ning proov kuivatati plaadil. Peptiidi arvutusliku molekulmassi võrreldi massispektromeetri abil mõõdetud molekulmassiga. Seejärel peptiid külmutati, lüofiliseeriti ning säilitati 20  $\mu$ l kaupa 1 mM lähtelahustena, et vältida korduvat sulatus-külmutus tsüklit.

### 3.6 Komplekside moodustamine peptiidi ja nukleiinhappemolekulide vahel

Peptiid/pDNA kompleksid moodustati mittekovalentselt. Nanoosakeste moodustamiseks segati vastavalt PF14, nsPF14, (W<sub>6</sub>)-PF14 ja (L<sub>10</sub>)-PF14 ja lutsiferaasi kodeerivat plasmidi erinevatel peptiid:plasmid laengu suhetel (N/P) 2:1, 4:1, 8:1 mQ vees. Laengusuhte arvutamisel arvestati plasmidi positiivse laenguga ning peptiidi negatiivse laenguga. Peptiidi ja pDNA segu inkubeeriti 1 h toatemperatuuril komplekside moodustumiseks enne katse järgmisi etappe.



**Joonis 6.** Peptiidi ja pDNA mittekovalentne sidumine tekib peamiselt elektrostaatiliste ja hüdrofoobsete interaktsioonide tulemusena. RSP peab pDNA kondenseerima, et tekiks nanosuurusel partikkel.

### 3.7 Komplekside moodustumise kontroll

#### 3.7.1 Agarosgeelelektroforees

Agarosgeelelektroforees on üks efektiivsemaid meetodeid 100-25 000 aluspaariliste DNA fragmentide teineteisest eraldamiseks, visualiseerimiseks ning suuruse hindamiseks. Nukleiinhapete fosfaatrühmad on negatiivselt laetud ning elektrivälja toimele migreeruvad

nukleiinhappe fragmendid positiivselt laetud elektroodile. DNA molekulid lahutatakse suuruse järgi, väiksemad molekulid liiguvad geelis kiiremini kui suuremad nukleiinhapped. Lisaks võivad näiteks sama suurusega plasmiidid migreeruda geelis erinevalt, sest omavad mitut vormi (vaba rõngasmolekul, superspiraliseerunud). Geelelektroforeesi kasutatakse ka peptiidi ja DNA komplekside moodustumise ja laengute neutraliseerimise hindamiseks. Selleks moodustati nanokompleksid erinevatel laengu suhetel (N/P peptiid:plasmiid 2:1, 4:1, 8:1) ning elektroforeeriti etiidumbromiidi sisaldaval 1% agarosgeelil 1 x TAE puhvril konstantsel 65 mA voolutugevusel. Geel pildistati UV-valguse juures. Peptiidi ja DNA komplekside migreerumist võrreldi vaba DNA migreerumisega. DNA ja peptiidi kompleksi moodustamise tulemusena pole osakesed võimelised geeli läbima, sest osakeste mõõtmed on tunduvalt suuremad kui poorid. Juhul kui laengud neutraliseeritakse, ei toimu samuti geelis liikumist. Läbitud vahemaa geelil on proportsionaalne molekuli molekulmassi logaritmiga. Etiidumbromiidi (EtBr) lisati geelile nukleiinhapete visualiseerimiseks. EtBr interkaleerub DNA-molekuli aluspaaride vahele ning fluorestseerub UV alas (Lee *et al.* 2012). Geeli pildistati 260 nm lainepikkusel UV valguse juures.

### 3.7.2 Komplekside disintegratsiooni analüüs

Nanopartiklite stabiilsuse hindamiseks töödeldi neid pDNA-ga konkureeriva anioonse ühendiga (hepariini soola lahusega). Kompleksid moodustati punktis 3.7 kirjeldatud viisil. Inkubatsiooni järel lisati 100 µl-le hepariinilahusele 30 µl kompleksilahust. Hepariini kasutatakse pDNA välja tõrjumiseks nanoosakestest, sest oma polüanioonsuse tõttu interakteerub positiivselt laetud RSP-ga. Hepariiniga inkubeeriti komplekse 1 h. Seejärel lisati lahusele fluorokroomi *PicoGreeni*<sup>®</sup>, mis seostub pDNA aluspaaride vahele. *PicoGreeniga*<sup>®</sup> seostunult on võimalik fluoromeetri abil kvantifitseerida vaba pDNA hulk. Fluoromeetriga *SynergyMx* registreeriti vaba pDNA hulk ning tulemused esitati graafikuna protsendina vaba plasmidi suhtes vähemalt 4 mõõtmise keskmisena.

### 3.8 *In vitro* rakkude kasvatus ja katsed rakkudel

Antud töös kasutati CHO (hiina hamstri munasarja rakud) rakuliini. CHO rakke kasvatati inkubaatoris 5% CO<sub>2</sub> sisaldavas veeauruga küllastatud keskkonnas 37 °C juures. Rakkude arvu plaadil vähendati passeerimisega iga 2-3 päeva järel hoidmaks rakkude konfluentsust alla 100%. Enne passeerimist pesti rakke PBS-iga surnud rakkude ja vana söötme eemaldamiseks ning eemaldati plaadilt 0,25% trüpsiini lahusega. Trüpsiin inaktiveeriti seerumit sisaldava

söötme lisamisega. CHO rakke kasvatati ja katsed rakkudel viidi läbi Ham's F12 söötmes, millele lisati 10% veise loote seerumit, 0,1 mM asendatavaid aminohappeid ja 1 mM naatriumpüruvaati, 100 U/ml penitsilliini ning 100 µg/ml streptomütsiini.

Rakkude transfekterimiseks külvati 24 tundi enne katsete läbiviimist rakud 24-kaevulistele plaatidele nii, et igas kaevus oleks 1 ml söötmes 50 000 rakku. Katse päeval eemaldati vana sööde ning rakkudele lisati 450 µl seerumiga söödet ja 50 µl kompleksi lahust. Kasutati N/P 2:1; 4:1 ja 8:1. Kontrollina kasutati puhast plasmidi lahust ning töötlemata rakke (K). Rakke inkubeeriti 4 tundi inkubaatoris. Seejärel eemaldati kaevudest sööde ning lisati 1 ml uut seerumiga söödet. Rakke kasvatati lisaks 20 h inkubaatoris 37 °C juures ja 5% CO<sub>2</sub> tingimustes.

Seejärel aspireeriti sööde, pesti rakud 1 ml PBS-iga ning rakud lüüsi 100 µl 0,1 % detergendi Triton X100 lahusega PBSis. Rakulüsaat segati ning valgele 96-kaevulisele plaadile pipeteeriti 20 µl rakulüsaati. Sellele lisati 80 µl lutsiferaasi substraati segati ning mõõdeti luminetsentsiväärtused, kasutades GLOMAX TM 96 luminomeetrit. Rakulüsaadist määrati ka valgukontsentratsioon kommertsiaalse komplekti abil, mis põhineb Lowry meetodil. 5 µl rakulüsaadi lahust pipeteeriti rakuplaadile ning proovidele lisati DC valgumääramise komplekt. Mõõtmistulemused esitatakse ühikutes RLU/mg.

Töös kasutati lutsiferaasi kodeerivat reporterplasmidi. Lutsiferaasil põhinevad meetodid on võrreldes fluorestsentsmeetoditega tundlikumad ning tänu sellele on võimalik ensüümi substraati lisades määrata plasmiidilt ekspresseeritud valgust hulk, mis on seotud mõõdetud luminetsentsiga. Antud katses mõõdeti rakku sisseviidud plasmiidilt ekspresseeritud lutsiferaasi ja lisatud substraadi vahelisel reaktsioonil tekkinud valgust – luminetsentsi. Valgu vastu normaliseerimine aitab ühtlustada tulemust ning vähendada külvist, transfektsioonist ja pesemisest tekkinud materjalikadudest tekkivaid varieeruvusi.

## 4. Tulemused ja arutelu

### 4.1 Peptiidi logP kalkulatsiooni alusel on sarnase hüdrofoobsuse saavutamiseks vajalik lisada kümme leutsiini või kuus trüptofaani

Rakku sisenevate peptiidide rakku sisenemise efektiivsuse suurendamisel on üheks edukaimaks modifikatsiooniks osutunud hüdrofoobsete regioonide lisamine RSP järjestusse. Kõige enam on selleks kasutatud rasvhappejäägi, näiteks stearoüülrühma lisamist RSP-le. Stearoüülrühma lisamine Arg<sub>8</sub> N-terminaalsesse otsa suurendas RSP efektiivsust plasmiidse DNA rakku transportimisel (Futaki *et al.* 2001). TP10 stearoüülimine tõstis peptiidide bioaktiivsust mitmeid kordi (Mäe *et al.* 2009). Hüdrofoobne stearoüülrühm muutis nanopartikleid palju stabiilsemaks ning suurendas endosoomidest vabanemist (Lehto *et al.* 2011). Peptiidi hüdrofoobsus pole ainuke faktor, mis mõjutab peptiidi bioaktiivsust. Lisaks mõjutavad plasmidi ekspressiooni peptiidi/pDNA komplekside stabiilsus, komplekside suurus, kasutatav rakuliin, inkubatsiooni tingimused, keskkond (pH) ning peptiidi ja plasmidi interaktsiooni tugevus.

Käesolevas töös kasutati peptiidide disainil alusena RSP-d PepFect14, mis sisaldab N-terminaalses osas hüdrofoobset stearoüülrühma. Järgmise etapina kalkuleeriti antud RSP hüdrofoobsust kirjeldava parameetri (logP) väärtus, kasutades MarvinSketch'i 17.2.27 programmi. Järgmisena kalkuleeriti stearoüülrühmata peptiidjärjestuse (staPF14) logP väärtus (tabelis 1). Hüdrofoobsuse lisamiseks saab lisaks rasvhappejäägile kasutada ka hüdrofoobse kõrvalahelaga aminohappeid (alaniin, isoleutsiin, leutsiin, fenüülalaniin, valiin, glütsiin, metioniin, trüptofaan ja proliin). Antud disainil valiti kaks kandidaati – leutsiin ning trüptofaan. Selleks, et logP väärtus oleks kalkulatsioonis sarnane PF14-le, on vaja lisada kümme leutsiini või kuus trüptofaani.

Leutsiin on valgujärjestustes väga levinud aminohape. Selleks, et omada sarnast kalkuleeritud logP väärtust kui PF14-l, peab staPF14 järjestusse lisama 10 leutsiini. Otsides sama motiivi valguandmebaasist (*Universal Protein Resource*) selgus, et ka mõned inimese kehas leiduvad valgud (STRC, STRCP1, LTBP3, NOTCH4, PLXNA1) sisaldavad N-terminaalses osas sama motiivi signaalpeptiidina defineeritud osas. Teisel modifikatsioonil lisati PepFect14-le stearoüülrühma asemele kuus trüptofaani. Trüptofaan võib aidata rakku jõudnud kompleksidel endosoomidest vabaneda (Lönn *et al.* 2016) ning sellega võiks kasvada ka peptiid-transportitud plasmidi lõplik saadud bioaktiivsus.

## 4.2 Järjestikune hüdrofoobsete aminohapete lisamine vähendab oluliselt peptiidi saagist

Antud töös sünteesiti kaks uut rasvhappejäägita PepFect14-l põhinevat rakku sisenevat peptiidi: (L)<sub>10</sub>-PF14 ja (W)<sub>6</sub>-PF14. Stearöülita PF14 analoogi sünteesi saagis oli kõige suurem ning aminohapete sidumine õnnestus efektiivselt. Selleks, et saada stearöülrühmata ja stearöülrühmaga PF14, viidi läbi üks süntees ning enne stearöülhappe lisamise etappi jagati vaik kaheks. Ühelt osalt eemaldati ainult Fmoc ning külmuivatamise järel lõigati peptiid kandjalt. Teiselt osalt eemaldati Fmoc ning lisati stearöülrühm. Tavalise PF14 sünteesil, mis sisaldab rasvhappejääki stearöül oli limiteerivaks etapiks just rasvhappe lisamine, kuid see on optimeeritud ning sidumisetappi korratakse. Saagise suurendamiseks viidi sidumine läbi topelt. Esimesel korral inkubeeriti 2 h ning värske lahuse lisamise järel üleöö toatemperatuuril. Uute analoogide süntees osutus keerukamaks ning saagis oli märgatavalt väiksem kui kahel eelneval peptiidil.

Kõige väiksem saagis oli peptiidil (L)<sub>10</sub>-PF14, mille puhul sai käsitsisünteesi ja HPLC-ga puhastuse järel puhast peptiidi alla 1 mg. Seetõttu korrati peptiidi sünteesi peptiidi automaatsüntesaatoriga Biotage<sup>®</sup> Initiator+ Alstra<sup>™</sup> ning iga sidumisetapp kuni (L)<sub>10</sub> osani viidi läbi 2 kordse sidumisega ning alates (L)<sub>10</sub> osast kolmekordselt. Iga sidumisetapi järel pesti reageerimata rühmad. Peptiid (W)<sub>6</sub>-PF14 sünteesiti käsitsi. Peptiid puhastati kõrvalproduktidest pöördfaas vedelikkromatograafia abil ning saadud produktide õigsuse määramiseks kasutati MALDI-TOF massispektromeetria (lisa 3). Vedelikkromatograafias elueeriti peptiidid 20-100% juures atsetonitriili/vee gradiendi juures (lisa 2). Peptiid (W)<sub>6</sub>-PF14 elueerus 58% ning (L)<sub>10</sub>-PF14 elueerus 64% atsetonitriili juures.

## 4.3 Stearöülrühmata analoogid ei suuda moodustada RSP/pDNA partikleid

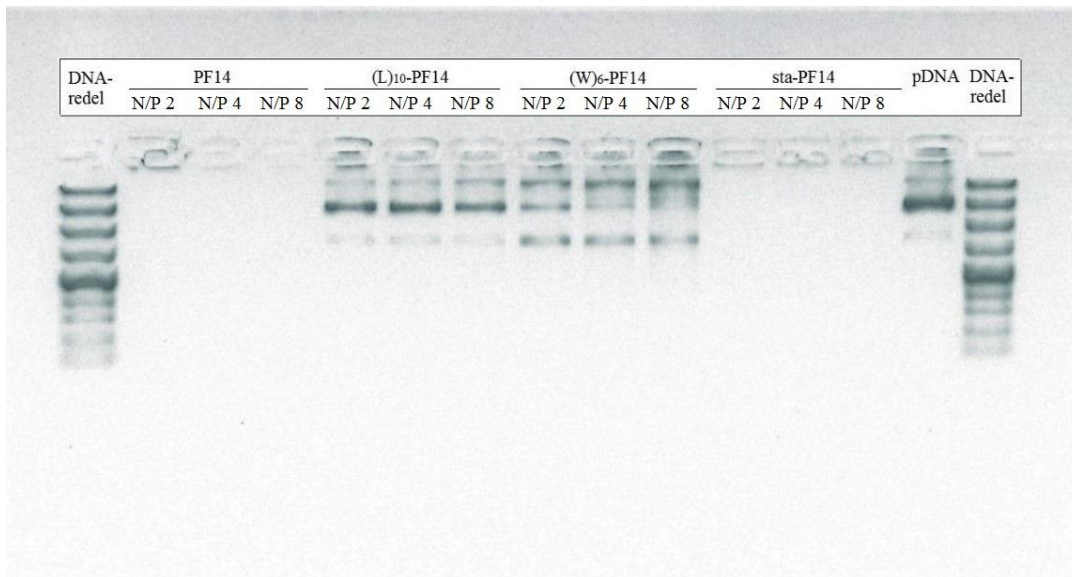
Selleks, et edukalt lastmolekuli rakku viia, peavad RSP-d suutma plasmidi kondenseerida ning moodustama partikli. Selleks, et hinnata sünteesitud peptiidide võimet komplekseerida plasmidi, kasutati geelektroforeesi ning DNA-spetsiifilist fluorestseeruvat värvi. Disainitud peptiidid ei ole võimelised efektiivselt komplekse moodustama ka kõrgemal peptiidi kontsentratsioonil (joonis 6). Kõik laengusuhted olid PF14 korral piisavad kogu pDNA kondenseerimiseks nanokompleksi. PF14-s sisalduv hüdrofoobne stearöülrühm soodustab peptiidil moodustada nukleiinhapetega tugevaid komplekse ja võimaldab pDNA-l kondenseerida stabiilseteks nanoosakesteks (Mäe *et al.* 2009). Ka staPF14 oli võimeline siduma

kogu pDNA. StaPF14 korral võisid tekkida plasmidi ja peptiidi vahel laeng-laeng interaktsioonid, mille tulemusena tekkis laengute neutralisatsioon ning kompleksid püsisid hambas, mida toetab ka see, et plasmid on kättesaadav DNA spetsiifilisele fluoretseeruvale värvile (joonis 6). Stearoüülrühmaga PF14 moodustab kompleksid juba N/P 2 juures, samas kui (L)<sub>10</sub>-PF14 ja (W)<sub>6</sub>-PF14 puhul on ka N/P 8 juures näha konkreetseid vabasid pDNA bände. Kuna (L)<sub>10</sub>-PF14 ja (W)<sub>6</sub>-PF14 sisaldavad hulganisti hüdrofoobseid aminohappeid, siis ei ole nende katioonseid laenguid sisaldavas peptiidi regioonis nukleiinhappes olevate negatiivsete laengute neutraliseerimine sama efektiivne ning toimub pigem agregeerumine, mitte kompleksi lagunemine madalal hepariini kontsentratsioonil (joonis 7).

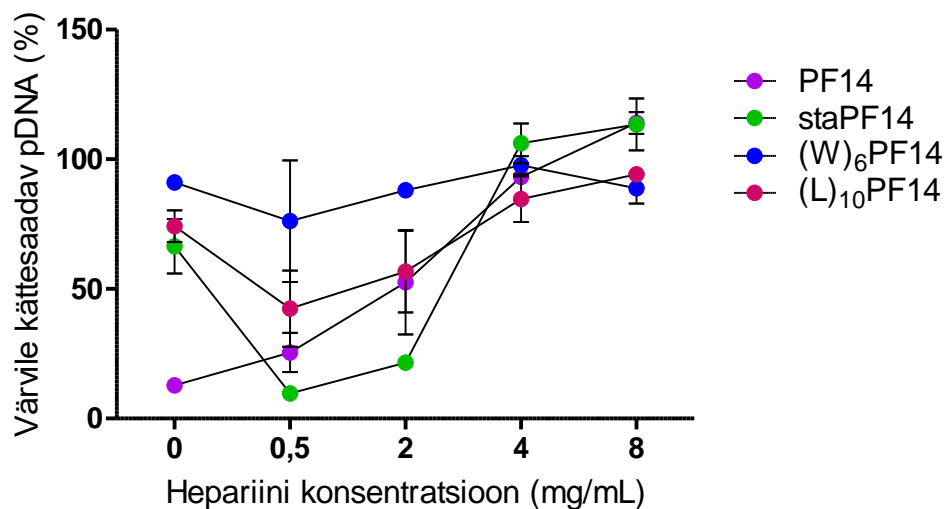
(L)<sub>10</sub>-PF14, (W)<sub>6</sub>-PF14 ei moodusta tugevaid nanokomplekse. Üheks põhjuseks võib-olla leutsiini ning trüptofaani ahelate lisastruktuuride moodustamine, mille tagajärjel on pDNA seondumine raskendatud. (W)<sub>6</sub>-PF14 moodustab nõrgemaid komplekse kui (L)<sub>10</sub>-PF14. Põhjuseks võib-olla (W)<sub>6</sub>-PF14 kogukam kõrvalahel.

Analüüsi ka nanokomplekside stabiilsust hepariini soola lisamise teel. Hepariin on pDNA-ga konkureeriv anioon, mis tõrjub RSP/plasmidi kompleksist plasmidi välja. Olenevalt kompleksitugevusele on vajalik lisada pDNA väljatõrjumiseks erinev kogus hepariini soola. Lisati ka fluorofoori PicoGreen, mille fluorestseeruvad omadused tugevnevad pDNA seostumisel. Stabiilsuse katse viidi läbi N/P 4 juures ning saadud värvile kättesaadav pDNA hulk esitati protsentuaalselt (%) graafikuna programmis Prism (joonis 7). (L)<sub>10</sub>-PF14 on mõnevõrra stabiilsem kui (W)<sub>6</sub>-PF14 ehk värvile kättesaadav pDNA kogus oli väiksem (L)<sub>10</sub>-PF14 korral. Nii (L)<sub>10</sub>-PF14, (W)<sub>6</sub>-PF14 kui ka staPF14 korral oli hepariini lisamata värvile kättesaadav pDNA kogus suurem kui 0,5 mg/ml hepariini lisades. Järelikult olid need kompleksid ebastabiilsed, ei moodustanud nanoosakesi ning hepariini lisamisel kompleksid agregeerusid kokku ning plasmid ei olnud värvile enam nii hästi kättesaadav. Kontrollpeptiid PF14 moodustas ainsana pDNA-ga stabiilseid nanokomplekse. Hepariin tõrjus pDNA täielikult välja alles 8 mg/ml hepariini kontsentratsioonil (joonis 7).

Nanoosakesed on defineeritud kui nanosuuruses osakesed. Varasemalt on näidatud, et stearoüülita TP10 ei ole võimeline sama efektiivselt partikleid moodustama, kui stearoüüluga TP10 ehk PF3 (van Asbeck *et al.* 2013). Sarnane tulemus saadi ka staPF14 ja PF14 võrdlusel. Antud tulemustele tuginedes ei ole võimalik kindlaks teha, kas hüdrofoobsete aminohapetega analoogid suudavad moodustada nanokomplekse plasmiidiga.



**Joonis 7.** Kompleksi moodustamise ja laengute neutraliseerimise hindamine agarosgeelelektrofooresil. Vaba pDNA olemasolu kompleksides erinevate laengu suhete (N/P) korral. Peptiidiga komplekseerunud pDNA püsib geelihambas ning vaba pDNA migreerub hambast geeli. DNA on visualiseeritud UV abil. DNAGA seonduv UV-alas fluorestseeruv EtBr on lisatud eelnevalt geelile.

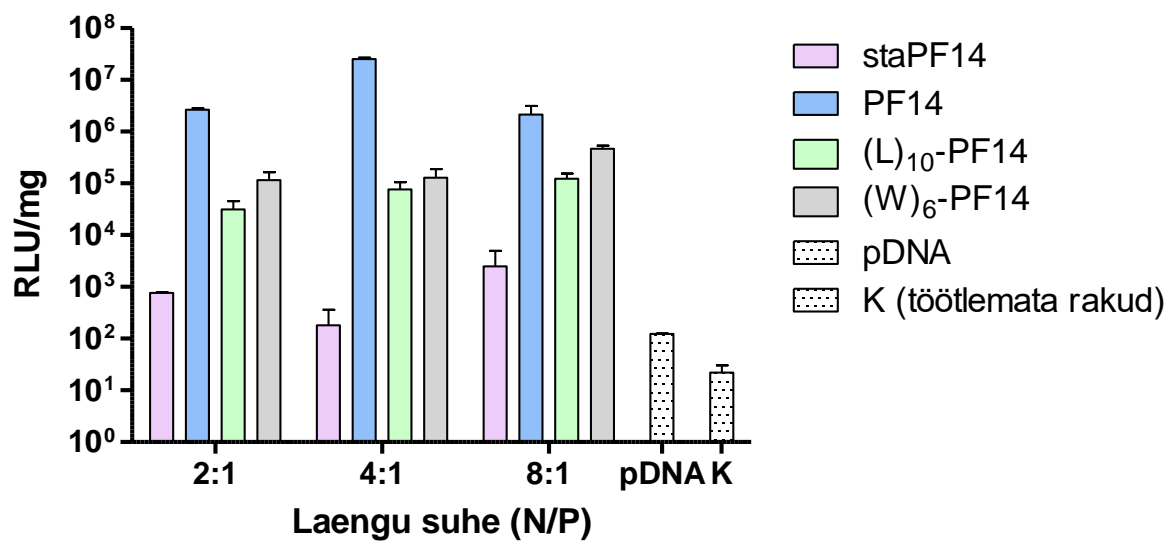


**Joonis 8.** Nanokomplekside stabiilsus hepariinile hepariini erinevatel kontsentratsioonidel. Kompleksid moodustati standardtingimustel ning inkubeeriti 1 h toatemperatuuril. Katses kasutati laengu suhet 4:1 (N/P). Kompleksidele lisati erinevatel kontsentratsioonidel (0,5-8 mg/ml) hepariini soola kompleksilahuse kohta. 100% on võetud fluorestsentsväärtus, mis vastab samale kontsentratsioonile kompleksidesse lisatud komplekseerimata pDNA fluorestsentsile.

#### 4.4 Stearöülita analoogid suudavad viia plasmidi rakku ning võimaldavad reportergeeni ekspressiooni

CHO rakkudesse transfekteeriti lutsiferaasi kodeerivat plasmidi erinevatel laengu suhetel moodustatud kompleksiga (N/P 2, N/P 4, N/P 8). Plasmidi transfektsiooniks kasutati nelja RSP-i, mille järjestused on välja toodud tabelis 1. Negatiivseks kontrolliks olid K (töötlemata) rakud ning puhta plasmidiga töödeldud rakud. On teada, et PF14/pDNA nanokomplekside kõige optimaalsem laengu suhe plasmidi transfektsioonil on N/P 2 (Veiman *et al.* 2013). Reportergeeni ekspressiooni hindamiseks moodustati ka nanokompleksid N/P 4 ja N/P 8, kuna geelipildi alusel (joonis 6) sisaldus vaba pDNA nii (L)<sub>10</sub>-PF14 kui ka (W)<sub>6</sub>-PF14 moodustatud kompleksides. Laengu suhete suurendamisel võeti arvesse, et peptiidi kontsentratsioon kompleksis jäaks optimaalsesse vahemikku, kuna varasemalt on näidatud, et peptiidi kontsentratsiooni suurenemisel kasvab RSP toksilisus rakkudele (Saar *et al.* 2005). Ekspressioonikatse tulemused esitati Prism programmi kasutades tulppiagrammil RLU/mg valgu kohta rakulüsaadis (joonis 8).

Kõigil N/P suhetel on kõige madalam bioloogiline aktiivsus staPF14-l. N/P 4 juures jääb staPF14 bioaktiivsus pDNA-ga samale tasemele. StaPF14 transfektsiooniefektiivsus on väga madal ning võimalik, et staPF14 ei vii plasmidi rakku piisaval määral või ei vabasta staPF14 pDNA-d endosoomidest piisaval määral ning plasmidi ei ole võimalik rakutuuma viia. Kõige suuremat bioaktiivsust näitab PF14, millel on hüdrofoobne saba. Ka on leitud korrelatsioon nukleiinhappe rakku transportimise efektiivsuse ning rasvhappe süsivesinikahela pikkuse vahel. Pikema süsivesinikahela korral täheldati paremat transfektsiooniefektiivsust. Seda seostatakse hüdrofoobsete interaktsioonidega rakumembraani ning komplekside vahel (Lehto *et al.* 2017). (L)<sub>10</sub>-PF14 ja (W)<sub>6</sub>-PF14 bioloogiline aktiivsus jääb PF14-le alla kõikidel N/P suhetel. Peptiidi bioaktiivsus sõltub suurel määral hüdrofoobsusest, kuid plasmidi ekspressiooniefektiivsusele aitab oluliselt rohkem kaasa peptiidi väga hüdrofoobne osa rasvhappe näol, kui selle asendamine hüdrofoobsete aminohapetega. Rasvhappe saba interakteerub paremini rakumembraanidega ning hüdrofoobsed interaktsioonid kompleksi moodustamisel tugenevad. Nii (L)<sub>10</sub>-PF14 kui ka (W)<sub>6</sub>-PF14 puhul ei suurenenud märgatavalt transfektsiooniefektiivsus N/P suhete kasvu korral. Tulemused näitavad, et (W)<sub>6</sub>-PF14 on mõnevõrra efektiivsem (L)<sub>10</sub>-PF14-st. Siiski, mõlemad analoogid viivad kõrgema ekspressioonini pDNA-lt kui staPF14, seega hüdrofoobse regiooni lisamine soodustab bioaktiivsust.



**Joonis 9.** (W)<sub>6</sub>-PF14, (L)<sub>10</sub>-PF14, PF14 ja staPF14 abil pDNA transfektsioon CHO rakkudesse erinevate laengu suhete (N/P) juures. Negatiivse kontrollina on kasutatud pDNA-ga töötlemata rakke (K) ning puhta pDNA-ga töödeldud rakke. Katsed on läbi viidud seerumiga söötmes ja luminesstsents mõõdetud rakulüsaadist 24 h peale komplekside lisamist. Tulemused on normaliseeritud rakulüsaadi totaalvalgu vastu.

## 5. Kokkuvõte

Antud bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates tutvustati rakku sisenevaid peptiide, nende omadusi ning PepFectide perekonda kuuluvaid peptiide. Samuti tutvustati tahke faasi peptiidisünteesi ning peptiidide puhastamist ja detekteerimist. Kirjeldati lastmolekuli ja rakku siseneva peptiidi kompleksimoodustamise strateegiaid ning rakku sisenemist.

Eksperimentaalses osas disainiti PF14 alusel sarnase kalkuleeritud hüdrofoobsusega ( $\log P$  väärtusega) peptiidid, mis sisaldasid stearoüülrühma asemel hüdrofoobseid aminohappeid. Sünteesiti eelnevalt kalkuleeritud hüdrofoobsusega PepFect perekonda kuuluvate peptiidide analoogid (L)<sub>10</sub>-PF14 ja (W)<sub>6</sub>-PF14 ning kontrollpeptiidid staPF14 ja PF14 Fmoc tahke faasi peptiidisünteesi meetodil. Sünteesitud peptiidid puhastati RP-HPLC-ga ja õiged produktid tehti kindlaks MALDI-TOF massispektromeetria abil. Lisaks komplekseeriti RSP ja pDNA mittekovalentselt ning hinnati disainitud peptiidide mittekovalentse kompleksimoodustamise efektiivsust ja stabiilsust aluseks võetud peptiidiga PF14. Võrreldi ka rakku transporditud plasmiidilt saadud bioloogilist aktiivsust (reportergeeni ekspressiooni) erinevatel kompleksimoodustamise laengu suhetel.

Peptiide on võimalik edukalt sünteesida Fmoc peptiidisünteesi strateegiat kasutades, kuid sünteesi protokoll vajab optimeerimist. Kõige keerukamaks osutus mitme järjestikuse leutsiini või trüptofaani lisamine N-terminaalsesse osasse. *In vitro* katsetulemused näitavad, et peptiidil stearoüülrühma asendamine aminohapetega mõjutab RSP-de võimet moodustada komplekse ning komplekside stabiilsust. (L)<sub>10</sub>-PF14 ja (W)<sub>6</sub>-PF14 ei moodustanud võrreldes stearoüülrühma sisaldava peptiidiga pDNA-ga tugevaid nanokomplekse.

Disaini aluseks võetud peptiid PF14 on ka parema bioloogilise aktiivsusega kui disainitud analoogid (L)<sub>10</sub>-PF14 ja (W)<sub>6</sub>-PF14. Siiski (L)<sub>10</sub>-PF14 ja (W)<sub>6</sub>-PF14 abil rakku transporditud plasmiidilt saadud reportergeeni ekspressioon oli arvestatava tulemusega. Tulemused kinnitavad, et peptiidi bioaktiivsus sõltub olulisel määral tema hüdrofoobsusest ning kõrgeks transfektsiooniefektiivsuse saavutamiseks vajab peptiid N-terminaalses osas hüdrofoobset osa, sest võrreldes rasvhappejäägita ja hüdrofoobse osata staPF14-ga oli kõigi analoogidega transporditud pDNA-d rakku enam ja reportergeeni ekspresseeritud oluliselt rohkem.

Lisaks senistele katsetele võiks uurida uute peptiidide (L)<sub>10</sub>-PF14 ja (W)<sub>6</sub>-PF14 ja pDNA komplekside hüdrodünaamilist diameetrit, millega saaks hinnata nanoosakeste moodustumist.

Geelektroforees võimaldab esialgset hinnangut komplekside või agregaatide moodustumisest, kuid ei anna olulist infot nanosuurustes osakeste moodustumise kohta. Samuti võiks kaaluda teiste hüdrofoobse kõrvalahelaga aminohapete lisamist leutsiini ning trüptofaani asemel. Lisaks, kuna sama aminohappe järjestikune lisamine oli keerukas, tasuks disainil arvesse võtta seda, kas oleks võimalik aminohappelist järjestust muuta ka sünteesikeerukuse seisukohast.

## 6. Summary

### **Synthesis of cell-penetrating peptide PepFect14 analogues without fatty acid residue and testing them *in vitro***

Janely Sojone

Cell-penetrating peptides (CPPs) are less than 40 amino acids long sequences that are capable of efficient cellular transport of various covalently or noncovalently conjugated biomolecules (including pDNA). In this study, two new PepFect14 (PF14) analogues (W)<sub>6</sub>-PF14 and (L)<sub>10</sub>-PF14 were designed. The conjugation of hydrophobic amino acids to the N-terminus of CPP was used instead of the stearyl group at the N-terminus of PF14. Analogues have almost the same calculated hydrophobicity values (log P) with the PF14. Two analogues (W)<sub>6</sub>-PF14, (L)<sub>10</sub>-PF14 and the control peptides stearylated PF14, non-stearylated PF14 were synthesised using the solid-phase peptide synthesis strategy.

CPPs with pDNA were co-incubated to form non-covalent complexes. It was determined whether CPPs form nanoparticles with pDNA using different N/P ratios for the formation of nanoparticles. Also, the heparin displacement assay was included to analyse the stability of complexes. In addition, expression of genes from the pDNA in cells was examined.

The experiments show that the change of the hydrophobic stearyl group with the amino acids affects the ability of CPPs to form complexes and the stability of complexes. (W)<sub>6</sub>-PF14, (L)<sub>10</sub>-PF14 did not form strong complexes with the pDNA.

PF14 yields higher biological activity of delivered pDNA compared to new analogues. However, (W)<sub>6</sub>-PF14 and (L)<sub>10</sub>-PF14 induce considerable level of gene expression. The results confirm that the biological activity of CPPs remarkably depends on hydrophobicity, and for obtaining high expression of pDNA peptide needs the presence of hydrophobic part at the N-terminus.

## 7. Kasutatud kirjandus

- Agrawal, Piyush, Sherry Bhalla, Salman Sadullah Usmani, Sandeep Singh, Kumardeep Chaudhary, Gajendra P. S. Raghava, and Ankur Gautam. n.d. “CPPsite 2.0: A Repository of Experimentally Validated Cell-Penetrating Peptides.” *Nucleic Acids Research* Vol.44 (2016): D1098–1103.
- Aguilar, Marie-Isabel. 2004. “HPLC of Peptides and Proteins: Basic Theory and Methodology.” *HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols*, 3–8.
- Asbeck, Alexander H. van, Andrea Beyerle, Hesta McNeill, Petra H.M. Bovee-Geurts, Staffan Lindberg, Wouter P. R. Verdurmen, Mattias Hällbrink, Ülo Langel, Olaf Heidenreich, and Roland Brock. 2013. “Molecular Parameters of siRNA–Cell Penetrating Peptide Nanocomplexes for Efficient Cellular Delivery.” *ACS Nano* 7 (5): 3797–3807. doi:10.1021/nn305754c.
- Chan, Weng C., and Peter D. White. 2000. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press.
- Copolovici, Dana Maria, Kent Langel, Elo Eriste, and Ülo Langel. 2014. “Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications.” *ACS Nano* 8 (3): 1972–94. doi:10.1021/nn4057269.
- Croxatto, Antony, Guy Prod’hom, and Gilbert Greub. 2012. “Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology.” *FEMS Microbiology Reviews* 36 (2): 380–407. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
- Derossi, Daniele, Alain H. Joliot, Gerard Chassaing, and Alain Prochiantz. 1994. “The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes.”
- Deshayes, Sébastien, Thomas Plénat, Gudrun Aldrian-Herrada, Gilles Divita, Christian Le Grimellec, and Frédéric Heitz. 2004. “Primary Amphipathic Cell-Penetrating Peptides: Structural Requirements and Interactions with Model Membranes<sup>†</sup>.” *Biochemistry* 43 (24): 7698–7706. doi:10.1021/bi049298m.
- Doherty, Gary J., and Harvey T. McMahon. 2009. “Mechanisms of Endocytosis.” *Annual Review of Biochemistry* 78 (1): 857–902. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.
- Ezzat, K., S. EL Andaloussi, E. M. Zaghoul, T. Lehto, S. Lindberg, P. M. D. Moreno, J. R. Viola, et al. 2011. “PepFect 14, a Novel Cell-Penetrating Peptide for Oligonucleotide

- Delivery in Solution and as Solid Formulation.” *Nucleic Acids Research* 39 (12): 5284–98. doi:10.1093/nar/gkr072.
- Frankel, Alan D., and Carl O. Pabo. 1988. “Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus.” *Cell* 55 (6): 1189–1193.
- Futaki, Shiroh, Wakana Ohashi, Tomoki Suzuki, Miki Niwa, Seigo Tanaka, Kunihiro Ueda, Hideyoshi Harashima, and Yukio Sugiura. 2001. “Stearylated Arginine-Rich Peptides: A New Class of Transfection Systems.” *Bioconjugate Chemistry* 12 (6): 1005–11. doi:10.1021/bc015508l.
- Hardee, Cinnamon, Lirio Arévalo-Soliz, Benjamin Hornstein, and Lynn Zechiedrich. 2017. “Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy.” *Genes* 8 (2): 65. doi:10.3390/genes8020065.
- Heitz, Frederic, May Catherine Morris, and Gilles Divita. 2009. “Twenty Years of Cell-Penetrating Peptides: From Molecular Mechanisms to Therapeutics.” *British Journal of Pharmacology* 157 (2): 195–206.
- Howl, John. 2005. *Peptide Synthesis and Applications*. Vol. 298. University of Wolverhampton: Humana Press.
- Järver, Peter, and Ülo Langel. 2004. “The Use of Cell-Penetrating Peptides as a Tool for Gene Regulation.” *Drug Discovery Today* 9 (9): 395–402.
- Joliot, Alain H., C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, and Alain Prochiantz. 1991. “Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, March, 1864–68.
- Kumari, Sudha, M. G. Swetha, and Satyajit Mayor. 2010. “Endocytosis Unplugged: Multiple Ways to Enter the Cell.” *Cell Research* 20 (3): 256–275.
- Langel, Ülo, ed. 2015. *Cell-Penetrating Peptides*. Vol. 1324. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-4939-2806-4.
- Lee, Pei Yun, John Costumbrado, Chih-Yuan Hsu, and Yong Hoon Kim. 2012. “Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments.” *Journal of Visualized Experiments*, no. 62 (April). doi:10.3791/3923.
- Lehto, Taavi, Kariem Ezzat, Matthew J.A. Wood, and Samir EL Andaloussi. 2016. “Peptides for Nucleic Acid Delivery.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 106 (November): 172–82. doi:10.1016/j.addr.2016.06.008.
- Lehto, Taavi, Oscar E Simonson, Imre Mäger, Kariem Ezzat, Helena Sork, Dana-Maria Copolovici, Joana R Viola, et al. 2011. “A Peptide-Based Vector for Efficient Gene

- Transfer In Vitro and In Vivo.” *Molecular Therapy* 19 (8): 1457–67. doi:10.1038/mt.2011.10.
- Lehto, Tõnis, Luis Vasconcelos, Helerin Margus, Ricardo Figueroa, Margus Pooga, Mattias Hällbrink, and Ülo Langel. 2017. “Saturated Fatty Acid Analogues of Cell-Penetrating Peptide PepFect14: Role of Fatty Acid Modification in Complexation and Delivery of Splice-Correcting Oligonucleotides.” *Bioconjugate Chemistry* 28 (3): 782–92. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00680.
- Lönn, Peter, Apollo D. Kacsinta, Xian-Shu Cui, Alexander S. Hamil, Manuel Kaulich, Khirud Gogoi, and Steven F. Dowdy. 2016. “Enhancing Endosomal Escape for Intracellular Delivery of Macromolecular Biologic Therapeutics.” *Scientific Reports* 6 (1). doi:10.1038/srep32301.
- Madani, Fatemeh, Staffan Lindberg, Ülo Langel, Shiroh Futaki, and Astrid Gräslund. 2011. “Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides.” *Journal of Biophysics* 2011: 1–10. doi:10.1155/2011/414729.
- Mäde, Veronika, Sylvia Els-Heindl, and Annette G Beck-Sickinger. 2014. “Automated Solid-Phase Peptide Synthesis to Obtain Therapeutic Peptides.” *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 10 (May): 1197–1212. doi:10.3762/bjoc.10.118.
- Mäe, Maarja, Samir EL Andaloussi, Per Lundin, Nikita Oskolkov, Henrik J. Johansson, Peter Guterstam, and Ülo Langel. 2009. “A Stearylated CPP for Delivery of Splice Correcting Oligonucleotides Using a Non-Covalent Co-Incubation Strategy.” *Journal of Controlled Release* 134 (3): 221–27. doi:10.1016/j.jconrel.2008.11.025.
- Merrifield, Bruce. 1969. “Solid-Phase Peptide Synthesis.” *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 32: 221–96.
- Montalbetti, Christian A.G.N., and Virginie Falque. 2005. “Amide Bond Formation and Peptide Coupling.” *Tetrahedron* 61 (46): 10827–52. doi:10.1016/j.tet.2005.08.031.
- Morris, M. C., P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz, and G. Divita. 1997. “A New Peptide Vector for Efficient Delivery of Oligonucleotides into Mammalian Cells.” *Nucleic Acids Research* 25 (14): 2730–2736.
- Mueller, Judith, Ines Kretzschmar, Rudolf Volkmer, and Prisca Boisguerin. 2008. “Comparison of Cellular Uptake Using 22 CPPs in 4 Different Cell Lines.” *Bioconjugate Chemistry* 19 (12): 2363–74. doi:10.1021/bc800194e.
- Pai, Jaeyoung, Taejin Yoon, Nam Doo Kim, Im-Soon Lee, Jaehoon Yu, and Injae Shin. 2012. “High-Throughput Profiling of Peptide–RNA Interactions Using Peptide Microarrays.” *Journal of the American Chemical Society* 134 (46): 19287–96. doi:10.1021/ja309760g.

- Pan, Chensong, Songyun Xu, Houjiang Zhou, Yu Fu, Mingliang Ye, and Hanfa Zou. 2006. "Recent Developments in Methods and Technology for Analysis of Biological Samples by MALDI-TOF-MS." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (1): 193–204. doi:10.1007/s00216-006-0905-4.
- Paulasova, Petra, and Franck Pellestor. 2004. "The Peptide Nucleic Acids (PNAs): A New Generation of Probes for Genetic and Cytogenetic Analyses." *Annales de Génétique* 47 (4): 349–58. doi:10.1016/j.anngen.2004.07.001.
- Pooga, Margus, Mattias Hällbrink, Matjaz Zorko, and Ülo Langel. 1998. "Cell Penetration by Transportan." *FASEB J*, January, 67–77.
- Saar, Külliki, Maria Lindgren, Mats Hansen, Emelía Eiríksdóttir, Yang Jiang, Katri Rosenthal-Aizman, Meeri Sassian, and Ülo Langel. 2005. "Cell-Penetrating Peptides: A Comparative Membrane Toxicity Study." *Analytical Biochemistry* 345 (1): 55–65. doi:10.1016/j.ab.2005.07.033.
- Schwarze, Steven R., Alan Ho, Adamina Vocero-Akbani, and Steven F. Dowdy. 1999. "In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse." *Science* 285 (5433): 1569–72.
- Soomets, Ursel, Maria Lindgren, Xavier Gallet, Mattias Hällbrink, Anna Elmquist, Lajos Balaspiri, Matjaz Zorko, Margus Pooga, Robert Brasseur, and Ülo Langel. 2000. "Deletion Analogues of Transportan." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1467 (1): 165–176.
- Tymoczko, John L., Jeremy M. Berg, and Lubert Stryer. 2016. *Biokeemia. Lühikursus*. TTÜ kirjastus. Vol. W. H. Freeman and Company. Tallinn.
- Universal Protein Resource*. n.d. [http://www.uniprot.org/blast/?about=Q04756\[1-35\]&key=Signal peptide](http://www.uniprot.org/blast/?about=Q04756[1-35]&key=Signal%20peptide).
- Veiman, Kadi-Liis, Imre Mäger, Kariem Ezzat, Helerin Margus, Tõnis Lehto, Kent Langel, Kaiko Kurrikoff, et al. 2013. "PepFect14 Peptide Vector for Efficient Gene Delivery in Cell Cultures." *Molecular Pharmaceutics* 10 (1): 199–210. doi:10.1021/mp3003557.
- Vives, Eric, Priscille Brodin, and Bernard Lebleu. 1997. "A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus." *Journal of Biological Chemistry* 272 (25): 16010–16017.
- Ziegler, André. 2008. "Thermodynamic Studies and Binding Mechanisms of Cell-Penetrating Peptides with Lipids and Glycosaminoglycans." *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (4–5): 580–97. doi:10.1016/j.addr.2007.10.005.

Zorko, M, and U Langel. 2005. "Cell-Penetrating Peptides: Mechanism and Kinetics of Cargo Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (4): 529–45. doi:10.1016/j.addr.2004.10.010.

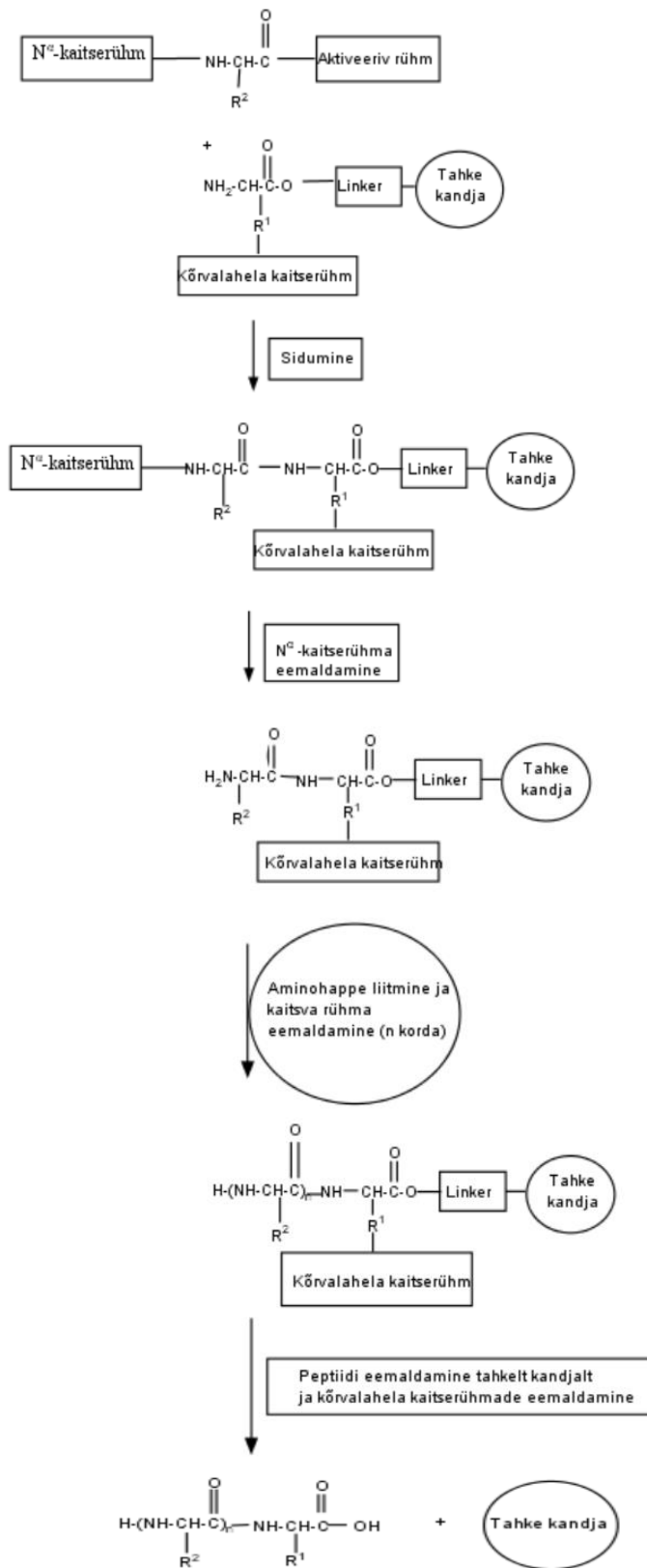
## **Tänuõnad**

Sooviksin siiralt tänada oma juhendajaid, Ly Pärnastet, kelle toetus, vastutulelikkus ja meisterlik juhendamine aitas väga palju kaasa mu lõputöö valmimisele, ja Kadri Künnapuud asjakohaste nõuannete ja toetava suhtumise eest. Tänan ka Piret Arukuuske laboritöö juhendamise ning igakülgse toetuse eest.

Samuti tahan tänada kogu molekulaarse biotehnoloogia laborigruppi abivalmiduse ja meeldiva õhkkonna loomise eest.

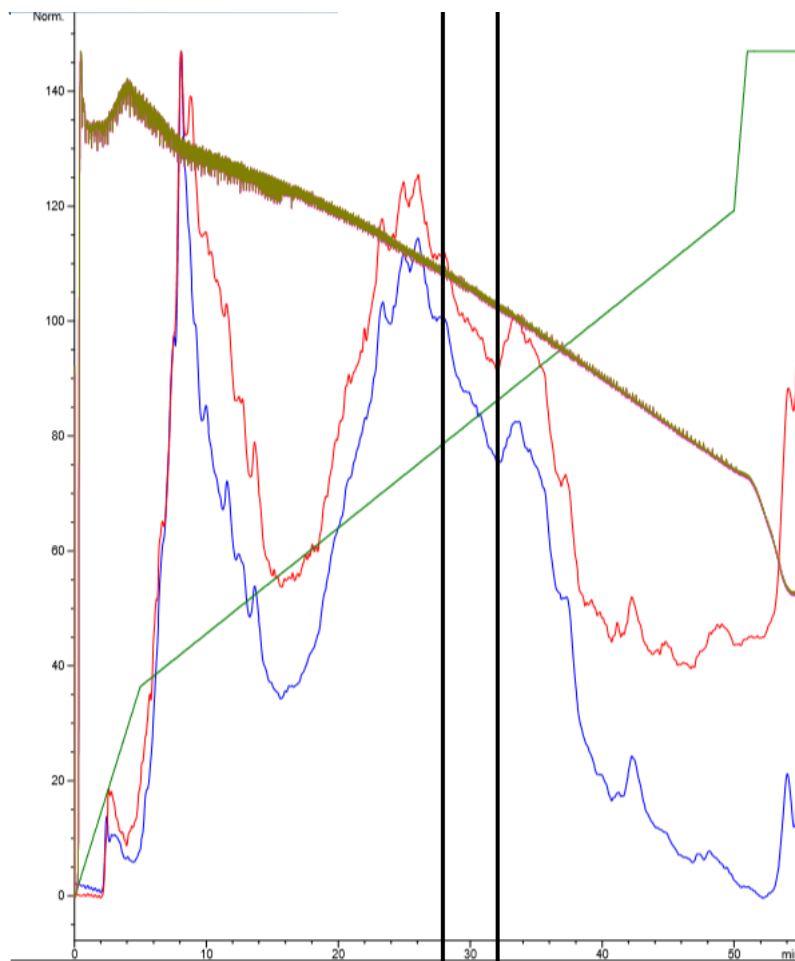
## **8. LISAD**

# LISA 1

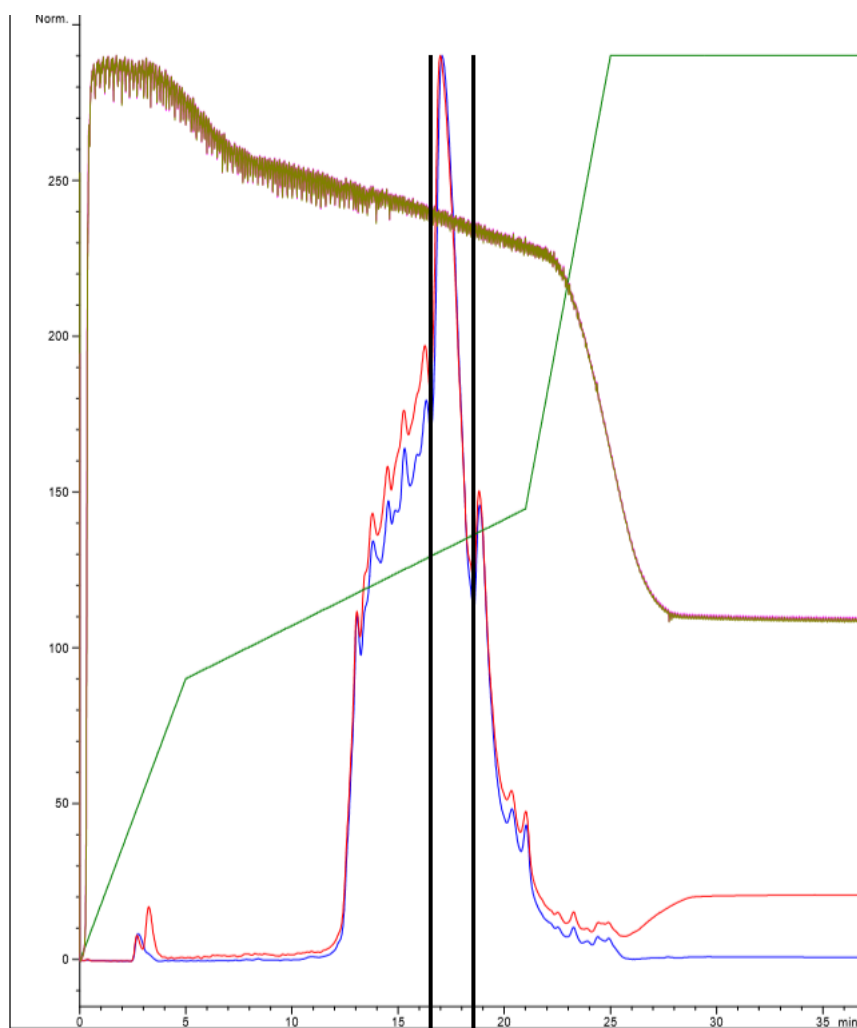


Joonis 10. Tahkel faasil põhineva peptidisünteesi üldskeem

## LISA 2

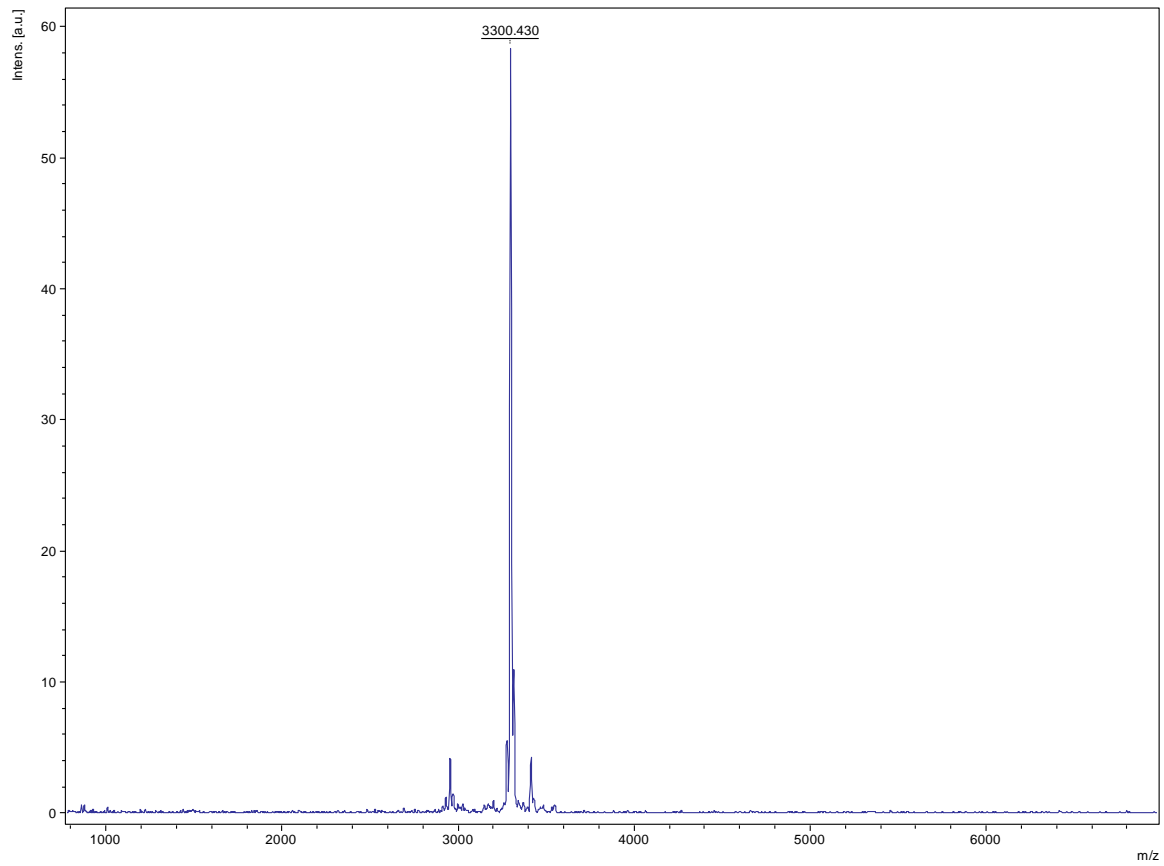


**Joonis 11.** (L)<sub>10</sub>-PF14 puhastus RP-HPLC-ga. Kogutud (L)<sub>10</sub>-PF14 sisaldav fraktsioon on kahe vertikaalse musta joone vahel. (L)<sub>10</sub>-PF14. Peptiid elueerus 64% atsetonitrili juures.

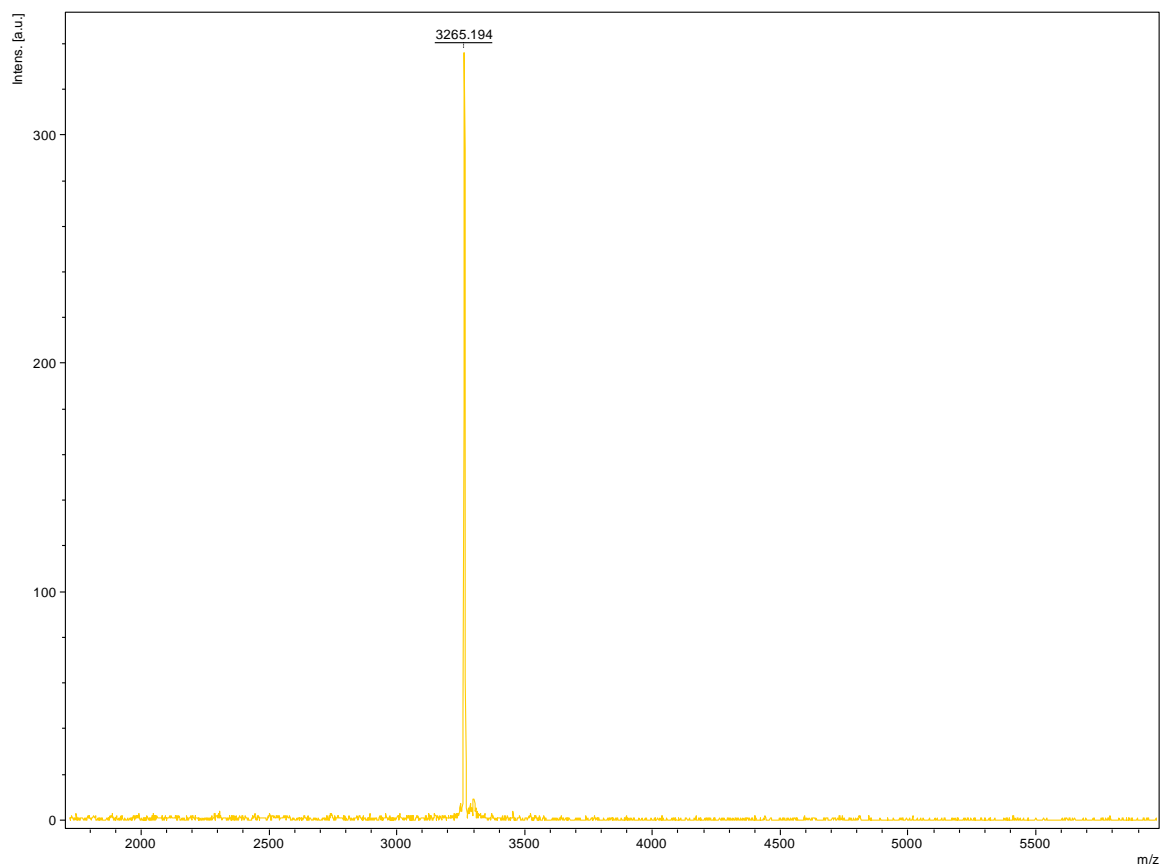


**Joonis 12.** (W)<sub>6</sub>-PF14 puhastus RP-HPLC-ga. Kogitud (W)<sub>6</sub>-PF14 sisaldav fraktsioon on kahe vertikaalse musta joone vahel. Peptiid elueerus 58% atsetonitrili juures.

### LISA 3



**Joonis 13.**  $(L)_{10}$ -PF14 MALDI-TOF massispekter pärast puhastamist



**Joonis 14.**  $(W)_6$ -PF14 MALDI-TOF massispekter pärast puhastamist

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Janely Sojone

(sünnikuupäev: 19.07.1995)

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

PepFect14 analoogide süntees ja testimine rakukultuuris,

mille juhendajad on Ly Pärnaste ja Kadri Künnapuu,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, (24.05.2017)