

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
TARTU ÜLIKOOLI MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Evelin Rammul

**pCMV-Luc705 reportersüsteemi
disain ja valideerimine**

Bakalaureusetöö

Juhendajad MSc Kalle Pärn

PhD Kaido Kurrikoff

TARTU 2013

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Geeniteraapia	7
1.2 Viiruslikud geeniteraapiavektorid.....	8
1.3 Mitteviruslikud geeniteraapiavektorid.....	9
1.4 Rakku sisenevad peptiidid	10
1.4.1 Primaarsed amfipaatsed RSP-d	11
1.4.2 Sekundaarsed amfipaatsed RSP-d	11
1.4.3 Mitteamfipaatsed RSP-d.....	11
1.5 Rakku sisenevate peptiidide sisenemismehhanismid	11
1.5.1 Endotsütoos	12
1.5.2 Translokatsioon	13
1.6 Transportaan	14
1.7 PepFect tehnoloogia.....	14
1.7.1 PepFect6	15
1.7.2 PepFect14	15
1.8 Inimese defektsel β -globiinil põhinev reportersüsteem	16
1.9 Splaissingu korrigeerimine ja kliiniline potentsiaal.....	17
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2 Materjalid ja meetodika	18
2.2.1 Kasutatud rakuliinid ja nende kasvatamine	18
2.2.2 Plasmidi disainimine, süntees ja paljundamine	18
2.2.3 Plasmidi kontrollimine geel-elektroforeesiga.....	19
2.2.4 pDNA ja SKO transfektsioon rakkudesse	19
2.2.5 <i>In vivo</i> testimiseks kasutatud hiired.....	19
2.2.6 Hüdrodünaamiline süst.....	20
2.2.7 Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine hiire maksast <i>in vivo</i> imager-iga.....	20
2.3 Tulemused ja arutelu.....	21

2.3.1	Peptiidsete transfektsioonisüsteemide testimiseks sobiva reportersüsteemi valimine ²¹	
2.3.2	pLuc705 plasmidi disain	22
2.3.3	pLuc705 DNA geel-elektroforees ja kvaliteedikontroll	23
2.3.4	Plasmidi testimine <i>in vitro</i> koekultuuri tingimustes	23
2.3.5	Plasmidi testimine <i>in vivo</i>	27
3	KOKKUVÕTE	30
4	SUMMARY	32
5	KASUTATUD KIRJANDUS	34
6	LISAD	39
6.1	LISA 1 Plasmidi pCMV-Luc705 järjestus	39
6.2	Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	43

KASUTATUD LÜHENDID

AH	aminohape
bp	aluspaar (<i>basepair</i>)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium sööde
DMD	Duchenne lihasdüstroofia
FBS	veise looteserum (<i>Fetal bovine serum</i>)
HeLa	Henrietta Lacks'i emakakaelavähi rakkude rakuliin
HIV	inimese immuunpuudulikkuse viirus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
LAR	<i>Luciferase Assay Reagent</i>
LF2000	lipofektamiin, in vitro kasutatav kaubanduslik transfektsioonireagent (<i>LipofectamineTM 2000</i>)
mQ	deioniseeritud vesi
MR	molaarsuhe
NPC	tuumapoori kompleks (<i>nuclear pore complex</i>)
ON	oligonukleotiid (<i>oligonucleotide</i>)
pDNA	plasmiidne DNA
PF	PepFect, transportaan10-1 põhinevad modifitseeritud rakku sisenevad peptiidid
PF14	PepFect14
PF3	PepFect3
PF6	PepFect6
RLU	suhteline valgusühik (<i>relative light unit</i>)
RSP	rakku sisenevad peptiidid (<i>cell penetrating peptide</i>)
SCID	raske kombineeritud immuunpuudulikkus (<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>)
siRNA	väike interfereeriv RNA (<i>small interfering RNA</i>)
SKO	splaissingut korrigeeriv oligonukleotiid (<i>splice correction oligonucleotide</i>)
TP	transportaan
TP10	rakku sisenev peptiid transportaan 10

SISSEJUHATUS

Sajandeid on inimesed keskendunud oma elukvaliteedi parandamisele, mille üheks oluliseks tahuks on meditsiini ja inimese tervise edendamine. Tänapäeval liigub teaduse areng kiires tempos ning uute avastuste tegemine on viinud mitmete ravimeetodite väljatöötamiseni.

Üheks edukamaks suunaks raskete geneetiliste haiguste ja kasvajate raviks on kujunemas geeniteraapia, mis seisneb vigaste geenide parandamises, asendades defektse geneetilise materjali terve ja toimivaga või modifitseerides geeni ekspressioonimäära. Geeniteraapia edukaks läbiviimiseks tuleb vastavad nukleiinhapped toimetada sihtmärgiks olevate rakkudeni ning sealt edasi ka rakkudesse. Geneetilise materjali sisenemisel rakkudesse esineb mitmeid takistusi. Rakku ümbritseb fosfolipiidne kaksikkiht, mis takistab suurte biomolekulide difusiooni raku sisekeskkonda. Lisaks on nukleiinhapped negatiivse laenguga ja hüdrofiilse loomuga, mistõttu ei pääse nad iseseisvalt rakkudesse.

Sellest tulenevalt on nende molekulide rakkudesse viimiseks väljatöötatud mitmeid transpordivektoreid. Laias laastus jagunevad transpordivektorid kaheks: viiruslikud ja mitteviiruslikud transpordivektorid. Viiruslike transpordivektorite kasuks räägib efektiivne rakkudesse sisenemine ja suhteliselt kõrge ekspressiooni tase, siiski esineb viirusvektoritel ka mitmeid negatiivseid külgi: viiruste ettearvamatus ja toksilisus. Uueks suunaks on kujunemas mitteviiruslike transpordivektorite väljatöötamine, mis pole rakkudele nii ohtlikud, kuid samas on ka transfektsiooni tase oluliselt madalam.

Käesoleval ajal on geneetilise materjali rakku toimetamiseks hakatud uurima rakku sisenevaid peptiide (RSP). Need on lühikesed 5-30 aminohappe (AH) pikkused, enamasti positiivse laenguga, ühendid. Siiski on nende ühendite kasutamisel veel mitmeid lahendamata probleeme ja RSP-del põhinevate ravimite väljatöötamiseks tuleb läbi viia veel mitmeid uuringuid.

Antud bakalaureusetöö eesmärkideks on:

1. Analüüsida erinevate ekspressioonivektorite omadusi ning valida välja sobiv ekspressioonivektor, mida kasutada rakku sisenevate peptiidide uuringutes.
2. Disainida eelnevalt RSP-de uuringuteks väljavalitud vajaminev vektorsüsteem.
3. Viia läbi kontroll tellitud ja minu poolt disainitud vektorsüsteemi korrektsuse üle.
4. Testida vektorsüsteemi efektiivsust *in vitro*, kasutades transfekterimiseks PF3, PF6 ja PF14 abi.
5. Pikemas perspektiivis kasutada uuritavat vektorit *in vivo* katsetes.

Käesolev bakalaureusetöö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi geenitehnoloogia õppekava raames, eksperimentaalne osa on läbi viidud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis. Erilised tänud juhendajatele: Kalle Pärn ja Kaido Kurrikoff, kes on kaasa aidanud käesoleva töö valmimisele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Geeniteraapia

Inimese genoomis on avastatud ja katalogiseeritud üle 5000 haiguseid põhjustava päriliku tunnuse, millest enamus on tingitud looduslikest geenimutatsioonidest (Heinaru, 2012). Tänapäeval on tõusval teel pärilike haiguste ravimiseks geeniteraapia, mis põhineb ühe muteerunud geeni (monogeenne geeniteraapia) või geenide klastrite (polügeenne geeniteraapia) asendamisel funktsionaalse geeni või geeniklastriga (Patil et al., 2012). Geeniteraapiat on edukalt kasutatud patsientidel, kes kannatavad raske kombineeritud immuunpuudulikkuse sündroomi all (X-SCID ja ADA-puudulikkus) või Leberi kaasasündinud amauroos'i (retinaalse düstroofia üks raskemaid vorme, mis põhjustab raskeid nägemiskahjustusi või pimedaks jäämist juba looteas või lapse esimestel elukuudel) käes. Samuti on geeniteraapia kasutamine olnud edukas ka hemofiilia ja β -talasseemia ravimisel (Jazwa et al., 2013).

Üheks heaks näiteks terapeutiliste vektorite vallas on 2012. aastal Euroopa Liidus turule lubatud esimene terapeutiline vektor Glybera, mida kasutatakse lipoproteiin lipaasi puudulikkuse raviks (Ylä-Herttua, 2012). Glybera on viraalne vektor ning pakub leevendust patsientidele, kelle organism ei suuda rasvade lõhustamiseks piisavalt ensüüme toota. Kuigi antud ravim näitab üles suurt potentsiaali, leidub siiski veel mitmeid probleeme, millele tuleb leida lahendus, et geeniteraapia oleks ohutum, efektiivsem ja patsientidele kättesaadavam (Ylä-Herttua, 2012).

Geneetilise materjali toimetamisel eukarüootsetesse rakkudesse ohutul ja efektiivsel meetodil on püsivalt suurimaks probleemiks molekulide transportimine. Peamiseks väljakutseks molekulide transpordil on rakku ümbritsev fosfolipiidne kaksikkiht koos selles asuvate regulaatorvalkudega, mis takistab kõikide suurte biomolekulide difusiooni raku sisekeskkonda. Lisaks eelnevale, leidub nukleiinhapete transportimisel veel mitmeid olulisi takistusi ka organismi tasemel, näiteks lagundatakse nukleiinhapped vereplasmas või tsütoplasmas väga kiiresti (Wang et al., 2013).

Kõige tavalisem geeniteraapias kasutatav vektor on bakteriaalse päritoluga DNA rõngasmolekul (Zhang et al., 2012). Sellesse sisestatakse rekombinantse DNA tehnoloogiat kasutades efektorgeen ja eukarüootses raku paljunemiseks vajalik promooterjärjestus, mis seejärel viiakse geeni sisaldav pDNA raku tuuma, kus paiknevad replikatsiooniks ning transkriptsiooniks vajalikud ensüümid. Kahjuks on aga plasmiidse DNA kasutamisel

peamiseks probleemiks asjaolu, et tegemist on negatiivset laengut kandva makromolekuliga, mistõttu ei ole see suuteline iseseisvalt rakkudesse sisenema.

Seega võib väita, et geeniteraapia edu või ebaedu sõltub suuresti geneetilise materjali transportimise efektiivsusest. Selleks, et *in vitro* pDNA edukalt rakku toimetada on loodud mitmeid erinevaid transportvektor-süsteeme, mida saab üldjoontes jaotada kaheks: viiruslikud ja mitteviiruslikud vektorid (Wang et al., 2013). Mõlemal meetodil on omad plussid ja miinused.

1.2 Viiruslikud geeniteraapiavektorid

Viirused on kujunenud efektiivseteks vahenditeks transportimaks geneetilist materjali erinevatesse rakkudesse, kuna nad suudavad mööda minna peremeesrakkude kaitsemehhanismidest ning replitseeruda kiiresti ja suures hulgas. Viirused on leidnud ka edukat kasutamist geeniteraapias, mistõttu on nad ühed enimuuritud ja -kasutatud vektorid selles valdkonnas. Vektoritena on laboratoorselt uuritud ja modifitseeritud retroviiruseid, adenoviiruseid, adeno-assotsieerunud viiruseid (AAV), herpes simplex viiruseid ja paljusid teisi viiruseid (Patil et al., 2012).

Sageli kasutatakse geenide transfekteerimisel viirusel põhinevate replikonvektorite abi, mille puhul eraldatakse viiruse genoomist struktuurseid valke kodeeriv järjestus, et see transportitava geeniga asendada. Paljunemiseks vajaminevad viraalsed järjestused jäetakse terviklikuks.

Viiruslikud geeniteraapiavektorid tagavad suurema transduktsiooni efektiivsuse ja tekitavad pikaajalisema geeniekspressiooni, siiski on nende vektorite kasutamisel ka mõned miinused (Wang et al., 2013). Kasutatava terapeutilise geeni suurus on piiratud, kuna viirused on võrdlemisi väikse genoomiga. Sellest tulenevalt saab viiruste kapsiidi pakkida ainult võrdlemisi väikeses koguses genoomset materjali. Negatiivseks küljeks on ka viiruste ettearvamatus: viiruslik materjal võib rakus integreeruda kromosomaalse DNA juhuslikku piirkonda, mis võib organismile kaasa tuua kahjulikud muutused nagu geeni muteerumise, kantserogeneesi või tumorigeneesi. Samuti võib viirusvektorite kasutamine esile kutsuda peremeesorganismis immuunvastuse (Thompson, 2000). Viirusvektorite kasutamisega seotud probleemidest võiks veel välja tuua asjaolu, et osad viirusvektorid võivad mõjuda peremeesrakule letaalselt, nende tootmine on tihtipeale kulukas ja viirustega tegelevad inimesed peavad omama asjakohast väljaõpet.

1.3 Mitteviiruslikud geeniteraapiavektorid

Alternatiivseks meetodiks nukleiinhapete transportimisel raku on mitteviiruslikud geeniteraapiavektorid ja -meetodid. Mitteviiruslike vektorite kasutusele võtmise poolt räägivad mitmed tegurid. Esiteks on geneetilise materjali raku toimetamine ohutum ja üldjuhul vähem toksilisem, kutsudes peremeesrakus esile minimaalse immuunvastuse (Wang et al., 2013). Teiseks saab nende abil raku toimetada suuremal hulgal geneetilist materjali kui viiruslike vektoritega. Positiivne on ka asjaolu, et mitteviiruslike transportvektoreid on üldjuhul lihtsam valmistada.

Mitteviiruslikud transpordimeetodid jagunevad kaheks: füüsikalisteks meetoditeks ja keemilisteks meetoditeks (Wang et al., 2013). Füüsikaliste meetodite alla kuuluvad geenipüstoli kasutamine, mikroinjektsioon (Ansorge, 1982), elektroporatsioon (Shigekawa and Dower, 1988) ja sonoporatsioon (raku ultrahelitöötlus) (Pan et al., 2004). Eelnevad meetodid võimaldavad rakumembraani muuta lühiajaliselt läbilaskvaks, võimaldades seeläbi DNA-l raku siseneda. Füüsikalised meetodid on *in vitro* tingimustes suhteliselt efektiivsed, siiski puudub neil kliiniline perspektiiv, kuna üldjuhul on nad kas liiga aeganõudvad või mõjuvad suurele hulgale rakkudele letaalselt. Seetõttu keskendutakse tänapäeval rohkem keemiliste mitteviiruslike vektorite arendamisele (Wang et al., 2013).

Keemiliste meetodite puhul kasutatakse lastmolekuli transpordiks erinevate keemiliste molekulide abi. Nende alla kuuluvad näiteks sünteetilised ja looduslikud katioonsed lipiidid ja katioonsed polümeerid (Zhang et al., 2004). Nende meetoditega pakitakse DNA ja RNA nii, et moodustuks positiivse pinnalaenguga ühend, mida oleks rakul kergem endotsütoosi teel omastada (raku pinna anioonsete aladega laeng-laeng interaktsioonide abil). Peale endotsütoosi peavad vektorsüsteemid endosoomidest vabanema enne, kui endosoomid saavad küpseteks ja sulanduvad lüsoosoomidega. Vastasel juhul lagundatakse sisseviidud geneetiline materjal lüsoosoomi hüdrolyütiliste ensüümide poolt (Xu and Szoka, 1996). Kui vektorsüsteemid on endosoomidest vabanenud, algab liikumine rakutuuma, kus leiab aset transkriptsioon. Ka rakutuuma liikumisel on mitmeid takistusi. Üheks neist on DNA lagundamine tsütoplasma nukleaasidega. Teiseks takistuseks on tuumaümbris, mis tuleb geneetilisel materjalil läbida kas sisenedes läbi tuumapoori kompleksi (*NPC*) või mitoosi ajal seondudes kromatiiniga (Bastos et al., 1995).

Vaatamata edusammudele tehnika arengus ja vektorsüsteemide disainimise ja mõistmise edendamisel, on mitteviiruslike vektorsüsteemide loomisel veel mitmeid lünki. Jätkuvalt on mitteviiruslike vektorite kasutamisel põhilisteks negatiivseteks külgedeks madal

transfektsiooni ja geeniekspressiooni tase ning mõne reagenti puhul ka mõningane toksilisus, mis muudab nende potentsiaalse *in vivo* rakenduse võimatuks.

1.4 Rakku sisenevad peptiidid

Bioaktiivsete ainete rakku transportimisel võib esineda mitmeid takistusi: esmalt peavad transporditavad ühendid suutma vältida lüsomaatilist degradatsiooni, lisaks tuleb rakku liikumise käigus ületada plasmamembraan ja ka tuumamembraan (ühenditel, mis transporditakse tuuma) (Gautam et al., 2013). Kuna eelpool nimetatud transpordimeetoditel on kõigil omad puudused, on vajalik pidevalt välja arendada uudseid lähenemisi geenitranspordile. Üheks selliseks lähenemiseks on kujunenud bioloogiliste ühendite transport paljulubavate bioloogiliste ühendite – rakku sisenevate peptiidide (RSP) abil (Morris et al., 2008). Erinevalt mitmest eelnevalt nimetatud meetodist on RSP-del märkimisväärne omadus siseneda rakkudesse rakke füüsiliselt kahjustamata. Seni ei ole nende puhul täheldatud ka märkimisväärset immuunvastuse teket. Lisaks sellele, et RSP-d on võimelised läbima bioloogilisi membraane iseseisvalt, on nad suutelised transportima endaga erinevaid lastmolekule, mis iseseisvalt rakkudesse siseneda ei suuda: peptiide, proteiine, oligonukleotiide, nanopartikleid, liposoomi jne. (Madani et al., 2011). Samuti on RSP-de heaks omaduseks see, et paljud peptiidide poolt rakku transporditud ühendid säilitavad oma bioloogilise aktiivsuse, tehes RSP-dest väga paljulubava vektorsüsteemi, mida saab potentsiaalselt kasutada nii geeni- kui ka ravimiteraapias (Fonseca et al., 2009).

Rakku sisenevad peptiidid on 5-30 aminohappe pikkused peptiidid ühendid. Esimene RSP avastati 1988. aastal kui näidati, et inimese immuunpuudulikkust põhjustava viiruse (HIV) transaktivatsiooni valgu domäänist eraldatud Tat-peptiid suudab läbida biomembraane ning seejärel jõuda rakutuuma (Green and Loewenstein, 1988). Järgnevatel aastatel leiti, et äädikakärbse (*Drosophila melanogaster*) transkriptsioonifaktori Antennapedia homeodomään on ka võimeline penetreeruma läbi rakumembraani näiliselt endotsütoosist sõltumatult. See avastus viis 16-aminohappelise peptiidi – penetratiin avastamiseni. Järgmised suuremad läbimurded RSP-de valdkonnas tehti Langeli (Pooga et al., 1998a) ja Dowdy (Schwarze et al., 1999) töögruppide poolt, kes näitasid, et rakku sisenevaid peptiide saab rakendada peptiidsete nukleinihapete, väikeste peptiidide ja suurte valkude rakkudesse toimetamiseks ka *in vivo* süsteemides.

RSP-sid võib klassifitseerida mitmeti. Üheks võimaluseks on kasutada jaotust, mis tugineb rakku sisenevate peptiide peptiidisel järjestusel ja nende interaktsioonidel kunstlike

membraanidega. RSP-d jagunevad: primaarsed amfipaatsed RSP-d, sekundaarsed amfipaatsed RPS-d ja mitteamfipaatsed RSP-d (Ziegler, 2008).

1.4.1 Primaarsed amfipaatsed RSP-d

Primaarsed amfipaatsed peptiidid sisaldavad tavaliselt üle 20 aminohappejäägi. Nende alla kuuluvad näiteks transportaan, transportaan 10 (TP10), PepFect14. Primaarsetes amfipaatses molekulis on eristunud nii hüdrofoobsed kui ka hüdrofiilsed osad ning oma primaarstruktuuris sisaldavad nad järjest hüdrofoobseid ja katioonseid domeene. Interaktsioonid lipiididega on enamasti hüdrofoobsed, kuna primaarsed amfipaatsed RSP-d seonduvad kõrge amfipaatsusega nii neutraalsete kui ka anioonsete omadustega lipiidsete membraanidega (Fernández-Carneado et al., 2004; Ziegler, 2008).

1.4.2 Sekundaarsed amfipaatsed RSP-d

Sekundaarsete amfipaatsete RSP-de amfipaatsus avaldub alles pärast membraani pinnamolekulidega seostumist, kui tekivad sekundaarstruktuurid. Seondues membraanidega omandavad need peptiidid alfa-heeliksi või beeta-lehe konformatsiooni. Sekundaarsed amfipaatsed RSP-d on näiteks penetratiin, MAP, CADY, pVEC (Fernández-Carneado et al., 2004; Ziegler, 2008).

1.4.3 Mitteamfipaatsed RSP-d

Mitteamfipaatsete RSP-de esindajad on pTat ja oligoarginiinid. Mitteamfipaatsed RSP-d koosnevad suures enamuses katioonsetest aminohapetest (nt. arginiin ja lüsiin) ning nad on kõige lühemad rakku sisenevad peptiidid. Sellesse gruppi kuuluvad RSP-d on tugeva positiivse laenguga, seetõttu seonduvad nad lipiidsete membraanidega ainult siis, kui membraan sisaldab suurel määral anioonseid lipiide (Ziegler, 2008).

1.5 Rakku sisenevate peptiidide sisenemismehhanismid

Kuigi rakku sisenevaid peptiide on uuritud juba mõnda aega, ei olda siiski päris kindlad selles, milliseid bioloogilisi või mittebioloogilisi radu RSP-d rakku pääsemiseks kasutavad. Rakku sisenemine sõltub mitmetest parameetritest: rakkudest, transporditavast molekulist ja

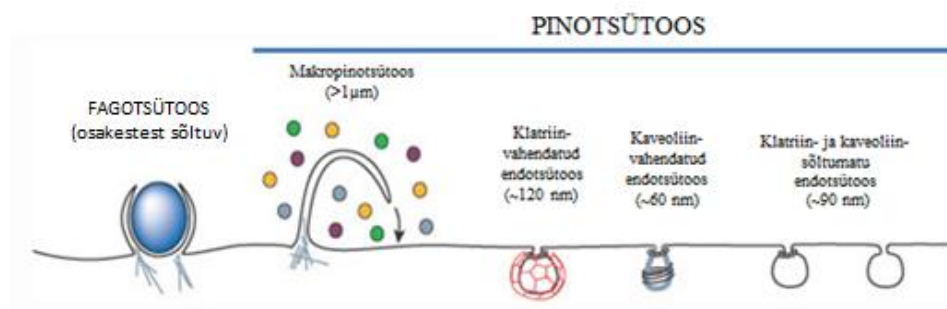
selle sidumismeetodist, temperatuurist, konkreetselt kasutatava RSP omadustest, kontsentratsioonist, jne. (Morris et al., 2008).

Arvatakse, et peamisteks meetoditeks RSP-de rakku sisenemisel võivad olla erinevad endotsütoosi rajad, mis sõltuvad energiast, kuid on ka andmeid, et osad peptiidid on võimelised sisenema rakku otse läbi plasmamembraani, mida nimetatakse kas translokatsiooniks või penetratsiooniks (Zorko and Langel, 2005). On näidatud, et lastmolekuli suurus võib mõjutada seda, kas RSP siseneb rakku endotsütoosi või otsese translokatsiooni teel (Tünnemann et al., 2006). Vähendades rakku viidava molekuli suurust võib penetreerumine toimuda pigem translokatsiooni teel. Peamine erinevus translokatsiooni ja endotsütoosi radade vahel on see, et peale RSP-de otsest membraani läbimist satub peptiid kohe tsütoplasmasse ja saab hakata täitma oma eesmärki. Endotsütoosi läbinud molekulid võivad aga kinni jääda vesiikulitesse, millest vabanemine tsütosooli on omaette keeruline protsess (Patel et al., 2007; Xu and Szoka, 1996).

1.5.1 Endotsütoos

Endotsütoos on energiast sõltuv spetsiaalne transpordiviis, millega sisenevad rakku makromolekulid ja mittelahustuvad ained. Eelnimetatud ained sisenevad plasmamembraani sissesopistumisel ja neelatakse rakku. Endotsütoos on oluline raku normaalseks elutegevuseks: ainevahetuseks, arenguks, immuunreaktsioonideks, rakkudevaheliseks kommunikatsiooniks, signaali edastamiseks jne. (Conner and Schmid, 2003). Endotsütoosirajad jagunevad: fagotsütoos ja pinotsütoos. (Joonis 1) Fagotsütoosi kasutatakse suuremate molekulide omastamiseks, moodustunud vesiikulite läbimõõt on tavaliselt üle 250 nm. Fagotsütoos ilmneb spetsialiseerunud rakkudel nagu näiteks makrofaagidel ja leukotsüütidel.

Pinotsütoosi kasutavad enamik eukarüootsetest rakkudest vedelike ja lahustunud ainete kätte saamiseks. Pinotsütoos esineb kõikidel rakutüüpidel ja jaguneb veel omakorda: makropinotsütoos, klatriin-sõltuv, kaveoliin-sõltuv ja klatriin- ning kaveoliin-sõltumatu endotsütoos (Patel et al., 2007). Pinotsütoosi käigus moodustunud vesiikulid ehk pinosoomid on tunduvalt väiksemate mõõtmetega, varieerudes 60 nm kuni 1 μm -ni (Conner and Schmid, 2003). Kõiki eelnevaid endotsütoosi radade kasutamist on täheldatud RSP-de sisenemisel rakkudesse (Patel et al., 2007).

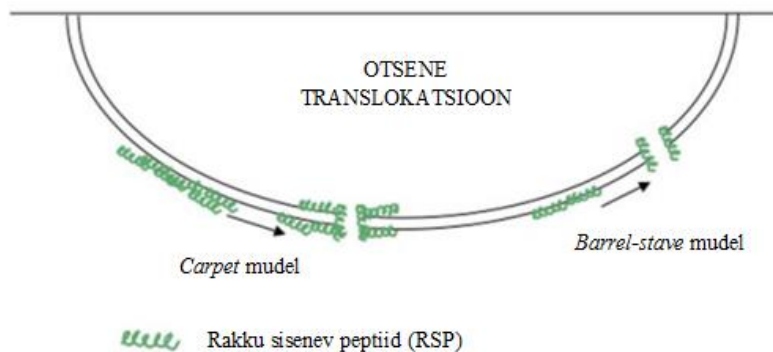


Joonis 1 Endotsütoosi liigid. Endotsütoos on energiast sõltuv spetsiaalne transpordi viis, mille abil sisenevad raku makromolekulid ja mittelahustuvad ained. (Conner and Schmid, 2003)

1.5.2 Translokatsioon

Kuigi enamus uurimused RSP-de raku sisenemise mehhanismide valdkonnas on toimunud endotsütoosi radade ümber, on veidike tähelepanu koondunud ka translokatsiooni uurimisele. Välja on pakutud kaks hüpoteetilist mudelit: esiteks otsene membraani penetratsioon ja teiseks pööratud mitselli mudel. Mõlemad mudelid koosnevad kolmest etapist: Seandumine membraaniga, membraani läbimine, RSP-de vabastamine tsütosooli (Patel et al., 2007). Otsese penetratsiooni mudel põhineb avastusel, mille kohaselt *Tat-fusion* valk, omades kõrget energiat ja olles denatureerunud olekus, suudab seonduda elektrostaatiliselt raku pinnaga ning seejärel penetreeruda tsütosooli, millele järgneb *chaperonide* abiga valgu taas kokkupanemine (Nagahara et al., 1998; Patel et al., 2007).

Pööratud mitselli mudel põhineb membraani destabiliseerimisel. Moodustunud mitsellides püsivad peptiidid hüdrofiilses keskkonnas kuni nende interaktsioonid membraaniga destabiliseerivad mitselli ning RSP vabaneb tsütoplasmasse (Trabulo et al., 2010). Lisaks on pakutud, et RSP-d võivad siseneda raku hetkeliste pooride moodustumise läbi. Arvatakse, et membraani häirimine aitab kaasa peptiidide liikumisele läbi membraani. Sellise mehhanismi mudeliteks on *carpet*-mudel ja *barrel-stave*-mudel (Stewart et al., 2008). (Joonis 2)



Joonis 2 RSP-de sisenemiseks rakkudesse on üheks võimaluseks otsene translokatsioon, mille ühtedeks alaliikideks on *carpet* ja *barrel-stave* mudelid. (Stewart et al., 2008)

1.6 Transportaan

Transportaan on 27 aminohappe pikkune kimäärne rakku sisenev peptiid. See amfipaatne ühend on üks esimestest sünteesitud RSP-dest (Pourmoussa et al., 2013). Transportaani eellasmolekul on galparaan, mis koosneb kahest komponendist. Üheks komponendiks on neuropeptiid galaniinist, mis asub ühendi aminoterminaaalses osas ja on kolmeteistkümne aminohappe pikkune. Teiseks komponendiks on karboksüterminaaalses osas asuv algselt herilase mürgist eraldatud mastoparaan, mis on neljateistkümne aminohappe pikkune (Pooga et al., 1998a). Uurides galparaani sünteesiti tema analoog, milles leiduva galaniini osas 13ndas positsioonis olev proliin asendati lüsiiniga, sellest sai ka peptiidi funktsionaalne, lasti siduv osa. Saadud kimäärsel peptiidil oli suur potentsiaal transportida rakku hüdrofiilseid molekule (Pooga et al., 1998b). Transportaani avastamine oli suureks edusammuks RSP-de uurimustöös. Siiski esinesid transportaani kasutamisega ka mõningad probleemid, nende uurimiseks sünteesiti kolm seeriat transportaani analooge, mille hulgast edukaimaks osutus transportaan 10 (Soomets et al., 2000).

1.7 PepFect tehnoloogia

PepFect-id on uudne rakku sisenevate peptiidide generatsioon. Need on keemiliselt modifitseeritud RSP-d, mille eesmärgiks on läbi transfektsiooni efektiivsemaks muutmise suurendada rakku transportitavate oligonukleotiidide ja plasmiidide hulka. Samuti võimaldavad PepFect klassi peptiidid muuta transfektsiooni vähem töömahukaks ja odavamaks, kuna rakku sisenemisel kasutavad PepFect klassi peptiidid mittekovalentse

kompleksi strateegiat, mis võimaldab kovalentse sidumisega võrreldes palju suuremat paindlikkust.

PepFectid on välja arenenud transportaan 10st (TP10), mis on näidanud efektiivset plasmiidse DNA transporti mitmetes *in vitro* rakuliinides (Ezzat et al., 2012). TP10 sisaldab 21 aminohapet ja on positiivselt laetud rakku sisenev peptiid.

Esimene PepFect töötati välja transportaan 10-le N-terminaalsesse otsa stearüülrühma lisamisel, sellise modifikatsiooniga peptiidi hakati nimetama PepFect3-ks (PF3). On näidatud, et stearüülrühma lisamine peptiidi järjestusse soodustab hüdrofoobseid interaktsioone membraanidega ning tagab peptiidi efektiivsema liikumise läbi plasmamembraani, tuues endaga kaasa tõusu oligonukleotiidide transfektsiooni efektiivsuses (Mäe et al., 2009).

PF3-e on kasutatud mudeliks, mille põhjal on välja arendatud mitmeid teisi PepFect-e (PF4, PF6, PF14). Eelnevalt on näidatud, et PF peptiidid on efektiivsed, mittetoksilised ja mitteimmunogeensed vektorid nukleiinhapete rakku toimetamiseks nii *in vitro* kui ka *in vivo* katsetes ja omavad paljutõotavat perspektiivi tuleviku ravimeetodite väljatöötamisel (Andaloussi et al., 2011a; Suhorutsenko et al., 2011).

1.7.1 PepFect6


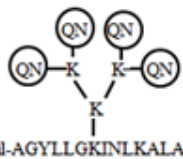
PF6 on TP10 modifikatsioon, millele on lisaks stearüülhappele lisatud ka trifluorometüülkinoon (klorokviini analoog), mis seob prootoneid ja hõlbustab endosoomist vabanemist (Andaloussi et al., 2011b). PepFect 6 eesmärgiks oli välja töötada peptiidil põhinev kandja spetsiifiliselt siRNA transportimiseks (Andaloussi et al., 2011b).

1.7.2 PepFect14

PepFect14 on rakku sisenev peptiid, mis on stearüül-transportaan10 (stearüül-TP10) modifitseeritud vorm, milles positiivse laengu saamiseks on leutsiinid asendatud isoleutiiniga ja lüsiinid on asendatud ornitiinidega (Ezzat et al., 2011). PF14 on algselt splaissingut korrigeerivate oligonukleotiidide (SKO) transpordiks loodud RSP. Lüsiinide asendamine ornitiinidega on andnud tulemusi, mille kohaselt mõnes rakuliinis on transfektsiooni efektiivsus tõusnud kuni 10 korda (Ramsay and Gumbleton, 2002). Ornitiin, kui mittestandardne aminohape, on seerumis olevatele proteaasidele vähem äratuntav. Seetõttu suudab PF14 seerumi valkude juuresolekul säilitada suurema aktiivsuse. Samuti on ornitiin DNA suhtes affiinsed, võimaldades tihedamate nanokomplekside moodustamist ja tagades seeläbi tekkivate nanokomplekside suurema stabiilsuse madalamatel laengusuhetel (Ezzat et

al., 2011). Kui algselt disainiti PF14 SKO-de transpordiks rakku, siis nüüdseks on tõestatud, et nende abil saab rakku transportida ka pDNA-d. PF14 moodustab negatiivse laenguga pDNA-ga 130-170 nm suuruseid stabiilseid nanopartikleid. Need nanopartiklid hõlbustavad geeni transportimist ja ekspressiooni mitmetes rakuliinides. Uurimused näitavad, et PF14 kasutab rakku sisenemiseks A klassi *scavenger retseptoreid* ja kaveoolide vahendatud endotsütoosi (Veiman et al., 2013).

Tabel 1 Transportaan ja tema derivaadid

NIMETUS	JARJESTUS	AH PIKKUS
TP	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	27
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	21
steariinhape		
Steariül-TP10 ehk PF3	steariül-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	21
PF6	 steariül-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	
PF14	steariül-AGYLLGKLLLOOLAAAALLOLL-NH ₂	21

1.8 Inimese defektsel β -globiinil põhinev reportersüsteem

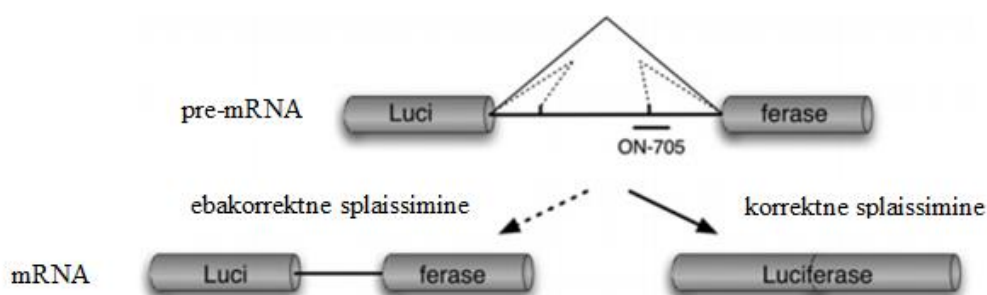
Inimese beetaglobiin on geen, mis asub 11-nda kromosoomi lühikeses õlas inimese β -globiini lookuses. β -globiin koos α -globiiniga moodustavad hemoglobiini valgu. Mutantne beetaglobiin põhjustab punaste vereliblede kahjustumist (Levings and Bungert, 2002).

β -globiini translatsioon toimub ribosoomides, mis koosnevad 3-5 RNA molekulist. Ribosoomides transleeritavaid RNA molekule nimetatakse informatsiooni-RNA-deks ehk mRNA-deks (messenger RNA). Prokarüootidel on geeni poolt määratav esmane transkript võrdne mRNA-ga ta on ka kohe transleeritav, eukarüootides toimub aga esmalt eellas- ehk pre-mRNA süntees, seejärel toimub nn. eellas-mRNA protsessing küpseks mRNA molekuliks. Enamikus eukarüootsetes geenides on mittekodeerivad järjestused ehk intronid, mis lõigatakse RNA protsessingul RNA-st välja, ühendades sellega RNA-s geeni kodeerivad järjestused ehk eksonid (Heinaru, 2012).

Beeta-talasseemia on autosomaalne retsessiivselt päranduv haigus, mille korral sünteesitakse hemoglobiini vähe ja selle tagajärjel tekib hüpokroomne aneemia (Grünberg ja Mikkel, 2006).

See haigus on enamasti põhjustatud ühenukleotiidsel mutatsioonil inimese beetaglobiini geeni intronis, mille tagajärjel toimub viga splaissingus (Virus et al., 2011).

Alternatiivse splaissingu uurimiseks on mudelina loodud HeLa pLuc705 rakuliin. See sisaldab lutsiferaasi geeni, mis sisaldab defektset inimese β -globiini intronit. Eelnimetatud mutatsioon intronis põhjustab ebakorrektselt splaissingut lutsiferaasi pre-mRNA-s ning selletõttu lutsiferaasi translatsiooni ei toimu. Viies defektsetesse rakkudes SKO (splaissingut korrigeerivad oligonukleotiidid) oligoribonukleotiid ON-705 parandatakse splaissingut ja toodetakse õiget mRNA-d, misjärel toimub translatsioon ja ekspresseeritakse funktsionaalne lutsiferaasi valk (Kang et al., 1998). (Joonis 3)



Joonis 3 Splaissingu korrigeerimine ON-705-ga. Reportersüsteem, mis on loodud selleks, et uurida splaissingut. Lutsiferaasi geen, mis on katkestatud mutatsiooniga inimese beetaglobiini intronis, mille tagajärjel toimub ebakorrektsne splaissimine. Viies defektsetesse geeni SKO-d parandatakse splaissingut ja sünteesitakse õiget RNA-d. (Guterstam et al., 2008)

1.9 Splaissingu korrigeerimine ja kliiniline potentsiaal

Mitmed geneetilised haigused ja vähiliigid on seostatud mutatsioonidega, mis tekivad ebakorrektselt alternatiivse splaissimise teel (Ezzat et al., 2011). Üheks näiteks on Duchenne lihasküstroofia (DMD) – neuromuskulaarne haigus, mis on põhjustatud mutatsioonist düstrofiini geenis. Samuti on vigasest splaissimisest põhjustatud ka β -talasseemia ja tsüstiline fibroos (Sazani and Kole, 2003).

SKO-d omavad eelnevate haiguste ravis ja vigasest splaissingust põhjustatud häirete leevendamises suurt potentsiaali. SKO-de eesmärk on kasutada neid mutatsioonide (mis põhjustavad vigast splaissimist) mahasurumiseks. Sellest tulenevalt peaks taastuma korrektne splaissimine ja defektse geeni korrapärane töö (Ezzat et al., 2011).

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud bakalaureusetöö eesmärkideks on:

1. Analüüsida erinevate ekpressioonivektorite omadusi ning valida välja sobiv ekpressioonivektor, mida kasutada rakku sisenevate peptiidide uuringutes.
2. Disainida eelnevalt RSP-de uuringuteks väljavalitud vajaminev vektorsüsteem.
3. Viia läbi kontroll tellitud ja minu poolt disainitud vektorsüsteemi korrektsuse üle.
4. Testida vektorsüsteemi efektiivsust *in vitro*, kasutades transfekteamiseks PF3, PF6 ja PF14 abi.
5. Pikemas perspektiivis kasutada uuritavat vektorit *in vivo* katsetes.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Kasutatud rakuliinid ja nende kasvatamine

Katseteks kasutati HeLa (emakaela kasvajakud) ja HeLa pLuc705 (stabiilselt defektse introniga lutsiferaasi sisaldav rakuliin) rakuliine. Rakke kasvatati DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) söötmes, millesse oli lisatud 10 % veise loote seerumit (FBS), 0,1 mmol/L asendatavaid aminohappeid, 1,0 mmol/L naatriumpüruvaati, 100 IU/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. Rakke kasvatati 5% CO₂ keskkonnas veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37 °C ja neid külvati ümber 2-3 päeva järel.

2.2.2 Plasmidi disainimine, süntees ja paljundamine

pCMV-Luc705 plasmidi disainimiseks kasutati programmi Clone Manager 5. Loodud järjestus sünteesiti ettevõtte Genewiz (USA) poolt ning paigutati nende poolt pakutavasse ampitsilliini resistentsusgeeni sisaldavasse bakteriaalsesse paljundusvektorisse. Plasmidi paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* tüve XL-10. Rakke kasvatati 37°C juures LB söötmes (10 g/l bakto-trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 10 g/l NaCl), kuhu lisati kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml. Plasmiidne DNA eraldati bakterirakkudest kasutades FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini kit-i (Favorgen Biotech Corp.) ning NucleoBond® Xtra Midi Endofree kit-i (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG).

2.2.3 Plasmidi kontrollimine geel-elektroforeesiga

DNA ahela pikkuse korrektsust kontrolliti DNA geel-elektroforeesiga. Forees viidi läbi 0,8% agarosgeelil TAE puhvril. Kontrollrestriksiooniks kasutati FastDigest XhoI ensüümi (*Thermo Scientific*), markeriks kasutati GeneRuler 1kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*).

2.2.4 pDNA ja SKO transfektsioon rakkudesse

Rakke transfekteriti kasutades Lipofectamine 2000 reagenti ja PepFect peptiide (PF3, PF6, PF14). Päev enne katse algust külvati rakud 24-kaevulisse plaati, tihedusega 5×10^4 rakku kaevu kohta. Katsed tehti seerumit sisaldavas DMEM täissöötmes. pDNA transfektsioon HeLa rakkudesse Lipofectamine 2000-ga viidi läbi kasutades tootjapoolseid juhiseid. SKO (5'-CCU CUU ACC UCA GUU ACA-3') transfektsiooniks HeLa ja HeLa pLuc705 rakkudesse kasutati SKO ja peptiidi vahelist molaarsuste suhet 1:5. Transfektsioon toimus 4 tundi peale pDNA transfektsiooni. Esmalt segati kokku transfektsioonikompleksid SKO-st, peptiidist ja veest ruumalas 50 μ l/well. Saadud segu inkubeeriti toatemperatuuril üks tund, peale mida kanti segu rakkudele, millele oli eelnevalt lisatud 450 μ l söödet. Peale SKO transfektsiooni inkubeeriti rakke 24 tundi, peale mida eemaldati sööde ja rakud lüüsi, lisades 100 μ l 1xReporter Lysis Buffer (Promega) ja inkubeerides toatemperatuuril 30 minutit. Lutsiferaasi aktiivsust mõõdeti kasutades GLOMAX 96 mikroplaat luminomeetrit (Promega). Selleks lisati 20 μ l rakulüsaati valgele 96-kaevulisele plaadile (Greiner Bio One) ja seejärel 100 μ l *Luciferase Assay Reagent*'i (Promega). Saadud tulemusi analüüsiti tabelitöötlusprogrammiga Excel (Microsoft).

2.2.5 *In vivo* testimiseks kasutatud hiired

In vivo katseteks kasutati Balb/c (Harlan) isaseid hiiri. Eksperimendi alguseks olid hiired 8-14 nädala vanused. Hiiri hoiti kontrollitud temperatuuriga ruumis (20-22°C), neile oli tagatud 12 tunnine valguse-pimeduse tsükkel (7.00 - 19.00 valgustatud) ja nad said standardiseeritud sööta (pelletid) Katseloomad olid varustatud vaba juurdepääsuga söögile ja joogile. Kõik loomkatsed viidi läbi Eesti katseloomade eetikakomitee kinnitatud loal (kinnitused no 69 ja 70 (9. veebruar 2011)).

2.2.6 Hüdrodünaamiline süst

Nukleiinhapete viimiseks eluslooma maksarakkudesse eksperimentaaltingimustel kasutatakse nn. „hüdrodünaamilise süsti“ meetodit, millega manustatakse intravenoosselt (sabaveeni kaudu) lühikese aja jooksul (kuni 5 sekundit) suur kogus süstelahust koos nukleiinhaptega. Selle tagajärjel korjatakse nukleiinhapped hepatotsüütide poolt üles ning need saavad täide viia oma bioloogilist aktiivsust. Antud töös kasutati plasmidi hüdrodünaamilist kohaletoimetamist, mille eesmärgiks oli plasmidi ekspresseerimine maksarakkudes.

Hüdrodünaamiline süst teostati mahus 3 ml, iga loom sai 5 ug pDNA-d. pDNA lahustati Mirius TransIT-QR hüdrodünaamilise süste lahuses, mis on endotoksiinide suhtes kontrollitud steriilne isotooniline süstelahus. Osad loomad said pool tundi pärast hüdrodünaamilise süsti teostamist RSP peptiidiga komplekseeritud SKO oligonukleotiidi (1 mg/kg SKO, peptiid/SKO molaarsussuhte 1:5 juures), mis manustati normaalsel teel intravenoosselt (sabaveeni).

2.2.7 Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine hiire maksast *in vivo* imager-iga

24 tundi pärast hüdrodünaamilise süsti teostamist kuvati loomi bioluminestsentsil põhineva *in vivo* skänneriga (Art Optix MX300), mis kasutab signaali saamiseks ülitundlikke CCD kaameraid, võimaldades signaali mõõta isegi läbi bioloogilise koe (st. elusloomast). Selle meetodi suurimaks eeliseks on sama looma mõõtmise võimalus erinevatel ajapunktidel. Loomad anesteseeriti 3% isofluraaniga, 7 minutit enne skaneerimist süstiti looma 25 mg/ml d-lutsiferiini (PerkinElmer). Skaneerimisel määratleti iga hiire kohta huvipakkuv ala (ROI, mis antud katses oli maksa piirkond), mis jagati 2,5 mm suurusteks piksliteks. Iga piksli kohta mõõdetakse luminestsentsi väärtus ning see väljendatakse RLU (suhteline valgusühik, *relative light unit*) väärtusena, mida saab võrrelda teistest pikslitest (k.a. teistest skaneeringutest) mõõdetud väärtustega. Kuvamiseade joonistab ka värv-kodeeritud joonised, kus iga piksli intensiivsus on visualiseeritud värvikoodina.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Peptiidsete transfektsioonisüsteemide testimiseks sobiva reporterüsteemi valimine

Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli leida ja välja valida selline reporterüsteem, mida saaks edukalt kasutada RSP-de uurimiseks nii *in vitro* kui ka *in vivo* tingimustes.

Reportergeen on geen, mida kasutatakse huvi pakkuva genoomipiirkonna uurimiseks näiteks bakterites, rakukultuurides, loomades või taimedes. Üheks reportergeenide kasutusala on ka transfektsiooni efektiivsuse määramine. Reportergeenidega saab näidata geenide ekspresseerumist rakkudes, millesse on toimunud edukas võõr- või modifitseeritud geeni sisestamine – ehk siis kui plasmiidne järjestus on edukalt rakku sisenenud ja seal transfektsioonikompleksidest vabanenud, ekspresseeritakse lisaks muudele võimalikele valkudele ka reportergeeni, mida saab siis vastavalt reporteri liigist kas mõõta või vaadelda. Üheks tüüpiliseks ekspresseerimissüsteemiks on plasmiidne järjestus, mis omab eukarüootses rakus replitseerumiseks vajaminevaid järjestusi ning milles sisalduvaks reportergeeniks on GFP (green fluorescent protein, roheline fluorestseeruv valk), mis paneb rakud, mis seda ekspresseerivad sinise valguse ja UV valguse all roheliselt kiirgama. GFP koosneb 238 aminohappest ning ta isoleeriti esmakordselt meduusist (*Aequorea victoria*) (Chalfie et al., 1994). Sellise süsteemi üheks peamiseks eeliseks on visuaalselt nähtav signaal – kuigi see saavutab vaadeldava taseme alles peale pikemaajalist geeniekspressiooni, pakub see lihtsa võimaluse hinnata transfektsiooni efektiivsust, loendades helendavad rakud mikroskoobi all. Kahjuks on GFP kasutamisel ka oma negatiivsed küljed: näiteks ei paku selline lähenemine võimalust transfektsiooni efektiivsust ning plasmidi replikatsiooni kiirust mõõta kvantitatiivselt.

Teiseks reportergeeniks, mida hulgaliselt kasutatakse on ensüüm lutsiferaas, mis katalüüsib reaktsiooni lutsiferiini. Lutsiferaas oksüdeerib lutsiferiini ning reaktsiooni käigus eraldub valgus, mida on kvantitatiivselt võimalik mõõta luminomeetriga. Lutsiferaasi taset saab mõõta, määramaks transfektsiooni efektiivsust. Samas on võimalik teha ka mitmeosalisi katseid, kus rakkudele lisatakse veel mõni molekul. Sellistest katsetest on enimlevinud kaks: esiteks transfekteeritud või rakkude genoomi eelnevalt lisatud geenide vaigistamine siRNA-dega ja teiseks defektse splaissinguga intronit sisaldavate geenide kasutamine, mida seejärel korrigeeritakse SKO lisamise läbi. Bioluminestsentsiga geeni ekspressiooni jälgimise kasuks räägivad mitmed tegurid: nende kasutamine on lihtne, odav ja mugav. Eelkõige on sellise süsteemi eeliseks aga asjaolu, et luminomeetriga saab detekteerida ja kvantifitseerida ka väga

madalaid geenide ekspressioonitasemeid (Kang and Chung, 2008). Kuigi mõlemad lähenemised põhinevad samal geenil, on nad tegelikult teineteisest üpriski erinevad, erinedes seega ka saadavate tulemuste osas. Kui tavapärane lutsiferaas võimaldab meil näha tugevat signaali ja sellele vastav siRNA surub seda maha, siis defektse introniga lutsiferaas ekspresseerub ainult siis, kui lisatud on SKO. Selline erinevus toimemehhanismides teeb tavapärase mahasurumise kasulikuks siis, kui uuritav siRNA järjestus või transpordimeetod omab piisavalt suurt efekti, sest väikemahuline mahasurumine võib tugeva ekspressiooni taustal märkamata jääda. Siinkohal pakubki defektse introniga reportersüsteem võimalust suuremaks tundlikkuseks, kuna ilma SKO efektita ei tohiks ekspressiooni üldse toimudagi.

Olles kaalunud kõikide vektorsüsteemide positiivseid ja negatiivseid aspekte, sai käesolevas uurimustöös kasutamiseks valitud lutsiferaas, kuna seda on võimalik ka väga madala geeniekspressiooni korral detekteerida. Täpsemalt sai valitud defektse introniga süsteem, kuna eelpool kirjeldatud suurem tundlikkus on eriti oluline *in vivo* süsteemide jaoks, kus loodame kunagi peptiidseid vektoreid testida. Valiku kasuks räägib veel ka see, et eelnimetatud mudel on varasemalt näidatud kui töötav ja tundlik mudel, samuti omavad SKO-d väga suurt terapeutilist potentsiaali, kuna seda süsteemi on võimalik erinevate haiguste raviks kasutada.

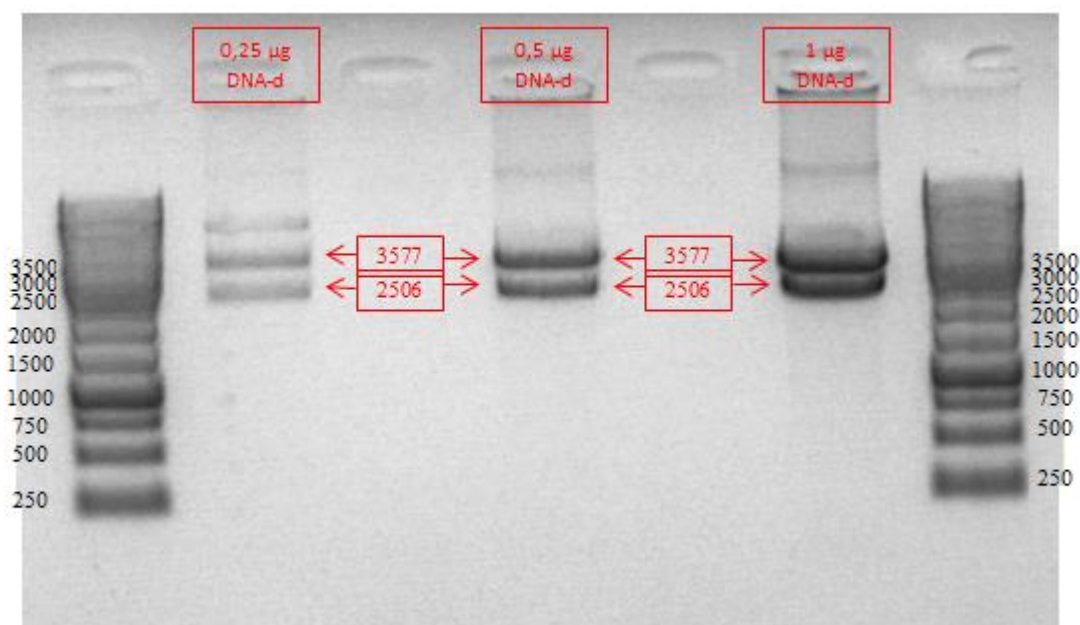
2.3.2 pLuc705 plasmidi disain

Olles edutult otsinud kontakti autoritega, kes nimetatud plasmidi disaininud olid ja selle abil rakuliini loonud, ning leidmata antud plasmidi järjestust andmebaasidest, sai otsustatud defektse introniga plasmid ise luua. Kuna geenisünteesiga tegelev firma pakkus välja oma vektori, mida saab kasutada plasmidi paljundamiseks bakteriaalse kultuuri abil, oli vaja promotereid, enhansereid ning defektse introniga lutsiferaasi.

Soovitud tulemuse saavutamiseks ning eukarüootses süsteemis ekspressiooni tagamiseks sai kasutatud lutsiferaasi sisaldavat plasmidi (pLuc), millest sai võetud järjestuskassett CMV promooterist ja sellele vastavast enhanserist kuni lutsiferaasi geeni lõpuni. Antud järjestus ei sisaldanud defektset intronit, seega tuli vastav intron võtta kuskilt mujalt. Meritsa uurimisgrupp (Viru et al., 2011) kasutas defektseid introneid viirusvektorite replikatsiooni kontrollimiseks, mistõttu sai ka vajaminev 705 intron võetud nende Semliki Forest viirusel põhinevast konstrukstist A3, mis antud intronit sisaldas. Siinkohal oli keeruliseks aspektiks erinevate vektorite lutsiferaasi järjestuste erinevus, mistõttu tuli mõlemad järjestused hoolikalt üle vaadata, paigutamaks intron korrektselt nii, et hiljem saavutatud korrektse splaissingu tulemusel ei kustuks ära mõni lutsiferaasi ekspressiooni jaoks vajaminev regioon.

2.3.3 pLuc705 DNA geel-elektroforees ja kvaliteedikontroll

Veendumaks, et tellitud sünteesiprodukt on korrektne, sooritati kvaliteedikontroll restriksioonianalüüsi läbi. Selleks, valmistati erinevates hulkades pCMV-Luc705 plasmiidset vektorit sisaldavad reaktsioonisegud (vastavalt 0,25 μ g, 0,5 μ g ja 1 μ g DNA-d) (Joonis 4). Produkti lõikamiseks kasutati ensüümi XhoI, mille tulemusena olid soovitud fragmentide suurused 15, 2506 ja 3577. Nagu jooniselt näha, siis antud fragmendid tõepoolest vastavad markerilt nähtavatele suurusjärgudele, kinnitades, et plasmiid on korrektselt sünteesitud. Kahjuks pole pildil küll näha kõige väiksemat, 15bp suurust fragmenti, kuid see oli ka oodatav, kuna mitmetuhande aluspaari suuruste fragmentide eraldamiseks mõeldud geelil ei ole niivõrd väikseid DNA lõike lihtsalt võimalik tuvastada.



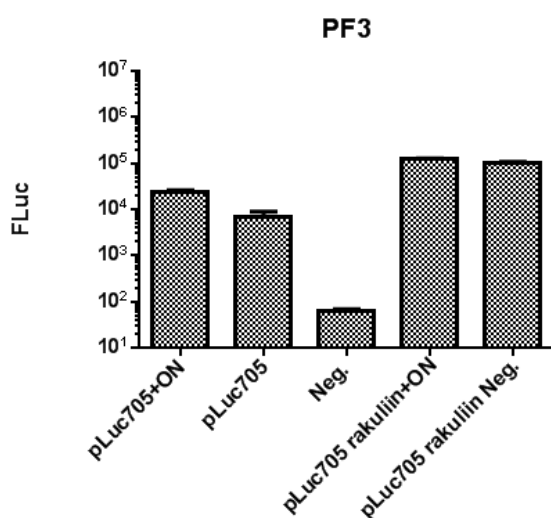
Joonis 4 – Geel-elektroforees. Sünteesitud produkti, pLuc705 kvaliteedikontroll lõikamisel ensüüm XhoI-ga. Joonisel on märgitud plasmiidse DNA kogus ning korrektsete fragmentide suurused.

2.3.4 Plasmidi testimine *in vitro* koekultuuri tingimustes

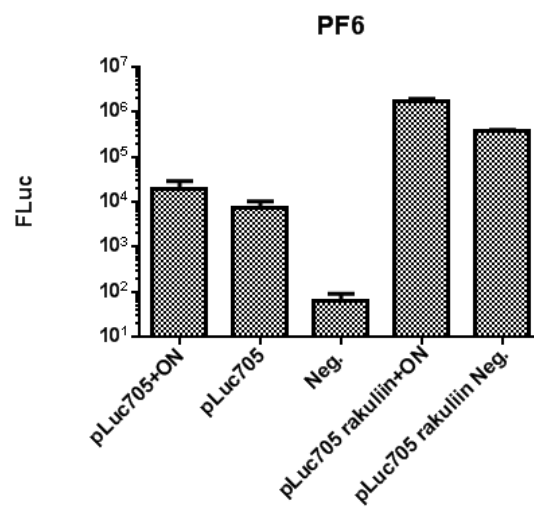
Antud töö üheks oluliseks osaks oli kontrollida, kas disainitud ekspressioonisüsteem omab aktiivsust ka *in vitro* tingimustes ning seda, kuidas ta sobitub kokku erinevate peptiidsete vektoritega. Selle määramiseks sai läbi viidud katseseria, mille puhul transfekteriti pCMV-Luc705 plasmiid rakkudesse kasutades lipiidset Lipofectamine 2000 reagenti. Nelja tunni möödudes kanti osadele eeltransfekteritud rakkudele transfektsioonisegu, mis sisaldas SKO-d ja peptiidset transfektsioonireagenti, teistele eelnevalt plasmiidiga transfekteritud

rakkudele midagi ei lisatud. Paralleelselt plasmiidse ekspressioonisüsteemi testimisele viidi SKO-sid ka HeLa pLuc705 rakkudesse, tegemaks kindlaks, kas ja millisel määral omavad valitud SKO-d efekti. SKO-de transfektoerimiseks kasutati kolme erineva peptiidse reagenti abi – PF3, PF6 ja PF14.

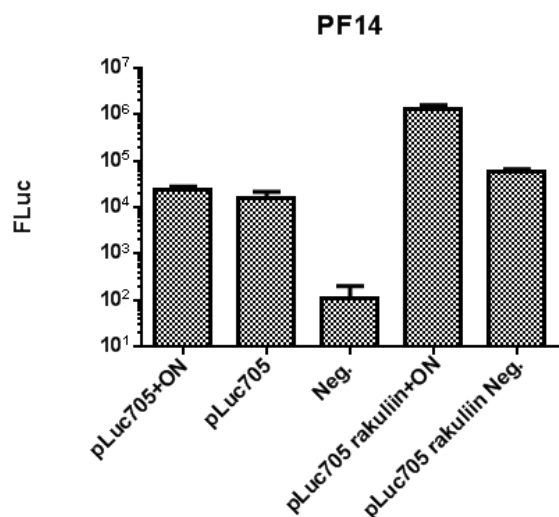
Kõik kolm katsetulemust, mis saavutati erinevate PepFect peptiidide abil, näitasid, et ainult plasmiidse pLuc705 viimisel HeLa rakkudesse LF2000 abil toimus lutsiferaasi geeni ebakorrekne splaissimine ja seega ka PepFect/SKO-d sisaldavate rakkudega võrreldes madalam ekspressioonitase. Kui aga rakkudesse viidi erinevate PepFect peptiididega splaissingut parandavad oligonukleotiidid, leidis aset lutsiferaasi geeni (mis oli katkestatud inimese muteeritud β -globiini introniga) korrektne splaissimine ja sellest tulenev geeniekspressiooni tase oli SKO-ga transfektoerimata rakkudega võrreldes tunduvalt kõrgem. Paralleelselt viidi läbi katsed ka HeLa pLuc705 rakuliiniga, mis juba sisaldab genoomi integreeritud aberrantse introniga järjestust, kus negatiivse kontrolli rakke ei töödeldud millegagi. Positiivse kontrolli puhul viidi rakkudesse SKO oligonukleotiidid, mis parandasid vale splaissimise. Ka nende rakkude puhul võib peale SKO lisamist näha lutsiferaasi aktiivsuse kasvu. (Joonis 5-7)



Joonis 5 SKO transfektsioon PF3 abil. Võrreldud on SKO efektiivsust plasmiidiga transfektoeritud HeLa rakkudes ja HeLa pLuc705 rakuliinis. Negatiivne tulp on töötlemata HeLa rakud.

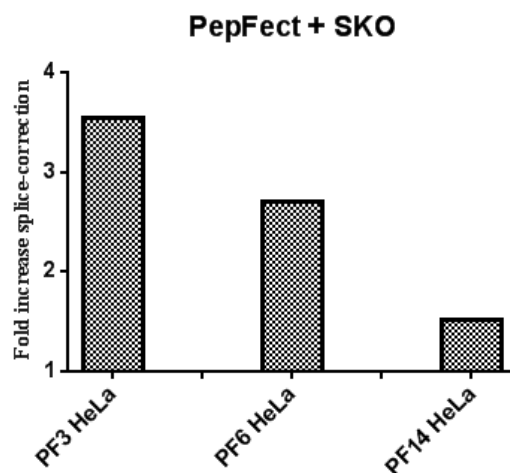


Joonis 6 SKO transfektsioon PF6 abil. Võrreldud on SKO efektiivsust plasmiidiga transfektoeritud HeLa rakkudes ja HeLa pLuc705 rakuliinis. Negatiivne tulp on töötlemata HeLa rakud.



Joonis 7 SKO transfektsioon PF14 abil. Võrreldud on SKO efektiivsust plasmiidiga transfekteeritud Hela rakkudes ja Hela pLuc705 rakuliinis. Negatiivne tulp on töötlemata Hela rakud.

Üheks katse eesmärgiks oli ka võrrelda, milliste peptiidsete vektoritega toimib disainitud vektor kõige efektiivsemalt. Kõrvutades erinevate peptiididega saadud tulemused, võime näha, et kõrvutades erinevate peptiididega saadud tulemused (Joonis 8), võime näha, et kõige efektiivsemalt töötab koos vektoriga PF3, head aktiivsust näitavad ka PF6 ja PF14. Huvitaval kombel on see vastupidine nendele tulemustele, mida võib näha Luc stabiilse rakuliini transfekterimisel SKO-ga, mille puhul näitab PF14 teistest tunduvalt suuremat efektiivsust. Seda nähtust võib selgitada asjaoluga, et kuigi defektse introniga lutsiferaasi ekspresseeriva rakuliini puhul on PF14 aktiivsus suurim, nagu ka oodatud, võib eelnev rakkude transfektsioon LF2000-ga mõjutada kuidagi rakumembraane, andes transfektsiooni eelise hoopis teistele peptiididele ja alandades PF14 efektiivsust (Andaloussi et al., 2011a; Andaloussi et al., 2011b; Ezzat et al., 2011; Veiman et al., 2013).



Joonis 8 PF3, PF6 ja PF14 SKO transfektsiooni efektiivsuste võrdlus. Võrreldud on plasmidi ja SKO-d sisaldavate rakkude lutsiferaasi aktiivsuse suhet ainult plasmidi sisaldavate rakkude lutsiferaasi aktiivsusesse.

Kuigi katse võib selles osas õnnestunuks lugeda, et vektor töötas ja samuti sai lutsiferaasi aktiivsust SKO-de abil taastada, on katse juures siiski paar huvitavat küsimust: üheks küsimuseks on see, miks ilma SKO-ta, kuid defektse introniga lutsiferaasi sisaldavad, rakud annavad märgatava lutsiferaasi aktiivsuse. Esmalt võiks arvata, et vektor on kuidagimoodi puudulikult disainitud ja seetõttu ei ole defektse introni efekt täielik. Samas esineb see probleem isegi suuremal määral HeLa pLuc705 rakuliini puhul, andes mõista, et viga ei saa olla selles konkreetses vektoris. Pigem võib probleem olla põhjustatud asjaolust, et ainult ühest defektsest intronist ei piisa, et garanteerida lutsiferaasi ekspressiooni täielik mahasurumine. Nimelt on bioloogiliste protsesside üheks osaks evolutsiooniline surve ja mutatsioonid, mistõttu võib uskuda, et osades rakkudes muteerus defektne intron lihtsalt sellisesse vormi, mis võimaldas lutsiferaasil taas ekspresseeruda.

Ekspressioonivektori puhul võib kahtlustada ka seda, et võis aset leida mingisugune konformatsiooniline muutus, mille käigus eellasmolekul voltus rakus nii, et intronit sisaldav osa jäi varjatuks ning toimus osaline korrektse lutsiferaasi geeni ekspressioon. Samas pole välistatud ka seda, et antud intron lihtsalt „lekib“ ning selle olemasolu ei takista ekspressiooni täielikult.

Siinkohal võiks lahenduseks pakkuda kas mõne muu analoogse introni kasutamist või isegi mitme defektse introni lisamist – see annaks kindlustunde, et kui ühe introniga peaks midagi juhtuma, on kahe introniga samaaegselt toimuv muutus väga vähe tõenäoline.

Teine küsimus puudutab rohkem saadud tulemuste suurust – nimelt on sisseviidud plasmiidiga saadud tulemuste ja rakuliini lutsiferaasi aktiivsuste vahe üpriski suur. Et seda selgitada, tuleks süveneda eelpool nimetatud süsteemide olemusse. Tuleb meeles pidada, et

plasmidi transfekterimisel ei jõua plasmid kunagi saajaprotsendiliselts kõikidesse rakkudesse, vaid hoopiski teatud protsenti nendest. Täpsem protsent sõltub sellest, mis tüüpi plasmiidiga on tegu ja mis on selle hulk transfektsiooniseegu. Teisest küljest sisaldavad rakuliini puhul kõik plaadil olevad rakud plasmidis leiduvat järjestust. Kui siia lisada veel asjaolu, et ka SKO-de transfektsioon ei pruugi alati olla saajaprotsendiline, saamegi oma vastuse: kui transfekteerida rakuliini SKO-dega, jõuavad nad kindlasti rakku, kus neid on ootamas defektse introniga lutsiferaasi geen, samas kui SKO-sid viia plaadile, kuhu eelnevalt on lisatud plasmiidiga transfektsiooniseegu, on nii plasmidi kui SKO samasse rakku sattumise tõenäosus oluliselt väiksem.

Üleüldiselt võib väita, et kuigi ka sellel ekspressioonisüsteemil on omad vead, nagu mittetäielik lutsiferaasi aktiivsuse mahasurumine, paistab see siiski olevat sobiv meetod hindamiseks peptiidide võimet transportida rakkudesse SKO-sid, tehes antud plasmidist hea kandidaadi edasisteks katseteks *in vivo* süsteemides.

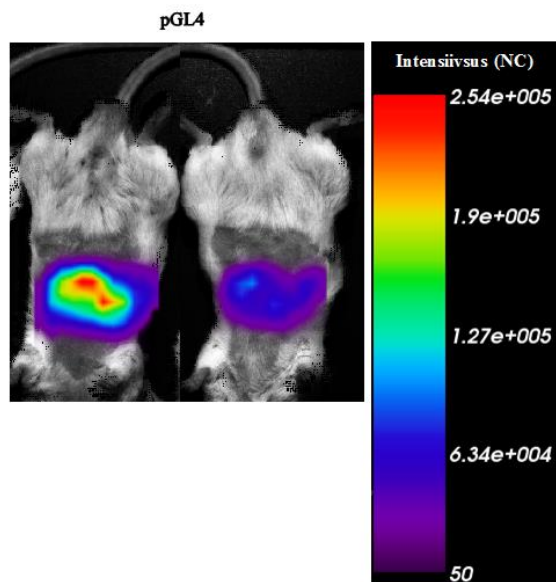
Peptiididevahelise erinevuse üle arutlemisel tuleks ka meeles pidada, et nähtud erinevuse põhjuseks võib olla ka erinevused disainis - kui näiteks PF14 on disainitud põhiliselt SKO-de transportimiseks, siis PF6 puhul on sihtgrupiks siRNA-d (Andaloussi et al., 2011a; Andaloussi et al., 2011b; Ezzat et al., 2011; Veiman et al., 2013).

2.3.5 Plasmidi testimine *in vivo*

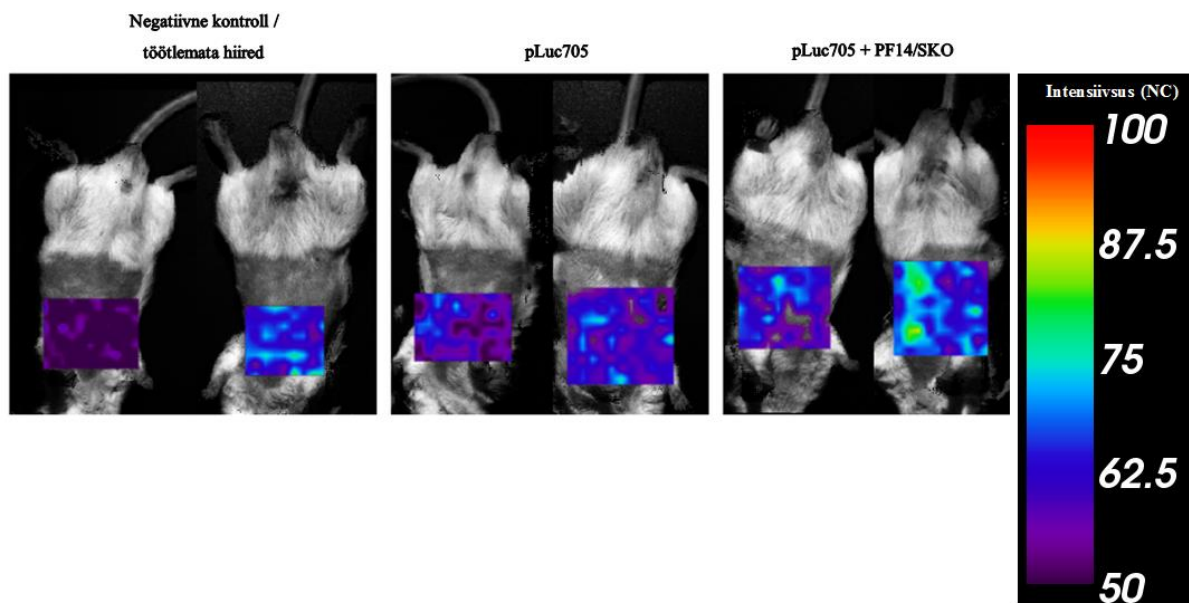
Töö viimaseks eesmärgiks oli võimaluse korral liikuda plasmidi kasutamisega *in vivo* süsteemi. Selleks kasutati Balb/C hiiri, kellele süstiti kas 5µg uuritavat plasmidi või 5µg pGL4 plasmidi, mis ekspresseerib Luc2 markervalku (Joonis 9). Negatiivseks kontrolliks võetud hiirtele ei süstitud midagi. Kahele hiirele, kellele oli süstitud pCMV-Luc705 plasmidi, süstiti pool tundi hiljem SKO-d, mis oli kompleksis PF14-ga ning järgmisel päeval mõõdeti hiirte maksas olevat lutsiferaasi taset *in vivo* imageri abil (Joonis 10).

Saadud tulemustest võime näha, et kuigi nendel hiirtel, kellele süstiti ainult defektse introniga plasmidi, on kontrolliga võrreldes pisut suurem foon, ei ole nende puhul ikkagi näha sellist lutsiferaasi ekspressiooni, mida nägime *in vitro* koekultuuri tingimustes, andes sellega mõista, et antud vektori kasutamise puhul *in vivo* tingimustes valepositiivse tulemuse ohtu ei ole. Kahjuks ei õnnestunud selles katses peptiidse vektori abil saavutada edukat SKO transfektsiooni – kuigi SKO-ga transfekteeritud hiired näitasid transfekteerimata hiirtega võrreldes pisut kõrgemat üldist fooni, ei olnud lutsiferaasi aktiivsuse kasv siiski piisavalt suur, et lugeda seda kontrollist olulisel määral erinevaks (Joonis 11).

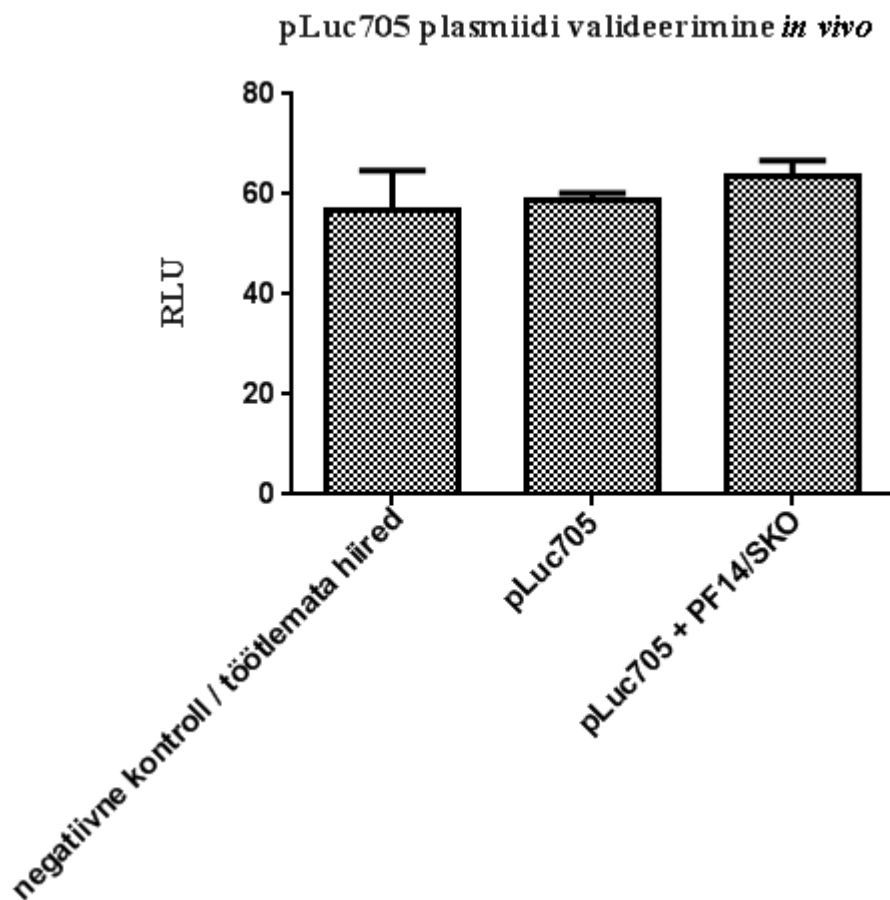
Seega võib *in vivo* katseosa puhul järelduseks tuua, et kuigi antud vektorsüsteemi puhul on defektse introni töö palju efektiivsem, kui see on koekultuuri tingimustes, tuleb siinkohal teha veel mitmeid edasisi uuringuid, määramaks sellise peptiidi ja SKO hulga ning vahekorra, mis hiirtesse süstides tooks endaga kaasa märgatava lutsiferaasi aktiivsuse kasvu.



Joonis 9 Joonisel on kuvatud katseloomad, kellesse on sisestatud plasmiid pGL4, mida kasutasime antud *in vivo* katses positiivse kontrollina. Joonis on esitletud värv-kodeerituna, kus iga piksli intensiivsus on visualiseeritud värvikoodina.



Joonis 10 Joonisel on kuvatud plasmidi pCMV-pLuc705 testimine *in vivo*. Kujutatud on: esiteks negatiivne kontroll ehk hiired kellele ei manustatud midagi, teiseks on hiired kellele manustati ainult plasmidi pLuc705-te ja kolmandaks on hiired kellele süstiti lisaks pLuc705 plasmiidile peptiidi PF14/SKO segu. Joonis on esitletud värv-kodeerituna, kus iga piksli intensiivsus on visualiseeritud värvikoodina.



Joonis 11 Tulemustest võime näha, et kuigi nendel hiirtel, kellele süstiti ainult defektse introniga plasmidi, on kontrolliga võrreldes pisut suurem foon, siiski ei ole nende puhul ikkagi näha sellist lutsiferaasi ekspressiooni, mida nägime *in vitro* koekultuuri tingimustes. Samuti SKO-ga transfekteeritud hiired näitasid transfekteerimata hiirtega võrreldes pisut kõrgemat üldist fooni, siiski ei olnud lutsiferaasi aktiivsuse kasv piisavalt suur, et seda lugeda kontrollist olulisel määral erinevaks.

3 KOKKUVÕTE

Geeniteraapia omab nii tänapäeva kui ka tuleviku meditsiinis olulist rolli. Geeniteraapias on siiski veel suurimaks väljakutseks geneetilise materjali ohutu ja efektiivse rakku toimetamise meetodi väljatöötamine. Üheks uurimissuunaks mitteviraalsete vektorite seas on kujunenud rakku sisenevad peptiidid, mis omavad suurt potentsiaali terapeutiliste molekulide rakku toimetamiseks. Kõige rohkem on RSP-d leidnud kasutust antisens-oligonukleotiidide transpordil, RNAi tehnoloogias ja splaissingu korrektsioonis.

Antud bakalaureusetöö eksperimentaalse osa eesmärkideks oli analüüsida erinevate ekspressioonivektorite omadusi ning valida välja, disainida ja kontrollida sobiv ekspressioonivektorite kogum, mida kasutada rakku sisenevate peptiidide uuringutes *in vitro* ja edaspidi *in vivo*.

Antud tööks sai erinevate reportergeenide seast välja valitud lutsiferaas, täpsemalt võeti kasutusele defektse splaissinguga intronit sisaldavad geenid, mida seejärel korrigeeriti SKO-de lisamise läbi. Selle meetodi kasuks räägivad mitmed tegurid: nende kasutamine on lihtne, odav ja mugav. Defektse introniga reportersüsteem pakub võimalust suuremaks tundlikkuseks, kuna ilma SKO efektita ei tohiks ekspressiooni üldse toimudagi, samuti omab see süsteem potentsiaalset terapeutilist rakendust.

Katsetulemused näitasid, et ainult plasmidi pLuc705 viimisel Hela rakkudesse LF2000 abil toimus aberrantse splaissinguga lutsiferaasi geeni ekspressioon, mille tase oli madalam võrreldes selle tulemusega, kui rakkudesse viidi erinevate PepFect peptiididega splaissingut parandavad oligonukleotiidid, mille läbi leidis aset lutsiferaasi geeni (mis oli katkestatud inimese muteeritud β -globiini introniga) korrektne splaissimine.

Üleüldiselt võib väita, et kuigi ka sellel ekspressioonisüsteemil on omad vead, nagu mittetäielik lutsiferaasi aktiivsuse mahasurumine, paistab see siiski olevat sobiv meetod hindamiseks peptiidide võimet transportida rakkudesse SKO-sid, tehes antud plasmiidist hea kandidaadi edasisteks katseteks *in vivo* süsteemides.

Töö viimaseks eesmärgiks oli võimaluse korral liikuda plasmidi kasutamisega *in vivo* süsteemi. Selleks viidi läbi katse, mille käigus ühtedele loomadele ei süstitud midagi, teistele loomadele süstiti uuritavad plasmidi pCMV-Luc705 ja kolmandatele loomadele süstiti lisaks plasmiidile veel ka PF14/SKO segu. Kuigi nendel hiirtel, kellele süstiti ainult defektse introniga plasmidi, on kontrolliga võrreldes pisut suurem foon, ei ole nende puhul ikkagi näha sellist lutsiferaasi ekspressiooni, mida nägime *in vitro* koekultuuri tingimustes. Antud loomkatse puhul näitasid SKO-ga transfekteeritud hiired ainult plasmidi sisaldavate hiirtega võrreldes pisut kõrgemat üldist fooni, kuid siiski ei olnud lutsiferaasi aktiivsuse kasv piisavalt

suur, et seda lugeda oluliseks. Edaspidi on vaja teha veel mitmeid uuringuid, määramaks sellise peptiidi ja SKO hulga ning vahekorra, mis hiirtesse süstides tooks endaga kaasa märgatava lutsiferaasi aktiivsuse kasvu.

4 SUMMARY

„Design and validation of reporter system pCMV-Luc705“

Evelin Rammul

Gene therapy has an important role in the world today and also in the future medicine. One of the biggest challenge in gene therapy still today is developing safe and effective method to deliver genetic material into the cell. In the field of non-viral gene delivery vectors - cell penetrating peptides have become very useful tools for research. They have great potential to deliver therapeutic molecules into the cells. Most CPP-s have found their purpose of use in: antisense-oligonucleotide transport, RNAi technology and splice correction technology.

Aim of this thesis was to analyze characteristics of different gene expression vectors and then select, design and control the set of appropriate expression vectors, which could be used for studies of CPP's in *in vitro* and in *in vivo* systems.

Among the various reporter genes we selected for this thesis luciferase enzyme. Specifically we used defective splicing intron genes, which then were adjusted through the addition of SCO-s. This method has several advantages: it is easy to use, it's inexpensive and convenient. Compared to other methods this method allows greater sensitivity because there shouldn't be seen expression without SCO-s effect.

Test results showed that when only this defected plasmid was entered to cells, then took place luciferase gene incorrect splicing and that caused lower gene expression level compared to the controlsystem. However when cells were introduced with different PepFect peptides (PF3, PF6, PF14) mixed with SCO-s, then mutations in luciferase genes were fixed. That lead to the correct splicing and results showed that gene expression levels were significantly higher compared to the controlsystem.

Overall we can claim that although this expression system has it's disadvantages, such as incomplete suppression of luciferase activity, it seems to be an appropriate method to evaluate peptides ability to deliver SCO-s to cells. So we can say that this plasmid (pLuc705) is good candidate for further experiments of CPP's in *in vivo* systems.

The last aim of this thesis was to use plasmid pCMV-pLuc705 in *in vivo* system. For that, test was performed during which two animals were not injected with anything. Other two animals were injected with plasmid pCMV-Luc705. In addition two animals were injected with our plasmid and PF14/SCO mixture. Although animals that were injected with defective intron plasmid had slightly higher background than untreated animals, we did not see as high luciferase expression as in *in vitro* conditions. This animal experiment showed that SCO-

transfected mice had slightly higher background than mice that were not transfected. But luciferase activity was not high enough to read the test as successful. All in all we have to continue to do number of studies to determine right ratio of peptide and SCO-s to increase luciferase activity.

5 KASUTATUD KIRJANDUS

Andaloussi, S. E., T. Lehto, P. Lundin, and U. Langel, 2011a, Application of PepFect peptides for the delivery of splice-correcting oligonucleotides: *Methods Mol Biol*, v. 683, p. 361-73.

Andaloussi, S. E., T. Lehto, I. Mäger, K. Rosenthal-Aizman, I. I. Oprea, O. E. Simonson, H. Sork, K. Ezzat, D. M. Copolovici, K. Kurrikoff, J. R. Viola, E. M. Zaghoul, R. Sillard, H. J. Johansson, F. Said Hassane, P. Guterstam, J. Suhorutšenko, P. M. Moreno, N. Oskolkov, J. Hälldin, U. Tedebark, A. Metspalu, B. Lebleu, J. Lehtiö, C. I. Smith, and U. Langel, 2011b, Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo: *Nucleic Acids Res*, v. 39, p. 3972-87.

Ansorge, W., 1982, Improved system for capillary microinjection into living cells: *Exp Cell Res*, v. 140, p. 31-7.

Bastos, R., N. Panté, and B. Burke, 1995, Nuclear pore complex proteins: *Int Rev Cytol*, v. 162B, p. 257-302.

Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher, 1994, Green fluorescent protein as a marker for gene expression: *Science*, v. 263, p. 802-5.

Conner, S. D., and S. L. Schmid, 2003, Regulated portals of entry into the cell: *Nature*, v. 422, p. 37-44.

Ezzat, K., S. E. Andaloussi, E. M. Zaghoul, T. Lehto, S. Lindberg, P. M. Moreno, J. R. Viola, T. Magdy, R. Abdo, P. Guterstam, R. Sillard, S. M. Hammond, M. J. Wood, A. A. Arzumanov, M. J. Gait, C. I. Smith, M. Hällbrink, and U. Langel, 2011, PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation: *Nucleic Acids Res*, v. 39, p. 5284-98.

Ezzat, K., H. Helmfors, O. Tudoran, C. Juks, S. Lindberg, K. Padari, S. El-Andaloussi, M. Pooga, and U. Langel, 2012, Scavenger receptor-mediated uptake of cell-penetrating peptide nanocomplexes with oligonucleotides: *FASEB J*, v. 26, p. 1172-80.

Fernández-Carneado, J., M. J. Kogan, S. Pujals, and E. Giralt, 2004, Amphipathic peptides and drug delivery: *Biopolymers*, v. 76, p. 196-203.

- Fonseca, S. B., M. P. Pereira, and S. O. Kelley, 2009, Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications: *Adv Drug Deliv Rev*, v. 61, p. 953-64.
- Gautam, A., K. Chaudhary, R. Kumar, A. Sharma, P. Kapoor, A. Tyagi, G. P. Raghava, and O. s. d. d. consortium, 2013, In silico approaches for designing highly effective cell penetrating peptides: *J Transl Med*, v. 11, p. 74.
- Green, M., and P. M. Loewenstein, 1988, Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein: *Cell*, v. 55, p. 1179-88.
- Guterstam, P., M. Lindgren, H. Johansson, U. Tedebark, J. Wengel, S. El Andaloussi, and U. Langel, 2008, Splice-switching efficiency and specificity for oligonucleotides with locked nucleic acid monomers: *Biochem J*, v. 412, p. 307-13.
- Jazwa, A., U. Florczyk, A. Jozkowicz, and J. Dulak, 2013, Gene therapy on demand: Site specific regulation of gene therapy: *Gene*.
- Kang, J. H., and J. K. Chung, 2008, Molecular-genetic imaging based on reporter gene expression: *J Nucl Med*, v. 49 Suppl 2, p. 164S-79S.
- Kang, S. H., M. J. Cho, and R. Kole, 1998, Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development: *Biochemistry*, v. 37, p. 6235-9.
- Levings, P. P., and J. Bungert, 2002, The human beta-globin locus control region: *Eur J Biochem*, v. 269, p. 1589-99.
- Madani, F., S. Lindberg, U. Langel, S. Futaki, and A. Gräslund, 2011, Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides: *J Biophys*, v. 2011, p. 414729.
- Morris, M. C., S. Deshayes, F. Heitz, and G. Divita, 2008, Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics: *Biol Cell*, v. 100, p. 201-17.
- Mäe, M., S. El Andaloussi, P. Lundin, N. Oskolkov, H. J. Johansson, P. Guterstam, and U. Langel, 2009, A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy: *J Control Release*, v. 134, p. 221-7.
- Nagahara, H., A. M. Vocero-Akbani, E. L. Snyder, A. Ho, D. G. Latham, N. A. Lissy, M. Becker-Hapak, S. A. Ezhevsky, and S. F. Dowdy, 1998, Transduction of full-length TAT

fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration: *Nat Med*, v. 4, p. 1449-52.

Pan, H., Y. Zhou, F. Sieling, J. Shi, J. Cui, and C. Deng, 2004, Sonoporation of cells for drug and gene delivery: *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, v. 5, p. 3531-4.

Patel, L. N., J. L. Zaro, and W. C. Shen, 2007, Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives: *Pharm Res*, v. 24, p. 1977-92.

Pooga, M., M. Hällbrink, M. Zorko, and U. Langel, 1998a, Cell penetration by transportan: *FASEB J*, v. 12, p. 67-77.

Pooga, M., M. Lindgren, M. Hällbrink, E. Bråkenhielm, and U. Langel, 1998b, Galanin-based peptides, galparan and transportan, with receptor-dependent and independent activities: *Ann N Y Acad Sci*, v. 863, p. 450-3.

Pourmousa, M., J. Wong-ekkabut, M. Patra, and M. Karttunen, 2013, Molecular dynamic studies of transportan interacting with a DPPC lipid bilayer: *J Phys Chem B*, v. 117, p. 230-41.

Ramsay, E., and M. Gumbleton, 2002, Polylysine and polyornithine gene transfer complexes: a study of complex stability and cellular uptake as a basis for their differential in-vitro transfection efficiency: *J Drug Target*, v. 10, p. 1-9.

Sazani, P., and R. Kole, 2003, Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing: *J Clin Invest*, v. 112, p. 481-6.

Schwarze, S. R., A. Ho, A. Vocero-Akbani, and S. F. Dowdy, 1999, In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse: *Science*, v. 285, p. 1569-72.

Shigekawa, K., and W. J. Dower, 1988, Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells: *Biotechniques*, v. 6, p. 742-51.

Soomets, U., M. Lindgren, X. Gallet, M. Hällbrink, A. Elmquist, L. Balaspiri, M. Zorko, M. Pooga, R. Brasseur, and U. Langel, 2000, Deletion analogues of transportan: *Biochim Biophys Acta*, v. 1467, p. 165-76.

- Stewart, K. M., K. L. Horton, and S. O. Kelley, 2008, Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine: *Org Biomol Chem*, v. 6, p. 2242-55.
- Suhorutsenko, J., N. Oskolkov, P. Arukuusk, K. Kurrikoff, E. Eriste, D. M. Copolovici, and U. Langel, 2011, Cell-penetrating peptides, PepFects, show no evidence of toxicity and immunogenicity in vitro and in vivo: *Bioconjug Chem*, v. 22, p. 2255-62.
- Thompson, A. R., 2000, Gene therapies for the hemophilias: *Mol Ther*, v. 2, p. 5-8.
- Tünnemann, G., R. M. Martin, S. Haupt, C. Patsch, F. Edenhofer, and M. C. Cardoso, 2006, Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells: *FASEB J*, v. 20, p. 1775-84.
- Veiman, K. L., I. Mäger, K. Ezzat, H. Margus, T. Lehto, K. Langel, K. Kurrikoff, P. Arukuusk, J. Suhorutšenko, K. Padari, M. Pooga, and Ü. Langel, 2013, PepFect14 peptide vector for efficient gene delivery in cell cultures: *Mol Pharm*, v. 10, p. 199-210.
- Viru, L., G. Heller, T. Lehto, K. Pärn, S. El Andaloussi, Ü. Langel, and A. Merits, 2011, Novel viral vectors utilizing intron splice-switching to activate genome rescue, expression and replication in targeted cells: *Virology*, v. 8, p. 243.
- Wang, W., W. Li, N. Ma, and G. Steinhoff, 2013, Non-viral gene delivery methods: *Curr Pharm Biotechnol*, v. 14, p. 46-60.
- Xu, Y., and F. C. Szoka, 1996, Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection: *Biochemistry*, v. 35, p. 5616-23.
- Ylä-Herttuala, S., 2012, Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union: *Mol Ther*, v. 20, p. 1831-2.
- Zhang, S., Y. Xu, B. Wang, W. Qiao, D. Liu, and Z. Li, 2004, Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery: *J Control Release*, v. 100, p. 165-80.
- Zhang, Y., A. Satterlee, and L. Huang, 2012, In vivo gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles?: *Mol Ther*, v. 20, p. 1298-304.
- Ziegler, A., 2008, Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans: *Adv Drug Deliv Rev*, v. 60, p. 580-97.
- Zorko, M., and U. Langel, 2005, Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery: *Adv Drug Deliv Rev*, v. 57, p. 529-45.

Raamatud:

Heinaru, A., 2012, Geneetika õpik kõrgkoolile

Veebilehed:

H. Grünberg, S. Mikkel, 2006, Beeta-talasseemia:

<http://www.eestiartst.ee/static/files/033/beeta-talasseemia.pdf>

P.M.Patil, P.D. Chaudhari, M. Sahu and N.J. Duragkar, 2012, Cell-Penetrating Peptides—
Review article on gene therapy:

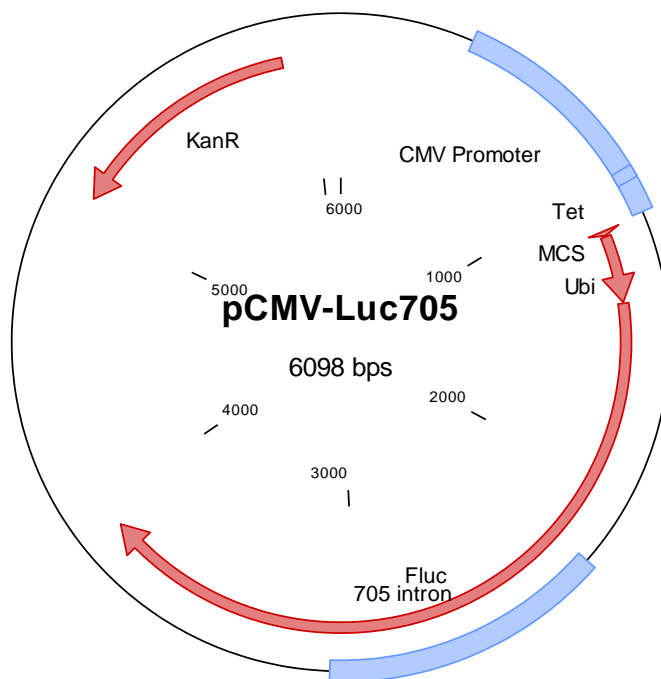
http://www.bioinfo.in/uploadfiles/13470791054_1_2_IJG.pdf

S. Trabulo, A. L. Cardoso, M. Mano and M. C. Pedroso de Lima, 2010, Mechanisms of
Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems:

<http://www.mdpi.com/1424-8247/3/4/961>

6 LISAD

6.1 LISA 1 Plasmidi pCMV-Luc705 järjestus



CMV Promooter: 402-1128

Fluc: 1392-3903

705 intron: 2228-3081

KanR: 5083-5898

SKO seondumisala: 2926-2943

```
TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
GGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGC
GTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGG
AGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAG
GGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGC
```

TGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTA
ACGACGGCCAGTGAATTCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC
AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTT
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAA
TAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATG
CCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATG
CCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC
ATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC
GGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
GTTTTGGAACCAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTTCGTAACAACCTCCGCCCA
TTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT
CTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTC
GTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCA
TAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGCGTTTAAACTTAAGCTT
GGTACCATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACTGGTAAGACCATCACTCTCGAAG
TGGAGCCGAGTGACACCATTGAGAATGTCAAGGCAAAGATCCAAGACAAGGAAG
GCATCCCTCCTGACCAGCAGAGGTTGATCTTTGCTGGGAAACAGCTGGAAGATGG
ACGCACCCTGTCCGACTACAACATCCAGAAAGAGTCCACCCTGCACCTGGTCCTG
CGTCTGAGAGGTGGGCCCCTCGAGATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGC
CCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAG
GCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATA
TCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGA
AGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGA
AAACTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGGCGGTTATTTATCGGAGTTGCAG
TTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCAT
TTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAAC
GTGCAAAAAAGCTCCCAATCATCCAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGG
ATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGT
TTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCAC
TGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCAT
AGAAGTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAA
TCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATG
TTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATT
TGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGTGAGTCTATGGGGCCCTTGATGT

TTTCTTTCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAA
CAGGGTACAGTTTAGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTC
TCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTTGCTGTTCATAACAATTGTTTTCTTTTGTTT
AATTCTTGCTTTCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAATGCCTT
AACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAAA
AAAACCTTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATT
TGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTTATTTTAAATTGATACATAATCA
TTATACATATTTATGGGTTAAAGTGTAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACC
AAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAAATATA
CTTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATA
ATGATACAATGTATCATGCCTCTTTCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTT
CTGGGTTAAGGCAATAGCAATATCTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAAT **TGT**
AACTGAGGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTC
TGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCC
TTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCCCTCCACAGGATTACAAGATTCAA
AGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGA
CAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTA
AGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAG
GATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGA
TAAACCGGGCGCGGTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGAT
CTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGA
GGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGA
TTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACG
AACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCA
GGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGAC
GCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAAGTCCCGCCCGCGTTG
TTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCG
CCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACG
AAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCC
TCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGCTCGAGGAAGCTTGGCTCG
AGCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACA
ACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCT
AACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCCG
TGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTG
GGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGG

CGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG
GATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCG
TAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAT
CACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGA
TACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC
GCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATA
GCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGT
GTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTC
TTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA
CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTG
GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAG
CCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCG
CTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGG
ATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAA
AACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGA
TCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC
TTGGTCTGACAGTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTC
ATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAG
AAA ACTCACCGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGAT
TCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGG
TTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAA
AGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATC
AAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGA
CGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAAC
CGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATT
CTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCAGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGC
ATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCGTC
AGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCC
ATGTTTCAGAAACA ACTCTGGCGCATCGGGCTTCCATACAATCGATAGATTGTC
GCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTATACCCATATAAATCAGCAT
CCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCT
CATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGA
GCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACA AATAGGGGTTCCGCGCAC
ATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTA
ACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

6.2 Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Evelin Rammul

(sünnikuupäev: 19.09.1990)

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

“pCMV-Luc705 reportersüsteemi disain ja valideerimine“,

mille juhendajad on MSc Kalle Pärn ja PhD Kaido Kurrikoff,

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **05.28.2013** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 28.05.2013