

TARTU ÜLIKOOL
Bioloogia-geograafiateaduskond
Molekulaar- ja rakubioloogia instituut
Rakubioloogia õppetool

ANNELY LORENTS

**KATIOONSETE PEPTIIDIDE RAKKU SISENEMISE
MEHHAANISMIDE UURIMINE**

Magistritöö

Juhendajad: Margus Pooga, vanemteadur, Ph. D
Sulev Ingerpuu, dotsent, Ph. D

Tartu 2007

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
ENDOTSÜTOOS	5
Endotsütoosi liigid	6
Endotsütootilised organellid rakus	8
RAKKU PENETREERUVAD PEPTIIDID	9
Penetratsioon	9
Penetratiinid	11
Tat perekonna peptiidid	12
Transportaan ja selle analoogid	13
Arginiinirikkad peptiidid	14
Amfipaatsed mudelpeptiidid (MAP)	15
Vaskulaar-endoteliaalsest kadheriinist pärinev peptiid (pVEC)	15
Lastmolekulide sidumine rakkudesse penetreeruvate peptiididega	16
Membraanipotentsiaali osalus raku penetreeruvate peptiidide sisenemisel	18
TÖÖ EESMÄRGID	19
KASUTATUD MATERJALID JA METOODIKAD	20
Rakkude kultiveerimine	20
Kasutatud transportpeptiidid	20
Analüüs läbivoolutsütomeetrial	21
Plasmamembraani potentsiaali mõju peptiidi ning peptiid-avidiin komplekside sisenemisele HeLa rakkudesse	21
Plasmamembraani potentsiaali mõju peptiidi sisenemisel K562 ja Jurkat rakkudesse	22
Suspensioonirakkude depolarisatsiooni hindamine	23
Fluorestsentsmikroskoopia	23
Elektronmikroskoopia	24
Kullamärgise suurendamine	24
Rakkude osmeerimine ja sisestamine vaiku	25
TULEMUSED	26
Membraanipotentsiaali mõju transportpeptiidide ja avidiini komplekside sisenemisele HeLa rakkudesse	26
Transportpeptiidide sisenemine HeLa rakkudesse sõltuvalt membraanipotentsiaalidest	29
Transportpeptiidide sisenemine K562 rakkudesse sõltuvalt membraanipotentsiaalidest	31
Transportpeptiidide sisenemine Jurkat rakkudesse sõltuvalt membraanipotentsiaalidest	34
Elektronmikroskoopia	37
ARUTELU	41
KOKKUVÕTE	47
SUMMARY	49
KASUTATUD KIRJANDUS	51

KASUTATUD LÜHENDID

ah	aminohape
Arg ₉	oligoarginiin (koosneb üheksast arginiinist)
ATP	adenosiin trifosfaat
Av-FITC	fluorestseiin-isotiotsüanaadiga märgitud avidiin
DiBAC	membraanipotentsiaalset sõltuv fluorestseeruv värv bis-(1,3-dibutüülbarbituraathape)-trimetiin oksanool
FACS	fluorestsents-aktiveeritud läbivoolutsütomeeter (<i>fluorescence-activated cell sorter</i>)
FITC	fluorestseiin-isotiotsüanaat
GPI	glükosüülfosfatidüülinositol
GTPaas	guanidiin trifosfaati hüdrolyüsiv ensüüm
HeLa	inimese emakakaela kartsinoomist pärinevad rakud
HSPG	heparaansulfaatproteoglükaan
Jurkat	inimese akuutse lümfoblastilise leukeemia rakud
K562	inimese erütroleukeemia rakud
kDa	kilodalton
MAP	amfipaatne mudelpeptiid (<i>amphipathic model peptide</i>)
pAntp	penetratiin (<i>Antennapedia</i>)
pTat	Tat-peptiid
pVEC	vaskulaar-endoteliaalsest kadheriinist pärinev penetreeruv peptiid (<i>VE-cadherin protein derived peptide</i>)
RFU	suhteline fluorestsentsi ühik (<i>relative fluorescence unit</i>)
RPP	rakku penetreeruv peptiid
RPP-Fluo	fluorestseiiniga märgitud rakku penetreeruv peptiid
TP	transportaan
TP10	transportaani analoog 10

SISSEJUHATUS

Rakumembraan on oma olemuselt füsioloogiline barjäär, mis eraldab rakkude sisemust väliskeskkonnast. See on hõlbus viis takistamaks lahuste kontrollimatut sisse- või väljavoolu, mis osutuks raku normaalsele funktsioneerimisele kahjulikuks. Et hõlbustada membraani läbimatute ühendite transporti raku, on kaasaegses molekulaarbioloogias võetud kasutusele mitmeid keemilisi ja füüsikalisi meetodeid, hõlmates elektroporatsiooni, viirusvektorite ja katioonsete lipiidide/liposoomide kasutamist või mikroinjektsiooni. Samuti võidakse ära kasutada endotsütoosi. Antud meetodid võivad küll suurendada suurte hüdrofiilsete molekulide transporti rakkudesse, samas esineb limiteeritud rakendatavus *in vivo* süsteemis, võivad tekkida häired raku elutegevuses ning saagis on tihti madal või ebaühtlane.

Vastukaaluks seniajani kasutatud tehnoloogiatele avastati 15 aastat tagasi, et teatud valgufragmentid on võimelised ületama transpordibarjääri ning sisenevad efektiivselt rakkudesse retseptor-sõltumatul viisil. Neid 10 – 30 aminohappe pikkuseid peptiide hakati kutsuma rakkudesse penetreerivateks peptiidideks (RPP, *cell penetrating peptides*) ning nende konjugeerimisel bioloogiliselt aktiivsete molekulidega leiti, et antud peptiidid hõlbustavad märkimisväärselt makromolekulide sisenemist rakkudesse sõltuvalt kontsentratsioonist.

Kahjuks on tänaseni RPP-de ja nende vahendatud lastmolekulide sisenemise mehhanism(id) ebaselg(ed), mis limiteerib nende laiemat kasutamist nii biotehnoloogias kui ka meditsiinis. Viimasel ajal arvatakse üha enam, et RPP-d pääsevad rakkudesse erinevaid endotsütoosi radasid kasutades, kuid leidub ka andmeid, et osad peptiidid on võimelised sisenema otse läbi plasmamembraani.

Tulenevalt nendest seisukohtadest, otsustati antud töös uurida kui suur osakaal RPP-de rakkudesse pääsemisel on endotsütoosil ja milline penetratsioonil. Selleks hinnati RPP-de endi ja lastmolekuli rakkudesse kontsentreerumise võimalikku muutust tingimustes, kus penetratsioon on inhibeeritud. Samuti vaadeldi peptiidide sisenemist ja lokaliseerumist rakkudes ultrastruktuuri tasemel.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

ENDOTSÜTOOS

Rakku ümbritsev plasmamembraan on oma hüdrofoobse südamiku tõttu selektiivse läbilaskvusega barjäär raku ja seda ümbritseva keskkonna vahel (Fittipaldi *et al.*, 2003). Läbi membraani moodustava fosfolipiitse kaksikkihi toimub mõlemasuunaline ainete transport. Hüdrofoobsed ühendid, väikesed laenguta molekulid, samuti gaasid liiguvad rakku ja sealt välja passiivse difusiooni teel kontsentratsioonigradiendi suunas ilma lisaenergiat kulutamata. Veelahustuvad polaarsed molekulid ja ioonid kasutavad rakumembraani läbimiseks hõlbustatud difusiooni kanalite, pumpade ja kandjavalgude ehk transporterite abil. Need spetsiifilised transportvalgud ei ole aga võimelised rakku viima suuremaid molekule nagu rasvad, valgud ja peptiidid.

Makromolekulide suunatud liikumine rakku on limiteeritud ja toimub endotsütoosi teel, mis hõlmab nende molekulide seondumist plasmamembraaniga või membraanseoseliste retseptoritega, millele järgneb raku energiast sõltuv membraanist pärinevate vesiikulite moodustumine.

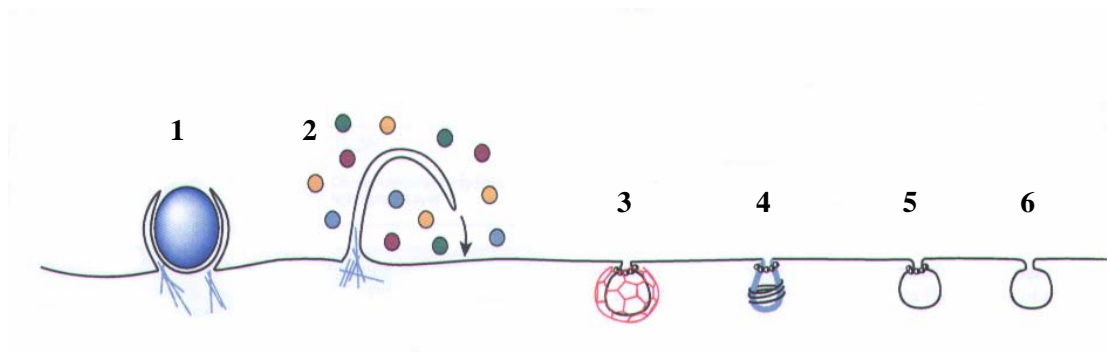
Endotsütoos jagatakse sõltuvalt vesiikuli suurusest ja invagineeritavast materjalist: (i) fagotsütoosiks, mille kaudu toimub suurte partiklite nagu mikroorganismide ja surnud rakkude osade omastamine ja (ii) pinotsütoosiks – vedelike ja neis lahustunud makromolekulide transport rakku väikeste pinotsütootiliste vesiikulite abil (joonis 1) (Pollard, 2002). Termineid endotsütoos ja pinotsütoos kasutatakse mittespetsialiseerunud rakkudes võrdväärsena, kuna fagotsütoosiks on võimelised ainult spetsialiseerunud rakud.

Pinotsütoos jagatakse omakorda vedela faasi pinotsütoosiks, mille korral viiakse rakuvälist vedelikku rakku mittespetsiifiliselt ja retseptor-vahendatud endotsütoosiks, mille korral toimub makromolekulide sidumine pinnaretseptoritele ja nende kontsentreerimine enne sisenemist (Lamaze ja Schmid, 1995).

Endotsütoos on oluline ka füsioloogilistes ja patoloogilistes protsessides nagu raku polarisatsiooni säilitamine, antigeenide esitlemine, toksiinide ja viiruste sisenemine, väliskeskkonna muutuste jälgimine, endoteeli lämmastikoksiidi süntaasi

maharegulatsioon, mis põhjustab veresoonte ahenemist jne (Mukherjee *et al.*, 1997; Conner ja Schmid, 2003).

Ühe endotsütoosiraja blokeerimine spetsiifiliste inhibiitoritega võib vähendada teatud ainete omastamist raku poolt, kuid ei peata transporti rakku. Ühe transpordiraja häiritus kompenseeritakse sõltuvalt rakutüübist teiste radade osakaalu tõusuga (Lamaze ja Schmid, 1995; Pollard, 2002).



Joonis 1. Endotsütoosi liigid. 1) fagotsütoos; 2)-6) pinotsütoosi eriliigid: 2) makropinotsütoos; 3) klatriin-vahendatud endotsütoos; 4) kaveoliin-vahendatud endotsütoos; 5) dünamiin-sõltuv endotsütoos katmata vesiikulite kaudu; 6) katmata vesiikulite kaudu toimuv endotsütoos (Conner ja Schmid, 2003).

Endotsütoosi liigid

Kõige efektiivsemaks peetakse klatriin-sõltuvat ehk retseptor-vahendatud endotsütoosi rada (Lamaze ja Schmid, 1995). Retseptor-vahendatud endotsütoosi kasutavad kõik eukarüootsed rakud, et omastada vajalikke toitaineid ja signaalmolekule. Samuti eemaldatakse väliskeskkonnast potentsiaalselt kahjulikke ühendeid ja reguleeritakse retseptorite arvukust. Klatriin-sõltuv endotsütoos hõlmab plasmamembraani retseptorite vahendusel ligandite kontsentreerimist rakupinnale, mille tagajärjel sopistub moodustunud kompleks rakku. Vesiikulite moodustumine toimub plasmamembraani spetsiaalsetes piirkondades, mida nimetatakse kaetud lohukesteks. Nende lohukeste tsütoplasmaatiliselt poolt katab võrgustikuna klatriin ja erinevad adaptorvalgud (Robinson, 2004; Sorkin, 2004; Merrifield *et al.*, 2005). Kaetud lohukesed invagineeruvad ja seejärel eralduvad membraanist, moodustades 100-150 nm diameetriga vesiikuleid (Lamaze ja Schmid, 1995; Mukherjee *et al.*,

1997). Moodustunud transportvesiikul liigub raku sisemusse, kus endotsüteeritud materjal töödeldakse ümber või lagundatakse (Pollard, 2002).

Kaveoliin-sõltuv endotsütoos on märkimisväärselt aeglasem kui klatriinist sõltuv rada, nõuab tsütoskeleti terviklikkust ning võib vajada dünamiini osalust. Kaveoolid on väikesed (50-80 nm) plasmamembraani sissesopistused, mille põhiliseks struktuurvalgus on 21 – 24 kDa (kilodalton) molekulmassiga kaveoliin-1. Kaveoliin seob kõrge afiinsusega kolesterooli, mistõttu moodustuvad kaveoolid eelistatult plasmamembraani mikrodomeenides, mida nimetatakse „lipiidseteks parvedeks”. „Lipiidsed parved“ on rikastatud kolesterooli ja sfingolipiididega. Lisaks on sinna kontsentreeritud ka mitmed glükosüülfosfatidüülinositool- (GPI) või rasvhappesega ankurdatud membraanivalgud. Kaveole leidub eriti rohkelt epiteeli ja endoteeli rakkudes, kus need moodustavad 10-30% raku pinnast (Glenney ja Soppet, 1992; Conner ja Schmid, 2003; Fittipaldi *et al.*, 2003).

Endotsütoosi üheks suhteliselt vähe iseloomustatud liigiks on makropinotsütoos, mis esineb konstitutiivselt või on vajadusel kiirelt esile kutsutav näiteks kasvufaktorite või osade bakteritoksiinide poolt (Pollard, 2002). Teatud Rho perekonna GTPaasid põhjustavad aktiinifilamentide formeerumist, mille tagajärjel moodustuvad membraani väljasopistused – lamellipoodid. Lamellipoodid langevad tagasi ja fuseeruvad plasmamembraaniga, transportides rakkudesse suurel hulgal ekstratsellulaarset vedelikku ja selles lahustunud aineid mahukates makropinosoomides (kuni 1 µm diameetriga). Arvatakse, et makropinotsütoos toimub samuti „lipiidsete parvede” piirkondades (Grimmer *et al.*, 2002). Kuigi makropinotsütoos kaasneb näiliselt kaootilise membraani kurrutamisega (*membrane ruffling*), on tõenäoline, et see on hästi reguleeritud ja kontrollitud protsess (Conner ja Schmid, 2003).

Katmata vesiikulite kaudu toimuva endotsütoosi tekkemehhanismide kohta täpsemad andmed puuduvad (Lamaze *et al.*, 2001). Arvatakse, et selle mehhanismi kaudu viiakse rakku GPI-ankurdatud valke (Kirkham *et al.*, 2005) ja heparaansulfaatproteoglükaanidega (HSPG) seotud ligandeid (Tkachenko *et al.*, 2004). Katmata vesiikulite kaudu toimuv endotsütoos jagatakse omakorda dünamiinist sõltuvaks ja sõltumatuks (Kirkham ja Parton, 2005).

Endotsütootilised organellid rakus

Pikka aega valitses seisukoht, et rakkude poolt omastatud materjali esimene sorteerimise etapp toimub varajastes endosoomides. Viimasel ajal on leitud tõendeid, et sorteerimine saab alguse juba plasmamembraanil (Lakadamyali *et al.*, 2006). Endosoomid jagatakse nelja klassi, mis erinevad morfoloogia, rakus paiknemise ja biokeemiliste markerite poolest.

Endotsütoosi teel omastatud materjal suunatakse rakus esmalt varajastesse ehk sorteerivatesse endosoomidesse, mis asetsevad plasmamembraani läheduses (Pollard, 2002). Varajased endosoomid jagatakse sõltuvalt nende liikumise ja küpsemise kiirusest staatiliseks või dünaamiliseks populatsiooniks (Pollard, 2002; Lakadamyali *et al.*, 2006). Seal dissotsieeritakse kergelt happelise (pH 6,5) keskkonna mõjul enamus retseptor-ligand komplekse ning retseptorid koos membraani komponentidega saadetakse otse või tsirkuleerivate endosoomide (*recycling endosomes*) kaudu tagasi rakupinnale. Tsirkuleerivad endosoomid on vähem happelised kui varajased endosoomid ning ei sisalda degradeerimisele suunatud molekule (Gruenberg, 2001; Pollard, 2002; Lakadamyali *et al.*, 2006).

Varajastest endosoomidest liiguvad degradeerimisele kuuluvad molekulid edasi multivesikulaarsetesse kehakestesse (*multivesicular carrier body*, pH 5,5), mis küpsevad ja liituvad hiliste endosoomidega (pH 4,5). Hilised endosoomid fuseeruvad lõpuks primaarsete ja sekundaarsete lüsoosoomidega, kus degradatiivsesse ratta sorteeritud molekulid lõplikult lagundatakse ja mittelagundatav materjal säilitatakse.

Endosoomide happelisust reguleerivad ATP-sõltuvad prootonpumbad ja ioonkanalid (Pollard, 2002).

RAKKU PENETREERUVAD PEPTIIDID

Penetratsioon

Rakku penetreeruvate peptiidide (RPP) rakku difundeerumine on vähetõenäoline, sest suurte hüdrofiilsete positiivselt laetud molekulide jaoks on rakumembraan läbimatu barjäär (Derossi *et al.*, 1998) ning enamike juhtude korral on peptiidi rakusisene kontsentratsioon suurem kui rakuväline (Hällbrink *et al.*, 2001). Penetratsiooniks nimetatakse peptiidide võimet läbida rakumembraani näiliselt endotsütoosist ja raku ATP energiast sõltumatult (Derossi *et al.*, 1994). RPP-d arvatavasti ei kasuta plasmamembraanil olevaid retseptorvalke (Lindgren *et al.*, 2000; Fretz *et al.*, 2007), vaid interakteeruvad otse membraani fosfolipiididega (Derossi *et al.*, 1996).

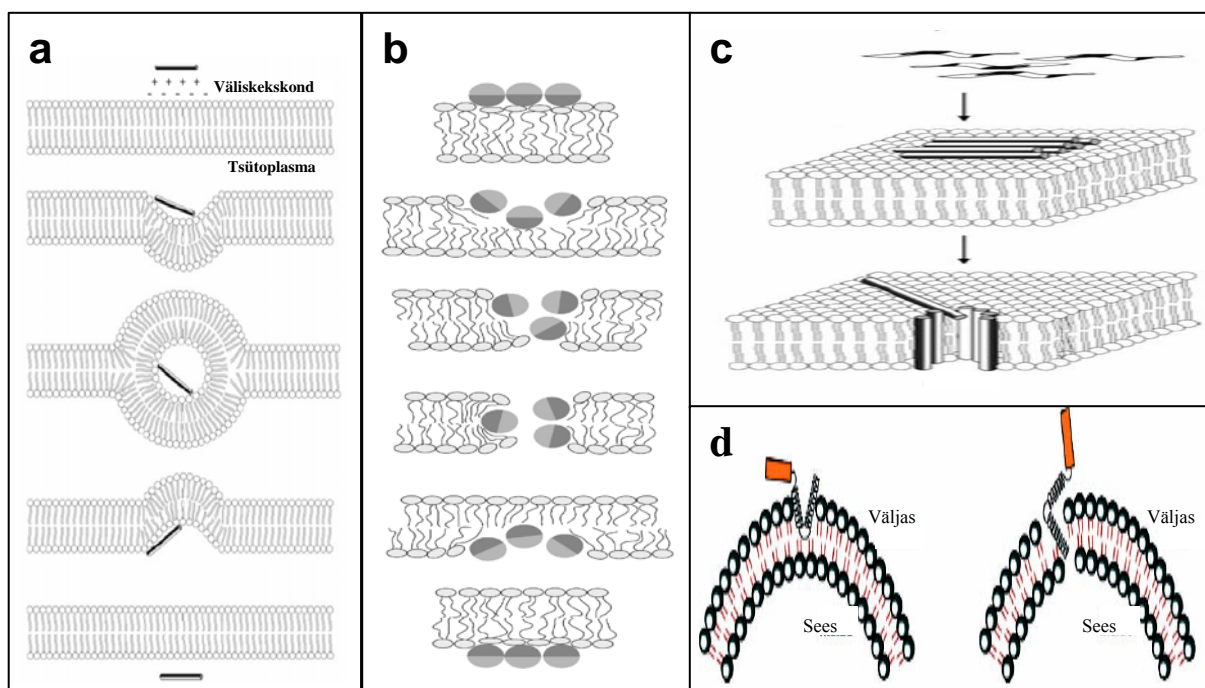
RPP-de rakku liikumise kohta on esitatud mitmeid mudeleid. Varaseim neist on pööratud mitselli mudel (joonis 2a), mille järgi peptiid interakteerub elektrostaatiliselt tõmbejõu mõjul negatiivselt laetud plasmamembraani fosfolipiididega või suhkrukomponentidega (glükoosaminoglükaanid, polüsiaalhapped). Peptiidide kontsentreerumine membraanile indutseerib pööratud mitselli tekke, mis avaneb membraani teisele küljele. Sellise mudeli korral jääb peptiid vesikeskkonda, mis võib selgitada, miks peptiididega seotud hüdrofiilsed ühendid transporditakse rakku (Derossi *et al.*, 1996; Derossi *et al.*, 1998).

Teiseks translokeerumise võimaluseks on „vajuva parve” mudel (joonis 2b). Selle kohaselt muutub membraanipinnaga seondumisel peptiidi sekundaarstruktuur ja peptiidi hüdrofoobsed aminohapped (ah) interakteeruvad membraani hüdrofoobse osaga, mis muudab lipiidse kaksikkihi struktuuri ning peptiidid sisenevad rakku. „Vajuva parve” mudelit peetakse eelkõige antimikroobsete peptiidide rakku sisenemise mehhanismiks, kuid see võib samas seletada ka osade RPP-de liikumist rakku (Pokorny *et al.*, 2002).

Kolmandaks tuntumaks mudeliks on pooride moodustumine (joonis 2c), mille puhul peptiidide hüdrofoobsed aminohapped interakteeruvad lipiidse kaksikkihi südamikuga ja hüdrofiilsed aminohapped moodustavad plasmamembraani poori, mis viib peptiidide sisenemisele rakku (Lundberg ja Langel, 2003; Deshayes *et al.*, 2004).

Hüdrofoobsete peptiidide raku sisenemise kirjeldamiseks on välja pakutud ka juuksenõela struktuuri moodustamist (joonis 2d). Selle teooria kohaselt siseneb lingu-kujuline peptiidi α -heeliksi struktuur kaksikkihti, mis viib RPP sukeldumiseni otse läbi membraani (Veach *et al.*, 2004).

Praeguseks on jõutud arusaamale, et RPP-d kasutavad rakkudesse liikumiseks ka erinevaid endotsütoosi radu. Nii on nende sisenemise mehhanismina näidatud kaveoliin-vahendatud endotsütoosi (Ferrari *et al.*, 2003; Fittipaldi *et al.*, 2003), makropinotsütoosi indutseerimist (Wadia *et al.*, 2004) ja klatriin-sõltuva endotsütoosi osalust (Richard *et al.*, 2005). Mõnede RPP-de sisenemine raku sõltub kontsentratsioonist, seetõttu on võimalik, et ka sõltuvalt RPP kontsentratsioonist kasutatakse erinevaid internaliseerumise mehhanisme (Lundberg ja Langel, 2003). Samuti võivad raku pääsemiseks kasutatavad mehhanism(id) oleneda rakutüübist, lastmolekuli puudumisest/olemasolust ja selle omadustest (Langel, 2007)



Joonis 2. Penetreeruvate peptiidide raku sisenemise mudelid. a) pööratud mitselli mudel ((Derossi *et al.*, 1996); joonis Elmquist, 2003 järgi); b) vajuva parve mudel (Pokorny *et al.*, 2002); c) internalisatsioon poori moodustamise abil (joonis Elmquist, 2003 järgi); d) juuksenõela struktuuri ja 45° nurga all membraani sisenemise mudel (Veach *et al.*, 2004)

Penetratiinid

Penetratiini perekonna peptiidid pärinevad *Drosophila* homeovalgust Antennapedia, mis on transkriptsioonifaktor (Joliot *et al.*, 1991a). Translokeerumiseks rakku on minimaalselt vajalik aminohapetest 43-58 koosnev järjestus ehk homeodomeeni kolmas α -heeliks, mida hakati hiljem nimetama ka penetratiiniks.

Penetratiini, selle pööratud aminohappelise järjestusega analoogi ja D-enantiomeeridest koosneva peptiidi sisenemine rakku toimub nii 37 °C kui ka 4 °C juures, mis näitab spetsiifilise valgulise retseptori puudumist nende peptiidide jaoks ja endotsütoos klassikalises mõttes on välistatud (Derossi *et al.*, 1994; Derossi *et al.*, 1996).

Penetratiini helikaalse struktuuri muutmisel säilib peptiidi internaliseerumisvõime tsütoplasmasse, kuid lokaliseerumine tuuma väheneb märkimisväärselt. Seega pole helikaalne struktuur oluline peptiidide sisenemiseks rakku, kuid akumuliseerumiseks tuuma on tähtis aminohappeline järjestus ja/või struktuur (Derossi *et al.*, 1994).

Internalisatsiooni seisukohalt on olulised kaks trüptofaani jääki, eriti kuues trüptofaan (Fischer *et al.*, 2000; Drin *et al.*, 2001). Nende asendamisel fenüülalaniinidega vähenes peptiidi sisenemine rakkudesse drastiliselt (Derossi *et al.*, 1994). Kuna trüptofaan siseneb sügavale lipiidsesse kaksikkihti (Christiaens *et al.*, 2002), arvatakse, et ta on võimeline destabiliseerima membraani, mis viibki penetratiini sisenemisele rakku (Dom *et al.*, 2003).

Homeodomeenidele vastavad peptiidid sisenevad efektiivselt rakkudesse, mille plasmamembraanid sisaldavad α -2,8-polüsiaalhappeid. Polüsiaalhapped võivad toimida peptiidide kontsentratsiooni tõstjana rakupinnal või stabiliseerivad peptiidi seondumist rakumembraaniga. Samas sisenevad homeovalkudest pärinevad peptiidid ka rakkudesse, mille pinnal polüsiaalhapped puuduvad, mistõttu võivad samasuguseid funktsioone täita negatiivselt laetud membraanikomponendid (Joliot *et al.*, 1991b).

Viimasel ajal arvatakse, et penetratiin kasutab rakkudesse sisenemisel ja lastmolekuli transpordil mitmeid mehhanisme, kaasa arvatud endotsütoosi. Erinevate mehhanismide osakaal võib sõltuda rakutüübist ja lastmolekulist (Letoha *et al.*, 2003; Christiaens *et al.*, 2004; Säälük *et al.*, 2004; Letoha *et al.*, 2005; El-Andaloussi *et al.*, 2006).

Tat perekonna peptiidid

Tat valk on sõltuvalt viirustüvest 86-102 aminohappest koosnev transaktiivatsioonifaktor, mis osaleb inimese immuunpuudulikkust põhjustava viiruse (HIV-1) replikatsioonis. Nagu osasid homeovalke, sekreteeritakse ka Tat valku rakkudest ja reinternaliseeritakse seejärel teiste rakkude poolt (Ensoli *et al.*, 1993).

Tat valgu internaliseerumine on ajast ja kontsentratsioonist sõltuv ning on osaliselt inhibeeritav madalatel temperatuuridel (Frankel ja Pabo, 1988). Samas on näidatud, et osade rakkude puhul temperatuurisõltuvus puudub (Mann ja Frankel, 1991), mis viitab sellele, et eksisteerib erinevaid ja võib-olla konkureerivaid rakku sisenemise viise. On näidatud, et Tat valgu ja sellest pärineva peptiidi internalisatsioonimehhanismid on erinevad (Silhol *et al.*, 2002).

Kõige efektiivsem fragment on Tat (48-60), mis sisaldab valgu aluselist regiooni ja selle tuumalokalisatsioonisignaali. On leitud, et deletsioonid helikaalses domeenis ei vähenda sisenemise efektiivsust (Vives *et al.*, 1997), vaid pigem vähendavad Tat peptiidi tsütotoksilisust (Richard, avaldamata andmed). Samas arginiinide eemaldamine või asendamine pärsib internalisatsiooni rohkem kui lüsiinide eemaldamine või asendamine (Wender *et al.*, 2000).

Vastupidiselt varem arvatule on näidatud, et Tat perekonna peptiidid kasutavad rakku sisenemiseks erinevaid endotsütootilisi radu. Nii on kogunenud andmeid kaveoliin-vahendatud endotsütoosi (Wender *et al.*, 2000; Fittipaldi *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2003) ja klatriin-sõltuva endotsütoosiraja kasutamise kohta (Richard *et al.*, 2003, Vendeville *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2005) ning makropinotsütoosi indutseerimise poolt (Wadia *et al.*, 2004). Samuti on näidatud, et Tat peptiidi vahendatud kargo transpordimehhanism rakkudesse sõltub lastmolekuli suurusest. Lühema kui 50 ah pikkuse peptiidi sisestamine sõltub membraanipotentsiaalset, samas valkude transport toimub suurte vesiikulite vahendusel (Tunnemann *et al.*, 2006).

On näidatud, et heparaansulfaatproteoglükaanid osalevad Tat perekonna peptiidide internalisatsioonis (Brooks *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2005), kuid ka nende puudumisel ei ole protsess blokeeritud (Dowdy, avaldamata andmed).

Tat peptiidid on võimelised läbima hematoentsefaalset barjääri: peptiidiga konjugeeritud β -galaktosidaas internaliseerus *in vivo* aju, säilitades ensüümi aktiivsuse (Schwarze *et al.*, 1999).

Transportaan ja selle analoogid

Transportaan on kimäärne peptiid (27 ah), mille eellasmolekul galparaan kombineeriti kahest fragmendist: aminohapped 1-13 pärinevad neuropeptiid galaniinist ja aminohapped 14-27 vastavad herilase mürgis leiduvale mastoparaanile (Langel *et al.*, 1996). Et uurida galparaani paiknemist rakkudes, asendati 13. positsioonis olev proliin lüsiiniga, mis võimaldab kõrvalahelasse siduda erinevaid molekule (näiteks biotiiniga või värvainega märgistamine). Üllatavalt internaliseerus asendusega galparaan efektiivselt rakkudesse, mistõttu nimetati uus molekul transportaaniks (Pooga *et al.*, 1998a).

Transportaani sisenemine rakkudesse toimub kiiresti ning 15-30 minuti möödudes jõuab peptiid tuumaümbrisesse ja tuuma. Endotsütoosi välistavad tingimused ei blokeeri transportaani internaliseerumist rakkudesse ning transportaani sisenemine ei ole ilmselt retseptor-sõltuv ega rakutüübi spetsiifiline (Pooga *et al.*, 1998b).

Transportaani rakusisene lokaliseerimine ei kattu oluliselt rakuorganellide paiknemisega. Peptiid- Valk komplekse on rakkudes detekteeritud tubulaarsetes ja/või vesikulaarsetes struktuurides, mille iseloom ei ole seni selge. Samuti on näidatud komplekside paiknemist vabalt tsütoplasmas (Padari, 2001; Padari *et al.*, 2005).

Kuna transportaan inhibeerib kõrgetel kontsentratsioonidel summaarset GTP-aasset aktiivsust rakumembraanides, on sünteesitud erinevaid transportaani analooge, et leida raku elutegevusele minimaalselt mõjuv peptiid. GTP-aasset aktiivsust ei pärsi transportaani analoog TP10, millel puudub N-otsast kuus esimest aminohapet. Transportaani analoogide analüüs näitas ka, et efektiivseks internaliseerumiseks on oluline C-terminaalne piirkond (Soomets *et al.*, 2000), mis võib vesikeskkonnas või lipiididega seondumisel võtta α -helikaalse struktuuri (Magzoub *et al.*, 2001). Moodustunud heeliks seondub fosfolipiididega hüdrofoobse piirkonnaga (Barany-Wallje *et al.*, 2004).

Algselt arvati, et transportaani internalisatsioonimehhanism on sarnane Antennapedia homeovalgu kolmanda α -heeliksi rakku sisenemisega (Derossi *et al.*, 1996), kuna transportaan sisaldab trüptofaani ja türosiini jääki, mis võivad indutseerida pööratud mitselli moodustumise (Pooga *et al.*, 1998). Samas on tõendeid ka „lipiidsetest parvedest” sõltuva endotsütoosi kohta, mida tekkivate vesiikulite morfoloogia alusel võib pidada makropinotsütoosiks (Säälik *et al.*, 2004; Padari *et al.*, 2005).

Lisaks TP10 transportvektorina kasutamisele, on see võimeline pärssima patogeensete bakterite ja seente kasvu. On näidatud, et TP10 inhibeerib *Staphylococcus aureus*'e ja *Candida albicans*'i kasvu nii madalatel kontsentratsioonidel, mis ei ole toksiline imetajarakkudele (Nekhotiaeva *et al.*, 2004).

Arginiinirikkad peptiidid

Mitmete RPP-de efektiivseks internalisatsiooniks on oluline positiivselt laetud aminohapete (arginiin, lüsiin) olemasolu peptiidahelas (Derossi *et al.*, 1994; Schwarze ja Dowdy, 2000; Vivés *et al.*, 1997). Sellest tulenevalt on näidatud ka ainult arginiini sisaldavate peptiidide efektiivset sisenemist rakku, kusjuures on tähtis arginiinide arv peptiidi molekulis. Oligomeerid, mis koosnevad rohkem kui kuuest arginiinist, sisenevad rakkudesse palju efektiivsemalt kui sama hulka lüsiini, ornitiini või histidiini sisaldavad peptiidid (Mitchell *et al.*, 2000). Optimaalseks peetakse kaheksast või üheksast arginiinist koosnevat oligomeeri (Futaki *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002), mis lokaliseerub nii rakkude tsütoplasmasse kui ka tuuma. Ahela pikenedes internalisatsiooni efektiivsus väheneb ning tsütotoksilisus suureneb (Futaki *et al.*, 2001).

Rakkudesse sisenemise seisukohalt ei ole oluline ka lineaarne struktuur, kuna kõrvalahelates arginiini sisaldavad peptiidid olid translokeerumisel sama efektiivsed, viidates sellele, et tähtis on guanidinorühmade olemasolu peptiidis (Futaki *et al.*, 2002). Arvatakse, et guanidinorühmad moodustavad vesiniksidemeid membraani fosfolipiididega, mis võib olla oluline internalisatsiooniks (Futaki *et al.*, 2003; Futaki, 2005; Rothbard *et al.*, 2005).

On näidatud, et HSPG-d omavad olulist rolli RPP-de internalisatsioonis, kuna nende eemaldamine või blokeerimine põhjustas polüarginiini sisenemise vähenemist (Belting, 2003).

Polüarginiinide internaliseerumist saab inhibeerida, kui rakke eelnevalt inkubeerida naatriumasiidiga, mis inhibeerib oksüdatiivset fosforüleerimist. Samas ei mõjuta sisenemist madal temperatuur (3 °C), mis näitab, et antud protsess on energiast sõltuv, kuid mitte seotud endotsütoosiga (Mitchell *et al.*, 2000; Fretz *et al.*, 2007). Teiselt poolt on leidnud tõendeid polüarginiini sisenemise kohta makropinotsütoosi teel (Nakase *et al.*, 2004).

Amfipaatsed mudelpeptiidid (MAP)

Amfipaatsed mudelpeptiidid (MAP – *model amphiphatic peptide*) koosnevad lüsiinist,alaniinist ja leutsiinist ning omandavad α -helikaalse struktuuri, kusjuures üks külg kannab laengut ja teine on hürdofoobne (Scheller *et al.*, 1999). MAP sünteesiti algselt, et uurida polükatioonsete peptiidide ja membraanlipidiide vahelisi interaktsioone (Steiner *et al.*, 1991).

On näidatud, et amfipaatsete mudelpeptiidide sisenemine rakku sisaldab üheaegselt nii energia-, temperatuur-, pH- ning ioon-sõltuvaid, kui ka –sõltumatuid komponente. Amfipaatsed mudelpeptiidid seostuvad negatiivselt laetud fosfolipiide sisaldavate vesiikulitega elektrostaatilise ja neutraalsete vesiikulite korral ilmselt hürdofoobse interaktsiooni tõttu (Oehlke *et al.*, 1998). On tehtud kindlaks, et membraaniga seostumine ei korreleeru internalisatsiooni efektiivsusega ning sisenemiseks peab peptiid sisaldama vähemalt nelja täispööret hõlmavat α -heeliksit. Positiivselt laetud kõrvalahelad ei ole arvatavasti olulised translokeerumise seisukohalt, kuna lüsiinide asendamisel laenguta glutamiinidega paranes internalisatsiooni efektiivsus (Scheller *et al.*, 1999). Seega MAP-i rakku sisenemise mehhanism tõenäoliselt erineb penetratiini omast (Lindgren *et al.*, 2000).

Mudelpeptiid on rakkudele toksiline juba madalal kontsentratsioonil ($< 1 \mu\text{M}$), mis on põhjustatud MAP-i hürdofoobsusest (Hällbrink *et al.*, 2001). Hiljem on sünteesitud vähem toksilisi ja parema sisenemisvõimega analooge (Scheller *et al.*, 1999). Amfipaatsete mudelpeptiidide lokalisatsioon rakus erineb sõltuvalt rakuliinist ning on leitud, et amfipaatsus ei ole tingimata vajalik, kuna MAP-ide mitteamfipaatsed analoogid on samuti sisenemisvõimelised (Scheller *et al.*, 2000).

Vaskulaar-endoteliaalsest kadheriinist pärinev peptiid (pVEC)

pVEC on hiire vaskulaar-endoteliaalsest kadheriinist (rakkude adhesioonivalk) pärinev 18 aminohappe pikkune (615 – 632 ah) rakku penetreeruv peptiid (*VE-cadherin protein derived peptide*). See koosneb hürdofoobsest osast (5 ah kadheriini transmembraanse regiooni C terminusest) ja hürdofiilsest, positiivselt laetud kadheriini tsütosooli poolsest sabast. Sellest tulenevalt on pVEC-il amfipaadne

loomus, mida peetakse oluliseks faktoriks rakkudesse sisenemiseks (Elmqvist *et al.*, 2001).

pVEC-i sisenemine rakkudesse on retseptor- ja temperatuurisõltumatu kuna pVEC säilitab internaliseerumisvõime ka 4 °C juures ning sama efektiivne on ka D-enantiomeeridest koosnev peptiid. See välistab klassikalise endotsütoosiraja kaudu sisenemise (Elmqvist ja Langel, 2003). Plasmamembraani intaktsuse katsed näitavad, et pVEC ei mõjuta membraani terviklikkust, seega peptiid ei sisene rakkudesse ka pooride moodustumist indutseerides (Elmqvist *et al.*, 2001).

Inkubeerimisel seerumiga keskkonnas eemaldatakse peptiidi C terminusest lüsiin, pärast mida on pVEC ensümaatilise degradatsiooni suhtes stabiilsem. Samuti on peptiid lagundamise vastu kaitstum juba raku sees olles (Elmqvist ja Langel, 2003).

pVEC on üks vähestest RPP-dest lisaks TP10-le, millel on avastatud antimikroobsed omadused. Nii on leitud pVEC-i inhibeeriv toime *Mycobacterium smegmatis*'e kasvule juba piisavalt madalatel kontsentratsioonidel, mis ei mõjuta seni kontrollitud imetajarakkude normaalset elutegevust (Nekhotiaeva *et al.*, 2004).

Lastmolekulide sidumine rakkudesse penetreeruvate peptiididega

Rakku viidavate lastmolekulide seostamiseks RPP-dega on mitmeid meetodeid. Väiksemate molekulide ühendamiseks eelistatakse disulfiidsidet. Peptiid sünteesitakse nii, et N-terminusse lisatakse aktiveeritud tsüsteiin, mis võimaldab disulfiidsilla moodustumist lastmolekuli küljes oleva vaba tiolrühmaga. Selline side tsütoplasmas redutseeritakse ja seetõttu pole sisestatud molekuli lokaliseerimine enam transportpeptiidist sõltuv. Teiseks võimaluseks on kimäärse peptiidi keemiline süntees. Kolmandaks on võimalik peptiidi ja lastmolekuli liitvalgu ekspresseerimine bakterites. Suuremate molekulide transporteriga ühendamiseks võidakse kasutada ka stabiilsete mittekovalentsete komplekside moodustumist (näiteks biotinüleeritud transportaani kompleks avidiiniga) või bifunktsionaalsete ristsidujate abi (Derossi *et al.*, 1998; Hällbrink *et al.*, 2001; Pooga *et al.*, 2001; Astriab-Fisher *et al.*, 2002).

Kuigi siiani pole RPP-de sisenemise mehhanism(id) üheselt selge(d), saab neid kasutada transpordivektoritena. Nii koekultuuris kui *in vivo* on RPP-de vahendusel

suudetud rakkudesse viia arvukalt bioaktiivseid molekule või halvasti imenduvaid ravimeid, mis iseseisvalt plasmamembraani barjääri läbida ei suuda (tabel 1).

Tabel 1. Näiteid rakku penetreeruvate peptiidide vahendusel rakku viidud lastmolekulidest

Lastmolekul	Transportpeptiid	Viide
nanopartiklid	Tat-peptiid	(Lewin <i>et al.</i> , 2000)
kuni 200 nm liposoomid	Tat-peptiid	(Torchilin <i>et al.</i> , 2001)
~1MDa kolloidse kulla partiklid	transportaan	(Pooga <i>et al.</i> , 2001)
faagi partiklid	Tat-peptiid	(Eguchi <i>et al.</i> , 2001)
<i>small interfering</i> RNA	penetratiin	(Nakanishi <i>et al.</i> , 2003)
	penetratiin ja transportaan	(Davidson <i>et al.</i> , 2004)
peptiidnukleiinhappe (PNA) oligomeerid	penetratiin, Tat-peptiid	(Muratovska ja Eccles, 2004)
		(Turner <i>et al.</i> , 2005)
	penetratiin	(El-Andaloussi <i>et al.</i> , 2006)
	transportaan	(Tripathi <i>et al.</i> , 2005)
		(Pooga <i>et al.</i> , 1998c)
		(El-Andaloussi <i>et al.</i> , 2006)
	oligoarginiin	(Bendifallah <i>et al.</i> , 2006)
	MAP	(Oehlke <i>et al.</i> , 2004)
	pVEC	(Elmquist <i>et al.</i> , 2001)
peptiidid	penetratiin	(Senatus <i>et al.</i> , 2006)
	Tat-peptiid	(Vives <i>et al.</i> , 1997)
	transportaan	(Hällbrink <i>et al.</i> , 2001)
valgud	penetratiin	(Brunet <i>et al.</i> , 2005)
	Tat-peptiid	(Theisen <i>et al.</i> , 2006)
		(Fawell <i>et al.</i> , 1994)
	transportaan	(Pooga <i>et al.</i> , 2001)
	oligoarginiin	(Chen <i>et al.</i> , 2001)
	pVEC	(Elmquist <i>et al.</i> , 2001)
<i>antisense</i> -oligonukleotiidid	penetratiin ja Tat-peptiid	(Astriaab-Fisher <i>et al.</i> , 2000)
	MAP	(Oehlke <i>et al.</i> , 2002)
	transportaan	(Fisher <i>et al.</i> , 2004)
<i>decoy</i> oligonukleotiidid	penetratiin	(Rousselle <i>et al.</i> , 2000)
ravimid	oligoarginiin	(Rothbard <i>et al.</i> , 2000)

Membraanipotentsiaali osalus rakku penetreeruvate peptiidide sisenemisel

Elusrakkude membraanid omavad membraanipotentsiaali, mille säilitamiseks on vajalik ATP. Membraanipotentsiaali tekitavad läbi plasmamembraani liikuvad ioonid (nagu Na^+ , K^+ või H^+). Lümfootsüütide rakusisene K^+ kontsentratsioon on ~140 mM ja rakuväline ~5 mM ning see on põhiline kontsentratsioonigradient, mis säilitab transmembraanset potentsiaali (Aidley, 1996).

Kuna RPP-d on positiivselt laetud, siis negatiivne membraanipotentsiaal võiks viia nende sisenemisele rakku (Boisseau *et al.*, 2006). Penetratsioon on membraanipotentsiaalst sõltuv protsess (Aidley, 1996) ning arvatakse, et membraanipotentsiaali vähendamine ei mõjuta endotsütoosi toimumist (Rothbard *et al.*, 2005; Boisseau *et al.*, 2006).

Varem on näidatud, et Tat-peptiidi ja D-enantiomeeridest koosneva arginiini oktameeri sisenemine rakkudesse vähenes ~90 % kaaliumioonide kontsentratsiooni tõstmisel väliskeskkonnas ning sisenemine oli lineaarses sõltuvuses K^+ kontsentratsioonist (Rothbard *et al.*, 2005).

TÖÖ EESMÄRGID

Antud töö eesmärkideks olid:

- Hinnata ja võrrelda rakkudesse penetreeruvate peptiidide vahendatud biomolekulide transporti ja transpordi efektiivsust koekultuuri tingimustes HeLa rakkudes sõltuvalt plasmamembraani potentsiaalset biotinüleeritud peptiid-avidiin kompleksi mudeli alusel
- Teha kindlaks membraanipotentsiaali osatähtsus mitmete peptiidide endi sisenemisel ja hinnata võimalikke erinevusi kasutades:
 - ✓ Kinnituvaid rakkude (HeLa)
 - ✓ Suspensioonirakke (K562 ja Jurkat)
- Uurida peptiidide akumulereerumist normaalsetes ja järk-järgult depolariseeritavates rakkudes sõltuvalt:
 - ✓ peptiidi kontsentratsioonist
 - ✓ inkubatsiooniajast
- Vaadelda peptiidi sisenemist ja paiknemist ultrastruktuuri tasemel HeLa rakkudes kasutades elektronmikroskoopiat.

KASUTATUD MATERJALID JA METOODIKAD

Rakkude kultiveerimine

Antud töös kasutati kolme erinevat rakuliini: inimese emakakaela kartsinoomist pärinevad rakke (HeLa), inimese erütroleukeemia rakke (K562) ja inimese akuutse lümfoblastilise leukeemia rakke (Jurkat).

HeLa rakke kultiveeriti IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes (Gibco[®], Invitrogen Corporation, CA, USA) ning K562 ja Jurkat rakke kultiveeriti RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) söötmes (Gibco[®], Invitrogen Corporation, CA, USA). Söötmed sisaldasid ka 10% veiselooete vereseerumit (PAA Laboratories, Austria), 100 IU/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (Gibco[®], Invitrogen Corporation, CA, USA). Rakke kasvatati CO₂ inkubaatoris 5% süsinikdioksiidi keskkonnas veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37 °C. K562 ja Jurkat rakkude suspensiooni lahjendati söötmega iga 2 – 3 päeva järel, et tagada tihedus vahemikus 100 000 – 1 000 000 rakku/ml.

Kasutatud transportpeptiidid

Töös kasutati erinevaid biotiiniga või fluorestseiiniga märgitud, elektronmikroskoopia jaoks lisatsüsteiniga peptiide: transportaani ja selle analoogi TP10-t, pVEC-i, penetratiini, Tat-peptiidi, MAP-i ning oligoarginiini (vt. tabel 2). Kõik kasutatud peptiidid sünteesiti Stockholmi Ülikooli Neurokeemia ja Neurotoksikoloogia instituudis Applied Biosystem M431A peptiidisüntesaatoriga *t*-Boc strateegiat kasutades. Peptiidide detekteerimist hõlbustav ja avidiiniga komplekseerumist võimaldav biotiinmärgis konjugeeriti peptiidiga manuaalselt nagu ka fluorestseiin. Biotiin- ja fluorestseiinmärgis või täiendav tsüsteiinijääk paiknes transportaani ja TP10 puhul vastavalt 13. või 7. positsioonis asuva lüsiini ε-aminorühma küljes, ülejäänud peptiidide korral aga N-terminuses. Peptiidid puhastati kõrglahutusega vedelikkromatograafiat kasutades C₁₈ pöördfaasikolonnil (HPLC – *High Pressure Liquid Chromatography*) ja nende puhtus oli >99%. Kõigi peptiidide molekulmassid kontrolliti mass-spektromeetriliselt (MALDI-TOF, Voyager-DE STR, Applied

Biosystems, Foster City, CA) ja arvutuslikud molekulmassid saadi kõigil juhtudel. Kõik kasutatud peptiidid olid C-terminaalselt amideeritud.

Tabel 2. Töös kasutatud rakku penetreeruvate peptiidide aminohappelised järjestused

Peptiid (lühend)	Ah järjestus
Transportaan (TP)	GWTLNSAGYLLGK* INLKALAALAKKIL amiid
Transportaan10 (TP10)	-----AGYLLGK* INLKALAALAKKIL amiid
Penetratiin (pAntp)	R* QIKIWFQNRMMKWKK amiid
pVEC	L* LIILRRRIRKQAHAAHSK amiid
Tat-peptiid (pTat)	G* RKKRRQRRRPQ amiid
Amfipaadne mudelpeptiid (MAP)	K* LALKLALKALKALKLA amiid
Oligoarginiin (Arg ₉)	R* RRRRRRRR amiid

* märgitud aminohappe külge on konjugeeritud biotiin, fluorestseiin või tsüsteiin

Analüüs läbivoolutsütomeetril

Plasmamembraani potentsiaali mõju peptiidi ning peptiid-avidiiin komplekside sisenemisele HeLa rakkudesse

Kõik puhverlahuste komponendid olid AppliChemilt (Saksamaa), kui pole öeldud teisiti.

Membraanipotentsiaali osaluse uurimiseks kinnituvates rakkudes külvati HeLa rakud eelmisel päeval 6-kaevuliste plaatide (Greiner bio-one, Saksmaa) kannudesse tihedusega 250 000 rakku/ml.

Rakkude pesemine (kui pole öeldud teisiti) ja inkubeerimine toimus puhverlahustes, milles varieeriti NaCl ja KCl kontsentratsioone vahemikus 145 mM kuni 5mM (vt. tabel 3). Ülejäänud komponendid antud lahustes olid 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 10 mM glükoos, 10 mM Hepes (C₈H₁₈N₂O₄S, pH 7,4) ja 1 mg/ml veise seerumialbumiini (OÜ Naxo, Eesti). Rakud pesti 2 korda vastavalt nelja erineva soolalahusega ja seejärel eelinkubeeriti 10 minutit 37 °C juures või madala temperatuuri katse korral jääl. Rakkudele lisati lahused, mis sisaldasid 0,5 µM biotinüleeritud transportpeptiidi ja 0,15 µM (10 µg/ml) fluorestseiin-isotiotsüanaadiga märgitud avidiini (Av-FITC; Sigma-Aldrich, Inc., MO, USA) komplekse või fluorestseiiniga märgitud transportpeptiidi lõppkontsentratsiooniga 3 µM. RPP-avidiiin

kompleksidega katsetes kasutati kontrollina 0,15 μ M Av-FITC-ga töödeldud rakke. Rakke inkubeeriti sõltuvalt katsest 37 °C juures tund aega või 30 minutit. Madalal temperatuuril teostatud katse korral inkubeeriti rakke tunni aja jooksul jääs. Pärast pesti rakud 2 korda soolalahustega ja üks kord trüpsiinilahusega (0.5 mg/ml PBS-s, 0.2 mg/ml EDTA; Gibco[®], Invitrogen Corporation, CA, USA). Rakud eemaldati plastikult inkubeerides trüpsiiniga 37 °C juures 10 minutit. Rakkude suspensioonile lisati külma soolalahust, koguti, tsentrifugeeriti toatemperatuuril 10 sekundit 16000 \times g ja resuspendeeriti külma lahusega. Raku välise fluorestsentsignaali kustutamiseks ja rakkude intaktsuse hindamiseks lisati suspensioonile 0,0005 %-list trüpaansinist (Sigma-Aldrich, Inc., MO, USA).

Analüüsi teostamiseni hoiti proove jääs. Lävivoolutsütomeetril (FACS) loendati igast proovist 30 000 rakku ning fluorestsentsi intensiivsuse analüüsimiseks kasutati firma „Becton Dickinson” lävivoolutsütomeetrit FACSCalibur ja sama firma tarkvara CellQuest (BD Biosciences, Heidelberg, Saksamaa). Andmete analüüsiks kasutati MS Excelit. Igas katses on tehtud kaks paralleeli ja tulemused on esitatud kahe katse keskmisena.

Tabel 3. Töös kasutatud NaCl-i ja KCl-i kontsentratsioonide vahemikud

Kasutatud sool	Lahus 1	Lahus 2	Lahus 3	Lahus 4
NaCl	145 mM	100 mM	50 mM	5 mM
KCl	5 mM	50 mM	100 mM	145 mM

Plasmamembraani potentsiaali mõju peptiidi sisenemisel K562 ja Jurkat rakkudesse

Membraanipotentsiaali rolli uurimiseks K562 ja Jurkat rakuliinides, kasutati antud suspensioonirakke tihedusel 200 000 rakku/ml. Selleks koguti rakud tsentrifugeerides toatemperatuuril (16000 \times g 10 sekundit), sööde aspireeriti ja rakud resuspendeeriti vastavas mahus erinevates soolalahustes (nagu eelnevalt kirjeldatud).

Rakud pesti 2 korda. Selleks suspendeeriti rakke lahustes ja tsentrifugeeriti (16000 \times g 10 sekundit). Seejärel inkubeeriti rakke 10 minutit 37 °C juures lahustega, millele oli

lisatud sõltuvalt katsest 3 – 10 μM fluorestseiiniga märgitud transportpeptiid. Pärast seda pesti rakud külma soolalahusega. Viimase tsentrifuugimise järel lisati rakusademele külma lahust, mis sisaldas lisaks 0,0005 %-list trüpaansinist. Proovid hoiti kuni FACS-l lugemiseni jääl. FACS analüüs teostati nagu eelnevalt kirjeldatud.

Suspensioonirakkude depolarisatsiooni hindamine

Membraanipotentsiaali kaudseks hindamiseks kasutati K562 ja Jurkat rakke tihedusega 200 000 rakku/ml. Selleks koguti rakud tsentrifuugides toatemperatuuril ($16000\times g$ 10 sekundit), sööde aspireeriti ja rakud pesti üks kord vastavas mahus erinevates soolalahustes. Rakke inkubeeriti 10 minuti jooksul $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Seejärel lisati värsked lahused, mis sisaldasid 2 μM membraanipotentsiaali hindamiseks kasutatavat fluorestseeruvat värvi DiBAC (bis-(1,3-dibutüülbarbituraathape)-trimetiin oksanool; Molecular Probes™, Invitrogen Corporation, CA, USA) ja inkubeeriti veel 10 minutit ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Rakud pesti ning analüüsiti FACS-l nagu eelnevalt kirjeldatud (kuid viimastele soolalahustele ei lisatud trüpaansinist).

Fluorestsentsmikroskoopia

Fluorestsentsmikroskoopiaks külvati eelmisel päeval 50 000 HeLa rakku 24-kaevuliste plaatide (Greiner bio-one, Saksmaa) kannudesse ümmargustele katteklaasidele (“Menzel-Gläser”, #1, diameetriga 12 mm, Saksamaa). Katsepäeval pesti rakud 2 korda soolalahustega (nagu eelnevalt kirjeldatud, kuid NaCl ja KCl kontsentratsioonid olid vastavalt 145 mM ja 5 mM; 75 mM ja 75 mM; 5 mM ja 145 mM) ja lasti tasakaalustuda 10 minutit $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Seejärel lisati inkubatsioonilahus, mis sisaldas 0,5 μM biotiiniga märgitud transportpeptiidi ja 1:200 (0,15 μM) Alexa Fluor 488-ga märgitud avidiini (Molecular Probes™, Invitrogen Corporation, CA, USA) komplekse. Pärast inkubatsiooni pesti rakke 2 korda ning inkubeeriti vastava puhverlahustega toatemperatuuril 5 minuti jooksul, kuhu oli lisatud 10 $\mu\text{g/ml}$ propiidiumjodiidi (Sigma-Aldrich, Inc., MO, USA). Seejärel pesti rakud uuesti 2 korda. Rakkudega katteklaasid sulundati alusklaasidele ja servad suleti värvitu küünelakiga.

Fluorestsentskujutised salvestati CCD kaameraga DX70 varustatud Olympus BX61 fluorestsentsmikroskoobiga ning töödeldi arvutiprogrammiga DP Manager. Saadud fluorestsentskujutiste viimistlemiseks kasutati arvutiprogrammi Adobe Photoshop 7.0.

Elektronmikroskoopia

Transmissioonielektronmikroskoopiaks külvati HeLa rakud 24-kaevuliste plaatide (Greiner bio-one, Saksmaa) kannudesse ümmargustele katteklaasidele ("Menzel-Gläser", #1, diameetriga 12 mm, Saksamaa) sellise arvestusega, et katse tegemise hetkeks oleksid rakud 80 – 100% konfluentsusega. Rakkudel lasti klaasidele kinnituda ja kasvada minimaalselt 24 tundi enne eksperimendi teostamist.

Rakke inkubeeriti kullaga konjugeeritud transportpeptiididega 37 °C juures CO₂ termostaadis 1 tund seerumiga IMDM söötmes. Sõltuvalt katsest kasutati 0,5 – 2,5 µM peptiidi kontsentratsiooni. RPP kovalentseks märgistamiseks lahustati vastav peptiid 1 mM kontsentratsioonil deaereeritud destilleeritud vees (ddH₂O) ja lisatsüsteiini tiolrühm modifitseeriti spetsiifiliselt monomaleimiid-nanokullaga (*Monomaleimide-Nanogold*TM; 1,4 nm diameetriga, Nanoprobes Inc, NY, USA) vastavalt tootja protokollile, kasutades peptiidi 3-kordset molaarset ülehulka märgise suhtes.

Töödeldud rakke fikseeriti 3% glutaaraldehüüdiga (Electron Microscopy Science, PA, USA) 0,1 M naatriumkakodülaatpuhvril (pH 7,2; (CH₃)₂AsO₂Na (Fluka, Sigma-Aldrich, Inc., MO, USA)) 1 tund toatemperatuuril. Seejärel pesti rakke ühe tunni jooksul, vahetades kakodülaatpuhvrit iga 20 minuti järel.

Kullamärgise suurendamine

Metallilise hõbeda sadestamisega kullapartiklitele suurendati märgiseosakese diameetrit, hõlbustades sel moel peptiidide detekteerimist elektronmikroskoopias. Hõbeda reagentide valgustundlikkuse tõttu teostati antud etappi pimedas ruumis kasutades punase filtriga valgusallikat. Rakud pesti eelnevalt destilleeritud veega ning seejärel töödeldi hõbeda reagentidega (HQ SILVERTM Enhancement kit, Nanoprobes Inc, NY, USA). Hõbetamisreandid segati kokku vahetult enne kasutamist vastavalt tootjapoolsetele juhistele. Rakud kaeti hõbetamisseguga ning inkubeeriti sõltuvalt

katses 3 – 5 minutit toatemperatuuril. Reaktsiooni peatamiseks pesti rakke 10 minuti jooksul kaks korda destilleeritud veega. Hõbedasade stabiliseeriti kullatöötusega. Selleks inkubeeriti rakke 2%-lise naatriumatsetaadiga (OÜ Naxo, Eesti) 3 x 5 minutit toatemperatuuril, seejärel 0,05%-lise HAuCl_4 (Reachim, NSVL) lahusega 10 minutit jääs ning lõpuks 0,3%-lise $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Inc., MO, USA) lahusega 2 x 10 minutit jääs. Reaktsioon peatati proovide pesemisega destilleeritud vees toatemperatuuril.

Rakkude osmeerimine ja sisestamine vaiku

Enne rakkude edasist töötlemist pesti rakke kakodülaatpuhvril ning rakumembraanide rõhutatud visualiseerimiseks inkubeeriti rakke järgnevalt 1 tunni jooksul värskeltvalmistatud 1% OsO_4 (Electron Microscopy Science, PA, USA) lahusega 0,1 M naatriumkakodülaatpuhvril (pH 7,2), millele lisati 15 mg/ml kollast veresoola ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; Sigma-Aldrich, Inc., MO, USA). Osmiumi reagenti eemaldamiseks pesti rakke kakodülaatpuhvriliga. Rakud dehüdreeriti 70%, 96% ja absoluutse etanooliga, inkubeerides neid igas lahuses 1 minuti jooksul. Täielikuks veetustamiseks kasteti rakkudega kaetud katteklaasid hetkeks atsetooni sisse. Seejärel pandi katteklaasid rakkudega pealpool lamedatele alumiiniumalustele ning kaeti koheselt epoksüvaiguga (TAAB Premix Embedding Kit Medium, TAAB Laboratories Equipment Ltd., Suurbritannia). Rakkudele asetati eelnevalt vaiguga täidetud polüetüleenkaplid (BEEM®, Electron Microscopy Science, PA, USA), hoiti 2 tundi toatemperatuuril ning polümeriseeriti 60°C juures minimaalselt 14 tundi.

Alusklaasid eemaldati, nii et sisestunud rakud jäid vaiguploki ülemisele pinnale. Ultramikrotoomiga („PoweTome XL“, RMC Products by Boeckeler®, AZ, USA) lõigati rakkudest üliõhukesed (40-50 nm) lõigud. Preparaadid kontrasteeriti 2% uranüülatsetaadiga 50 % etanoolis ja pliitsitraadiga (Venable ja Coggeshall, 1965), mikroskopeeriti ning dokumenteeriti elektronmikroskoobiga JEM-100S („Joel“, Jaapan).

Elektronmikrofotode viimistlemiseks ja lõplikuks vormistamiseks kasutati arvutiprogrammi Adobe Photoshop 7.0.

TULEMUSED

Membraanipotentsiaali mõju transportpeptiidide ja avidiini komplekside sisenemisele HeLa rakkudesse

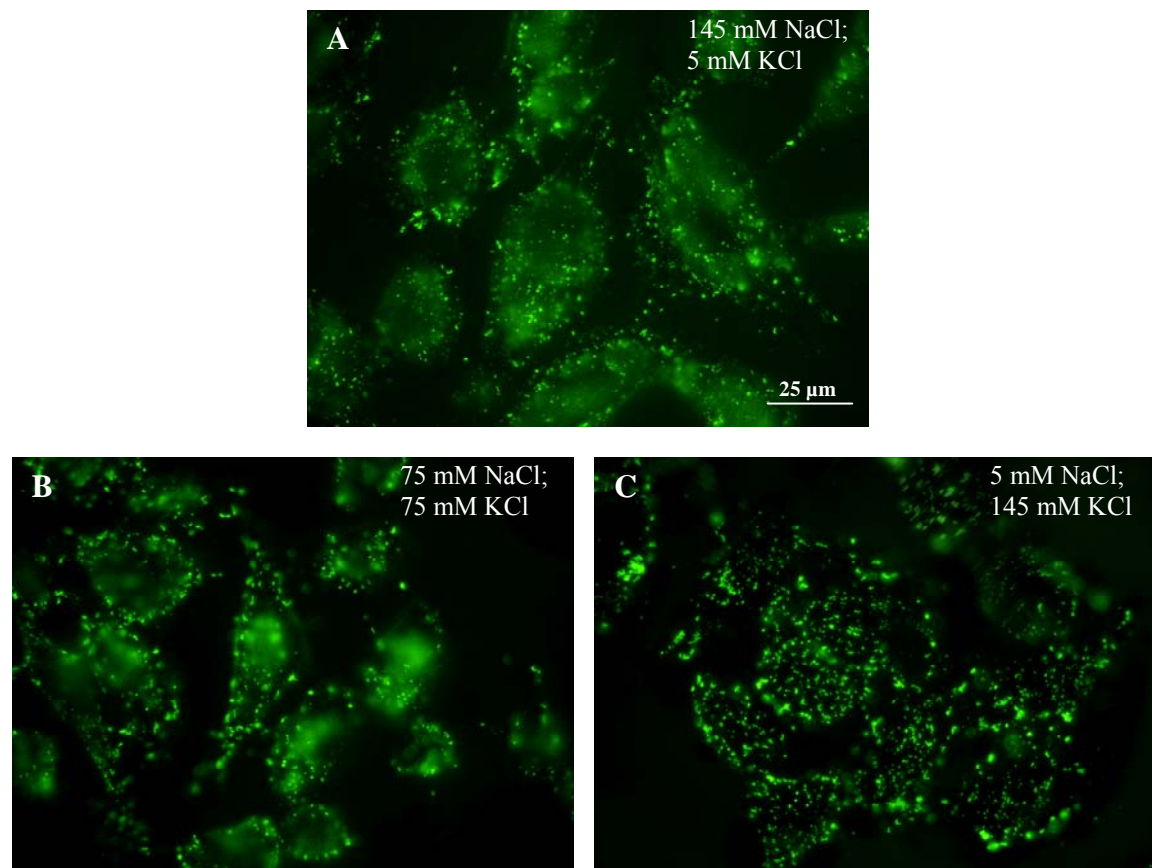
Viimasel ajal arvatakse üha enam, et RPP-d kasutavad rakku pääsemiseks erinevaid endotsütoosi radasid, samas ei välistata ka sisenemist otse läbi plasmamembraani (Rothbard *et al.*, 2005). Seega otsustati hinnata kui suur osa RPP-de vahendatud transpordil on endotsütoosil ja milline panus penetratsioonil, mida peetakse membraanipotentsiaalset sõltuvaks protsessiks (Aidley, 1996; Watanabe *et al.*, 2004). Selleks uuriti biomolekuli akumulatsioonide efektiivsust rakkudes, millede membraanipotentsiaali järjest alandati. Depolariseeritud rakkudes peaks penetratsioon olema blokeeritud, kuid endotsütoosi ei tohiks potentsiaali vähenemine või puudumine mõjutada (Boisseau *et al.*, 2006).

67 kDa valk avidiin moodustab väga stabiilse kompleksi biotiiniga. Selline biotiini omadus võimaldab tema kaudset visualiseerimist näiteks avidiiniga, millega on liidetud fluorestseeruv rühm. Uurimaks RPP-de vahendusel toimival transpordil suure lastmolekuli internaliseerumist HeLa rakkudesse sõltuvalt membraanipotentsiaalset, kasutati antud töös fluorestseiin-isotiotsüanaadiga (FITC) märgitud avidiini komplekse vastava biotinüleeritud peptiidiga.

Membraanipotentsiaali mõju hindamiseks kasutati kahte meetodit. Fluorestsentsmikroskoopia jaoks inkubeeriti rakke biotinüleeritud peptiidide ja Av-FITC kompleksidega tund aega puhverlahuses, kus varieeriti naatrium- ja kaaliumioonide kontsentratsiooni, et saada erineva polariseerituse tasemega rakud ning visualiseeriti elusrakke. Kuna fluorestsentsmikroskoopia ei võimalda rakkudesse sisenenud komplekside kvantitatiivset analüüsi, kasutati lisaks läbivoolutsütomeetrit, mis võimaldab elusate rakkude fluorestsentssignaali hindamist. Sellisel juhul toimus inkubatsioon peptiid-valk kompleksidega 37 °C juures või jääl ning pärast inkubatsioonilahuse eemaldamist töödeldi proove trüpaansiniseaga, et kustutada fluorestsentssignaal kompleksidelt, mis on plasmamembraani välisküljega seondunud aga veel rakkudesse mitte sisenenud.

HeLa rakkude inkubeerimisel transportaan10 (TP10) ja avidiini kompleksidega lahuses, mis peaks vastama füsioloogilistele tingimustele, on märkimisväärne osa

fluorestseeruvaid partikleid koondunud rakkudesse (joonis 3a). Need on tsütoplasmas jälgitavad suuremate ja väiksemate helenduvate graanulitena, kuid esineb ka difuusset märkumist. Osaliselt depolariseeritud rakkudes paiknevad kompleksid eelistatult suuremates vesikulaarsetes struktuurides tsütoplasma membraanilähedases piirkonnas (joonis 3b), samas on võimalik detekteerida komplekside hajusat signaali. Samuti on märgatav rakkude kinnituspinna vähenemine. Täielikult depolariseeritud rakkudes on peptiid-valk kompleksid valdavalt agregeerunud plasmamembraani pinnale ja vaadeldavad teraliste struktuuridena (joonis 3c) ning märgatavad on ka rakkude morfoloogilised muutused. Need ei ole enam lamestunud nagu normaalselt koekultuuris kasvavad HeLa rakud ning on kergelt pundunud.

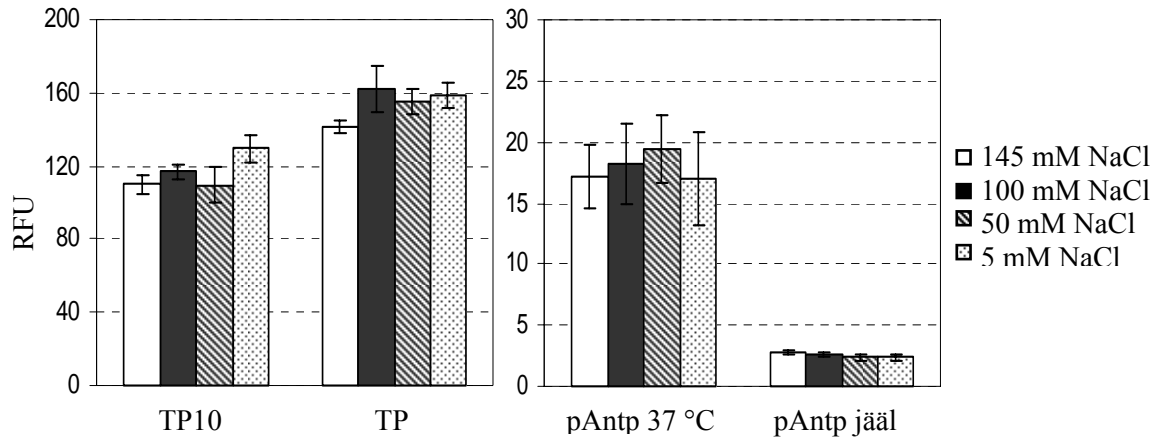


Joonis 3. Biotinüleeritud peptiidi ja avidiini komplekside paiknemine erineva polariseerituse tasemega rakkudes. HeLa rakke inkubeeriti 0,15 μM Alexa Fluor 488-märgitud avidiini ja 0,5 μM biotinüleeritud TP10 kompleksidega 1 tund temperatuuril 37 °C erineva Na⁺/K⁺ ionide suhtega puhverlahuses, et moduleerida rakkude membraanipotentsiaali. Visualiseeriti elusrakke.

Elusate rakkude fluorestsentsignaali kvantitatiivsest analüüsist FACS-ga ilmnes, et 37 °C juures tunniajase inkubatsiooni järel olid kolmest uuritud peptiidist efektiivseimad valgu transpordi vahendajad transportaan ja selle analoog TP10, tõstes rakkude fluorestsentsi füsioloogilises lahuses vastavalt 140 ja 125 korda võrreldes avidiin-FITC-ga inkubeeritud rakkudega (joonis 4). Seevastu penetratiin suurendas avidiini rakusisest kontsentratsiooni ligikaudu 17 korda. Samas on kõik peptiid- Valk kompleksidega töödeldud rakupopulatsioonid homogeensed, viidates kõigi analüüsitud rakkude märkumisele (pole töös näidatud).

Jälgides biotinüleeritud transportaani ja TP10 avidiiniga moodustunud komplekside sisenemist järk-järgult väheneva membraanipotentsiaaliga rakkudes ilmnes, et depolariseeritud rakkudes võib detekteerida minimaalset komplekside sisenemise efektiivsuse tõusu. Penetratiin-avidiin komplekside korral kinnituvatesse rakkudesse akumulereerumise efektiivsuse hindamisel ei ole valgu kontsentratsiooni muutused märkimisväärsed.

Inkubeerides rakke penetratiin-avidiin kompleksidega jääl (0 – 4 °C), kus ATP-st sõltuvad energeetilised protsessid ja seega ka endotsütoos on tugevalt inhibeeritud, on näha, et fluorestsentsignaali tugevus on langenud ligikaudu seitsmekordselt (joonis 4). Samas isegi sellistes tingimustes olevatesse rakkudesse pole komplekside tsütoplasmasse jõudmine täielikult blokeeritud. Säilib ka populatsiooni homogeensus (pole töös näidatud) ja komplekside sisenemise efektiivsus membraanipotentsiaalset ei sõltu.



Joonis 4. Biotinüleeritud peptiidi ja avidiin-FITC komplekside rakkudesse sisenemise efektiivsus erineva polariseerituse tasemega rakkudes. HeLa rakke inkubeeriti 0,15 μM avidiin-FITC-i ja 0,5 μM biotinüleeritud peptiidi kompleksidega 1 tund 37 °C juures või jääl erineva Na^+/K^+ ioonide suhtega puhverlahuses, et saada erineva membraanipotentsiaaliga rakupopulatsioonid. Rakuväline fluorestsentsisignaal kustutati trüpaansinisega. Fluorestsentsi intensiivsus on esitatud suhtena avidiin-FITC-ga töödeldud rakkudesse. RFU – relatiivne fluorestsentsi ühik.

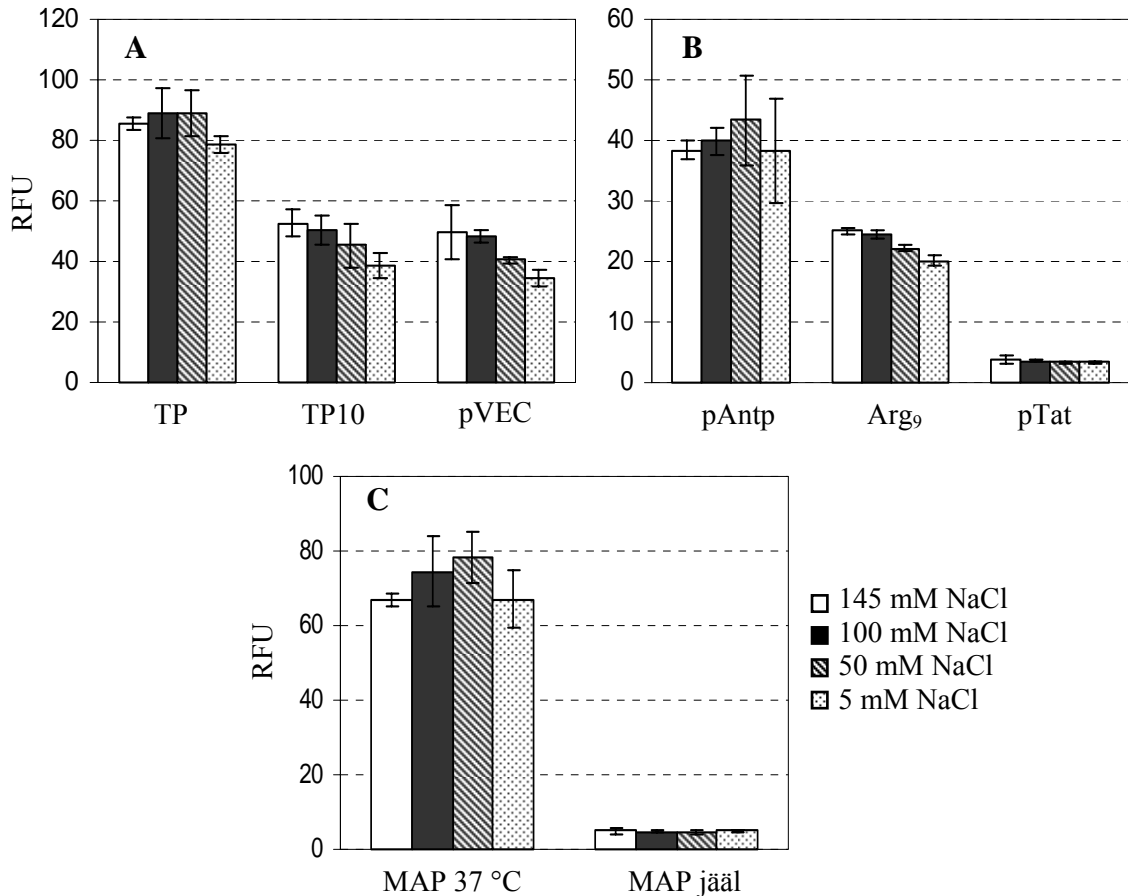
Transportpeptiidide sisenemine HeLa rakkudesse sõltuvalt membraanipotentsiaalist

On teada, et RPP enda ja RPP vahendatud lastmolekuli transportimehhanism(id) võivad erineda (Tunnemann *et al.*, 2006). Kuivõrd peptiid-alk komplekside sisenemise efektiivsuse muutused depolariseeritud rakkudes ei olnud märkimisväärsed, otsustati uurida peptiidi enda akumulereerumise kineetikat sõltuvalt membraanipotentsiaalist. Selleks inkubeeriti rakke fluorestseiniiga märgitud peptiididega (RPP-Fluo) tunni aja jooksul temperatuuril 37 °C või jääl ning pärast kompleksidega lahuse eemaldamist töödeldi proove trüpaansinisega.

Kasutades FACS-i nähtus, et seitsmest uuritud RPP-Fluo-st osutus soolalahuses, mis vastab füsioloogilistele tingimustele, efektiivseimaks samuti transportaan (joonis 5a), tõstes rakkude fluorestsentsisignaali ligikaudu 85 korda. Kõige vähemal määral akumulereerus rakkudesse Tat-peptiid, näidates ainult kuni 4 korda kõrgemat signaali kui töötlemata HeLa rakud (joonis 5b). Ülejäänud viie peptiidi (MAP, TP10, pVEC, penetratiin ja Arg₉) korral tõusis fluorestsentsisignaal vähemalt 25 korda võrreldes töötlemata rakkudega (joonis 5). Uurides antud peptiidide sisenemise efektiivsust sõltuvalt plasmamembraani potentsiaalist 37 °C juures, selgus, et kõige vähem on

mõjutatud transportaani, penetratiini, Tat-peptiidi ja MAP-i internaliseerumine. TP10-e ja pVEC-i akumulatsioonil rakkudesse on märgata mõningast peptiidi rakusisesest kontsentratsiooni langust, kui tõsta kaaliumioonide hulka rakuvälises keskkonnas. Seevastu oligoarginiini (Arg₉) korral on sisenemise efektiivsuse vähenemine ligikaudu 20 %-line. Lühendades Arg₉ puhul inkubatsiooniaega poolele tunnile, saadi analoogsed tulemused (pole töös näidatud).

Rakkude inkubeerimine jääkülma füsioloogilise soolalahusega ja fluorestseiniiga märgitud MAP-ga põhjustab saagise langust 13 korda võrreldes 37 °C juures detekteerituga (joonis 5c). Samas on MAP võimeline ka sellistes tingimustes rakkudesse sisenema, näidates 5 korda suuremat fluorestsentsi signaali kui töötlemata rakkudes, olles seega ka madalal temperatuuril rakkudesse sisenemise seisukohalt mõnevõrra efektiivsem RPP kui seda on Tat-peptiid 37 °C juures. Uurides MAP-i internaliseerumise efektiivsust erineva depolariseerituse tasemega rakkudes võib täheldada, et MAP-i akumulatsioon ei mõjuta membraanipotentsiaali muutmine/muutumine ka madalal temperatuuril.



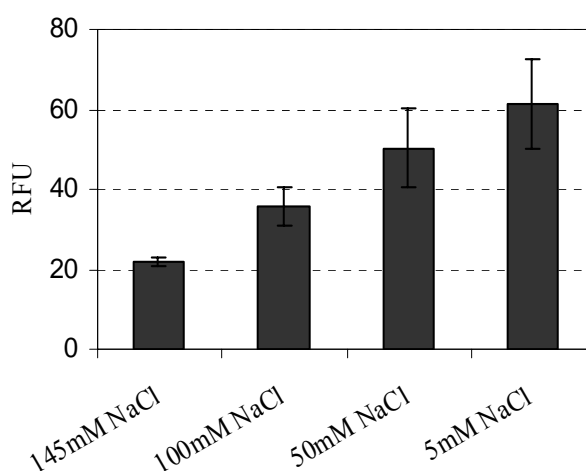
Joonis 5. Fluorestsiiniga märgitud RPP-de rakkudesse sisenemise efektiivsus erineva polariseerituse tasemega rakkudes. HeLa rakke inkubeeriti 3 μM RPP-Fluo-ga 1 tund 37 °C juures või jääl erineva Na^+/K^+ ionide suhtega puhverlahuses, et saada erineva membraanipotentsiaaliga rakupopulatsioonid. Rakuväline fluorestsentsignaali kustutati trüpaansinisega. Fluorestsentsi intensiivsus on esitatud suhtena töötlemata rakkudesse.

Transportpeptiidide sisenemine K562 rakkudesse sõltuvalt membraanipotentsiaalst

Järgmiseks taheti teada saada, kas membraanipotentsiaali mõju RPP-de rakkudesse sisenemisele võib muutuda sõltuvalt ajast, kuna rakkude pikaajane depolariseeritus võib mõjutada ka muid raku funktsioone. Uurimaks peptiidide sisenemist depolariseeritavatesse rakkudesse lühiaegsel inkubatsioonil ja võimalikku erinevust pikaajalisest protsessist, kasutati algselt K562 suspensioonirakke. Kinnituvates rakkudes ei oleks antud katsete läbiviimine mõeldav, kuna rakkude eemaldamine plastikult võtaks rohkem aega kui lühikese inkubatsiooniaja kestus ise.

Kõigepealt kontrolliti, kas rakkude lühiajaline inkubeerimine vastava naatrium- ja kaaliumioonide kontsentratsiooniga puhverlahustes põhjustab membraanipotentsiaali muutust. Selleks pesti K562 rakud kaks korda vastavate lahustega ja seejärel inkubeeriti 10 minuti jooksul 2 μM DiBAC-ga 37 °C juures. On näidatud, et bis-oksanoolsete värvide (sinna hulka kuulub ka DiBAC) sisenemine depolariseeritud rakkudesse ja seondumine intratsellulaarsete valkude ja membraanidega põhjustab DiBAC-i fluorestsentssignaali tõusu (Epps *et al.*, 1994), mis võimaldab hinnata rakkude membraanipotentsiaali. Mida enam on rakud depolariseeritud, seda efektiivsem on anioonse värvi akumulatsioon rakkudesse ning selle tagajärjel on nähtav fluorestsentsi intensiivsuse tõus (Dall'Asta *et al.*, 1997).

Saadud tulemustest võib järeldada, et piisab 10 minutilisest inkubatsioonist vastavate ionsete kontsentratsioonidega lahuses, et rakkudes membraanipotentsiaal muutuks (joonis 6). DiBAC-ga inkubeerimisel on näha järk-järgulist fluorestsentssignaali tõusu, kusjuures madalaima Na^+ ionide kontsentratsiooni korral on fluorestsentssignaal kuni 3 korda kõrgem kui füsioloogilises lahuses olevatel rakkudel.

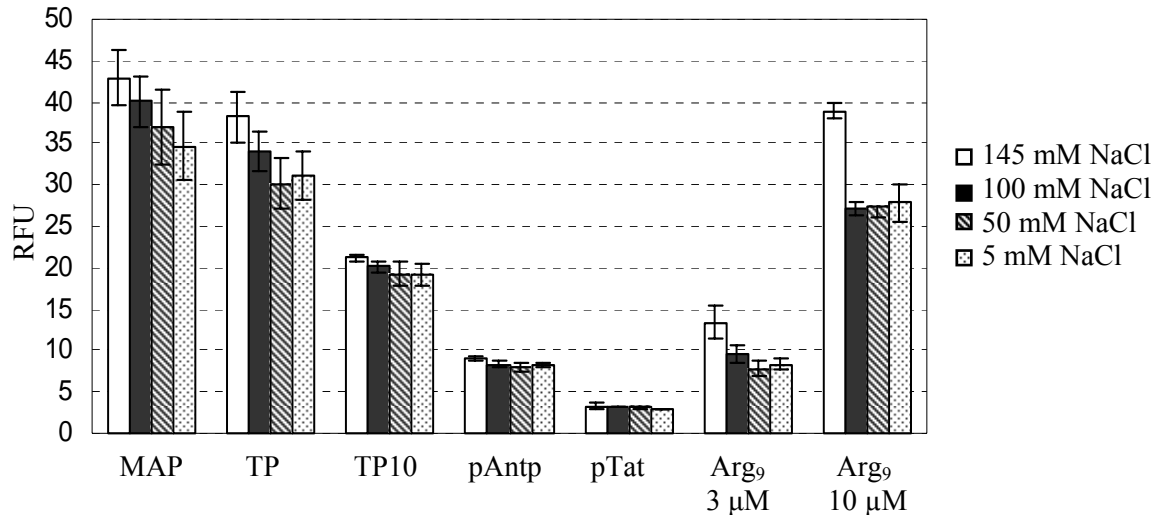


Joonis 6. K562 rakkude membraanipotentsiaali muutuse sõltuvus Na^+ ja K^+ kontsentratsioonist keskkonnas. Rakke inkubeeriti 2 μM DiBAC-ga 10 minutit 37 °C juures erineva Na^+/K^+ ionide suhtega puhverlahuses.

Et jälgida peptiidide sisenemist depolariseeritavatesse rakkudesse lühikese aja jooksul, inkubeeriti K562 rakke 10 minutit erinevate NaCl ja KCl kontsentratsiooniga lahustes, mis sisaldasid lisaks fluorestseiniiga märgitud peptiide. Rakkude välispinnal olevate peptiidide fluorestsentssignaal kustutati trüpaansinisega.

Antud katsetest ilmnes, et kõik uuritud RPP-d on võimelised sisenema rakkudesse juba kümne minuti jooksul. Madala RPP-Fluo kontsentratsiooniga (3 μM , nagu ka HeLa rakkudega tehtud katsetes) inkubeerimisel selgus, et füsioloogilises lahuses on uuritud peptiididest efektiivseim MAP, tõstes rakkude fluorestsentssignaali ligikaudu 40 kordselt (joonis 7). Halvimaks rakkudesse akumulējuks osutus jällegi Tat-peptiid, jäädes sarnasele tasemele HeLa rakkudes detekteeritule (kuni 4 korda kõrgem signaal kui töötlemata rakkudel). Ülejäänud peptiidide sisenemisvõime jäi selle miinimumi ja maksimumi vahele. Jälgides RPP-Fluo-de rakkudesse kontsentreerumise efektiivsuse võimalikku sõltuvust rakkude polariseerituse tasemest, ilmnes, et viie uuritud peptiidi (MAP, TP, TP10, penetratiin ja Tat-peptiid) korral on täheldatav teatav internaliseerumise vähenemine madalama potentsiaaliga rakkudes. Rakkude lühiajalisel töötlemisel oligoarginiiniga 37 °C juures on seevastu sisenemise vähenemine ligikaudu 1,5 kordne.

Kuna Arg₉ internaliseerumine rakkudesse väljendas mõningast sõltuvust rakkude membraanipotentsiaalst, otsustati uurida, kas see võib sõltuda ka peptiidi kontsentratsioonist. Rakkude inkubeerimisel 10 μM oligoarginiiniga suurenes füsioloogilises lahuses olnud rakkude fluorestsentssignaal 3 korda võrreldes 3 μM Arg₉-ga (joonis 7). Hinnates sisenemise efektiivsust järjest rohkem depolariseeritud rakkudesse, selgus, et tulemused on samad, mida nähti ka madala kontsentratsiooni juures ning rakkudesse sisenemise vähenemine oli 1,5 kordne. Samas ei olnud see langus lineaarne nagu eeldada võiks, vaid peptiidi sisenemise efektiivsus langes juba 100 mM NaCl-ga lahuses poolteist korda ning jäi membraanipotentsiaali alanedes sarnasele tasemele.

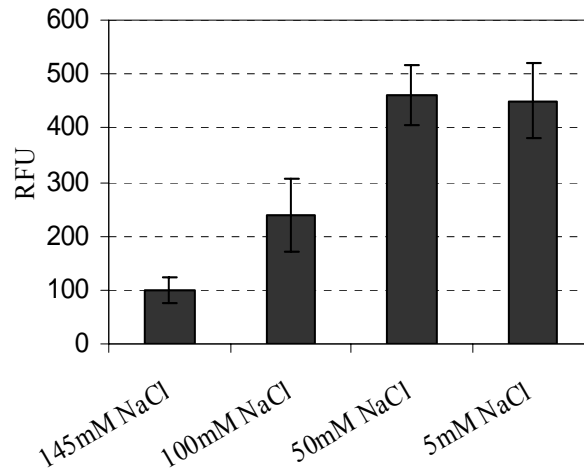


Joonis 7. Fluorestseiniiga märgitud RPP-de rakkudesse sisenemise efektiivsus erineva polariseerituse tasemega rakkudes. K562 rakke inkubeeriti 3 või 10 μM RPP-Fluo-ga 10 minutit 37 °C juures erineva Na^+/K^+ ionide suhtega puhverlahuses, et saada erineva membraanipotentsiaaliga rakupopulatsioonid. Rakuvälise fluorestsentssignaali kustutati trüpaansinise. Fluorestsentsi intensiivsus on esitatud suhtena töötlemata rakkudesse.

Transportpeptiidide sisenemine Jurkat rakkudesse sõltuvalt membraanipotentsiaalst

Varem on näidatud, et olenevalt rakuliinist võivad RPP-de sisenemise mehhanism(id) erineda (Fretz *et al.*, 2007). Selle hüpoteesi uurimiseks võtsime kasutusele ka teise suspensioonirakkude liini. Jurkat rakud on teadaolevalt rohkem terminaalselt diferentseerunud kui K562 rakud.

Sarnaselt K562 rakkudega tehti eelnevalt kindlaks Jurkat rakkude depolarisatsiooni toimumine 10 minuti jooksul, inkubeerides neid DiBAC-ga neljas erinevas Na^+/K^+ ionide suhtega soolalahuses. Saadud tulemused näitavad, et ka antud rakkude membraanipotentsiaal sõltub ionide tasakaalust (joonis 8). DiBAC-i signaal depolariseeritud rakkudes oli üle nelja korra kõrgem kui normaalsetel rakkudel. Üllatuslikult ilmnis, et signaal ei ole lineaarses sõltuvuses naatriumioonide kontsentratsioonist, vaid juba 50 mM rakuvälise NaCl kontsentratsiooni juures on Jurkat rakkudes detekteeritav samaväärne fluorestsentssignaal kui 5 mM NaCl korral.

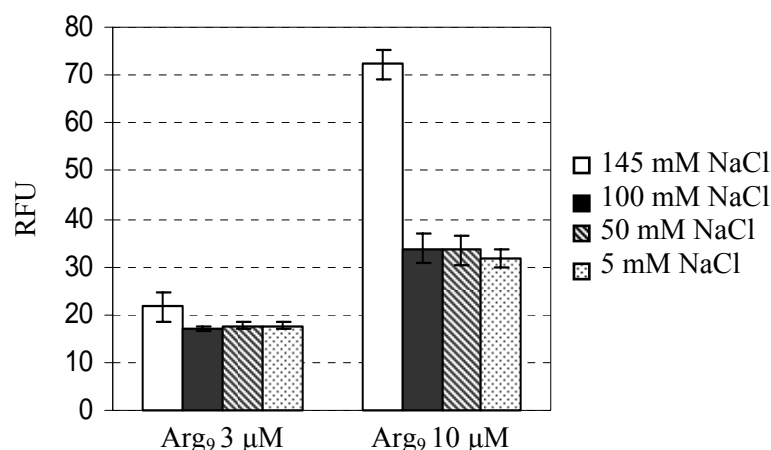


Joonis 8. Jurkat rakkude membraanipotentsiaali muutuse sõltuvus Na^+ ja K^+ kontsentratsioonist keskkonnas. Rakke inkubeeriti 2 μM DiBAC-ga 37 °C juures 10 minutit erineva Na^+/K^+ ionide suhtega puhverlahuses.

Et hinnata RPP-de sisenemise efektiivsust Jurkat rakkudesse, töödeldi neid 10 minuti jooksul soolalahustes, kus varieeriti NaCl ja KCl kontsentratsiooni. Inkubatsioonilahusesse olid lisatud RPP-Fluo-d ning enne analüüsi FACS-l töödeldi rakke trüpaansinisega.

Rakkude inkubeerimisel 3 μM Arg₉-ga toimub peptiidi kontsentreerumine rakkudesse, kusjuures füsioloogilistel tingimustel on märgata ligi 20-kordset fluorestsentsi tõusu võrreldes töötlemata rakkudega (joonis 9). Rakkudesse sisenemise efektiivsus langeb vähesel määral kui alandada membraanipotentsiaali. Selleks, et uurida internaliseerumise efektiivsuse võimalikke erinevusi kontsentratsioonist, kasutati 10 μM Arg₉-t. Antud olukorras vähenes peptiidi sisenemine rakkudesse potentsiaali vähendamisel, kusjuures ka siin ei esinenud lineaarne sõltuvus, vaid juba vähesel määral depolariseeritud rakkudes on peptiidi sisenemise efektiivsus langenud rohkem kui 2 korda ning see jääb sarnasele tasemele ka täielikult depolariseeritud rakkudes.

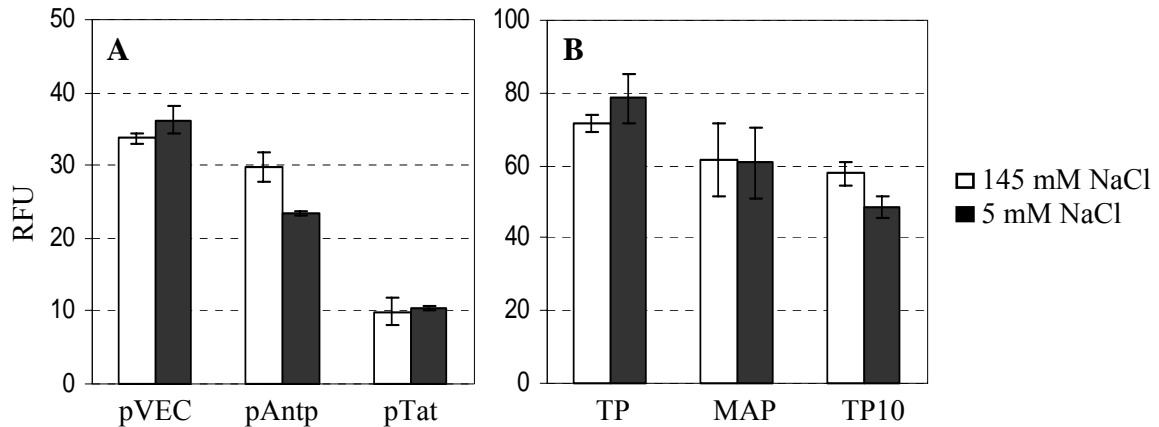
Kuna 10 μM oligoarginiini puhul oli Jurkat rakkudes võimalik detekteerida selget akumulatsioonist erinevust sõltuvalt potentsiaalidest, siis oletati, et ka teiste RPP-de kasutamisel kõrgemal kontsentratsioonil võiksid efektid olla suuremad ja seega üheselt mõistetavamad. Kolmest uuritud RPP-Fluo-st (penetratiin, pVEC ja Tat-peptiid) oli 10 μM kontsentratsioonil ainult penetratiini puhul võimalik tuvastada



Joonis 9. Fluorestseiniga märgitud oligoarginiini rakkudesse sisenemise efektiivsus erineva polariseerituse tasemega rakkudes. Jurkat rakke inkubeeriti 3 või 10 μM Arg₉-fluorestseiniga 10 minutit 37 °C juures erineva Na⁺/K⁺ ionide suhtega puhverlahuses, et saada erineva membraanipotentsiaaliga rakupopulatsioonid. Rakuväline fluorestsentsignaali kustutati trüpaansinisega. Fluorestsentsi intensiivsus on esitatud suhtena töötlemata rakkudesse.

mõningane sisenemise efektiivsuse langus depolariseeritud rakkudes (joonis 10a). Nende peptiidide kasutamisel oli fluorestsentsignaali füsioloogilises lahuses 10 korda (Tat-peptiid) kuni 30 korda (pVEC) kõrgem kui töötlemata rakkudel.

Varem on näidatud, et transportaan ja eelkõige MAP peptiid põhjustavad suurematel kontsentratsioonidel toksilisust (Hällbrink *et al.*, 2001). Seetõttu otsustati antud peptiidide ja ka TP10 korral uurida nende sisenemist algselt 5 μM kontsentratsioonil. Kõige efektiivsemaks osutus transportaan, näidates ligikaudu 70-kordset fluorestsentsi tõusu (joonis 10b). Nii TP-i kui ka MAP-i korral ei esine sõltuvust membraanipotentsiaalst, samas TP10 puhul võib teatavat sisenemise vähenemist märgata. Kuna MAP ja transportaan osutusid sellisel kontsentratsioonil ka suhteliselt toksiliseks, põhjustades membraanide häiritusi keskmiselt 15 – 20 % rakkudest populatsioonis (pole töös näidatud), otsustati antud peptiididega mitte teha katseid veel kõrgema kontsentratsiooniga. Samas TP10 kontsentratsiooni tõstmisel kaks korda ei ilmnenud rakkudesse sisenemise efektiivsuste suhte muutusi ega ka suuremat toksilisust (pole töös näidatud).



Joonis 10. Fluorestseiniiga märgitud RPP-de rakkudesse sisenemise efektiivsus erineva polariseerituse tasemega rakkudes. Jurkat rakke inkubeeriti 10 μM (a) või 5 μM (b) RPP-Fluo-ga 10 minutit 37 °C juures erineva Na⁺/K⁺ ionide suhtega puhverlahuses, et saada erineva membraanipotentsiaaliga rakupopulatsioonid. Rakuväline fluorestsentsignaali kustutati trüpaansinisega. Fluorestsentsi intensiivsus on esitatud suhtena töötlemata rakkudesse.

Elektronmikroskoopia

Transmissioonielektronmikroskoopiat kasutades uuriti nelja erineva *Nanogold*TM märgisega RPP HeLa rakkudesse sisenemist ja raku paiknemist ultrastruktuuri tasemel tunniajase inkubatsiooni järel. Rakkude inkubeerimine kullamärgisega peptiidide sisaldavas seerumiga söötmes näitas, et kõik uuritud RPP-d on detekteeritavad nii rakusiseselt kui –väliselt.

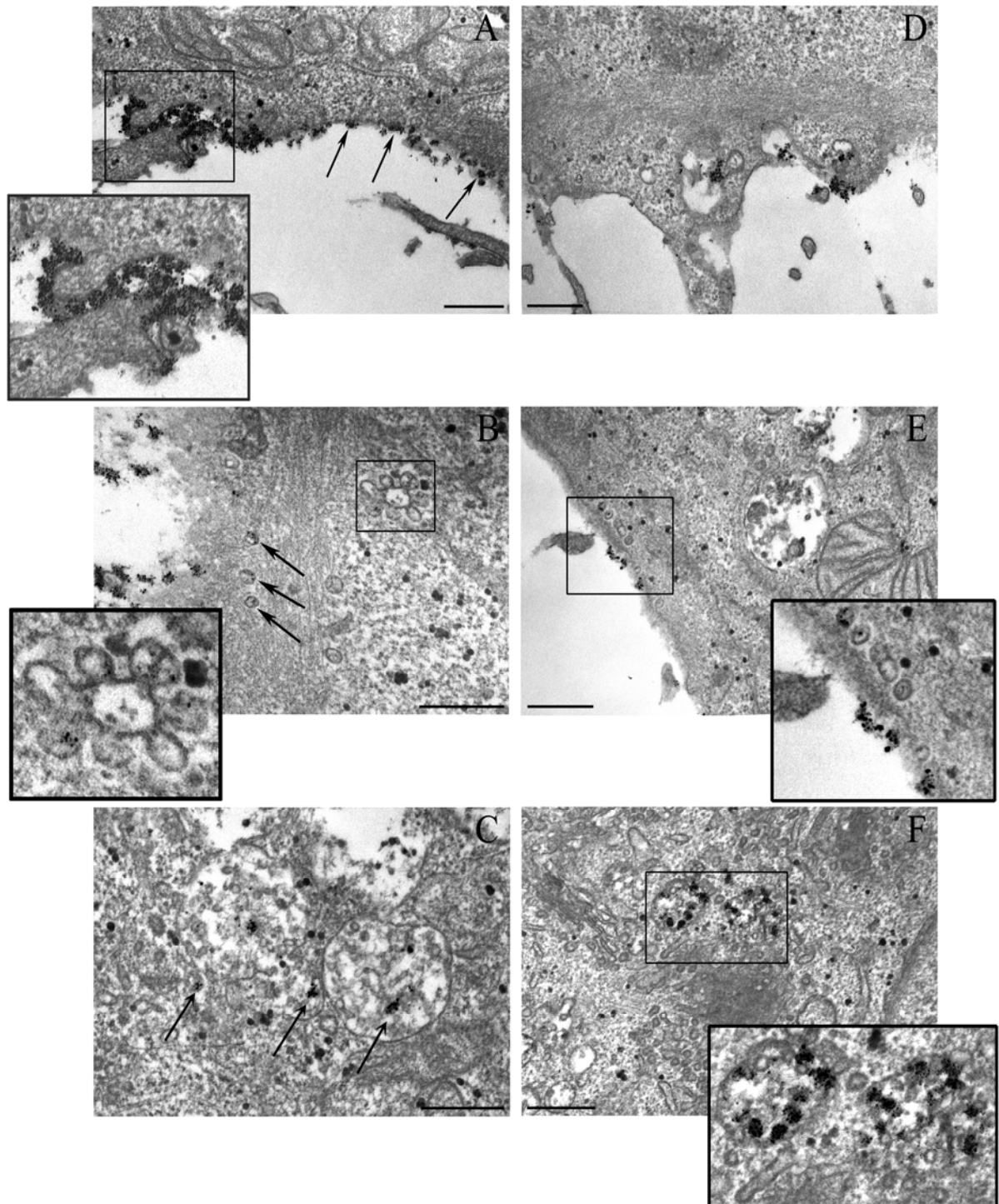
Tansportaan esineb ekstratsellulaarselt enamasti erineva suurusega agregaatidena plasmamembraani vahetus läheduses. Eriti tugevalt kontsentreerub peptiidid piirkonda, kus võib potentsiaalselt toimuda membraani „kurrutamine“ (joonis 11a). Rakkudest välja sopistunud filopoodidel on membraan enamasti paremini visualiseeritav. Rakujätketel esinev membraan on tihti eristatav elektrontihedama struktuurina võrreldes rakumembraani siledamate regioonidega. Rakus on peptiidi agregaadid üldjuhul väiksemad kui rakuvälises keskkonnas.

Raku sees paikneb *Nanogold*TM märgisega TP erineva morfoloogiaga vesiikulites (joonis 11b ja 11c): (i) kortikaalses piirkonnas kaveoolisarnastes vesiikulites, (ii) kaveoolide liitumise ja küpsemise tagajärjel moodustunud kaveosoomides ja (iii) suurtes vesiikulites (500 – 800 nm diameetriga), mis võivad oma iseloomult olla multivesikulaarsed kehakesed. Transportaani sisaldavate küpsevate endosoomide membraani terviklikkust ei ole alati võimalik tuvastada.

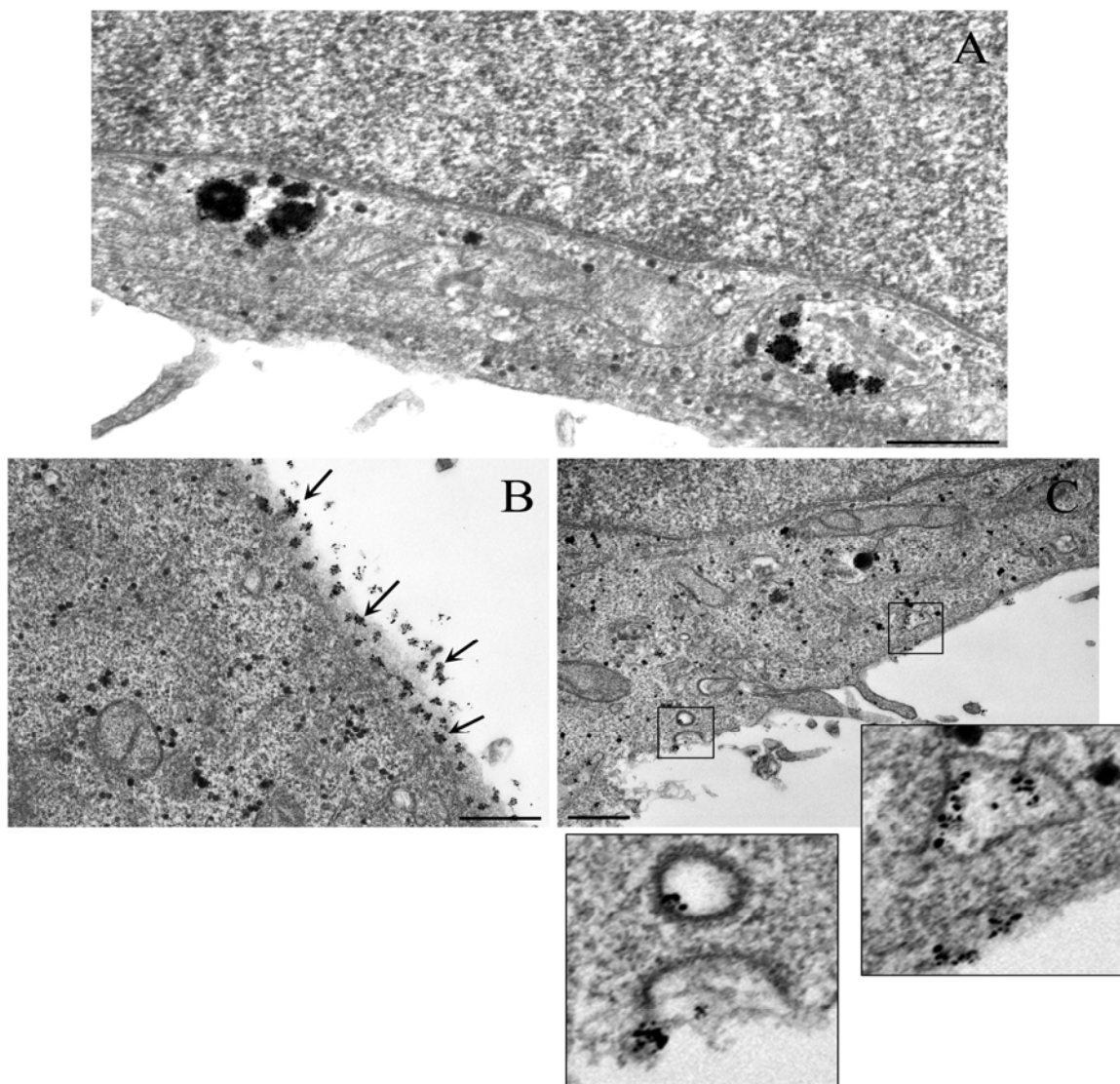
Kullaga märgitud TP10 korral on peptiid samuti koondunud plasmamembraani pinnale agregaatidena. Agregaatide võib näha membraani invaginatsioonides ja nende sisse sopistumisel satub multimeriseerunud peptiid suurtesse elektronheleda taustaga vesiikulitesse, mille näol võib olla tegemist makropinosoomi tekkega (joonis 11d). Samas on plasmamembraani läheduses TP10 detekteeritav ka väiksemate multimeeridena kaveoolides (joonis 11e). Jälgides küpsevaid endosoomi selgub, et TP10 paikneb enamasti multimeriseerunult ja kontsentreerunult suurematesse elektrontiheda taustaga vesiikulitesse, mille membraani on mõnikord võimalik tuvastada ainult osaliselt (joonis 11f).

HeLa rakkude inkubeerimisel kullaga kojugeeritud Tat-peptiidiga ilmneb, et RPP koondub ohtralt plasmamembraani lähedusse (pole töös näidatud). Raku sisemuses moodustab pTat enamasti suuri spetsiifilise kujuga agregaatide, mis kontsentreeruvad suurematesse ($\sim 0,5 - 1 \mu\text{M}$) elektrontiheda taustaga vesiikulitesse (joonis 12a).

Rakkude inkubeerimisel *Nanogold*TM märgisega pVEC-ga on näha, et peptiid multimeriseerub ja moodustab elektrontihedal taustal võrdlemisi ühtlase suurusega agregaatide (joonis 12b). Raku sees on pVEC detekteeritav membraanijätkete juures moodustuvates invaginatsioonides ning juba rakku sisenenud endosoomides (joonis 12c). Samuti on pVEC võimeline rakkudesse sisenema klatriin-sõltuva endotsütoosi kaudu, kuna peptiidi võib leida alles sisse sopistuvana ning ka rakku internaliseerunud klatriin-kaetud vesiikulis. Moodustuvate/moodustunud vesiikulite membraan on suurema elektrontihedusega ja paksem.



Joonis 11. *Nanogold*TM märgistatud RPP seundumine rakupinnaga ja rakusisene lokalisatsioon I. Transportaani (2,5 μ M (a-b) ja 0,5 μ M (c)) ja TP10 (0,5 μ M (d) ja 2,5 μ M (e-f)) paiknemine HeLa rakkudes peale 1-tunnilist inkubeerimist seerumiga söötmes 37 °C juures. TP agregaatide (nooded) seundumine rakupinnaga (a), paiknemine kaveoolides (nooded) ja kaveosoomis (b) ja TP multimeerid (nooded) küpsevates endosoomides (c). TP10 agregaatide seundumine rakupinnaga ja lokaliseerumine erineva morfoloogiaga vesiikulitesse (a,b) ning kontsentreerumine küpsevatesse endosoomidesse (c). Mõõtlõik 0,5 μ m.



Joonis 12. *Nanogold*TM märgistatud RPP seondumine rakupinnaga ja rakusisene lokalisatsioon II. 2 μM Tat-peptiidi kontsentreerumine HeLa rakkude vesiikulitesse (a) ja 0,5 μM pVEC-i agregaatide (nooled) seondumine rakupinnaga (b) ning paiknemine raku sees erineva iseloomuga vesiikulites (c) peale 1-tunnilist inkubeerimist seerumiga söötmes 37 °C juures. Mõõtlõik 0,5 μm .

ARUTELU

Käesolevas töös vaadeldi rakku penetreeruvate peptiidide (transportaan, selle analoogi TP10 ja penetratiini) võimet vahendada 67 kDa suuruse valgu – avidiini – transporti eukarüootsetesse rakkudesse ja uuriti sisenemise efektiivsust sõltuvalt plasmamembraani potentsiaalst, kasutades analüüsiks fluorestsentsmikroskoopiat ja läbivoolutsütomeetriat. Samuti hinnati seitsme erineva RPP internaliseerumisvõime iseärasusi erinevates rakuliinides ja sõltuvalt kontsentratsioonist ning ajast, muutes rakkude membraanipotentsiaali. Lisaks kirjeldati RPP-de seondumist rakkudega ja nende paiknemist raku sisemuses ultrastruktuuri tasemel elektronmikroskoopiat kasutades.

Töös kasutatud peptiidid valiti kui erinevate RPP perekondade esindajad, mistõttu võib arvata, et nende peptiidide sisenemist määravad tegurid on erinevad. Penetratiini puhul peetakse oluliseks trüptofaanijääke (Derossi *et al.*, 1996; Drin *et al.*, 2001; Fischer, 2001) ja positiivselt laetud aminohappeid (Derossi *et al.*, 1994), Tat peptiidil aluselisi arginiine (Vives *et al.*, 1997; Wender *et al.*, 2000). Transportaanil ja TP10-l on vajalik amfipaatne C-terminaalne osa, kuid nendel kahel RPP-l on ka erinevusi. Transportaan inhibeerib kõrgetel kontsentratsioonidel GTP-aaside aktiivsust membraanipreparaatides (Soomets *et al.*, 2000) ja TP10-l on avastatud antimikroobsed omadused (Nekhotiaeva *et al.*, 2004). Oligoarginiinide puhul on oluline tugevalt positiivne laeng (Mitchell *et al.*, 2000) ja guanidinomühmade olemasolu (Futaki *et al.*, 2002), MAP peab sisaldama vähemalt nelja pöördega α -heeliksit (Scheller *et al.*, 1999) ning pVEC-il peetakse oluliseks amfipaatset loomust (Elmquist *et al.*, 2001). Kuna nende RPP-de puhul peetakse rakkudesse sisenemise seisukohalt tähtsaks peptiidi erinevaid omadusi, siis võib eeldada, et nende koondumine raku pinnal ning internaliseerumise mehhanismid ei pruugi kattuda.

Varaseimad fluorestsentsmikroskoopia pildidel põhinevaid järeldusi RPP-de üliefektiivse sisenemise kohta on hiljuti rakkude fikseerimisest tulenevaks ülehindamiseks pidama hakatud (Lundberg ja Johansson, 2002; Richard *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2005). Meie kasutatud katseskeemis oli võimalik visualiseerida elusaid HeLa rakke, kus vastavate artefaktide tekkimine on välistatud. Saadud tulemustest järeldus, et pärast ühe tunni pikkust inkubatsiooni biotinüleeritud transportaani ja FITC märkega avidiini kompleksidega on tugevalt märkunud nii plasmamembraan kui

ka rakkude tsütoplasma, kusjuures kompleksid on peamiselt detekteeritavad granulaarsete/vesikulaarsete struktuuridena. See viitab komplekside ulatuslikule multimeriseerumisele juba inkubatsioonilahuses või seondumisel plasmamembraaniga. Kuna on näidatud, et transportaani C-terminaalne piirkond võib omandada α -helikaalse struktuuri (Magzoub *et al.*, 2001), milles leutsiini ja isoleutsiini külghelad asetuvad heeliksi ühele küljele, siis on tõenäoline, et peptiidiahelad interakteeruvad leutsiinirühmade interakteerumise tõttu ja moodustavad suuri multimeere.

Fluorestsentsmikroskoopiliselt tuvastatud üliefektiivne peptiid- Valk komplekside sisenemine on kooskõlas ka FACS-l saadud tulemustega, kus transportaaniga komplekseeritud avidiini kontsentratsioon rakus on kuni 140 korda kõrgem kui ainult Av-FITC-ga inkubeeritud rakkudel.

Nagu näitavad antud töös esitatud tulemused, on kõik kasutatud biotinüleeritud RPP-d võimelised vahendama avidiini transporti HeLa rakkudesse erineva Na^+ ja K^+ ionide kontsentratsiooni suhtega puhverlahustes inkubeerides, seda siiski erineval määral. Avidiini rakkudesse transportimisel on märkimisväärselt edukamad transportaan ja TP10 olles penetratiivset ligikaudu kaheksa korda efektiivsemad. Kuna transportaan ja TP10 on sama RPP perekonna esindajad, siis ei ole nende transpordivõime tõhususe sarnasused üllatavad. Samas osutus transportaan TP10-st mõnevõrra efektiivsemaks.

Jälgimaks nende peptiid- Valk komplekside internalisatsioonimäära sõltuvust membraanipotentsiaalidest, depolariseeriti rakke järk-järgult. Saadud tulemustest võib järeldada, et komplekside sisenemine rakkudesse ei vähene tähelepanuväärselt membraanipotentsiaali alandamisel, pigem võib TP ja TP10 korral oletada mõningast kontsentreerumise suurenemist. Samas ei saa me FACS-il saadud tulemusi üheselt fluorestsentssignaali suurenemiseks pidada, kuna fluorestsentsmikroskoopia näitas rakkude morfoloogilisi muutusi. Samamoodi oli võimalik rakkude mahu muutust jälgida FACS-l, mistõttu komplekside rakku sisenemise suurem efektiivsus võib tuleneda ka rakupindala suurenemisest ja mitte membraanipotentsiaalidest. Komplekside internaliseerumisvõime vähenemise mitte tuvastamine võib tuleneda ka madalast RPP kontsentratsioonist, sest membraanipotentsiaalidest sõltuvat ja endostütoosist sõltumatut internaliseerumist tuvastatakse kõrgete peptiidikontsentratsioonide korral. On võimalik, et meie kasutatud kontsentratsioonil ei ole efektiivsuse muutused tuvastatavad.

Hiljuti on Tat-peptiidi vahendatud transpordil näidatud, et väikese lastmolekuli sisenemine sõltub membraanipotentsiaalst, samas valkude sisenemine toimub suurte vesikulite abil (Tunnemann *et al.*, 2006). Seega võib eeldada, et peptiid-valk komplekside esinemine suurte agregaatidena pärsib nende penetreerumist otse läbi plasmamembraani, mistõttu ei ole komplekside sisenemise efektiivsus membraanipotentsiaalst sõltuv.

Selleks, et hinnata RPP-de endi akumulereerumist rakkudes erineva Na⁺ ja K⁺ ionide kontsentratsiooni suhtega puhverlahustes, kasutati fluorestseiiniga märgitud peptiide. Uuritud seitsmest RPP-Fluo-st suutsid kõik siseneda antud töös kasutatud kolme erinevasse rakuliini. HeLa rakkude ühetunnise inkubeerimise järel osutus efektiivseimaks transportaan, seevastu K562 rakkudes lühiajalisel (10 minutit) inkubeerimisel oli rakkudesse akumulereerunud kõige rohkem MAP. Saadud tulemustest saab järeldada, et osade RPP-de sisenemise efektiivsus sõltuvalt membraanipotentsiaalst võib oleneda ka kasutatavast rakuliinist või inkubatsiooniajast. Seda toetab ka fakt, et oligoarginiini internaliseerumine halvenes depolariseeritud HeLa rakkudes väiksemal määral kui depolariseeritud K562 rakkudes, kus Arg₉ akumulereerumise vähenemine oli 1,5 kordne.

Pärast Jurkat rakkude 10 minutilist inkubeerimist fluorestseiiniga märgitud Arg₉-ga puhverlahustes, kus varieeriti NaCl ja KCl kontsentratsioone, on oligoarginiini rakusisesed kontsentratsioonid kõrgemad kui K562 rakkude korral. Varem on näidatud, et K562 rakud toodavad vähem või ei tooda üldse heparaansulfaat-proteoglükaane. See võiks seletada RPP sisenemise suuremat efektiivsust Jurkat rakkudes tulenevalt HSPG olemasolust. Seega teatav peptiidide eelistus siseneda rakkudesse, mille plasmamembraan sisaldab HSPG võib esineda, kuid HSPG vähesusel ja/või puudumisel on RPP-d võimelised ära kasutama muid membraanikomponente. Seda toetab kaudselte fakt, et homeodomeenide sisenemine on eelistatud rakkudesse, mis presenteerivad oma plasmamembraanil α -2,8-polüsiaalhappeid, samas nende puudumine ei blokeeri homeovalkudest pärinevate peptiidide internaliseerumist (Joliot *et al.*, 1991b).

Rakuliinide erinevusele viitab teataval määral ka see, et Jurkat rakkudes vähenes Arg₉ sisenemise efektiivsus depolariseeritud rakkudesse kontsentratsiooni tõstmisel kuni kaks korda. Samas K562 rakkudes ei ilmnenud Arg₉ sõltuvus membraanipotentsiaalst olenevalt peptiidi kontsentratsioonist. Kahe suspensioonirakkude liinide erinevust

toonitasid ka katsed membraanipotentsiaalset sõltuva fluorestsentsvärvi DiBAC-iga. Kui K562 rakkude korral on nende inkubeerimisel erineva Na^+/K^+ ionide suhtega soolalahustes potentsiaali langus lineaarne, siis Jurkat rakkude puhul saavutatakse depolarisatsioon juba 50 mM NaCl kontsentratsiooni (väliskeskkonnas) juures. FACS analüüsil on K562 rakkude kasutamise korral võimalik detekteerida rakkude ruumala suurenemist KCl kontsentratsiooni tõstmisel väliskeskkonnas, seevastu Jurkat rakkude suuruse muutust ei esine. Sellest võib järeldada, et: (i) antud rakkude plasmamembraani koostis on erinev või (ii) saadud erinevus tuleneb nende rakuliinide erinevast diferentseerituse tasemest.

Jurkat rakkude inkubeerimisel RPP-Fluo-dega võib penetratiini, aga eriti oligoarginiini korral, detekteerida sõltuvust membraanipotentsiaalset kõrgel kontsentratsioonil (10 μM). Avaldatud töödes on just nende peptiidide korral näidatud tsütoplasma eelistatud märkumist difuusselt, mis viitab otse läbi plasmamembraani sisenemisele K1 suspensioonirakkudes (Fretz *et al.*, 2007), mistõttu võib oletada, et nende peptiidide sisenemisel rakkudesse on penetratsiooni osakaal suurem.

Erinevates Na^+/K^+ ionide suhtega puhverlahustes Jurkat rakkude inkubeerimisel MAP-i ja transportaaniga ilmneb nende RPP-de plasmamembraani destabiliseeriv toime juba 5 μM kontsentratsiooni juures, mis on kooskõlas varasemate peptiidide toksilisuse valdkonnas avaldatud töödega (Hällbrink *et al.*, 2001).

Transportaani sisenemise efektiivsuse sõltumatus ja TP10 minimaalne sõltuvus membraanipotentsiaalset Jurkat rakkudes on raske põhjendada. Samas on TP ja selle analoogi erinevusi varemgi välja toodud. Kuna TP10-l puudub N-terminusest 6 aminohapet, siis on võimalikud nende peptiidide erinevad interaktsioonid plasmamembraaniga trüptofaani puudumise tõttu. Trüptofaani tähtsust rakkudesse sisenemisel on varem näidatud penetratiini korral (Derossi *et al.*, 1994; Drin *et al.*, 2001).

Temperatuuridel alla 18 °C on plasmamembraani lipiidide dünaamika tugevalt pärsitud, mistõttu on membraan jäigem ja seniste arusaamade järgi peaks endotsütoos olema välistatud ning tänu rakkude depolariseerimisele, on ka penetratsioon blokeeritud. Nii RPP-Fluo kui ka biotinüleeritud peptiidi ja Av-FITC komplekside sisenemise efektiivsus langes madalal temperatuuril märgatavalt, samas ei olnud rakkudesse kontsentreerumine täielikult inhibeeritud. Kuigi madalal temperatuuril on

plasmamembraani jäikus suurem, ei saa välistada lipiidide ümberpaiknemist membraanis (*flip-flop*-i toimumine), mistõttu ohtralt membraanile koondunud ja sellega seondunud agregaadid satuksid mingil hetkel rakkude sisemusse.

Elektronmikroskoopiat on RPP-de rakusiseseks detekteerimiseks ja lokaliseerimiseks seni vähe kasutatud. Samal ajal võimaldab elektronmikroskoopia lahutusvõime saada väga olulist informatsiooni peptiidide plasmamembraaniga interakteerumise, läbi selle liikumise ja rakus paiknemise kohta ultrastruktuuride tasemel.

Uurides kullamärgisega (diameeter 1,4 nm) TP ja TP10 rakupinnaga seondumist ühetunnise inkubatsiooni järel, ilmneb, et transportaani perekonna esindajad on võimelised moodustama agregate ka lastmolekulita. Järelikult peptiid- Valk komplekside multimeriseerumine ei tulenenud niivõrd lastmolekuli iseärasustest, vaid pigem peptiidide endi interakteerumistest.

Transportaan-lastmolekuli rakkudesse sisenemise teeks on välja pakutud näiteks „lipiidsetest parvedest“ sõltuvat endotsütoosi, mida arvatavasti võib pidada makropinosütoosiks (Säälik *et al.*, 2004; Padari *et al.*, 2005). Vaadeldes transportaani ja TP10 lokaliseerimist HeLa rakkudes ühetunnise inkubatsiooni järel, selgub, et mõlemad RPP-d võivad paikneda kaveoole meenutavates vesiikulites. TP10 on plasmamembraani läheduses detekteeritav ka suurtes vesiikulites, mis võivad olla moodustuvad/moodustunud makropinosoomid. Kuna transportaan koondub ohtralt membraanijätketele või nende lähedusse, siis on võimalik, et ka TP siseneb makropinosütoosi kaudu. Saadud tulemustest saab järeldada, et transportaani perekonna peptiidid võivad eelistada „lipiidsete parvede“ piirkondi, sest nii kaveoliin-vahendatud endotsütoos kui ka makropinosütoos toimuvad just nendes mikrodomeenides.

Tat peptiid lokaliseerub rakus spetsiifiliste sfääriliste multimeersete struktuuridena, mis efektiivselt kontsentreeruvad suurtesse vesiikulitesse. Kuna Tat peptiid ei moodusta selliseid struktuure söötmes (Padari, isiklik konsultatsioon), siis on suurte agregaatide tekkimine põhjustatud ilmselt antud peptiidi interaktsioonist lipiididega. Seda, et Tat peptiidi vahendusel toimuval valgu transpordil ei suunata sisenenud aidiini efektiivselt degradeerimisele isegi 4 tunni möödudes, olen ma näidanud oma bakalaureusetöös (2005). Seega agregaatide tugev kontsentreerumine vesiikulitesse Tat peptiidi korral võib tuleneda peptiidi enda omadustest.

Kullaga märgitud pVEC-i korral toimub selle sisenemine rakkudesse klatriin-sõltuva endotsütoosi kaudu ning samuti väiksemate invaginatsioonidena, mille iseloom pole päris selge, sest makropinosoomide kohta on need vesiikulid suhteliselt väikese diameetriga. Elektronmikroskoopiaga saadud tulemustest järeldub, et RPP-d kasutavad erinevaid rakkudesse sisenemise mehhanisme ja eelistatud internalisatsiooniteede osakaal varieerub sõltuvalt peptiidist ning kontsentratsioonist.

Elektronmikroskoopias saadud tulemus näitab ilmekalt, kui kiiresti toimub klatriin-sõltuv endotsütoos - üks vesiikul sulgub ja hakkab liikuma raku sisemusse ning paralleelselt tekib uus vesiikul (klatriin eemaldub sisse sopistunud vesiikulilt kiiresti, seega on kahe sündmuse ajaline vahe väga lühike, muidu ei oleks sisenenud vesiikul eristatav kui klatriin-kaetud endosoom).

KOKKUVÕTE

Lühikeste katioonsete rakkudesse penetreeruvate peptiidide (RPP) kasutamine on efektiivne ja mitteinvasiivne moodus erinevate bioaktiivsete molekulide ja ravimite transportimiseks rakkudesse. Vaatamata arvukatele uuringutele, ei ole seniajani üheselt kindlaks tehtud, milliseid mehhanisme RPP-d ja peptiid-lastmolekul konstruktid rakkudesse sisenemiseks kasutavad. Samas lubab järjest enamate erinevate omadustega peptiidide avastamine siiski eeldada, et tulevikus on RPP-d molekulaarbioloogias ja meditsiinis laialdaselt kasutatavad.

Antud töös on vaadeldud rakku penetreeruvate peptiidide vahendatud suure lastmolekuli (avidiin, 67 kDa) transporti rakkudesse sõltuvalt membraanipotentsiaalidest. Samuti on uuritud erinevates rakuliinides peptiidide endi sisenemise efektiivsust järk-järgult depolariseeritavates rakkudes. Lisaks on elektronmikroskoopiat kasutades jälgitud RPP-de kinnitumist rakupinnale ja nende lokaliseerimist raku ultrastruktuuri tasemel.

Analüüsitud RPP-dest olid efektiivseimad avidiini rakku transportijad transportaani perekonna peptiidid. Komplekside sisenemine rakku ei sõltunud membraanipotentsiaalidest, kuid sõltus energiaallikatest protsessidest. Seega internaliseeritakse avidiin kasutatud peptiididega rakkudesse vesikulaarsel transpordil.

RPP-de endi sisenemine rakkudesse sõltus kontsentratsioonist, ajast ja kasutatud rakuliinidest ning osade peptiidide puhul ka membraanipotentsiaalidest. Arvestades RPP-de erinevaid füüsikalisi-keemilisi omadusi, võib oletada erinevate sisenemismehhanismide osakaalu varieeruvust sõltuvalt kasutatud peptiidist ning rakkudest. Samas ühe transpordiraja inhibeerimine ei blokeeri peptiidide sisenemist rakkudesse ning selle kompenseerimiseks võib teiste radade osakaal sõltuvalt rakutüübist suurenedada.

Elektronmikroskoopiliselt oli võimalik tuvastada RPP-de sisenemist rakkudesse klatriin- ja kaveoliin-vahendatud endotsütoosil, samuti makropinotsütoosil, mis võib olla tingitud konkreetse peptiidi omadustest ja kajastada endotsütoosi liikide erinevat osakaalu.

Saadud tulemustest võib järeldada, et kõik antud töös kasutatud RPP-d on võimelised sisenema rakkudesse ning transportima avidiini, kuid efektiivseimad on transportaani

perekonna peptiidid ja amfipaatne mudelpeptiid (MAP). Rakkudesse pääsemiseks kasutatakse eelistatult erinevaid endotsütoosi mehhanisme.

THE MECHANISMS OF THE CATIONIC PEPTIDES' CELL ENTRY

Annely Lorents

SUMMARY

Application of short cationic cell penetrating peptides (CPP) is an efficient and non-invasive method for delivery of various biologically active molecules and drugs into the cell interior. Despite of the extensive research, there is still no consensus, which pathway(s) CPP-s and peptide-cargo constructs use for cell entry. However, increasing discovery of novel CPP-s with varying properties enables us to believe that in the future CPP-s could be used for addressing a number of problems in biomedical applications and research.

In the present work we assessed the role of membrane potential in the internalization of protein (avidin, 67 kDa) complexed with CPP-s. We also studied the internalization of CPP-s itself in gradually depolarized cells in different cell types. In addition, we mapped the interaction of CPP-s with the plasma membrane and further cellular trafficking in HeLa cells on ultra-structural level by transmission electron microscopy.

Among analyzed CPP-s, peptides from the transportan family showed the highest efficiency in the delivery of avidin into cells. Internalization of complexes did not depend on the membrane potential but was inhibited at low temperature. Hence, the cellular delivery of avidin with the used CPP-s takes place via vesicular transport.

Internalization of CPP-s, however, depended on the concentration, time and cell type and in case of some peptides, also on membrane potential. Taking into consideration the differences in the properties of CPP-s, we can suggest that the used internalization mechanism may vary depending on the used CPP and cell type. On the other hand, inhibition of one pathway does not block the internalization of the peptides and for compensating the uptake of CPP-s the other pathways can be upregulated depending on cell type

The results of electron microscopy demonstrated that used CPP-s can be internalized via both clathrin- and caveolin-dependent endocytosis, but also by macropinocytosis. This can be caused by different properties of CPP-s and can also reflect the involvement of dissimilar proportion of diverse mechanisms of endocytosis.

To sum up, we can conclude that all CPP-s used in this work are capable of gaining entry into cells and efficiently transport avidin across the plasma membrane. The most potent transporters are the peptides from the transportan family and the amphipathic model peptide (MAP). Additionally, we confirmed that all used CPP-s enter cells, preferentially using different types of endocytosis.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Aidley, D., Stanfield, P (1996). Ion channels. Cambridge, Cambridge University Press.
- Astriab-Fisher, A., D. Sergueev, M. Fisher, B. R. Shaw and R. L. Juliano (2002). "Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions." Pharm Res **19**(6): 744-54.
- Astriab-Fisher, A., D. S. Sergueev, M. Fisher, B. R. Shaw and R. L. Juliano (2000). "Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide-oligonucleotide conjugates." Biochem Pharmacol **60**(1): 83-90.
- Barany-Wallje, E., A. Andersson, A. Graslund and L. Maler (2004). "NMR solution structure and position of transportan in neutral phospholipid bicelles." FEBS Lett **567**(2-3): 265-9.
- Belting, M. (2003). "Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier." Trends Biochem Sci **28**(3): 145-51.
- Bendifallah, N., F. W. Rasmussen, V. Zachar, P. Ebbesen, P. E. Nielsen and U. Koppelhus (2006). "Evaluation of cell-penetrating peptides (CPPs) as vehicles for intracellular delivery of antisense peptide nucleic acid (PNA)." Bioconjug Chem **17**(3): 750-8.
- Boisseau, S., K. Mabrouk, N. Ram, N. Garmy, V. Collin, A. Tadmouri, M. Mikati, J. M. Sabatier, M. Ronjat, J. Fantini and M. De Waard (2006). "Cell penetration properties of maurocalcine, a natural venom peptide active on the intracellular ryanodine receptor." Biochim Biophys Acta **1758**(3): 308-19.
- Brooks, H., B. Lebleu and E. Vives (2005). "Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics." Adv Drug Deliv Rev **57**(4): 559-77.
- Brunet, I., C. Weinl, M. Piper, A. Trembleau, M. Volovitch, W. Harris, A. Prochiantz and C. Holt (2005). "The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons." Nature **438**(7064): 94-8.
- Chen, L., L. R. Wright, C. H. Chen, S. F. Oliver, P. A. Wender and D. Mochly-Rosen (2001). "Molecular transporters for peptides: delivery of a cardioprotective epsilonPKC agonist peptide into cells and intact ischemic heart using a transport system, R(7)." Chem Biol **8**(12): 1123-9.
- Christiaens, B., J. Grooten, M. Reusens, A. Joliot, M. Goethals, J. Vandekerckhove, A. Prochiantz and M. Rosseneu (2004). "Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides." Eur J Biochem **271**(6): 1187-97.
- Christiaens, B., S. Symoens, S. Verheyden, Y. Engelborghs, A. Joliot, A. Prochiantz, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu, B. Vanloo and S. Vanderheyden (2002).

- "Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes." Eur J Biochem **269**(12): 2918-26.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**(6927): 37-44.
- Dall'Asta, V., R. Gatti, G. Orlandini, P. A. Rossi, B. M. Rotoli, R. Sala, O. Bussolati and G. C. Gazzola (1997). "Membrane potential changes visualized in complete growth media through confocal laser scanning microscopy of bis-oxonol-loaded cells." Exp Cell Res **231**(2): 260-8.
- Davidson, T. J., S. Harel, V. A. Arboleda, G. F. Prunell, M. L. Shelanski, L. A. Greene and C. M. Troy (2004). "Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation." J Neurosci **24**(45): 10040-6.
- Derossi, D., S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing and A. Prochiantz (1996). "Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent." J Biol Chem **271**(30): 18188-18193.
- Derossi, D., G. Chassaing and A. Prochiantz (1998). "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery." Trends. Cell Biol. **8**(2): 84-87.
- Derossi, D., A. H. Joliot, G. Chassaing and A. Prochiantz (1994). "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes." J. Biol. Chem. **269**(14): 10444-10450.
- Deshayes, S., A. Heitz, M. C. Morris, P. Charnet, G. Divita and F. Heitz (2004). "Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis." Biochemistry **43**(6): 1449-57.
- Dom, G., C. Shaw-Jackson, C. Matis, O. Bouffieux, J. J. Picard, A. Prochiantz, M. P. Mingeot-Leclercq, R. Brasseur and R. Rezsöházy (2003). "Cellular uptake of Antennapedia Penetratin peptides is a two-step process in which phase transfer precedes a tryptophan-dependent translocation." Nucleic Acids Res **31**(2): 556-61.
- Drin, G., M. Mazel, P. Clair, D. Mathieu, M. Kaczorek and J. Temsamani (2001). "Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide. Role of lipid-binding affinity." Eur J Biochem **268**(5): 1304-1314.
- Eguchi, A., T. Akuta, H. Okuyama, T. Senda, H. Yokoi, H. Inokuchi, S. Fujita, T. Hayakawa, K. Takeda, M. Hasegawa and M. Nakanishi (2001). "Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells." J. Biol. Chem. **276**(28): 26204-26210.
- El-Andaloussi, S., H. Johansson, P. Lundberg and Ü. Langel (2006). "Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids." J Gene Med.
- Elmqvist, A. (2003). Cell-penetrating peptides: cellular uptake and biological activities. Stockholm, Stockholms Universitet.

- Elmquist, A. and Ü. Langel (2003). "In vitro uptake and stability study of pVEC and its all-D analog." Biol Chem **384**(3): 387-93.
- Elmquist, A., M. Lindgren, T. Bartfai and Ü. Langel (2001). "VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions." Exp. Cell. Res. **269**(2): 237-244.
- Ensoli, B., L. Buonaguro, G. Barillari, V. Fiorelli, R. Gendelman, R. A. Morgan, P. Wingfield and R. C. Gallo (1993). "Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation." J Virol **67**(1): 277-87.
- Epps, D. E., M. L. Wolfe and V. Groppi (1994). "Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (Dibac4(3)) in model systems and cells." Chem Phys Lipids **69**(2): 137-50.
- Fawell, S., J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky and J. Barsoum (1994). "Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 664-668.
- Ferrari, A., V. Pellegrini, C. Arcangeli, A. Fittipaldi, M. Giacca and F. Beltram (2003). "Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time." Mol. Ther. **8**(2): 284-294.
- Fischer, P. M., Krausz, E., Lane, D.P. (2001). "Cellular delivery of impermeable effector molecules in the form of conjugates with peptides capable of mediating translocation." Bioconjugate Chemistry **12**: 825-841.
- Fischer, P. M., N. Z. Zhelev, S. Wang, J. E. Melville, R. Fahraeus and D. P. Lane (2000). "Structure-activity relationship of truncated and substituted analogues of the intracellular delivery vector Penetratin." J Pept Res **55**(2): 163-72.
- Fisher, L., U. Soomets, V. Cortes Toro, L. Chilton, Y. Jiang, U. Langel and K. Iverfeldt (2004). "Cellular delivery of a double-stranded oligonucleotide NFkappaB decoy by hybridization to complementary PNA linked to a cell-penetrating peptide." Gene Therapy **11**(16): 1264-72.
- Fittipaldi, A., A. Ferrari, M. Zoppe, C. Arcangeli, V. Pellegrini, F. Beltram and M. Giacca (2003). "Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins." J. Biol. Chem. **278**(36): 34141-34149.
- Frankel, A. D. and C. O. Pabo (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." Cell **55**(6): 1189-93.
- Fretz, M. M., N. A. Penning, S. Al-Taei, S. Futaki, T. Takeuchi, I. Nakase, G. Storm and A. T. Jones (2007). "Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34+ leukaemia cells." Biochem J **403**(2): 335-42.
- Futaki, S. (2005). "Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms." Adv Drug Deliv Rev **57**(4): 547-58.

- Futaki, S., S. Goto and Y. Sugiura (2003). "Membrane permeability commonly shared among arginine-rich peptides." J Mol Recognit **16**(5): 260-4.
- Futaki, S., I. Nakase, T. Suzuki, Z. Youjun and Y. Sugiura (2002). "Translocation of branched-chain arginine peptides through cell membranes: flexibility in the spatial disposition of positive charges in membrane-permeable peptides." Biochemistry **41**(25): 7925-30.
- Futaki, S., T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda and Y. Sugiura (2001). "Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery." J. Biol. Chem. **276**(8): 5836-5840.
- Glenney, J. R., Jr. and D. Soppet (1992). "Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10517-21.
- Grimmer, S., B. van Deurs and K. Sandvig (2002). "Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2953-62.
- Gruenberg, J. (2001). "The endocytic pathway: a mosaic of domains." Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2**(10): 721-730.
- Hällbrink, M., A. Florén, A. Elmquist, M. Pooga, T. Bartfai and Ü. Langel (2001). "Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides." Biochim. Biophys. Acta **1515**(2): 101-109.
- Joliot, A., C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin and A. Prochiantz (1991a). "Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(5): 1864-8.
- Joliot, A. H., A. Triller, M. Volovitch, C. Pernelle and A. Prochiantz (1991b). "alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide." New Biol **3**(11): 1121-34.
- Kirkham, M., A. Fujita, R. Chadda, S. J. Nixon, T. V. Kurzchalia, D. K. Sharma, R. E. Pagano, J. F. Hancock, S. Mayor and R. G. Parton (2005). "Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles." J Cell Biol **168**(3): 465-76.
- Kirkham, M. and R. G. Parton (2005). "Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers." Biochim Biophys Acta **1746**(3): 349-63.
- Lakadamyali, M., M. J. Rust and X. Zhuang (2006). "Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes." Cell **124**(5): 997-1009.

- Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C. G. Lo, A. Benmerah and A. Dautry-Varsat (2001). "Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway." Mol Cell **7**(3): 661-71.
- Lamaze, C. and S. L. Schmid (1995). "The emergence of clathrin-independent pinocytotic pathways." Curr Opin Cell Biol **7**(4): 573-80.
- Langel, U., M. Pooga, C. Kairane, M. Zilmer and T. Bartfai (1996). "A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na⁺,K⁺-ATPase and reverses its inhibition by ouabain." Regul Pept **62**(1): 47-52.
- Langel, Ü. (2007). Cell-penetrating peptides. Cell-penetrating peptides. Boca Raton, CRC Press: 1-600.
- Letoha, T., S. Gaal, C. Somlai, A. Czajlik, A. Perczel and B. Penke (2003). "Membrane translocation of penetratin and its derivatives in different cell lines." J Mol Recognit **16**(5): 272-9.
- Letoha, T., S. Gaal, C. Somlai, Z. Venkei, H. Glavinas, E. Kusz, E. Duda, A. Czajlik, F. Petak and B. Penke (2005). "Investigation of penetratin peptides. Part 2. In vitro uptake of penetratin and two of its derivatives." J Pept Sci.
- Lewin, M., N. Carlesso, C. H. Tung, X. W. Tang, D. Cory, D. T. Scadden and R. Weissleder (2000). "Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells." Nat Biotechnol **18**(4): 410-4.
- Lindgren, M., M. Hallbrink, A. Prochiantz and U. Langel (2000). "Cell-penetrating peptides." Trends Pharmacol Sci **21**(3): 99-103.
- Lundberg, M. and M. Johansson (2002). "Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation." Biochem. Biophys. Res. Commun. **291**(2): 367-371.
- Lundberg, P. and U. Langel (2003). "A brief introduction to cell-penetrating peptides." J Mol Recognit **16**(5): 227-33.
- Magzoub, M., K. Kilk, L. E. Eriksson, U. Langel and A. Graslund (2001). "Interaction and structure induction of cell-penetrating peptides in the presence of phospholipid vesicles." Biochim Biophys Acta **1512**(1): 77-89.
- Mann, D. A. and A. D. Frankel (1991). "Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein." EMBO J **10**(7): 1733-9.
- Merrifield, C. J., D. Perrais and D. Zenisek (2005). "Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells." Cell **121**(4): 593-606.
- Mitchell, D. J., D. T. Kim, L. Steinman, C. G. Fathman and J. B. Rothbard (2000). "Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers." J. Pept. Res. **56**(5): 318-325.

- Mukherjee, S., R. N. Ghosh and F. R. Maxfield (1997). "Endocytosis." Physiol Rev **77**(3): 759-803.
- Muratovska, A. and M. R. Eccles (2004). "Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells." FEBS Lett **558**(1-3): 63-8.
- Nakanishi, M., A. Eguchi, T. Akuta, E. Nagoshi, S. Fujita, J. Okabe, T. Senda and M. Hasegawa (2003). "Basic peptides as functional components of non-viral gene transfer vehicles." Curr Protein Pept Sci **4**(2): 141-50.
- Nakase, I., M. Niwa, T. Takeuchi, K. Sonomura, N. Kawabata, Y. Koike, M. Takehashi, S. Tanaka, K. Ueda, J. C. Simpson, A. T. Jones, Y. Sugiura and S. Futaki (2004). "Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement." Mol Ther **10**(6): 1011-22.
- Nekhotiaeva, N., A. Elmquist, G. K. Rajarao, M. Hallbrink, U. Langel and L. Good (2004). "Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides." Faseb J **18**(2): 394-6.
- Oehlke, J., P. Birth, E. Klausenz, B. Wiesner, M. Beyermann, A. Oksche and M. Bienert (2002). "Cellular uptake of antisense oligonucleotides after complexing or conjugation with cell-penetrating model peptides." Eur. J. Biochem. **269**(16): 4025-4032.
- Oehlke, J., A. Scheller, B. Wiesner, E. Krause, M. Beyermann, E. Klausenz, M. Melzig and M. Bienert (1998). "Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non- endocytically." Biochim Biophys Acta **1414**(1-2): 127-39.
- Oehlke, J., G. Wallukat, Y. Wolf, A. Ehrlich, B. Wiesner, H. Berger and M. Bienert (2004). "Enhancement of intracellular concentration and biological activity of PNA after conjugation with a cell-penetrating synthetic model peptide." European Journal of Biochemistry **271**(14): 3043-9.
- Padari, K. (2001). Peptiididega vahendatud valkude transport rakku transportaanstreptavidiin (-avidiin) kompleksi mudeli alusel. Zoologia ja Hüdrobioloogia Instituut, Tartu Ülikool.
- Padari, K., P. Säälik, M. Hansen, K. Koppel, R. Raid, Ü. Langel and M. Pooga (2005). "Cell transduction pathways of transportans." Bioconjugate Chemistry **16**(6): 1399-1410.
- Pokorny, A., T. H. Birkbeck and P. F. Almeida (2002). "Mechanism and kinetics of delta-lysine interaction with phospholipid vesicles." Biochemistry **41**(36): 11044-56.
- Pollard, T. D., Earnshaw, W., C (2002). Cell Biology. USA, Elsevier Science.
- Pooga, M., M. Hällbrink, M. Zorko and Ü. Langel (1998b). "Cell penetration by transportan." FASEB J. **12**(1): 67-77.

- Pooga, M., A. Jureus, K. Razaeei, H. Hasanvan, K. Saar, K. Kask, P. Kjellen, T. Land, J. Halonen, U. Maeorg, A. Uri, S. Solyom, T. Bartfai and U. Langel (1998a). "Novel galanin receptor ligands." J. Pept. Res. **51**(1): 65-74.
- Pooga, M., C. Kut, M. Kihlmark, M. Hällbrink, S. Fernaeus, R. Raid, T. Land, E. Hallberg, T. Bartfai and Ü. Langel (2001). "Cellular translocation of proteins by transportan." FASEB J. **15**(6): 1451-1453.
- Pooga, M., U. Soomets, M. Hällbrink, A. Valkna, K. Saar, K. Rezaeei, U. Kahl, J. X. Hao, X. J. Xu, Z. Wiesenfeld-Hallin, T. Hökfelt, T. Bartfai and Ü. Langel (1998c). "Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo." Nat. Biotechnol. **16**(9): 857-861.
- Richard, J. P., K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu and L. V. Chernomordik (2005). "Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors." J Biol Chem **280**(15): 15300-6.
- Richard, J. P., K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik and B. Lebleu (2003). "Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake." J Biol Chem **278**(1): 585-90.
- Robinson, M. S. (2004). "Adaptable adaptors for coated vesicles." Trends Cell Biol **14**(4): 167-74.
- Rothbard, J. B., S. Garlington, Q. Lin, T. Kirschberg, E. Kreider, P. L. McGrane, P. A. Wender and P. A. Khavari (2000). "Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation." Nat Med **6**(11): 1253-7.
- Rothbard, J. B., T. C. Jessop and P. A. Wender (2005). "Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells." Adv Drug Deliv Rev **57**(4): 495-504.
- Rousselle, C., P. Clair, J. M. Lefauconnier, M. Kaczorek, J. M. Scherrmann and J. Tamsamani (2000). "New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy." Mol Pharmacol **57**(4): 679-86.
- Scheller, A., J. Oehlke, B. Wiesner, M. Dathe, E. Krause, M. Beyermann, M. Melzig and M. Bienert (1999). "Structural requirements for cellular uptake of alpha-helical amphipathic peptides." J. Pept. Sci. **5**(4): 185-194.
- Scheller, A., B. Wiesner, M. Melzig, M. Bienert and J. Oehlke (2000). "Evidence for an amphipathicity independent cellular uptake of amphipathic cell-penetrating peptides." Eur J Biochem **267**(19): 6043-50.
- Schwarze, S. R. and S. F. Dowdy (2000). "In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA." Trends. Pharmacol. Sci. **21**(2): 45-48.

- 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 **285**(5433): 1569-72.
- Senatus, P. B., Y. Li, C. Mandigo, G. Nichols, G. Moise, Y. Mao, M. D. Brown, R. C. Anderson, A. T. Parsa, P. W. Brandt-Rauf, J. N. Bruce and R. L. Fine (2006). "Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells in vitro and in vivo by a p53 COOH-terminal peptide." Mol Cancer Ther **5**(1): 20-8.
- Silhol, M., M. Tyagi, M. Giacca, B. Lebleu and E. Vives (2002). "Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat." Eur J Biochem **269**(2): 494-501.
- Soomets, U., M. Lindgren, X. Gallet, M. Hallbrink, A. Elmquist, L. Balaspiri, M. Zorko, M. Pooga, R. Brasseur and U. Langel (2000). "Deletion analogues of transportan." Biochim Biophys Acta **1467**(1): 165-76.
- Sorkin, A. (2004). "Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort." Curr Opin Cell Biol **16**(4): 392-9.
- Steiner, V., M. Schar, K. O. Bornsen and M. Mutter (1991). "Retention behaviour of a template-assembled synthetic protein and its amphiphilic building blocks on reversed-phase columns." J Chromatogr **586**(1): 43-50.
- Suzuki, T., S. Futaki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda and Y. Sugiura (2002). "Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides." J. Biol. Chem. **277**(4): 2437-2443.
- Säälik, P., A. Elmquist, M. Hansen, K. Padari, K. Saar, K. Viht, Ü. Langel and M. Pooga (2004). "Protein cargo delivery properties of cell-penetrating peptides. A comparative study." Bioconjug Chem **15**(6): 1246-53.
- Theisen, D. M., C. Pongratz, K. Wiegmann, F. Rivero, O. Krut and M. Kronke (2006). "Targeting of HIV-1 Tat traffic and function by transduction-competent single chain antibodies." Vaccine **24**(16): 3127-36.
- Tkachenko, E., E. Lutgens, R. V. Stan and M. Simons (2004). "Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway." J Cell Sci **117**(Pt 15): 3189-99.
- Torchilin, V. P., R. Rammohan, V. Weissig and T. S. Levchenko (2001). "TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8786-91.
- Tripathi, S., B. Chaubey, S. Ganguly, D. Harris, R. A. Casale and V. N. Pandey (2005). "Anti-HIV-1 activity of anti-TAR polyamide nucleic acid conjugated with various membrane transducing peptides." Nucleic Acids Res **33**(13): 4345-56.

- Tunnemann, 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 **20**(11): 1775-84.
- Turner, J. J., G. D. Ivanova, B. Verbeure, D. Williams, A. A. Arzumanov, S. Abes, B. Lebleu and M. J. Gait (2005). "Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells." Nucleic Acids Res **33**(21): 6837-49.
- Wadia, J. S., R. V. Stan and S. F. Dowdy (2004). "Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis." Nat. Med. **10**(3): 310-315.
- Watanabe, Y., S. Kameoka, V. Gopalakrishnan, K. D. Aldape, Z. Z. Pan, F. F. Lang and S. Majumder (2004). "Conversion of myoblasts to physiologically active neuronal phenotype." Genes Dev **18**(8): 889-900.
- Veach, R. A., D. Liu, S. Yao, Y. Chen, X. Y. Liu, S. Downs and J. Hawiger (2004). "Receptor/transporter-independent targeting of functional peptides across the plasma membrane." J Biol Chem **279**(12): 11425-31.
- Venable, J. H. and R. Coggeshall (1965). "A Simplified Lead Citrate Stain for Use in Electron Microscopy." J. Cell Biol. **25**(407).
- Wender, P. A., D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman and J. B. Rothbard (2000). "The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**(24): 13003-13008.
- Vendeville, A., F. Rayne, A. Bonhure, N. Bettache, P. Montcourrier and B. Beaumelle (2004). "HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses." Mol Biol Cell **15**(5): 2347-60.
- Vives, E., P. Brodin and B. Lebleu (1997). "A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus." J Biol Chem **272**(25): 16010-7.