

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Indrek Etverk

**Oligonukleotiidide rakusisene lokaliseerimine raku siseneva peptiidi
PepFect14 vahendatud transpordil**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Annely Lorents, *PhD*
Prof. Margus Pooga

TARTU 2013

Sisukord

Sisukord.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 Endotsütoos	5
1.1.1 Endosoomide rakusisene suunamine ja ainete endosoomidest väljumine.....	6
1.2 Terapeutilised oligonukleotiidid ja nende transport rakkudesse	8
1.3 Rakku sisenevad peptiidid	10
1.3.1 RSP-de seondumine rakumembraaniga ning rakku sisenemine.....	11
1.3.2 Lastmolekuli sidumine RSP-ga	13
1.4 Transportaanid.....	13
1.5 PepFect-id.....	14
1.6 Koristusretseptorid	16
1.6.1 Koristusretseptorite klass A.....	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1 Töö eesmärk	18
2.2 Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1 Kasutatud rakuliin	18
2.2.2 Kasutatud transportpeptiid ja oligonukleotiid	18
2.2.3 PF14-SCO mittekovalentsete komplekside moodustamine	19
2.2.4 PF14-SCO komplekside kolokalisatsioon rakuorganellide markeritega.....	19
2.2.5 Statistika	20
2.3 Tulemused	20
2.3.1 PF14-SCO komplekside rakusisene lokaliseerumine.....	20
2.4 Arutelu	25
KOKKUVÕTE.....	28
SUMMARY	29
KASUTATUD KIRJANDUS	31
Tänuõnad.....	37
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	38

KASUTATUD LÜHENDID

DIC	diferentsiaal-interferents kontrastmikroskoopia (<i>differential interference contrast microscopy</i>)
ER	endoplasmaatiline retiikulum
mRNA	informatsiooni RNA (<i>messenger RNA</i>)
PF14	PepFect14
QN	trifluorometüülkvinoliin (<i>trifluoromethylquinoline</i>)
RSP	rakku sisenev peptiid
SCO	splaisimist korrigeeriv oligonukleotiid (<i>splice correction oligonucleotide</i>)
TP10	transportaan 10

SISSEJUHATUS

Tänapäeval on geenide ekspressioonitaseme reguleerimine erinevate nukleiinhapete abil perspektiivikas meditsiiniharu. Paraku ei ole potentsiaalsed terapeutilised nukleiinhapped võimelised iseseisvalt rakkudesse sisenema ja seetõttu on vajalik välja töötada efektiivne meetod nende rakkudesse transportimiseks. Bioaktiivsete makromolekulide raku toimetamiseks võib kasutada näiteks viirusvektoreid või lipofektsiooni, kuid tihti võib efektiivse meetodi kasutamisega kaasneda patsiendile ohtlikke kõrvalmõjusid või ohutu meetod osutub ebaefektiivseks.

Üheks transpordivektorite klassiks on raku sisenevad peptiidid (RSP-d), mille eelisteks võrreldes teiste transpordimeetoditega on kõrge efektiivsus erineva suurusega lastmolekulide transpordil rakkudesse nii *in vitro* kui *in vivo* ning madal toksilisus. Tuntud transportpeptiidi TP10-e (transportaan 10) baasil on välja töötatud keemiliselt modifitseeritud nn teise põlvkonna RSP-de perekond nimega PepFect, mis on näidanud suurepäraselt geeniekspressiooni mõjutavate nukleiinhapete rakkudesse toimetamise võimet. Samas enne kui peptiidsed transpordivektorid saab meditsiinis ja biotehnoloogias kasutusele võtta, tuleb kindlaks teha nende täpne sisenemise mehhanism, rakusisene liikumine/suunamine ja selle võimalikud kõrvalmõjud rakule.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida PepFect-ide perekonda kuuluva raku siseneva peptiidi PepFect14-e ning splaissimist korrigeeriva oligonukleotiidi mittekovalentsete komplekside rakusisest lokalisatsiooni. Seetõttu uuriti nimetatud komplekside võimalikku rakusisest suunamist endoplasmaatilisse retiikulumi, Golgi kompleksi või mitokondritesse sõltuvalt ajast.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

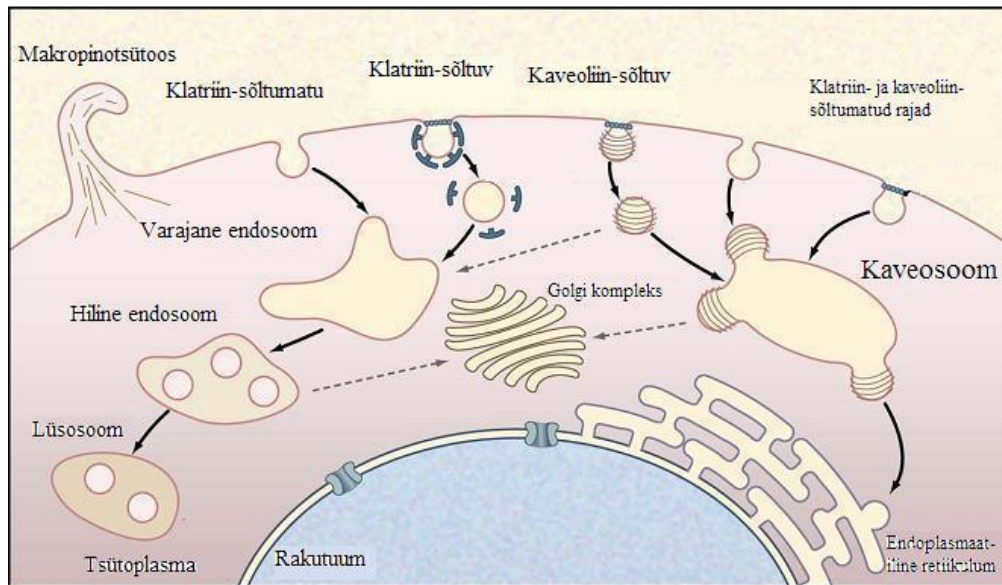
1.1 Endotsütoos

Rakku ümbritseb fosfolipiidsest kaksikkihist ja selles paiknevatest valkudest koosnev plasmamembraan, mis on selektiivseks barjääriks raku sise- ja väliskeskkonna vahel. Raku plasmamembraani ülesandeks on kaitsta rakku väliste mõjutuste eest ja samal ajal tagada raku ainevahetus väliskeskkonnaga. Rakule eluliselt vajalikud väikesed molekulid (näiteks suhkrud, ioonid ja aminohapped) pääsevad rakku mitmete spetsialiseerunud pumpade ja kanalite vahendusel, ent suuremad molekulid sisenevad rakku endotsütoosi teel.

Endotsütoos jaguneb fagotsütoosiks ja pinotsütoosiks. Fagotsütoosiks on võimelised vaid mõned rakutüübid, näiteks makrofaagid ja neutrofiilid, mis kasutavad fagotsütoosi apoptootiliste rakkude ning organismi tunginud patogeenide eemaldamiseks. Pinotsütoosi esinemist on aga leitud kõikides rakutüüpides ning selle abil omastavad rakud vedelikke koos neis lahustunud makromolekulidega (Alberts jt., 2008). Pinotsütoosi jagatakse omakorda mitmesse alaliiki: klatriin-vahendatud endotsütoos, kaveoliin-sõltuv endotsütoos, klatriin- ja kaveoliin-sõltumatu endotsütoos ning makropinotsütoos (joonis 1) (Conner ja Schmidt, 2003).

Klatriin-vahendatud endotsütoos (joonis 1) esineb kõikides imetajarakkude tüüpides (Sahay jt., 2010). Klatriin-vahendatud endotsütoosi puhul haaratakse plasmamembraanil olev retseptor koos temaga seondunud ligandiga membraanil olevasse kindlasse alasse, mida nimetatakse kaetud lohuks. Lohkude peamiseks struktuurseks üksuseks on tsütosoolis asuv valk nimega klatriin-1, kuid klatriini seondumiseks plasmamembraaniga on vajalikud ka mitmed adaptorvalgud, näiteks AP-2 ja AP180. Klatriini ja adaptorvalkude interkatsiooni tulemusena tekib umbes 120 nm läbimõõduga vesiikul, mis eemaldatakse plasmamembraani küljest väikese GTPaasi (GTP-d lagundav valk) dünamiini poolt (Pucadyil ja Schmid, 2009).

Kaveoliin-sõltuv endotsütoos (joonis 1) esineb eelkõige lihasrakkudes, endoteeli rakkudes, fibroblastides ja adipotsüütides (Doherty ja McMahon, 2009) ning toimub plasmamembraanis olevates kolesteroolirikastes alades, mida nimetatakse lipiidseteks parvedeks (*lipid rafts*) (Simons ja Toomre, 2000). Kaveoolid on 60-80 nm läbimõõduga membraanisopistused, mille tekkeks on vajalik valk nimega kaveoliin-1 (Doherty ja McMahon, 2009). Kaveoolide eemaldamine plasmamembraanilt toimub samuti dünamiini abil (Nabi, 2009).



Joonis 1. Erinevad endotsütoosirajad. Endotsütoosirajade jaotus ja endotsüteeritud materjali rakusisene suunamine (Marsh ja Helenius, 2006 järgi).

Makropinotsütoos (joonis 1) on klatriin- ja kaveoliin-sõltumatu endotsütoosi liik, mida iseloomustab suurte, kuni 1 μm läbimõõduga vesiikulite teke. Makropinotsütoosi aktiveerivad tavaliselt kasvufaktorid, mis omakorda kutsuvad esile signaalikaskaadi, mille tulemusena toimub raku aktiinifilamentide dünaamika muutus ning plasmamembraani lainetamine (*ruffling*). Aktiini tsütoskeleti ümberkorralduste tulemusena indutseeritakse raku pinnal pikkade jätkete teke, mis tagasi membraanile langedes moodustavad makropinotsütootilisi vesiikuleid ehk makropinosoome (Mercer ja Helenius, 2009).

Lisaks on leitud veel mitmeid **klatriinist- ja kaveoliinist sõltumatuid endotsütoosiradu**, mille regulatsioonimehhanismid on veel täpselt teadmata.

1.1.1 Endosoomide rakusisene suunamine ja ainete endosoomidest väljumine

Endotsütoosi kaudu rakku sisenenud ained võidakse sõltuvalt endotsütoosirajast ning aine iseloomust suunata erinevatesse rakusisestesse kompartmentidesse. Membraanilt punguvad vesiikulid viiakse esmalt kergelt happelise keskkonnaga (pH \sim 6) varastesse endosoomidesse, kus toimub ainete sorteerimine, mille tulemusena saadetakse endosoomidega rakku sisenenud materjal transpordivesiikulite abil tagasi plasmamembraanile, suunatakse lüsosoomidesse lagundamisele, viiakse endoplasmaatilisse retiikulumi (ER-i) või Golgi kompleksi. Lagundamisele suunatud ained viiakse multivesikulaarsetesse kehadesse, mis ühinevad hiliste endosoomidega ning hiljem lüsosoomidega, kus toimub ainete lagundamine. Iga järgnev

endosomaalse vesiikuli liik on eelnevast madalama pH-ga, mille tekitavad endosoomide membraanis olevad prootonipumbad, mis hoiavad vesiikulites vesinikuioonide kontsentratsiooni ümbritsevast tsütosoolist kõrgemana (Alberts jt., 2008).

Kaveoliin-sõltuva endotsütoosi puhul on näidatud, et plasmamembraanil moodustunud vesiikulid võivad liikuda otse ER-i ja Golgi kompleksi, mis võib olla seotud ER-ist ja Golgi aparaadist ekslikult raku pinnale viidud ainete tagasiviimisega neisse organellidesse või raku sisenenud ainete ER-is lagundamisele suunamisega (Le ja Nabi, 2003).

Endotsütoosi teel sisenevad rakkudesse ka paljud ravimid, mis suunatakse rakusiseselt enamasti lüsoosoomidesse lagundamisele ning seetõttu on ravimite bioloogilise efekti avaldumiseks vajalik nende väljumine endosoomidest (Varkouhi jt., 2011).

Ainete endosoomidest vabanemiseks on mitu võimalust, näiteks poori moodustamine endosoomi membraani (Huang jt., 2004), endosoomi pH puhverdamine (Lin ja Engbersen, 2008), peptiidide fuseerumine endosoomi membraaniga (Wagner jt., 1992) ning endosoomi membraani fotodünaamiline lõhkumine (Nishiyama jt., 2006)

Poori moodustumine endosoomi membraani võib toimuda mitme mehhanismi kaudu, näiteks tünni (*barrel-stave*) või toroidikujulise (*toroidal*) kanali moodustumise läbi, mida on näidatud katioonsete amfifilsete peptiidide puhul. Tünnimudelisel toimub pärast peptiidimolekulide membraanilipiididega seondumist peptiidimolekulide tünnikujuline klasterdumine. Klastris olevad peptiidid muudavad oma orientatsiooni membraaniga risti olevaks ning moodustavad niimoodi membraani poori. Toroidikujuline kanal moodustub kui peptidiagregaadid sisenevad membraanilipiidide vahele, millele järgneb membraani paindumine sissepoole (Jenssen jt., 2006).

Endosoomi pH puhverdamine ehk “prootonkäsna efekt” (*proton sponge*) toimub suure puhverduvõimega ainete abil, mis seovad madala pH juures prootoneid. Protoneerumine põhjustab tugeva vee sissevoolu endosoomidesse, mistõttu endosoomides suureneb osmootne rõhk ja membraan katkeb (Lin ja Engbersen, 2008). pH-d on võimelised puhverdama näiteks histidiini-rikkad molekulid (Pack jt., 2000) ning klorokviini analoog trifluourometüülkvinoliin (QN) (Marches ja Uhr, 2004).

Peptiidide fuseerumine endosoomide membraaniga on enamike viiruste meetod endosoomidest vabanemiseks ning toimub viiruse valkudes olevate peptiidijärjestuste abil, mis madala pH juures, näiteks endosoomides, muudavad oma konformatsiooni ning fuseeruvad endosoomi membraani lipiidega, muutes membraani läbilaskvaks. Selline peptiid on näiteks gripiviiruse kapsiidivalgu hemaglutiniini subühik HA-2 (Wagner jt., 1992).

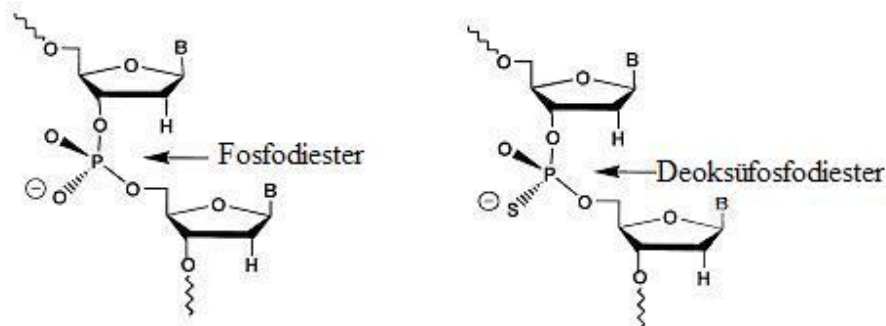
Fotodünaamiline membraani lõhkumine põhineb rakku viidud valgustundlike molekulide kasutamisel, mis lokaliseeruvad pärast rakku sisenemist endosoomide ja lüsoosoomide membraanides või nende lähedal. Pärast vastavale molekulile sobiva lainepikkusega ergastamist tekitavad sellised molekulid reaktiivseid hapnikuradikaale, mis lõhuvad vesiikuli membraani ja seetõttu vabaneb endosoomi sisu tsütosooli (Nishiyama jt., 2006).

1.2 Terapeutilised oligonukleotiidid ja nende transport rakkudesse

Terapeutilised oligonukleotiidid on pärilikkusaine (kas RNA või DNA) molekulid, mille eesmärk on tekitada rakus terapeutiline efekt ning nende kasutamine meditsiinis geeniekspressiooni reguleerimiseks on muutumas üha populaarsemaks. Terapeutilisi oligonukleotiide leidub mitmeid, näiteks RNA interferentsi esile kutsuvad oligonukleotiidid ja informatsiooni RNA (mRNA) splaissimist muutvad oligonukleotiidid.

RNA interferentsi esile kutsuvad molekulid lõigatakse *Dicer* ensüümi poolt lühikesteks üheaheelalisteks RNA juppideks, mis seonduvad RNA poolt indutseeritud vaigistamiskompleksiga. RNA poolt indutseeritud vaigistamiskompleksi koosseisus olev lühike üheaheelaline RNA molekul seonduv endale vastava mRNA molekuliga komplementaarsusprintsibi alusel ning mRNA molekul lagundatakse, muutes sellelt valgu sünteesi võimatuks (Alberts jt., 2008). Tänapäevaks on kirjeldatud mitmeid erinevaid RNA molekule, mida saab kasutada geeniekspressiooni maha surumiseks RNA interferentsi abil (Li ja Rana, 2012).

Splaissimist korrigeerivad oligonukleotiidid (SCO-d) on terapeutiliste nukleiinhapete liik, mis mõjutavad RNA splaissimist. Splaissimise käigus eemaldatakse eel-mRNA-st mittekodeerivad järjestused ehk intronid, ning alternatiivse splaissimise kaudu saab ühest eel-mRNA molekulist sünteesida mitu erinevat mRNA molekuli, mis omakorda transkribeeritakse erinevateks valkudeks. See mehhanism toimib omamoodi genoomivõimendina, sest alternatiivsete splaissimisvariantide olemasolu on näidatud 75%-l inimese geenidest (Alberts jt., 2008), samuti peetakse inimeste geneetilistest haigustest 50%-l põhjuseks ebakorrekse splaissimise tõttu tekkinud mittefunktsionaalseid valke (Bauman jt., 2009). SCO-d seonduvad eel-mRNA-s splaissimissaitidele ning blokeerivad sellega splaissimist läbi viivate valkude seondumise neisse kohtadesse. Seega saab nende abil taastada kas valesti splaissitava geeni korrektse splaissimise, tekitada uue, tavaolukorras mitte esineva splaissimisvariandi või mõjutada alternatiivset splaissimist. Viimase mehhanismi puhul toimub samaaegselt ebasoovitava geenivariandi ekspressiooni maha surumine ning eelistatud variandi võimendamine



Joonis 2. Looduslik fosfodiesterside (vasakul) ning eemaldatud hapnikuaatomiga fosfodiesterside (paremal). “B” tähistab nukleotiidide asukohta (Manoharan, 1999 järgi).

(Mercatante jt., 2002). SCO- de puhul on samas probleemiks nukleiinhappe molekuli lagundamine raku nukleaaside poolt enne kui terapeutiline efekt saab avalduda.

Selle vältimiseks on katsetatud erinevaid keemiliselt modifitseeritud SCO molekule (Kurreck, 2003), näiteks 2'-*O*-metüüldeoksüfosforotioaat modifikatsioon. Sellise molekuli puhul on läbi viidud kaks keemilist muutust: RNA molekulis looduslikult esinevast fosfodietersidemest on üks hapnikuaatom eemaldatud (deoksüfosfodiester) (joonis 2) (Crooke, 1998) ning deoksüriboosi 2' positsioonis oleva süsinikuaatomi külge on ühendatud metüülrühm, mis vähendab SCO seondumist nukleaasidega ning parandab seondumist sihtmärgiks oleva RNA järjestusega. 2' positsioon on valitud modifikatsiooni asukohaks, sest see muudab molekuli lipofiilsemaks ja parandab sellega rakkudesse sisenemist, parandab molekuli stabiilsust sünteesi ajal ning pärast ravimina manustamist (Cummins jt., 1995).

Terapeutilise iseloomuga nukleiinhapete sisenemist rakkudesse takistab nende suur molekulmass ja negatiivne laeng. Selleks, et tagada oligonukleotiidi rakkudesse pääsemine ja efekti avaldamine on kasutusele võetud mitmeid erinevaid transfektsioonimeetodeid, mille võib üldiselt jagada kaheks: viirustel põhinevad transpordivektorid ja mitteviiruslikud transfektsioonimeetodid.

Viirustel põhinevatest vektoritest on enim kasutatud retroviiruseid, lentiviiruseid (näiteks HIV), adenoviiruseid ja rõugeviirust. Viirused sisenevad raku ja algatavad seal enda genoomi ekspressiooni, seega asendades viiruse genoomis osa viiruse geene meie huvipakkuvat oligonukleotiidi kodeeriva järjestusega, saab viiruse muuta väga efektiivseks geeniteraapia vahendiks (Pack jt., 2005). Viirusvektorite peamiseks puuduseks on nende võimalik ohtlikkus, näiteks võib viirusvektori patsiendi genoomi integreerumine aktiveerida mõne onkogeeni ja tekitada patsiendil vähkkasvaja (Woods jt., 2003).

Mitteviiruslike transfektsioonimeetodite korral kasutatakse lastmolekuli raku toimetamiseks erinevaid kandjamolekule (näiteks polümeere, lipiide või peptiide), mis moodustavad nukleiinhapetega komplekse ja kaitsevad sel viisil oligonukleotiide lagundamise eest. Saadud kompleksid sisenevad rakkudesse endotsütoosi teel (Pack jt., 2005).

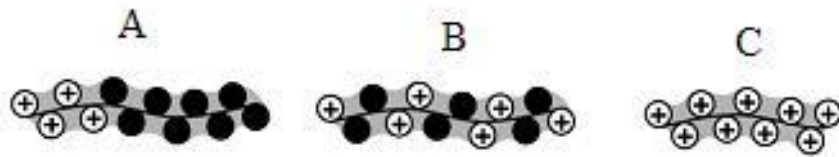
Lipiidel põhinevate vektorite eelisteks on komplekside valmistamise lihtsus ja kasutamise ohutus võrreldes viirusvektoritega ning seetõttu on nad ühed levinumad nukleiinhapete transfektsioonivahendid (Guo jt., 2010). Transportvektoritena saab kasutada neutraalseid lipiide, näiteks DOPC-i (1,2-oleüül-sn-glütsero-3-fosfokoliin), mille korral on komplekside valmistamisel võimalik siduda 65% nukleiinhapest (Landen Jr jt., 2005) või katioonseid lipiide, näiteks DOTAP-i (1-oleüül-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-bensoksüdiazool-4-üül)amino]heksanoüül]-3-trimetüülammooniumpropan), mis on üks levinumaid nukleiinhapete transfektsiooniks kasutatavaid katioonseid lipiide (Terp jt., 2012).

Polümeeridel põhinevaid oligonukleotiidikomplekse on võimalik valmistada näiteks polüetüleenimiinist, mida on kasutatud nukleiinhapete transpordiks nii *in vitro* kui *in vivo* selle võime tõttu kondenseerida nukleiinhappeid ning siseneda rakkudesse endotsütoosi teel. Polüetüleenimiini eeliseks on veel “prootonkäsna efekti” abil endosoomidest väljumine (Urban-Klein jt., 2004), kuid suureks puuduseks on tsütotoksilisus (Pack jt., 2005).

Üheks perspektiivikaks kandjamolekulide klassiks on raku sisenevatel peptiididel põhinevad transpordivektorid, mis on näidanud kõrget efektiivsust ja madalat toksilisust erinevate ühendite rakkudesse viimisel (Fonseca jt., 2009).

1.3 Raku sisenevad peptiidid

Makromolekulide raku viimiseks saab kasutada RSP-sid, mis on lühikesed (tavaliselt vähem kui 30-st aminohapest koosnevad) ning enamasti katioonsed ja/või amfipaatsed molekulid, mis suudavad tungida läbi rakke ümbritseva plasmamembraani ja toimetada sinna nendega liidetud lastmolekule (Heitz jt., 2009). Amfipaatsus tähendab seda, et molekulis esinevad selgelt eristatavad hüdrofoobne ja hüdrofiilne osa. Tavaliselt on hüdrofoobne osa C-terminaalses otsas ning hüdrofiilne N-terminaalses (Jafari jt., 2013). RSP-dega komplekseeritult on rakkudesse viidud näiteks plasmiidset DNA-d (Eguchi jt., 2001), liposoomi (Torchilin jt., 2001), raua nanoosakesi (Lewin jt., 2000), peptiidset nukleiinhapet (Pooga jt., 1998b), SCO-d (Ezzat jt., 2011) ning väikest interfereeruvat RNA-d (siRNA) (Simeoni jt., 2003). Tähelepanuväärne on see, et nimetatud lastmolekulid võivad ületada RSP-de molekulmassi 100-kordselt ning transpordi käigus ei kaota need oma bioloogilist aktiivsust (Chugh jt., 2010).



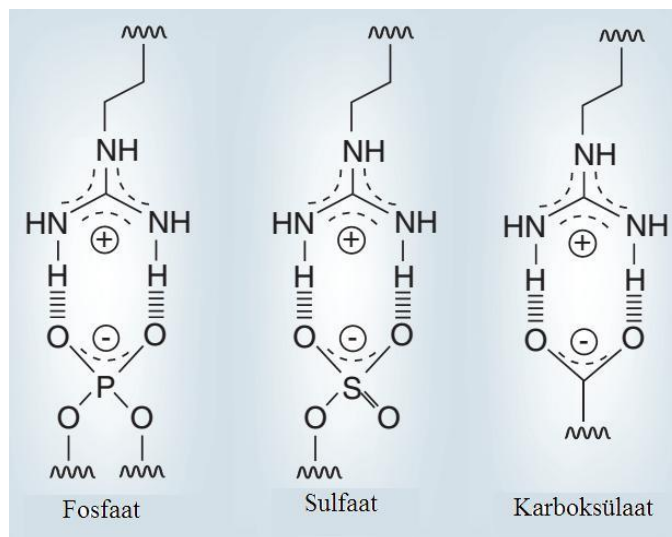
Joonis 3. RSP-de grupid amfipaatsuse järgi. A - primaarsed amfipaatsed RSP-d; B - sekundaarsed amfipaatsed RSP-d; C - mitteamfipaatsed RSP-d. Hüdrofoobsed aminohapped on tähistatud musta ringiga ning positiivsed aminohapped “+”-märgiga ringiga (Ziegler, 2008 järgi).

Raku sisenevaid peptiide on klassifitseeritud mitmel viisil, millest üks võimalus on jagada need päritolu järgi looduslikeks järjestusteks, kimäärseteks (sisaldavad erinevatest allikatest pärinevaid järjestusi, mis on omavahel ühendatud) ning sünteetilisteks peptiidideks. Suurim ning enim uuritud grupp on valkudest pärinevate peptiidide klass (Lindgren jt., 2010).

See klassifikatsioon ei anna aga ülevaadet peptiidide omaduste kohta ning seega võivad päritolu järgi samasse klassi kuuluvad peptiidid olla vägagi erinevate omadustega. Seetõttu pakkus Ziegler välja alternatiivse, tänapäeval rohkem kasutusel oleva klassifitseerimisviisi, mis jagab RSP-d kolme gruppi nende amfipaatsuse alusel: primaarsed- ja sekundaarsed amfipaatsed RSP-d ning mitteamfipaatsed RSP-d (joonis 3). Primaarsed amfipaatsed RSP-d (näiteks transportaanid) on üldjuhul pikemad kui 20 aminohappejääki ning nende primaarstruktuuris on järjestikku paiknevad hüdrofiilsed ja –foobsed domeenid. Sekundaarsed amfipaatsed RSP-d (näiteks *Drosophila* Antennapedia valgust pärinev penetratiin) on üldjuhul lühemad kui 20 aminohappejääki (Ziegler, 2008) ning sisaldavad vaheldumisi paiknevaid hüdrofoobseid ja –fiilseid aminohappeid. Seega sekundaarsete amfipaatsete RSP-de amfipaatsus avaldub alles siis kui peptiid on seondunud membraanilipiididega ning omandanud vastava sekundaarstruktuuri, milleks võib olla alfa-heeliks (Dathe jt., 1996) või beeta-leht (Blazyk jt., 2001). Kolmandasse gruppi kuuluvad mitteamfipaatsed RSP-d (näiteks oligoarginiinid), mis on tavaliselt üsna lühikesed ja koosnevad enamjaolt katioonsetest aminohapetest (Ziegler, 2008).

1.3.1 RSP-de seondumine rakumembraaniga ning rakku sisenemine

Vaatamata 20-e aasta jooksul läbi viidud intensiivsetele uuringutele ei ole RSP-de täpne rakkudesse sisenemise mehhanism endiselt teada, ehkki arvatakse, et see sõltub mitmest faktorist, näiteks peptiidi kontsentratsioonist plasmamembraanil, keskkonna temperatuurist (Fretz jt., 2007), RSP laengust ning lastmolekuli suuruselt (Tünnemann jt., 2006). Edukaks rakku sisenemiseks on vajalik seondumine raku pinnale ning kuna RSP-d on tavaliselt positiivselt



Joonis 4. Arginiini koosseisus oleva guanidiinigrupi seondumine erinevate raku pinnal olevate molekulidega. Bidentaalne vesinikside tekib vesiniku ja hapniku aatomite vahel (Walrant jt., 2012 järgi).

laetud, siis nad moodustavad sidemeid mitmete raku plasmamembraani anioonsete komponentidega, näiteks negatiivselt laetud valkude (Nisole jt., 1999) ja fosfolipiididega (Golebiewska jt., 2006). Oluline on ka peptiidi aminohappeline koostis, näiteks kõrge arginiinisaldusega peptiidid seonduvad plasmamembraaniga paremini kui teisi positiivseid aminohappeid, näiteks lüsiini sisaldavad peptiidid. Põhjuseks peetakse arginiinis sisalduvat guanidiinigrupi, mis moodustab raku pinnal olevate molekulidega stabiilse bidentaalse (*bidental*) vesiniksideme (joonis 4) (Rothbard jt., 2004). Samuti on näidatud, et raku pinnal olevad negatiivsed suhkrumolekulid glükoosaminoglükaanid seonduvad paremini arginiiniga kui lüsiiniga. Glükoosaminoglükaanide karboksüül- ja sulfaatühmad moodustavad katioonsete RSP-dega samuti vesiniksidemeid, mis aitavad peptiidil kinnituda raku pinnale (Mitchell jt., 2000).

Esiõlgseid katsed RSP-dega näitasid, et peptiidid olid võimelised rakkudesse sisenema ka madalal temperatuuril (Vivès jt., 1997), kui keskkonnast oli eemaldatud ATP (Derossi jt., 1996) ning kui rakke oli töödeldud endotsütoosi inhibiitoritega (Suzuki jt., 2002). Samuti leiti, et RSP-de sisenemine ei sõltu peptiidi primaarstruktuurist, mis tähendab, et ei toimu RSP ning plasmamembraanil olevate retseptorite seondumist (Wender jt., 2000). Seetõttu arvati, et RSP-d ei vaja rakku sisenemiseks endotsütoosi ega spetsiifiliste valgulistest transporterite abi, vaid sisenemine toimub otse läbi plasmamembraani lipiidse kaksikkihi (Vivès jt., 1997, Derossi jt., 1996).

Ent 2003. aastal näitasid Richard ja kaastöötajad, et eelnevate tulemuste saamisel kasutatud rakkude fikseerimismeetod mõjutab oluliselt RSP-de paiknemist rakkudes ning tekitab

artefakte. Samuti näitasid nad, et arginiinirikaste peptiidide (Tat peptiid ning nonaarginiin) puhul toimub sisenemine endotsütoosi teel (Richard jt., 2003). Pärast seda on uuesti uuritud mitmete RSP-de rakkudesse sisenemise mehhanisme ning leitud, et RSP-d võivad rakkudesse siseneda makropinotsütoosi (Wadia jt., 2004), klatriin-vahendatud endotsütoosi (Rinne jt., 2007) ning kaveoliin-sõltuva (Säälik jt., 2009) endotsütoosi kaudu. Samuti on näidatud, et sisenemismehhanismi valik sõltub lastmolekuli suurusest ning RSP positiivse laengu tugevusest -väiksema lastmolekuli või tugevama positiivse laengu korral võib toimuda RSP-lastmolekuli komplekside otsene membraani läbimine, suurema lastmolekuli või RSP väiksema positiivse laengu korral aga endotsütoos (Tünnemann jt., 2006).

1.3.2 Lastmolekuli sidumine RSP-ga

Lastmolekuli rakku transportimiseks on vajalik selle konjugeerimine RSP-ga, milleks on mitu võimalust. Algselt kasutati lastmolekuli ja RSP ühendamiseks **kovalentset** sidet. Kovalentselt seotud peptiidi-lastmolekuli konjugaadid saadakse tavaliselt peptiidi ja kargo keemilise sidumisega disulfiidsildadega (Derossi jt., 1998) või konjugaadi ekspresseerimisega kloonitud nukleinhappejärjestuselt (Zatsepin jt., 2005). Selliste meetodite eelisteks on võimalus täpselt kontrollida saadava konjugaadi struktuuri ning stöhhiomeetriat, puudusteks on aga protseduuri keerukus ning oht vähendada lastmolekuli bioloogilist aktiivsust (Heitz jt., 2009).

Tänapäeval eelistatakse **mittekovalentse** kompleksi moodustamist, mille eeliseks on valmistamise kiirus, lihtsus ja odavus ning lastmolekuli bioloogilise aktiivsuse säilimine. Mittekovalentne sidumine põhineb RSP ja lastmolekuli elektrostaatilisel tõmbumisel (Heitz jt., 2009). Sealjuures on tähtis ka RSP ja lastmolekuli laengute suhe, näiteks kui RSP molekule on ühe lastmolekuli kohta liiga palju on pärast rakku sisenemist lastmolekuli dissotsiatsioon RSP molekulide küljest raskendatud (Hoyer ja Neundorf, 2012).

1.4 Transportaanid

Transportaan on 27-e aminohappe pikkune kimäärne peptiid, mille esialgne nimetus galparaan tulenes valkude nimedest, millest pärinevad selle RSP loomiseks kasutatud järjestused. Esimesed 12 aminohapet pärinevad neuropeptiidi galaniini N-terminaalsest otsast ning viimased 14 aminohapet herilasemürgis leiduvast peptiidsest toksiinist mastoparaanist. Kahte järjestust ühendab 13. positsioonis aminohape lüsiin, mille külge saab siduda erinevaid lastmolekule ning seetõttu nimetati galparaan ümber transportaaniks (Pooga jt., 1998a). Transportaan disainiti ja sünteesiti esmakordselt 1996. aastal (Langel jt., 1996). Transportaani rakku penetreeruvad

omadused ilmsid nii 37 °C, 4 °C kui ka 0 °C juures, millest järeldati, et peptiidi sisenemine ei sõltu raku energiaalsetest protsessidest ning toimub raku pinnal olevatest retseptoritest sõltumatult membraani otsese läbimise teel (Pooga jt., 1998a). Hiljem on näidatud, et olukord on tunduvalt keerulisem. Leiti, et transportaani ja lastmolekuli komplekside rakkudesse sisenemine toimub pigem endotsütoosi teel või kasutades endotsütoosi ja membraani läbimist paralleelselt ning sisenemise mehhanismi valikut mõjutab ka komplekside kontsentratsioon plasmamembraanil (Padari jt. 2005).

TP10 on transportaani lühendatud analoog, mille loomiseks eemaldati transportaani N-terminaalsest otsast kuus galaniinist pärinevat aminohapet, mis siiski säilitas peptiidi võime rakkudesse siseneda (Soomets jt., 2000). On näidatud, et TP10 on isegi efektiivsem lastmolekulide rakku transportija kui transportaan ning enamus teisi rohkemuuritud RSP-sid (El-Andalousi jt., 2007). Transportaan ja TP10 ei seonu raku pinnal olevatele galaniinireseptoritele ning seetõttu arvatakse, et need peptiidid seonduvad otse plasmamembraaniga (Soomets jt., 2000). TP10-e lipiidsete mudelmembraanidega seondumise kineetika uurimine tõestas seda teooriat ning seetõttu pakuti välja mudel, mille kohaselt TP10-e molekulide membraaniga seondumine põhjustab membraanis häireid, mille leevendamiseks translokeeruvad TP10-e molekulid läbi plasmamembraani ning see võimaldab omakorda rakku pääseda muudel molekulidel (Yandek jt., 2007).

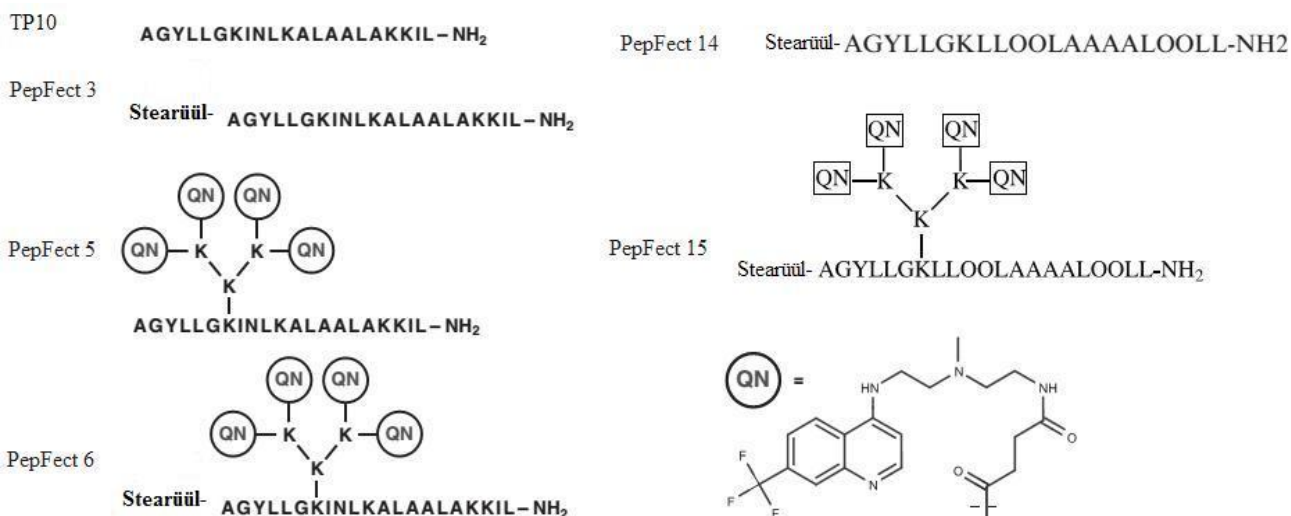
1.5 PepFect-id

Viimastel aastatel on arendatud TP10-l põhinevat nn teise põlvkonna RSP-de perekonda nimetusega **PepFect**, mis loodi spetsiaalselt nukleiinhapete rakkudesse transportimiseks. PepFectide puhul on peptiidi ja nukleiinhappe komplekside rakkudesse sisenemise ja endosoomidest vabanemise võime parandamiseks läbi viidud keemilisi modifikatsioone, näiteks lisati peptiidi struktuuri stearüülrühm (Anko jt., 2012).

On teada, et peptiidide sidumine rasvhapetega võib suurendada nende rakku sisenemise võimet. Mõne peptiidi puhul on täheldatud, et rasvhapetega seotud peptiid suudab rakku tungida, samas kui ilma seotud rasvhapetega analoog seda ei suuda (Avbelj jt., 2011). Arvatakse, et rasvhappe rühm muudab peptiidi ja nukleiinhappe kompleksi hüdrofoobsemaks ning lipofiilsemaks ja parandab seega membraani läbimise võimet. Samas ei saa seda lugeda universaalseks meetodiks, sest näiteks penetraatiini ja nonaarginiini puhul see meetod rakku sisenemise efektiivsust ei parandanud (Mäe jt., 2009).

Lisaks stearüülhappejäägile kasutati PepFectide loomisel trifluorometüülkvinoliini (QN), mis suurendab endosoomidest vabanemist “prootonkäsna efekti” abil (Anko jt., 2012). Praeguseks on disainitud ja uuritud mitmeid PepFect-e (joonis 5). **PepFect3** on TP10, mille N-terminaalsesse otsa on lisatud stearüülhappejääk. **PepFect4** on TP10, millele on lisatud stearüülhappejääk 7. positsioonis oleva lüsiini külge (El-Andaloussi jt., 2011a). **PepFect5** saadi, kui TP10-e 7. positsioonis oleva lüsiinjäägi külge lisati kolmest lüsiinist koosnev lüsiinipuu, millele omakorda kinnitati kovalentselt neli suksinüleeritud QN-i molekuli. **PepFect6-e** puhul rakendati nii N-terminaalset stearüülilisandit kui seitsmendas positsioonis oleva lüsiini külge QN-i molekulide lisamist, mille tulemusena näitas PepFect6 võrreldes eelnevate peptiidikonstruktiividega märkimisväärselt paremat võimet nukleiinhappeid rakku transportida ning endosoomidest vabastada (El-Andaloussi jt., 2011b).

PepFect14 (PF14) puhul asendati stearüül-TP10-e struktuuris olevad lüsiinid ning isoleutsiinid vastavalt ornitiinide ja leutsiinidega jättes alles 7. positsioonis oleva lüsiini (Ezzat jt., 2011), sest on näidatud, et polüornitiinil on võrreldes polülüsiiniga kuni 10 korda suurem võime rakke transfekteerida. Arvatakse, et see tuleneb ornitiini võimest siduda DNA-d paremini kui lüsiin ning see võimaldab omakorda tekkida stabiilsematel nukleiinhappe ja peptiidi kompleksidel (Ramsay ja Gumbleton, 2002). Samuti arvatakse, et kuna ornitiin on ebestandartne aminohape, on ta seerumiproteaasidele (valke lagundavad ensüümid) raskemini äratuntav. PF14-e ja nukleiinhappe kompleksid säilitavad suure osa oma aktiivsusest ka pärast komplekside kuivatamist ning mitme nädala jooksul kõrgematel temperatuuridel (40 °C ja 60 °C) hoiustamist. Pärast tahkel kuival kujul säilitamist uuesti lahustatud ning rakkudele lisatud kompleksid näitasid rakkude transfekteerimisel värskelt valmistatud kompleksidega võrreldavat efektiivsust ning see omadus võib tulevikus muuta võimalikuks tableti kujul manustatavate geeniekspressiooni mõjutavate ravimite loomise (Ezzat jt., 2011). PF14-e ja nukleiinhappe komplekside summaarne laeng on negatiivne, mistõttu võiks arvata, need kompleksid ei sisene samal viisil nagu positiivselt laetud RSP-d, kuna raku pinnal olevate negatiivselt laetud glükoosaminoglükaanide ja/või membraanilipiididega seondumist eeldatavasti ei toimu. Seetõttu arvati, et nende rakku sisenemisel on tegemist retseptorite poolt vahendatud endotsütoosiga ning mitmeid polüanioonseid ligande siduvate koristusretseptorite (*scavenger receptors*) perekond tundus sobiv kandidaat. Kui rakke töödeldi enne komplekside lisamist mitmete koristusretseptorite inhibiitoritega vähenes komplekside rakkudesse sisenemise efektiivsus drastiliselt. Täpsemalt leiti, et PF14-e ja nukleiinhappe kompleksid seonduvad raku pinnal koristusretseptorite klassi A kuuluvate SCARA3-e ja SCARA5-ga (Ezzat jt., 2012). Pärast seondumist sisenevad kompleksid



Joonis 5. PepFectide perekonna RSP-d ning nende algmolekul TP10. Ebestandartne aminohape ornitiin on tähistatud tähega “O” (Ezzat jt., 2011, El Andaloussi jt., 2011, Lindberg jt., 2013 järgi).

rakkudesse peamiselt klatriin-sõltuva (Hassane jt., 2011) või kaveoliin-sõltuva (Veiman jt., 2012) endotsütoosi teel.

PepFect15-e disainimisel sooviti ühendada PF14-e efektiivsus rakkude transfekteerimisel ning PF6-e võime endosoomidest pääseda. Selleks modifitseeriti PF14-e molekuli sarnaselt PF6-e molekulile nelja QN-ga (joonis 3), mille tulemusena saadi peptiid, mis näitas võrreldes PF14-ga SCO rakkudesse viimisel kaks korda suuremat efektiivsust (Lindberg jt., 2013).

1.6 Koristusretseptorid

Koristusretseptorid on raku pinnal olev glükoproteiinide perekond (Peiser ja Gordon, 2001), mis on võimelised endaga siduma väga erinevaid ligande, näiteks gramnegatiivseid ja -positiivseid baktereid, valke, polüribonukleotiide, polüsahhariide ja lipiide (Martínez jt., 2011). Koristusretseptoreid kirjeldati esmakordselt 1979. aastal kui uuriti aterosklerootilistes faagilaikudes tekkivaid lipiididega täitunud makrofaage (Goldstein jt., 1979) ning alates esmasest kirjeldamisest on koristusretseptorite perekond märkmisväärselt täienenud, koosnedes praeguseks kaheksast klassist, mis on üksteisest üsna erineva struktuuriga, kuid seovad sarnaseid ligande (Murphy jt., 2005).

1.6.1 Koristusretseptorite klass A

Selle klassi esindaja eraldati esmakordselt veise kopsu mRNA-st ning oli esimene koristusretseptor, mis suudeti kloonida (Kodama jt., 1990, Rohrer jt., 1990). Koristusretseptorite klassi A kuulub seitse liiget: SR-AI/II/III, MARCO (kollageense struktuuriga makrofaagi retseptor, nimetatud ka SCARA2-ks (Jiang jt., 2006)), SCARA3, SCARA4 ja SCARA5 (DeWitte-Orr jt., 2010). SR-AI/II/III-e ning MARCO-t ekspresseeritakse enamasti makrofaagides, endoteeli- ning silelihasrakkudes (Murphy jt., 2005), SCARA3-e fibroblastides (Han jt., 1998), SCARA4-a endoteeli (Ohtani jt., 2001) ja SCARA5-e epiteeli rakkudes (Jiang jt., 2006).

Hiljuti on näidatud klass A koristusretseptorite, täpsemalt SCARA3-e ja SCARA5-e osalust peptiidi-nukleiinhappe komplekside rakkudesse transpordil (Ezzat jt., 2012).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärk

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida nn teise põlvkonna rakku siseneva peptiidi PepFect14-e ning splaissingut korrigeeriva oligonukleotiidi mittekovalentsete komplekside rakusisest lokaliseerumist võrreldes endoplasmaatilise retiikulumi, Golgi kompleksi ja mitokondritega pärast 30- ja 60- minutilist inkubatsiooni.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud rakuliin

Antud töös kasutati HeLa pLuc705 rakuliini. Rakke kasvatati 100 mm diameetriga koekultuuri tassidel (*Greiner BioOne*, Saksamaa ja *BD Falcon*, USA) 37 °C inkubaatoris 5% CO₂ sisalduse juures IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes (*PAA Laboratories GmbH*, Austria), millele oli lisatud 10% veise loote vereseerumit (*PAA Laboratories GmbH*, Austria) ning 100 IU/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomüsiini (*Invitrogen*, USA).

HeLa on inimese emakakaelavähi kasvajast pärinev rakuliin, mis on üks enimkasutatavaid koekultuuri rakuliine. Antud töös kasutatud rakuliinis on HeLa rakud stabiilselt transfekteritud rekombinantse pLuc plasmiidiga, mis sisaldab reportervalk lutsiferaasi kodeerivat geenijärjestust, millesse on sisestatud inimese β-globiini geeni intron. Intronis asuv mutatsioon takistab lutsiferaasi eel-mRNA korrektset splaissimist ja seega lutsiferaasi sünteesi. Transportvektorite abil rakkudesse lutsiferaasi eel-mRNA splaissimist parandavat oligonukleotiidi viies oleks võimalik tekkiva luminesentsi tugevuse järgi hinnata nukleiinhappe transpordi efektiivsust (Kang jt., 1998).

2.2.2 Kasutatud transportpeptiid ja oligonukleotiid

Katsetes kasutati PepFect14 nimelist rakku sisenevat peptiidi (stearüül-AGYLLGKLLLOOLAAAALLOOLL-NH₂, „O“ tähistab ornitiini), mis sünteesiti *t*-Boc strateegiat kasutades Stockholmi Ülikooli Neurokeemia ja Neurotoksikoloogia instituudis või Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

2'-*O*-metüüldeoksüfosforotioaat keemilise modifikatsiooniga splaissingut korrigeeriva oligonukleotiidi (5'-CCU CUU ACC UCA GUU ACA-3') (*Microsynth AG*, Šveits) 5' terminusse

on lisatud RSP-SCO komplekside visualiseerimise võimaldamiseks fluorestseeruv märgis tsüaniin 5 (Cy5).

2.2.3 PF14-SCO mittekovalentsete komplekside moodustamine

PF14-e ja SCO mittekovalentsed kompleksid moodustati enne rakkudele lisamist 1/10 lahuse lõppruumalast. PF14-e kontsentratsioon lõppmahus oli 1 μM ning SCO lõppkontsentratsioon 200 nM. Komplekside moodustamiseks pipeteeriti esmalt tuubi SCO lahust, siis Milli-Q (*EMD Millipore*, USA) filtreeritud ja deioniseeritud vett ning seejärel lisati PF14. Lahus suspendeeriti ja kompleksidel lasti formuleeruda toatemperatuuril ühe tunni jooksul. Pärast tunni möödumist viidi lahuse ruumala lõppmahuni seerumvaba IMDM söötmega.

2.2.4 PF14-SCO komplekside kolokalisatsioon rakuorganellide markeritega

HeLa pLuc705 rakud külvati 8-kannulistesse kambritesse (*Thermo Fischer Scientific*, USA) tihedusega 15.000 rakku kannu kohta 2 ööpäeva enne eksperimenti. Katse päeval inkubeeriti rakke kõigepealt 2 tundi 37 °C juures seerumvabas IMDM söötmes. Edasine töötlus sõltus kasutatud markerist.

Golgi kompleksi visualiseerimiseks kasutati punase fluorestseeruva märgisega (BODIPY TR) tseramiidi (*Molecular Probes*, USA). Rakke inkubeeriti tseramiidiga (lahjendusega 1:10) seerumvabas IMDM söötmes 30 minutit jääl, seejärel lisati komplekse sisaldav lahus ning inkubeeriti lisaks 30 minutit või 60 minutit 37 °C juures.

Endoplasmaatiline retiikulumi visualiseerimiseks kasutati *Blue-White DPX* märgisega (sinine, fluorestsentsi emissioonimaksimum sõltuvalt keskkonnast 430 nm-st 640 nm-ni) markerit (*Molecular Probes*, USA). Rakke inkubeeriti PF14-SCO komplekside ning 0,2 μM ER markerit sisaldava seerumvaba söötmega 30 minutit või 60 minutit 37 °C juures.

Mitokondrite visualiseerimiseks kasutati markerit nimega *MitoTracker® Red* (*Molecular Probes*, USA), mis on märgitud punase fluorestseeruva värviga CMXRos (klorometüül-X-rosamiin). Rakke inkubeeriti 10 nM *MitoTracker®*-it sisaldava seerumvaba söötmega 30 minutit 37 °C juures. Seejärel eemaldati märgist sisaldav lahus ning rakke inkubeeriti komplekse sisaldava seerumvaba söötmega 30 minutit 37 °C juures.

Pärast inkubeerimist PF14-SCO komplekside ja markeriga pesti rakke kaks korda seerumvaba IMDM söötmega ning lisati värske seerumvaba sööde. Seejärel analüüsiti rakke konfokaalmikroskoobiga Olympus FV1000 (*Olympus Corporation*, Jaapan), kasutades 100x

suurendusega õliimmersioonobjektiivivi ning programmi Olympus Fluoview 3.1a (*Olympus Corporation*, Jaapan).

Iga rakuorganelli markeri ja ajapunktiga viidi läbi kolm katset.

2.2.5 Statistika

PF14-SCO komplekside ja märgitud rakuorganellide kolokalisatsiooni hindamiseks loeti 105-s rakus (35 rakku katse kohta) komplekside hulk ja kolokaliseeruvate komplekside hulk. Töös on välja toodud kolokaliseeruvate komplekside hulk (protsentides) kõikidest rakkudes loendatud kompleksidest. Samuti on välja arvatud rakkude protsent populatsioonist, milles leidis märgitud organellidega kolokaliseeruvaid komplekse.

2.3 Tulemused

2.3.1 PF14-SCO komplekside rakusisene lokaliseerumine

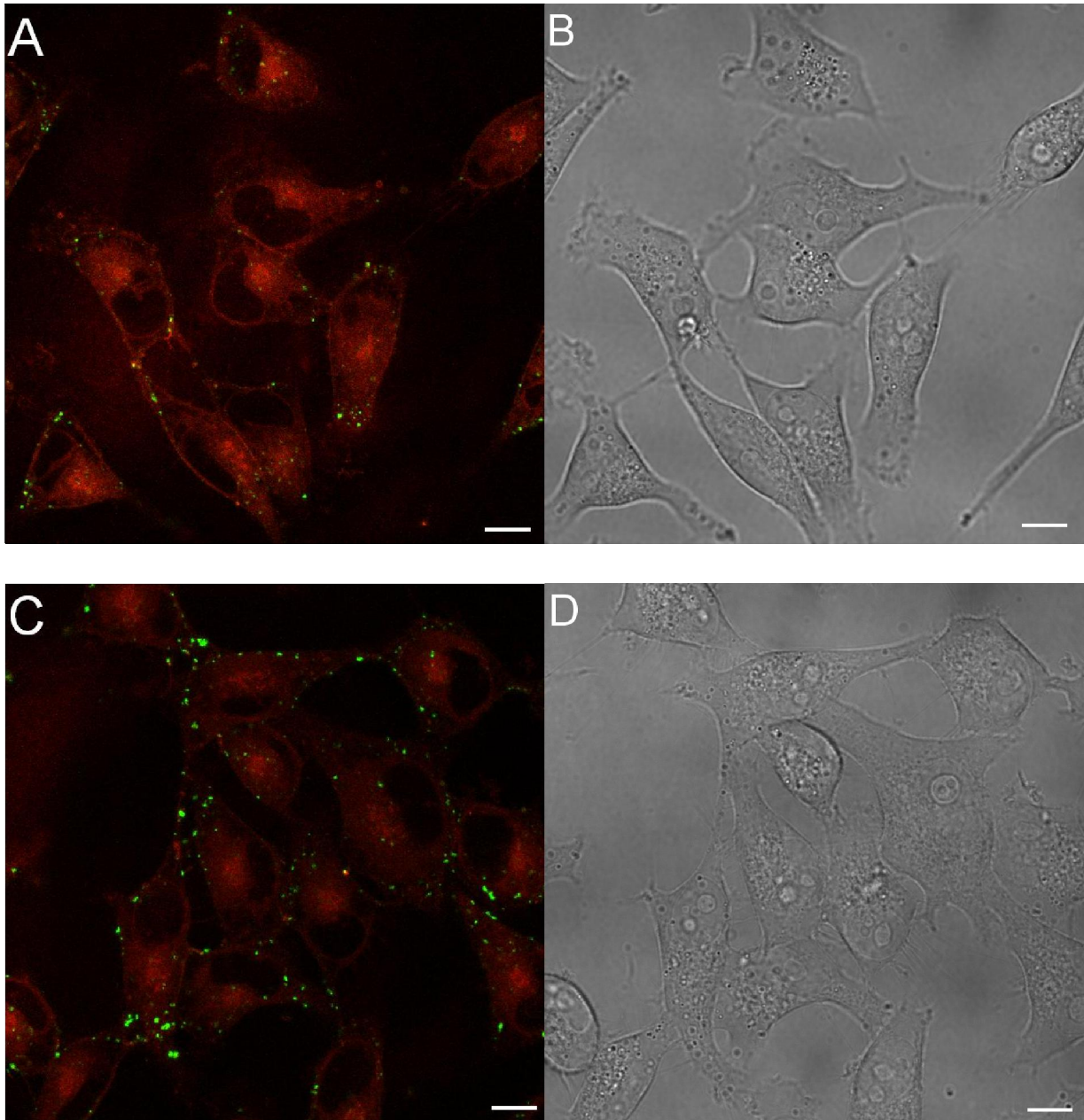
Komplekside rakusisese lokaliseerumise uurimiseks inkubeeriti HeLa pLuc705 rakke rakuorganelle (Golgi kompleks, ER ja mitokondrid) märkivate fluorestseeruvate markeritega ning PF14-SCO mittekovalentsete kompleksidega. Analüüs teostati konfokaalmikroskoobiga Olympus FV1000. Järeltöötamise käigus muudeti ER-i markeriga läbi viidud katsete puhul ER-i signaal pseudopunaseks ja kõikide katsete puhul PF14-SCO komplekside signaal pseudoroheliseks, et kolokaliseeruv signaal oleks kergemini tuvastatav.

Kõikide katsete puhul oli näha, et rakku siseneva peptiidi PepFect14-ga seotud splaissingut korrigeeriv oligonukleotiid oli võimeline rakkudesse sisenema (joonis 6-8). Kuigi suur osa peptiid-oligonukleotiid komplekse olid nii pärast 30-minutilist kui ka 60-minutilist inkubatsiooni plasmamembraambraanil või selle vahetus läheduses, toimus siiski ka nende sisenemine vesikulaarsel teel (endotsütoos). Kõikide katsete puhul asusid PF14-SCO kompleksid ka rakusiseselt vesiikulites ning difuusset fluorestsentsisignaali tsütoplasmas (ehk siis tsütosoolis vabalt paiknemist) ei detekteeritud. Sisenenud komplekside hulk sõltus ajast – pärast 60-minutilist inkubatsiooni leidis komplekse rakkudes rohkem kui pärast 30-minutilist inkubatsiooni.

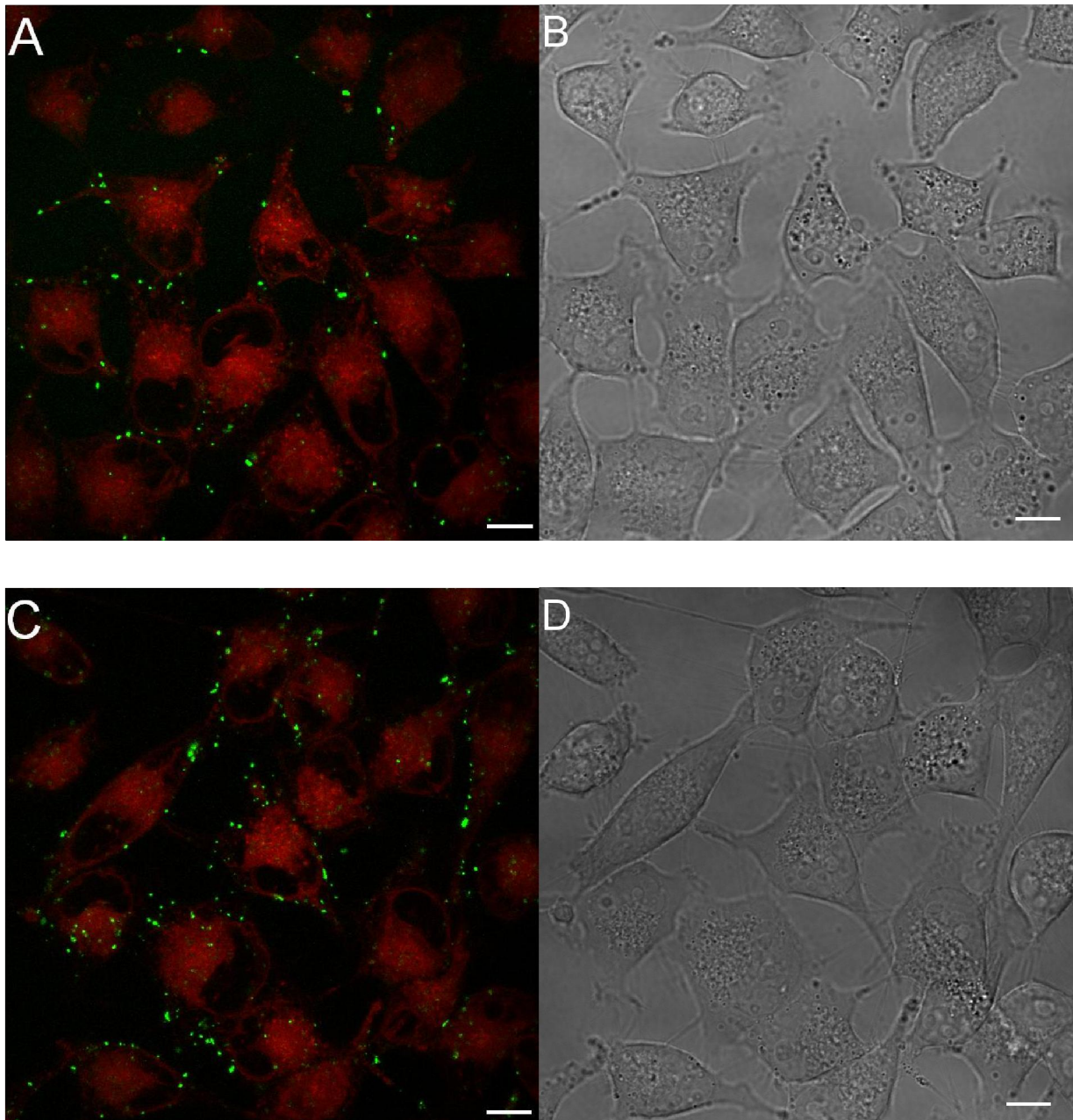
Rakkudesse sisenenud komplekse detekteeriti enamasti väljaspool Golgi võrgustikku asuvates vesiikulites, kuid mõned üksikud PF14-SCO komplekse sisaldavad vesiikulid suunati ka Golgi kompleksi (joonis 6). Kuigi kogu uuritud rakupopulatsioonist võis 30-minutilise inkubatsiooni järel PF14-SCO komplekse sisaldavaid vesiikuleid näha Golgi võrgustikus 17,1%-s

rakkudest, asus tegelikult kõikidest rakku sisenenud kompleksidest Golgi kompleksis vaid 1,9% (joonis 6A). Pärast 60 minutist inkubatsiooni oli olukord sarnane, kuid komplekse oli Golgi aparati suunatud veel vähem (joonis 6C). Golgi võrgustikuga kolokaliseeruvaid PF14-SCO komplekse leidis vaid 6,7%-s rakkudest ning kõikidest rakkudes leitud kompleksidest asus Golgi võrgustikus vaid 1,16%.

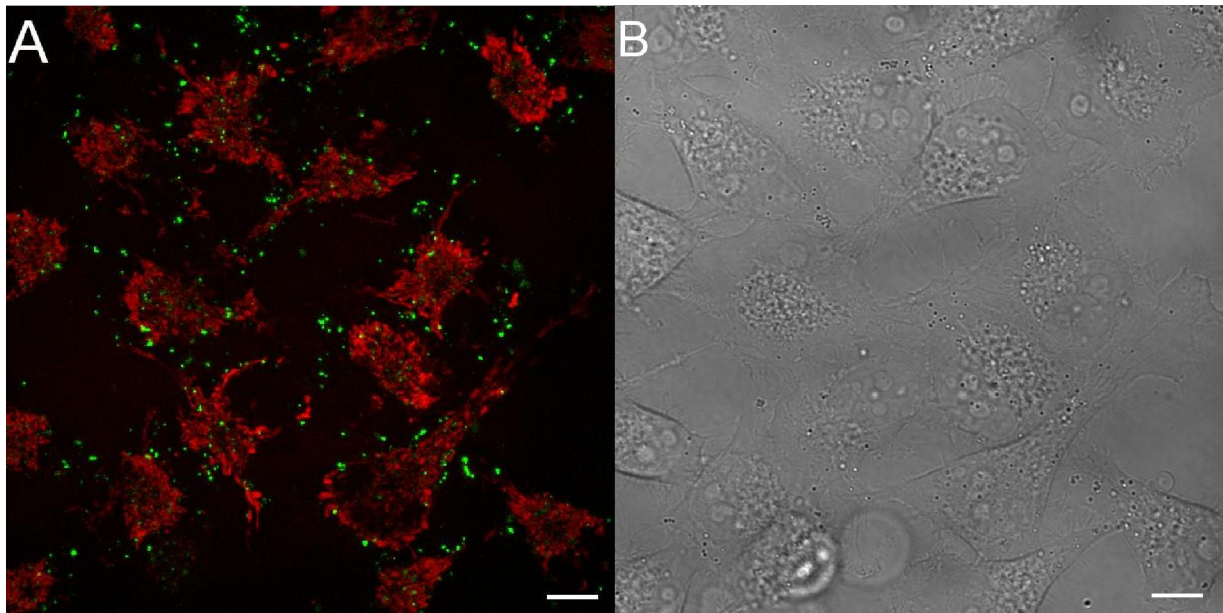
ER võrgustiku visualiseerimisel ei õnnestunud ei 30-minutilise ega 60-minutilise PF14-SCO kompleksidega inkubatsiooni järel nende ER-i suunamist tuvastada (joonised 7A,C). Samuti mitokondrite visualiseerimisel ei detekteeritud pärast 30-minutist inkubatsiooni mitokondritega kolokaliseeruvaid peptiid-oligonukleotiid komplekse (joonis 8).



Joonis 6. PF14-SCO komplekside lokalisatsioon võrreldes Golgi kompleksiga. HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti Golgi kompleksi markerit suhtel 1:10 sisaldava lahusega 30 minutit jääl, seejärel lisati 1 μM PF14-e ja 200 nM SCO kompleksid ning inkubeeriti rakke 37 °C juures 30 minutit (A,B) või 60 minutit (C,D). PF14-SCO komplekside signaal on muudetud järeltötluse käigus pseudoroheliseks. Pildidel B ja D on DIC-i (differentsiaal-interferents kontrastmikroskoopia) kujutis. Mõõtlõigu pikkus on 10 μm .



Joonis 7. PF14-SCO komplekside lokaliseerimine võrreldes ER-iga. HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti 1 μM PF14-e ja 200 nM SCO komplekside ning 0,2 μM ER-i markeriga 37 $^{\circ}\text{C}$ juures 30 minutit (A,B) või 60 minutit (C,D). ER-i markeri signaal on muutunud järeltöötamise käigus pseudopunktsaaks ja PF14-SCO komplekside signaal pseudopunktsaaks. Pildidel B ja D on DIC-i kujutis. Mõõtlõigu pikkus on 10 μm .



Joonis 8. PF14-SCO komplekside lokaliseerimine võrreldes mitokondritega. HeLa pLuc705 rakke inkubeeriti 10 nM *Mitotracker*[®]-i lahusega 30 min 37 °C juures ning seejärel 1 μM PF14-e ja 200 nM SCO kompleksidega 30 minutit 37 °C juures. PF14-SCO komplekside signaal on muudetud järeltötluse käigus pseudoroheliseks. Pildil B on DIC-i kujutis. Mõõtlõigu pikkus on 10 μm.

2.4 Arutelu

RSP-de keemiliselt modifitseeritud perekonna PepFect loomise eesmärgiks oli erinevate terapeutilise iseloomuga nukleiinhapete rakkudesse transportimise efektiivsuse suurendamine. Selleks lisati tuntud transportpeptiidi TP10-e struktuuri stearüülrühm ning mõne PepFecti puhul ka endosoomidest vabanemist soodustav trifluorometüülkvinoliinrühm (Mäe jt., 2009). Uuemate PepFect-ide puhul on TP10-e primaarstruktuuris olevad lüsiinid ning isoleutsiinid asendatud vastavalt ornitiinide ja leutsiinidega, mis suurendab peptiidi stabiilsust *in vivo* tingimustes (Lindberg jt., 2013). Käesolevas töös kasutatud rakku sisenev peptiid PepFect14 on näidanud väga head nukleiinhapete rakkudesse transportimise võimet mitmes rakuliinis, sealhulgas ka raskesti transfekteeritavates rakuliinides (Ezzat jt., 2011, Veiman jt., 2012). PF14 moodustab nukleiinhapetega seondudes negatiivse laenguga mittekovalentseid komplekse, mis ei sisene rakkudesse varem RSP-de puhul täheldatud mehhanismide kaudu. Nimelt kõik varem leitud RSP-de rakkudesse sisenemise mehhanismid eeldavad elektrostaatiliste interaktsioonide tekkimist RSP ning negatiivselt laetud plasmamembraanikomponentide vahel, mida anioonsed PF14-nukleiinhappe kompleksid elektrostaatilise tõukumise tõttu teha ei saa. PF14-nukleiinhappe komplekside puhul leiti, et need on võimelised rakkudesse sisenema koristusretseptorite klassi A kuuluvate SCARA3-e ja SCARA5-e poolt vahendatud (Ezzat jt., 2012) klatriin- või kaveoliin-sõltuva endotsütoosi teel (Juks, 2012).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida PF14-e ja splaiissingut korrigeeriva 2'-*O*-metüüldeoksüfosforotioaat-modifikatsiooniga oligonukleotiidi mittekovalentsete komplekside rakusisest lokalisatsiooni HeLa pLuc705 rakkudes ja nende võimalikku suunamist endoplasmaatilisse retiikulumi, Golgi kompleksi või mitokondritesse.

Katsete tulemustest selgus, et PF14-SCO kompleksid sisenevad rakkudesse vesikulaarsel teel (endotsütoos) ning pärast 60-minutilist inkubatsiooni leidis komplekse rakkudes rohkem kui pärast 30-minutilist inkubatsiooni. Samas jäävad enamus peptiid-oligonukleotiid komplekse pärast rakkudesse sisenemist plasmamembraani lähedale. Varem on näidatud, et PF14-SCO kompleksid paiknevad pärast retseptor-vahendatud (SCARA3 ja SCARA5) endotsütoosi endiselt retseptoritega seotult plasmamembraani lähedal ka pärast 30-minutilist inkubeerimist 37 °C juures (Ezzat jt., 2012). See võib selgitada ka antud töös saadud tulemusi, mis näitasid suurema osa PF14-SCO komplekside lokaliseerumist plasmamembraani lähedal olevates vesiikulites pärast 30- minutilist inkubeerimist.

Varem on näidatud, et kaveoliin-sõltuva endotsütoosi teel sisenenud materjal võidakse viia plasmamembraanilt otse nii ER-i kui ka Golgi kompleksi (Le ja Nabi, 2003) ning seetõttu võidakse osa PF14-SCO komplekse suunata neisse organellidesse. Samas meie tulemused näitavad, et ER-is ei olnud PF14-SCO komplekse sisaldavate vesiikulite lokaliseerumine tuvastatav ning Golgi kompleksis leidis vaid väga väheseid PF14-SCO komplekse sisaldavaid vesiikuleid (pärast 30-minutilist inkubatsiooni vaid ~2% ja pärast 60-minutilist inkubatsiooni vaid ~1% kõikidest rakus olevatest vesiikulitest oli suunatud Golgi kompleksi). Kuna katsete tulemustes ei nähtud PF14-SCO komplekside difuusset signaali, mis näitaks komplekside paiknemist tsütosoolis väljaspool vesiikuleid, võib arvata, et suurem osa retseptorist vabanenud komplekse on suunatud endolüsoosomaalsesse ratta. Komplekse sisaldavate vesiikulite osaline lokaliseerumine Golgi kompleksis siiski näitab, et üksikud vesiikulid võivad sattuda pärast rakkudesse sisenemist Golgi kompleksi.

Varasemalt on näidatud, et RSP-d ei suuda läbida mitokondreid ümbritsevat membraani ning ei sisene seetõttu mitokondritesse (Ross jt., 2004). See on kooskõlas käesolevas töös saadud tulemustega, mis näitavad, et PF14-SCO komplekse sisaldavad vesiikulid ei kolokaliseeru mitokondritega. Komplekside sisenemine mitokondritesse oleks rakule kahjulik, sest mitokondreid ümbritseva membraani läbimine RSP-de poolt võib kaasa tuua membraanipotentsiaali kadumise, mis omakorda võib viia raku apoptoosi suunamiseni (Tait ja Greene, 2010) ning seetõttu on hea, et PF14-SCO komplekse ei suunata pärast raku sisenemist mitokondritesse.

Kuigi käesolevas töös saadud tulemustes ei nähtud rakkudes PF14-SCO komplekside difuusset signaali rakkude tsütoplasmas, mis näitaks komplekside vabanemist endosomaalsetest vesiikulitest, on varasemalt näidatud PF14-SCO komplekside kõrget geeniekspressiooni taastamise võimet HeLa pLuc705 rakkudes, mis eeldab komplekside vabanemist endosoomidest. Antud uurimuses nähti pärast 4-tunnist inkubatsiooni PF14 ning 200 nM SCO kompleksidega ning järgnenud 20-tunnist inkubatsiooni seerumit sisaldavas söötmes 37 °C juures 170-kordset lutsiferaasi aktiivsuse kasvu võrreldes töötlemata kontrollrakkudega (Ezzat jt., 2012). Selline tulemus näitab, et oli toimunud PF14-SCO komplekside vabanemine endosoomidest tsütosooli. Käesolevas töös nähtud komplekside valdav paiknemine endosomaalsetes vesiikulites võib seega olla seletatav ka oluliselt lühema (30-60 minutit) inkubatsiooniajaga, mis on komplekside endosoomidest vabanemiseks liiga lühike.

Järeldusena võib öelda, et pärast 30- ja 60-minutilist HeLa pLuc705 rakkude inkubeerimist PF14-SCO kompleksidega leiti, et ei ole toimunud komplekse sisaldavate

vesiikulite suunamist ER-i ja mitokondritesse ning on toimunud vaid vähene suunamine Golgi kompleksi.

KOKKUVÕTE

Geeniteraapia on tänapäeval üks suurima potentsiaaliga meditsiinivaldkondi. Geenide ekspressioonitaset saab reguleerida erinevate terapeutiliste nukleiinhapete, näiteks RNA interferentsi esile kutsuvate väikeste RNA molekulide või mRNA splaissimist mõjutavate SCO-de, abil. Paraku on sellised nukleiinhappe molekulid iseseisvalt rakku pääsemiseks liiga suure negatiivse laengu ja molekulmassiga ning vajavad seetõttu rakku sisenemiseks transpordivektorite abi. Praegusel ajal kasutatavatel „klassikalistel“ transportvektoritel on aga mitmeid puudusi (näiteks madal efektiivsus) või halbu kõrvalmõjusid (näiteks toksilisus). Üks perpektiivikas transpordivektorite klass on aga rakku sisenevad peptiidid (RSP-d), mis on näidanud erinevate bioaktiivsete lastmolekulide efektiivset transporti rakkudesse ja samal ajal madalat toksilisust. Siiani on aga teadmata RSP-de täpne rakkudesse sisenemise mehhanism, kuigi arvatakse, et enamasti (eriti siis kui peptiidiga on seotud lastmolekul) on tegemist endotsütootilise protsessiga. RSP TP10-e põhjal on loodud keemiliselt modifitseeritud nn teise põlvkonna RSP-de perekond PepFect, mis on näidanud suurt efektiivsust just nukleiinhapete transpordil rakkudesse.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida PepFect-ide perekonda kuuluva RSP PepFect14-e ja splaissimist korrigeeriva oligonukleotiidi rakusisest lokalisatsiooni ning seetõttu uuriti PF14-SCO komplekside võimalikku rakusisest suunamist ER-i, Golgi kompleksi ja mitokondritesse sõltuvalt ajast. Tulemustest selgub, et pärast 30- ja 60-minutilist inkubatsiooni on enamus PF14-SCO komplekse sisaldavaid vesiikuleid lokaliseerunud plasmamembraani lähedale ning rakusiseselt paiknevad kompleksid on enamasti väljaspool uuritud rakuorganelle asuvates vesiikulites. Vähene PF14-SCO komplekse sisaldavate vesiikulite ja uuritud rakuorganellide kolokaliseerumine oli tuvastatav vaid Golgi kompleksi puhul.

Seega antud bakaleureusetöö näitab, et PepFect14-st saab kasutada nukleiinhapete transpordiks rakkudesse. Kuna enamus komplekse ei suunata erinevatesse rakuorganellidesse, võib oletada, et peptiid-oligonukleotiid kompleksid on võimelised pikema aja vältel vabanema endolüsoosomaalsetest vesiikulitest tsütosooli, kus oligonukleotiid saaks oma toimet avaldada

Intracellular localization of oligonucleotides after cell-penetrating peptide PepFect14-mediated transport

Indrek Etverk

SUMMARY

Regulating the expression level of genes has a tremendous potential in medicine. Using therapeutic nucleic acids such as small nucleic acid molecules that take advantage of RNA interference or oligonucleotides that can affect the splicing of mRNA one can direct the amount of protein synthesized from a gene or direct the splicing of mRNA to the direction that is favourable for the patient. But unfortunately nucleic acid molecules are too big and have a strong negative charge to be able to enter cells by themselves and, therefore, they need the help of transport vectors. Current transport vectors show often limited efficiency with high cytotoxicity or low cytotoxicity with poor transport capability and, therefore, it is important to develop means of intracellular transport that is both efficient and safe to use. Cell penetrating peptides are one potential way of achieving this, since they have shown low cytotoxicity and high transport efficiency for delivery of many different-sized cargo molecules. To this date, however, the exact means by which they enter cells is not known. The so-called “second generation” cell penetrating peptide family PepFect was specially designed to transport nucleic acids to cells and has shown great efficiency in doing so.

The main goal of this study was to characterize the intracellular localization of noncovalent complexes formed between a cell penetrating peptide PepFect14 and a splice correcting oligonucleotide. Fluorescent dyes were used to stain the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and mitochondria and HeLa pLuc705 cells were incubated with dyes and PF14-SCO complexes for either 30 or 60 minutes. The results show that after internalization most of the complexes are localized in vesicles close to the plasma membrane of the cells and there are more complexes internalized after 60 minutes than after 30 minutes. Intracellularly the vesicles that contain complexes are located mostly out of the marked organelles. Out of the three studied organelles there was only a slight colocalization of PF14-SCO complexes with the Golgi apparatus and no evident colocalization with either endoplasmic reticulum or mitochondria. After 30 minutes of incubation only ~2% of complexes could be detected in the Golgi apparatus and after 60 minutes ~1%. Colocalizing complexes could be found in ~17% and ~7% of cells in the population, respectively.

In conclusion, PepFect14 can be used to transport nucleic acids into cells. Because most of the PF14-SCO complexes are not trafficked into different cellular organelles, we speculate that the peptide-oligonucleotide complexes are able to escape from endosomes to cytosol during a longer time-period where they could facilitate their biological effect.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2008. *Molecular Biology of The Cell* 5th Edition. p 347-348, 495-497, 590-592, 787-799. Garland Science, New York
- Anko, M., Majhenc, J., Kogej, K., Sillard, R., Langel, Ü., Anderluh, G. and Zorko, M. (2012). Influence of stearyl and trifluoromethylquinoline modifications of the cell penetrating peptide TP10 on its interaction with a lipid membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1818: 915-924
- Avbelj, M., Horvat, S. and Jerala, R. (2011). The Role of Intermediary Domain of MyD88 in Cell Activation and Therapeutic Inhibition of TLRs. *The Journal of Immunology*. 187: 2394-2404.
- Bauman, J., Jearawiriyapaisarn, N. and Kole, R. (2009). Therapeutic potential of splice-switching oligonucleotides. *Oligonucleotides*. 19: 1-13
- Blazyk, J., Wiegand, R., Klein, J., Hammer, J., Epanand, R. M., Epanand, R. F., Maloy, W. L. and Kari, U. P. (2001). A novel linear amphipathic beta-sheet cationic antimicrobial peptide with enhanced selectivity for bacterial lipids. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 27899-27906
- Chugh, A., Eudes, F. and Shim, Y-S. (2010). Cell-Penetrating Peptides: Nanocarrier for Macromolecule Delivery in Living Cells. *Life*, 62(3): 183–193
- Conner, S. D. and Schmidt, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 422: 37-44
- Crooke, S. T. 1998. Basic principles of antisense therapeutics. p 1-50 *In* Crooke, S. T. (Ed). *Antisense Research and Application Vol 13*. Springer, Berlin.
- Cummins, L. L., Owens, S. R., Risen, L. M., Lesnik, E. A., Freier, S. M., McGee, D., Guinasso, C. J. and Cook, P. D. (1995). Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity. *Nucleic Acids Research*. 23: 2019-2024
- Dathe, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O. and Bienert, M. (1996). Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry*. 35: 12612-12622
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1996). Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 271 No 30: 18188-18193
- Derossi, D., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1998). Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends in Cell Biology*. 8: 84-87
- DeWitte-Orr, S. J., Collins, S. E., Bauer, C. M. T., Bowdish, D. M., Mossman, K. L. (2010). An Accessory to the 'Trinity': SR-As Are Essential Pathogen Sensors of Extracellular dsRNA, Mediating Entry and Leading to Subsequent Type I IFN Responses. *PLoS Pathogens*. 6: 1-15
- Doherty, G. J. and McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*. 78: 857
- Eguchi, A., Akuta, T., Okuyama, H., Senda, T., Yukoi, H., Inokuchi, H., Fujita, S., Hayakawa T., Takeda, K., Hasegawa, M. and Nakanishi, M. (2001). Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 26204-26210

- El-Andaloussi, S., Järver, P., Johansson, H., J. and Langel, Ü. (2007). Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *Biochemical Journal*. 407: 285-292
- El-Andaloussi, S., Lehto, T., Lundin, P. and Langel Ü. 2011a. Application of Pepfect Peptides for the Delivery of Splice-Correcting Oligonucleotides. p. 361-373. *In* Langel, Ü. (Ed), Cell- Penetrating Peptides-Methods and Protocols. Humana Press, New York
- El-Andaloussi, S., Lehto, T., Mäger, I., Rosenthal-Aizman, K., Oprea, I. I., Simonson, O. E., Sork, H., Ezzat, K., Copolovici, K. M., Kurrikoff, K., Viola, J. R., Zaghoul, H. M., Sillard, R., Johansson, H. J., Hassane, F. S., Guterstam, P., Suhorutšenko, J., Moreno, P. M. D., Oskolkov, N., Hälldin, J., Tedebark, U., Metspalu, A., Lebleu, B., Lehtiö, J., Smith, C. I. E. and Langel, Ü. (2011b). Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Research*. Vol. 39, No. 9: 3972-3987
- El-Sayed, A. ja Harashima, H. (2013). Endocytosis of Gene Delivery Vectors: From Clathrin dependent to Lipid Raft-mediated Endocytosis. *The American Society of Gene & Cell Therapy*. In Press
- Ezzat, K., El-Andaloussi, S., Zaghoul, E. M., Lehto, T., Lindberg, S., Moreno, P. M. D., Viola, J. R., Magdy, T., Abdo, R., Guterstam P., Sillard, R., Hammond, S. M., Wood, M. J. A., Arzumanov, A. A., Gait, M. J., Smith, C. I. E., Hällbrink, M., and Langel, Ü. (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Research*. Vol. 39, No. 12: 5284–5298
- Ezzat, K., Helmfors, H., Tudoran, O., Juks, C., Lindberg, S., Padari, K., El-Andaloussi, S., Pooga, M. and Langel, Ü. (2012). Scavenger receptor-mediated uptake of cell-penetrating peptide nanocomplexes with oligonucleotides. *The FASEB Journal*. 26: 1172-1180
- Fonseca, S. B., Pereira, M. P. and Kelley, S. O. (2009). Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61: 953–964
- Fretz, M. M., Penning, N. A., Al-Taei, S., Futaki, S., Takeuchi, T., Nakase, I., Storm, G. and Jones, A. T. (2007). Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34+ leukaemia cells. *Biochemical Journal*. 403: 335-342
- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K. and Brown, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *PNAS*. Vol. 76 No. 1: 333-337
- Golebiewska, U., Gambhir, A., Hangyás-Mihályne, G., Zaitseva, I., Rädler, J. and Mclaughlin, S. Membrane-Bound Basic Peptides Sequester Multivalent (PIP₂), but Not Monovalent (PS), Acidic Lipids. *Biophysical Journal*. Vol 91: 588-599
- Guo, P., Coban, O., Snead, N. M., Trebley, J., Hoepflich, S., Guo, S. and Shu, Y. (2010). Engineering RNA for Targeted siRNA Delivery and Medical Application. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62: 650-666
- Han, H. J., Tokino, T. and Nakamura, Y. (1998). CSR, a scavenger receptor-like protein with a protective role against cellular damage caused by UV irradiation and oxidative stress. *Human Molecular Genetics*. 7: 1039-1046
- Hassane, F. S., Abes, R., El Andaloussi, S., Lehto, T., Sillard, R., Langel, Ü. and Lebleu, A. (2011). Insights into the cellular trafficking of splice redirecting oligonucleotides complexed with chemically modified cell-penetrating peptides. *Journal of Controlled Release*. 153: 163-172
- Heitz, F., Morris, M. C. and Divita, G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British Journal of Pharmacology*. 157: 195-206

- Hoyer J. and Neundorff, I. (2012). Peptide Vectors for the Nonviral Delivery of Nucleic Acids. *Accounts on Chemical Research*. 45: 1048-1056
- Huang, H. W., Chen, F. Y., Lee, M. T. (2004). Molecular mechanism of Peptide-induced pores in membranes. *Physical Review Letters*. 92: 198304
- Jafari, M., Karunaratne, D. N., Sweeting, C. M. and Chen, P. (2013). Modification of a Designed Amphipathic Cell-Penetrating Peptide and Its Effect on Solubility, Secondary Structure and Uptake Efficiency. *Biochemistry*. In press
- Jenssen, H., Hamill, P. and Hancock, R.E.W. (2006). Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 18: 491-511
- Juks, C. 2012. Peptiidsete transporterite kasutamine oligonukleotiidide suunamiseks rakkudesse. Magistritöö. Tartu Ülikool.
- Jiang, Y., Oliver, P., Davies, K. E. and Platt, N. (2006). Identification and Characterization of Murine SCARA5, a Novel Class A Scavenger Receptor That Is Expressed by Populations of Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 281 No 17: 11834-11845
- Kang, S-H., Cho, M-J. and Kole, R. (1998). Up-Regulation of Luciferase Gene Expression with Antisense Oligonucleotides: Implications and Applications in Functional Assay Development. *Biochemistry*. 37: 6235-6239
- Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P. and Krieger, M. (1990). Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature*. 343: 531-535
- Kurreck, J. (2003). Antisense technologies-Improvement through novel chemical modifications. *European Journal of Biochemistry*. 270: 1628-1644
- Landen Jr, C. N., Chavez-Reyes, A., Bucana, C., Schmandt, R., Deavers, M. T., Lopez-Berestein, G. and Sood, A. K. (2005). Therapeutic EphA2 Gene Targeting In vivo Using Neutral Liposomal Small Interfering RNA Delivery. *Cancer Research*. 65: 6910-6918
- Langel, Ü., Pooga, M., Kairane, C., Zilmer, M. and Bartfai, T. (1996). A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na⁺,K⁺-ATPase and reverses its inhibition by ouabain. *Regulatory Peptides*. Vol 62 No 1: 47-52
- Le, P. U. and Nabi, I. R. (2003). Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*. 116: 1059-1071
- Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C. H., Tang, X. W., Cory, D., Scadden, D. T. and Wessleder, R. (2000). Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nature Biotechnology*. 18: 410-414
- Li, Z. and Rana, T. M. (2012). Molecular Mechanisms of RNA-Triggered Gene Silencing Machineries. *Accounts of Chemical Research*. Vol 45 No 7: 1122-1131
- Lin, C. and Engbersen, J. F. (2008). Effect of chemical functionalities in poly(amido amine)s for non-viral gene transfection. *Journal of Controlled Release*. 132: 267-272
- Lindberg, S., Munoz-Alarcón, A., Helmfors, H., Mosqueira, D., Gyllborg, D., Tudoran, O. and Langel, Ü. (2013). PepFect15, a novel endosomolytic cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery via scavenger receptors. *International Journal of Pharmaceutics*. 441: 242-247
- Lindgren, M. and Langel, Ü. 2010. Classes and Prediction of Cell-Penetrating Peptides p. 1-5 *In* Langel, Ü. (Ed). *Cell-Penetrating Peptides – Methods and Protocols*. Humana Press. New York
- Mäe, M., El Andaloussi, S., Lundin, P., Oskolkov, N., Johansson, H. J., Guterstam, P. and Langel, Ü. (2009). A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *Journal of Controlled Release*. 134: 221-227

- Manoharan, M. (1999). 2'-Carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1489: 117-130
- Marches, R. and Uhr, J. W. (2004). Enhancement of the p27^{KIP1}-mediated Antiproliferative Effect of Oftrastuzumab (Herceptin) on Her2-overexpressing Tumor Cells. *International Journal of Cancer*. 112: 492-501
- Marsh, M. and Helenius, A. (2006). Virus Entry: Open Sesame. *Cell*. 124: 729-740
- Martínez, V. G., Moestrup, S. K., Holmskov, U., Mollenhauer, J. and Lozano, F. (2011). The Conserved Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily in Therapy and Diagnosis. *Pharmacological Reviews*. 63: 967-1000
- Mercatante, D. R., Mohler, J. L. and Kole, R. (2002). Cellular Response to an Antisense-mediated Shift of Bcl-x Pre-mRNA Splicing and Antineoplastic Agents. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 277 No 51: 49374-49382
- Mercer, J. and Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nature Cell Biology*. 11: 510-520
- Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G. and Rothbard, J. B. (2000). Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *Journal of Peptide Research*. 56: 318-325
- Murphy, J. E., Tedbury, T. R., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J. H. and Ponnambalam, S. (2005). Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*. 182: 1-15
- Nabi, I. R. (2009). Cavin fever: regulating caveolae. *Nature Cell Biology*. 11: 789-791
- Nishiyama, N., Jang Arnida, W. D., Date, K., Miyata, K. and Kataoka, K. (2006). Photochemical enhancement of transgene expression by polymeric micelles incorporating plasmid DNA and dendrimer-based photosensitizer. *Journal of Drug Targeting*. 14: 413-424
- Nisole, S., Krust, B., Callebaut, C., Guichard, G., Muller, S., Briand, J-S. and Hovanessian, A. G. (1999). The Anti-HIV Pseudopeptide HB-19 Forms a Complex with the Cell-surface-expressed Nucleolin Independent of Heparan Sulfate Proteoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 274 No 39: 27875-27884
- Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T. and Kase, T. (2001). The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 44222-44228
- Pack, D. W., Putnam, D. and Langer, R. (2000). Design of imidazole-containing endosomolytic biopolymers for gene delivery. *Biotechnology and Bioengineering*. 67: 217-223
- Pack, D.W., Hoffmann, A. S., Pun, S. and Stayton, P. S. (2005). Design and Development of Polymers for Gene Delivery. *Nature Reviews:Drug Discovery*. 4: 581-593
- Padari, K., Säälík, P., Hansen, M., Koppel, K., Raid, R., Langel, Ü. and Pooga, M. (2005). Cell Transduction Pathways of Transportans. *Bioconjugate Chemistry*. 16: 1399-1410
- Peiser, L. and Gordon, S. (2001). The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes and Infection*. 3: 149-159
- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M. and Langel, Ü. (1998a). Cell penetration by transportan. *The FASEB Journal*. Vol. 12: 67-77
- Pooga, M., Soomets, U., Hällbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., Kahl, U., Hao, J. X., Xu, X. J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Bartfai, T. and Langel, Ü. (1998b). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nature Biotechnology*. 16: 857-861
- Pucadyil, T. J., Schmid, S. L. (2009). Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science*. 325: 1217-1220

- Ramsay, E. and Gumbleton, M. (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. *Journal of Drug Targeting*. Vol. 10, No. 1: 1-9
- Richard, J. P., Melikov, K., Vivès, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V. and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating Peptides: A Reevaluation of the Mechanism of Cellular Uptake. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 278 No 1: 585-590
- Rinne, J., Albarran, B., Jylhävä, J., Ihalainen, T. O., Kankaanpää, P., Hytönen, V. P., Stayton, P. S., Kulomaa, M. S. and Vihinen-Ranta, M. (2007). Internalization of novel non-viral vector TAT-streptavidin into human cells. *BMC Biotechnology*. Vol 7 No 1: 1-14
- Rohrer, L., Freeman, M., Kodama, T., Penman, M. and Krieger, M. (1990). Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature*. 343: 570-572
- Ross, M. F., Filipovska, A., Smith, R. A., Gait, M. J. and Murphy, M. P. (2004). Cell-penetrating peptides do not cross mitochondrial membranes even when conjugated to a lipophilic cation: evidence against direct passage through phospholipid bilayers. *Biochemical Journal*. 383: 457-468
- Rothbard, J. B., Jessop, T. C., Lewis, R.S., Murray, B. A. and Wender, P. A. (2004). Role of Membrane Potential and Hydrogen Bonding in the Mechanism of Translocation of Guanidinium-Rich Peptides into Cells. *JACS*. 126: 9506-9507
- Säälük, P., Padari, K., Niinep, A., Lorents, A., Hansen, M., Jokitalo, E., Langel, Ü. and Pooga, M. (2009). Protein Delivery with Transportans Is Mediated by Caveolae Rather Than Flotillin-Dependent Pathways. *Bioconjugate Chemistry*. 20: 877-887
- Sahay, G., Alakhova, D. Y. and Kabanov, A. V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*. 145: 182-195
- Simeoni, F., Morris, M. C., Heitz, F. and Divita, G. (2003). Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acid Research*. 31(11): 2717-2724
- Simons, K. and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Review Molecular Cell Biology*. 1: 31-39
- Soomets, U., Lindgren M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, M., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R. and Langel, Ü. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochimica et Biophysica Acta* . 1467:165-176
- Suzuki, T., Futaki, S., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K. and Sugiura, Y. (2002). Possible Existence of Common Internalization Mechanisms among Arginine-rich Peptides. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 277 No 4: 2437-2443
- Tait, S. W. G. and Greene, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11: 621-632
- Terp, M. C., Bauer, F., Sugimoto, Y., Yu, B., Brueggemeier, R. W., Lee, J. and Lee, R. J. (2012). Differential efficacy of DOTAP enantiomers for siRNA delivery *in vitro*. *International Journal of Pharmaceutics*. 430: 328-334
- Torchilin, V. P., Rammohan, R., Weissig, V., Levchenko, T. S. (2001). TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *PNAS*. 98: 8786-8791
- Tünnemann, G., Martin, M. M., Haupt, S., Patsch, C., Edenhofer, F. and Cardoso, M. C. (2006). Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *The FASEB Journal*. 20: 1775-1784

- Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubyko, F. and Aigner, A. (2004). RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Therapy*. 12: 461-466
- Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G. and Haisma, H. J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*. 3: 220-228
- Veiman, K.-L., Mäger, I., Ezzat, K., Margus, H., Lehto, T., Langel, K., Kurrikoff, K., Arukuusk, P., Suhorutšenko, J., Padari, K., Pooga, M., Lehto, T. and Langel, Ü. (2012). PepFect14 Peptide Vector for Efficient Gene Delivery in Cell Cultures. *Molecular Pharmaceutics*. 2013, 10: 199-210
- Vivès, E., Brodin, P. and Lebleu, B. (1997). A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 272 No 25: 16010-16017
- Wadia, J. S., Stan, R. V. and Dowdy, S. F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nature Medicine*. Vol 10 No 3: 310-315
- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotton, M. and Birnstiel, M. L. (1992). Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *PNAS*. 89: 7934-7938
- Walrant, A., Bechara, C., Alves, I. D. and Sagan, S. (2012). Molecular partners for interaction and cell internalization of cell-penetrating peptides: how identical are they? *Nanomedicine*. 7: 133-143
- Wender, P. A., Mitchell, D. J., Pattabiraman, K., Pelkey, E. T., Steinman, L. and Rothbard, J. B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *PNAS*. Vol 97 No 24: 13003-13008
- Woods, N. B., Muessig, A., Schmidt, M., Flygare, J., Olsson, K., Salmon, P., Trono, D., von Kalle, C. and Karlsson, S. (2003). Lentiviral vector transduction of NODSCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell risk of insertional mutagenesis. *Blood*. Vol 101 No 4: 1284-1289
- Yandek, L. E., Pokorny, A., Florén, A., Knoelke, K., Langel, Ü. and Almeida, P. F. F. (2007). Mechanism of the Cell-Penetrating Peptide Transportan 10 Permeation of Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*. Vol 92: 2434-2444
- Zatsepin, T. S., Turner, J. J., Oretskaya, T. S. and Gait, M. J. (2005). Conjugates of oligonucleotides and analogues with cell penetrating peptides as gene silencing agents. *Current Pharmaceutical Design*. 11: 3639-3654
- Ziegler, A. (2008). Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60: 580-597

Tänuõnad

Suurim tänu juhendajatele prof. Margus Poogale ja eriti Annely Lorentsile kannatlikkuse ja nõu eest. Samuti tänan heade nõuannete ja abi eest kõiki teisi uurimisgrupi liikmeid. Aitäh! ☺

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Indrek Etverk (sünnikuupäev 8.2.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Oligonukleotiidide rakusisene lokalisatsioon rakku siseneva peptiidi PepFect14 vahendatud transpordil“, mille juhendajad on Annely Lorents ja Margus Pooga,

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

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

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

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

Tartus, 28.5.2013