

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Keemia Instituut

Tuule Treiberg

**Rakku sisenevale peptiidile NickFect55 vähispetsiifilise peptiidse fragmendi lisamine**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendaja: *PhD* Piret Arukuusk

Tartu 2017

## Sisukord

Infoleht.....	4
Kasutatud lühendid .....	5
1. Sissejuhatus.....	7
2. Kirjanduse ülevaade.....	8
2.1 Rakku sisenevad peptiidid .....	8
2.1.1 NickFectid.....	9
2.2 Kasvajad sihtivad peptiidid.....	10
2.3 Peptiidsüntees .....	10
2.3.1 Peptiidside.....	11
2.3.2 Tahke faasi süntees .....	11
2.3.3 Tahke kandja.....	14
2.3.4 Kaitserühmad .....	14
2.4 Pöördfaas kõrgrõhu-vedelikkromatograafia (RP-HPLC).....	15
2.5 <i>Click</i> -reaktsioon .....	16
2.5.1 Vask(I)-katalüüsitud <i>click</i> -reaktsioon.....	16
3. Eksperimentaalne osa.....	18
3.1 Töö eesmärgid.....	18
3.2 Kasutatavad reagentid .....	18
3.3 Sünteesitavad peptiidid ja nende disain .....	18
3.4 Peptiidsüntees .....	19
3.5 Vask(I)-katalüüsitud <i>click</i> -reaktsioon.....	20
3.6 Peptiidide puhastamine ja massispektromeetria .....	21
3.7 RSP efektiivsuse hindamine <i>in vitro</i> tingimustes .....	22
4. Tulemused ja arutelu.....	23
4.1 Peptiidide süntees.....	23
4.2 Vask(I)-katalüüsitud <i>click</i> -reaktsioon.....	24
4.3 RSP efektiivsuse hindamine <i>in vitro</i> tingimustes .....	26
5. Kokkuvõte.....	28
6. Summary .....	29
7. Kasutatud kirjandus .....	30

Lisad.....	32
Lisa 1.....	32
Lisa 2.....	35
Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ....	38

Infoleht

### **Rakku sisenevale peptiidile NickFect55 vähispetsiifilise peptiidse fragmendi lisamine**

Rakku sisenevad peptiidid on sobivad transportvektorid ravimiarenduses tänu oma võimele transportida kõrgmolekulaarseid ühendeid ravi eesmärgil läbi rakumembraani. Kuna rakku sisenevad peptiidid on mittespetsiifilised – nad võivad siseneda kõikidesse rakkudesse, on oluline parandada rakku siseneva peptiidi kui transportvektori spetsiifilisust.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks on lisada rakku sisenevale peptiidile NickFect55 kasvajaspetsiifiline peptiidijärjestus CREKA kahe meetodiga – tahke faasi peptidiidisünteesi ning *click*-reaktsiooniga, puhastada saadud sünteesiproduktid RP-HPLC-ga ning testida saadud peptiidide bioloogilist aktiivsust *in vitro* tingimustes.

Märksõnad: rakku sisenev peptiid, kasvajat sihtiv peptiid, *click*-reaktsioon, tahke faasi peptidiidisüntees

CERCS kood: T490 Biotehnoloogia

### **Addition of a tumor homing peptide to a cell-penetrating peptide, NickFect55**

Cell-penetrating peptides are suitable transport vectors for drug delivery due to its ability to transport big macromolecules through the cell membrane. Since cell-penetrating peptides are non-specific – they are able to enter all the cells, it is important to modify the specificity of the cell-penetrating peptide as a transport vector.

The aim of this Bachelor's thesis was to synthesise a cell-penetrating peptide NickFect55 and to add to the peptide a tumor homing peptide CREKA with two different methods – solid-phase peptide synthesis and click-reaction, then to purify the products with RP-HPLC and to test the efficiency of the peptides *in vitro*.

Keywords: cell-penetrating peptide, tumor homing peptide, click-reaction, solid-phase peptide synthesis

CERCS code: T490 Biotechnology

## Kasutatud lühendid

ACN	atsetonitriil
BSA	veise seerumi albumiin ( <i>bovine serum albumin</i> , ingl k)
Bzl	bensüülrühm
CuAAC	vask(I)-katalüüsüd alküün-asiid tsükloliitumisreaktsioon
DCM	diklorometaan
DIEA	diisopropüületüülamiin
DMF	N,N-dimetüülformamiid
DNA	desoksüribonukleiinhape
EDT	1,2-etaanditiool
Fmoc	9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüül rühm
HBTU	N-[1H-bensotriasool-1-üül](dimetüülamino)metüleen]-N-metüülmetaanamiinium heksafluorofosfaat N-oksiid
HF	vesinikfluoriidhape
HOBt	1-hüdroksübensotriasool
KCN	kaaliumtsüaniid
MALDI-TOF	maatriks assisteeritud laserdesorptsioonionisatsioon-lennuaja massispektromeetria ( <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i> , ingl k)
NF	rakku sisenev peptiid NickFect
NMP	N-metüül-2-pürrolidoon
OBt	bensotriasool
PBS	fosfaatpuhverdatud füsioloogiline lahus ( <i>phosphate-buffered saline</i> , ingl k)
pDNA	plasmiidne DNA, plasmiid
PF3	rakku sisenev peptiid PepFect3
pGL3	promega reportergeeni ekspressioonivektor
PyBOP	bensotriasool-1-üül-oksütripürrolidinofoosooniumheksafluorofosfaat
RLU	suhtelised luminesentsi ühikud ( <i>relative luminescence units</i> , ingl k)
RNA	ribonukleiinhape
RP-HPLC	pöördfaas kõrgrõhu-vedelikkromatograafia
RSP	rakku sisenev peptiid
RPMI 1640	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i> (ingl k) 1640 rakusööde
SPPS	tahke faasi peptiidisüntees ( <i>solid-phase peptide synthesis</i> , ingl k)

<i>t</i> -Boc	<i>tert</i> -butüüloksükarbonüül rühm
TBTA	tri(1-bensüül-[1,2,3]-triasool-4-üülmetüül)amiin
TBTU	O-(bensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüülurooniumtetrafluoroboraat
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butüül rühm
TFA	trifluoroädikhape
TIS	triisopropüülsilaan
TP10	transportaan 10

## 1. Sissejuhatus

Vähk on haigus, mis tapab miljoneid inimesi igal aastal ning seetõttu on vähiravimite disainimine üks teadlaste kõige suurematest väljakutsetest. Kuna enamik vähiravimeid pole piisavalt spetsiifilised ning tapavad lisaks kasvajarakkudele ka terveid rakke, on oluline parandada ravimite spetsiifilisust.

Üks võimalus vähiraviks on geeniteraapia. Geeniteraapia korral kasutatakse nukleiinhappe molekulile ravi eesmärgil. Kuna nukleiinhappe molekulid võivad rakuvälises keskkonnas ensüümide toimele laguneda ning neil puudub võime läbida rakumembraani, on vaja kasutada transportvektoreid nukleiinhapete transpordiks rakku. Transportvektoreid on kahte tüüpi – viiruslikud ja mitteviiruslikud vektorid.

Viiruslikud vektorid on küll efektiivsed transportvektorid, kuid neil on ka mitmeid puudusi, näiteks toksilisus ning võime põhjustada immuunreaktsiooni. Nii ongi nende puuduste kompenseerimiseks arendatud mitmeid alternatiive, näiteks rakku sisenevaid peptiide (RSP). Rakku sisenevad peptiidid on sobivad transportvektorid ravimiarenduses tänu oma võimele transportida endaga seotud makromolekule läbi rakumembraani. Makromolekule on võimalik konjugeerida peptiidi külge ning hiljem rakus bioloogiliste protsesside abil vabastada. Üks puudujääk on aga rakku sisenevate peptiidide mittespetsiifilisus, mis tuleneb nende võimest siseneda kõikidesse rakkudesse.

Üks võimalus rakku sisenevate peptiidide spetsiifilisuse parandamiseks on kasvajat sihtivad peptiidijärjestused, mis on võimelised ära tundma erinevaid kasvajaid või nendega seotud keskkondi. Kasvajat sihtivaid peptiidijärjestusi saab rakku sisenevale peptiidile lisada mitmel erineval meetodil. Üks meetod on *click*-reaktsioon, millega on võimalik efektiivselt lihtsa reaktsiooni tulemusena konjugeerida omavahel erinevaid molekule, mis sisaldavad kindlaid funktsionaalrühmi. Teine võimalus on kasutada tahke faasi peptiidisünteesi ning sünteesida terve RSP koos sihtiva järjestusega.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks on lisada rakku sisenevale peptiidile NickFect55 kasvajaspetsiifiline peptiidijärjestus CREKA kahel eelnevalt mainitud meetodil, puhastada saadud sünteesiproduktid RP-HPLC-ga ning teha kindlaks saadud peptiidide bioloogiline aktiivsus *in vitro* tingimustes.

Töös kirjeldatud katsed on läbi viidud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.

## 2. Kirjanduse ülevaade

### 2.1 Rakku sisenevad peptiidid

Rakumembraani hüdrofoobsed omadused muudavad selle makromolekulidele läbimatuks. Selleks, et edukalt transportida kõrgmolekulaarseid aineid ravi eesmärgil läbi rakumembraani, on üks võimalik strateegia kasutada rakku sisenevaid peptiidide. Esimene rakku sisenev peptiid avastati aastal 1988, kui leiti, et HI-viiruse transkriptsiooni trans-aktivaatori (Tat) valgu osa on võimeline translokatsiooniks läbi rakumembraanide. Aastad hiljem avastati ka efektiivselt rakumembraani läbiv peptiid penetratiin, mis pani aluse suurele rakku sisenevate peptiidide gruppide kasvule. Neid rakku sisenevaid peptiide võib liigitada nende hüdrofoobsuse, amfipaatsuse, katioonsuse ja anioonsuse alusel. [1]

Rakku sisenevad peptiidid on suhteliselt lühikesed peptiidid, mis koosnevad 5-30-st aminohappest ja on võimelised rakku sisenema ning rakku viima ka endaga seotud lastmolekuli, seda ka väikeste mitte-toksiliste kontsentratsioonide juures, mis teeb neist sobivad transportvektorid ravimiarenduses. Tüüpiliselt omavad RSP-d positiivset laengut, mis hõlbustab elektrostaatilisi interaktsioone rakku katva membraani negatiivselt laetud pinna komponentidega, nagu glükoosaminoglükaanide ja siaalhapetega, mis on esimeseks sammuks enne membraani läbimist. [1]

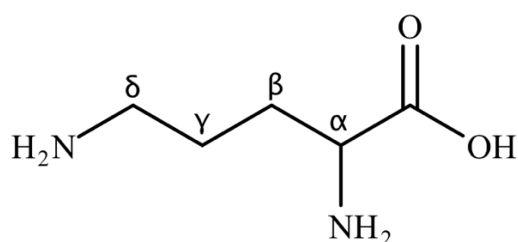
RSP-de transporditavad molekulid seotakse peptiidide külge kovalentselt või mittekovalentsete kompleksidena. Kovalentselt konjugeeritakse lastmolekulid peptiidi külge näiteks disulfiidsidemete või tioestersidemete kaudu, mittekovalentsed kompleksid moodustuvad aga RSP-de positiivse laengu tõttu läbi elektrostaatiliste ja hüdrofoobsete interaktsioonide negatiivselt laetud lastmolekulidega, milleks võib olla näiteks väike interferiv RNA (siRNA), mikro-RNA (miRNA), plasmiidne DNA (pDNA), jt. [2]

Soovitud bioloogilise efekti saavutamiseks peab lastmolekul aga peptiidi küljest rakusisestes tingimustes vabanema. Kovalentsete sidemete korral püsivad sidujad, näiteks disulfiidsidemed või tioestersidemed, rakuvälistes tingimustes piisavalt stabiilsena, kuid rakusisestes tingimustes sidemed lagunevad ning lastmolekul vabaneb. Mittekovalentsete komplekside korral vabaneb lastmolekul rakusisestes tingimustes ilmselt samuti rakusisese keskkonna tõttu, kas endosomaalse pH languse või mõne muu teguri tõttu. Levinum on mittekovalentne lastmolekulide moodustumise strateegia transpordiks tänu mugavale proovi ettevalmistusele ning lihtsasti varieeritavale RSP ja lastmolekuli suhtele. [2]



### 2.1.1 NickFectid

NickFectid on grupp rakku sisenevaid peptiide, mis on keemiliselt modifitseeritud stearooliseeritud transportaan 10 (TP10) ehk PepFect3 (PF3) põhjal. [3] NickFect51 on üks näide sellesse gruppi kuuluvast peptiidist, mille korral 7.positsioonis asuv lüsiin, mis seob TP10 järjestusse kuuluva neuropeptiidi galaniini ja mastorpaani jäägid, on asendatud ornitiiniga ning sünteesi on jätkatud erinevalt tavalisest sünteesist, kus jätkatakse  $\alpha$ -amino rühmaga, ornitiini  $\delta$ -amino rühmast. Nii saavutatakse parem pDNA kompleksi sidumise võime ja endosoomidest vabanemine, mis tähendab ka transfektsiooniefektiivsuse paranemist. [4]



Joonis 1. Ornitiini struktuur

NickFect55 on NickFect51 analoog, kus 19.postitsioonis asuv positiivselt laetud lüsiin on asendatudalaniiniga, tänu millele moodustub selgelt eraldiseisev hüdrofiilne piirkond peptiidi  $\alpha$ -heeliksi ehituses, mis omakorda parandab mitmekordselt peptiidi geeniekspressiooni võrreldes NickFect51-ga. [5]

Tabel 1. Näiteid erinevate peptiidide aminohappelistest järjestustest.

Peptiid	Järjestus	Ref
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH <sub>2</sub>	[6]
PF3	Stearoüül-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH <sub>2</sub>	[7]
NF51	Stearoüül-AGYLLGO*INLKALAALAKKIL-NH <sub>2</sub>	[4]
NF55	Stearoüül-AGYLLGO*INLKALAALAKAIL-NH <sub>2</sub>	[5]

O\* – süntees on jätkatud  $\delta$ -amino rühmast

## 2.2 Kasvajad sihtivad peptiidid

Kasvajad sihtivad peptiidid on tänapäeval väga tähtis valdkond ravimiarenduses, mis tuleneb nende kõrgest spetsiifilisusest ära tunda kasvajakarakke ning kasvajaga seotud keskkondi. Tänu sellele on võimalik vähendada ravimi ebaspetsiifilisusest tulenevaid võimalikke kõrvalmõjusid. Need peptiidid on võimelised sihtima erinevat tüüpi kasvajaid, nii rinna, kopsu, eesnäärme, melanoomi, käärsoole jt, tänu nende tugevale afiinsusele kindla retseptori või markeri suunas. Sellised markerid esinevad tihti paljudes kasvajates ja nende veresoontes. [8] Kasvajad sihtivaid peptiidseid järjestusi on detekteeritud üha rohkem. Üks peptiidijärjestus, mis on võimeline efektiivselt sihtima kasvajakarakke on CREKA (tabel 2). Esmalt prooviti selle võimekust faagimeetodit kasutades *in vivo*, mis näitas üles peptiidi head selektiivsust kasvajate veresoontele. Katsetades aga CREKA järjestust tavalistes kudedes oli peptiid tuvastamatu, seda nähtust põhjustab ilmselt suur hüübinud plasmavalkude hulk kasvaja stroomas ja veresoonte seintel. CREKA spetsiifilisus kasvajakarakkude sihtimisel seisneb aga kinnitumises fibriini ja fibriiniga seondunud hüübinud plasmavalkude külge. CREKA peptiidijärjestus on näidanud *in vivo* analüüsi korral kasvajaspetsiifilisust nii transgeense rinnavähi kui ka [9] eesnäärmevähi vastu. [10]

Tänu oma lühikesele lineaarsele järjestusele on CREKA ka hea spetsiifilisuse parandaja rakku sisenevatele peptiididele. Kombineerides omavahel rakku siseneva peptiidi ning kasvajat sihtiva peptiidi on võimalik saada spetsiifilist kasvajat sihtiva RSP-i, millega on võimalik efektiivselt transportida lastmolekule läbi rakumembraani. [11]

## 2.3 Peptiidisüntees

Peptiidisüntees on osa orgaanilisest sünteesist, mille korral aminohapped liidetakse omavahel amiid- ehk peptiidsidemetega, moodustades peptiide.

Peptiidide keemia algusaastaks võib lugeda aastat 1901, mil E. Fischer ning E. Fourneau avaldasid teadusartikli dipeptiidi glütsüülglütsiini sünteesist hüdroolüüsides glütsiini diketopiperasiiniks. Aastate jooksul täiendasid keemikud erinevaid peptiidisünteesi meetodeid, kuid läbimurre toimus aastal 1963 kui B. Merrifield avaldas artikli, mis selgitas tema leiu – tahke faasi peptiidisünteesi (SPPS) – põhimõtteid ja rakendusi. [12]

Erinevalt vedelfaasi peptiidisünteesist, mille korral peale iga reaktsiooni peab produkti enne järgmist sammu isoleerima ja puhastama, on sünteesitav peptiid tahke faasi meetodi korral kinnitatud mittelahustuva polümeeri külge, seetõttu peale iga reaktsioonisammu on

kõrvalsaadused lihtsalt eemaldatavad filtreerimise ja pesuga. [12] Lisaks saab sellise süsteemiga suures kõrgete kontsentratsioonidega reagentide liias viia sidumisreaktsioone lõpuni ning kõik sünteesisammud läbi viia samas reaktsiooninõus ilma materjali kaota. [13]

### 2.3.1 Peptiidside

Peptiidside ehk amiidside on kovalentne side, mis tekib kahe aminohappe vahel kui ühe aminohappe karboksüülrühma süsinikuaatom jagab elektrone teise aminohappe lämmastikuaatomiga ning reaktsiooni käigus eraldub vesi. [14] Kuna tegemist on kondensatsioonireaktsiooniga, mis nõuab täiendavat energiat, kuid peptiidisünteesi reaktsioon viiakse läbi toatemperatuuril või isegi madalamal temperatuuril, on vajalik kas karboksüül- või aminorühma aktiveerimine. [15]

Karboksüül- või aminorühma aktiveerimine toimub sobivate reagentidega. Esimesed kasutatavad aktiveerivad reagentid olid karbodiimiidid. Vähendamaks aga karbodiimiide kasutades tekkivat epimerisatsiooni, võeti lisainena kasutusele ka HOBt, mis tekitab aktiivse OBt estri, suurendades aktiveeritud estri reaktiivsust ning stabiliseerides amiini sidumist läbi vesiniksidemete. [16] Teised aktiveerivad reagentid on fosfooniumil põhinev sool PyBOP ja amiiniumil/urooniumil põhinevad soolad TBTU ja HBTU. Need reagentid muudavad  $\alpha$ -amino kaitstud aminohapped samuti neile vastavateks OBt estriteks, vältides aktiveeritud rühma ratsemisatsiooni. Vajalik on ka tertsiarse amiini, tavaliselt diisopropüületüülamiini (DIEA) olemasolu, et moodustada  $\alpha$ -amino kaitstud aminohapetest karboksülaate, mis reageeriks aktiveerivate reagentidega. [13]

### 2.3.2 Tahke faasi peptiidisüntees

Tahke faasi peptiidisünteesi korral kasutatakse  $\alpha$ -amino ja kõrvalahela kaitserühmade suhtes enim kahte põhilist strateegiat – *t*-Boc/Bzl ja Fmoc/*t*-Bu. [13]

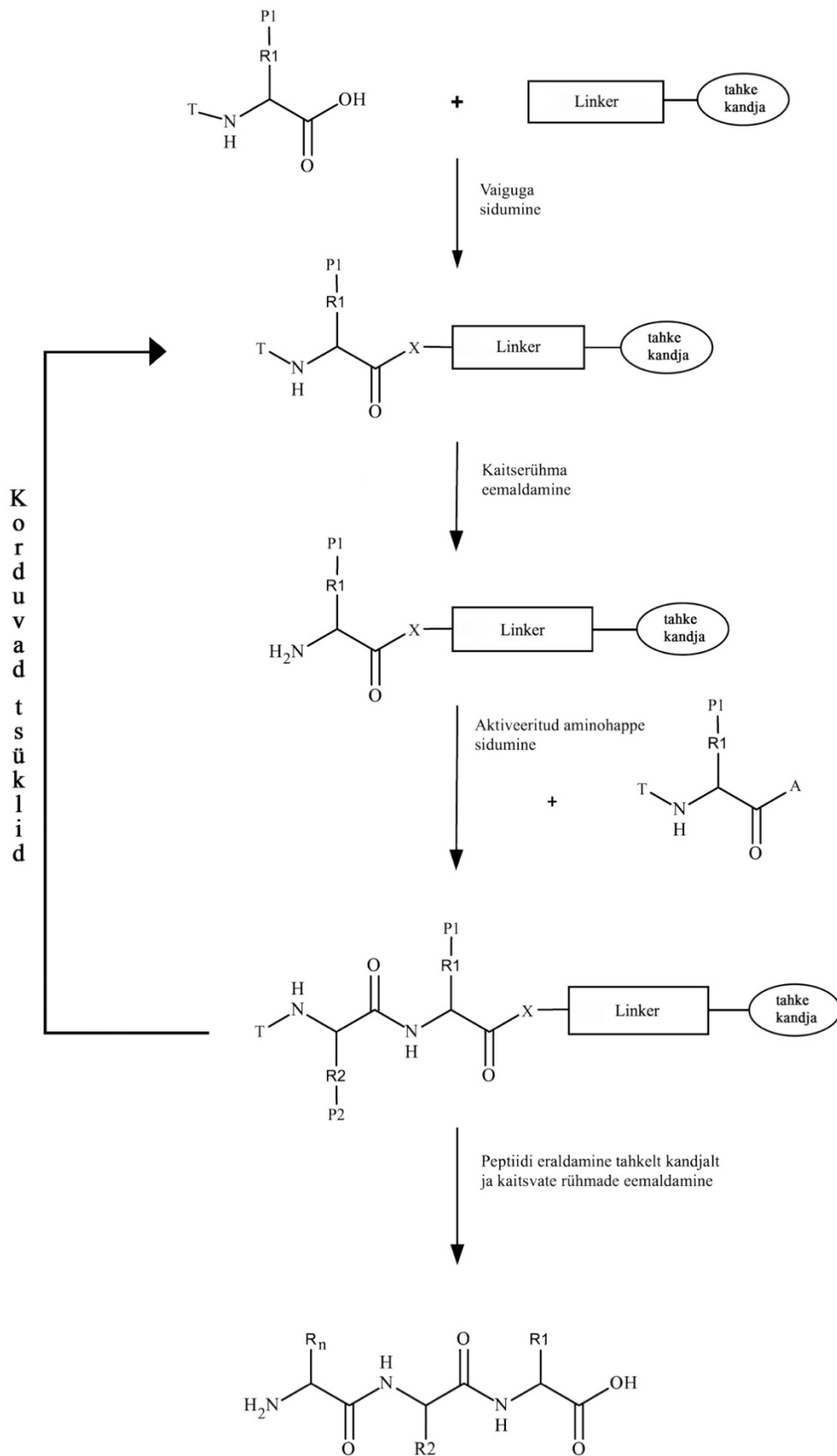
*t*-Boc/Bzl strateegia põhineb aminohapete kõrvalrühmade astmelisel happe-labiilsusel. Selle lähenemise korral eemaldatakse *t*-Boc-kaitserühm happega, näiteks puhta trifluoroäädikhappega (TFA) või TFA-ga DCM-s ning kõrvalahela kaitsvad rühmad ja peptiidi-tahke kandja linker eemaldatakse sünteesi lõpus tugeva happega, nagu veevaba vesinikfluoriidhappega (HF). Kuigi see meetod võimaldab efektiivselt sünteesida suuri peptiide ning väikeseid proteiine, on tugeva happe HF kasutamine väga mürgine ning tugevalt

happeline keskkond võib põhjustada muutusi hapraid järjestusi sisaldavate peptiidide struktuuris. [13]

Fmoc/*t*-Bu meetod põhineb aga ortogonaalse kaitserühma strateegial. Selle meetodi korral kaitstakse  $\alpha$ -amino rühmad, happe-labiilsed kõrvalahela kaitsvad rühmad ning happe-labiilsed linkerid, mis moodustavad C-terminaalse aminohappe kaitserühma, alus-labiilse Fmoc-grupiga. Strateegia eeliseks on ajutiste ja püsivate ortogonaalsete kaitserühmade eemaldamine erinevate mehhanismidega, mistõttu lõplik kaitserühmade eemaldamine ning peptiidi lõikamine vaigult saab toimuda leebemates happelistes tingimustes. Fmoc-il põhinev strateegia on enimkasutatud meetod tahke faasi peptiidisünteesiks. [13]

Esimene SPPS samm on  $\alpha$ -amino kaitstud rühmaga C-terminaalse aminohappejäägi kinnitamine tahke kandja külge ester- või amiidsideme abil, olenevalt soovitud peptiidi C-terminaalsest funktsionaalrühmast, vastavalt kas hape või amiid. [17] Aminohapped, mille kõrvalahela reageerivad rühmad on kaitstud püsivate kaitserühmadega, seotakse omavahel  $\alpha$ -amino rühma abil. Peale aminohappe kinnitumist pestakse ja filtreeritakse tahke kandja sobivate solventidega, et eemaldada reagentide liig ning kõrvalproduktid.

Aminohapete kinnitumine tehakse kindlaks Kaiseri testiga, mis on kvalitatiivne test näitamaks vabade aminohapperühmade olemasolekut või puudumist. Test põhineb ninhüdrüüni reageerimisel primaarsete amiinidega, mis annab iseloomuliku tumesinise värvuse. Järgmisena eemaldatakse tekkinud peptiidi  $\alpha$ -amino kaitsev rühm, mida nimetatakse ka deprotekteerimiseks, ning tahke kandja pestakse ja filtreeritakse uuesti, et eraldada reagentide liig ning kõrvalproduktid. Tsükli korratakse kuni soovitud peptiidijärjestus on saavutatud. [18] Viimasel sammul eemaldatakse kõrvalahela kaitsvad rühmad ning peptiid tahke kandja küljest tugeva happega, milleks on tavaliselt kontsentreeritud TFA. Selle protseduuri korral võivad aga kõrvalahela kaitsvad rühmad toota stabiilseid karbokatioone, mis omakorda võivad reageerida elektronirohkete aminohapete kõrvalahelatega põhjustades soovimatuid kõrvalprodukte. Selle nähtuse vähendamiseks lisatakse eemaldamissegusse teatud aineid, näiteks diisopropüülsilaani ja 1,2-etaanditooli, mis kõrvaldavad tekkivaid karbokatioone [13]



Joonis 2. Tahke faasi sünteesi põhimõte, kus P1 ja P2 on kõrvalahela kaitserühmad, T  $\alpha$ -amino kaitserühm, X vastavalt kas NH või O ning A aktiveeriv karboksüülrühm.

### 2.3.3 Tahke kandja

Esimene nõue edukaks peptiidisünteesiks tahkel kandjal on sobiv tahke kandja – polümeer. Sobiv polümeer peab olema lahustumatu kõikides kasutatavates solventides ning omama filtreerimist võimaldavat stabiilset füüsilist olekut. Samuti peab polümeer sisaldama funktsionaalset rühma, mille külge esimene kaitstud rühmaga aminohape saaks kindlalt kovalentse sideme abil kinnituda. [12]

Algselt prooviti polümeeridena tselluloosi, polüvinüülalkoholi, polümetakrolaati ja sulfoonitud polüstireeni. Kõige paremini töötas klorometüülitud kopolümeer stüreenist ja divinüülbenseenist. Selline tahke kandja, mis on 200-400 poorse helme kujul, moodustab poorse geeli struktuuri, võimaldades reagentide tungimist pooridesse, eriti punduvate solventide juuresolekul. [12]

C-terminaalse peptiidisünteesi, mille C-terminuses asub amiid, kõige tihedamini kasutatavad tahked kandjad on rink-amiid, Pal ja Sieber. [13]

### 2.3.4 Kaitserühmad

Peptiidisüntees põhineb reagentide ja katalüsaatorite koostööl uute sidemete tekke saavutamisel, mille jaoks on aga vajalik sobivate kaitsvate rühmade kasutamine, vältimaks soovimatute sidemete teket ning kõrvalreaktsioone. Seetõttu on aminohapete  $\alpha$ -aminorühmade kaitsmine üks kõige olulisematest probleemidest peptiidide keemias ning samuti kohustuslik aktiveeritud aminohapete polümeriseerumise vältimiseks. [19]

Kuna enamik peptiidisünteesi viiakse läbi suunal  $\alpha$ -süsinikust  $\alpha$ -lämmastikuni, eemaldatakse sünteesi käigus mitmeid kordi  $\alpha$ -amino kaitserühmi. Kaitserühmade eemaldamine peab seetõttu toimuma leebetes tingimustes, mis ei mõjuta kõrvalahelate kaitsvaid rühmi või peptiidiahelat. Püsivad kaitserühmad eemaldatakse tavaliselt sünteesi viimases etapis ja poolpüsivad kaitserühmad, mis asuvad tavaliselt C-terminuses, on eemaldatavad kõikide teiste kaitsvate rühmade juuresolekul kui peptiid on seotud C-terminusest. [19]

$\alpha$ -amino kaitsev rühm peab lahustuma kõige sagedamini kasutatavates solventides ning ennetama või minimeerima epimiseerumist sidumise ajal, lisaks peab eemaldamine olema kiire, tõhus, piisavalt stabiilne, vältima kõrvalreaktsioone ning tekitama lihtsasti eemaldatavaid kõrvalsaadusi.

Kõige tuntumad  $\alpha$ -amino kaitsvad rühmad on 9-fluorenüülmetoksükarbonüül (Fmoc) ja *tert*-butüülmetoksükarbonüül (*t*-Boc) rühmad.

*t*-Boc-rühm on eemaldatav hapetega, ta on stabiilne aluste ja nukleofiilide suhtes, samuti ka katalüütilise hüdrogeenimise suhtes. Kõige sagedamini eemaldatakse *t*-Boc-rühma 25-50% TFA lahusega DCM-is.

Fmoc-rühm on eemaldatav alustega ning on stabiilne hapete suhtes. Enamasti eemaldatakse Fmoc-rühma sekundaarsete amiinidega, sest nad seondavad paremini eemaldamisel tekkivat dibensofulveeni. Sagedasti kasutatakse eemaldamiseks piperidiini, mis eemaldab Fmoc-rühma minutitega. [19]

## 2.4 Pöördfaas kõrgrõhu-vedelikkromatograafia (RP-HPLC)

Pöördfaas kõrgrõhu-vedelikkromatograafia (RP-HPLC) on laialt kasutatud meetod biomolekulide analüüsiks ning puhastamiseks, mille korral molekulid eraldatakse kolonnis nende hüdrofoobsuse põhjal. Meetodi suureks plussiks on tema lihtsus, kiirus, selektiivsus ning hea töövõime laias reaktsioonitingimuste vahemikus nii väga sarnaste molekulide kui ka struktuurselt erinevate molekulide korral, näiteks kaks peptiidi, mis erinevad teineteisest vaid metüülrühma poolest on täiesti eraldatavad. [20,21]

Molekulide eraldamine oleneb mobiilses faasis asuva analüüsitava molekuli hüdrofoobsetest interaktsioonidest hüdrofoobse ligandiga, mis on kinnitatud statsionaarse faasi ehk sorbendi külge. Sorbendiks on enamasti mittepolaarne silikageel, mille silanoolrühmad on asendatud *n*-alküülrühmaga. Soluuti sisaldav segu kantakse kõigepealt statsionaarse faasi külge vett sisaldava puhverlahuse kohalolekul. Tugevate veemolekulide vaheliste vesiniksidemete tõttu tõugatakse soluudimolekulid sorbendi alküülrühmade külge ning need elueeritakse jällegi kolonnist väljutamiseks mobiilsesse faasi orgaaniliste solventide lisamisega, mis kahjustab mõneti vee struktuuri ning seega ka veemolekulide vahelisi sidemeid. Elueerimine võib toimuda kas konstantse kontsentratsiooniga orgaanilise solventi lisamisega või gradiendiga elueerimisel, mille korral aja jooksul suurendatakse orgaanilise solventi kontsentratsiooni. See paneb soluudimolekulid eralduma ning kolonnist väljuma hüdrofoobsuse kasvu järgi. Enamasti kasutatakse peptiidide analüüsil orgaanilise solventina atsetonitrili, millele on lisatud ioonset teisendajat, näiteks trifluoroäädikhapet. [20]

Kõige enam kasutatakse RP-HPLC korral UV-VIS detektorit, mis mõõdab peptiidside me absorptsiooni 190-230 nm vahemikus. [21,22]

## 2.5 Click-reaktsioon

*Click*-reaktsiooni kirjeldati esimest korda täielikult K.B. Sharplessi, M.G. Finni ja H.C. Kolbi poolt aastal 2001. Inspireerituna loodusest, üritasid nad moodustada ühendeid sidudes väikseid ühikuid heteroatomsete sidemetega (C-X-C) nimetades sellised reaktsioonid *click*-reaktsioonideks ning määrates protsessile kindlad kriteeriumid. *Click*-reaktsioon peab olema modulaarne, laiaulatuslik, kõrge saagisega, moodustama ainult kahjutuid kõrvalprodukte, mis on lihtsalt eemaldatavad mitte-kromatograafiliste meetoditega, näiteks kristalliseerimise või destilleerimisega, ja olema stereospetsiifilised (aga mitte tingimata enantioselektiivsed). *Click*-reaktsioon omab lihtsaid reaktsioonitingimusi, ta peaks olema mittetundlik hapnikule ja veele, toimub lihtsate algmaterjalidega ja reagentidega ning solvendid on lihtsasti eemaldatavad. *Click*-reaktsiooni produkt peaks aga olema stabiilne füsioloogilistes tingimustes. *Click*-reaktsioonide klassifikatsioon jaguneb neljaks. Sinna alla kuuluvad küllastumata ühendite tsükloliitumisreaktsioonid, eriti 1,3-dipolaarsed tsükloliitumisreaktsioonid; nukleofiilsed asendusreaktsioonid, kus toimub tsükli avanemine; karbonüülrühmade keemia, näiteks urea moodustumine ja süsinik-süsinik kordsele sidemele liitumisreaktsioonid. [23]

*Click*-keemia on leidnud kasutust mitmetes uurimisvaldkondades, nii materjaliteaduses, polümeeride keemias kui ka farmaatsiateaduses. [24]

### 2.5.1 Vask(I)-katalüüsitud *click*-reaktsioon

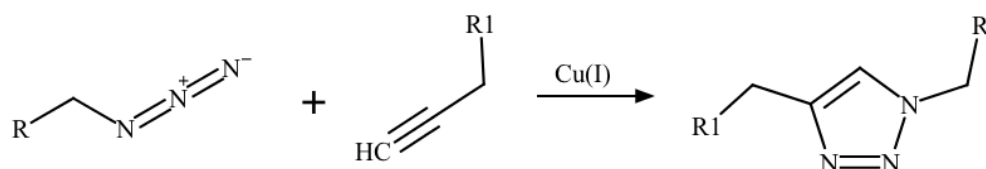
Kõige enim kasutatav "*click*"-reaktsioon, mis täidab kõik eelnevalt loetletud tingimused, on vask(I)-katalüüsitud asiid-alküün tsükloliitumisreaktsioon (CuAAC). [25] Reaktsiooni käigus reageerib asiidrühma sisaldav molekul terminaalset alküülrühma sisaldava molekuliga ning nende vahel moodustub stabiilne 1,2,3-triasoolne konjugaat. Kuna aga terminaalsete alküünid on üsna reaktsioonivõimetud asiidrühmade suhtes, sõltub efektiivne CuAAC reaktsioon tugevalt metallist katalüsaatori kohalolekust, milleks on vask oksüdatsiooniastmes +1. Sobiva vase oksüdatsiooniastme saavutamiseks kasutatakse erinevaid vaseühendeid ning redutseerijaid suures liias. Kõige sagedamini kasutatakse selleks Cu(II) soola CuSO<sub>4</sub> kombineerituna askorbaadiga redutseerijana, eriti biomolekulide märgistamiseks. [26]

1,2,3-triasooli moodustumine asiididest ja terminaalsetest atsetüleenidest on võimas sidumisreaktsioon tänu oma heale töövõimele erineva pH ja temperatuuri juures, täielikule spetsiifilisusele ja reagentide bioloogilisele sobivusele, mistõttu leiab reaktsioon laia kasutusala nii keemilistes kui ka bioloogilistes valdkondades. Tekkivad triasoolsed produktid



on sobivad passiivsed seondujad, mis oma võimele kaituda vesiniksideme doonorina, sarnaselt amiidi NH-rühmale, ning tugevale dipoolmomendile, võivad seostuda teiste amiididega ning seeläbi ka asendada amiidsidet peptiidide modifitseerimisel, eriti peptiidide kasutamisel ravimiarenduses. [26,27]

Üks takistus CuAAC reaktsioonisaaduste kasutuseks elusrakkudes transportvektoritena on aga vaseioonide toksilisus. Vähendamaks selle probleemi mõju, kasutatakse vaseioone kelaatavaid ligande, mis nii kiirendavad reaktsiooni kui ka hoiavad vaske õiges oksüdatsiooniastmes, kaitstes seeläbi biomolekuli oksüdeerumise eest. [26] Kõige populaarseim *click*-reaktsioonis kasutatav ligand on tri(1-bensüül-[1,2,3]-triasol-4-üülmetüül)amiin (TBTA), kuid ka teised vees lahustuvad ligandid on sobilikud. [29]



Joonis 3. Vask(I)-katalüüsitud *click*-reaktsioon, kus R ja R<sub>1</sub> tähistavad peaaahelaid

### 3. Eksperimentaalne osa

#### 3.1 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgid on:

- Sünteesida rakku sisenev peptiid NF55 ning lisada sellele kahe erineva meetodiga kasvajat sihtiv peptiidijärjestus CREKA.
- Puhastada saadud sünteesiproduktid kõrvalproduktidest RP-HPLC-ga.
- Testida sünteesitud peptiidide transfektsiooniefektiivsust *in vitro* tingimustes

#### 3.2 Kasutatavad reagensid

Töös kasutatavad reagensid ACN, DMF, DCM, naatriumaskorbaat, HOBt, TFA, piperidiin, DIEA, FBS, seariinhape, rakusööde RPMI 1640, asendatavate aminohapete lahus, penitsilliin, streptomütsiin, TIS ja metanool saadi Sigma-Aldrichist, NMP Scharlaust, HBTU ja aminoheksaanhape Alfa Aesarist, TBTA ja Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH AnaSpec Incist, želatiin ja PBS Naxost, naatriumpüruvaat Thermo Fisher Scientificust. Kaitserühmadega aminohapped saadi Iris Biotechist. Rink Amide-ChemMatrix® vaik Biotagest ning  $\alpha$ -tsüano-4-hüdroksükaneelhape Brukerist.

#### 3.3 Sünteesitavad peptiidid ja nende disain

Antud töös kasutati 4 peptiidi, millest autor sünteesis 3 peptiidi. NickFect55\* (NF55\*), sünteesiti käsitsi ning K(N<sub>3</sub>)AKERC (CREKA\*) ja NF55-CREKA sünteesiti automatiseeritud peptiidisüntesaatoriga (Biotage Initiator+ Alstra). Kontrollpeptiid NF55 sünteesiti laboris juhendaja poolt samuti automatiseeritud peptiidisüntesaatoriga.

Üks võimalus lisada rakku sisenevale peptiidile vähipetsiifilisuse parandamiseks kasvajat sihtiv peptiidijärjestus on vask(I)-katalüüsitud asiid-alküün tsüklooliitumisreaktsioon. See *click*-reaktsioon oma lihtsate läbiviimistingimuste ning puhastuse kergusega on ravimiarenduses hea moodus ravimidisainiks, kuna võimaldab erinevate molekulide sidumist justkui ehitusklotsidena uuteks soovitud molekulideks vaid mõne lihtsa etapiga. Vajalik on vaid kindlate funktsionaalrühmade olemasolu. Sobivate *click*-reaktsiooni reageerivate rühmade saamiseks lisati NF55 peptiidiahela C-terminusse terminaalset propalgüülrühma sisaldav

leutsiin, saades nii NF55\*. Lisaks terminaalsete propargüülrühmale on *click*-reaktsiooni jaoks vaja ka terminaalset asiidrühma, nii sünteesiti kasvajat sihtiva peptiidijärjestuse CREKA N-terminusse terminaalset asiidrühma sisaldav lüsiin, saades CREKA\*.

Teine võimalus rakku sisenevale peptiidile kasvajakpetsiifilise peptiidijärjestuse lisamine on tahke faasi peptiidisüntees. Sünteesi käigus lisati rakku sisenevale peptiidijärjestusele linker, mis eraldab kasvajakpetsiifilise peptiidijärjestuse RSP järjestusest. Selle töö puhul lisati NF55-le linkerina aminoheksaanhape, mis kinnitub sarnaselt aminohapetele ning aminoheksaanhappejäagi külge omakorda peptiidijärjestus CREKA.

Tabel 2. Sünteesitavate peptiidide järjestused ning molekulmassid

Nimi	Järjestus	Molekulmass
NF55	Stearoüül-AGYLLGO*INKALAALAKAIL-NH <sub>2</sub>	2377 g/mol
NF55*	Stearoüül-AGYLLGO*INLKALAALAKAILL(Pra)-NH <sub>2</sub>	2472 g/mol
CREKA*	K(N <sub>3</sub> )AKERC-NH <sub>2</sub>	735 g/mol
NF55- CREKA	Stearoüül-AGYLLGO*INLKALAALAKAIL-X-AKERC-NH <sub>2</sub>	3207 g/mol

O\* – süntees on jätkatud δ-amino rühmast

X – aminoheksaanhappe jääk

Pra – propargüülrühm

### 3.4 Peptiidisüntees

Töös kasutatavad peptiidid sünteesiti Fmoc/*t*-Bu tahke faasi sünteesimeetodit kasutades. Tahke kandjana kasutati Rink Amide-ChemMatrix® polümeeri funktsionaalsete rühmade hulga 0,45 mmol/g. Süntees viidi läbi skaalas 0,125 mmol, st iga sünteesi korral võeti vaiku 0,278 g ning enne aminohapete kinnitamist lasti tahkel kandjal punduda mitukümmend minutit DCM-s. Aminohapped võeti 5-kordses ülehulgas ning sidumisreaktsioon teostati 45 minuti kuni 2 h jooksul. Aktivaatoritena kasutati käsitsi sünteesi korral 0,5 M HOBt ja 0,5 M HBTU lahuseid DMF-s ning DIEA-d, automatiseeritud süntesaatoriga sünteesides aga 0,5 M HOBt ja 0,6M HBTU lahuseid DMF-s ning 2 M DIEA-d NMP-s.

Käsitsi sünteesi korral kasutati ajutiste Fmoc-kaitserühmade eemaldamiseks nii enne aminohapete sidumist tahke kandjaga kui aminohapete sidumist omavahel, 20% piperidiini lahust DMF-s, inkubeeriti loksutil kõigepealt 2 minutit, reagensid eemaldati ning siis uuesti 20

minutit. Sellele järgnes 5-kordne pesu DMF-iga ning 1-kordne pesu DCM-ga. Seejärel kontrolliti vabade aminorühmade olemasolu Kaiseri testiga. Selleks võeti reaktsioonisegust paar tera tahket kandjat ning lisati paar tilka lahuseid A (KCN-i, püridiini, fenooli ja etanooli segu) ja B (5% nihüdrüüni lahus etanoolis) ning kuumutati 2-3 minutit 105°C juures. Sinine värvus viitas vabade aminorühmade olemasolekule ning kollane värvus vabade rühmade puudumisele. Seejärel vajalik aminohape kaaluti, lahustati DMF-s, lisati aktivaatoreid ning kanti tahkele kandjale. Peale sobivat sidumisaega pesti ja filtreeriti reaktsioonisegu 3 korda DMF-ga, 3 korda DCM-ga ning uuesti 3 korda DMF-ga. Kontrolliti uuesti vabade aminorühmade olemasolu ning sobiva tulemuse korral algas tsüklil uuesti aminohappelt Fmoc-kaitserühma eemaldamisega ning etapid toimusid korduvalt kuni sobiva peptiidijärjestuse saavutamiseni. Sünteesitud NF55\*-le lisati veel steariinhape sarnaselt aminohapete lisamisele, kuid sidumisaeg oli üleöö.

Automatiseeritud süntesaatori korral toimusid etapid sarnaselt käsitsi sünteesiga. Fmoc-kaitserühmad eemaldati piperidiiniga töödeldes 20 minuti jooksul ning sidumisreaktsioon kestis 45 minutit. Piisavalt suure saagise saamiseks võeti CREKA\* sünteesi korral aminohappeid topeltkogusel, et sooritada kahekordne sidumisreaktsioon. NF55-CREKA sünteesi korral sooritati aga ühekordne sidumisreaktsioon.

Tahkelt kandjalt lõikamiseks peptiidid lüofiliseeriti ning kasutati standardset lõikamissegust, mis koosnes 95% TFA-st, 2,5% MilliQ-st ja 2,5% TIS-st. Tsüsteiini sisaldavate peptiidijärjestuste korral disulfiidsidemete vältimiseks lisati lõikamissegusse ka EDT-d lahuses, mis koosnes 94% TFA-st, 2,5% MilliQ-st, 2,5% EDT-st ning 1% TIS-st. Peptiidide lõikamisreaktsioon toimus ca 2 h ning saadud peptiidilahused eemaldati tahkest osast. Üleliigsed lahendid ja kõrvalproduktid ekstraheeriti külma eetri ja tsentrifuugimisega, mis sadestas peptiidi anuma põhja. Protseduuri korrati 3 korda, eeter eemaldati ning peptiidid lahustati 10 ml MilliQ vees. Lahustunud peptiidid külmutati ning lüofiliseeriti.

### 3.5 Vask(I)-katalüüsitud *click*-reaktsioon

Antud töös teostati vask(I)-katalüüsitud *click*-reaktsioon kahe eelnevalt sünteesitud peptiidi vahel (NF55\* ja CREKA\*), millele oli vastavalt lisatud vajalik alküül- või asiidrühm. Vask(I)-katalüüsitud *click*-reaktsioon viidi läbi 2 erineva protokolliga järgi.

Esimene katse viidi läbi O'Malley, Rubbiani jt kirjelduse järgi. [30] Selle meetodika järgi lisati kõiki abiaineid otse pulbrina lahusesse, eelnevalt neid lahustamata. Lähteaineid kokku hoides

optimeeriti protokollil ning võeti reaktsiooni läbiviimiseks pooled kogused võrreldes kirjeldatuga. Nii lahustati 2,6  $\mu\text{mol}$  asiidrühmaga peptiidi 5 ml MilliQ-s ning seejärel 2,3-kordses ülehulgas alküülrühmaga peptiidi, asiidiga võrdsel hulgal  $\text{CuSO}_4$ , kahekordses ülehulgas ligandi TBTA ning kolmekordses ülehulgas naatriumaskorbaati. Reaktsioonisegu inkubeeriti toatemperatuuril loksutil üleöö, seejärel külmutati ja lüofiliseeriti.

Teine katse viidi läbi aga optimeriseerides erinevaid laboris proovitud protokolle, kuid põhiline teostus põhineb Presolski, Vu Phong Hongi ja Finni järgi. [26] Seda meetodikat optimeerides võeti asiidrühmaga peptiidi kahekordses ülehulgas alküülrühmaga peptiidi suhtes, mõlemast tehti sobiva kontsentratsiooniga vesilahused ning segati omavahel argooniga täidetud korgiga 2 ml Eppendorfi anumal.  $\text{CuSO}_4$ -st valmistati alküülrühmaga peptiidiga võrdse hulga vesilahus, mis segati eelnevalt 100% DMSO-s lahustatud ligandi TBTA lahusega, ligandi võeti alküülrühmaga peptiidiga võrreldes kahekordses ülehulgas. Kahe lahuse segu lisati peptiidisegule korgiga 2 ml Eppendorfi anumasse ning lisati ka alküülrühmaga peptiidiga võrreldes kolmekordse ülehulgaga võetud naatriumaskorbaadi vesilahust. Kontrolliti reaktsioonisegu pH-d ning jäeti toatemperatuuril üleöö loksuma. Järgmisel päeval segu külmutati ja lüofiliseeriti.

### 3.6 Peptiidide puhastamine ja massispektromeetria

Lüofiliseeritud peptiidid puhastati kõrvalproduktidest RP-HPLC-ga (Agilent Technologies). Peptiidide NF55 ja NF55\* puhastamiseks lahustati korraga ca 20 mg peptiidi 20/80 ACN/MilliQ segus, mis sisaldas 0,1% TFA-d ning 30 minuti jooksul kasutati gradientelueerimist 20-100% ACN sisalduseni. Eluendina kasutati ACN ning MilliQ, mõlemasse lisatud ka 0,1% TFA-d. Lühema peptiidi CREKA\*, *click*-reaktsiooni saaduste ja NF55-CREKA puhastamiseks lahustati samuti korraga ca 20 mg pulbrit 5/95 ACN/MilliQ segus, mis sisaldas 0,1% TFA-d. 55 minuti jooksul kasutati gradientelueerimist ACN ning MilliQ-ga, mõlemasse lisatud 0,1% TFA-d, 5-100% ACN sisalduseni. Kõik fraktsioonid koguti käsitsi ning lüofiliseeriti. Õiged fraktsioonid läbisid ka teistkordse puhastuse piisava puhtuse saavutamiseks.

Produktide olemasolu määrati molekulmasside kaudu MALDI-TOF massispektromeetriaga. Maatriksina kasutati  $\alpha$ -tsüano-4-hüdroksükaneelhapet (HCCA).

### 3.7 RSP efektiivsuse hindamine *in vitro* tingimustes

Rakku sisenevate peptiidide bioloogilise efektiivsuse hindamiseks kasvatati inimese eesnäärmevähi rakuliini (PC3), millesse hiljem transfekteeriti plasmiidne DNA pGL3 ning määrati transfektsiooni efektiivsus. Rakuliini toideti pidevalt RPMI 1640 söötmega, millesse oli lisatud 0,1 mM asendatavaid aminohappeid, 1,0 mM naatriumpüruvaati, 10% veise loote seerumit ning antibiootikumidena 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomüsiini. Parema kasvu tagamiseks kasvatati rakke želatiniseeritud tassil. Rakke inkubeeriti pidevalt 5% CO<sub>2</sub> ning veeauru sisaldavates tingimustes 37°C juures. Rakkude konfluentsuse vähendamiseks, et nad kasvaksid ühtlase üherakulise kihina, jagati rakud iga 2 päeva tagant suhtes 1:2 ja 1:3.

Rakkude transfekteerimiseks loendati rakud ning külvati želatiniseeritud 24-kaevulisele plaadile 65 000 rakku, umbes 1 ml raku ja söötme segu süvendi kohta. Külvatud rakke plaadil inkubeeriti üleöö. Järgmisel päeval valmistati RSP-pDNA mittekovalentsed kompleksid. Kuna aga komplekside moodustamine erinevatel RSP-pDNA laengu suhetel ei oleks andnud võrreldavaid tulemusi peptiidide laengu erinevuste tõttu, moodustati kõik kompleksid kindlal peptiidikontsentratsioonil, mis oli optimeeritud kontrollpeptiid NF55 kontsentratsiooni järgi laengu suhtel 3:1. Laengu suhte arvutamisel võeti arvesse plasmiidse DNA negatiivset laengut rakku siseneva peptiidi positiivse laengu kohta. Peale 45 minutit komplekside inkubeerimist eemaldati rakkudelt sööde ning lisati 50 µl kompleksi ja 450 µl sooja söödet. Rakke inkubeeriti 4 h ning 4 h möödudes eemaldati sööde koos sisenemata kompleksidega ning asendati 1 ml söötmega iga kaevu kohta. Rakud jäeti inkubaatorisse inkubeerima 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> tingimustes. 24 h möödudes sööde rakkudelt aspireeriti, rakud pesti PBS-iga ning lüüsiiti 100 µl Tritoni 0,1%-lise lahusega 20 minutit +4°C juures. Seejärel mõõdeti plasmidi reportergeeni ekspresseerumisel tekkinud reportervalgu luminesentsi substraadi lisamisel.

Plasmidi lutsiferaasi ekspressioonitase mõõdeti GLOMAX™ 96 mikroplaat luminomeetriga, mõõtes lutsiferaasi ja lutsiferiini vahelisel reaktsioonil eralduvat luminesentsi. Selleks pipeteeriti valgele 96-süvendisele plaadile ühe kaevu kohta 20 µl rakulüsaati ning lisati 80 µl lutsiferaasi substraati (*Luciferase Assay Reagent*). Saadud tulemused normeeriti valgusisalduse määramisega kasutades Bio-rad DC valguanalüüsi komplekti (*Bio-rad DC™ protein assay kit*), mis sarnaneb Lowry meetodile. Valgusisalduse määramiseks lisati 96-süvendilisele plaadile ühe kaevu kohta 5 µl rakulüsaati ning 25 µl lahust A+S ja 200 µl lahust B. Valmistati ka kindla valgusisaldusega kalibreerimislahused referentsvalgust BSA ning mõõdeti absorptsioon 700 nm juures Sunrise™ mikroplaat absorptsioonimõõtjaga. Rakulüsaadi valgusisaldus leiti

kalibreerimismeetodiga. Normeeritud mõõtmistulemused esitati ühikutes RLU/mg.

#### 4. Tulemused ja arutelu

##### 4.1 Peptiidide süntees

Rakku sisenevale peptiidile kasvajaspetsiifilise fragmendi lisamiseks sünteesiti 3 peptiidi, millest üks on rakku sisenev peptiid ja teine kasvajat sihtiv peptiid. Kolmas peptiid on nende kahe peptiidi kombinatsioon, mis on ühtlasi ka üks meetod vähispetsiifilise fragmendi lisamiseks rakku sisenevale peptiidile.

Sünteesitud rakku sisenev peptiid on NF55, mille C-terminusse lisati terminaalset propargüülrühma sisaldav leutsiin. Lisatud terminaalne propargüülrühm on reageeriv rühm, millega saab läbi viia vask(I)-katalüüsitud *click*-reaktsiooni. Peptiid sünteesiti käsitsi Fmoc/*t*-Bu tahke faasi sünteesistrateegiat kasutades. Oma pika järjestuse tõttu oli peptiidisüntees väga mahukas ning aeganõudev, ühe aminohappe kinnitamiseks inkubeeriti reaktsioonisegu ca 2 h, stearüülrühma kinnitamiseks ca 20 h ning tahkelt kandjalt eemaldamiseks ca 3 h. Tahkelt kandjalt lõigatud ning lüofiliseeritud kõrvalproduktidest puhastamata peptiidi oli ligikaudu 90 mg ning peale kahekordset puhastamist RP-HPLC-ga saadi lõpp-produkti ligikaudu 25 mg. Saadud peptiid jagati kolme ossa. Kaks osa läks *click*-reaktsiooni läbiviimiseks ning üks osa peptiidi bioloogilise aktiivsuse testimiseks *in vitro*. Kuigi sünteesi saagis oli hea, jäi seda kõigi kolme osa jaoks väheseks, mistõttu oli vajalik katsete optimeerimine. Sünteesi saagise suurus võib olla mitme asjaolu tagajärg, üks neist on sünteesi käsitsi läbiviimine, mille käigus viiakse läbi ühe aminohappe kinnitamisel kaks korda Kaiseri test. Kaiseri testi käigus võetakse vabade aminorühmade olemasolu kontrollimiseks paar terakest tahket polümeeri, mis vähendab iga korraga saagist. Teine asjaolu võib olla see, et pikkade peptiidide sünteesil ahela viimased aminohapped kinnituvad peptiidiahela külge halvemini. Peptiid puhastati RP-HPLC-ga gradientelueerimisega, selleks peptiidi elueeriti 20-100% gradiendiga umbes 35 minutit (vt lisa 2).

Teine sünteesitud peptiid on kasvajat sihtivate peptiidide rühma kuuluv peptiidijärjestus CREKA, millele lisati *click*-reaktsiooni läbiviimiseks N-terminusse terminaalset asiidrühma sisaldav lüsiin. CREKA\* sünteesiti automatiseeritud peptiidisüntesaatoriga ning oli lühikese järjestuse tõttu võrreldes NF55\* sünteesiga palju vähem aeganõudev, sünteesiks kulus koos tahkelt kandjalt eemaldamisega ca 29 h, ning mahult samuti palju väiksem. Kuna *click*-reaktsiooni läbiviimiseks oli vaja saada piisaval hulgal kõrvalproduktide vaba peptiidi, sooritati

sünteesil iga aminohappe kinnitamiseks kahekordne sidumisreaktsioon, et suurendada lõpp-produkti saagist. Lüofiliseeritud puhastamata peptiidi saadi ligikaudu 70 mg, mis puhastati RP-HPLC-ga kõrvalproduktide eemaldamiseks ühekordselt ning lõpp-produkti saadi ca 30 mg. Kuna RP-HPLC meetodil eralduvad fraktsioonid kolonnist hüdrofoobsuse alusel ning CREKA\* järjestus on suhteliselt hüdrofiilne, kasutati elueerimisel gradienti 5-100%, mis väljutas CREKA\* kolonnist esimese paari minuti jooksul (vt lisa 2).

Kolmas peptiid oli rakku siseneva peptiidijärjestuse NF55 ja kasvajat sihtiva peptiidijärjestuse CREKA konjugaat. Nende kahe peptiidijärjestuse ühendamiseks ning kasvajat sihtiva peptiidijärjestuse eraldamiseks rakku sisenevast peptiidist, kasutati linkerina aminoheksaanhapet. NF55-CREKA sünteesiti samuti automatiseeritud peptiidisüntesaatoriga ning süntees oli võrreldes käsitsi sünteesiga samuti vähem aeganõudev kuigi pika järjestuse tõttu oli samuti väga mahukas. Kuna sünteesi põhieesmärk oli lisada kasvajat sihtiv järjestus rakku siseneva peptiidi külge, siis ei olnud produkti suur saagikus väga oluline (bioloogilisteks katseteks piisab ka 1 mg-st), seetõttu viidi sidumisreaktsioon läbi ühekordselt. Lüofiliseeritud puhastamata peptiidi saadi ligikaudu 60 mg, puhastati RP-HPLC-ga kõrvalproduktidest ning lõpp-produkti saadi ligikaudu 25 mg. Puhastamisel kasutati gradientelueerimist 5-100%. (vt lisa 2)

Fraktsioonide puhtust ning õige aine olemasolu kontrolliti MALDI-TOF massispektromeetriaga. Massispektrilt saadud tulemusi võrreldi ainete teoreetiliste arvutatud molekulmassidega, mis kinnitab kõikide eespool mainitud peptiidide olemasolu (vt lisa 1).

#### 4.2 Vask(I)-katalüüsitud *click*-reaktsioon

Teise meetodina rakku sisenevale peptiidile vähispetsiifilise järjestuse lisamiseks kasutati vask(I)-katalüüsitud asiid-alküün tsüklooliitumisreaktsiooni. Optimeerides erinevaid protokolle, viidi katse läbi kahel korral reaktsiooniks sobivaid rühmi sisaldavate eelnevalt sünteesitud peptiididega, millest rakku sisenev peptiid NF55\* sisaldas terminaalset propargüülrühma ja kasvajat sihtiva peptiidi järjestus CREKA\* terminaalset asiidrühma.

Mõlema lähenemise korral olid lähteained täpselt samad, kuid lähteainete kogused ning reaktsioonikeskkonnad erinesid üksteisest. Esimesel juhul võeti alküülrühmaga peptiidi ülehulgas võrreldes asiidrühmaga peptiidiga ning lahustati vees. Kuna eelnevalt sünteesitud NF55\* ning CREKA\*-ga sooviti läbi viia katse kahel korral, võeti *click*-reaktsiooni läbiviimiseks planeeritud väiksemad kogused, et lähteaineid jaguks ka teiseks katseks ning



bioloogilise aktiivsuse kontrolliks. Kõik ülejäänud lähteained lisati lahusesse ilma neid eelnevalt lahustamata. Ilmnes, et ligand TBTA ei lahustu piisavalt hästi vees, mis võib omakorda põhjustada vase ebasobivat oksüdatsiooniaset lahuses ning pärssida reaktsiooni kulgu.

Teisel juhul võeti asiidrühmaga peptiidi ülehulgas võrreldes alküülrühmaga peptiidiga ning mõlemast peptiidist tehti kindla kontsentratsiooniga lahused, mis segati hiljem kokku reaktsiooninõus. Ülejäänud lähteainetest tehti samuti sobivate kontsentratsioonidega lahused ning vaske sisaldava soola ning ligandi lahused segati enne reaktsiooninõusse lisamist omavahel, et saavutada õige vase oksüdatsiooniasete. Erinevalt esimesest katses, kus ligand lahustati reaktsioonianumas veekeskkonnas, lahustati teises katses ligand 100%-lises DMSO-s, et saada täielikult lahustunud ligandi lahus. Reaktsiooninõu täideti enne lahuste lisamist ka argooniga, et viia reaktsioon läbi hapnikuvabas keskkonnas, vältimaks õhuhapniku juuresolekul võimalikku vase oksüdeerumist.

Reaktsioon toimus mõlemal katsel üleöö ning reaktsioonisegu puhastati RP-HPLC-ga. Kuna lahus sisaldas CREKA\* järjestust, kasutati puhastamisel gradientelueerimist 5-100%, peptiidi fraktsioon eraldus kolonnist CREKA\* ning NF55\* piikide vahel (vt lisa 2). Puhastatud fraktsioonid kontrolliti MALDI-TOF massispektromeetriaga ning massispektrilt saadud tulemusi võrreldi teoreetiliste arvutatud tulemustega, mis kinnitas, et reaktsioon oli mõlemal korral toimunud (vt lisa 1).

Mõlema katse õigete fraktsioonide lüofiliseerimisel selgus, et peptiidi saagis on rakukatsete läbiviimiseks liiga väike, selle põhiliseks põhjuseks on kindlasti liiga väike lähteainete kogus, mis sai takistuseks mõlema katse korral. Lisaks võis esimese katse korral ligandi mittelahustumine mõjutada vase püsivust õiges oksüdatsiooniasetmes, mis aeglustab reaktsiooni kulgu vähendades terminaalset alküülrühma reaktsioonivõimet asiidrühma suhtes. Võib öelda, et teise protokolliga järgi sooritatud vähispetsiifilise fragmendi lisamine raku sisenevale peptiidile oli edukam kui esimese protokolliga järgi, kuna kõik ained lahustusid valitud reaktsioonikeskkonnas ning kõik eeldatud tingimused reaktsiooni edukaks läbiviimiseks olid tagatud.

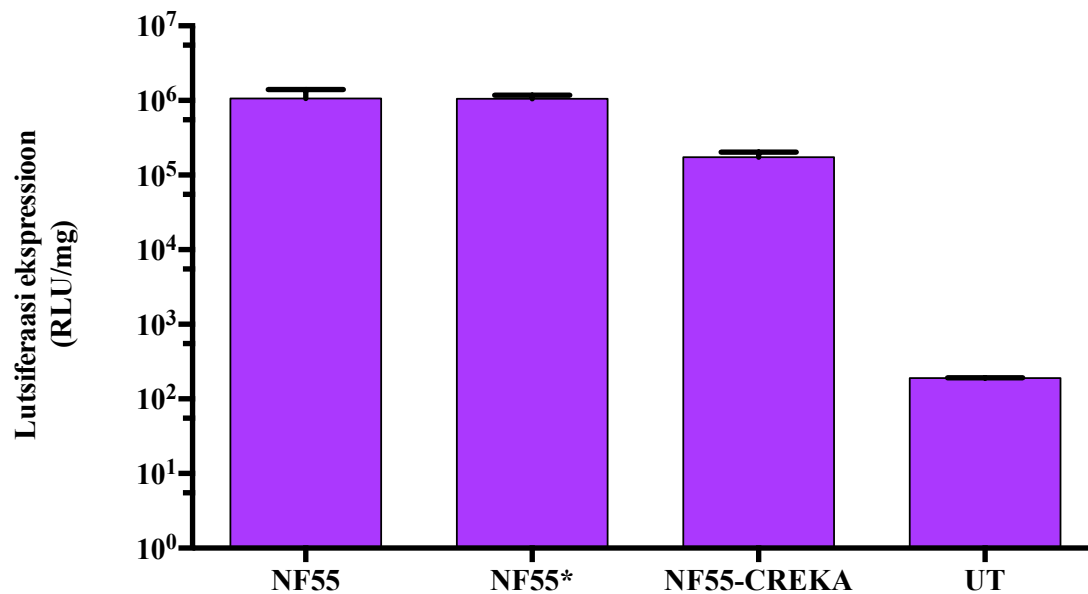
Lisaks võib öelda, et kasvajat sihtiva peptiidijärjestuse lisamine *click*-reaktsiooniga on võimalik, selleks on tõestus massispektril olemas, seega vajab protokoll veel edasist optimeerimist nii piisavalt suurte lähteainete koguse kui sobiva ligandi valiku suhtes.

### 4.3 RSP efektiivsuse hindamine *in vitro* tingimustes

Hindamaks sünteesitud peptiidide efektiivsust transportvektorina, moodustati mittekovalentsed kompleksid rakku siseneva peptiidi ja plasmiidse DNA vahel ning transfekteeriti PC3 rakuliini. Inimese eesnäärmevähi rakuliin PC3 valiti CREKA järjestuse tõttu, mis on just eesnäärmevähi spetsiifiline. Komplekside moodustamisel võeti arvesse kontrollpeptiidi positiivset laengut füsioloogilise pH juures. Kuna teiste peptiidide laengud füsioloogilise pH juures on sellest erinevad, oleksid samal RSP ja pDNA laengu suhtel moodustatud komplekside tingimused erinevad. Nii optimeeriti komplekside moodustamist kontrollpeptiidi kontsentratsiooni järgi laengu suhtel 3:1 RSP ja pDNA vahel, võttes kõigi peptiidide kontsentratsioon võrdseks peptiidi kontsentratsiooniga sellel kontrollpeptiidi laengu suhtel.

Mittekovalentsed kompleksid moodustati kontrollpeptiidi NF55, NF55\* ning NF55-CREKA ning plasmiidse DNA pGL3 vahel. Kuna *click*-reaktsiooni käigus saadud NF55-CREKA konjugaadi saagis oli väga väike, ei olnud võimalik *click*-reaktsiooni tulemuste pDNA rakku transfekteerimise bioloogilist aktiivsust määrata.

Jooniselt 4 on näha, et NF55\* poolt rakku transfekteeritud reportergeeni bioloogiline aktiivsus ei muutunud võrreldes kontrollpeptiidi sama reportergeeni rakku transfekteerimise aktiivsusega, mis näitab, et propargüülrühma sisaldava leutsiini lisamine rakku sisenevale peptiidile ei mõjuta tema aktiivsust. Sünteesitud rakku siseneva peptiidi ja kasvajat sihtiva peptiidi konjugaat on samuti võimeline pDNA transfekteerimiseks rakku, seda on jooniselt näha lutsiferaasi ekspressioonina, mis on natuke madalam kui kontrollpeptiidil. Kindlasti on edaspidi võimalik transfektsiooniefektiivsust tõsta optimeerides peptiidi kontsentratsiooni ning tänu vähispetsiifilisele peptiidijärjestusele on saavutatud suurem spetsiifilisus.



Joonis 4. pGL3 transfektsioon rakku siseneva peptiidi abil PC3 rakkudesse mõõdetuna reportergeeni bioaktiivsuseks 24 h peale transfektsiooni. Tulemused on normaliseeritud analüüsitud proovide valgusisalduse järgi. Katse on läbi viidud seerumiga söötmes ning kontrollina on kasutatud komplekse mittesisaldavat söödet. UT – *untreated*, töötlemata rakud.

## 5. Kokkuvõte

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli sünteesida rakku sisenev peptiid NickFect55 ning lisada sellele kahe erineva meetodiga kasvajaspetsiifiline peptiidijärjestus CREKA, puhastada saadud sünteesiproduktid RP-HPLC-ga ning testida saadud peptiidide efektiivsust *in vitro* tingimustes.

Peptiidijärjestused lisati RSP-le kahe meetodiga – tahke faasi peptiidisünteesi ja *click*-reaktsiooniga. Selgus, et valitud kahe meetodiga on võimalik lisada rakku sisenevale peptiidile kasvajaspetsiifiline peptiidijärjestus. Mõlema meetodi võimalikkust kinnitati molekulmasside alusel MALDI-TOF massispektromeetriaga ning saadud sünteesiproduktid puhastati kõrvalproduktidest RP-HPLC-ga. Tahke faasi peptiidisünteesi kasutades saadi piisav saagis rakku siseneva peptiidi ja kasvajat sihtiva peptiidi konjugaadi bioloogilise aktiivsuse testimiseks *in vitro* tingimustes, kuid *click*-reaktsiooni kahe katse tulemusena polnud võimalik saada piisavalt peptiidset konjugaati, mille efektiivsust hiljem testida. Järelikult tuleb edaspidi optimeerida *click*-reaktsiooni protokolle piisava saagise saamiseks.

Sünteesitud peptiidide testimisel *in vitro* selgus, et kasvajat sihtiva peptiidijärjestuse lisamine rakku sisenevale peptiidile mõjutab küll peptiidi bioloogilist aktiivsust, kuid mitte märkimisväärselt. Bioloogilise aktiivsuse vähenedes kasvas aga peptiidi kasvajaspetsiifilisus, mida saab edaspidi kontrollida *in vivo*. Lisaks ei muuda ka *click*-reaktsiooniks vajaliku funktsionaalrühma sisaldava leutsiini lisamine rakku sisenevale peptiidile NF55 tema bioloogilist aktiivsust, mis kinnitab *click*-reaktsiooni perspektiivikust tuleviku suhtes.

## 6. Summary

### **Addition of a tumor homing peptide to a cell-penetrating peptide, NickFect 55**

Tuule Treiberg

The aim of this Bachelor's thesis was to synthesise a cell-penetrating peptide NickFect55 and to add to the peptide a tumor homing peptide CREKA with two different methods, then to purify the products with RP-HPLC and to test the efficiency of the peptides *in vitro*.

To add a tumor homing peptide to a cell-penetrating peptide, solid-phase peptide synthesis and click reaction was used. It occurred that it is possible to add a tumor homing peptide to a cell-penetrating peptide with both chosen methods, the feasibility of the methods was verified with MALDI-TOF mass spectrometry and the products were purified from byproducts with RP-HPLC. Addition of a tumor homing peptide with solid-phase peptide synthesis showed a sufficient yield for testing the biological activity of the peptide *in vitro*, however addition of a tumor homing peptide with *click*-reaction lacked on both experiments of an adequate yield for testing the peptides biological activity *in vitro*. Consequently there is a need to optimize the protocols to gain an adequate yield.

Testing the peptides *in vitro* showed, that the addition of a tumor homing peptide to a cell-penetrating peptide does affect the biological activity of the peptide, but not remarkably. Although the biological activity of the peptide decreased comparing to the control peptide, the tumor specificity increased, which can be tested further on *in vivo*.

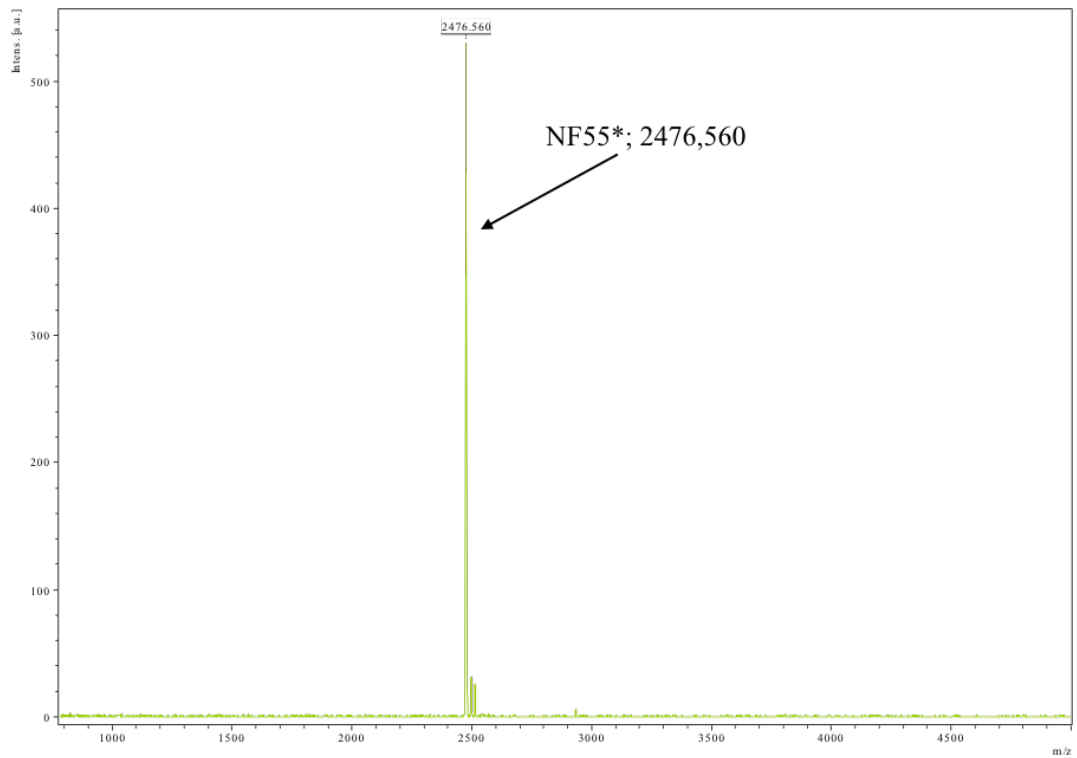
## 7. Kasutatud kirjandus

1. Kristensen, M.; Birch, D.; Nielsen, H. M. Applications and Challenges for Use of Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vectors for Peptide and Protein Cargos. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (2), 185.
2. Langel, K. Cell-Penetrating Peptide Mechanism Studies: From Peptides to Cargo Delivery, University of Tartu, **2014**.
3. Oskolkov, N.; Arukuusk, P.; Copolovici, D. M.; Lindberg, S.; Margus, H.; Padari, K.; Pooga, M.; Langel, Ü. NickFects, Phosphorylated Derivatives of Transportan 10 for Cellular Delivery of Oligonucleotides. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2011**, *17* (2), 147.
4. Arukuusk, P.; Pärnaste, L.; Oskolkov, N.; Copolovici, D. M.; Margus, H.; Padari, K.; Möll, K.; Maslovskaja, J.; Tegova, R.; Kivi, G.; et al. New Generation of Efficient Peptide-Based Vectors, NickFects, for the Delivery of Nucleic Acids. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2013**, *1828* (5), 1365.
5. Freimann, K.; Arukuusk, P.; Kurrikoff, K.; Vasconcelos, L. D. F.; Veiman, K. L.; Uusna, J.; Margus, H.; Garcia-Sosa, A. T.; Pooga, M.; Langel, Ü. Optimization of in Vivo DNA Delivery with NickFect Peptide Vectors. *J. Control. Release* **2016**, *241*, 135.
6. Soomets, U.; Lindgren, M.; Gallet, X.; Hällbrink, M.; Elmquist, A.; Balaspiri, L.; Zorko, M.; Pooga, M.; Brasseur, R.; Langel, Ü. Deletion Analogues of Transportan. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2000**, *1467* (1), 165.
7. Mäe, M.; EL Andaloussi, S.; Lundin, P.; Oskolkov, N.; Johansson, H. J.; Guterstam, P.; Langel, Ü. A Stearylated CPP for Delivery of Splice Correcting Oligonucleotides Using a Non-Covalent Co-Incubation Strategy. *J. Control. Release* **2009**, *134* (3), 221.
8. Kapoor, P.; Singh, H.; Gautam, A.; Chaudhary, K.; Kumar, R.; Raghava, G. P. S. Tumorhope: A Database of Tumor Homing Peptides. *PLoS One* **2012**, *7* (4).
9. Simberg, D.; Duza, T.; Park, J. H.; Essler, M.; Pilch, J.; Zhang, L.; Derfus, A. M.; Yang, M.; Hoffman, R. M.; Bhatia, S.; et al. Biomimetic Amplification of Nanoparticle Homing to Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (3), 932.
10. Agemy, L.; Sugahara, K. N.; Kotamraju, V. R.; Gujrati, K.; Girard, O. M.; Kono, Y.; Mattrey, R. F.; Park, J.-H.; Sailor, M. J.; Jimenez, A. I.; et al. Nanoparticle-Induced Vascular Blockade in Human Prostate Cancer. *Blood* **2010**, *116* (15), 2847.
11. Laakkonen, P.; Vuorinen, K. Homing Peptides as Targeted Delivery Vehicles. *Integr. Biol.* **2010**, *2* (7–8), 326.
12. Kimmerlin, T.; Seebach, D. “100 Years of Peptide Synthesis”: Ligation Methods for Peptide and Protein Synthesis with Applications to  $\beta$ -Peptide Assemblies. *J. Pept. Res.* **2005**, *65* (2), 229.
13. Howl, J. *Peptide Synthesis and Applications*; **2005**; Vol. 298.
14. Alberts, B.; Alexander Johnson; Julian Lewis; Martin Raff; Keith Roberts; Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed.; New York, **2007**.
15. Bodanszky, M. *Principles of Peptide Synthesis. 2nd Edition*, 2nd ed.; Springer-Verlag: Berlin, **1993**, 9-10
16. Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem Soc Rev* **2009**, *38* (2), 606.
17. Merrifield, R. B. Solid-Phase Peptide Synthesis, the Synthesis of Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149.
18. Palomo, J. M. Solid-Phase Peptide Synthesis: An Overview Focused on the Preparation of Biologically Relevant Peptides. *RSC Adv.* **2014**, *4* (62), 32658.
19. Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2455.

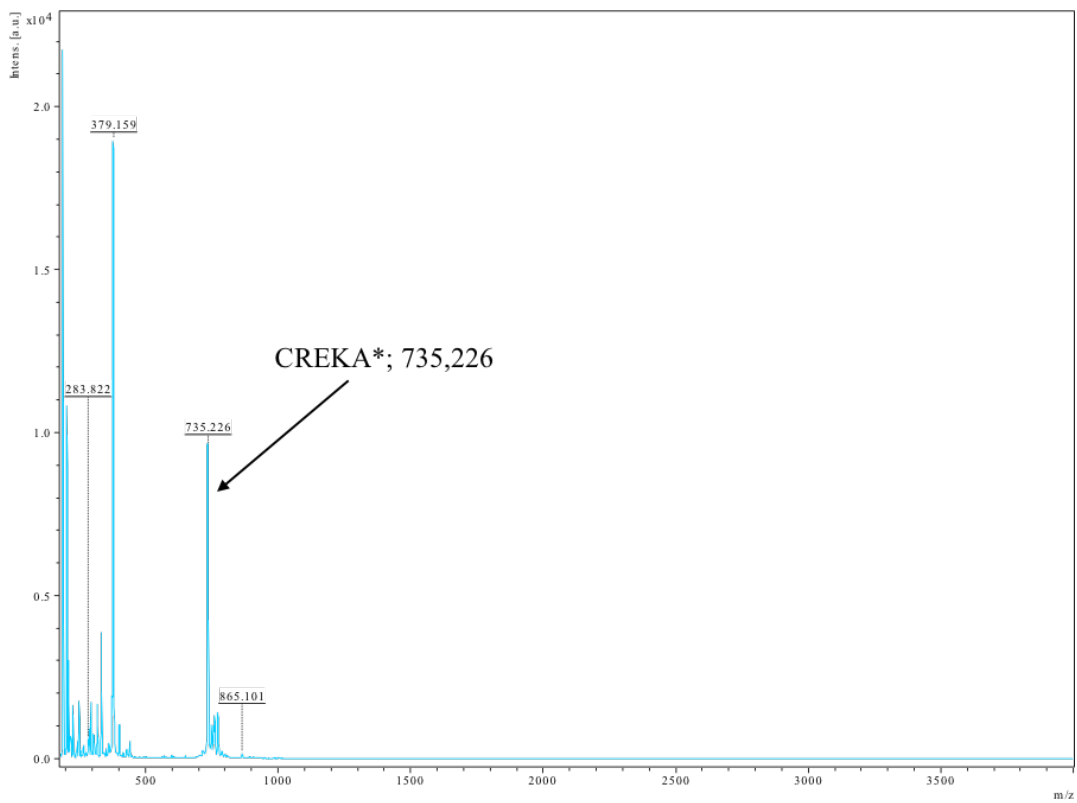
20. Aguilar, M.-I. HPLC of Peptides and Proteins: Basic Theory and Methodology. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *251*, 3.
21. Mccarthy, S. M. Analysis of Oligonucleotides by Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. **2000**, 256.
22. Robert, A.; Saidel, L. E. O. J.; Mosovich, E. The Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins. *J.Biol.Chem* **1951**, *193*, 397.
23. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004.
24. Hein, C. D.; Liu, X.-M.; Wang, D. Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (10), 2216.
25. Liang, L.; Astruc, D. The copper(I)-Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and Its Applications. An Overview. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255* (23–24), 2933.
26. Presolski, S. L.; Hong, V. P.; Finn, M. G. Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **2011**, *3* (4), 153.
27. Li, H.; Aneja, R.; Chaiken, I. Click Chemistry in Peptide-Based Drug Design. *Molecules* **2013**, *18* (8), 9797.
28. Ahmad Fuaad, A. A. H.; Azmi, F.; Skwarczynski, M.; Toth, I. Peptide Conjugation via CuAAC “Click” Chemistry. *Molecules* **2013**, *18* (11), 13148.
29. Meldal, M.; Tomøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide - Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952.
30. O’Malley, W. I.; Rubbiani, R.; Aulsebrook, M. L.; Grace, M. R.; Spiccia, L.; Tuck, K. L.; Gasser, G.; Graham, B. Cellular Uptake and Photo-Cytotoxicity of a gadolinium(III)-DOTA-Naphthalimide complex “Clicked” to a Lipidated Tat Peptide. *Molecules* **2016**, *21* (2), 194.

Lisad

Lisa 1

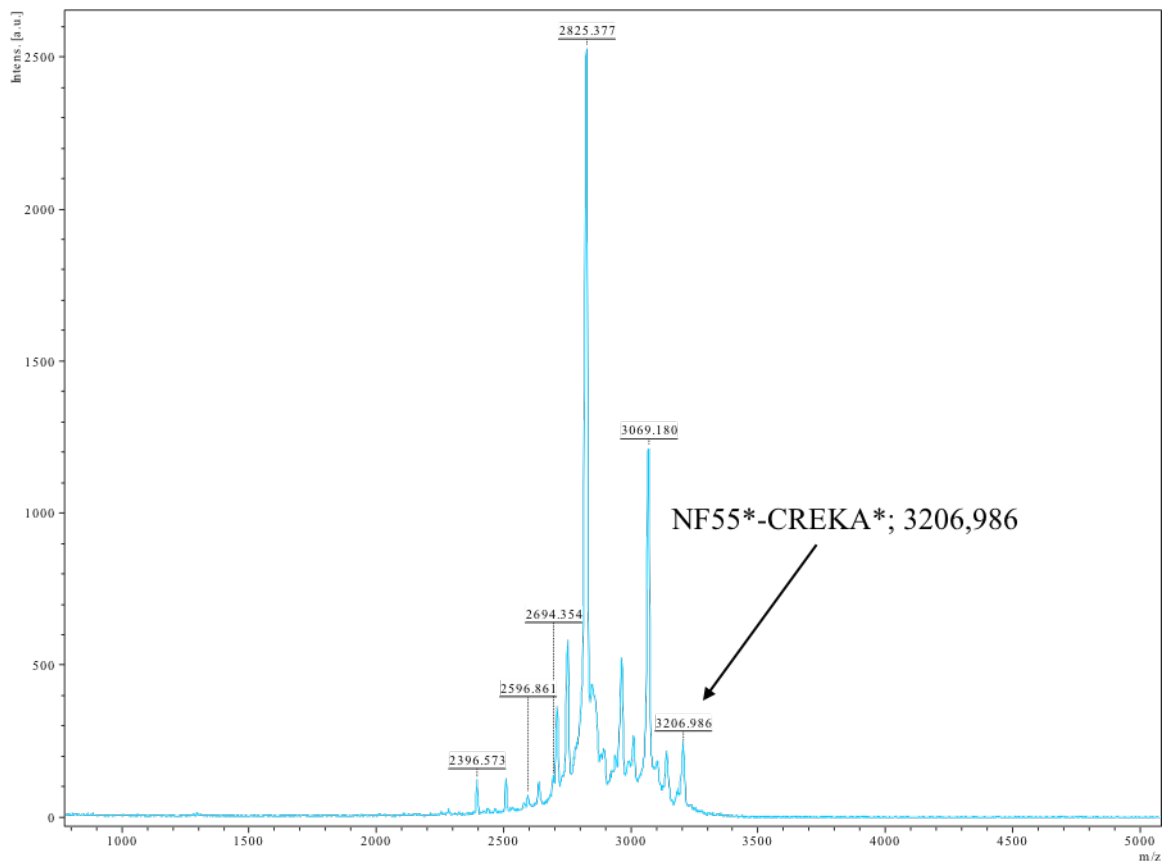


Joonis 5. NF55\* massispekter

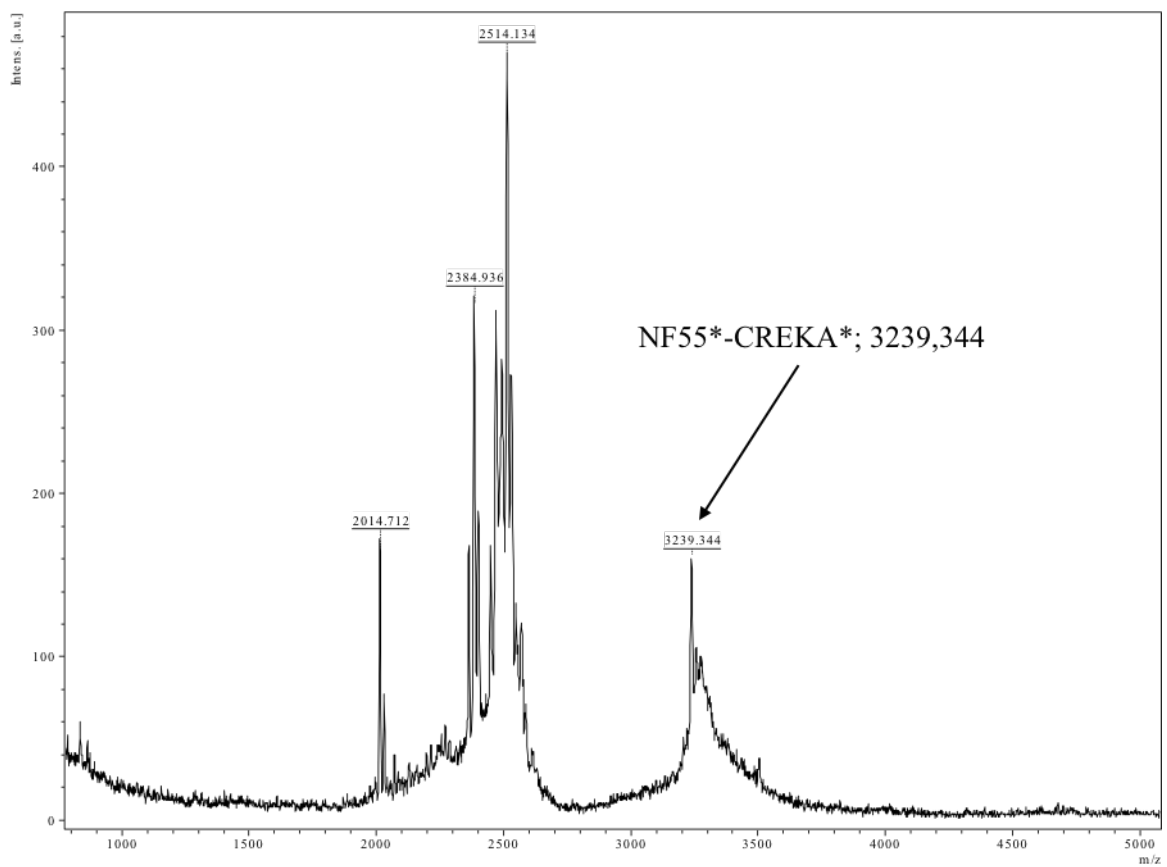


Joonis 6. CREKA\* massispekter

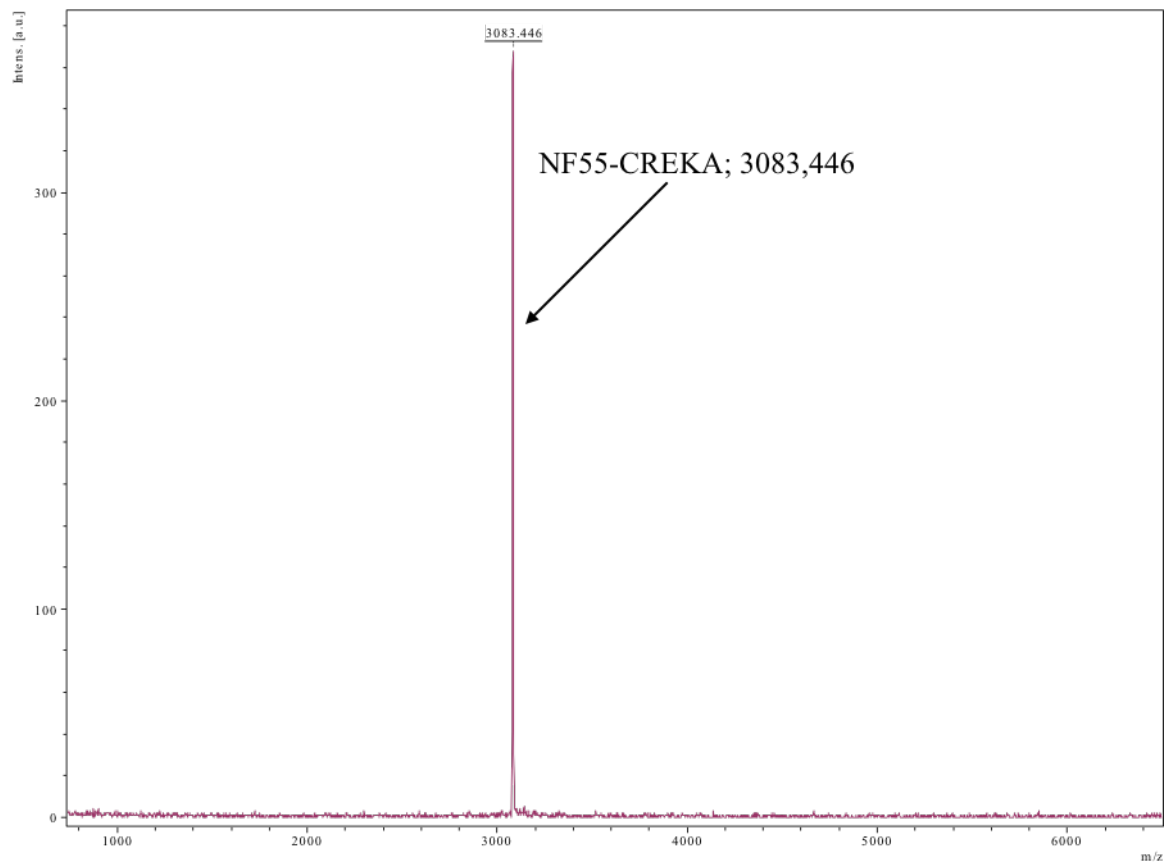




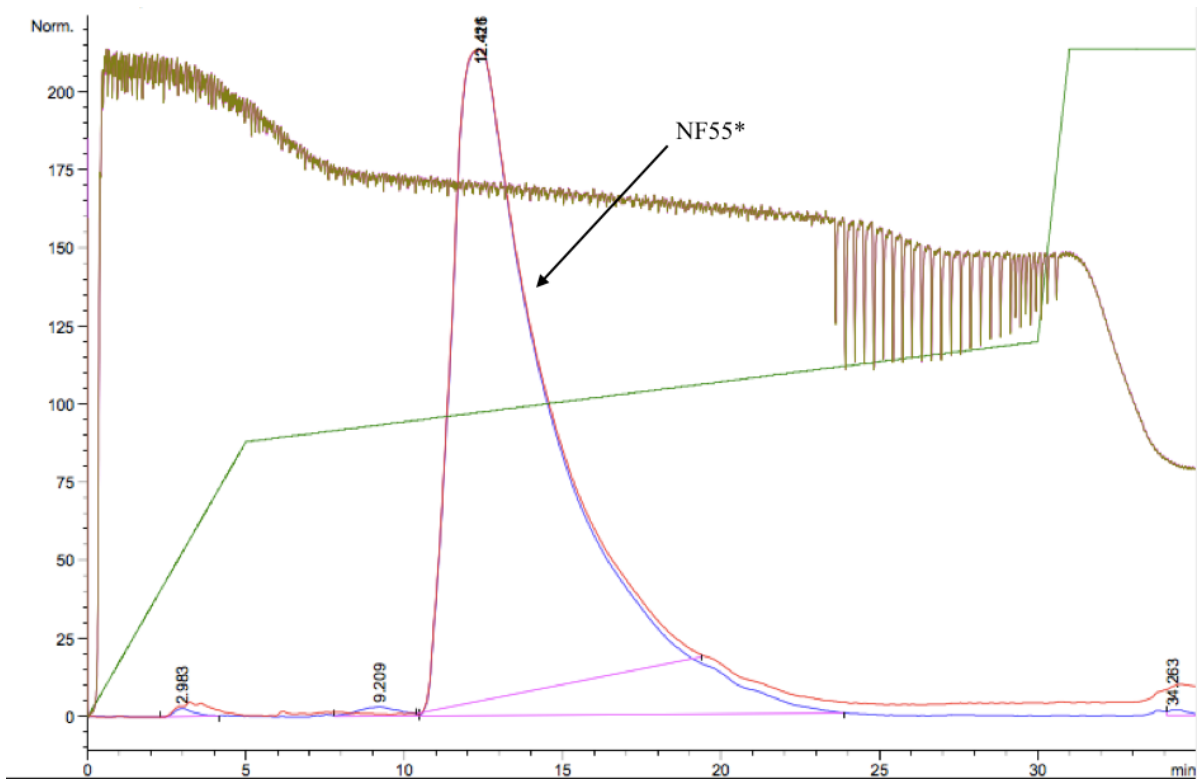
Joonis 7. NF55\*-CREKA\* katse 1 massispekter



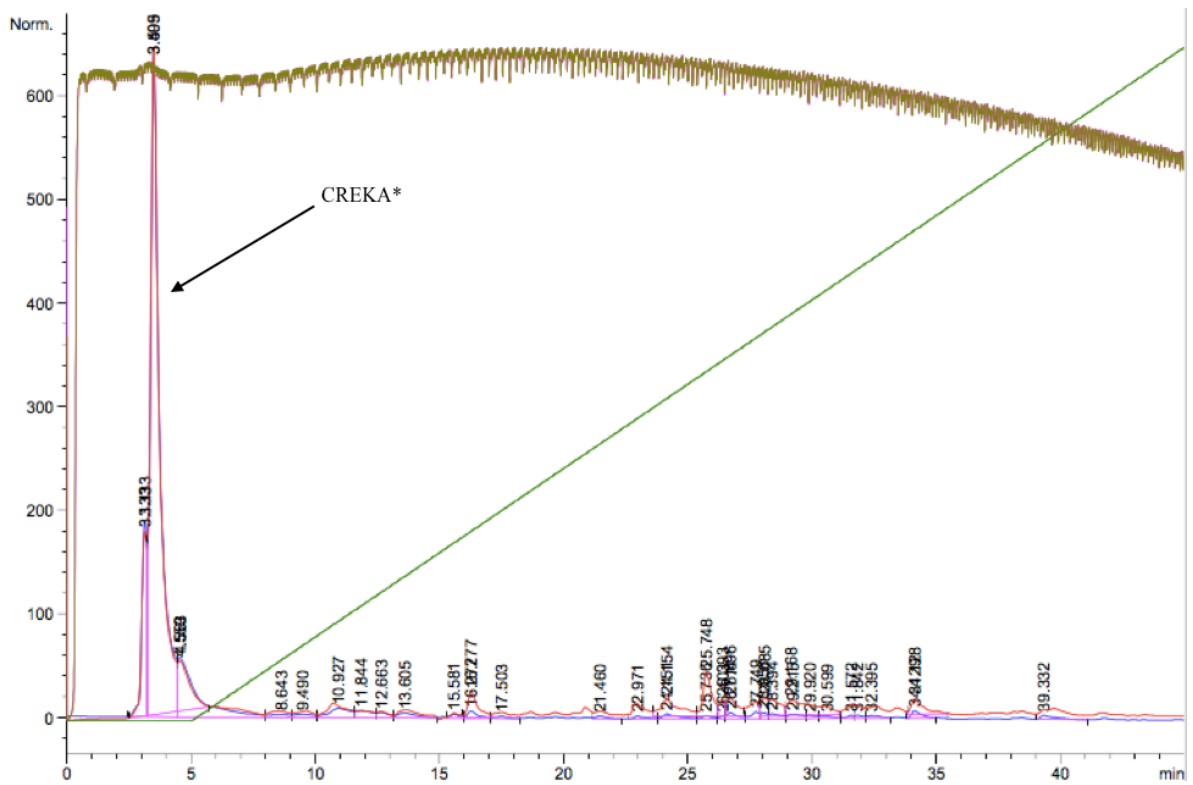
Joonis 8. NF55\*-CREKA\* katse 2 massispekter



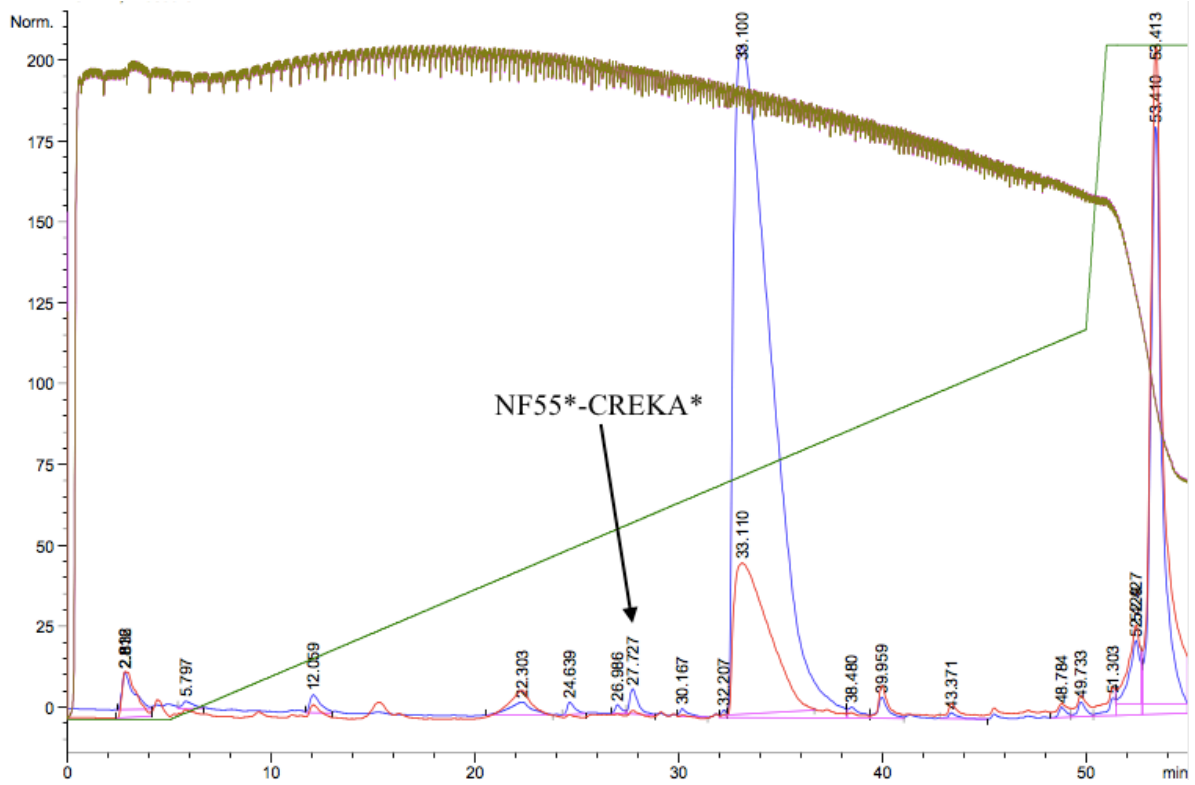
Joonis 9. NF55-CREKA massispekter



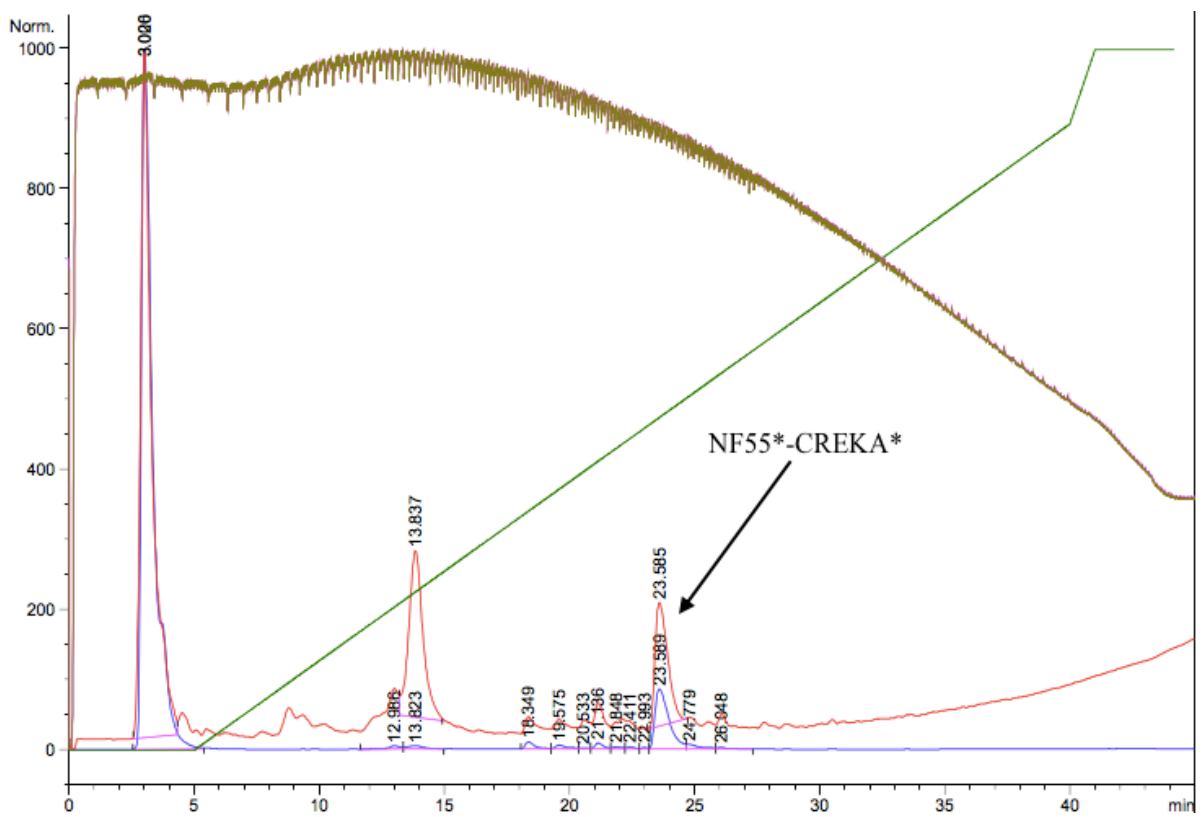
Joonis 10. NF55\* puhastus



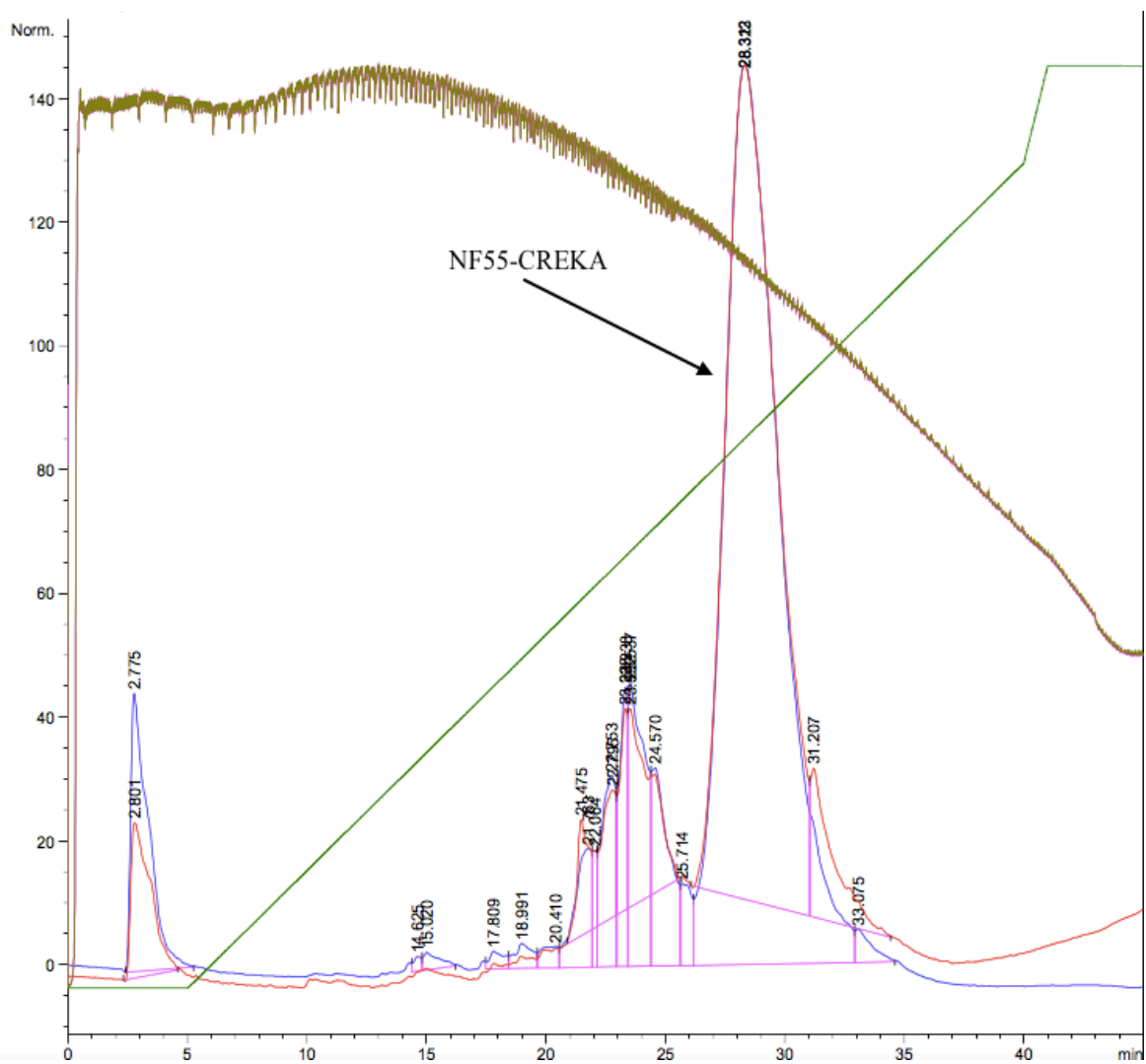
Joonis 11. CREKA\* puhastus



Joonis 12. NF55\*-CREKA\* *click*-konjugaadi puhastus katse 1



Joonis 13. NF55\*-CREKA\* *click*-konjugaadi puhastus katse 2



Joonis 14. NF55-CREKA konjugaadi puhastus

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

Mina, Tuule Treiberg,

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

**Rakku sisenevale peptiidile NickFect55 vähispetsiifilise peptiidse fragmendi lisamine,**

mille juhendaja on Piret Arukuusk,

- 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**