

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

**Kahevalentsete metalliioonide mõju RPP-vahendatud transfektsioonile ja  
splaiisingu korrigeerimise efektiivsusele SCO poolt**

Magistritöö

30 EAP

Maria Maloverjan

Juhendaja PhD Margus Pooga

TARTU 2020

## INFOLEHT

### **Kahevalentsete metalliioonide mõju RPP-vahendatud transfektsioonile ja splaissingu korrigeerimise efektiivsusele SCO poolt**

Oligonukleotiidid (ON), mille üheks liigiks on splaissingut korrigeerivad ON (SCO), on kõrge potentsiaaliga terapeutikumid ja mitmed ON-id on juba aastaid kasutuses kliinilises praktikas. ON-ide kasutuse suurimateks takistusteks on transfektsiooni madal efektiivsus ning nende kiire lagundamine organismis. Seetõttu töötatakse välja erinevaid transfektsiooni süsteeme, millest üheks on ON-idega nanopartikleid (NP) moodustavate rakkudesse penetreeruvate peptiidide (RPP) kasutamine. Kuigi RPP-ga kompleksis on ON transfektsioon efektiivsem ning nende lagundamine pärsitud, vajab ka RPP-vahendatud transport täiustamist.

Käesolevas töös uuriti kaltsiumi ionide mõju RPP-vahendatud ON transfektsioonile ja SCO-ga suunatud splaissingu korrigeerimise efektiivsusele. Töö tulemusena avastati, et  $\text{Ca}^{2+}$  ioonid suurendavad olulisel määral NP-de bioloogilist aktiivsust. Lisaks uuriti detailsemalt  $\text{Ca}^{2+}$  ioone sisaldavate RPP-SCO NP-de füüsikalisi omadusi, rakku tungimise ja toime mehhanisme.

Märksõnad: SCO, RPP, RPP-ON nanopartiklid, transfektsioon, kaltsiumi ioonid.

CERCS kood: B210, B200.

### **Effect of bivalent metal ions on CPP-mediated transfection and splice-correcting activity of SCO**

Oligonucleotides (ONs), including splice-correcting ONs (SCOs), are highly promising novel therapeutic agents. Multiple ONs have been used in clinics already for some years. However, degradation of ONs in extra- and intracellular compartments and their low transfection efficiency hinder their wide use in clinical practice. To overcome these obstacles, several methods have been developed. One of the most promising transfection systems is based on cell-penetrating peptides (CPPs) that bind ONs, forming CPP-ON nanoparticles (NPs). Although ONs incorporated into NPs are more effectively transfected into cells, and they are less likely degraded, novel strategies for increasing efficiency of NPs are required.

The aim of the present study was to investigate the effect of calcium ions on CPP-mediated transfection and splice-correcting activity of SCO. It was found that  $\text{Ca}^{2+}$  ions enhance considerably biological activity of CPP-SCO NPs. In addition, physical properties and mechanism of action of such NPs were studied in more detail.

Keywords: SCO, CPP, CPP-ON nanoparticles, transfection, calcium ions.

CERCS code: B210, B200.

## SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD .....	3
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus .....	6
1 Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1 Geeniteraapia ja antisenss-teraapia .....	7
1.2 Antisenss-teraapias kasutatavate nukleiinhapete toimemehhanismid .....	7
1.2.1 Oligonukleotiidide keemilised modifikatsioonid .....	9
1.2.2 Splaissingut muutvad oligonukleotiidid (SSO-d).....	11
1.2.3 Ravimina kasutatavad oligonukleotiidid .....	14
1.3 Nukleiinhapete transfektsiooni meetodid .....	16
1.3.1 Viirusvektorid .....	16
1.3.2 Mitte-viraalsed transfektsioonimeetodid .....	17
1.3.2.1 Rakkudesse penetreeruvad peptiidid (RPP-d) .....	20
1.4 Transfekteeritava nukleiinhappe teekond rakusisese sihtmärgini .....	22
1.4.1 ON-RPP NP-de sisenemine rakku .....	22
1.4.1.1 Püüdurreseptorid ehk <i>scavenger</i> retseptorid.....	23
1.4.2 NA vabanemine endosoomidest .....	25
1.4.3 Kaltsiumi ionide roll RPP-vahendatud transfektsioonis.....	26
2 Eksperimentaalosa .....	28
2.1 Töö eesmärgid.....	28
2.2 Materjalid.....	28
2.3 Metoodika .....	30
2.3.1 Rakkude kultiveerimine ja külvamine .....	30
2.3.2 RPP-SCO NP-de valmistamine .....	30
2.3.3 Konfokaalmikroskoopia .....	31
2.3.4 FACS analüüs SCO transfektsiooni efektiivsuse või bioloogilise efekti määramiseks .....	32
2.3.5 SCO-ga indutseeritud splaissingu analüüs luminesentsi mõõtmise alusel HeLa pLuc705 rakkudes .....	32
2.3.5.1 Kahevalentsete metalliioonide ja erinevate peptiidide mõju uurimine splaissingu ümberlülitamisele.....	33

2.3.5.2 Klorokviini ja SR-A inhibiitorite mõju PF14-SCO NP-de efektile.....	34
2.3.6 RPP-SCO-Me <sup>2+</sup> NP-de toksilisuse hindamine.....	34
2.3.7 PF14-SCO NP-de suuruse ja zeta-potentsiaali mõõtmine .....	35
3. Tulemused ja arutelu .....	36
3.1 PF14-ga HeLa rakkudesse transporditud SCO hulga, paiknemise ja bioloogilise efekti mikroskoopiline analüüs.....	36
3.2 PF14-vahendatud SCO transfektsiooni efektiivsuse ja bioloogilise toime tugevuse määramine FACS analüüsi abil .....	40
3.3 Luminesentsi intensiivsuse mõõtmine SCO splaissingut korrigeeriva aktiivsuse määramiseks .....	41
3.3.1 Kahevalentsete metalliioonide mõju splaissingu korrigeerimise efektiivsusele SCO poolt erineva koostisega NP-de korral.....	42
3.3.2 KMI mõju pDNA PF14-vahendatud transfektsiooni efektiivsusele.....	44
3.3.3 NP-de moodustamise ja rakkude töötlemise optimeerimine .....	46
3.3.4 Endosoomide destabiliseerimise mõju PF14-SCO-KMI NP-de bioloogilisele efektile .....	48
3.3.5 SR-A blokeerimise mõju PF14-SCO-KMI NP-de bioloogilisele efektile.....	49
3.4 PF14-SCO-Ca <sup>2+</sup> NP-de toime hindamine HeLa pLuc705 rakkude elulemusele .....	51
3.5 KMI mõju uurimine NP-de füüsikalistele omadustele .....	52
Kokkuvõte .....	55
Summary.....	56
Kasutatud kirjandus .....	57
Kasutatud veebiaadressid .....	64
Lisad .....	65
Lisa 1.....	65
Lisa 2.....	65
Lisa 3.....	65
Lisa 4.....	66
Lisa 5.....	67
Lisa 6.....	68
Lisa 7.....	69
LIHTLITSENTS.....	70

## Kasutatud lühendid

AH – aminohape

ASO – antisenss-oligonukleotiid

CR – laengusuhe (*charge ratio*)

DMD – Duchenne lihasdüstroofia (*Duchenne muscular dystrophy*)

DMF – dimetüülformamiid

EGFP – võimendatud roheline fluorestseeruv valk (*enhanced fluorescent green protein*)

ER – endoplasmaatiline retiikulum

FACS – fluorestsents-aktiveeritud rakkude sortimine (*fluorescence-activated cell sorting*)

iCa – intratsellulaarne kaltsium

KMI – kaltsiumi ja magneesiumi ioonid

MTT – 3-(4,5-dimetüültiasol-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid

MR – molaarne suhe (*molar ratio*)

NA – nukleiinhape (*nucleic acid*)

NF – NickFect

NP – nanopartikkel

ON – oligonukleotiid

pDNA – plasmiidne DNA

PF – PepFect

PI3K – fosfoinositiid 3-kinaas (*phosphoinositide 3-kinase*)

PS – fosforotioaat

rcf – suhteline tsentrifugaaljõud (*relative centrifugal force*)

RLU – suhteline luminesentsi ühik (*relative luminescence unit*)

RPP – rakkudesse penetreeruv peptiid (ingl. k. CPP, *cell penetrating peptide*)

SCO – splaissingut korrigeeriv oligonukleotiid (*splice-correcting oligonucleotide*)

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

SR – püüdurretseptorid ehk *scavenger* retseptorid (*scavenger receptors*)

SSO – splaissingut muutev oligonukleotiid (*splice-switching oligonucleotide*)

ZP – zeta-potentsiaal

## Sissejuhatus

Koos RNA interferentsi ja antisenss-mehhanismidega on splaissingut korrigeerivate oligonukleotiidide (SCO, ingl. k. *splice-correcting oligonucleotides*) kasutamine üheks väga kõrge potentsiaaliga geeniteraapia strateegiaks. “Paljast” SCO-d lagundatakse kiiresti nii ekstra- kui ka intratsellulaarselt ning selle tungimine läbi plasmamembraani on väheefektiivne, sellepärast on töötatud välja erinevad transfektsiooni tehnoloogiad, mida pidevalt täiustatakse. Kasutatavaid vektoreid võib jaotada viraalseteks ja mitte-viraalseteks, millest esimeste kasutamisega kaasneb terve rida turvalisusega seotud küsimusi, näiteks võivad viirusvektorid põhjustada immuunvastuse ning ka pahaloomuliste kasvajate teket.

Kuna mitte-viraalsete vektorite kasutamine ei põhjusta eelnimetatud probleeme, sobivad need eeldatavalt paremini *in vivo* kasutamiseks. Koos sünteetiliste lipiidide ja polümeeridega kuuluvad nende hulka ka rakkudesse penetreeruvad/tungivad peptiidid (RPP-d), mis on käesoleva töö peamiseks fookuseks. Kuigi mitte-viraalseid vektoreid on rakendatud juba aastakümneid, ei ole nende poolt vahendatud transfektsiooni efektiivsus *in vivo* rakendustes üldjuhul piisavalt kõrge. Keemilise transfektsiooni efektiivsuse suurendamiseks on rakendatud erinevaid lähenemisi, millest mõned on suhteliselt tõhusad, paraku ei ole universaalselt toimivat lahendust seni leitud.

Käesolevas töös uuriti SCO splaissingut korrigeerivat toimet RPP-del põhinevas transfektsioonisüsteemis. Töö eesmärgiks oli uurida kahevalentsete metalliioonide mõju RPP-SCO nanopartiklite (NP) bioloogilisele toimele *in vitro*. Selleks teostati katseid, kus mõõdeti SCO splaissingut korrigeerivat toimet kvantitatiivselt, vaadeldi SCO hulka ja jaotust rakkudes, uuriti NP-de rakkudega seostumist ja rakusisest ümberpaiknemist. Lisaks uuriti täpsemalt ka metalliioone sisaldavate NP-de füüsikalisi omadusi ja toksilisust rakkudele. Töös kasutati erinevaid transportpeptiide ja analüüsiti metalliioonide mõju SCO-de efektile kahes erinevas rakuliinis.

## 1 Kirjanduse ülevaade

### 1.1 Geeniteraapia ja antisenss-teraapia

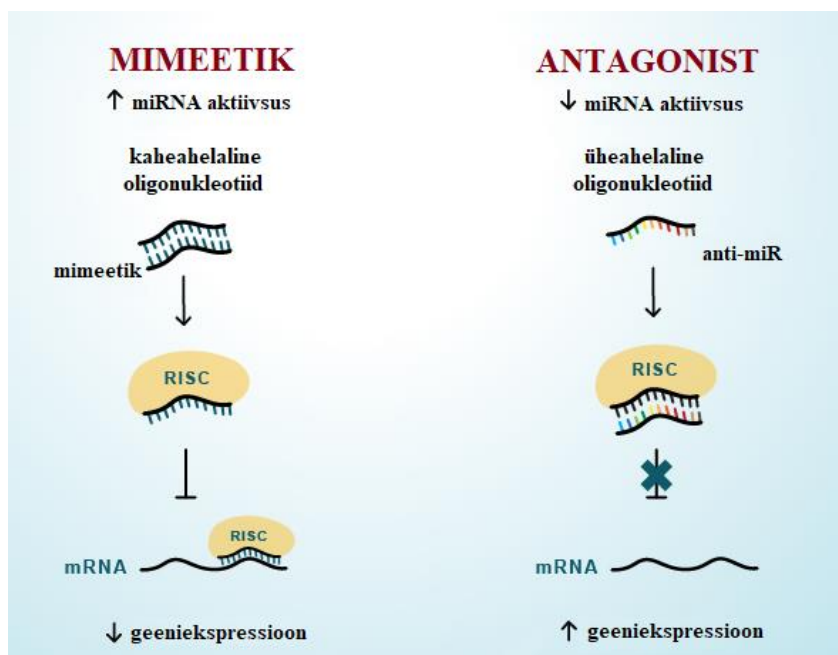
Geeniteraapia on ravimeetodite kompleks, mis on suunatud haigusseisundi leevendamisele geenide avaldumise mõjutamise teel. Selle võimalikeks lähenemisteks on haigusttekitava geenivariandi inaktiveerimine, selles esineva defekti parandamine või funktsionaalse geneetilise materjali viimine rakkudesse terve geenikoopia puudusest tekitatud kahju kompenseerimiseks. Geeniteraapiat on võimalik kasutada nii pärilike geneetiliste haiguste kui ka vähkkasvajate ja viirushaiguste ravis (FDA). Geeniteraapia kitsamas mõttes on puuduva või mittefunktsionaalse geeni terve koopia viimine organismi, milleks kasutatakse rekombinantse DNA tehnoloogiat ehk geen sisestatakse plasmidi/viirusvektorisse (Gonçalves ja Paiva, 2017) või sisestatakse sünteetilist mRNA-d rakkudesse. Geeniteraapia omaette haruks on antisenss-teraapia, mille eesmärgiks ei ole mitte puuduva geneetilise materjali lisamine, vaid haigusttekitavate mutatsioonide maskeerimine, muteerunud RNA lagundamine või inaktiveerimine lühikeste mittekodeerivate DNA või RNA oligonukleotiidide (ON) abil ja mida käsitletakse detailsemalt käesolevas töös.

### 1.2 Antisenss-teraapias kasutatavate nukleiinhapete toimemehhanismid

Antisenss-teraapia põhimõte seisneb nukleiinhappe (NA) paardumises märklaud-RNA-ga komplementaarsuse alusel. NA-terapeutikumide rakuliseks märklauaks võib olla kas pre-mRNA (splaiisingut muutvate ON-ide ehk SSO-de korral) või mRNA (nt miRNA, siRNA ja antisenss-ON-ide korral). Peale seostumist toimivad ON-id kahel erineval printsiibil: ühed indutseerivad märklaud-RNA degradatsiooni rakuensüümide poolt ja teised blokeerivad seda steeriliselt ega põhjusta lagundamist (Kole jt 2012). Esimene toimemehhanism on omane RNA interferentsi kaudu toimivatele väikestele RNA-dele ja RNAas H poolt äratuntavatele antisenss-ON-idele. Teise rühma kuuluvad translatsiooni ja voltumist blokeerivad ON-id ja SSO-d, mida kasutatakse ka käesolevas töös (Kole jt 2012; Monia jt 1993). Teisteks potentsiaalseteks teraapilisteks NA-teks on ribosüümid ja DNAsüümid, mis lagundavad märklaud-mRNA-d, ning aptameerid (nagu näiteks kliiniliselt kasutatav pegaptanib ehk Macugen) – NA segmendid, mis interakteeruvad valkudega, häirides nende funktsioneerimist (Patil jt 2005). Lisaks kasutatakse ka DNA-ga seostuvaid nn antigeenseid ON-e, mis tekitavad märklaud-alale tripleksi, blokeerides geeniekspressiooni transkriptsiooni tasemel (Stull jt 1995).

RNA interferents põhineb siRNA-de (*small interfering RNA*) või miRNA-de (*microRNA*) kasutamisel. Need seostuvad oma märklaud-mRNA-ga kas täieliku (siRNA) või osalise

(miRNA) komplementaarsuse alusel, misjärel dupleks lagundatakse RISC kompleksis (*RNA-induced silencing complex*) ja geeniekspressiooni tase langeb (Carthew ja Sontheimer 2009). Ravieesmärkidel disainitud miRNA-d võivad olla organismis esinevate miRNA-de analoogid (ehk miRNA mimeetikud) või nende antagonistid (ehk anti-miR-id), s.t kui esimesel juhul on märklauaks mRNA, siis anti-miR-id blokeerivad miRNA-d, suurendades vastava geeni ekspressioonitaset (joonis 1). Näiteks kontaktdermatiidi (*irritant contact dermatitis*, ICD) korral ei võimalda miR-146a ebapiisav hulk organismis põletiku maha surumist normaalsele tasemele ning vastava miRNA mimeetiku manustamine vähendab põletikuliste tsütokiinide ekspressiooni (Urgard jt 2016). siRNA toime näiteks on hepatotsüütide apoptoosi vahendava Fas retseptori ekspressiooni inhibeerimine. Fas mRNA-d lagundava siRNA süstimine hiirtele vähendas olulisel määral Fas hulka rakkudes ja maksakahjustust (Song jt 2003). Lisaks võivad RISC kompleksi kaudu töötavad RNA-d olla disainitud võõr-RNA lagundamiseks, nt respiratoorse süntsütsiaalse viiruse (RSV) N-valgu mRNA-ga paarduv siRNA inhibeerib RSV aktiivsust (DeVinceno jt 2008). siRNA puhul võivad osutada probleemiks *off-target* efektid, sest see võib seostuda mittetäieliku komplementaarsuse alusel (miRNA-tüüpi seostumine) mitme erineva RNA-ga rakus, vaigistades gene, mis ei ole selle märklauaks (Burchard jt 2009).



**Joonis 1. miRNA sünteetiliste analoogide ja antagonistide toime üldskeem.** miRNA mimeetikud on tavaliselt kaheahelalised oligonukleotiidid, mida rakus inkorporeeritakse RISC kompleksi ja need toimivad analoogselt vastava miRNA-ga. miRNA antagonistid ehk anti-miR-id on üheahelalised oligod, mis seostuvad oma märklaud-miRNA-ga komplementaarsuse alusel ja blokeerivad selle toimet. Nii saab kas suruda maha (mimeetiku abil) või tõsta (anti-miR-i abil) märklaud-geenide ekspressioonitaset (kohandatud AptamiR Therapeutics järgi).

Antisens-ON-id (ASO-d) seostuvad märklaud-mRNA-ga komplementaarsuse alusel ja pärsivad geeniekspressiooni. Nende toimemehhanismiks on kas dupleksi äratundmine ja lagundamine RNAas H poolt või ribosoomi alaühikute seostumise blokeerimine ja translatsiooni

pärssimine (Monia jt 1993; Kole jt 2012). Dupleksi stabiilsus sõltub suuresti märklaud-RNA sekundaarsest struktuurist: lineaarse RNA-ga tekkiv dupleks on palju stabiilsem kui nt juuksenõela struktuuri moodustava RNA-ga (Monia jt 1993). Lisaks imetaja RNAasi abil toimivatele ASO-dele on olemas nn välised suunavad järjestused (*external guide sequences*), mis paarduvad bakteriaalse mRNA-ga, misjärel dupleks võtab tRNA kuju ja selle lagundab bakteriaalne RNAas P (Kole jt 2012). Esimeseks ravimina kasutamiseks lubatud ON-iks oli 1998. aastal ASO Vitraveen ehk fomivirseen, mis blokeerib tsütomegaloviiruse (CMV) RNA translatsiooni (Crooke 1998). Seda kasutati põhiliselt HIV-nakatunud inimestel esineva retiniidi raviks, kuid ravim eemaldati turult mõne aasta pärast efektiivsemate ravivõimaluste ilmumise tõttu (DrugBank).

Teiseks suureks ON-ide rühmaks on SSO-d, mis kutsuvad esile märklaud-pre-mRNA splaissingu ümbersuunamist (Kole jt 2012) ja mida käsitletakse detailsemalt peatükis 1.2.2.

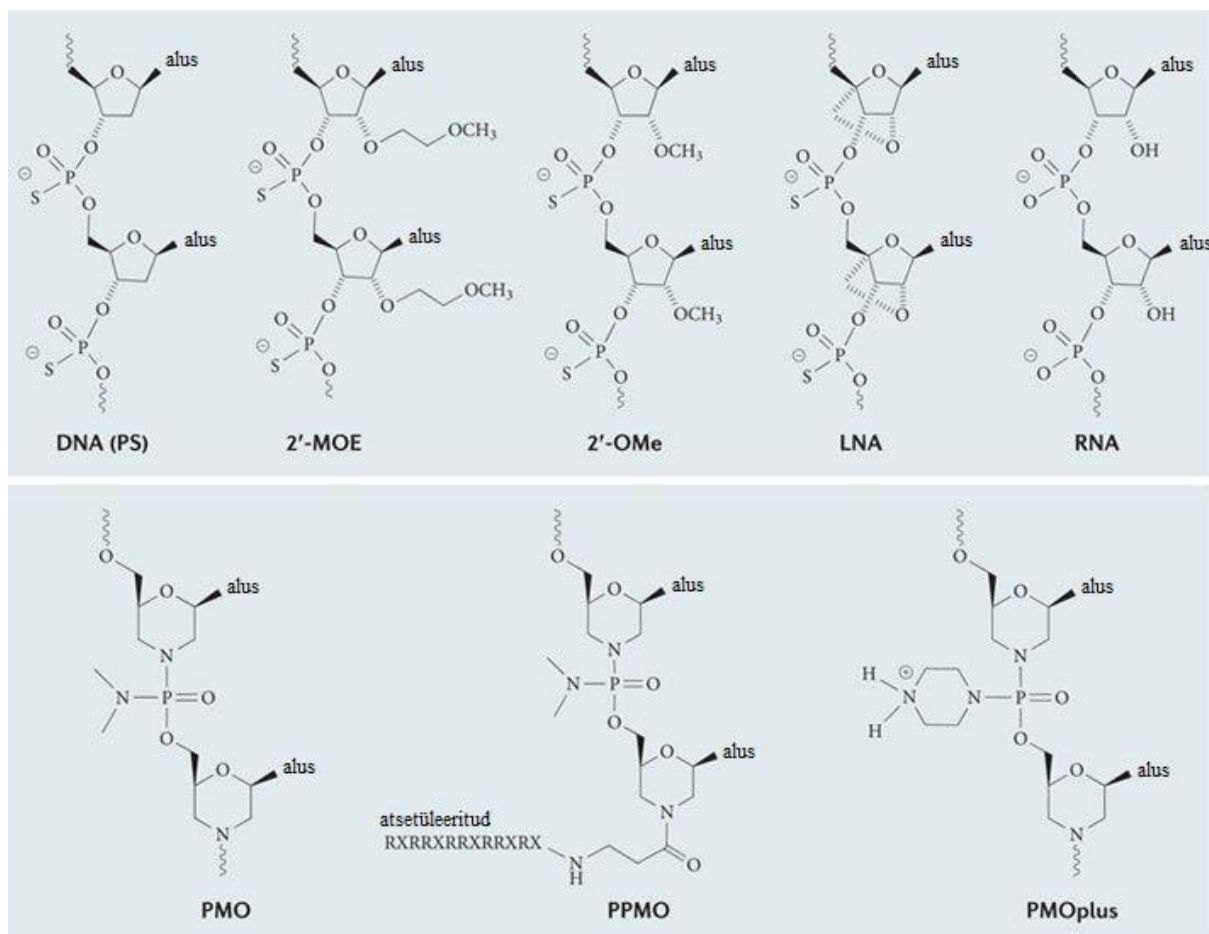
Eksogeensed geeniekspressiooni moduleerivad ON-id on tavaliselt 12-25 nukleotiidi pikad, kuna liiga lühikesed ON-id ei ole piisavalt spetsiifilised ja liiga pikk järjestus raskendab jällegi sisenemist raku ning suurendab mittespetsiifilise autohübridisatsiooni tõenäosust (Patil jt 2005).

### 1.2.1 Oligonukleotiidide keemilised modifikatsioonid

Modifitseerimata ON-e lagundatakse kiiresti rakuliste ekso- ja endonukleaaside poolt (Dagle jt 1991). Et suurendada nende stabiilsust ja märklauaga seostumise tugevust, viiakse ON-ide struktuuri sisse keemilisi modifikatsioone, mis võivad olla nii suhkrujäägis kui fosfaatselgroos (joonis 2). Suhkrujääki modifitseeritakse eelkõige 2' positsioonis, mille enim kasutatavad asendused on näiteks O-metüül-, metoksümetüül-, fluoriid- või aminorühm (Kole jt 2012; The biopolymer factory). Fosfaatrühma enimkasutatavaks modifikatsiooniks on selle muutmine fosforotioaadiks (PS), mis tagab suurema stabiilsuse nukleaaside vastu. Kompleksmodifikatsioonideks, mis hõlmavad nii suhku- kui ka fosfaatjääki, on fosforodiamidaat morfoliino oligomeerid (PMO) ja nende edasisel modifitseerimisel saadavad positiivselt laetud PMOplus ja PPMO ehk PMO konjugaat RPP-ga (joonis 2) ning PNA (*peptide nucleic acid*) (Pellestor ja Paulasova 2004).

Erinevatel põhimõtetel toimivatel ON-idel on lubatud modifitseerituse määr erinev: siRNA, miRNA ja märklaua degradatsiooni indutseerivate ASO-de toime eeldab äratundmist rakuensüümide (vastavalt RISC kompleksi valkude ja RNAas H) poolt, mis piirab nendesse sisseviidavate modifikatsioonide hulka. Teiselt poolt, translatsiooni blokeerivad ON-id ja SSO-d ei vaja ensüümide abi toime avaldamiseks, nii et keemilised modifikatsioonid ei takista nende

funktsioneerimist. Näiteks 2'-O-metüül modifikatsiooniga ON-id ei ole RNAas H substraadiks, mistõttu niimoodi täielikult modifitseeritud ON-id ei sobi kasutamiseks antisenss-teraapias, aga on see-eest väga sobilikud splaissingu korrigeerimiseks (Monia jt 1993).



**Joonis 2. Näited oligonukleotiidide (ON) stabiliseerivatest modifikatsioonidest.** Fosforotioaat (PS) nukleiinhappe (NA) selgroo fosfaatjärgis on üks hapniku aatomitest asendatud väävliga. 2'-metoksüetüül (2'-MOE) ja 2'-O-metüül (2'-OMe) modifikatsioonid tagavad ON suurema vastupidavuse nukleasid vastu ja lukustatud nukleiinhape (*locked nucleic acid*, LNA) seostub tugevamini märklauaga. Lisaks on võimalik suhkrujääki asendada morfoliino jäägiga ja fosfaatrühma fosfordiamidaatrühmaga – sellist ON nimetatakse fosfordiamidaat morfoliino oligomeeriks (PMO). PMOplus sisaldab positiivselt laetud piperasiinrühma ning PPMO on konjugeeritud positiivselt laetud peptiidiga. Käesolevas töös kasutati 2'-OMe modifikatsiooni sisaldavaid PS-selgrooga RNA ON-e, mis on stabiilsemad kui modifitseerimata ON-id ja seostuvad tugevamini oma märklaud-RNA-ga (kohandatud Kole jt 2012 järgi).

RNAi mehhanismiga toimivatel NA-del saab kasutada vaid väga väikest arvu modifikatsioone, eriti toimivas ehk antisenss-ahelas – ilma toimet vähendamata saab sinna lisada vaid mõne PS 3' otsas ja mõne modifitseeritud suhkrujäägi (Kole jt 2012). ASO-del on tavaliselt PS selgroog ning külgmised nukleotiidid sisaldavad lisa-modifikatsioone (2'-MOE või 2'-OMe), kusjuures keskele jäetakse u 10 nukleotiidi pikk modifitseerimata (ainult PS modifikatsiooniga) ala ("*deoxy gap*"), mida tunneb ära RNAas H, mistõttu neid kutsutakse ka gapmeerideks (Monia jt 1993; Kole jt 2012).

Kuna SSO-de ja translatsiooni blokeerivate ASO-de toime ei sõltu rakulistest ensüümidest, võivad need olla täies ulatuses modifitseeritud. Kasutatavateks modifikatsioonideks on nt 2'-O-metüül-fosforotioaat (2'OMePS), PMO ja LNA, mis tagavad kõrge aktiivsuse nii *in vitro* kui *in vivo*. Näiteks võib tuua Btk funktsiooni parandamist X-liitelise agammaglobulineemia (XLA) hiiremudelis ja ka patsientide primaarsetes leukotsüütides. Nii PMO kui ka 2'OMePS ja LNA modifikatsiooniga SSO-d olid efektiivsed splaissingu korrigeerimiseks *in vitro* ja *in vivo* tingimustes (Bestas jt 2014). Käesolevas töös kasutatud SSO-d sisaldasid 2'-O-MePS modifikatsiooni. 2'-O-MePS SSO-d seostuvad tugevamini märklaud-RNA-ga ja on stabiilsemad ega kutsu esile märklaud-RNA lagundamist RNAas H poolt, mis on oluline, kuna eesmärgiks on valgusünteesi taastamine, mitte pärssimine (Monia jt 1993; Kang jt 1998).

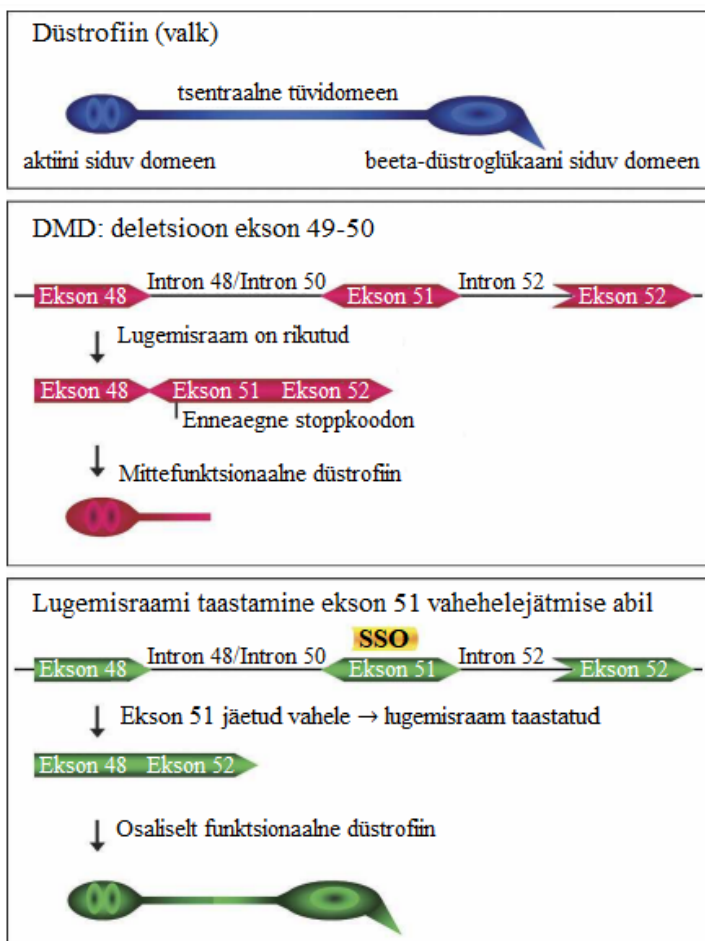
Erinevaid modifikatsioone sisaldavate NA-de omadused võivad olla erinevad, sõltudes aga konkreetsest NA-st ja kontekstist, nii et universaalseid erinevusi on raske esile tuua. Näiteks määrati mõnes uuringus 2'OMePS ON-ide efektiivsus kõrgemaks kui analoogse PMO ON-i oma (nt Chakravarthy ja Veedu 2019), kuigi teiste uurijate poolt on näidatud, et PMO ON-id on teatud juhtudel 2'OMePS ON-idest efektiivsemad, olles samas vähem järjestus-spetsiifilised (Heemskerk jt 2009). Lisaks võivad erinevalt modifitseeritud ON-idel olla erinevad farmakokineetilised omadused ja toksilisus (Heemskerk jt 2009).

## 1.2.2 Splaissingut muutvad oligonukleotiidid (SSO-d)

SSO-d on 15-25 nukleotiidi pikad ON-id (Ezzat jt 2011), mis seostuvad splaissingut suunavate järjestustega pre-mRNA-s. Kõik SSO-d põhjustavad splaissingu muutust, kuid need võivad toimida erinevaid mehhanisme kasutades, milleks on eksoni vahelejätmine (*exon skipping*), nagu see toimub Duchenne lihasdüstroofia (*Duchenne muscular dystrophy*, DMD) korral (Aartsma-Rus ja Van Ommen 2007); aberrantse splaissingu blokeerimine nt X-liitelise agammaglobulineemia ehk XLA ja beeta-talasseemia korral (Bestas jt 2014; Kang jt 1998); eksoni taaskasutus nt spinaalse lihasatroofia (*spinal muscular atrophy*, SMA) korral (Hua jt 2008) ning splaissingufaktorite eemaldamine kordusjärjestustelt nt müotoonilise düstroofia korral (Wheeler jt 2010).

DMD korral on haigussümptomite põhjuseks funktsionaalse düstrofiini vähesus või puudumine. Selle haiguse ravimiseks on kasutatud geeniteraapiat, süstides patsientidele normaalse düstrofiini geeni pDNA kujul (Romero jt 2004) või kasutades transfektsiooniks adeno-assotsieeritud viirusvektorit (Mendell jt 2010), kuid otsese pDNA injektsiooni tulemusel saavutatud ekspressioonitase oli väga madal ja viirus-vahendatud transfektsiooni puhul osutus

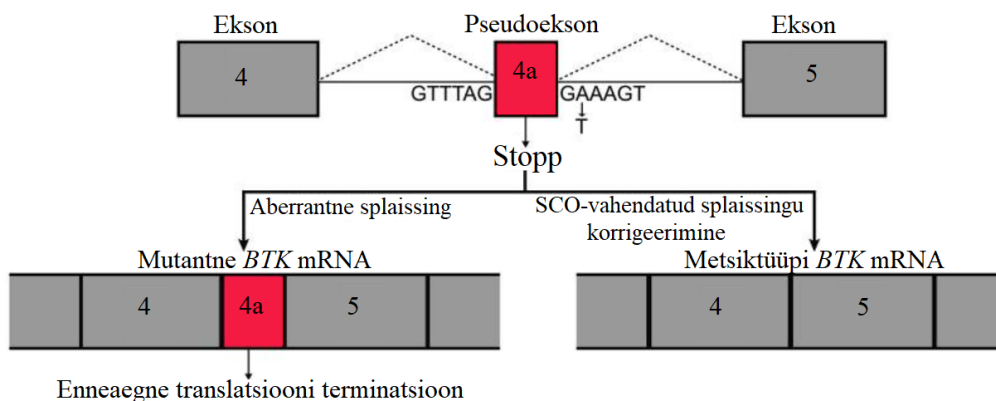
probleemiks immuunvastus rekombinantsele düstrofiinile. DMD-d põhjustab sageli deletsioon düstrofiini geenis, mis hõlmab kaht eksonit, rikkudes lugemisraami ja põhjustades lühema mittefunktsionaalse ja ebastabiilse valgu sünteesi (joonis 3). DMD teraapias kasutatav ON paardub eksonis 51 oleva splaissingu-saidiga, põhjustades vastava eksoni vahehelejätmist. See taastab lugemisraami ning sünteesitakse lühem, aga see-eest osaliselt funktsionaalne valk (Aartsma-Rus ja Van Ommen 2007).



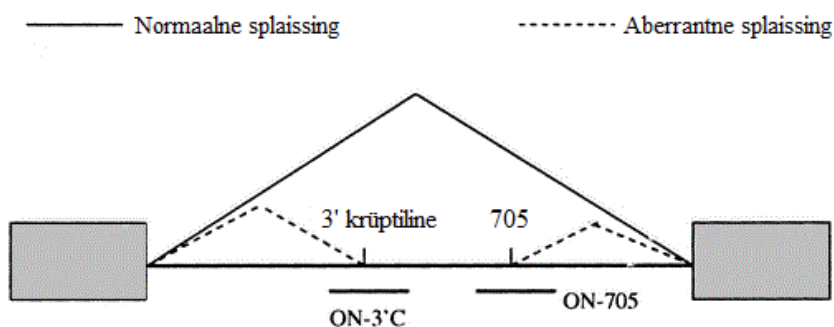
**Joonis 3. Spaissingu ümbersuunamine splaissingut muutva oligonukleotiidi (SSO) abil Duchenne lihasedüstroofia korral.** Düstrofiin koosneb kolmest domeenist (ülemine pilt). Deletsioon, mis rikub lugemisraami, põhjustab lühema mittefunktsionaalse valgu sünteesi (keskmine pilt). SSO seostumise tulemusel splaissitakse mutatsiooniga ekson 51 välja (alumine pilt). See taastab lugemisraami ning rakkudes sünteesitakse osaliselt funktsionaalne valk (kohandatud Aartsma-Rus ja Van Ommen 2007 järgi).

XLA ehk Brutoni tõve põhjuseks on mittefunktsionaalne BTK ehk Brutoni türosiinkinaas. Funktsionaalsuse kadu võivad põhjustada väga erinevad mutatsioonid: suured insertioonid ja deletsioonid, mittesünonüümsed missens- ja nonsens-mutatsioonid, splaissingu defektid ja raaminihke mutatsioonid. Need kõik võivad põhjustada XLA-d, kusjuures splaissingu defektid on haiguse põhjuseks umbes 1/9 juhtudest (Conley jt 1998). Splaissingu defekti põhjustab punktmutatsioon, mille tõttu lülitatakse mRNA koosseisu 4. introni osa, mille sees asub enneaegset translatsiooni terminatsiooni põhjustav stoppkoodon.

SSO, paardudes pre-mRNA-ga, blokeerib aberrantset splaissingut põhjustava järjestuse (Bestas jt 2014) (joonis 4). Antud juhul toimub normaalse splaissingu taastamine, nii et selliselt toimivaid SSO nimetatakse SCO-deks ehk splaissingut korrigeerivateks ON-ideks. Sama printsiibi järgi toimib SCO, mida kasutatakse beeta-talasseemiat põhjustava aberrantse splaissingu korrigeerimiseks beeta-globiini 2. intronis (joonis 5 ja Lisa 5).



**Joonis 4. Splaissingut korrigeeriva oligonukleotiidi (SCO) toimemehhanism XLA (X-liitelise agammaglobulineemia) ehk Brutoni tõve korral.** XLA korral on patsiendi Btk (Brutoni türosiinkinaas) mittefunktsionaalne. Üheks võimalikuks põhjuseks on splaissingu muutus, mille puhul sünteesitakse pseudoeksonit sisaldav mRNA, mille translatsioon katkeb enneaegselt stoppkoodoni tõttu. Põhjuseks on A→T asendus, mille tõttu tekib splaissingu doonorsait 4. introni sees. SCO, paardudes mRNA-ga, blokeerib vale splaissingu, taastades normaalse translatsiooni (kohandatud Bestas jt 2014 järgi).



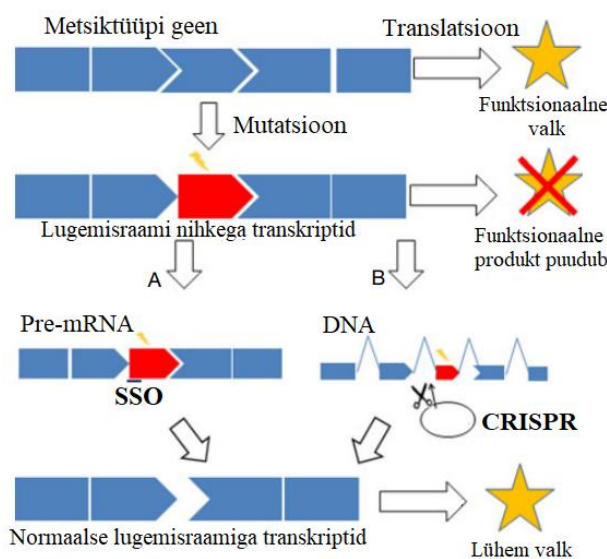
**Joonis 5. Splaissingu muutmine HeLa pLuc705 reporter-rakuliinis.** Skeemil on kujutatud lutsiferaasi geeni pre-mRNA, kuhu on sisestatud inimese beeta-globiini 2. intron, mis sisaldab splaissingu doonorsaiti tekitavat ühenukleotiidset asendust (T→G) positsioonis 705. See aktiveerib krüptilise splaissingu aktseptorsaidi (3' krüptiline) ülesvoolu, põhjustades valet splaissingut ja valgu sünteesi, kuna välja splaissimata introni osa sisaldab stoppkoodonit ja translatsioon peatub enneaegselt. Introni all on näidatud oligonukleotiidid (ON) – ON-705 ja ON-3'C – mis omavad splaissingut korrigeerivat aktiivsust, blokeerides vastavalt vale splaissingu doonor- või aktseptorsaidi (nendest ON-705 on efektiivsem) (kohandatud Kang jt 1998 järgi).

SMA (spinaalse lihastroofia) põhjuseks on funktsionaalse SMN1 (*survival motor neuron 1*) valgu puudumine, mida põhjustab vastava geeni homosügootne deletsioon või selle sisesed mutatsioonid (Hua jt 2008). SMN2 on SMN1 paraloog, mis ei asenda seda, kuna selle splaissingu käigus jäetakse vahele 7. ekson. Kasutatav ON blokeerib ISS (*internal splicing silencer*) 7. intronis, võimaldades funktsionaalse SMN2 ekspressiooni (Hua jt 2008).

Müotoonilist düstroofiat (*Dystrophia myotonica*, DM; ja täpsemalt DM1) põhjustab [CTG]-korduste ekspansioon DMPK (DM proteiinkinaasi) geenis. Vastav RNA akumulereerub tuuma ja seostudes splaissingu faktoritega pärsib see alternatiivset splaissingut ning põhjustab lihase funktsioneerimise häireid (Pistoni jt 2010). Splaissingu korrigeerimise mehhanism selle haiguse ravil on kaudne: ON paardub kordustega ja blokeerib nende interaktsiooni valkudega, vabastades seega splaissingu faktoreid ja taastades normaalse alternatiivse splaissingu (Wheeler jt 2010). Teiseks võimalikuks DM ravi strateegiaks on ASO-indutseritud mRNA lõikamine (Jauvin jt 2017).

Splaissingu muutmise võimaluste uurimiseks ja vastavate ravimite väljatöötamiseks luuakse tihtipeale reporter-rakuliinid. Nt XLA jaoks on olemas mitu pLuc705 rakuliini (Kang jt 1998; Rocha jt 2016), millest üks on HeLa pLuc705 (Kang jt 1998), mida kasutati käesolevas töös.

Võimalikuks alternatiiviks ON teraapiale on CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) süsteemi rakendamine, millega tekitatakse splaissingu-saiti rikkuvaid mutatsioone, taastades seega lugemisraami (joonis 6).



**Joonis 6. Splaissingut muutva oligonukleotiidi (SSO) ja CRISPR vahendatud splaissingu muutmise ja täpsemalt eksoni vahelejätmise induktsioon. SSO võib maskeerida splaissingu-saiti, põhjustades ebavajaliku ala väljalõikamist; kasutades CRISPR, saavutatakse sama efekt, tekitades mutatsioone splaissingu-saidis (kohandatud Hwang ja Yokota 2019 järgi).**

### 1.2.3 Ravimina kasutatavad oligonukleotiidid

ON-id on näidanud ennast efektiivsete ja ohutute potentsiaalsete NA-põhiste terapeutilikumidena nii *in vitro* kui *in vivo* katsetes, nii et hulk ON-e on jõudnud kliiniliste katseteni, millest osa omakorda on saanud müügiloa. Järgmiselt on toodud mõned näited kliinilise kasutuseeni jõudnud ON-põhistest ravimitest.

Esimeseks ravimiametite loa saanud ASO ravimiks sai 1998. aastal USA-s ja aasta hiljem ka Euroopas fomivirsen (Vitravene), mis blokeerib tsütomegaloviiruse (CMV) RNA translatsiooni (Crooke 1998). Seda kasutati HIV-nakatunud inimestel esineva retiniidi raviks, kuid selle tootmine peatati mõne aasta pärast efektiivsemate ravivõimaluste ilmumise tõttu (hakati rakendama HAART teraapiat, mille tõttu retiniiti haigestumine langes drastiliselt) (DrugBank; FDA).

2004. aastal toodi turule pegaptanib (Macugen), mis on modifitseeritud üheaheelaline ON, mis küll ei tööta antisenss-mehhanismi kaudu, vaid on aptameer ning seostub spetsiifiliselt VEGF-iga (*vascular endothelial growth factor*), mis mängib kesket rolli vanusega seotud kollatähni degeneratsioonis (*age-related macular degeneration*, AMD) [8]. Samas on ka selle ravimi kasutamine mõnevõrra langenud efektiivsemate ja odavamate alternatiivide kasutuselevõtu tõttu (Stein ja Castanotto 2017).

2013. aastal kiideti USA-s heaks mipomersen (Kynamro) homosügootse perekondliku hüperkolesteroleemia raviks (Drugs.com). See on antisenss PS gapmeer, mis indutseerib ApoB-100 mRNA lagundamist (Crooke jt 2005). Selle kasutamine on piiratud tõsiste kõrvalmõjude tõttu.

2016. aastal lubati kasutusse eteplirsen (Exondys 51, Sarepta) – SSO, mis parandab splaiissingut DMD korral (u 14% juhtudel, mis on põhjustatud 51. eksoni mutatsioonidest) (Drugs.com; BioPharma Dive) (Scoto jt 2018).

2016. aastal kiideti FDA poolt heaks naatrium defibrotiid (Defitelio), mida kasutatakse hepaatilise veno-oklusiivse haiguse (VOD) ehk sinusoidaalse obstruktiivse sündroomi raviks nendel patsientidel, kellel peale HSC (hematopoeetiliste tüvirakkude) transplantatsiooni areneb organi düsfunktsioon (Drugs.com). Selle eripära seisneb selles, et defibrotiid on mittesünteetiline polüdispersne segu erineva pikkusega DNA lõikudest, mis saadakse sea sooleepiteeli DNA eraldamisel ja depolümeeriseerimisel (saadavate fragmentide keskmine pikkus on 50 nukleotiidi, varieerudes 9-80 nukleotiidini), aga selle toimemehhanism pole lõplikult selge (Stein ja Castanotto 2017).

2016. aastal andis FDA kasutusloa nusinersenile (Spinraza) – SSO, mida kasutatakse SMA raviks (DrugBank). Nusinersen indutseerib SMN2 geeni 2. eksoni taaskasutust, blokeerides splaiissingut vaigistava elemendi kõrvalasuvast intronis (Hua jt 2010).

2018. aastal lubati FDA poolt turule esimene siRNA-põhine ravim patisiran (Onpattro), mis vaigistab mutantse transtüretiini mRNA-d ja mida kasutatakse polüneuropaatia ravimiseks päriliku transtüretiin-vahendatud amüloidoosiga täiskasvanutel (DrugBank; FDA). Patisirani ja teiste hetkel kasutusel olevate siRNA terapeutikumide farmakoloogiline toime põhineb siRNA-GalNAc konjugaatide suunamisel maksa, kus need seostuvad retseptoriga ja internaliseeritakse

hepatotsüütide poolt (Springer ja Dowdy 2018). Sama haiguse ravimiseks on töötatud välja ka 2018. aastal turule lubatud ASO inotersen (Tegsed) (Drugs.com); see seostub transtüreini mRNA-ga, kutsudes esile selle lagundamist (Gales 2019).

Kõikide loetletud ravimite manustamisviisiks on injektsioon: kas lokaalne (nt fomivirsen, pegaptanib, nusinersen), subkutaanne (inotersen, mipomersen) või intravenoosne (eteplirsen, defibrotiid, patisiran). Need on ühed kallimad ravimid, mille hind võib ulatuda mitmesaja tuhande dollarini: nt DMD ravi maksumus eteplirseniga on 750 000 kuni 1,5 miljonit USD aastas ja nusinerseniga 375 000 kuni 750 000 USD aastas (Pharmaceutical).

### **1.3 Nukleiinhapete transfektsiooni meetodid**

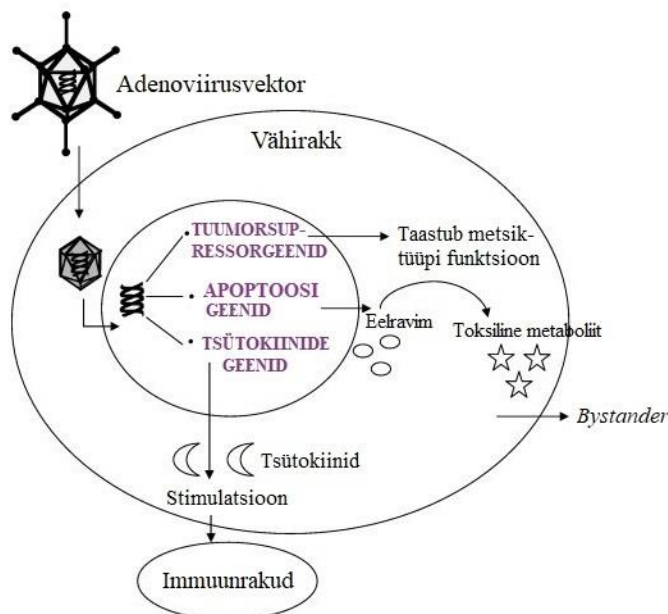
NA-põhineva teraapia suurimaks väljakutseks on NA efektiivne viimine sihtmärk-rakkudesse. Võõr-NA sisenemine rakkudesse on väheefektiivne (juba sellepärast, et nii NA kui rakupind on negatiivselt laetud) ja isegi kui NA siseneb rakku, lagundatakse see kiiresti (Dagle jt 1991; Patil jt 2005). Ravitoimet avaldavaks ühendiks võib olla kas NA ise (nt miRNA, siRNA, SSO-de puhul) või selle ekspressiooni tulemusel sünteesitav valk (geneetilise materjali puhul, mida transfekteeritakse plasmidi või viirusvektori koosseisus või mRNA-na) (Uherek ja Wels 2000). Viirusvektoreid või sisestamist plasmidi kasutatakse tavaliselt suurte DNA või RNA segmentide (nt geenide) viimiseks organismi, misjärel toimub nende transkriptsioon ja translatsioon ning avaldub vajalik toime (Patil jt 2005), aga ka nt shRNA (*short hairpin RNA*) ekspresseerimiseks (Labome). Lühemaid NA-sid (siRNA, miRNA, ASO-d jm) transfekteeritakse tavaliselt toimival, s.t transkriptsiooni mitte-vajaval kujul kahe- (nt siRNA ja miRNA mimeetikud) või üheaahelalisena (nt SSO-d).

NA-de transfektsiooni meetodid võib jagada kahte põhirühma: viraalseteks vektoriteks ja mitte-viraalseteks meetoditeks, mida kasutatakse “palja” NA (nt pDNA ja NA segmentide) transfektsiooni efektiivsuse suurendamiseks.

#### **1.3.1 Viirusvektorid**

Viraalsete vektoritena kasutatakse adeno-, retro-, parvo-, herpes- ja adeno-assotsieeritud viiruseid, mis on muudetud replikatsiooni-võimetuks, kuid millel on säilinud loomulik rakku invasiooni võime (Cevher jt 2012; Naso jt 2017; Witlox jt 2007; Blechacz ja Russell 2004). Erinevad viirusvektorid erinevad üksteisest nii geneetilise materjali tüübi (ühe- või kaheaahelaline DNA või RNA) kui ka immunogeensuse, ekspressiooni efektiivsuse ja kestuse ning nukleotiidses materjali hulga poolest, mida saab nende abil transfekteerida (Witlox jt 2007).

Mõned kasutatavatest vektoritest (herpes- ja adenoviirused) ei integreeru peremehe DNA-sse (joonis 7), osad aga (adeno-assotsieeritud, gammaretoviirused ja lentiviirused, nt HIV) integreeruvad. Viirusvektorisse saab sisestada suurt hulka transgeenset materjali (kiloaluspaarides) (Witlox jt 2007).



**Joonis 7. Adenoviirusvektori kasutamine osteosarkoomi raviks.** Rakku viidavaks transgeeniks on tavaliselt funktsionaalne tuumorsupressorgeen (mutatsiooni kompensatsiooni teraapia), apoptoosi geen (molekulaare kemoterapia, mille puhul mitte-toksiline ravim konverteeritakse vähirakus toksiliseks metaboliidiks transgeenilt ekspresseeruva ensüümi abil) või immuunsüsteemi stimuleerivat või selle poolt vähirakkude äratundmist suurendavat valku kodeeriv geen (immunopotentseerimisteraapia). *Bystander* efekt tähendab, et toksiline produkt surmab mitte ainult seda ekspresseeriva raku, vaid ka naaber-rakke, nii et mitte kogu populatsioon ei pea olema efektiivselt transfekteeritud (kohandatud Witlox jt 2007 järgi).

Esimeseks geeniteraapias kliiniliselt kasutatavaks ravimiks sai 2004. aastal gendicine, mida kasutatakse pea- ja kaelavähi ravis ning mis kujutab endast p53 geeni (tuumorsupressorgeeni) sisaldavat adenoviirusvektorit; see on osutunud efektiivseks ja ohutuks lisaks standardsele teraapiale (Zhang jt 2018).

Viirusvektorite põhiliseks eeliseks on efektiivne transfektsioon ja transgeeni stabiilne ekspressioon, kuid probleemideks on immunogeensus ja võimalik kantserogeensus (Naso jt 2017). Adeno-assotsieeritud viirusvektorit loetakse kõige ohutumaks, kuna selle immuunsüsteemi stimuleeriv toime on nõrgem kui teistel kasutatavatel viirusvektoritel ja integratsioon on järjestuse-spetsiifiline (Daya ja Berns 2008).

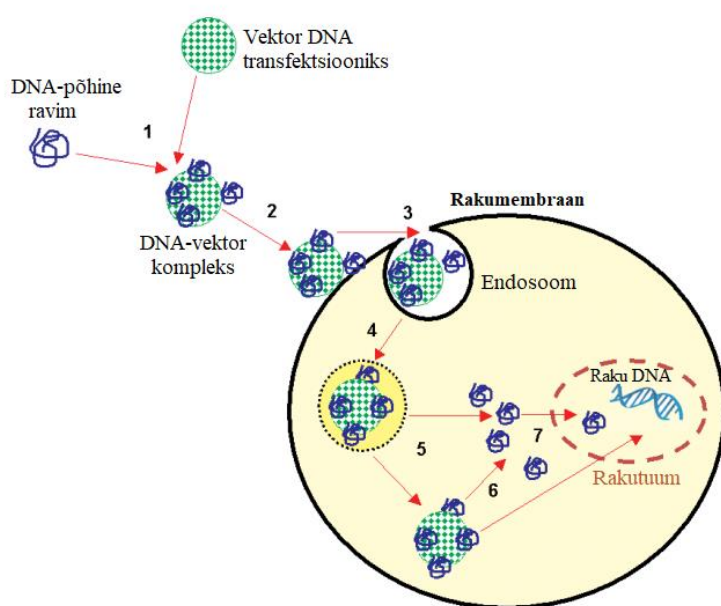
### 1.3.2 Mitte-viraalsed transfektsioonimeetodid

Nii pDNA kui ka lineaarsete NA-de (SSO, siRNA, miRNA, aptameerid jne) korral on tegemist nn “palja” NA-ga, mille sisenemine raku on väheefektiivne ning rakuväline ja -sisene

stabiilsus väga madal. Seetõttu rakendatakse erinevaid strateegiaid, mis parandavad NA-de transfektsiooni efektiivsust ja jõudmist rakusisesse sihtmärgini. Lisaks suurendavad NA-de stabiilsust ja tugevdavad seostumist rakulise märklauaga keemilised modifikatsioonid, mida käsitleti detailsemalt peatükis 1.2.1 (v.a pDNA, mida ei modifitseerita).

Laias laastus võib “palja” NA transfektsiooni hõlbustavaid meetodeid jagada kaheks: füüsikalisteks (nt elektroporatsioon, mikroinjektsioon, sonoporatsioon, hüdrodünaamiline ja biolistiline transfektsioon) (Luo ja Saltzman 2000; Cevher jt 2012), millel siin ei peatuta, ja keemilisteks meetoditeks.

Tavaliselt on NA transfektsiooniks kasutatavaks keemiliseks vektoriks katioonne ühend, mis moodustab kompleksi negatiivselt laetud NA ehk oma lastmolekuliga (Luo ja Saltzman 2000). Et muuta NA transfektsiooni efektiivseks, peab vektor üldjuhul täitma mitut funktsiooni. Esiteks peab vektor, komplekseerudes NA-ga, tagama selle stabiilsuse ekstratsellulaarses ruumis. Järgmiseks kriitiliseks etapiks on kompleksi seostumine rakupinnaga ja sisenemine rakku, mis toimub valdavalt endotsütoosi teel (Luo ja Saltzman 2000). Üheks olulisemaks NA-de rakus toimimist piiravaks teguriks on nende lagundamine endosoomides (Veiman jt 2013), s.t vektor peab ka tagama NA vabanemise endosoomist enne, kui selle sisemus muutub happeliseks ja hüdrofüüsilised ensüümid lagundavad kompleksi komponendid. Järgmisteks kriitiliselt olulisteks etappideks on NA dissotsieerumine vektorist, tsütoplasmaatilise lagundamise vältimine (selles etapis on olulised NA stabiilsust suurendavad keemilised modifikatsioonid) ja sisenemine rakutuuma SSO ja pDNA korral (joonis 8).

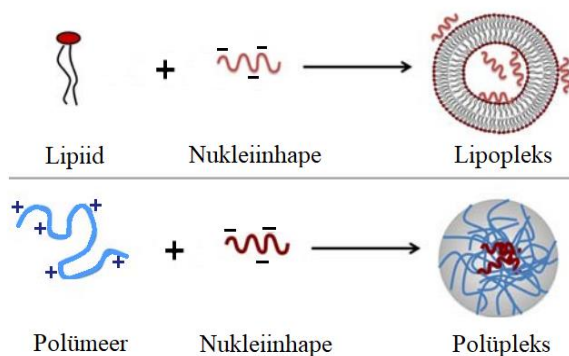


**Joonis 8. Nukleiinhappe (NA) vektorvahendatud mitte-viraalse transfektsiooni üldskeem.** Väljaspool rakku tekitatakse NA kompleks vektoriga (1), mis järgnevalt seostub raku pinnaga (2) ja internaliseeritakse (3), mille tulemusel satub see endosoomi (4). Seejärel toimub kompleksi või vaba NA vabanemine endosoomist (5) ning esimesel juhul selle dissotsieerumine vektorist (6). Nende NA-de puhul, mille toimekohaks on rakutuum (nt SSO-d), on lõpp-etapiks liikumine tuuma (7) (kohandatud Patil jt 2005 järgi).

Üheks esimeseks aineks, mida kasutati (viraalse) RNA transfektsiooni efektiivsuse suurendamiseks, oli DEAE-D ehk dietüülaminoetüül-dekstraan (Vaheri ja Pagano 1965). Transpordivektorina kasutatakse ka anorgaanilisi ühendeid: nt Ca-fosfaati kasutati adenoviiruse DNA komplekseerimiseks juba 1973. aastal (Graham ja Eb 1973). Paraku on mõlemal meetodil omad miinused, näiteks toksilisus ja transfektsiooni efektiivsuse ning bioloogilise efekti suur varieeruvus (Luo ja Saltzman 2000). Veel on üheks anorgaaniliseks vektoriks kaltsiumi ioonid, mida on kasutatud siRNA kompakteamisel nanopartikliteks (NP) (Goldshtein jt 2016).

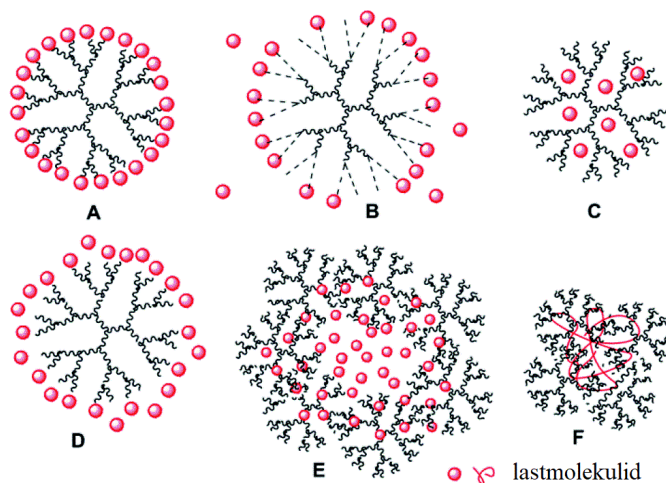
Oluliseks läbimurdeks NA-de transfektsioonis oli lipiidsete süsteemide, s.t lipofektsiooni kasutuselevõtt 1987. aastal (Felgner jt 1987). Katioonse lipiidi interaktsioonil NA-ga saadakse lipopleksid (joonis 9), millega transfektsioon on kordades stabiilsem ja efektiivsem kui eelnevalt kasutatud meetodite korral. Lipofektsiooni puudusteks on katioonsete lipiidide tsütotoksilisus ja immuunsüsteemi stimuleeriv toime (Dass 2004).

Teiseks suureks vektorite rühmaks on katioonsed polümeerid (nt PLL, polü-L-lüsiin; PEI, polüetüleenimiin; polüsahhariid kitosaan), mille interaktsioonil NA-ga tekivad partiklid, mida nimetatakse polüpleksideks (Mellet jt 2010) (joonis 9).



**Joonis 9. Lipoplekside ja polüplekside tekke skeem (kohandatud Rafael jt 2015 järgi).**

NA vektoritena kasutatavate erinevate katioonsete ainete hulk on väga suur. Üheks hästi defineeritud struktuuriga katioonsete polümeeride näiteks on dendrimeerid (joonis 10). Need on sünteetilised harunevad polümeerid, millel on defineeritud diameetri ja laenguga sfääriline struktuur (Haensler ja Szoka 1993).



**Joonis 10. Dendrimeerid ja nende komplekseerumine lastmolekuliga (kohandatud Caminade ja Turrin 2014 järgi).**

Üheks eripäraseks võimaluseks on tsüklodekstriinide kasutamine transfektsioonil (Mellet jt 2010). Need on looduslikud tsüklilised oligosahhariidid, mis moodustavad õõnega struktuuri, mille sisse sobituvad mitmed madalmolekulaarsed ravimid, aga ka ON-id (Mellet jt 2010). Samuti on ON-ide transfektsiooni vahendajatena kasutatud katioonseid porfüriine (Benimetskaya jt 1998), mis on heterotsüklilised orgaanilised ühendid. NA-de kapseldamiseks kasutatakse ka erinevatest ühenditest tekitatud mikrosfääre (Dass 2004).

Suhteliselt hiljuti on vektoritena leidnud väga laialdast kasutust raku penetreeruvad peptiidid (RPP). Need on enamasti alla 30 aminohappe (AH) pikad peptiidid, millel on omadus läbida bioloogilisi membraane, vedades endaga kaasas teisi molekule, milleks võib olla nii SSO, siRNA, pDNA kui ka peptiid või valk (Pooga ja Langel 2015; Kristensen ja Nielsen 2016). RPP-vahendatud transfektsioon on ka käesoleva töö fookuseks.

### 1.3.2.1 Rakkudesse penetreeruvad peptiidid (RPP-d)

Esimesteks avastatud looduslikeks RPP-deks olid Tat ja penetratiin. Tat (*Trans-activator of transcription*) on 86 AH pikk HIV valk, millel esmakordselt avastati võime siseneda rakkudesse (Frankel ja Pabo 1988; Green ja Loewenstein 1988) ja hiljem rakendati selle lühemat varianti ka vektorina (Nagahara jt 1998; Schwarze 1999). Penetratiini eellaseks oli *Drosophila* Antennapedia nimelise valgu homeodomeen, mis on DNA-d siduv 60 AH pikk valgu osa (Joliot jt 1991). Hiljem avastati, et transfektsioonis mängivad võtmerolli mõlema valgu lühikesed piirkonnad – Tat valgu 11 AH pikk osa (Vives jt 1997), mida kutsutakse ka Tat peptiidiks (pTat), ja Antennapedia homeodomeeni 16 AH pikk kolmas heeliks ehk penetratiin (Derossi jt 1994).

Kimäärsete RPP-de hulgast introductseeriti esimesena 1998. aastal transportaan (TP), mis oli pandud kokku kahest looduslikust peptiidist ja koosneb 27 AH-st (Pooga jt 1998). 2000. aastal sünteesiti TP10, mis on TP analoog, mille N-terminuses puudub kuus esimest AH (Soomets jt 2000). TP10 N-otsa stearüülimisel saadi omakorda PepFect3 (PF3) (Mäe jt 2009), mis sai teiste PF-ide ja NickFect'ide (NF) (Arukuusk jt 2013) eelkäijaks.

PF perekonna liige PF14 võeti kasutusele 2011. aastal. See disainiti Ezzat ja kolleegide poolt stearüülitud TP10 baasil, asendades peptiidis isoleutsiinid leutsiinidega ja lüsiinid ornitiinidega (ornitiini külghel on lüsiini omast lühem, mis võimaldab tugevama seostumise lastmolekuliga) (Ezzat jt 2011). Stearüülrühm omakorda tagab tugevama mitte-kovalentse seostumise NA-ga hüdrofoobsete interaktsioonide arvelt, efektiivsema vabanemise endosoomidest ja tõenäoliselt ka RPP-NA NP-de suurema stabiilsuse seerumi juuresolekul (Van Asbeck jt 2013; Veiman jt 2013). PF14 (nagu ka PF6) näitas ennast efektiivse vektorina siRNA, miRNA ja SCO transfektsioonis (Van Asbeck jt 2013; Urgard jt 2016; Juks jt 2015). Kuigi mõned NA transfektsiooniks disainitud RPP-d (nt PF6 ja PF14) on vaba peptiidina toksilisemad kui valkudest pärinevad penetratiin või pTat (Van Asbeck jt 2013), siis nende suurem efektiivsus NA transpordil kaalub selle üles ning üldine RPP-de toksilisus jääb oluliselt madalamaks võrreldes nt lipiidsete vektoritega (Urgard jt 2016; Langel jt 2011).

RPP-d võivad füüsikalis-keemiliselt olla katioonsed ehk positiivselt laetud, amfipaatsed või hüdrofoobsed (Pooga ja Langel 2015). Katioonsete hulka kuuluvad peptiidid, mis sisaldavad paljusid positiivselt laetud aminohappeid (nt pTat) või koosnevad nendest täielikult – polüarginiinid (Wender jt 2000; Rothbard jt 2000) ja polülüsiinid (Zauner jt 1998). Amfipaatsed peptiidid omavad hüdrofoobset ja hüdrofiilset osa ning nende hulka kuuluvad näiteks penetratiin ning TP ja tema derivaadid. Hüdrofoobsed peptiidid koosnevad valdavalt hüdrofoobsetest AH-test. Mõned RPP-d sisaldavad NLS-i (*nuclear localisation signal/sequence*), mis võimaldab RPP-lastmolekul NP translokatsiooni tuuma (Morris jt 1997). RPP efektiivsusel on eriti oluline roll positiivselt laetud (lüsiin, arginiin) ja hüdrofoobsete (eriti trüptofaan) AH-te olemasolul ja asukohal RPP järjestuses; lisaks mängib mõnede RPP-de puhul rolli nende L/D-stereochemia (Kristensen ja Nielsen 2016).

RPP võib olla seotud oma lastmolekuliga nii kovalentselt, nt disulfiidsildade kaudu (Patel jt 2009), kui ka mitte-kovalentselt (Morishita jt 2007) – sel juhul on olulisel kohal elektrostaatiliselt ja hüdrofoobselt interaktsioonid. NP-d, mida moodustavad erinevad PF-id oma lastmolekulidega, võivad olla vägagi erineva suuruse ja kujuga: näiteks näidati hiljuti, et PF6 moodustab miR-146a-ga väga regulaarseid sfäärilisi NP-sid diameetriga 30-50 nm, aga PF14 NP-d sama miRNA-ga olid väiksemad, ebaregulaarsema kujuga ja moodustasid tihtipeale agregate ja pikki hargnevaid filamente (Margus jt 2016; Urgard jt 2016).

## 1.4 Transfekteritava nukleiinhappe teekond rakusisese sihtmärgini

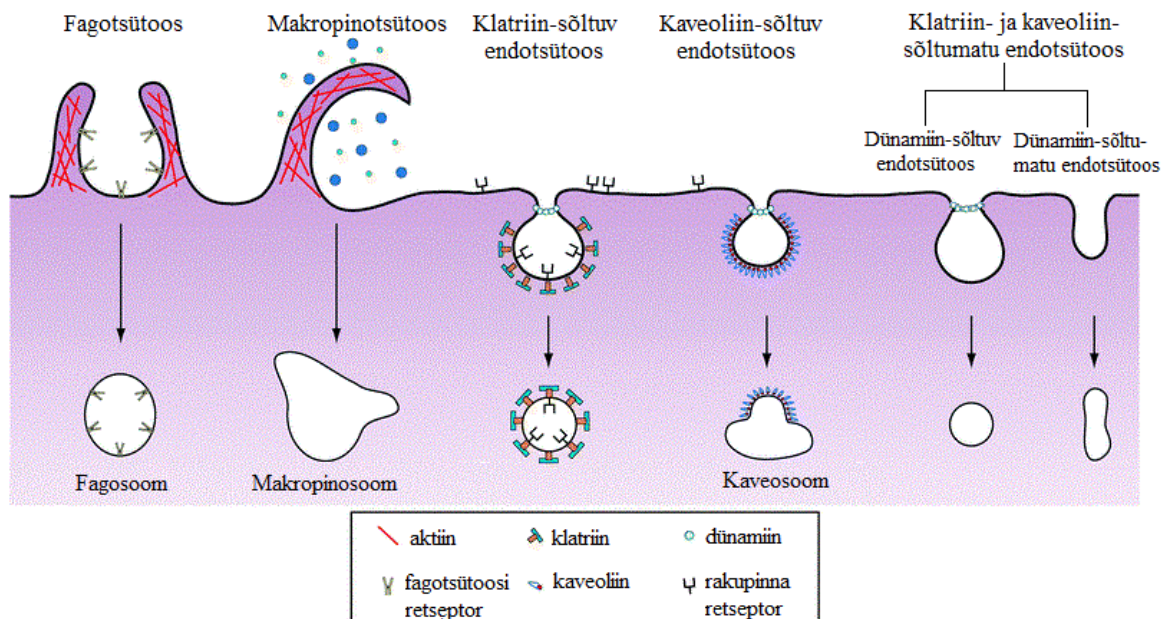
Toime avaldamiseks peab NA jõudma oma toimekohani, milleks peab see tegema läbi kaheetapilise rakku sisenemise protsessi: peab toimuma seostumine rakupinnaga ja tungimine läbi plasmamembraani, misjärel satuvad NP-d endosoomidesse. Rakku sisseviidava NA toimekohaks on kas tsütoplasma (miRNA ja siRNA jaoks) või rakutuum (nt SCO-del ja pDNA-l) ning selleni jõudmiseks peab toimuma endosoomidest vabanemine, mis on äärmiselt oluliseks etapiks, kuna vastasel juhul toimub lastmolekuli lagundamine endo-lüsoosomaalse raja organelides. Samuti ei tohi NA vektori külge kinni jääda, s.t peab toimuma dissotsieerumine vektorist ning tuuma suunatud NA-de puhul on lisaetapiks liikumine tuuma. Alla 20 nt pikad ON-id võivad vabalt pääseda tuuma läbi tuumapooride (Kang jt 1998), aga pDNA korral on selleks vajalik raku jagunemine.

### 1.4.1 ON-RPP NP-de sisenemine rakku

RPP-de rakku sisenemise võimalikeks mehhanismideks on otsene membraanide läbimine ehk penetratsioon/translokatsioon ja endotsütoos (Jiao jt 2009). Rakku sisenemise mehhanism sõltub nii RPP-st kui ka lastmolekuli olemasolust ja tüübist (Tünnemann jt 2006; Lorents jt 2012). SCO-RPP NP-de puhul on põhiliseks rakku sisenemise viisiks endotsütoos (Juks jt 2015; Juks jt 2017).

Endotsütoosi põhiliikideks on fagotsütoos ja pinotsütoos ning viimane jaguneb omakorda klatriin-, kaveoliin-sõltuvaks endotsütoosiks, makropinotsütoosiks ning klatriin- ja kaveoliin-sõltumatuks endotsütoosiks, mis omakorda võib olla kas dünaamiin-sõltuv või -sõltumatu (joonis 11). Fagotsütoos on omane eelkõige fagotsüütidele ehk õgirakkudele, mille ülesandeks on patogeenide eemaldamine organismist. Pinotsütoosi kasutavad aga kõik organismi rakud ning selle funktsioonid on palju laialdasemad: nendeks on nii signalseerimine ja homöostaasi säilitamine kui ka eksogeensete ainete, s.h NP-de sissevõtmine (Nelemans ja Gurevich 2020).

Erinevate NA-RPP NP-de internaliseerimisel prevaleerivad erinevad pinotsütoosi liigid. Näiteks  $\text{Ca}^{2+}$ -siRNA NP-de internaliseerimiseks kasutatakse klatriin-, kaveoliin- ja dünaamiin-sõltuvat endotsütoosi ja suurim roll on just klatriin-sõltuval endotsütoosil (Goldshstein jt 2016). pDNA-PF14 NP-de puhul mängib suurimat rolli kaveoliin-sõltuv endotsütoos (Veiman jt 2013) ja PF14-SCO NP-de puhul on kõige olulisemad makropinotsütoos ja kaveoliin-sõltuv endotsütoos, kusjuures makropinotsütoosi osakaal on u 2 korda suurem (Juks jt 2015; Juks jt 2017).

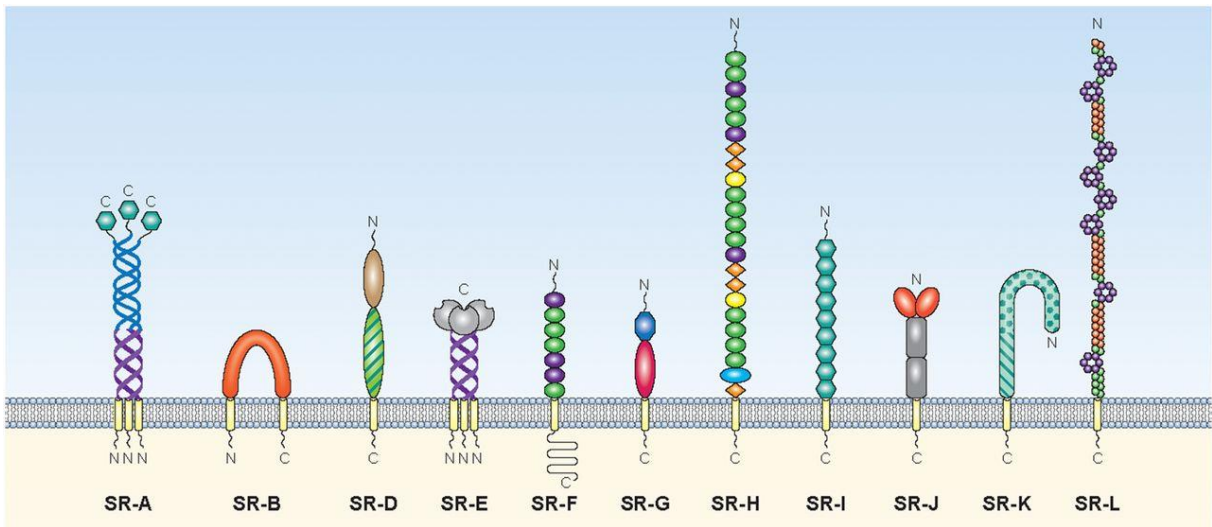


Joonis 11. Imetaja rakkude peamised endotsütoosi liigid (kohandatud Chou jt 2011 järgi).

Endotsütoosile eelneb NP-de seostumine rakupinnaga. Positiivselt laetud vektorite (nt katioonsed lipiidid ja RPP-d) seostumisel rakupinnaga ja järgneval endotsütoosil on oluline esmane ioonne interaktsioon membraanil olevate glükoosaminoglükaanidega (GAG) (Ziegler jt 2008; Jiao jt 2009). RPP-SCO NP-de sisenemisel mängib olulist rolli retseptor-vahendatud endotsütoos, kus peamisteks vahendajaiks on püüduretseptorid.

#### 1.4.1.1 Püüduretseptorid ehk *scavenger* retseptorid

Püüduretseptorid (*scavenger receptors*, SR) on rakupinna retseptorite rühm, mis võivad siduda suurt hulka nii endogeenseid (nt LDL) kui eksogeenseid (nt PAMP) molekule (PrabhuDas jt 2017; Canton jt 2013). SR-idel on palju funktsioone: alates LDL-ide (*low density lipoprotein*) transpordist rakku ja homöostaasi säilitamisest kuni patogeenide äratundmiseni (Canton jt 2017). SR-id ekspresseeruvad eelkõige immuunrakkudel (nt makrofaagid, dendriitrakud), kus need esmalt avastatigi (Goldstein jt 1979). Mõned SR (nt SR-I) ekspresseeruvad ainult immuunsüsteemi rakkudel (PrabhuDas jt 2017), kuid mõned esinevad ka paljude teiste rakupopulatsioonide pinnal: näiteks SR-A perekonna liikmed SR-A3, SR-A4 ja SR-A5 ekspresseeruvad ka kopsu-, südame- ja epiteelirakkudel (Jiang jt 2006; Whelan jt 2012). SR-ide nomenklatuur on olnud seni ebajärjekindel, mistõttu on ühel SR-il tavaliselt siiani kasutusel mitu alternatiivset nime, kuigi juba 2017. aastal loodi neile ühine konsensusnomenklatuur, mille järgi jagunevad imetaja SR-id 11 klassi (SR-A, B ja D kuni L) (PrabhuDas jt 2017).



Joonis 12. Imetaja püüdüretseptorite klassid (kohandatud PrabhuDas jt 2017 järgi).

Klass A SR (SR-A ehk SCARA-d) olid esimesed SR, mis avastati ja uuriti. Need on rakusisese regulatsiooni retseptorid, mis aga võivad paikneda ka plasmamembraanil. SR-A-de ligandide seas on ka RPP-NA NP-d – muuhulgas on SR-A-d PF14-SCO ja pDNA-PF14 NP-de sisenemise vahendajateks (Veiman jt 2013; Ezzat jt 2012). Käesolevas töös kasutatud HeLa pLuc705 rakud ekspresseerivad ainult SR-A3 (SCARA3) ja SR-A5 (SCARA5) retseptoreid, mis on olulised PF14-SCO NP-de (ja ka “palja” SCO) internaliseerimisel (Ezzat jt 2012). Samas on ka näidatud, et lisaks SR-A3 ja A5-le võivad PF14-SCO NP-de internaliseerimisel osaleda teised kattuva funktsiooniga retseptorid, kuna SR-A3 ja A5 inhibeerimine põhjustas NP-de bioloogilise toime täieliku inhibitsiooni, aga retseptorite *knock-down* vähendas toimet vaid poole võrra (Ezzat jt 2012).

SR-A3/5 suunatakse raku plasmamembraanile indutseeritud (reguleeritud) eksotsütoosiga: retseptorid paiknevad tsütoplasmas ja raku pinnale suunatakse need vaid siis, kui rakud on eksponeeritud PF14-SCO NP-dele, PF14 või teistele RPP-dele (Juks jt 2015). Retseptorite translokatsiooniks rakupinnale on olulised ekstratsellulaarsed  $Ca^{2+}$  ioonid, PI3K, aktiini tsütoskelett ja seerumi valgud: seerumi juuresolekul on SR-A-de hulk rakupinnal oluliselt suurem, kui ilma seerumita söötmes (Juks jt 2017).

SR-ide osaluse uurimiseks RPP-ON raku sisenemisel kasutatakse käesolevas töös nende inhibiitoreid (nt Fucoidan ja polüinosiinhape ehk Poly I), mis on SR-ide looduslikud ligandid. Need seostuvad konkurentselt SR-idega, blokeerides muude ligandide, s.h NP-de, seostumist (nt Ezzat jt 2012).

## 1.4.2 NA vabanemine endosoomidest

Mitte alati ei korreleeru RPP-NA NP-de bioloogiline toime rakkudega seostumise või raku sisenemise efektiivsusega (Urgard jt 2016; Van Asbeck jt 2013). Selle põhjuseks võib olla nii lastmolekuli ebaefektiivne vabanemine vektorist kui ka NP-de lukustamine endosoomidesse, millele järgneb nende lüsosomaalne lagundamine.

Vabanemine endosoomidest on kriitilise olulisusega etapiks kõikide endotsütoosi indutseerivate transpordimeetodite korral. On näidatud, et NP-de bioloogiline toime korreleerub pigem nende hulgaga tsütoplasmas kui rakuga seostunud ja internaliseeritud NP-de hulgaga (Van Asbeck jt 2013), mis rõhutab endosoomidest vabanemise olulisust. Endosoomidest vabanemist on üritatud tõhustada, modifitseerides RPP-de struktuuri erineval moel. Üheks võimaluseks on endosoomi lõhkuvate rühmade, nt klorokviini või selle analoogide, lisamine RPP struktuuri, nagu seda on tehtud PF6 korral (Andaloussi jt 2011). Teiseks populaarseks strateegiaks on hüdrofoobsete rühmade, nt stearüüljäägi, lisamine, mille näiteks on PF3 (Mäe jt 2009). Tugevalt katioonsete vektorite (nt PEI), aga ka rohkelt histidiini jääke sisaldavate vektorite vabanemist endosoomidest hõlbustab prootonite sidumine: pH langemisega endosomaalse raja vesiikulite küpsemisel kaasneb AH jääkide suurem protoneerimine (ehk “prootonkäsna efekt”). Selle tulemusel ei lange endosoomi pH oluliselt ja tekkinud prootongradiendi tasakaalustamiseks sisenevad organelli kloriidioonid ja prootonid, mille tõttu tõuseb endosoomi sisemuse osmolaarne rõhk ja lõpuks toimub vesiikuli hüperosmootne lõhkumine, võimaldades NP-de vabanemist (Cho jt 2003). Alternatiivseks mõnede (nt palju His jääke sisaldavate) RPP-de puhul võimalikuks mehhanismiks peetakse peptiidi protoneerimist sellisel määral, et see osaliselt vabaneb NP-st ja lõhub endosoomi membraani (Porosk jt 2019). Veel üheks transfektsiooni efektiivsust suurendavaks modifikatsiooniks on fusogeensete peptiidide lisamine RPP-dele: nt HA2 ehk hemaglutiniiniist tuletatud peptiid pH alanemisel protoneerub, võtab alfa-helikaalse struktuuri ja indutseerib endosoomi membraani lõhkumise ning RPP-lastmolekul kompleksi vabanemise tsütoplasmasse (Wadia jt 2004).

“Palja” (ilma vektorita) SCO ebaefektiivsuse üheks olulisemaks põhjuseks on selle lukustamine endosoomidesse ja järgnev lagundamine lüsosomaalsete ensüümide poolt (Juks jt 2015). Erinevalt “paljast” SCO-st, on PF14-SCO NP-d detekteeritavad peamiselt mitte-happelistes endosoomides, s.t PF14 tagab endosoomist vabanemise enne selle pH alanemist, vältides seega SCO lagundamist (Juks jt 2015). Kuid ka PF14-NA NP-de puhul tõstab endosoomi destabiliseerivate ainete (nt klorokviini) lisamine mõnevõrra NP-de bioloogilist aktiivsust (Veiman jt 2013). Klorokviin difundeerub happelistesse rakukompartimentidesse, nt

madala pH-ga endosoomidesse, põhjustades nende pH tõusu ja “prootonkäsna efekti”, s.t klorokviin takistab endosoomide hapustumist, aga samas ka destabiliseerib neid (Al Bari 2017; Nelemans ja Gurevich 2020).

Teisalt võib endosoomide pH langemine olla oluline transportivate NP-de vabanemiseks: nt “prootonkäsna” mehhanismi kaudu toimivate RPP-de, hemaglutiniiniga konjugeeritud peptiidide või ka  $\text{Ca}^{2+}$ -siRNA NP-de puhul. Endosomaalse pH langemisel toimub  $\text{Ca}^{2+}$ -siRNA NP-de dekomplekseerimine, millele järgneb prootonite sissevool, nagu ka prootonkäsna puhul, ja endosoomi lõhkumine (Goldshtein jt 2016). Samuti on võimalik endosoomidest vabanemise hõlbustamiseks kasutada fotoinduktsiooni, mille korral RPP on konjugeeritud fluorestseeruva värviga ja rakkude eksponeerimine valgusele nähtavas spektri osas indutseerib endosoomide lõhkumise ja peptiid-lastmolekul NP vabanemise tsütosooli (Räägel jt 2013).

“Paljas” SCO siseneb rakkudesse u 1 tunniga (paiknedes vesiikulites plasmamembraani lähedal), 2 tunniga jõuab see lüsosomaalsetesse vesiikulitesse ja 4 tunniga on suurem osa lüsosoomides, kuid ei ole detekteeritav tsütoplasmas ega tuumas. Kui aga komplekseerida see PF14-ga, hakkavad NP-d sisenema rakku u 30 minutiga ja 1 h pärast hakkavad need vabanema endosoomidest, kuid 4 tunniga vabaneb tsütosooli vaid 8% NP-dest ja ainult mõned SCO molekulid jõuavad tuuma (Juks jt 2015).

### 1.4.3 Kaltsiumi ionide roll RPP-vahendatud transfektsioonis

Kaltsium mängib olulist rolli paljudes raku elutegevuse protsessides: rakusiseses signaaliülekanandes (Clapham 2007), rakumigratsioonis (Wei jt 2012), lihaskontraktsioonis (Szent-Györgyi 1975), närviimpulsi ülekanandes (Neher ja Sakaba 2008) jpm, olles näiteks üheks klatriin-sõltuva endotsütoosi võtmeregulaatoriks nii närvisünapsites kui ka mitte-neuraalsetes rakkudes (Santos jt 2017). Selle kontsentratsioon ekstratsellulaarses keskkonnas on keskmiselt 1 mM ja raku tsütoplasmas 100 nM, kuid võib tõusta üle 10 korra (Bagur ja Hajnóczky 2017).

Ka RPP-de vahendatud transfektsiooni efektiivsus sõltub rakusisesest kaltsiumi ( $\text{iCa}$ ) kontsentratsiooni muutusest. Hiljuti näitas meie uurimisgrupp, et RPP-d jagunevad kahte rühma: ühed (amfipaatsed, nt TP ja TP10) kutsuvad esile  $\text{iCa}$  kontsentratsiooni stabiilset tõusu, indutseerides  $\text{Ca}^{2+}$  ionide sissevoolu ja membraani parandamise vastust (*membrane repair response*, MRR), samas kui teised (katioonsed, nt pTat ja R9) mitte (Lorents jt 2012). Samas kutsuvad mõlema rühma peptiidid esile lühiajalist  $\text{iCa}$  kontsentratsiooni tõusu, mis on hädavajalik nende sisenemiseks rakku (Melikov jt 2015; Lorents jt 2012). RPP sisenemiseks vajaliku  $\text{iCa}$  kontsentratsiooni tõusu jaoks on olulised nii rakusisesed  $\text{Ca}^{2+}$  varud (eelkõige ER-ist) kui ka ekstratsellulaarse  $\text{Ca}^{2+}$  sissevool katioonsete kanalite kaudu (Melikov jt 2015).

Lastmolekuliga kompleksis olev RPP kutsub esile väiksema iCa kontsentratsiooni tõusu ja MRR-i kui sama peptiid vabana (Lorents jt 2012).

Ca<sup>2+</sup>, nagu ka PI3K, aktiini tsütoskelett ja seerumvalgud, on olulised SR-A-de (täpsemalt SR-A3 ja SR-A5) toomiseks rakupinnale ja PF14-SCO NP-de toime avaldamiseks. Samas iCa kontsentratsiooni tõus üksinda ei suuda indutseerida SR-A3 ja SR-A5 translokatsiooni membraanile (Juks jt 2017), kuigi suurendab RPP sisenemise efektiivsust (Melikov jt 2015). Ca<sup>2+</sup> eemaldamine rakke ümbritsevast keskkonnast vähendab u 25% võrra PF14-SCO NP-de assotsieerumist rakupinnaga ja internaliseerimist ning 30-60% võrra NP-de bioloogilist toimet (Juks jt 2017; Melikov jt 2015).

Samuti on kaltsium ja tema ühendid leidnud kasutust NA transportivate vektoritena: Ca-fosfaati kasutati adenoviiruse DNA komplekseerimiseks juba 1973. aastal (Graham ja Eb 1973), viies transfektsiooni läbi kõrge CaCl<sub>2</sub> kontsentratsiooni juures. Lisaks sellele on võimalik Ca<sup>2+</sup> ioone kasutada siRNA kondenseerimiseks NP-deks (Goldshtein jt 2016). Samas töös näidati ka, et Ca<sup>2+</sup> on oluline siRNA laengu neutraliseerimiseks, NP-de tekkeks, internaliseerimiseks ja vabanemiseks endosoomidest. Samas teised uuritud kahevalentsed metalliioonid, millega tekkisid sarnased NP-d, ei soodustanud siRNA toimet (Mn ja Zn-ga olid NP-d toksilised, Mg-ga ei võetud neid rakkudesse ning Ba-ga sadenesid osakesed raku pinnale) (Goldshtein jt 2016).

Ca rolli uurimiseks töödeldakse tavaliselt rakke vastavate kelaatoritega (nt EGTA, BAPTA-AM) (Bödding ja Penner 1999), mis seovad selle, vähendades keskkonnas oleva vaba Ca<sup>2+</sup> kontsentratsiooni. Ca<sup>2+</sup> sisestamiseks rakkudesse kasutatakse ionofoore – peamiselt ionomütsiini (Morgan ja Jacob 1994).

Kaltsiumit on kasutatud pDNA transfektsiooni efektiivsuse tõstmiseks Tat peptiidiga nii *in vitro* (Baoum jt 2009) kui ka *in vivo* süsteemsel ja lokaalsel manustamisel (Ishiguro jt 2017). Ca<sup>2+</sup> toimemehhanismiks pakkusid uuringu autorid „pehmet“ ristsidumist (Baoum jt 2009), eeldades, et Ca<sup>2+</sup> ioonid interakteeruvad fosfaat- ja aminorühmadega, kondenseerides pTat-pDNA NP-deks, mis ei ole tsütotoksilised. Rakkude tundlikkus Ca<sup>2+</sup> kontsentratsiooni tõusu suhtes võib olla väga erinev, sõltudes nii rakuliinist kui ka muudest teguritest: nt fibroblastide elulemus ei langenud 3 mM Ca<sup>2+</sup> juuresolekul valmistatud siRNA NP-de mõjul, samas makrofaagide jaoks olid toksilised NP-d, mille valmistamisel kasutati üle 1 mM kaltsiumit, kusjuures makrofaagide hävimise otseseks põhjuseks võis olla kaltsium-indutseeritud agregatsioonile järgnev naaberrakkude suremine (Goldshtein jt 2016).

## 2 Eksperimentaalosa

### 2.1 Töö eesmärgid

Varasemate uuringute tulemuste põhjal (Juks jt 2017; Melikov jt 2015), mis näitasid, et  $\text{Ca}^{2+}$  ionide puudujääk võib vähendada PF14-SCO nanopartiklite (NP) transfektsiooni efektiivsust ja bioloogilist toimet ning et  $\text{Ca}^{2+}$  abil on võimalik suurendada pTat-pDNA NP-de efekti, oletasime, et  $\text{Ca}^{2+}$  ionid võivad parandada PF14-SCO NP-de sisenemist rakkudesse ja splaissingu korrigeerimise efektiivsust SCO poolt. Töö eesmärgiks oli kontrollida antud hüpoteesi tõesust, uurides nii NP-de sisenemist rakkudesse mikroskoopia ja läbivoolutsütomeetria abil, kui ka splaissingu korrigeerimise efektiivsust SCO poolt, mida hinnati mõttes lutsiferaasi aktiivsust reporter-rakuliinis HeLa pLuc705. Lisaks uuriti detailsemalt formeervate NP-de füüsikalisi omadusi ja internaliseerumise mehhanismi. Täiendavalt uuriti ka teiste kahevalentsete metalliioonide toimet PF14-SCO NP-dega indutseeritud splaissingu korrigeerimisele, lisaks  $\text{Ca}^{2+}$ , ning mõnede teiste RPP-de NP tõhustamist lisaks PF14 omadele.

### 2.2 Materjalid

Rakuliinid:

Reporter-rakuliinidena kasutati HeLa pLuc705 ja HeLa EGFP 654 rakke, mis on inimese beeta-talasseemia mudelliinid. HeLa pLuc705 rakud sisaldavad lutsiferaasi geeni, kuhu on sisestatud 705. positsioonis mutatsiooni kandev inimese beeta-globiini 2. intron (Kang jt 1998) (vt joonis 5). HeLa EGFP 654 rakkude genoom sisadab EGFP geeni, kuhu on sisestatud beeta-globiini intron, mis sisaldab splaissingu defekti põhjustavat mutatsiooni 654. positsioonis (ExPASy) (vt Lisa 5).

Kasutatud reagentid:

1) SCO-d: SCO-705, SCO-654, SCO-Cy5. Kõik kasutatud SCO-d on üheaahelised 18 nt pikad 2'-O-metüül-fosforotioaat (2'OMe PS) modifikatsioonidega RNA ON-id, mille laeng on -17 ja mille järjestus on komplementaarne inimese beeta-globiini 2. introni pre-mRNA-ga. SCO-705: CCU CUU ACC UCA GUU ACA (Kang jt 1998). SCO-654: GCU AUU ACC UAA ACC CAG (Metabion, Saksamaa). SCO-Cy5 on järjestuse poolest identne SCO-705-ga, aga kannab fluorestsentsmärgist. Kasutati Milli Q (MQ) kvaliteediga vees füsioloogilise pH juures lahustatud 20  $\mu\text{M}$  SCO varulahuseid, mida säilitati külmutatult temperatuuril  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Kasutatud SCO-d on ostetud MicroSynth'ilt (Šveits) ja Metabionilt (Saksamaa).

2) RPP-d: põhiliseks uuritud peptiidiks oli PF14. Osades katsetes kasutati ka järgmiseid peptiide: NF55, PF6, NF70 (H52), NF71 (H31), NF72 (H82), C22-14, WRAP1, WRAP5. Peptiidid lahustati 1 mM kontsentratsioonil MQ vees. Vajadusel (PF14 ja C22-14 korral) lahustati peptiidid 1 mM TFA-d (trifluoroäädikhape, *trifluoroacetic acid*) sisaldavas vees. Peptiidide varulahused säilitati külmutatult -20 °C juures. PF14 osteti PepScan'ilt (Holland) ja C22-14 Pepmic'ilt (Hiina). Ülejäänud PF ja NF peptiidid olid sünteesitud Prof. Ülo Langeli töögrupi poolt Stockholmi Ülikoolis ja TÜTI-s.

**Tabel 1. Kasutatud RPP-d, nende järjestused, laengud ja aminohapete arv.** Kõikidel PF ja NF perekonna peptiididel on C-ots amideeritud; e – ornitiinil on süntees jätkatud kõrvalahelast ( $\delta$  NH<sub>2</sub> rühmalt, mitte põhiahela  $\alpha$  NH<sub>2</sub>-lt); f – lüsiini külghela külge on lisatud lüsiin ja selle külge veel 2 lüsiini molekuli ning kummagi külge 2 klorokviini (kl.) molekuli. Kõik peptiidide omadused on modelleeritud ja laengud või logD arvutatud kasutades MarvinSketch 15.9.14, ChemAxon Ltd, USA (Porosk jt 2019). WRAP peptiidide järjestused ja laengud on võetud Konate ja kaasautorite artiklist (Konate jt 2019).

RPP	Teine nimi	Järjestus	N-terminaalne rasvhape	Laeng (N) (pH=7,4 juures)	Aminohapete arv
PF3	PepFect3	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	C18	+4	21
PF14	PepFect14	AGYLLGKLLLOOLAAAALLOLL	C18	+5	21
C22-14		AGYLLGKLLLOOLAAAALLOLL	C22	+5	21
PF6	PepFect6	AGYLLGK <sup>f</sup> INLKALAA LAKKIL	C18	+3 (8,9)	21 + 3K + 4 kl.
NF55	NickFect55	AGYLLGO <sup>e</sup> INLKALAA LAKAIL	C18	+3 (3,1)	21
NF70	H52	HHHHYHHGO <sup>e</sup> ILLKALAKAIL	C20	+4 (4,6)	22
NF71	H31	HHYHHGO <sup>e</sup> ILLKALKALAKAIL	C18	+4 (5,2)	20
NF72	H82	HHHHHHYHHGO <sup>e</sup> ILLKALKALAKAIL	C20	+4 (5,9)	24
WRAP1		LLWRLWRLWRLWRLWRL		+5	16
WRAP5		LLRLLRWWRLRL		+5	15

3) Rakkude kultiveerimise lahused ja komponendid. Kasutati kõrge glükoosisaldusega (4,5 g/L Glc) DMEM söödet (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (BioWhittaker, USA/Sigma-Aldrich, UK), mis sisaldas 10% FBS-i (*fetal bovine serum*, veiseseerum) ja 1% penitsilliini-streptomütsiini lahust (100 U/mL penitsilliini ning 100 µg/mL streptomütsiini). Trüpsiin-EDTA lahus (edaspidi trüpsiin), mis sisaldas 0,05% trüpsiini ja 0,53 mM EDTA'd (Corning, USA). DPBS (edaspidi PBS) ehk Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline ilma kaltsiumi- ja magneesiumita (Corning, USA).

4) SR-A inhibiitorid ja nende analoogid: fukoidaan, galaktoos, polüinosiinhape (Poly I), polütsütidüülhape (Poly C) (kõik Sigma-Aldrich'ilt, USA).

5) Muud ained: LF2000 (Lipofektamiin) (Thermo Fisher Scientific, USA), pGL3 (Promega, USA), lutsiferaasi substraat XenoLight D-Luciferin – K<sup>+</sup> sool (PerkinElmer, USA), Cell Culture Lysis Reagent (Promega, USA), MQ vesi, Fluoromount (Electron Microscopy Sciences, USA), Draq5 (BioStatus Limited, UK). Ülejäänud lahuste komponendid (nt CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, SDS jm) ning klorokviin (ingl. k. *chloroquine*) osteti Labochema'lt ja Appllichem'ilt kui ei ole märgitud teisiti.

6) Kitid: MTT assay lahuse koostis võeti artiklist Riss jt 2016, valgu mõõtmiseks kasutati DC Protein Assay Instruction Manual (Bio-Rad, USA), lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmise protokoll põhines Helmfors jt 2015 ja Rocha jt 2016 artiklitel ja lutsiferaasi aktiivsuse sõltuvuse analüüs erinevast reagentide segamise skeemist ja keskkonnast lähtus Saher jt 2018.

## 2.3 Metoodika

### 2.3.1 Rakkude kultiveerimine ja külvamine

HeLa pLuc705 rakke kasvatati täissöötmes 37 °C juures veeauruga küllastatud atmosfääris, mis sisaldas 5% CO<sub>2</sub>.

Rakke külvati ümber igal teisel päeval  $1,3 \times 10^6$  rakku 9 cm läbimõõduga koekultuuri tassidele (Falcon, USA). Katseteks külvati rakud 12 (Greiner Bio-One, Saksamaa), 24 (VWR, USA) või 96 (Sarstedt, Saksamaa) auguga koekultuuri plaatidele. Külvatud rakkude arv ühe augu kohta sõltuvalt plaadi tüübist ja kultiveerimise ajast on toodud Tabelis 2. Enne transfektsiooni kasvatati rakke kultuuris üleöö, s.t 1 ja 4 tundi (t) punktide puhul oli summaarne kasvamisega u 1 ööpäev (öp), 24 t punkti jaoks oli see u 2 öp ja 48 t punkti jaoks 3 öp.

**Tabel 2. HeLa pLuc705 rakkude külvamise tihedus erinevate ajapunktide ja plaatide jaoks.** Tabelis toodud ajapunktid tähistavad rakkude inkubeerimisega koos RPP-SCO NP-dega lahustega.

	1 t ja 4 t (rakku/auk)	24 t (rakku/auk)	48 t (rakku/auk)
12 auguga plaat	$1,4 \times 10^5$	$7 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$
24 auguga plaat	$5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$
96 auguga plaat	$1,1 \times 10^4$	$5,5 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$
8 kambriga plaat	$2,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$8 \times 10^3$

### 2.3.2 RPP-SCO NP-de valmistamine

NP-de valmistamise standardne skeem oli järgmine: RPP ja SCO segati kokku MQ vees 1/10 lõppruumalas, rakendades molaarset suhet (*molar ratio*, MR) 5, nii et raku söötmes oleks SCO lõpp-kontsentratsioon 100 nM. Selleks lahjendati mõlemad reagentid 50% ruumalas vees ja segati saadud lahused omavahel kokku (segades u 5 s) wortex segisti abil. Lahuste

valmistamiseks kasutati sõltuvalt ruumalast kas 0,5 mL või 1,5 mL plasttuube (Ratiolab, Saksamaa). Saadud segu inkubeeriti 15 min toatemperatuuril RPP-SCO NP-de täielikuks formeerumiseks, vajaduse korral lisati uuritavaid metalliioone (segamine u 5 s) ning inkubeeriti toatemperatuuril veel 15 min. Ilma ionide lisamiseta formeeritavaid NP-d inkubeeriti toatemperatuuril 30 min, nii et kõikide lahuste töötlemine jätkus üheaegselt. Saadud NP-de töölahus lahjendati täissöötmes vahekorras 1/10 ja kanti rakkudele.

Lisaks PF14-le rakendati SCO rakkudesse transfekteerimiseks ka teisi Tabelis 1 loetletud peptiide ning kasutades molaarseid suhteid 1, 3, 5, 7, 10, 15 ja 20. Kahevalentsetest metalliioonidest rakendati  $\text{Ca}^{2+}$  ja  $\text{Mg}^{2+}$  kontsentratsioonidel 10  $\mu\text{M}$  kuni 20 mM ning  $\text{Mn}^{2+}$  ja  $\text{Zn}^{2+}$  kontsentratsioonidel 100  $\mu\text{M}$  kuni 5 mM. Kõikides katsetes olid negatiivseks kontrolliks töötlemata rakud, mida inkubeeriti täissöötmes, millele lisati 10% mahuprotsenti MQ vett tagamaks võrdseid osmootse rõhu tingimusi NP-dega töödeldud rakkudega.

### 2.3.3 Konfokaalmikroskoopia

HeLa pLuc705 rakud külvati 24 auguga plaadile ümmargustele katteklasidele (läbimõõduga 12 mm, „Menzel-Gläser“, Saksamaa) u 1 öp enne transfektsiooni. Järgmisel päeval vahetati täissööde NP sisaldava täissöötme vastu. PF14-SCO NP-d formeeriti nagu eelpool kirjeldatud (punkt 2.3.2), kasutades Cy5 märgisega SCO-d ning lisades  $\text{CaCl}_2$  ja  $\text{MgCl}_2$  lõpp-kontsentratsiooniga 0,3 mM ja 3 mM. Samuti analüüsiti “palja” SCO ja ilma metalliioonideta valmistatud NP-dega töödeldud rakke.

Rakke inkubeeriti NP sisaldavas täissöötmes 1, 4 või 24 t 37 °C juures. Järgnevalt valmistati rakkudest mikroskopeerimise preparaadid. Selleks pesti rakud 2 korda PBS-iga (kõik pesud u 1 min) ja fikseeriti 4% paraformaldehüüdi (PFA) lahusega PBS-is 30 min toatemperatuuril. Sellele järgnes PBS-iga pesemine (1 kord) ja rakutuumade värvimine 4',6-diamidino-2-fenüülindooliga (DAPI), milleks inkubeeriti rakke 5 min 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DAPI lahuses PBS-is. Seejärel pesti rakkudega klaasid 1 kord PBS-iga ning sulundati alusklaasidele 30% glütserooli või Fluoromount'i tilkadesse. Katteklaside ääred suleti läbipaistva küünelakiga, preparaadid kuivatati ~10 min ja analüüsiti Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Jaapan) konfokaalmikroskoobiga. Igast proovist valmistati kaks paralleelpreparaati ning igast preparaadist salvestati vähemalt kolm kujutist (ühe kujutise kohta skanneeriti keskmiselt 12 tasapinda sammu suurusega 1,2  $\mu\text{m}$ ). Analüüsiti Cy5 ( $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 666 \text{ nm}$ ), DAPI ( $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$ ), EGFP ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 507 \text{ nm}$ ) ja Draq5 ( $\lambda_{\text{ex}} = 647 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 681 \text{ nm}$ ) signaali. Elusrakkude mikroskopeerimiseks külvati rakud kambritesse (8 kambriga Lan-Tek Chambered #1.0 Borosilicate Coverglass System; Thermo Fisher

Scientific, USA) tihedusega 15 000 rakku/auk (24 t ajapunkti jaoks) või 25 000 rakku/auk (1 või 4 t ajapunkti jaoks), inkubeeriti vajaliku aja jooksul 37 °C juures, pesti 2 korda PBS-iga, ning mikroskopeeriti konfokaalmikroskoobi abil PBS-is. Fikseeritud rakkude analüüsiks kasutati õli-immersioon objektiiviga suurendusega 100x (NA=1,45) ja elusrakke mikroskopeeriti vesi-immersioon objektiiviga suurendusega 60x (NA=1,35). Andmeanalüüsiks kasutati Olympus FV1000 tarkvara ja piltide tegemiseks FV10-ASW 4.2 Viewer. Cy5 ja EGFP signaali tugevust ja jaotust rakkude sees hinnati visuaalselt ja kvantitatiivselt, kasutades programme AutoQuant X3 (Media Cybernetics, USA) ja Imaris x64 7.6.5 (Oxford Instruments, UK).

#### **2.3.4 FACS analüüs SCO transfektsiooni efektiivsuse või bioloogilise efekti määramiseks**

HeLa pLuc705 rakud külvati 12 auguga koekultuuri plaadile u 24 t enne transfektsiooni. Järgmisel päeval vahetati rakkude peal olev täissööde NP sisaldava täissöötme vastu. NP-d valmistati samamoodi nagu eelpool on kirjeldatud, kasutades fluorestsents-märgistatud SCO-d (SCO-Cy5) ja PF14 (MR5).

Rakke inkubeeriti NP-dega 1, 4 või 24 t 37 °C juures. Seejärel rakud pesti PBS-iga ning töödeldi trüpsiiniga (Corning, USA) 3-5 min ning suspendeeriti täissöötmes. Rakud sadestati tsentrifuugides 250 rcf'i (200 g) juures 5 min temperatuuril 20 °C, pesti, suspendeeriti 100 µl PBS-is ning lisati 400 µl fiksaatorisse (4% PFA PBS-is) 30 minutiks toatemperatuuril. Seejärel rakud koguti, pesti ning suspendeeriti 0,5 µg/ml DAPI lahuses PBS-is ja jäeti toatemperatuurile 5 minutiks. FACS (fluorestsents-aktiveeritud rakkude sortimine) analüüs teostati võimalusel koheselt või säilitati rakususpensioone 4 °C juures kuni mõõtmise hetkeni. Analüüsiks kasutati BD FACSAria Cell Sorter (BD Biosciences, USA) ja programmi FACSDiva (BD Biosciences, Saksamaa), tingimustel: Cy5 ( $\lambda_{ex} = 633$  nm and  $\lambda_{em} = 666$  nm), DAPI ( $\lambda_{ex} = 405$  nm and  $\lambda_{em} = 470$  nm) ja EGFP ( $\lambda_{ex} = 488$  nm and  $\lambda_{em} = 507$  nm). Analüüsiti 30 000 sündmust (rakku) ühe proovi kohta.

#### **2.3.5 SCO-ga indutseeritud splaissingu analüüs luminesentsi mõõtmise alusel HeLa pLuc705 rakkudes**

HeLa pLuc705 rakud külvati 96 auguga plaadile umbes 24 t enne transfektsiooni. Järgmisel päeval vahetati sööde PF14-SCO (MR5) NP sisaldava söötme vastu. NP-d valmistati samamoodi nagu on eelpool kirjeldatud. Rakke inkubeeriti NP-dega 24 t (osades katsetes ka 1, 4 ja 48 t) 37 °C juures. Seejärel pesti rakud 2 korda PBS-iga ja lüüsi, lisades 20 µl lüüsilahust (MQ vees lahjendatud 5x Cell Culture Lysis Reagent, mis sisaldab 125 mM Tris (pH 7.8

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-ga), 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 50% glütserooli ja 5% Triton X-100 (Promega, USA)) ning inkubeerides 20 min 4 °C juures ja seejärel -20 °C juures kuni lahuste külmumiseni.

Lüsaadid sulatati toatemperatuuril, lisati igasse auku 100 µl lutsiferaasi substraadi lahust (vt Lisa 1), suspendeeriti, kanti lahused valgele läbipaistmatule 96 auguga plaadile (Greiner Bio-One, Saksamaa) ning mõõdeti lutsiferaasi signaali tugevus Infinite M200 PRO mikroplaadi lugeja abil (Tecan, Šveits), kasutades tarkvara Magellan 7.

### **2.3.5.1 Kahevalentsete metalliioonide ja erinevate peptiidide mõju uurimine splaissingu ümberlülitamisele**

Et uurida PF14-SCO NP-de bioloogilise aktiivsuse sõltuvust kahevalentsete metalliioonide kontsentratsioonist, lisati PF14-SCO NP-dele CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> ja ZnSO<sub>4</sub> vesilahuseid, varieerides vastavate ionide kontsentratsioone vahemikus 10 µM kuni 10 mM.

PF14-vahendatud SCO transfektsiooni efektiivsust võrreldi teiste NA transpordiks disainitud RPP-dega, milleks olid PF6, C22-14, NF55, NF70 (H52), NF71 (H31), NF72 (H82), WRAP1 ja WRAP5. NP-d valmistati samamoodi nagu eelpool on kirjeldatud. Samuti katsetati erinevaid MR-e põhiliselt PF14-SCO NP-de näitel. Lisaks sellele teostati rida katseid pGL3 plasmiidiga (millelt stabiilselt ekspresseeritakse jaanimardika lutsiferaasi), valmistades selleks PF14-pGL3 NP-d (laengusuhe 2 ehk CR2, pGL3 lõpp-kontsentratsioon 0,1 kuni 1 µg/ml). Positiivseks kontrolliks kasutati transfektsiooni LF2000 abil, mis viidi läbi tootja protokoll järgi. Selleks et uurida, kas NP-de valmistamisel kasutatavate komponentide (SCO, PF14 ja CaCl<sub>2</sub>) kokkusegamise järjekord mõjutab oluliselt NP-de omadusi, s.t. splaissingu parandamise efektiivsust, rakendati järgmiseid skeeme:

- A. Standardne skeem: PF14 + SCO segamine MQ vees, inkubeerimine 15 min, CaCl<sub>2</sub> lisamine, inkubeerimine 15 min.
- B. PF14 + SCO segamine MQ vees, kohene CaCl<sub>2</sub> lisamine, inkubeerimine 30 min.
- C. PF14 + CaCl<sub>2</sub> segamine MQ vees, inkubeerimine 15 min, SCO lisamine, inkubeerimine 15 min.
- D. SCO + CaCl<sub>2</sub> segamine, inkubeerimine 15 min, PF14 lisamine, inkubeerimine 15 min.

Selleks et uurida, kas Ca<sup>2+</sup> ja Mg<sup>2+</sup> on NP-de integraalne osa või efekti saavutamiseks piisab nende olemasolust lõpplahuses, teostati katse, kus lisati ioone kas standardse skeemi järgi või söötmesse (s.t peale NP-de töölahuse lahjendamist DMEM söötmega). Rakke inkubeeriti NP lahustega 24 t ning mõõdeti luminesentssignaali meie poolt valmistatud lutsiferaasi substraadi lahuse abil (vt Lisa 1), nagu on kirjeldatud punktis 2.3.5.

### 2.3.5.2 Klorokviini ja SR-A inhibiitorite mõju PF14-SCO NP-de efektile

Hindamaks NP endosoomidest vabanemise efektiivsust, analüüsiti endosoomide destabiliseeriva aine klorokviini mõju PF14-SCO NP-de bioloogilisele aktiivsusele  $\text{Ca}^{2+}$  ionide juuresolekul. Rakud külvati 96 auguga plaadile ja kasvatati üleöö 37 °C juures. Järgmisel päeval asendati sööde PF14-SCO NP ja 100 µM klorokviini sisaldava täissöötmega ja inkubeeriti 4 t 37 °C juures. Et vältida klorokviini toksilist mõju rakkudele, asendati 4 t järel lahused värske söötmega ning mõõdeti lutsiferaasi aktiivsust 14-20 t möödudes.

Et uurida PF14-SCO NP-de rakkudesse sisenemise mehhanismi võimalikku muutust  $\text{Ca}^{2+}$  ionide toimel, kasutati SR-A inhibiitoreid: Poly I-d ja fukoidaani. Negatiivseks kontrolliks kasutati keemiliselt analoogseid aineid, mis SR-A-sid ei inhibeerid: nendeks olid vastavalt Poly C ja galaktoos. Rakke külvati 96 auguga plaadile u 1 öp enne transfektsiooni ja kasvatati üleöö 37 °C juures. Järgmisel päeval asendati rakkudel olev sööde Poly I või Poly C (kontsentratsioonidel 5, 10 ja 25 µg/ml) ja fukoidaani või galaktoosi (2,5 ja 5 µg/ml) sisaldava DMEM söötmega (90% lõpp-ruumalast). Rakke inkubeeriti SR-A inhibiitoreid või nende analooge sisaldavate lahustega 1 t 37 °C juures. Seejärel lisati rakkudele PF14-SCO NP sisaldavaid lahuseid täissöötmes (1/10 lõpp-ruumalast), inkubeeriti 37 °C juures ja mõõdeti lutsiferaasi aktiivsust 18-24 t möödudes.

### 2.3.6 RPP-SCO-Me<sup>2+</sup> NP-de toksilisuse hindamine

Uuritavate NP-de toksilisuse hindamiseks mõõdeti rakkude elulemust spektrofotomeetriliselt, kasutades MTT (3-(4,5-dimetüül-tiasol-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiidi) põhise analüüsi.

Rakud külvati 96 auguga plaadile u 1 öp enne transfektsiooni. Järgmisel päeval asendati sööde PF14-SCO NP sisaldava söötmega. Rakke inkubeeriti uuritavate lahustega 24 t 37 °C juures. Järgmisel päeval lisati igasse auku 10 µl MTT lahust (lõpp-kontsentratsiooniga 0,45 mg/ml) ja inkubeeriti rakke 2-4 t 37 °C juures kuni formasaani kristallide moodustumiseni, mida hinnati valgusmikroskoobis. Seejärel lisati igasse auku 100 µl eelnevalt soojendatud (umbes 30 °C-ni) solubiliseerimise lahust (16% SDS, 40% DMF, 2% jää-äädikhape), segati 1 t loksutil 37 °C juures kuni kristallide täieliku lahustumiseni ning mõõdeti lahuste neelduvus 570 nm juures, kasutades selleks mikroplaadi lugejat Infinite M200 PRO (Tecan) ja programmi i-control 1.7. "Palja" SCO-ga inkubeeritud rakkude neelduvus loeti 100%-ks elulemuseks ja selle alusel arvutati PF14-SCO NP-de toime rakkude elulemusele.

### 2.3.7 PF14-SCO NP-de suuruse ja zeta-potentsiaali mõõtmine

PF14-SCO NP-d formeeriti nii nagu eelnevalt on kirjeldatud. NP-de hüdrodünaamilist diameetrit, mida kajastab nende dünaamiline valguse hajuvus (DLS, *dynamic light scattering*), ja zeta-potentsiaali mõõdeti kahel erineval seadmel: ZetaView seadmel (Particle Metrix, Saksamaa) kasutades ZetaView tarkvara, ning ZetasizerNano seadmel (Malvern Instruments, Suurbritannia), kasutades ZetaSizer tarkvara. Iga mõõtmise jaoks valmistati NP-de töölahustest lahjendusi (100-200x PF14-SCO NP-de korral ja 30-50x SCO-RPP + Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> korral), lisades nendele MQ vett või MES puhvrit kuni lõpp-ruumalani (1 mL). ZetaView korral oli lahustiks 0,8 mM MES puhver (pH=7,0) ja ZetaSizer-i korral MQ vesi. ZetaView abil saadud tulemuste visualiseerimiseks kasutati programmi zvgraphs (zvgraphs.ut.ee).

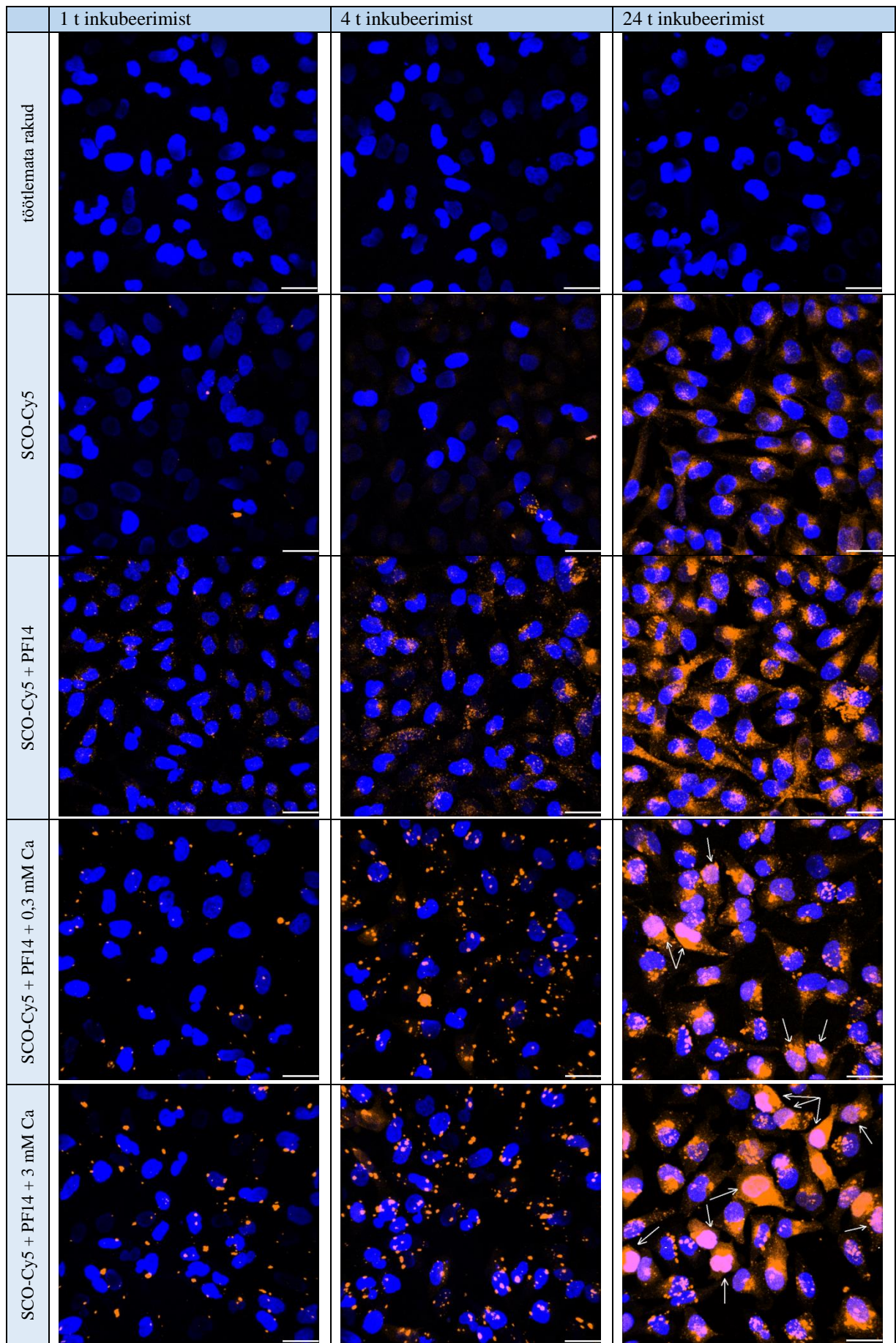
### 3. Tulemused ja arutelu

#### 3.1 PF14-ga HeLa rakkudesse transporditud SCO hulga, paiknemise ja bioloogilise efekti mikroskoopiline analüüs

Eelnevalt on näidatud, et  $\text{Ca}^{2+}$  ioonide eemaldamine rakuvälisest keskkonnast ja rakkudest vähendab PF14-SCO nanopartiklite (NP) internaliseerimist ja bioloogilist toimet (Juks jt 2017; Melikov jt 2015), mille põhjal me oletasime, et  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsiooni tõstmine võib tõhustada NP-de toimet. Lisaks kaltsiumile otsustasime testida ka teisi sarnaseid kahevalentseid metalliioone, eelkõige magneesiumit.

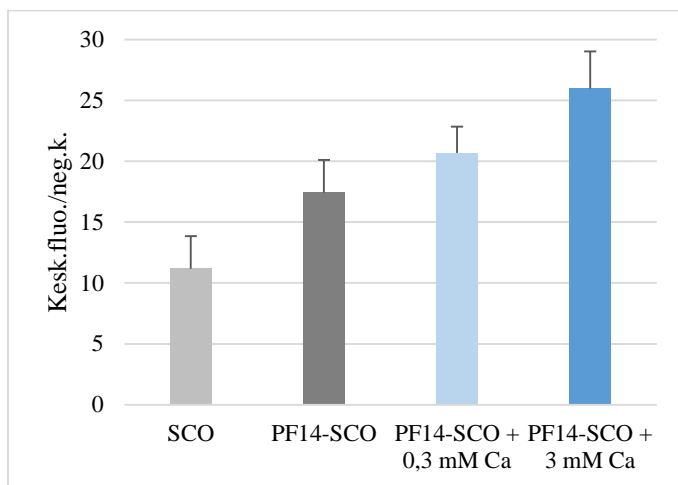
Et kontrollida püstitatud hüpoteesi, inkubeeriti HeLa pLuc705 rakke “palja” 100 nM SCO-Cy5 või PF14-SCO-Cy5 NP-dega (molaarne suhe 5 ehk MR5, 100 nM SCO). NP-sid valmistati kahel erineval viisil: kasutades ainult SCO-d ja PF14 või lisades nendele kaltsiumi või magneesiumi ioone (siin ja edaspidi KMI) nagu punktis 2.3.2 on kirjeldatud. Et uurida transfektsiooni dünaamikat ajas, inkubeeriti rakke uuritavate lahustega 1, 4 või 24 t (vt joonis 14 ja Lisa 2). “Paljas” SCO-Cy5 andis fluorestsentsmikroskoobis hajusa signaali, mis oli suhteliselt ühtlaselt jaotunud rakkude tsütoplasmas. Signaali olemasolu rakkudes oli eristatav alles 4, aga mitte 1 t pärast ning 24 tunni möödudes oli signaal tuvastamiseks juba piisavalt tugev. PF14 lisamisel muutus SCO-Cy5 paiknemine märgatavalt: rakkude pinnal ja tsütoplasmas ilmestusid granulaarsed struktuurid, tõenäoliselt invaginatsioonid ja endosoomid. PF14-SCO-Cy5 NP-d olid rakkudes tuvastatavad juba 1 t pärast töötlemise algust ning aja jooksul signaal järjest tugevnes, olles märgatavalt intensiivsem “palja” SCO-Cy5 omast. KMI lisamisel 0,3 ja 3 mM kontsentratsioonidel muutusid NP-d suuremaks võrreldes ilma KMI lisandita NP-dega ning nende suurus ja kuju varieerusid oluliselt rohkem.  $\text{Ca}^{2+}$  ja  $\text{Mg}^{2+}$  toimed olid fluorestsentssignaali tugevuse ja jaotuse järgi otsustades analoogsed. KMI mõlema kontsentratsiooni puhul olid NP-d rakkudes nähtavad juba 1 t pärast töötluse algust ning aja jooksul muutus signaal intensiivsemaks ja hajusamaks. Tähelepanuväärselt jõudis SCO-Cy5 24 tunniga KMI juuresolekul kõrgel kontsentratsioonil ka rakutuumadesse, kusjuures Cy5-positiivsete tuumade osakaal sõltus KMI kontsentratsioonist.

Konfokaalmikroskoopia pilte analüüsiti ka kvantitatiivselt: selleks kvantifitseeriti Cy5 signaal 24 t kestnud inkubatsiooniga rakkudes, arvutades signaali tugevuse ühe raku kohta programmis AutoQuant X3 (joonis 15; vt Lisa 6). Lisaks konfokaalmikroskoopia teostati uurimisrühma teiste liikmete poolt KMI juuresolekul formeeritud NP-de TEM (transmissioon elektronmikroskoopia) analüüs (vt Lisa 7, joonis 35).



**Joonis 14.** SCO-Cy5 paiknemine HeLa pLuc705 rakkudes. Rakke inkubeeriti SCO-Cy5, PF14 ja  $\text{Ca}^{2+}$  ioone sisaldavate NP-dega 1, 4 või 24 t, fikseeriti ning analüüsiti Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Jaapan)

konfokaalmikroskoobiga. NP-d on detekteeritavad Cy5 (oranž) ning rakutuomad DAPI (sinine) fluorestsentsignaali järgi. Kõik skanneeritud tasapinnad on kokku liidetud. Nooled osutavad Cy5-positiivsetele tuumadele. Esitatud on ühe representatiivse katse tulemused, katset korrati 3x. Mõõtjoon 30 µm, obj. 100x.

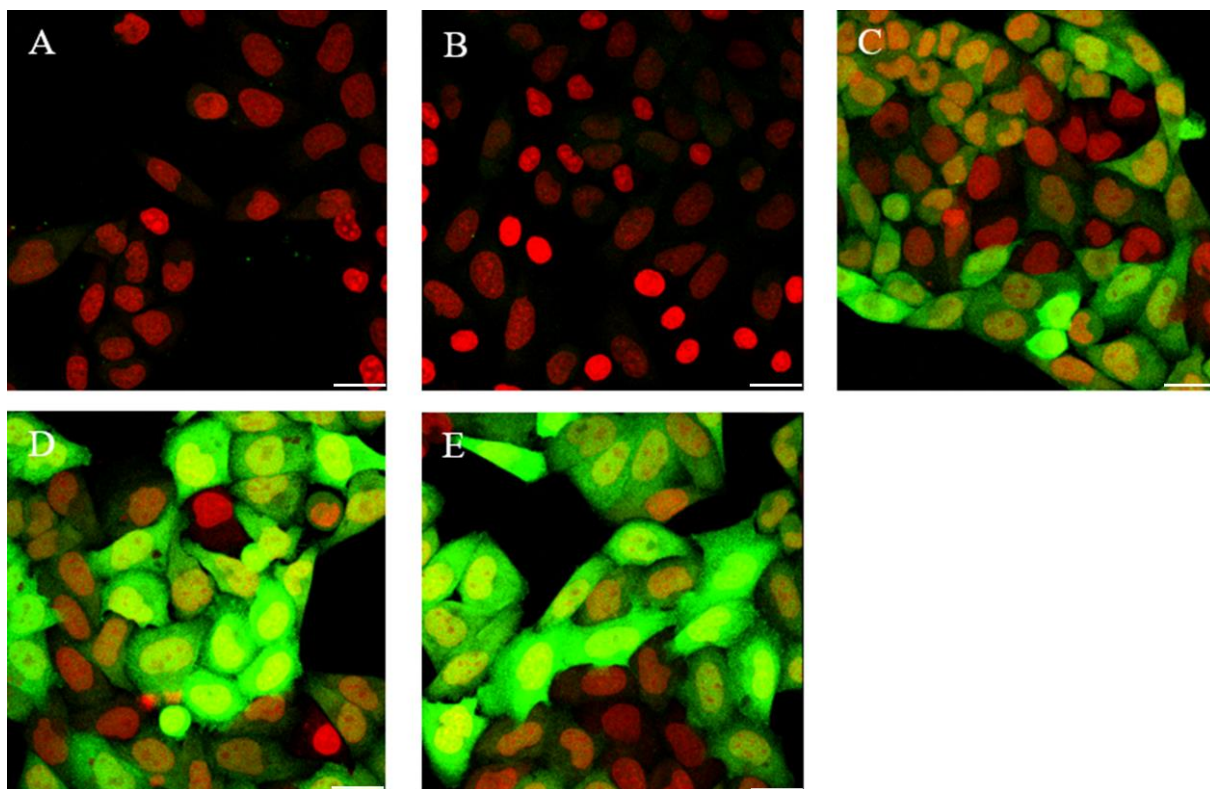


**Joonis 15. SCO-Cy5 signaali kvantifitseerimine rakkudes konfokaalmikroskoopia pildidel.** HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti uuritavate lahustega 24 t, fikseeritud rakke pildistati konfokaalmikroskoopi Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Jaapan) kasutades ning signaal kvantifitseeriti vähemalt sajas raku proovi kohta. Kasutati AutoQuant X3 tarkvara ning arvutati keskmine signaali tugevus raku kohta.

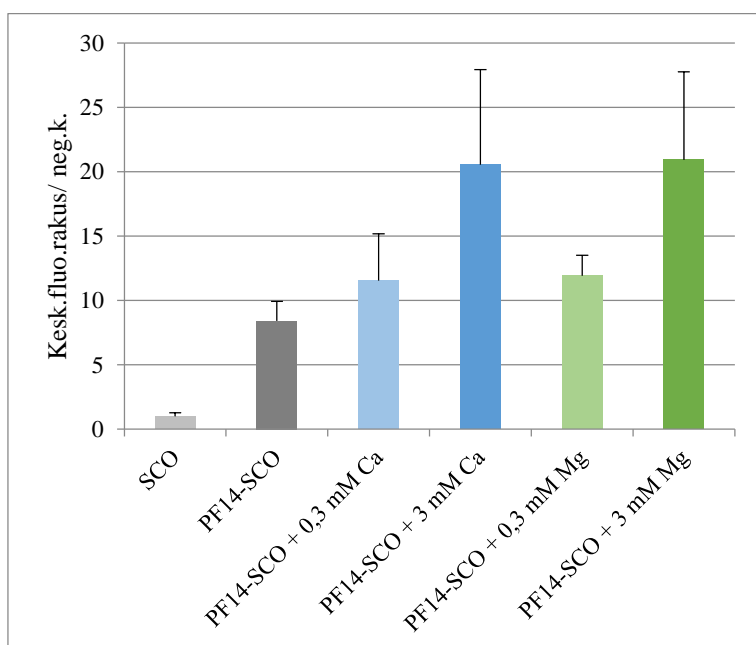
Nende tulemuste põhjal saab järeldada, et KMI juuresolekul tekitatud NP-d tungivad edukamalt rakkudesse ja seda eriti pikemaajalise (24 t) inkubeerimise puhul. Siiski, lühiajalise (1 või 4 t) inkubeerimise puhul võib ilma lisaioonideta valmistatud NP-de signaal olla tugevam. Selline erinevus võib tuleneda NP-de omaduste muutumisest nt nende suurenemisest KMI lisamisel, mistõttu NP-d kasutavad rakkudesse sisenemiseks aeglasemalt toimivaid mehhanisme (nt retseptorite transport plasmamembraanile või erineva endotsütoosiraja kasutamine).

Sarnase ülesehitusega katse viidi läbi ka HeLa EGFP 654 rakkudes, et analüüsida rakkudesse sisestatud SCO funktsionaalsust splaiissingu muutmisel. Selleks transfekteeriti reporterrakke “palja” SCO-654 või PF14-SCO-654 NP-dega ja analüüsiti KMI mõju EGFP ekspressioonile, mida võimaldab splaiissingu parandamine SCO-654 poolt (joonis 16). Selles katses mikroskopeeriti elusaid rakke, vältimaks EGFP signaali võimalikku kustutamist fiksaatori poolt. KMI lisamine suurendas oluliselt PF14-SCO NP-de bioloogilist toimet, tõenäoliselt tõstes nii rakkude transfektsiooni kui SCO rakutuuma jõudmise efektiivsust, lubades eeldada, et KMI mõju NP-de funktsionaalsusele oli sarnane mõlemas uuritud rakuliinis.

Konfokaalmikroskoopia pilte analüüsiti ka kvantitatiivselt, arvutades EGFP signaali tugevuse ühe raku kohta programmi AutoQuant X3 abil (joonis 17; vt Lisa 6).



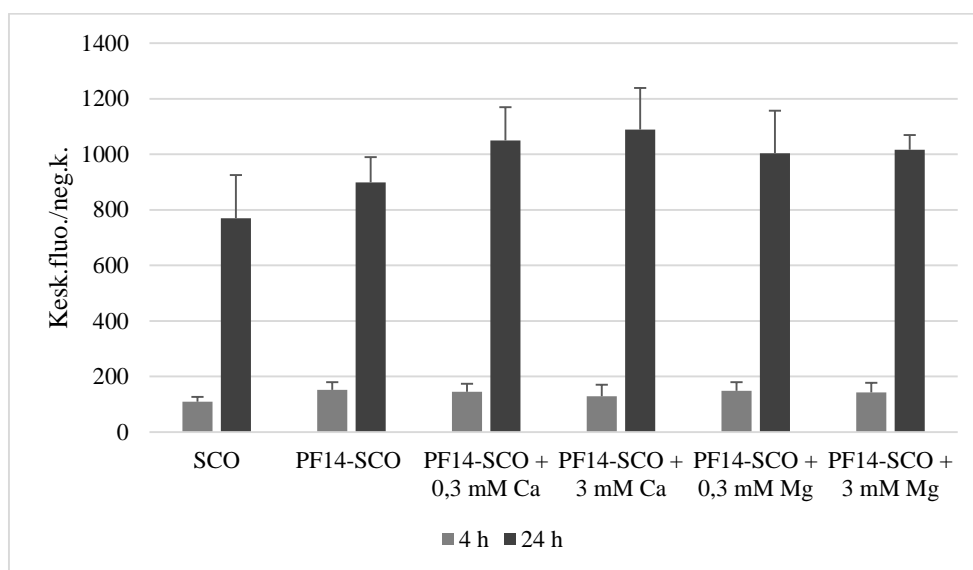
**Joonis 16. EGFP ekspressiooni muutus HeLa EGFP 654 rakkudes SCO toimeel.** Rakke inkubeeriti SCO-654, PF14 ja KMI sisaldavate NP-dega 24 t ning analüüsiti EGFP (roheline) ja DraQ5 (punane) fluorestsentssignaali Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Jaapan) konfokaalmikroskoobiga. Esitatud on kõikide tasapindade koondsignaal. A, töötlemata rakud; B, SCO-654; C, PF14-SCO-654; D, PF14-SCO-654 + 3 mM Ca<sup>2+</sup>; E, PF14-SCO-654 + 3 mM Mg<sup>2+</sup>. Esitatud on ühe representatiivse katse tulemused, katset korrati 3x. Mõõtjoon 30 µm, obj. 60x.



**Joonis 17. Konfokaalmikroskoopia pildidel kvantifitseeritud EGFP signaali tugevus rakkudes.** HeLa EGFP 654 rakke inkubeeriti uuritavate lahustega splaissingu indutseerimiseks 24 t, rakud pildistati, kasutades konfokaalmikroskoopi Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Jaapan). Signaal kvantifitseeriti vähemalt sajas rakus proovi kohta, kasutades AutoQuant X3 tarkvara, ning arvutati keskmine EGFP signaali tugevus raku kohta. Kasutati SCO-654.

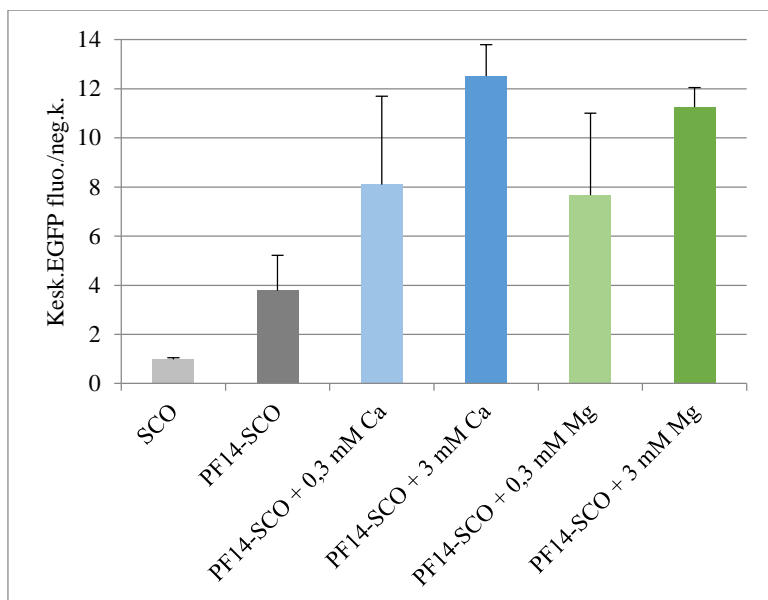
### 3.2 PF14-vahendatud SCO transfektsiooni efektiivsuse ja bioloogilise toime tugevuse määramine FACS analüüsi abil

Uuritavate NP-de transfektsiooni efektiivsuse kvantitatiivseks määramiseks inkubeeriti HeLa pLuc705 rakke PF14-SCO-Cy5 (KMI lisandiga või ilma) NP-dega 4 ja 24 t ning hinnati Cy5-positiivsete rakkude arvu ja fluorestsentsi intensiivsust läbivoolu tsütomeetris (joonis 18). Nagu ka mikroskoopia puhul, kasvas signaal kõikide töötluste korral ajas, olles tugevam 24 t järel. 4 t inkubatsiooni järel andis kõige tugevama signaali PF14-SCO-Cy5 NP-dega töötlemine ning KMI lisandiga NP-de korral oli signaali intensiivsus mõnevõrra madalam, olles ikkagi suurem kui “palja” SCO-Cy5-ga töödeldud rakkudel. 24 t inkubeerimisel oli tulemus oluliselt teistsugune: PF14-SCO-Cy5 NP-dega transfekteeritud rakkudes oli signaal samuti tugevam võrreldes “palja” SCO-Cy5-ga transfekteeritud rakkudega, aga KMI lisand tõstis märgatavalt NP signaali tugevust rakkudes. Antud tulemus on kooskõlas mikroskoopilises analüüsis täheldatuga: mõlemad analüüsid näitasid, et ilma KMI-ta valmistatud PF14-SCO NP-d sisenesid HeLa pLuc705 rakkudesse mõnevõrra efektiivsemalt lühiajalise (4 t) inkubeerimise korral, kuid KMI lisamine NP-dele andis eelise pikemaajalisel (24 t) töötlemisel.



**Joonis 18. SCO transfektsiooni efektiivsuse FACS analüüs HeLa pLuc705 rakkudes.** Rakke inkubeeriti Cy5 märgisega SCO või seda sisaldavate NP-dega 4 ja 24 t, fikseeriti ning mõõdeti Cy5 fluorestsentssignaali tugevust BD FACSria Cell Sorter (BD Biosciences, USA) abil, detekteerides 30 000 rakku ühe proovi kohta. Esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N=4.

Analoogne katse viidi läbi HeLa EGFP 654 rakkudega, transfekteerides neid vastavalt SCO-654 või PF14-SCO-654 NP-dega ja vaadates KMI mõju EGFP ekspressioonile (joonis 19). Nendes rakkudes tugevdas samuti KMI lisamine signaali, s.t mõju oli analoogne HeLa pLuc705 rakkudes märgatud toimega.



**Joonis 19. SCO-654 bioloogilise toime tugevus FACS analüüs HeLa EGFP 654 rakkudes.** Rakke inkubeeriti SCO-654 või seda sisaldavate NP-dega 24 t ning mõõdeti EGFP fluorestsentssignaali tugevust BD FACSria Cell Sorter (BD Biosciences, USA) abil, detekteerides 30 000 rakku ühe proovi kohta. Esitatud on ühe representatiivse katse tulemused, katset korrati 3x.

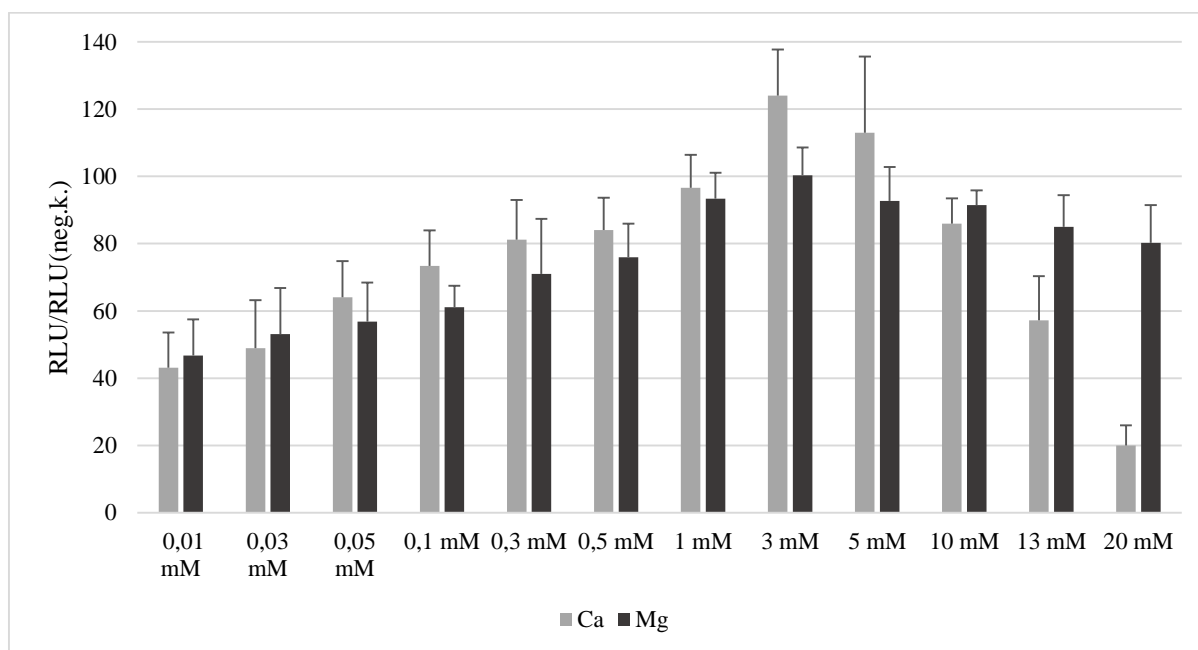
Mikroskoopilises ja FACS analüüsis andis  $\text{Ca}^{2+}$  ja  $\text{Mg}^{2+}$  ionide lisamine NP-dele sarnase tulemuse, kusjuures  $\text{Ca}^{2+}$  oli enamasti mõnevõrra efektiivsem, tagades nii SCO-Cy5 efektiivsemat transfektsiooni HeLa pLuc705 rakkudesse (joonis 18), kui ka kõrgema EGFP ekspressiooni HeLa EGFP 654 rakkudes (joonised 17 ja 19). See asjaolu võib olla seotud kaltsiumi ionide funktsioonide rohkusega rakus (vt lõik 1.4.3), mistõttu  $\text{Ca}^{2+}$  efekt võib olla vahendatud suurema hulga protsesside käivitamise/tõhustamisega, kui magneesiumi oma (nt tsütoskeleti ümberpaigutamine, endotsütoosiradade käivitamine jm).

### 3.3 Luminestsentsi intensiivsuse mõõtmine SCO splaissingut korrigeeriva aktiivsuse määramiseks

Järgnevalt uuriti erinevate tegurite mõju HeLa pLuc705 reporter-rakuliinis toimuvale lutsiferaasi ekspressioonile, mida võimaldab splaissingu korrigeerimine SCO-705 poolt ning mille numbriliseks väljundiks on luminestsentsi tugevus rakulüsaadis. Uuritavateks teguriteks olid erinevate RPP-de ja KMI lisamine NP-dele, söötme koostise muutmine, endosoomide destabiliseerimine, rakupinna retseptorite blokeerimine jms.

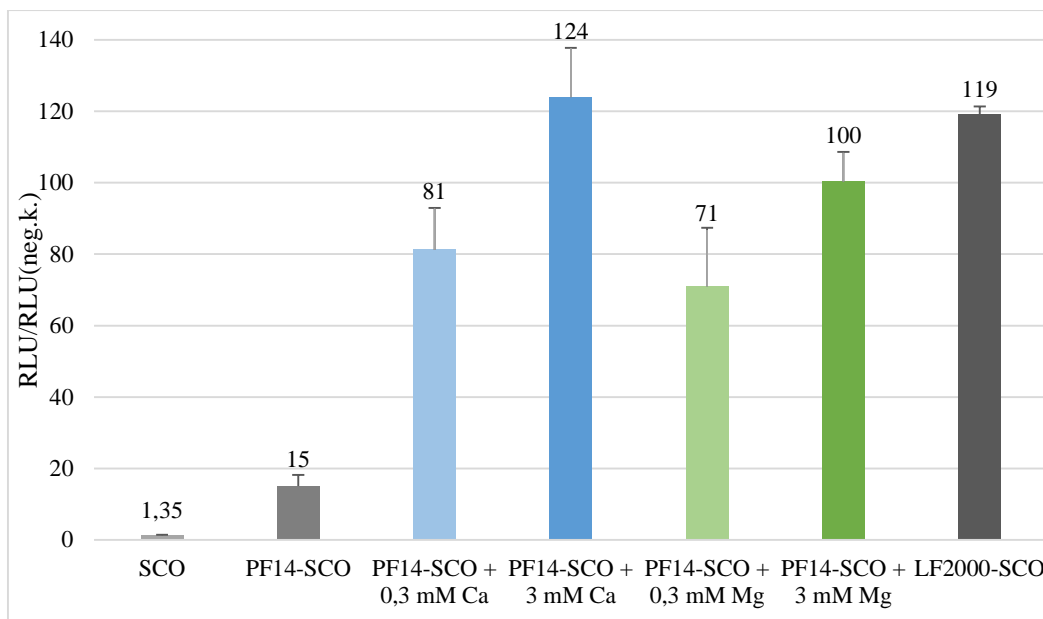
### 3.3.1 Kahevalentsete metalliioonide mõju splaiissingu korrigeerimise efektiivsusele SCO poolt erineva koostisega NP-de korral

Lisades PF14-SCO NP-dele kahevalentseid metalliioone, avastati, et NP-de bioloogiline toime oli tugevam KMI juuresolekul, kusjuures  $\text{Ca}^{2+}$  oli keskmiselt mõnevõrra efektiivsem kui  $\text{Mg}^{2+}$ . Kui KMI lisamine ei vähendanud nähtavalt rakkude elulemust, siis  $\text{Zn}^{2+}$  ja  $\text{Mn}^{2+}$  juuresolekul formeeritud NP-d olid rakkude jaoks toksilised kontsentratsioonil üle 0,3 mM, nii et kahe viimaseiooni kasutamisest loobuti.  $\text{Ca}^{2+}$  ja  $\text{Mg}^{2+}$  ionide erinevate kontsentratsioonide mõju testiti, inkubeerides rakke uuritavate lahustega 24 t jooksul (joonis 20). “Palja” SCO efektiivsust KMI lisamine ei mõjutanud.



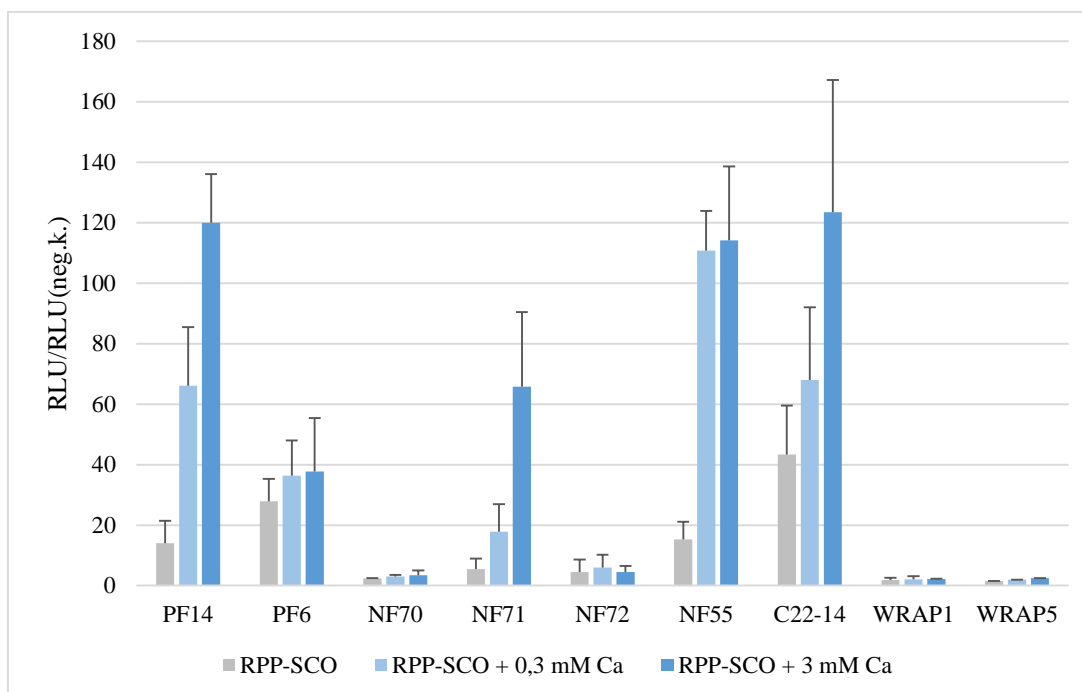
**Joonis 20.** KMI erinevate kontsentratsioonide mõju PF14-SCO NP-de bioloogilise toime efektiivsusele. HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti PF14-SCO-KMI NP-dega 24 t, lüüsi ning mõõdeti luminesentsi tugevus Infinite M200 PRO (Tecan, Šveits) mikroplaadi lugeja abil. Luminesentsi tugevus on väljendatud suhtena töötlemata rakkude luminesentsi intensiivsusega. Esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N>3.

PF14-SCO NP-d põhjustasid u 15-kordse SCO-vahendatud lutsiferaasi aktiivsuse tõusu võrreldes töötlemata rakkude luminesentsiga ning KMI lisamine suurendas NP-de efekti tugevust. KMI mõju splaiissingu korrigeerimise efektiivsusele oli selgelt märgatav alates u 10  $\mu\text{M}$ -st, olles maksimaalne 3-5 mM lisaioonide kontsentratsiooni juures. Täheledata, et 0,3 mM ja 3 mM KMI annavad representatiivse efekti, s.t sellised kontsentratsioonid iseloomustasid kõige paremini KMI toimet. Sellepärast kasutati edaspidistes katsetes neid kontsentratsioone (joonis 21). 0,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  juuresolekul suurenes luminesents u 80x ja 3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  juuresolekul u 125x võrreldes töötlemata rakkudega.  $\text{Mg}^{2+}$  lisandi puhul olid vastavad arvud mõnevõrra väiksemad: u 70x ja 100x. Seega, 0,3 ja 3 mM kontsentratsioonidel lisatud KMI suurendasid PF14-SCO NP-de efekti vastavalt 5,3x ja 8,3x ( $\text{Ca}^{2+}$  korral) ning 4,7x ja 6,7x ( $\text{Mg}^{2+}$  korral).



**Joonis 21. Splaissingu ümberlülitamine “palja” või NP-de koostises oleva SCO-ga HeLa pLuc705 rakkudes.** Rakke inkubeeriti SCO või SCO-d sisaldavate erinevate NP-dega 24 t, rakud lüüsi ning mõõdeti luminesentsi tugevus Infinite M200 PRO (Tecan, Šveits) mikroplaadi lugeja abil. Positiivse kontrollina kasutati katsetes Lipofektamiini (LF2000), mida ei ole järgnevatel joonistel näidatud. Luminesentsi tugevus on väljendatud suhtena töötlemata rakkude luminesentsi intensiivsusega. Esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N>3.

Lisaks PF14-le analüüsiti ka teiste NA transportivate peptiidide PF6, C22-14, NF55, NF70 (H52), NF71 (H31), NF72 (H82), WRAP1 ja WRAP5 toimet, leides et nii SCO transfektsiooni efektiivsus kui ka  $Ca^{2+}$  mõju varieerusid nende seas märgatavalt (joonis 22).



**Joonis 22. Splaissingu ümberlülitamise efektiivsus erinevate RPP-dega formeeritud NP-de koostises oleva SCO-ga HeLa pLuc705 rakkudes.** Rakke inkubeeriti SCO või SCO-d sisaldavate erinevate NP-dega 24 t, rakud lüüsi ning mõõdeti luminesentsi tugevus Infinite M200 PRO (Tecan, Šveits) mikroplaadi lugeja abil. Kõikide RPP-de puhul kasutati MR5. Luminesentsi tugevus on väljendatud suhtena töötlemata rakkude luminesentsi intensiivsusega. Esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N=3.

WRAP1 ja WRAP5 olid märgatavalt vähem efektiivsed kui teised uuritud transportpeptiidid. WRAP-SCO NP-dega töödeldud rakkude luminesentsi intensiivsus oli umbes samal tasemel mis “palja” SCO-ga ning  $\text{Ca}^{2+}$  lisamine seda ei mõjutanud. Samuti olid väheefektiivsed NF70 ja NF72 ning  $\text{Ca}^{2+}$  lisamise mõju nendele oli tühine või puudus ning neist kahest andis NF72 keskmiselt 1,7x tugevama efekti kui NF70, suurendades luminesentsi u 5x võrreldes töötlemata rakkudega. NF70 ja NF72 vähese efektiivsuse põhjuseks võib olla nende hüdrofoobsus, mistõttu tekivad SCO-ga liiga stabiilsed NP-d, millest SCO ei vabane rakus.

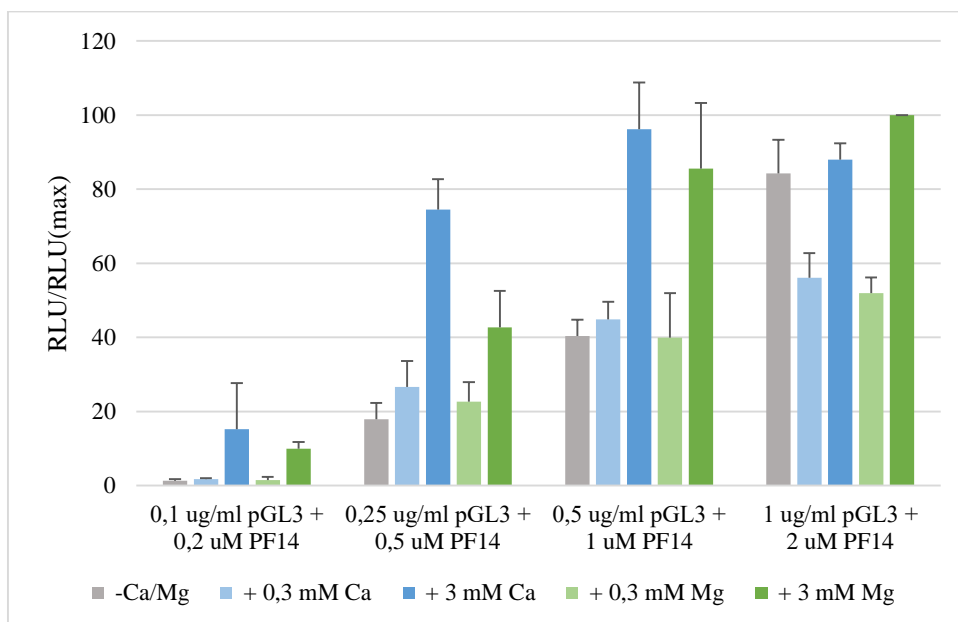
Keskmise efektiivsusega SCO transfektsioonis oli PF6, andes ilma kaltsiumita tugevama efekti kui PF14, kuid kuna PF6 oli vähem mõjutatud  $\text{Ca}^{2+}$  lisamise poolt, oli see keskmiselt 2x vähem efektiivsem kui PF14. NF71-SCO NP-d olid keskmiselt 2,6x vähem efektiivsed kui PF14-SCO NP-d ning  $\text{Ca}^{2+}$  lisamine mõjus nende aktiivsusele umbes sama tugevalt kui PF14-SCO NP-dele. NF55-vahendatud SCO transfektsiooni tõhusus oli võrreldav PF14 omaga ning ka  $\text{Ca}^{2+}$  efekt NF55-ga formeeritud NP-dele oli sama tugev kui PF14-SCO NP-dele, kusjuures 0,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  mõju oli tugevam NF55 korral. See võib olla tingitud NF55 vähem lineaarsest ruumilisest struktuurist, mis annab  $\text{Ca}^{2+}$  ionidele võimaluse efektiivselt integreeruda NF55-SCO NP-desse juba madalatel kontsentratsioonidel. C22-14-SCO NP-dele mõjus  $\text{Ca}^{2+}$  lisamine mõnevõrra nõrgemini, kui NF55, NF71 või PF14-ga formeeritud NP-dele, kuid see-eest osutus C22-14 väga efektiivseks ilma kaltsiumi lisamiseta transfektsioonil. Seega,  $\text{Ca}^{2+}$  ionide lisamine tugevdas enamuse uuritud peptiididega formeeritud NP-de bioloogilist toimet, kuigi mõnede peptiidide korral (WRAP1/5, NF70/72) oli mõju tühine, osadele (PF6, C22-14) tugevam ja mõnele (PF14, NF55, NF71) eriti märgatav (kuni 12x).

### 3.3.2 KMI mõju pDNA PF14-vahendatud transfektsiooni efektiivsusele

Kontrollimaks KMI efekti universaalsust, testiti ka nende mõju plasmidi transfektsioonile PF14 abil (joonis 23). Katsetes kasutati pGL3 plasmidi, millelt rakus ekspresseerub jaanimardika lutsiferaas, mille aktiivsust mõõdeti 24 t peale HeLa pLuc705 rakkude transfektsiooni.

“Palja” pGL3-ga transfekteeritud rakkude luminesents ei erinenud töötlemata rakkude luminesentsist, osutades asjaolule, et vaba plasmid, erinevalt ON-idest, ei pääse rakkudesse ega tuumadesse eelkõige pDNA molekuli suuruse tõttu. PF14-pGL3 NP-d formeeriti CR2 (PF14:pGL3) juures ning need põhjustasid võrreldes töötlemata rakkudega seda suuremat luminesentsi, mida kõrgem oli pGL3 kontsentratsioon. Luminesentsi intensiivsus tugevnes nii 0,3 kui ka 3 mM KMI lisamisel 0,1 ja 0,25  $\mu\text{g/ml}$  pGL3-ga NP-dele. 0,5  $\mu\text{g/ml}$  pGL3-ga NP-de puhul ei suurendanud 0,3 mM metalliioonid oluliselt luminesentsi intensiivsust,

seevastu 3 mM KMI lisamisel saavutati kuni 2,5x luminesstsentsi kasv. Plasmidi kontsentratsiooni edasisel tõstmisel 1 µg/ml-ni põhjustasid 0,3 mM KMI hoopis luminesstsentsi nõrgenemise ning 3 mM KMI suurendasid NP-de efekti vaid 5-20% võrra. Üldiselt oli Ca<sup>2+</sup> juuresolekul valmistatud pGL3-PF14 NP-de esilekutsutud luminesstsents tugevam kui Mg<sup>2+</sup> lisamisel, v.a 1 µg/ml pGL3-ga NP-d, kus 3 mM Mg<sup>2+</sup> põhjustas suurema luminesstsentsignaali tõusu kui 3 mM Ca<sup>2+</sup>.

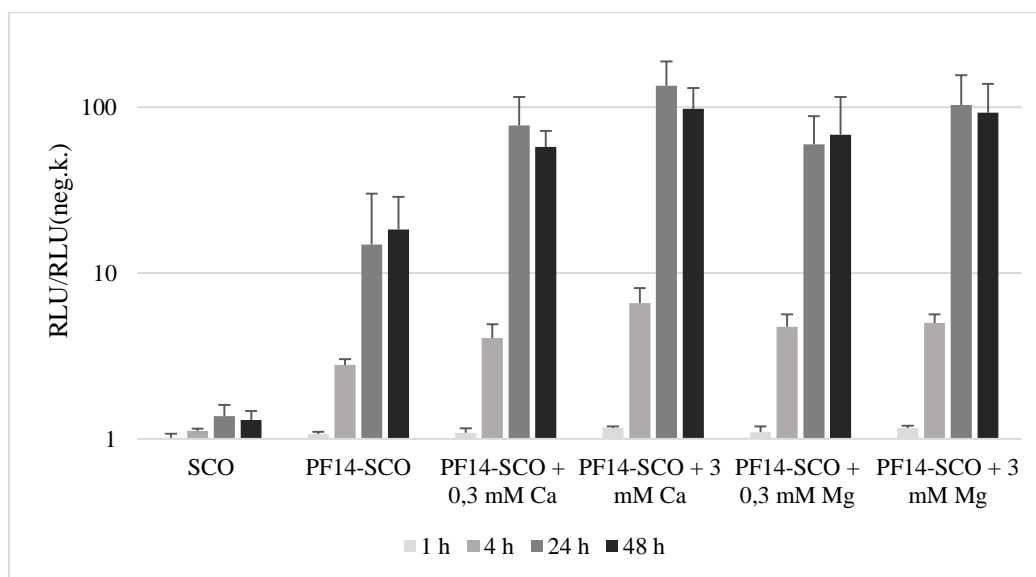


**Joonis 23. KMI mõju plasmidi (pGL3) transfektsioonile PF14 abil.** HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti uuritavate NP-dega 24 t, lüüsi ning mõõdeti luminesstsentsi tugevust Infinite M200 PRO (Tecan, Šveits) mikroplaadi lugeja abil. NP-de komponentide kontsentratsioonid varieeriti, säilitades laengute suhet 2 (PF14:pGL3) ning KMI lisati 0,3 ja 3 mM kontsentratsioonini. Luminesstsentsi intensiivsuse väärtused on esitatud osakaaluna tugevaima signaaliga proovist (milleks oli 1 µg/ml pGL3 + 2 µM PF14 + 3 mM Mg). Esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N=3.

Plasmidi transfekteerimise katsetest võib järeldada, et KMI muudavad efektiivsemaks ka pGL3-PF14 NP transfektsiooni. Samas sõltub nende efekt NP-de komponentide kontsentratsioonidest: pGL3 ja PF14 kontsentratsioonide kasvuga väheneb KMI mõju ning 2 µM PF14 (1 µg/ml pGL3) korral ei suurenda KMI lutsiferaasi ekspressiooni rakkudes. Antud efekt võib olla põhjustatud NP-de mõjust rakkude elulemusele, mis avaldub eelkõige kõrge PF14 summaarse kontsentratsiooni korral. Märgatavamaks muutub rakkude elulemuse langus KMI kontsentratsiooni suurenedes, s.t vaadeldav mõju hõlmab NP-de efektiivsust ja toksilisust, kusjuures madalamate kontsentratsioonide puhul prevaleerib efektiivsuse tõstmine ja kõrgemate kontsentratsioonide puhul prevaleerib toksilisuse kasv.

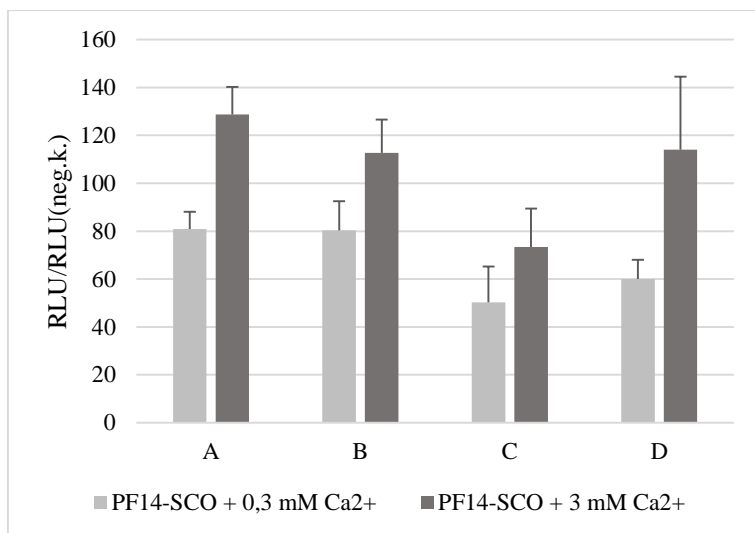
### 3.3.3 NP-de moodustamise ja rakkude töötlemise optimeerimine

Enamuse funktsionaalsete katsete puhul kasutati nn standardset inkubeerimisaega (24 t), mis oli valitud varem kirjanduses avaldatu alusel. Kontrollimaks, kas kasutatud inkubatsiooniaeg on optimaalne ning see kehtib ka KMI juuresolekul valmistatud NP-de puhul, võrreldi SCO bioloogilist mõju erinevatel ajapunktidel (joonis 24). Selleks inkubeeriti HeLa pLuc705 rakke uuritavate NP-de lahustega 1, 4, 24 ja 48 t jooksul. 1 t pärast ei erinenud luminesstsents olulisel määral töötlemata rakkude luminesstsentsist, samas 4 t pärast oli erinevus juba mitmekordne ning 24 t ja 48 t järel oli see kõige suurem, olles enamasti kõrgeim 24 t inkubeerimise puhul. Katseskeemi lihtsustamise ja rakkude külvamisel kasutatava konfluentsuse optimeerimise mõttes kasutati ka edaspidistes katsetes just 24 t kestvat inkubeerimist NP-de efektiivsuse hindamisel.



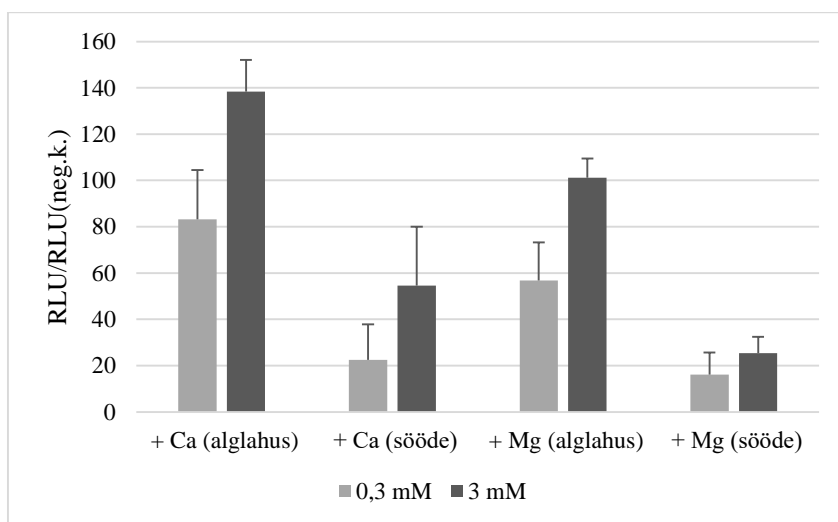
**Joonis 24. Inkubatsiooniaja mõju PF14-SCO-KMI NP-de bioloogilisele efektile.** HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti SCO, PF14 ja KMI sisaldavate NP-dega 1, 4, 24 ja 48 t, rakud lüüsi ning mõõdeti luminesstsentsi tugevus Infinite M200 PRO (Tecan, Šveits) abil. Luminesstsentsi tugevus on väljendatud võrrelduna töötlemata rakkude luminesstsentsi intensiivsusega ning väärtused on esitatud logaritmina. Esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N=3.

Järgmisena rakendati erinevaid NP komponentide kokkusegamise skeeme, katsetades punktis 2.3.5.1 kirjeldatud variante (joonis 25). Kuna alternatiivsed skeemid ei andnud oluliselt paremat tulemust võrreldes standardse skeemiga (skeem A), jätkati selle kasutamist.



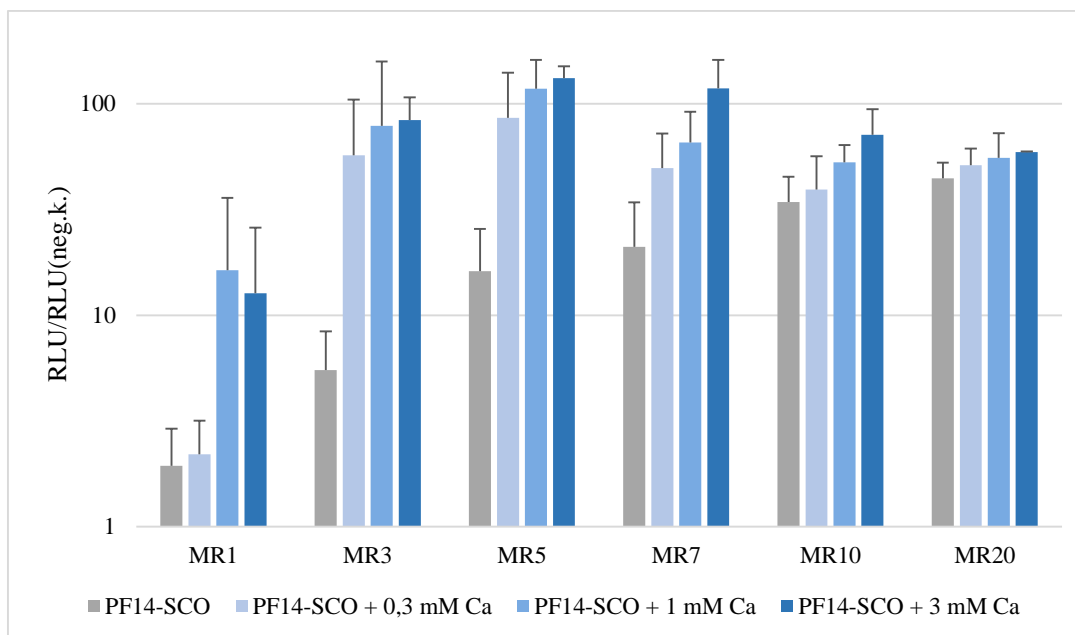
**Joonis 25. NP-de komponentide kokkusegamise järjekorra mõju PF14-SCO-Ca<sup>2+</sup> NP-de bioloogilisele efektile.** HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti 24 t neljal erineval viisil valmistatud NP-dega: A. Standardne skeem: SCO + PF14, 15 min järel + Ca<sup>2+</sup>. B. Kõik komponendid vahetult üksteise järel. C. PF14 + Ca<sup>2+</sup>, 15 min järel + SCO. D. SCO + Ca<sup>2+</sup>, 15 min järel + PF14. Luminestsentsi tugevust analüüsiti rakulüsaadis Infinite M200 PRO (Tecan, Šveits) abil. Luminestsentsi tugevus on väljendatud võrrelduna töötlemata rakkude luminestsentsiga. Esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N=3.

Et selgitada, kui võrd oluline on KMI inkorporeerimine NP-desse nende formeerumise etapis, teostati katse, kus lisati metalliioone kas NP-de töölahusesse või söötmega lahjendatud NP-de juurde, seejärel transfekteeeriti rakke ja mõõdeti lutsiferaasi aktiivsust 24 t inkubeerimise järel (joonis 26). KMI lisamine NP-de töölahusesse tõstis lutsiferaasi aktiivsust 2,9-3,8x rohkem, kui lisamine raku söötmesse, mille põhjal võib järeldada, et KMI on olulised NP-de integraalse osana.



**Joonis 26. PF14-SCO NP-de bioloogilise toime tugevuse sõltuvus KMI inkorporeerimisest.** KMI lisati kas NP-dele 15 min peale SCO ja PF14 komplekseerimist ("alglahus" joonisel) või täissöötmega lahjendatud NP-de lahustele ("sööde" joonisel). HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti uuritavate lahustega 24 t ning mõõdeti luminestsentsi tugevust rakulüsaadis Infinite M200 PRO (Tecan, Šveits) abil. Luminestsentsi tugevus on väljendatud võrrelduna töötlemata rakkude luminestsentsiga ja esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N=3.

Kuigi valdavalt kasutati PF14 ja SCO-d lõpp-kontsentratsioonidel vastavalt 500 nM ja 100 nM ehk molaarses suhtes 5:1 (MR 5), analüüsiti ka SCO toimet splaissingule teiste MR-ide korral (kasutades SCO-d alati 100 nM-na): MR1, MR3, MR7, MR10 ja MR20 (joonis 27).



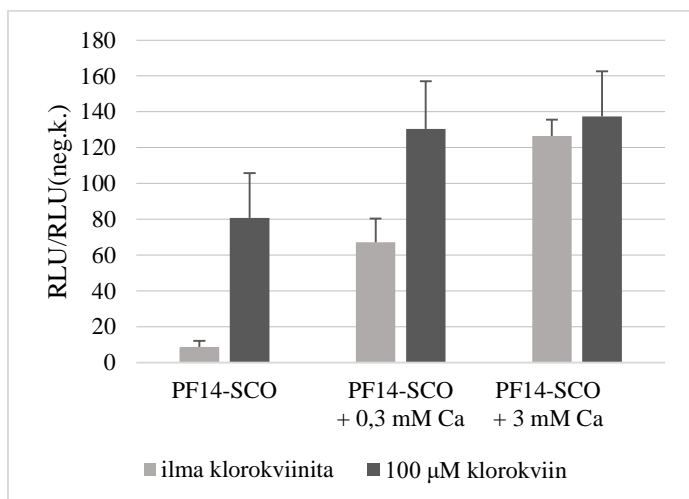
**Joonis 27. PF14-SCO NP-de ja  $Ca^{2+}$  mõju splaissingule sõltuvalt PF14:SCO molaarsest suhtest (MR).** HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti PF14-SCO või PF14-SCO-KMI NP-sid sisaldavate lahustega 24 t ning mõõdeti luminesentsi tugevus Infinite M200 PRO (Tecan, Šveits) abil. Luminesentsi tugevus on väljendatud võrrelduna töötlemata rakkude luminesentsiga. Väärtused on logaritmilised ja esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N=3.

Katsed kinnitasid, et varem kirjanduses avaldatud MR5 on optimaalne suhe ka meie katsesüsteemis. Madalamate MR-idega valmistatud PF14-SCO NP-d põhjustasid nõrgema luminesentsi ning ka  $Ca^{2+}$  ionide lisamisel saadud efekt oli proportsionaalselt madalam, võrreldes MR5-ga. Kõrgemate MR-idega NP-d indutseerisid sarnase või mõnevõrra tugevama luminesentsi, kui MR5 juures valmistatud NP-d, kuid  $Ca^{2+}$  mõju nendele oli nõrgem. Samasugust sõltuvust MR-ist täheldati ka NF55 puhul, aga erandlikult oli selle RPP korral optimaalseks suhteks MR10 (vt Lisa 3).

### 3.3.4 Endosoomide destabiliseerimise mõju PF14-SCO-KMI NP-de bioloogilisele efektile

Et selgitada, kas endosoomidesse lukustumine on oluliseks takistuseks ka KMI juuresolekul formeeritud NP-de toimele, lisati HeLa pLuc705 rakkudele lisaks NP-dele endosoomi destabiliseerivat ainet klorokviini. NP-sid ja klorokviini sisaldava täissöötmega inkubeeriti rakke 4 t, misjärel asendati sööde värske täissöötmega ja mõõdeti luminesentsi intensiivsus 20 t pärast. Vastavalt eeldatule leiti, et klorokviini lisamine parandab PF14-SCO NP-de bioloogilist aktiivsust (joonis 28). Ilma KMI lisandita valmistatud PF14-SCO NP-de

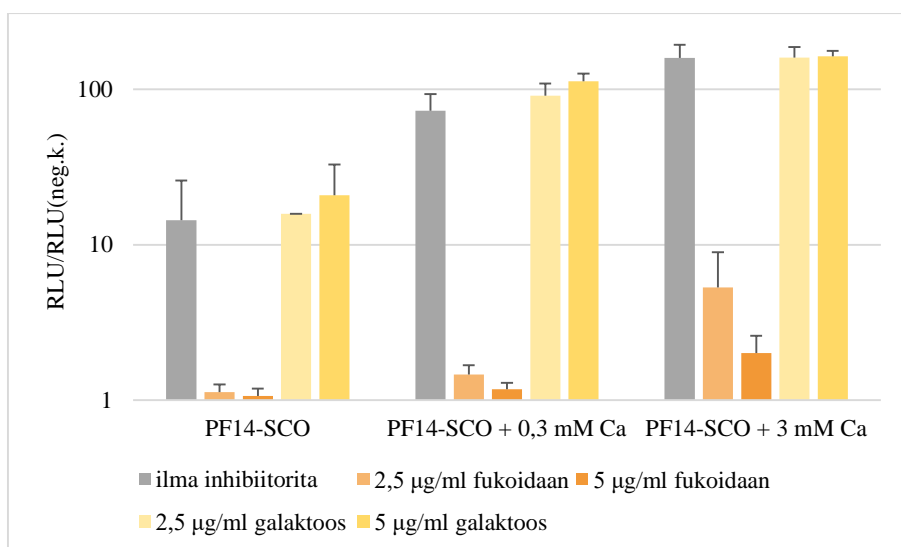
aktiivsusele avaldas klorokviini lisamine kõige tugevamat mõju (u 8x kõrgem luminesstents/splaiissingu korrigeerimine), 0,3 mM kaltsiumiga lahuste toimet tugevdas klorokviin vaid 94% võrra ja 3 mM kaltsiumiga NP-dele efekti suurendas see 8,6% võrra. Need tulemused annavad põhjust arvata, et KMI toime põhimehhanismiks võib olla just NP-de endosoomidest vabanemise soodustamine (s.t klorokviinile sarnane toime) ning see toime tugevneb KMI kontsentratsiooni tõstmisel, muutudes 3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  sisalduse juures piisavalt tugevaks selleks, et klorokviin peaaegu ei avaldaks lisamõju.



**Joonis 28. Endosoomide destabiliseerimise mõju PF14-SCO NP-de bioloogilisele aktiivsusele.** HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti 4 t koos NP-de ja endosoomide destabiliseeriva aine klorokviiniga ning seejärel üleöö täissöötmes. Seejärel rakud lüüsiiti ning mõõdeti luminesstentsi tugevust Infinite M200 PRO (Tecan, Šveits) abil. Luminesstentsi tugevus on väljendatud võrrelduna töötlemata rakkude luminesstentsiga. Esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N=3.

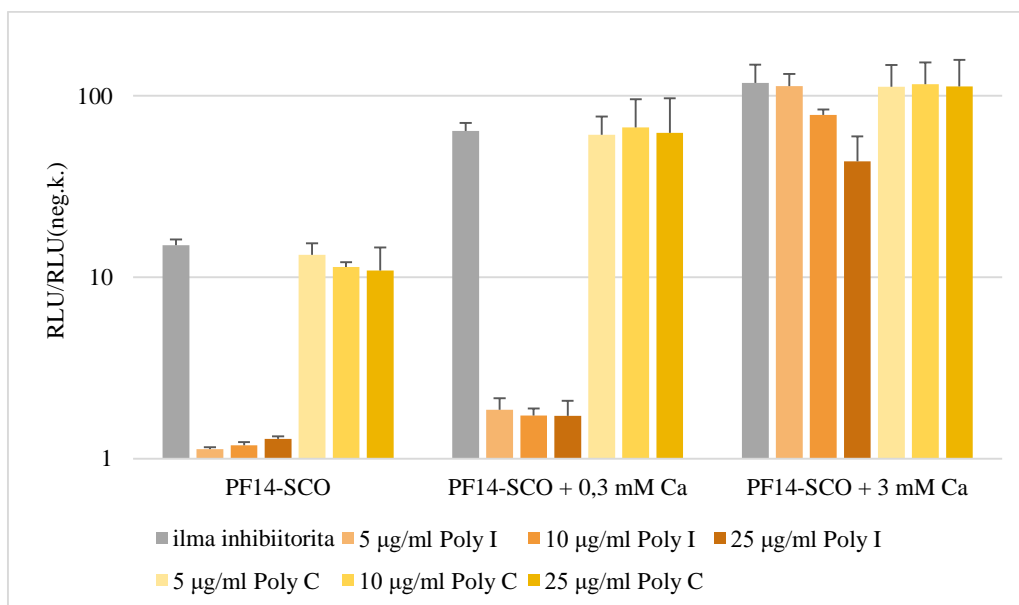
### 3.3.5 SR-A blokeerimise mõju PF14-SCO-KMI NP-de bioloogilisele efektile

Et vaadata, kas ka KMI sisaldavate NP-de puhul on rakkudesse sisenemise viisiks SR-A-sõltuv retseptor-vahendatud endotsütoos, lisati HeLa pLuc705 rakkudele vastavaid retseptoreid blokeerivaid looduslikke ligande (Poly I ja fukoidaan) 1 t enne transfektsiooni NP-dega. Rakke inkubeeriti NP ja SR-A inhibiitoreid sisaldavate lahustega üleöö ja mõõdeti luminesstentsi intensiivsust 24 t peale transfektsiooni. Fukoidaan vähendas olulisel määral (keskmiselt 96% võrra) PF14-SCO NP-de bioloogilist aktiivsust, aga selle keemiline analoog galaktoos ei avaldanud inhibeerivat toimet (joonis 29). Fukoidaani suhteline mõju NP-de aktiivsusele ei sõltunud selle kontsentratsioonist, varieerudes mitte rohkem kui 2% üht tüüpi NP-de puhul (suurim vahe esines PF14-SCO + 3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  NP-de korral: kui 2,5 µg/ml fukoidaan inhibeeris NP-de toimet 96,7%, siis 5 µg/ml kontsentratsioonil põhjustas see 98,7% aktiivsuse languse).



**Joonis 29. SR-A inhibiitor fukoidaani ja selle keemilise analoogi galaktoosi mõju PF14-SCO-Ca<sup>2+</sup> NP-de bioloogilisele efektile.** HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti 1 t SR-A inhibiitoreid sisaldava söötmega, lisati NP-de töölahused ning inkubeeriti üleöö. Lumineestsentsi tugevus mõõdeti Infinite M200 PRO (Tecan, Šveits) abil. Lumineestsentsi intensiivsus on väljendatud võrrelduna töötlemata rakkude lumineestsentsiga ning väärtused on logaritmitud. Esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N=3.

Teine SR-A inhibiitor Poly I pärssis samuti PF14-SCO NP-de bioloogilist aktiivsust ning selle toime sõltus märgatavalt Ca<sup>2+</sup> kontsentratsioonist (joonis 30). Kui ilma kaltsiumita ja 0,3 mM Ca<sup>2+</sup> puhul vähendas Poly I kõigil kasutatud kontsentratsioonidel lumineestsentsi tasemeni, mis oli võrreldav töötlemata rakkude lumineestsentsiga (langus 85-97%), siis 3 mM Ca<sup>2+</sup> korral vähendas Poly I lumineestsentsi vaid 4, 33 ja 63% võrra, sõltuvalt inhibiitori kontsentratsioonist. Poly I keemiline analoog Poly C ei avaldanud inhibeerivat toimet.

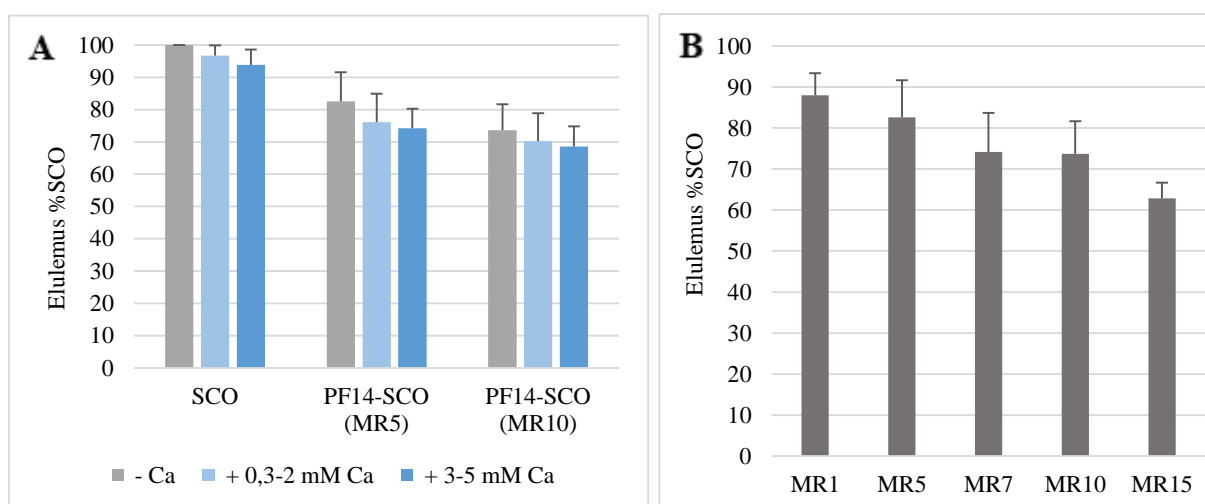


**Joonis 30. SR-A inhibiitori Poly I ja selle keemilise analoogi Poly C mõju PF14-SCO NP-de bioloogilisele aktiivsusele.** HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti 1 t SR-A inhibiitoreid sisaldava söötmega, lisati NP-d, inkubeeriti üleöö ning mõõdeti lumineestsentsi tugevus Infinite M200 PRO (Tecan, Šveits) abil. RLU väärtused on näidatud võrrelduna töötlemata rakkude lumineestsentsiga ning väärtused on logaritmitud. Esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N=3.

Inhibiitorite rakendamisel saadud tulemused näitavad, et SR-A on olulised ka KMI juuresolekul valmistatud NP-de sisenemise jaoks HeLa pLuc705 rakkudesse. Samas muutub SR-A inhibiitorite mõju nõrgemaks kõrge  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsiooniga NP-de puhul, mis annab põhjust arvata, et PF14-SCO-KMI NP-de internaliseerimisel on lisaks SR-A-vahendatud endotsütoosile kaasatud alternatiivsed mehhanismid või et sellised NP-d konkureerivad edukamalt SR-A looduslike ligandidega.

### 3.4 PF14-SCO- $\text{Ca}^{2+}$ NP-de toime hindamine HeLa pLuc705 rakkude elulemusele

PF14-SCO- $\text{Ca}^{2+}$  NP-de toimet HeLa pLuc705 rakkude elulemusele hinnati kasutades MTT testi. “Palja” 100 nM SCO mõjul ei langenud rakkude elulemus, olles keskmiselt võrdne töötlemata rakkude elulemusega.  $\text{Ca}^{2+}$  lisamisel SCO-le langes rakkude elulemus vähesel määral sõltuvalt lisaioonide kontsentratsioonist. Rakkude elulemus langes märgatavamalt PF14 lisamisel SCO-le ning pärssiv mõju sõltus oluliselt MR-ist (MR1 juures elulemus 88%, MR5 juures 83%, MR7 ja MR10 juures u 74% ning MR15 juures 63% “palja” SCO-ga töödeldud rakkude elulemusest) (joonis 31B). See viitab asjaolule, et PF14 tsütotoksiline efekt on põhjustatud peamiselt kompleksidesse mitte seotud, nn vaba peptiidi fraktsiooni poolt, mis on suurem kõrgema MR korral.  $\text{Ca}^{2+}$  lisamine PF14-SCO NP-dele pärssis rakkude elulemust analoogselt “palja” SCO korral täheldatuga  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsioonist sõltuvalt.



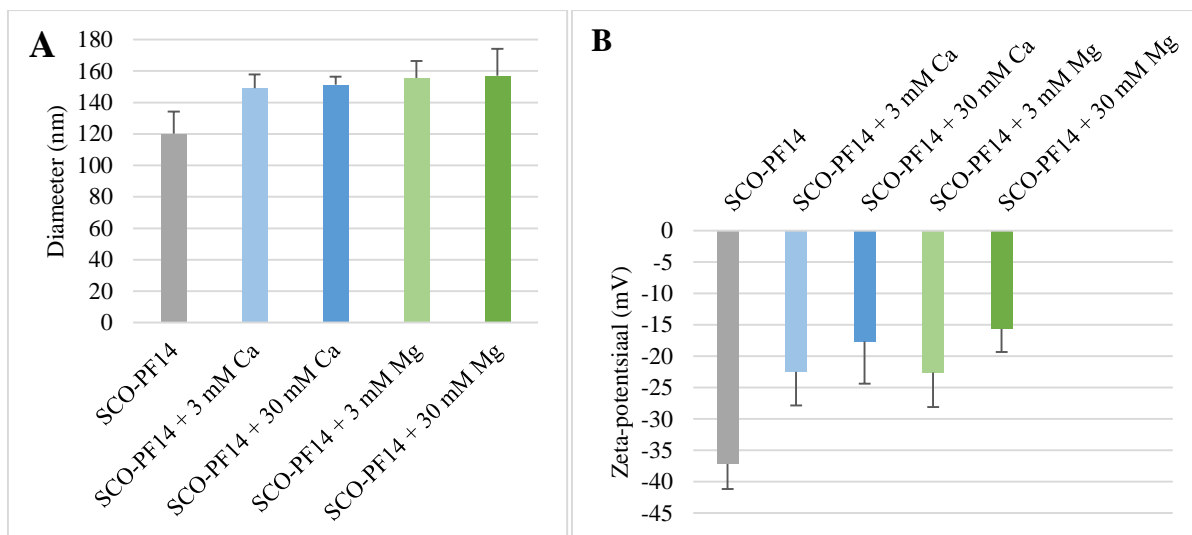
**Joonis 31. HeLa pLuc705 rakkude elulemus erinevaid NP-sid sisaldavas söötmes.** Rakke inkubeeriti “palja” SCO-ga ( $\text{Ca}^{2+}$  lisandiga või ilma), PF14-SCO või PF14-SCO- $\text{Ca}^{2+}$  NP-dega 24 t ning hinnati nende elulemus MTT testi kasutades. A – rakkude elulemus  $\text{Ca}^{2+}$  lisamisel erinevatel kontsentratsioonidel (“0,3-2 mM Ca” tähistab rakkude keskmist elulemust 0,3, 0,5, 1 ja 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  lisamisega valmistatud NP-de mõjul ning “3-5 mM Ca” tähistab rakkude keskmist elulemust 3, 4 ja 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  lisamisega valmistatud NP-de mõjul). B – rakkude elulemus erinevate PF14:SCO MR-ide puhul. Elulemus on väljendatud proovide neelduvuse osakaaluna “palja” SCO-ga töödeldud proovi neelduvusest. Esitatud on keskmised väärtused,  $N > 3$ .

Nendest tulemustest võib järeldada, et kasutatud RPP-del on rakkude elulemusele tugevam mõju, kui lisatud kaltsiumi ioonidel.  $\text{Ca}^{2+}$  mõjul langes rakkude elulemus vaid vähesel määral ning  $\text{Ca}^{2+}$  pärssiv efekt ei tugevnenud PF14:SCO MR-i tõstes. On oluline märkida, et  $\text{Ca}^{2+}$  arvutuslik lõpp-kontsentratsioon, mis on arvatud NP-de töölahuste valmistamisel kasutatud  $\text{CaCl}_2$  molaarsuse jagamisel kümnega, ei vasta otseselt tegelikule kontsentratsioonile lahuses, kuna ka rakusööde sisaldab metalliioone. Seega rakkude elulemust mõjutav  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsioon on söötmes olevate ja NP-dega lisatavate ioonide kontsentratsioonide summa, mis nt 3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  lisandi korral on 4,8 mM.

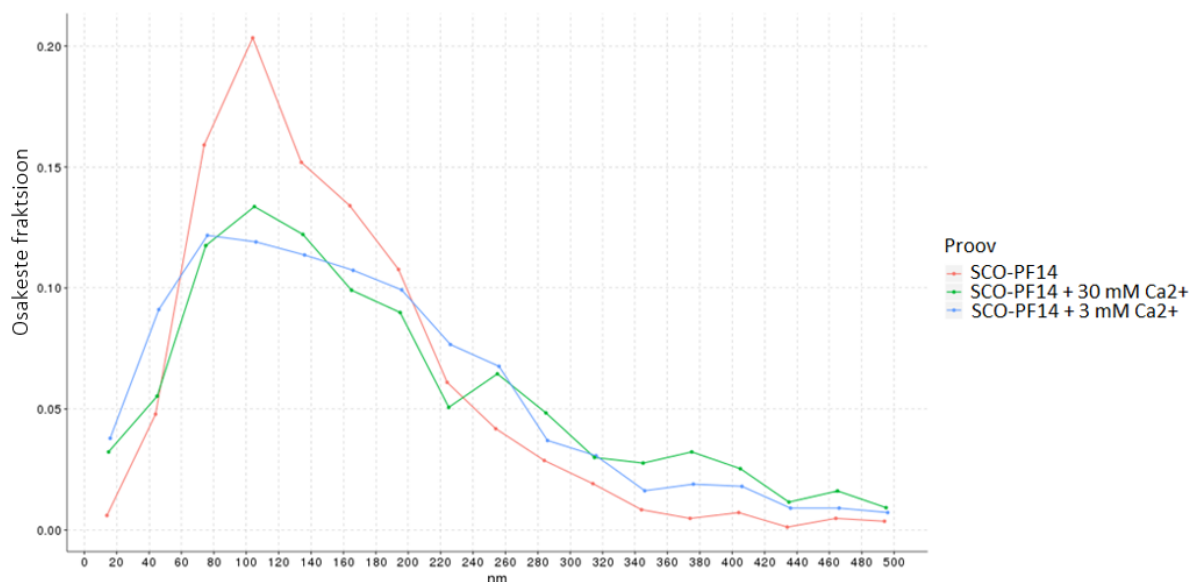
### 3.5 KMI mõju uurimine NP-de füüsikalistele omadustele

Fluorestsentsmikroskoopia tulemuste põhjal oletati, et NP-de suurus võib muutuda KMI lisamise mõjul. Et selgitada, kas ja kuidas see muutub, mõõdeti NP-de hüdrodünaamilist diameetrit (mida iseloomustab lahust läbiva valguse hajuvus) ja zeta-potentsiaal (ZP), mis kajastab lahuses olevate osakeste pinna elektrilisi omadusi. NP-de suurust ja ZP mõõdeti kasutades kahte erinevat põhimõtet toimivat seadet – ZetaView ja ZetaSizer'it – mille abil saadud tulemused erinesid mõnevõrra.

ZetaView abil saadud tulemused on toodud joonistel 32 ja 33. KMI lisamisel kasvas nii NP-de hüdrodünaamiline diameeter kui ka nende ZP ning viimase suurenemine oli sõltuvuses lisatavate ioonide kontsentratsioonist. ZetaView abil osakeste suuruse mõõtmise eripära seisneb selles, et seade ei võta arvesse liiga suuri osakesi, lugedes neid veaks, nii et masinal on olemas nii-öelda eelistatud fraktsioon suuruse järgi. Selle tulemusel näib osakeste suurus ühtlasem kui teised meetodid (ZS ja TEM) näitavad. PF14-SCO NP-d olid arvutuslikult keskmiselt 120 nm läbimõduga ning KMI lisamisel kasvas läbimõõt 25-30% võrra (ning vähenes “õnnestunud” mõõtmiste osakaal). PF14-SCO NP-de ZP 0,8 mM MES puhvril oli keskmiselt -37 mV ning muutus vähem negatiivseks KMI juuresolekul, kasvades vastavalt 38% ja 54% võrra 3 mM ja 30 mM KMI lisamisel NP-de alglahusesse. PF14-pGL3 NP-d olid keskmiselt väiksema läbimõõdu ja vähem negatiivse ZP-ga kui PF14-SCO NP-d (tulemused pole esitatud).

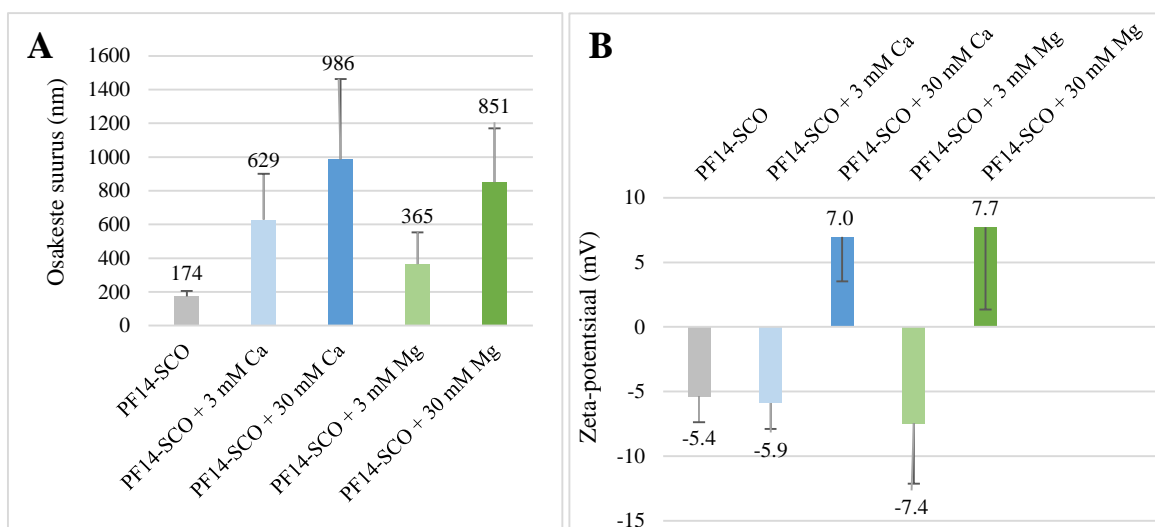


**Joonis 32. PF14-SCO NP-de keskmine hüdrodünaamiline diameeter (A) ja zeta-potentsiaal (B), mõõdetuna ZetaView abil.** Joonisel on toodud NP-de valmistamisel kasutatud (NP-de alglahusesse lisatud) lisaioonide kontsentratsioonid. Mõõtmiseks sobiva NP kontsentratsiooni saavutamiseks lahjendati alglahused 100x (PF14-SCO korral) või 30-50x (PF14-SCO-KMI korral). Esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N>3.



**Joonis 33. PF14-SCO NP-de suuruse sõltuvus lisatava Ca<sup>2+</sup> kontsentratsioonist mõõdetuna ZetaView'ga.** Ca<sup>2+</sup> lisamisel langes väiksema hüdrodünaamilise diameetriga NP-de osakaal ja kasvas suuremate NP-de osakaal. Esitatud on ühe representatiivse katse tulemus neljast. Graafik on saadud kasutades tarkvara veebilehel zvgraphs (zvgraphs.ut.ee).

ZetaSizer-i abil mõõdetud NP parameetrid on esitatud joonisel 34. Erinevalt ZetaView-st ei sordi ZetaSizer välja “liiga” suuri partikleid ning ka väga väikeste partiklite puhul on selle seadme tundlikkus kõrgem. See analüüs võimaldas mitte ainult iseloomustada osakeste keskmist diameetrit, vaid ka tuvastada polüdispersses segus olevaid erinevaid NP fraktsioone.



**Joonis 34. PF14-SCO NP-de keskmine hüdrodünaamiline diameeter (A) ja zeta-potentsiaal (B) mõõdetuna ZetaSizer-iga.** Esitatud on keskmised väärtused +/-SD, N≥3. Igas katses teostati ühe proovi kohta 8 suuruse mõõtmist ja 4 zeta-potentsiaali mõõtmist.

PF14-SCO NP-de keskmiseks diameetriks saadi u 174 nm (pGL3-PF14 NP-d olid mõnevõrra väiksemad) ning KMI juuresolekul formeeritud NP-de läbimõõt oli keskmiselt 2-6x suurem. Samas KMI lisand muutis NP heterogeensemaks ja lahustes esinesid väga erineva diameetriga osakesed – alates u 100-st ja kuni 1500 nm-ni (vt Lisa 4). PF14-SCO NP-de ZP-ks vees hindas ZetaSizer u -5,4 mV ning KMI lisamisel 3 mM kontsentratsioonil muutus see keskmiselt 10-40% negatiivsemaks, kõikudes mõõtmiste vahel suures ulatuses. KMI lisamisel suuremal kontsentratsioonil (30 mM) muutus NP-te ZP positiivseks. Kokkuvõtteks võib öelda, et madalal kontsentratsioonil lisatavad KMI suurendavad PF14-SCO NP-de läbimõõtu 2-3,5x, kuid ei muuda või muudavad väga vähesel määral nende ZP. Seevastu kõrgel kontsentratsioonil lisatud KMI suurendavad nii osakeste hüdrodünaamilist diameetrit (keskmiselt 5x) kui ka nende ZP, muutes selle positiivseks. Samas, mõlema suuruse väärtused varieeruvad suures ulatuses, viidates tekkiva segu suuremale heterogeensusele.

## Kokkuvõte

Splaiissingut korrigeerivad oligonukleotiidid (SCO-d) on kõrge potentsiaaliga terapeutilised, mille transfektsiooni efektiivsuse suurendamiseks on välja töötatud mitmeid vektorsüsteeme, s.h rakkudesse penetreeruvad peptiidid (RPP-d). Käesolevas töös uuriti, kuidas mõjub kaltsiumi ja magneesiumi ionide (KMI) lisamine RPP PepFect14 (PF14) ja SCO komplekseerimisel tekkivate nanopartiklite (NP-de) bioloogilisele aktiivsusele, füüsikalistele omadustele, internaliseerimise mehhanismile ja tsütotoksilisusele.

Splaiissingu ümbersuunamise kvantifitseerimise katsed näitasid, et splaiissingu korrigeerimine toimub suurema efektiivsusega nendes rakkudes, mis on töödeldud KMI juuresolekul valmistatud PF14-SCO NP-dega ning et KMI kasutades saab tõsta NP-de bioloogilist efektiivsust mitmekordselt. Lisaks sellele näidati, et KMI lisamine on efektiivne NP-de formeerumise etapil, viidates, et KMI on PF14-SCO NP-de integraalseks osaks. Mikroskoopia ja FACS analüüsi abil leiti, et KMI lisamisel suurenes PF14-SCO NP-de internaliseerimine rakkudesse ja oluliselt kasvas SCO kontsentratsioon rakutuumades, mis on SCO toimekohaks. Rakkude pinnal ja sisemuses ilmestusid suuremad struktuurid, viidates, et NP-d koonduvad KMI mõjul suurematesse agregaatidesse ning sisenevad rakkudesse, indutseerides suuremate endosoomide teket.

Uurides KMI sisaldavate NP-de internaliseerimise mehhanismi, näidati, et tüüp A püüdurreseptorid ehk SR-A on olulised nende internaliseerimisel. Samas ei blokeeri SR-A inhibiitorid täielikult  $Ca^{2+}$  kõrge kontsentratsiooni juures valmistatud NP-des rakku viidud SCO toimet. See viitab võimalusele, et KMI juuresolekul valmistatud NP-de internaliseerimisel on kaasatud alternatiivsed mehhanismid või et need konkureerivad edukamalt SR-A inhibiitoritega. Samuti leiti, et KMI muudavad oluliselt efektiivsemaks NP-de vabanemise endosoomidest, mis võib olla nende bioloogilise aktiivsuse kasvu peamiseks põhjuseks.

KMI muudavad PF14-SCO NP-de füüsikalisi omadusi, suurendades nende zeta-potentsiaali ja hüdrodünaamilist diameetrit ning nende mõjul muutub NP-sid sisaldav lahus heterogeensemaks. KMI ei suurenda oluliselt NP-de toksilisust rakkudele ja oks ning nende toime on analoogne erinevates splaiissingu korrigeerimisel põhinevates testsüsteemides ja erinevate RPP-de korral, viidates KMI-vahendatud NP-de bioloogilist efektiivsust suurendava mõju universaalsusele.

## **Effect of bivalent metal ions on CPP-facilitated transfection and splice-correcting activity of SCO**

Maria Maloverjan

### Summary

Splice-correcting oligonucleotides (SCOs) are highly promising novel therapeutic agents. To increase their transfection efficiency, several vector-based systems have been developed, among which are cell-penetrating peptides, CPPs. In current study, we studied nanoparticles (NPs) formed between SCO and one of the CPPs, PepFect14 (PF14). Calcium ions have earlier been used to facilitate pDNA transfection with Tat peptide and pack siRNA to NPs for internalisation by cells. It has been shown that depletion of calcium leads to reduction of biological activity of PF14-SCO NPs. The aim of the current study was to analyze, whether and how calcium and magnesium ions (CMI) influence biological activity, physical properties, mechanism of transfection and cytotoxicity of PF14-SCO NPs.

Confocal microscopy and FACS analysis revealed enhanced internalisation of CMI-complemented PF14-SCO-Cy5 NPs (cNPs) into HeLa pLuc705 cells, and an increase of Cy5 signal intensity was especially apparent in the cell nuclei. Similar tendencies were also observed using EGFP-based reporter cell system.

Enhanced biological activity of PF14-SCO cNPs compared with non-complemented NPs (nNPs) was further confirmed using luciferase assay in HeLa pLuc705 reporter cells. In addition,  $\text{Ca}^{2+}$  ions potentiated biological activity of NPs containing several other CPPs. SR-As (main receptors responsible for internalisation of nNPs) appeared to be important for the internalisation of cNPs, although the effect of one of the receptor inhibitors was relatively weak in case of high concentration of  $\text{Ca}^{2+}$ , suggesting that alternative internalisation mechanisms might also be involved in this case, or that cNPs compete more efficiently with natural ligands of SR-As. Endosomes destabilising compound, chloroquine, enhanced the biological response to cNPs, but its effect decreased at higher concentrations of CMI, suggesting that CMI induce endosomal escape of NPs, which seems to be the main cause of higher biological effect of cNPs. Addition of  $\text{Ca}^{2+}$  ions slightly interfered with the viability of cells. However, the negative impact of PF14 on cell viability was more remarkable than that of  $\text{Ca}^{2+}$ .

Analysis of the hydrodynamic diameter and zeta-potential (ZP) of nNPs and cNPs revealed that both the size and ZP of NPs increased upon addition of CMI, and NPs became more heterogeneous. The finding that CMI increased the efficiency of NPs assembled with different CPPs and nucleic acid molecules and biological effect of the latter in different cell lines allows to consider the effect of CMI universal.

## Kasutatud kirjandus

1. Aartsma-Rus, A. ja Van Omen, G. B. (2007). Antisense-mediated exon skipping: A versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA* 13:1609–1624.
2. Al Bari, M. A. A. (2017). Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacol Res Perspect*;5(1):e00293.
3. Andaloussi, S. E., Lehto, T., Mäger, I., ... Langel, Ü. (2011). Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Res*;39(9):3972-87.
4. Arukuusk, P., Pärnaste, L., Oskolkov, N., ... Langel, Ü. (2013). New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochim Biophys Acta*;1828(5):1365-73.
5. Bagur, R. ja Hajnóczky, G. (2017). Intracellular Ca<sup>2+</sup> sensing: role in calcium homeostasis and signaling. *Mol Cell.*; 66(6): 780–788.
6. Baoum, A., Xie, S. X., Fakhari, A. ja Berkland, C. (2009). "Soft" calcium crosslinks enable highly efficient gene transfection using TAT peptide. *Pharm Res*;26(12):2619-29.
7. Benimetskaya, L., Takle, G. B., Vilenchik, M., ... Stein, C. A. (1998). Cationic porphyrins: novel delivery vehicles for antisense oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1998 Dec 1;26(23):5310-7.
8. Bestas, B., Moreno, P. M. D., Blomberg, K. E. M., .... Smith, C. I. E. (2014). Splice-correcting oligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model. *J Clin Invest.* 2014 Sep 2; 124(9): 4067–4081.
9. Blechacz, B. ja Russell, S. J. (2004). Parvovirus vectors: use and optimisation in cancer gene therapy. *Expert Rev Mol Med.* 2004 Jul 23;6(16):1-24.
10. Burchard, J., Jackson, A. L., Malkov, V., ... Linsley, P. S. (2009). MicroRNA-like off-target transcript regulation by siRNAs is species specific. *RNA* 15, 308–315.
11. Bödding, M. ja Penner, R. (1999). Differential modulation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents by EGTA and BAPTA in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch.*;439(1-2):27-38.
12. Caminade, A. ja Turrin, C. (2014). Dendrimers for drug delivery. *J. Mater. Chem. B*, 2014,2, 4055-4066.
13. Canton, J., Neculai, D. ja Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol*;13(9):621-34.
14. Carthew, R. W. ja Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136(4):642-655.
15. Cevher, E., Sezer, A. D. ja Çağlar, E. Ş. (2012). Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy. *Intech 2012*, chapter 16.
16. Chakravarthy, M. ja Veedu, R. N. (2019). BACE1 inhibition using 2'-OMePS steric blocking antisense oligonucleotides. *Genes (Basel)*;10(9):705.
17. Cho, Y. W., Kim, J. D., ja Park, K. (2003) Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 55, 721–34.
18. Chou, L. Y. T., Ming, K. ja Chan, W. C. W. (2011). Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem Soc Rev*;40:233–245.
19. Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell.*;131(6):1047-58.

20. Conley, M. E., Mathias, D., Treadaway, J., ... Rohrer, J. (1998). Mutations in Btk in Patients with Presumed X-Linked Agammaglobulinemia. *AJHG* Volume 62, Issue 5, May 1998, Pages 1034-1043
21. Crooke, R. M., Graham, M. J., Lemonidis, K. M., ... Perera, R. J. (2005). An apolipoprotein B antisense oligonucleotide lowers LDL cholesterol in hyperlipidemic mice without causing hepatic steatosis. *J. Lipid Res.* 46, 872–884.
22. Crooke, S. T. (1998). Vitravene – another piece in the mosaic. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8, vii–viii.
23. Dagle, J. M., Weeks, D. L. ja Walder, J. A. (1991). Pathways of degradation and mechanism of action of antisense oligonucleotides in *Xenopus laevis* embryos. *Antisense Res Dev*; 1: 11–20.
24. Dass, C. R. (2004). Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med* 82, 579–591.
25. Daya, S. ja Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev*;21(4):583–593.
26. Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. ja Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*; 269:10444-50.
27. DeVincenzo, J., Cehelsky, J. E., Alvarez, R., ... Meyers, R. (2008). Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antiviral Res.* 77(3):225-231.
28. Ezzat K., Andaloussi S. E., Zaghoul, E. M., ... Langel, Ü. (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Research*, 2011, 1–15.
29. Ezzat K., Helmfors H., Tudoran O., ... Langel Ü. (2012). Scavenger receptor-mediated uptake of cellpenetrating peptide nanocomplexes with oligonucleotides. *FASEB J* 26, 1172–1180.
30. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., ... Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Nov;84(21):7413-7.
31. Frankel, A. ja Pabo, C. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*; 8:1189-93.
32. Gales, L. (2019). Tegsedi (Inotersen): An Antisense Oligonucleotide Approved for the Treatment of Adult Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Pharmaceuticals* 2019, 12(2), 78.
33. Goldshtein, M., Forti, E., Ruvinov, E., Cohen, S. (2016). Mechanisms of cellular uptake and endosomal escape of calcium-siRNA nanocomplexes. *International Journal of Pharmaceutics* 515 (2016) 46–56.
34. Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K. ja Brown, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*;76(1):333-7.
35. Gonçalves, G. A. R. ja Paiva, R. M. A. (2017). Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein.* 2017;15(3):369-75.
36. Graham, F.L. ja Eb, A.J.V.D. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456–467.

37. Green, M. ja Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*;55(6):1179-88.
38. Haensler, J. ja Szoka, F. C. Jr. (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem.* 1993 Sep-Oct;4(5):372-9.
39. Heemskerk, H. A., Winter, C. L., Kimpe, S. J., ... Aartsma-Rus., A. (2009). *In vivo* comparison of 2'-*O*-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping. *J Gene Med*2009;11: 257 – 266.
40. Helmfors, H., Eriksson, J. ja Langel, Ü. (2015). Optimized luciferase assay for cell-penetrating peptide-mediated delivery of short oligonucleotides. *Analytical Biochemistry* 484 (2015) 136–142.
41. Hua, Y., Sahashi, K., Hung, G., ... Krainer, A. R. (2010). Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes & Dev.* 2010. 24: 1634-1644.
42. Hua, Y., Vickers, T. A., Okunola, H. R., ... Krainer, A. R. (2008). Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet*;82(4):834-48.
43. Hwang, J. ja Yokota, T. (2019). Recent advancements in exon-skipping therapies using antisense oligonucleotides and genome editing for the treatment of various muscular dystrophies. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 21, e5, 1–11.
44. Ishiguro, S., Alhakamy, N. A., Uppalapati, D., ... Tamura, M. (2017). Combined Local Pulmonary and Systemic Delivery of AT2R Gene by Modified TAT Peptide Nanoparticles Attenuates Both Murine and Human Lung Carcinoma Xenografts in Mice. *J Pharm Sci*;106(1):385-394.
45. Jauvin, D., Chretien, J., Pandey, S. K., ... Puymirat, J. (2017). Targeting DMPK with Antisense Oligonucleotide Improves Muscle Strength in Myotonic Dystrophy Type 1 Mice. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017;7:465–474.
46. Jiang, Y., Oliver, P., Davies, K. E. ja Platt, N. (2006). Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells. *J Biol Chem.* 2006 Apr 28;281(17):11834-45.
47. Jiao, C. Y., Delaroche, D., Burlina, F., ... Sagan, S. (2009). Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J Biol Chem*;284(49):33957-65.
48. Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. ja Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*;88(5):1864-8.
49. Juks C., Lorents A., Arukuusk P., Langel Ü., and Pooga M. (2017). Cell penetrating peptides recruit type A scavenger receptors to the plasma membrane for cellular delivery of nucleic acids. *FASEB J* 31(3): 975–988.
50. Juks, C., Padari, K., Margus, H., ... Pooga, M. (2015) The role of endocytosis in the uptake and intracellular trafficking of PepFect14-nucleic acid nanocomplexes via class A scavenger receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1848(12): 3205–16.
51. Kang, S., Cho, M. ja Kole, R. (1998). Up-Regulation of Luciferase Gene Expression with Antisense Oligonucleotides: Implications and Applications in Functional Assay Development. *Biochemistry* 1998, 37, 18, 6235-6239.

52. Kole, R., Krainer, K. R. ja Altman, S. (2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov* 11:125–140.
53. Konate, K., Dussot, M., Aldrian, G., ... Deshayes, S. (2019). Peptide-Based Nanoparticles to Rapidly and Efficiently “Wrap ’n Roll” siRNA into Cells. *Bioconjugate Chemistry*;30(3):592-603.
54. Kristensen, M. ja Nielsen, H. M. (2016). Cell-penetrating peptides as tools to enhance non-injectable delivery of biopharmaceuticals. *Tissue Barriers*.;4(2):e1178369.
55. Lorents, A., Kodavali, P. K., Oskolkov, N., ... Pooga, M. (2012). Cell-penetrating Peptides Split into Two Groups Based on Modulation of Intracellular Calcium Concentration. *J Biol Chem*;287(20):16880-9.
56. Luo, D. ja Saltzman, W. M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol.* 2000;18:33-37.
57. Margus, H., Arukuusk, P., Langel, Ü. ja Pooga, M. (2016). Characteristics of Cell-Penetrating Peptide/Nucleic Acid Nanoparticles. *Mol Pharm*;13(1):172-9.
58. Melikov, K., Hara, A., Yamoah, K., ... Chernomordik, L. V. (2015). Efficient entry of cell-penetrating peptide nona-arginine into adherent cells involves a transient increase in intracellular calcium. *Biochem J*;471:221–230.
59. Mellet, C. O., Fernandez, J. M. G. ja Benito, J. M. (2010). Cyclodextrin-based gene delivery systems. *Chem. Soc. Rev.*, 2011,40, 1586-1608.
60. Mendell, J. R., Campbell, K., Rodino-Klapac, L., ... Walker, C. M. (2010). Dystrophin Immunity in Duchenne's Muscular Dystrophy. *N Engl J Med*; 363:1429-1437.
61. Monia, B. P., Lesnik, E. A., Gonzalez, C., ... Freier, S. M. (1993). Evaluation of 2'-Modified Oligonucleotides Containing 2'-Deoxy Gaps as Antisense Inhibitors of Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry* (1993), Inc. Vol. 268, No. 19, pp. 14514-14522.
62. Morgan, A. J. ja Jacob, R. (1994). Ionomycin enhances Ca<sup>2+</sup> influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem J*; 300(Pt 3): 665–672.
63. Morishita, M., Kamei, N., Ehara, J., ... Takayama, K. (2007). A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin. *J Control Release*; 118:177-84.
64. Morris MC, Vidal P, Chaloin L, Heitz F, Divita G. (1997). A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*;25(14):2730-6.
65. Mäe, M., El Andaloussi, S., Lundin, P., ... Langel, Ü. (2009). A stearylated RPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release*;134(3):221-7.
66. Nagahara, H., Vochoero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., ... Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27 Kip1 induces cell migration. *Nat Med*; 4:1449-52.
67. Naso, M. F., Tomkovitz, Perry III, W. L. ja Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* volume 31, pages317–334.
68. Neher, E. ja Sakaba, T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron*.;59(6):861-72.

69. Nelemans, L. C. ja Gurevich, L. (2020). Drug Delivery with Polymeric Nanocarriers – Cellular Uptake Mechanisms. *Materials (Basel)*;13(2).
70. Patel, L. N., Wang, J., Kim, K., ... Shen, W. (2009). Conjugation with cationic cell-penetrating peptide increases pulmonary absorption of insulin. *Mol Pharm*; 6:492-503.
71. Patil, S. D., Rhodes, D. G. ja Burgess, D. J. (2005). DNA-based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A Comprehensive Review. *The AAPS Journal* 2005; 7 (1) Article 9.
72. Pellestor, F. ja Paulasova, P. (2004). The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics. *Eur J Hum Genet* 12, 694–700.
73. Pistoni, M., Ghigna, C. ja Gabellini, D. (2010). Alternative splicing and muscular dystrophy. *RNA Biol.* 2010 ; 7(4): 441–452.
74. Pooga, M. ja Langel, Ü. (2015). Classes of Cell-Penetrating Peptides, *Methods Mol Biol.*;1324:3-28.
75. Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M. ja Langel, Ü. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J.*;12(1):67-77.
76. Porosk, L., Arukuusk, P., Põhako, K., ... Langel, Ü. (2019). Enhancement of siRNA transfection by the optimization of fatty acid length and histidine content in the RPP. *Biomater Sci*;7(10):4363-4374.
77. PrabhuDas, M. R., Baldwin, C. L., Bollyky, P. L., ... El Khoury, J. (2017). A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J Immunol*;198(10):3775-3789.
78. Rafael, D., Arranja, A., Adnrade, F., ... Videira, M. (2015). Lipoplexes and Polyplexes: Gene Delivery Applications. *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*, Edition: 1, Chapter: Lipoplexes and Polyplexes: Gene Delivery Applications, Publisher: CRC Press, Editors: Munmaya K. Mishra.
79. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L. ... ja Minor, L. (2016). Cell viability assays. *Assay Guidance Manual* [Internet].
80. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., ... Minor, L. (2016). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
81. Rocha, C. S. J., Lundin, K. E., Behlke, ... Smith, C. I. E. (2016). Four Novel Splice-Switch Reporter Cell Lines: Distinct Impact of Oligonucleotide Chemistry and Delivery Vector on Biological Activity. *Nucleic Acid Ther.* 2016 Dec;26(6):381-391.
82. Romero, N. B., Braun, S., Benveniste, O., ... Fardeau, M. (2004). Phase I Study of Dystrophin Plasmid-Based Gene Therapy in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *Human Gene Therapy* Vol. 15, No. 11.
83. Rothbard, J. B., Garlington, S., Lin, Q., ... Khavari, P. A. (2000). Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med*;6(11):1253-7.
84. Ruvinov, E., Kryukov, O., Forti, E., ... Cohen, S. (2015). Calcium–siRNA nanocomplexes: What reversibility is all about. *Journal of Controlled Release* 203 (2015) 150–160.
85. Räägel, H., Hein, M., Kriiska, A., ... Pooga, M. (2013). Cell-penetrating peptide secures an efficient endosomal escape of an intact cargo upon a brief photo-induction. *Cell Mol Life Sci*;70(24):4825-39.
86. Saher, O., Rocha, C. S. J., Zaghloul, E. M., ... Smith, C. I. E. (2018). Novel peptide-dendrimer/lipid/oligonucleotide ternary complexes for efficient cellular uptake and

- improved splice-switching activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 132 (2018) 29–40.
87. Santos, R. C. D., Bautista, S., Lucarelli, S., ... Antonescu, C. N. (2017). Selective regulation of clathrin-mediated epidermal growth factor receptor signaling and endocytosis by phospholipase C and calcium. *Mol Biol Cell*;28(21):2802-2818.
  88. Scherer W.F., Syverton J.T., Gey G.O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *Journal of Experimental Medicine*. 97 (5): 695–710.
  89. Schwarze, S. R. (1999). In Vivo Protein Transduction: Delivery of biologically active protein into the mouse. *Science*; 285:1569-72.
  90. Scoto, M., Finkel, R., Mercuri, E. ja Muntoni, F. (2018). Genetic therapies for inherited neuromuscular disorders. *The Lancet. Child & Adolescent Health*. 2(8):600–609.
  91. Song, E., Lee, S., Wang, J., ... Lieberman, J. (2003). RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9, 347–351.
  92. Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., ... Langel, Ü. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta*;1467(1):165-76.
  93. Springer, A. D. ja Dowdy, S. F. (2018). GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics. *Nucleic Acid Ther.*;28(3):109-118.
  94. Szent-Györgyi, A. G. (1975). Calcium regulation of muscle contraction. *Biophys J.*; 15(7): 707–723.
  95. Stein, C. A. ja Castanotto, D. (2017). FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Molecular Therapy Vol. 25 No 5*.
  96. Stull, R. A., Szoka, F. C. Jr. (1995). Antigene, ribozyme and aptamer nucleic acid drugs: progress and prospects. *Pharm Res*;12:465-483.
  97. Suhorutsenko, J., Oskolkov, N., Arukuusk, P., ... Langel, Ü. (2011). Cell-penetrating peptides, PepFects, show no evidence of toxicity and immunogenicity in vitro and in vivo. *Bioconjug Chem*;22(11):2255-62
  98. Zauner, W., Ogris, M. ja Wagner, E. (1998). Polylysine-based transfection systems utilizing receptor- mediated delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* 30, 97–113.
  99. Zhang, W. W., Li, L., Li, D., ... Lam, D. M. (2018). The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *Hum Gene Ther.* 2018 Feb;29(2):160-179.
  100. Ziegler, A.; Seelig, J. (2008). Binding and Clustering of Glycosaminoglycans: A Common Property of Mono- and Multivalent CellPenetrating Compounds. *Biophys. J.* 2008, 94, 2142–2149.
  101. Tünnemann, G., Martin, R. M., Haupt, S., ... Cardoso, M. C. (2006). Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB J*;20(11):1775-84.
  102. Uherek C, Wels W. DNA-carrier proteins for targeted gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;44(2-3):153-166.
  103. Urgard, E., Lorents, A., Klaas, M., ... Rebane, A. (2016). Pre-administration of PepFect6-microRNA-146a nanocomplexes inhibits inflammatory responses in keratinocytes and in a mouse model of irritant contact dermatitis. *Journal of Controlled Release* 235 (2016) 195–204.

104. Wadia, J. S., Stan, R. V. ja Dowdy, S. F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med.*;10(3):310-5
105. Vaheiri, A. ja Pagano, J. S. (1965). Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology* 27, 434– 436.
106. Van Asbeck, A. H., Beyerle, A., McNeill, H., ... Brock, R. (2013). Molecular Parameters of siRNA-Cell Penetrating Peptide Nanocomplexes for Efficient Cellular Delivery. *AcsNano Vol 7 No 5*, 3797–3807.
107. Wei, C., Wang, X., Zheng, M. ja Cheng, H. (2012). Calcium gradients underlying cell migration. *Curr Opin Cell Biol.*;24(2):254-61.
108. Veiman K., Mager I., Ezzat K., ... Langel Ü. (2013). PepFect14 Peptide Vector for Efficient Gene Delivery in Cell Cultures. *Mol. Pharmaceutics* 2013, 10, 199–210.
109. Wender, P. A., Mitchell, D. J., Pattabiraman, K., ... Rothbard, J. B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;97(24):13003-8.
110. Wheeler, T. M., Sobczak, K., Lueck, J. D., ... Thornton, C. A. (2009). Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science* 325, 336–339.
111. Whelan, F. J., Meehan, C. J., Golding, G. B., ... Bowdish, D. M. E. (2012). The evolution of the class A scavenger receptors. *BMC Evol Biol*;12:227.
112. Witlox, M. A., Lamfers, M. L., Wuisman, P. I. J. M., ... Siegal, G. P. (2007). Evolving gene therapy approaches for osteosarcoma using viral vectors: Review. *Bone* 40, 797–812.
113. Vives, E., Brodin, P. ja Lebleu, B. (1997). A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *Biol Chem* 1997; 272:16010-7.

## Kasutatud veebiaadressid

- AptamiR Therapeutics (2020): <http://www.aptamir.com/therapeutic-strategy/micrnas/> (viimati külastatud 28.05.2020)
- BioPharma Dive (23.05.2019): <https://www.biopharmadive.com/news/icer-dmd-cost-effectiveness-exondys-emflaza-sarepta-ptc/555442/> (viimati külastatud 10.02.2020)
- DrugBank (versioon 5.1.6, antud välja 22.04.20): Fomivirsen: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06759>; Spinraza: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB13161>; Patisiran: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB14582> (viimati külastatud 28.05.2020)
- Drugs.com (4.05.2020): Mipomersen: <https://www.drugs.com/history/kynamro.html>; Eteplirsen: <https://www.drugs.com/history/exondys-51.html>; Defibrotide: <https://www.drugs.com/history/defitelio.html>; Inotersen: <https://www.drugs.com/history/tegsedi.html> (viimati külastatud 2.06.2020)
- ExPASy – Bioinformatics Resource Portal (25.02.2019): [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_VS42](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_VS42) (viimati külastatud 23.03.2020)
- FDA – U.S. Food and Drug Administration: Vitravene: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/98/20961\\_Vitravene.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20961_Vitravene.cfm) (10.04.2002); Patisiran: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2018/210922Orig1s000TOC.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210922Orig1s000TOC.cfm) (7.09.2018); Pegaptanib: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2004/21-756\\_Macugen.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/21-756_Macugen.cfm) (23.03.2005); geeniteraapia: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy> (25.07.2018) (viimati külastatud 5.06.2020)
- Labome – siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing (16.05.2020): <https://www.labome.com/method/siRNAs-and-shRNAs-Tools-for-Protein-Knockdown-by-Gene-Silencing.html> (viimati külastatud 28.05.2020)
- Online Microbiology Notes – MicrobiologyInfo.com (2020): <https://microbiologyinfo.com/difference-between-serum-and-plasma/> (viimati külastatud 2.06.2019)
- Pharmaceutical – Top five most expensive drugs in the US (Vara, V. 24.06.2019): <https://www.pharmaceutical-technology.com/features/most-expensive-drugs-us/> (viimati külastatud 28.05.2020).
- The Biopolymer Factory – biomers.net: [https://www.biomers.net/en/products/RNA/antisense\\_oligos.html](https://www.biomers.net/en/products/RNA/antisense_oligos.html) (külastatud 2.06.2019)

## Lisad

### Lisa 1.

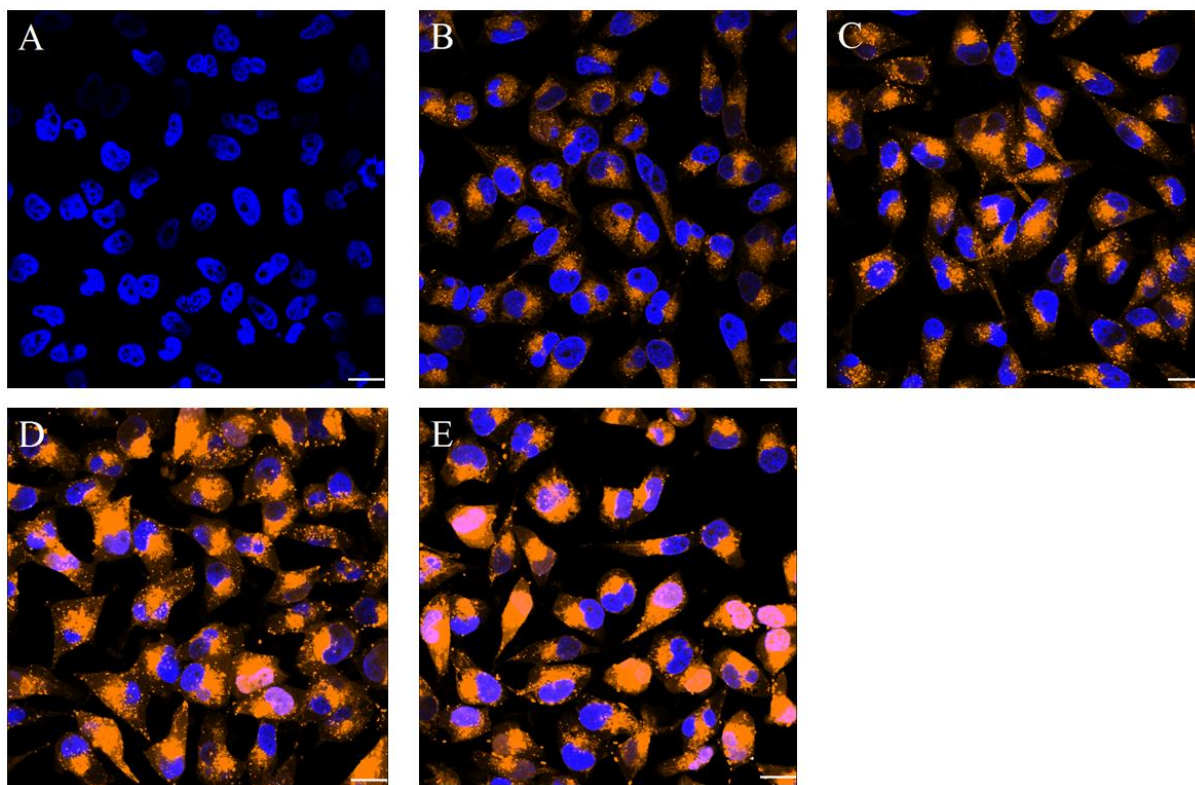
Lutsiferaasi substraadi lahuse koostis

komponent	konsentratsioon
DTT	25 mM
LH2	1 mM
ATP	1 mM
CoA	25 $\mu$ M

komponent	konsentratsioon
EDTA	1 mM
Tricine	20 mM
MgCO <sub>3</sub>	1 mM
MgSO <sub>4</sub>	5 mM

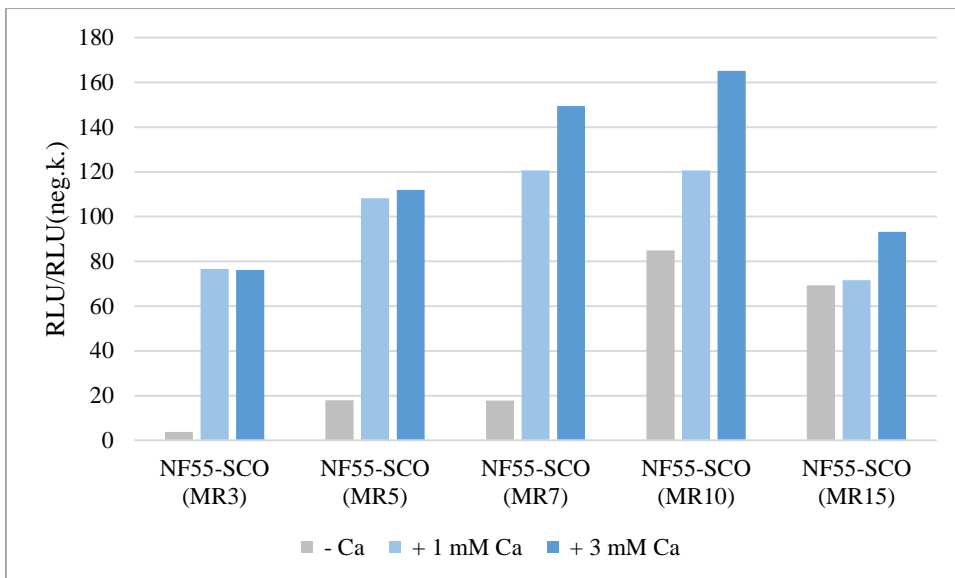
### Lisa 2.

SCO-Cy5 HeLa pLuc705 rakkudesse sisenemise konfokaalmikroskoopiline analüüs. Oranž on Cy5 ja sinine vastavalt DAPI / tuumade signaal. On näidatud üks tasapind ja üks ajapunkt (24 t). A, töötlemata rakud; B, SCO-Cy5; C, PF14-SCO-Cy5; D, PF14-SCO-Cy5 + 0,3 mM Mg<sup>2+</sup>; E, PF14-SCO-Cy5 + 3 mM Mg<sup>2+</sup>. Mõõtjoon 20  $\mu$ m, obj. 100x.



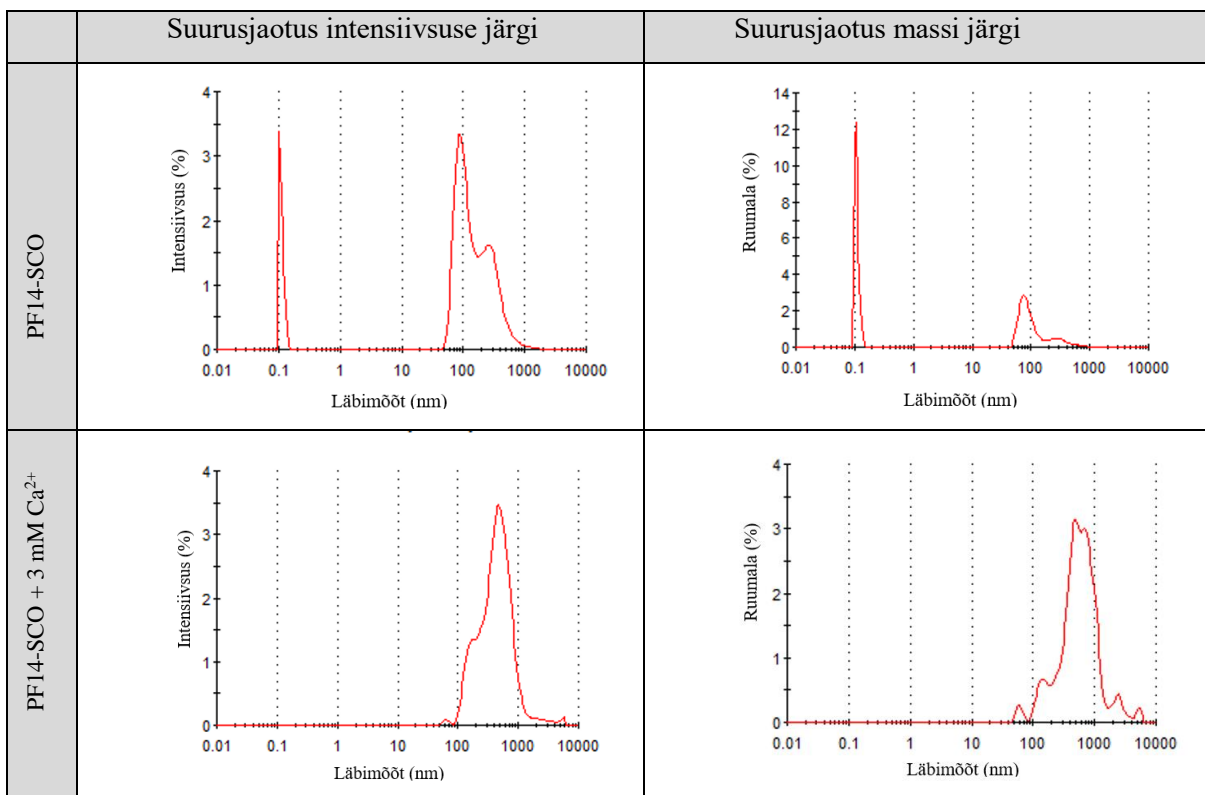
### Lisa 3.

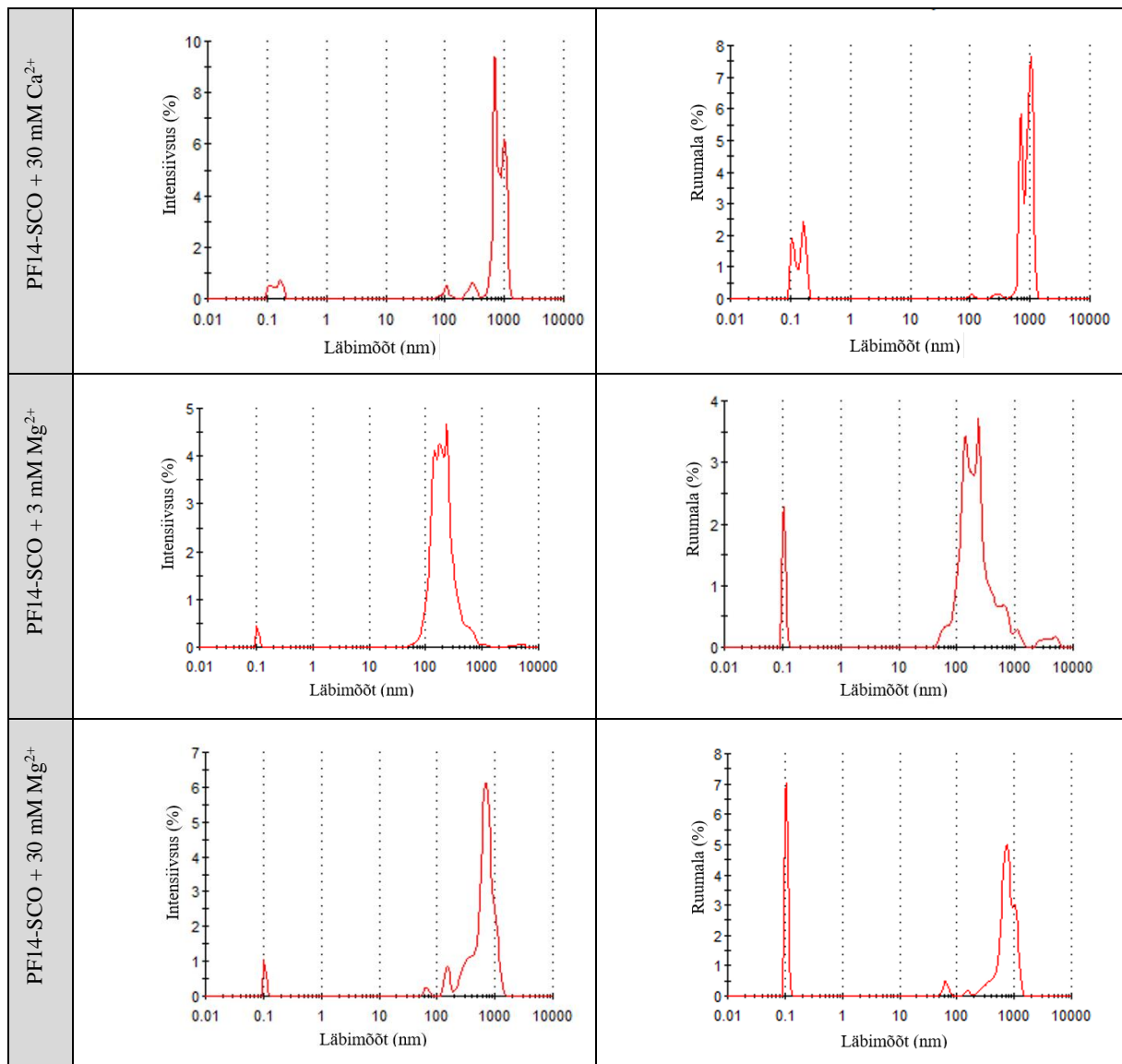
Ca<sup>2+</sup> mõju NF55-SCO NP-de luminesentsi suurendavale toimele sõltuvalt NF55 kontsentratsioonist. On näidatud ühe representatiivse katse tulemus. RLU väärtused on näidatud võrrelduna töötlemata rakkude luminesentsiga.



#### Lisa 4.

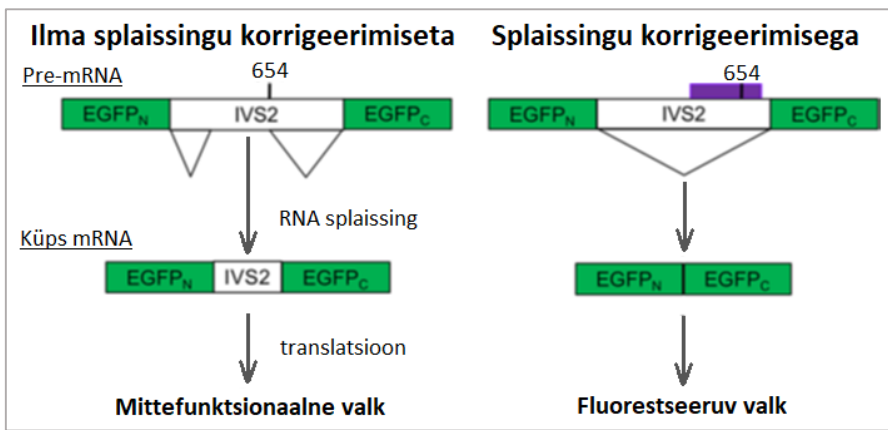
ZetaSizer-iga NP-de suuruse mõõtmise tulemused, esitatud on erineva hüdrodünaamilise diameetriga osakeste osakaal valguse hajuvuse intensiivsuse (vasakpoolsed graafikud) või NP-de massi (parempoolsed graafikud) järgi. Iga graafik kujutab endast ühe katse piires teostatud nelja mõõtmise keskmist tulemust.





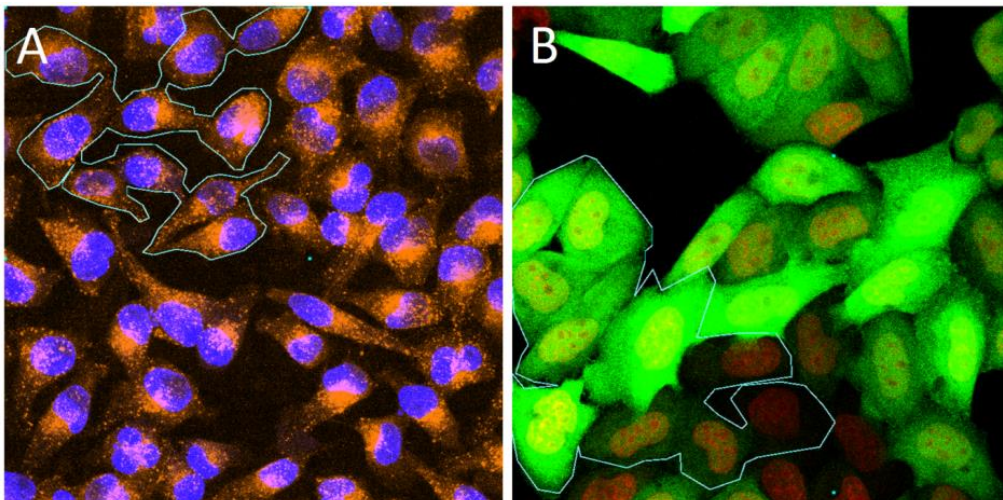
### Lisa 5.

Aberrantne splaissing ja selle korrigeerimine HeLa EGFP 654 rakkudes (“Kole’s assay”). Antud rakuliin sisaldab EGFP geeni, kuhu on sisestatud inimese beeta-globiini 2. intron, mis kannab ühenukleotiidset asendust 654. positsioonis. See asendus põhjustab aberrantset splaissingut, s.t kúpse mRNA sisse jääb introni osa, mille tulemusel sünteesitakse mittefunktsionaalne valk. Juhul kui SCO (lilla) blokeerib aberrantset splaissingut põhjustava piirkonna, kulgeb splaissing normaalselt ning sünteesitakse fluorestseeruv EGFP.

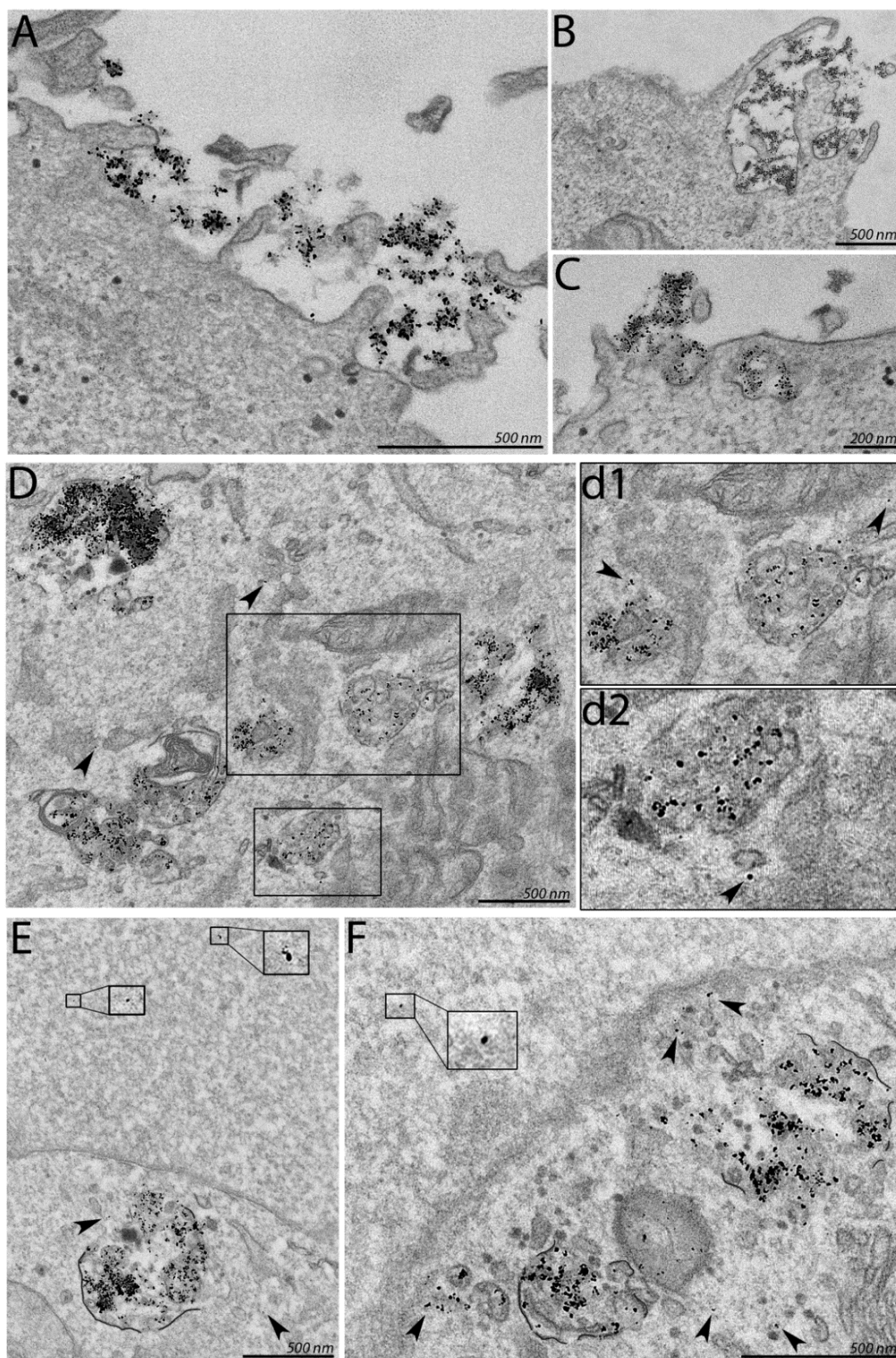


**Lisa 6.**

Cy5 ja EGFP signaali kvantifitseerimine konfokaalmikroskoopia piltidel. Valiti 10 rakku ning jagati parameeter “Sum of voxel intensities” kümnega, et saada keskmine signaali intensiivsus raku kohta. A, HeLa pLuc705 rakud + PF14-SCO-705; B, HeLa EGFP 654 rakud + PF14-SCO-654 + 3 mM Mg<sup>2+</sup>.



## Lisa 7.



**Joonis 35. PF14-SCO-NG-Ca<sup>2+</sup> NP-de internaliseerimise, endosoomidest vabanemise ja rakutuuma sisenemise TEM (transmissioon elektronmikroskoopia) analüüs.** Analüüsiks kasutati nanokullaga (*Nanogold*) märgistatud SCO-d ehk SCO-NG (100 nM). 3 mM Ca<sup>2+</sup> juuresolekul formeeritud PF14-SCO NP-d (MR5) seostuvad plasmamembraaniga (A) ning internaliseeruvad rakkudesse (B, C). Seejärel satuvad NP-d endosoomidesse (D), kust vabanevad endosoomi membraani lõhkudes (d1, d2), nii et vabu NP-sid võib näha ka tsütosoolis (noolepead pildidel D, d1, d2, E ja F), s.h tuumamembraani lähedal (F). 24 t inkubatsiooni järel võib näha ka tuuma sisenenud NP-sid (E, F, suurendatud alad). Rakke inkubeeriti PF14-SCO NP-dega 4 t (A, B, C) ja 24 t (D, E, F). TEM analüüs viidi läbi teiste uurimisrühma liikmete poolt.

## LIHTLITSENTS

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

Mina, Maria Maloverjan,

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

**“Kahevalentsete metalliioonide mõju RPP-vahendatud transfektsioonile ja splaissingu korrigeerimise efektiivsusele SCO poolt”,**

mille juhendaja on Margus Pooga,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **10.06.2023** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Maria Maloverjan

**10.06.2020**