

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Tehnoloogiainstituut

Anet Kivihall

Reporterrakuliini loomine RSP *in vivo* uuringuteks

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad MSc Kalle Pärn

PhD Kaido Kurrikoff

Tartu 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSLIK ÜLEVAADE	6
1.1. Transfektsioon	6
1.2. Rakku sisenevad peptiidid	7
1.2.1. RSP-de päritolu	8
1.2.2. RSP-de klassifikatsioon	8
1.2.3. Transportan ja selle analoogid.....	9
1.3. RSP rakku sisenemise viisid	11
1.4. Reportersüsteemid ja nende töömehhanism	13
1.4.1. Rohelise fluorestseeruva proteiini reportersüsteem	13
1.4.2. Lutsiferaasi reportersüsteem	14
1.4.3. Reporterrakuliinid	15
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	17
2.1. Töö eesmärgid.....	17
2.2. Materjalid ja meetodika	17
2.2.1. Eksperimendis kasutatud rakuliinid	17
2.2.2. Plasmidi disainimine	17
2.2.3. Plasmidi efektiivsuse kontrollimine CHO rakkudes	19
2.2.4. HT1080 rakkude tundlikkus antibiootikumile	20
2.2.5. Elektroporatsioon	20
2.2.6. Rakuliini efektiivsuse kontrollimine, paljundamine	20
2.3. Tulemused ja arutelu.....	21
2.3.1. Plasmidi konstrueerimine.....	21
2.3.2. PGL4-GLuc efektiivsus	24
2.3.3. HT1080 rakkude põhjal reporterrakuliini loomine	25
KOKKUVÕTE	27
SUMMARY	28
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	29
LISAD	36
LISA 1. Plasmidi pGL4.51(neo) järjestus	36

LISA 2. Plasmidi pMC.BESPX.GauFLuc2 järjestus	36
LIHTLITSENTS.....	37

KASUTATUD LÜHENDID

BESPX	pMC.BESPX.GauFLuc2
CHO	Hiina hamstri munasarja rakud (<i>Chinese hamster ovary cells</i>)
CMV	Tsütomegaloviirus (<i>Cytomegalovirus</i>)
DMEM	(<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	Dimetüülsulfoksiid
EtBr	Etiidiumbromiid
FBS	Veise looteseerum (<i>fetal bovine serum</i>)
HIV	Inimese immuunpuudulikkuse viirus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HT1080	Inimese fibrosarkoomi rakud (<i>human fibrosarcoma cells</i>)
miRNA	Mikro-RNA
MQ	Deioniseeritud vesi
Opti-MEM	(<i>Eagle's Minimum Essential Media</i> modifikatsioon)
PF6	PepFect 6, rakku siseneva peptiidi transportan 10 analoog
PF14	PepFect 14, rakku siseneva peptiidi transportan 10 analoog
pGL4.51	pGL4.51 (neo)
RNAi	RNA interferents
RSP	Rakku sisenevad peptiidid (<i>cell penetrating peptides</i>)
siRNA	Väike interfereeriv RNA
SKO	Splaissingut korrigeeriv oligonukleotiid
TP10	Rakku sisenev peptiid transportan 10
UT	Töötlemata (<i>untreated</i>)

SISSEJUHATUS

Inimeste huvi oma tervise ja elukvaliteedi parandamise vastu on aja jooksul viinud suure hulga uute avastusteni meditsiini valdkonnas. Selliste teadmiste hulka kuulub ka geeniteraapia ehk võõr-DNA sisestamine rakkudesse haiguse ennetamise või ravimise eesmärgil.

Geenravi läbiviimiseks kasutatakse tihti transfektsiooni, mille käigus viiakse rakkudesse nii viiruslikul kui mitteviiruslikul meetodil erinevaid terapeutiliste omadustega nukleiinhapetel põhinevaid ühendeid. Sedalaadi lähenemine eeldab tihedast lipiidsest kaksikkihist koosneva rakumembraani läbimist. Paljud raviks kasutatavad ühendid on suuremõõtmelised ja seetõttu pole need võimelised iseseisvalt rakku penetreerima, kuid genoomsete järjestuste kliinilisteks ning laboratoorseteks rakendusteks on vajalik see takistus ületada, mistõttu kasutatakse olukorra lahendamiseks erinevaid transportvektoreid, mis aitavad plasmamembraani läbida.

Üheks selliseks võimaluseks on kasutada rakku sisenevaid peptiide (RSP-sid), mis lisaks rakku sisenemisele aitavad transporditavatel ainetel (nagu nukleiinhapetel, proteiinidel ja liposoomidel) ka rakusiseselt sihtmärgini jõuda. Probleem seisneb aga selles, et kuigi RSP-de kasutamine omab meditsiini valdkonnas väga suurt potentsiaali, ei teata RSP-de kohta veel sugugi kõike. Seetõttu vajavad RSP-d edasist uurimist.

Antud bakalaureusetöö üldeesmärgiks on konstrueerida RSP uuringute läbiviimiseks vajalik reporterplasmiid, mis sisaldab kahte varaselt ekspresseeritavat reportergeeni ja testida PepFect 14-ga transfekteerimise abil disainitud plasmidi efektiivsust *in vitro*. Lisaks soovitakse saavutada reporterplasmidi integreerumine HT1080 rakkude genoomi ning selekteerida nende hulgast kõige suurema geeniekspressiooni määraga koloonia.

Käesolev töö on kirjutatud Tartu Ülikooli bioloogia õppekava raames, spetsialiseerudes molekulaar- ja rakubioloogia valdkonnale. Kõik töös läbiviidud eksperimentaalsed katsed teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

Märksõnad: RSP, reporter, Luc2, GLuc, HT1080, rakuliin.

1. KIRJANDUSLIK ÜLEVAADE

1.1. Transfektsioon

Viimaste aastate jooksul on üha suuremat tähelepanu pööratud geeniteraapiale. Geenravi tähendab haiguse ravimise või ennetamise eesmärgil sihtmärkorganismi rakkudesse terapeutiliste geenide sisestamist, olemasoleva geeniekspressiooni muutmist. Tihti kasutatakse selleks geeniteraapia alases teadustegevuses ja kliinilises rakenduses transfektsiooni (Wang *et al.*, 2013).

Transfektsiooni saab teostada kahel viisil: viiruslikult ja mitteviiruslikult. Viirusliku DNA sisestamise puhul viitab juba nimi viiruste kui vektorite kasutamisele. Sageli on nendeks viirusteks adeno- ja retroviirused (Parissis *et al.*, 2003). Kuna viiruse geenid võivad peremeesrakkudes väga tugeva põletikulise reaktsiooni esile kutsuda ning T-lümfotsüütide toimel väheneb sisestatud võõr-DNA geeniekspressioon kiirelt, tuleb viiruseid modifitseerida (Giacca *et al.*, 2012). Näiteks adenoviirusliku vektori disainimisel eemaldatakse tavaliselt viiruse genoomist E1 ja E3 regioonid, et ennetada uue põlvkonna viirusosakeste teket. Selline modifitseerimine võimaldab samaaegselt ka suurema transgeeni ja promooteri sisestamist, kuna viiruse genoomi mahutuvus on piiratud virionisisese ruumalaga. Vektori rekonstrueerimisele järgneb soovitud märklaudrakkudesse viiruse genoomi sisenemine (Crystal 2014; Giacca *et al.*, 2012).

Senised uuringud viraalsete vektorite kasutamise kohta on näidanud, et nende abil on võimalik saavutada väga efektiivne transduktsioon ja geenide pikaajaline ekspressioon, kuid viiruste kasutamisega võivad kaasneda ka probleemid. Esiteks ei võimalda viiruslikud vektorid suurte geenide sisestamist, teiseks võivad viiruslikud vektorid esile kutsuda raku immuunvastuse ning kolmandaks on viirused alati bioohutuse seisukohalt riskantsed (Wang *et al.*, 2013; Kaestner *et al.*, 2015). Lisaks eelnevatele faktoritele, tuleb arvesse võtta ka seda, et viirusliku meetodika kasutamine on kallis ja nõuab personalile vastavat väljaõpet.

Vastupidiselt viiruspõhisele meetodile on mitteviiruslikud süsteemid suhteliselt turvalised ja põhjustavad rakkudele väiksemat toksilist mõju. Mitteviraalsed meetodid saab üldjoontes jaotada kolmeks: keemiliseks, füüsiliseks ja bioloogiliseks (Wang *et al.*, 2013; Kaestner *et al.*, 2015).

Keemiliseks transfektsioonisüsteemiks loetakse näiteks kaltsiumfosfaat mehhanismi, mis katalüüsib DNA transporti läbi rakumembraani fosfaatide abil. Nimetatud tehnikat saab

edukalt kasutada suure hulga rakkude kiireks transfektsiooniks, kuid selle efektiivsust peetakse üldjuhul siiski pigem madalaks (Wang *et al.*, 2013; Kaestner *et al.*, 2015).

Kui uurimisobjektiks on raskesti töödeldavad rakud (nagu immuunsüsteemi rakud), siis soovitatakse pigem füüsiliste meetodite rakendamist (Wang *et al.*, 2013; Kaestner *et al.*, 2015). Siia kuuluvad näiteks mikroinjektsioon, mida kasutatakse üksikute rakkude transfekteerimisel, et viia molekulid otse rakkude tsütoplasmasse või tuuma, ja elektroporatsioon, mis võimaldab DNA sisestamist raku suspensioonidesse (Kaestner *et al.*, 2015; Merlen *et al.*, 2015). Elektroporatsiooni käigus asetatakse rakud elektrivälja, sealt saadavad elektriimpulsid põhjustavad rakumembraani suurema läbilaskvuse tekke ja eduka võõr-DNA rakku sisenemise (Yao *et al.*, 2010). Siiski tuleks mõlema eelnevalt nimetatud füüsilise meetodi kasutamisel arvestada kõrvalmõjudega: esimese puhul vigastatakse rakke mehhaaniliselt ning teisel saab märkimisväärne hulk töödeldavatest rakkudest kahjustada (Liu *et al.*, 2015; Merlen *et al.*, 2015).

Veel üheks väga efektiivseks mitteviiruslikuks transfektsiooni meetodiks loetakse katioonsete liposoomide kasutamist. Seda mehhanismi peetakse hetkel nii füüsiliseks kui bioloogiliseks. Antud lipiidid seonduvad negatiivselt laetud DNA-ga ning transpordivad selle endotsütoosi teel läbi rakumembraani (Parissis *et al.*, 2003; Kaestner *et al.*, 2015). Hoolimata selle süsteemi efektiivsusest ja laialdasest kasutuslevikust esinevad ka siin vastunäidustused (Kaestner *et al.*, 2015). Esiteks on tõestatud, et katioonsetel liposoomidel on toksilised kõrvalmõjud, teiseks sõltub nende transfekteerimise efektiivsus seerumi komponentide olemasolust ja kolmandaks kasutatakse tihti reagente, nagu Lipofectamine-seeria, mille täpset keemilist koostist teavad vaid tootjad (Wang *et al.*, 2013; Kaestner *et al.*, 2015).

Eelnimetatud põhjustel tasub kaaluda liposoomidega sarnaselt toimivate rakku sisenevate peptiidide (RSP-de) kasutamist. Lisaks transpordile läbi rakumembraani hõlbustavad ja suunavad need peptiidid ka raku sisestamise sihtmärgini jõudmist (Mäe *et al.*, 2006; Heitz *et al.*, 2009). Kokkuvõtteks võib öelda, et kuigi transfektsioonimeetodeid on väga erinevaid ning sõltuvalt rakutüübist ja sobivast meetodist võib saavutada ligilähedaselt 100%-se transfekteerimise efektiivsuse, on peamiseks probleemiks siiski ühendite transportimine ning seda teemat tuleks veel uurida (Schjötz *et al.*, 2011; Giacca *et al.*, 2012).

1.2. Rakku sisenevad peptiidid

Rakku ümbritseva membraani peamiseks funktsiooniks on raku kaitsmine. Nii rakku sisse kui sealt välja pääsevad plasmamembraani tiheduse tõttu vaid väikesemõõdulised molekulid.

Kuna osade ravimite mõõtmed on nende molekulidega võrreldes palju suuremad, tuleb nende rakkudesse sisestamiseks leida uusi alternatiivseid viise (Madani *et al.*, 2011).

Üheks selliseks võimaluseks on kasutada rakku sisenevaid peptiide. Tegemist on 5-30 aminohappe pikkuste katioonsete ja/või amfipaatsete peptiididega, mis oma hüdrofiilsete ja lipofiilsete osade abil on võimelised transportima rakkudesse väga varieeruva suurusega molekule: nukleiinhappeid, proteiine ja liposome (Farkhani *et al.*, 2014; Morris *et al.*, 2008). Suurimaks rakku sisenevate peptiidide eeliseks on aga see, et nende abil teostatav transport toimub efektiivselt nii *in vivo* kui ka *in vitro* ja selle käigus mõjutatakse, kahjustatakse rakumembraani ja rakku ennast vaid minimaalselt (Madani *et al.*, 2011).

1.2.1. RSP-de päritolu

1988.aastal avastati esmakordselt proteiinid, mis olid võimelised rakust rakku liikuma. Antud uurimisobjektiks oli tol hetkel Tat transkriptsiooni aktivaator, mis on 86-102 aminohapet pikk järjestus ning seda esineb inimese immuunpuudulikkuse viiruses (HIV-1) (Green *et al.*, 1988; Lindgren *et al.*, 2000; Torchilin 2007). Esimeseks RSP-ks peetakse aga 1994ndal aastal leitud Penetratiini, mis esineb *Drosophila Antennapedia*. Penetratiin sisaldab oma ehituses homeodomääni ehk 60 aminohappe pikkuselist järjestust, mis on võimeline DNA-d siduma (Lindgren *et al.*, 2000). Antud peptiidi avastamine algatas mitmed uurimistööd, et selgitada välja väikseim peptiidide järjestus, mis on võimeline rakku sisenema ning samaaegselt alustati ka erinevate uute RSP-de disainimisega. Ligikaudu kümme aastat hiljem esitasid Dowdy ja Langel'i uurimisgrupid oma esimesed tulemused edukast RSP-de lastmolekulide transpordist (Pooga *et al.*, 1998; Schwarze *et al.*, 1999; Andaloussi *et al.*, 2011) ning sellest ajast alates on järjepidevalt avastatud ja uuritud erinevaid rakku sisenevaid peptiide (Arukuusk *et al.*, 2013). Tänu nende peptiidide kiirele ja efektiivsele transpordile, stabiilsusele ja toksilisuse puudumisele on nüüdseks hetkeks kliiniliste uuringute käigus jõutud ka paljude haiguste võimaliku potentsiaalse ravimeetodini (Chen *et al.*, 2007; Lebleu *et al.*, 2008; Heitz *et al.*, 2009).

1.2.2. RSP-de klassifikatsioon

Rakku sisenevaid peptiide klassifitseeritakse nende päritolu, struktuuri või lastmolekuliga seondumise alusel. Genealoogia ehk päritolu põhjal jaotatakse antud peptiidid valgulisteks, kimäärseteks ja sünteetilisteks peptiidideks. Valgulise päritoluga peptiidid on saadud rakku sisenevatest proteiinidest teatud osa eraldamisel. Siia kuuluvad näiteks Tat ja Penetratiin (Zorko *et al.*, 2005). Kimäärsed peptiidid, nagu Transportan ja PepFect oma analoogidega (Mäe *et al.*, 2006; Regberg *et al.*, 2012), sisaldavad endas vähesel määral teistest peptiididest

pärinevaid osi ning polüarginiini perekond kategoriseeritakse sünteetiliste ehk disainitud peptiidide alla (Zorko *et al.*, 2005; Madani *et al.*, 2011).

Struktuurist lähtuvalt jagunevad RSP-d samuti kolmeks grupiks: katioonseteks, hüdrofoobseteks ja amfipaatsseteks. Katioonsed RSP-d erinevad teistest oma lühikeste järjestuste poolest, milles esinevad tihti arginiin, lüsiin ja histidiin. Siia kuuluvad polüarginiinid ja Penetratin (Farkhani *et al.*, 2014). Hüdrofoobseid aminohappeid ja nõrka laengut omavaid peptiide nimetatakse hüdrofoobseteks. Viimasesse ehk kolmandasse gruppi kuuluvad amfipaatsed RSP-d nagu Transportan (Madani *et al.*, 2011), mille rakumembraani läbimise edukuse tagavad struktuuris paiknevad lipofiilsed ja hüdrofiilsed osad (Farkhani *et al.*, 2014).

Osad rakku sisenevad peptiidid moodustavad transporditavate molekulidega keemilised kovalentsed sidemed ja teiste puhul formeeruvad stabiilsed mittekovalentsed kompleksid (Juliano *et al.*, 2008; Heitz *et al.*, 2009). Kovalentselt seonduvate rakku sisenevate peptiididega töötamisel tuleb arvestada võimalusega, et lastmolekuli bioloogilised omadused võivad muutuda. Seda esineb eriti laengutega oligonukleotiidide ja siRNA-de puhul (Juliano *et al.*, 2008; Heitz *et al.*, 2009). Lisaks on siRNA-dega töötamise korral kovalentse sideme sünteesimine RNA molekulide negatiivse laengu tõttu ka aeganõudev ja keeruline (Andaloussi *et al.*, 2011). Samas transporditava molekuliga mittekovalentsete sidemete abil seonduvad RSP-d (Tat, Transportani analoogid, Pep-1) pakuvad võimalust kasutada erinevate genoomsete materjalide (nagu valkude, peptiidide, plasmiidide) transpordiks sama transpordimolekuli ilma vajaduseta iga transpordi jaoks eraldi komplekse sünteesima hakata. Seetõttu on mittekovalentsete sidemete abil seonduvate RSP-de kasutamine võrreldes kovalentsete sidemetega peptiidide kasutamisega tunduvalt mugavam ning vähem töömahukam (Mäe *et al.*, 2006; Heitz *et al.*, 2009; Ezzat *et al.*, 2012). Ka antud töös keskenduti RSP ja nukleiinhappe mittekovalentsetele komplekside kasutamisele.

1.2.3. Transportan ja selle analoogid

Transportan on kimäärne, amfipaadne rakku sisenev peptiid, mis sisaldab vapsiku (*Vespula lewisii*) toksiinist pärit mastoparaani ja neuropeptiid galaniini järjestust. Selle peptiidi lipofiilsete ja hüdrofiilsete osade abil on edukalt erinevatesse rakuliinidesse transporditud näiteks siRNA-sid ja proteiine (Pooga *et al.*, 1998; Muratovska *et al.*, 2004; Yandek *et al.*, 2007; Heitz *et al.*, 2009; Regberg *et al.*, 2013).

Transportani toksiliste kõrvalmõjude tõttu tuli disainida uus ja efektiivsem analoog: N-terminaalsest otsast eemaldati kuus aminohapet ja saadi Transportan 10 (TP10). Tänu puuduvatele arginiini jääkidele on hüdrofoobne TP10 vähem toksiline kui selle eellane ja

võimaldab plasmiidse DNA transporti rakkudesse (Yandek *et al.*, 2007; Madani *et al.*, 2011). Täpsemalt kasutab Transportan 10 rakkudesse penetreerumiseks peamiselt endotsütootilisi radasid (Bárány-Walljea *et al.*, 2007; Yandek *et al.*, 2007; Lehto *et al.*, 2011).

Kuna nukleiinhapete transporti läbi plasmamembraani sooviti muuta veelgi efektiivsemaks, siis disainiti omakorda järgmised analoogid - TP10-st loodi PepFect (PF) perekonna peptiidid. Uute rakku sisenevate peptiidide saamiseks stearüülitati Transportan 10 N-terminaalne ots. Selline rasvhapete lisamine suurendas RSP-de hüdrofoobsust ja seetõttu toimub PF-de rakkudesse sisenemine efektiivsemalt (Suhorutšenko *et al.*, 2011; Anko *et al.*, 2012, Mäe *et al.*, 2009). Peptiid PepFect 6 (PF6) sisaldab oma struktuuris trifluorometüülkinoliini jääke, mis soodustavad endosomaalset vabanemist: oletatavasti hävineb peptiidide sisenemisel rakku endosoomide membraan osmootse rõhu tõttu ning kompleksid väljuvad tsütoplasmasse (Andaloussi *et al.*, 2011). Seetõttu kasutatakse PF6-te siRNA-de transpordiks. Uuringud hiirtega on näidanud, et PF6/siRNA nanokompleksidel on vaid minimaalne toksiline mõju või puudub üldse (Andaloussi *et al.*, 2011; Margus *et al.*, 2011; Dash-Wagh *et al.*, 2012).

Teine TP10-st arendatud konstrukt on PepFect 14 (PF14), mis sisaldab isoleutsiinide asemel leutsiine ja lüsiinide asemel ornitiine. PF14 kasutakse tihti splassingut korrigeerivate oligonukleotiidide transportimiseks rakkudesse. Edukaid eksperimente on läbi viidud nii HeLa rakkudega kui Duchenne'i lihasdüstroofia (DMD) rakukultuuriga (Ezzat *et al.*, 2011). Samuti viib PF14 rakkudesse plasmiidset DNA-d ja siRNA-d (van Asbeck *et al.*, 2013). Sellisel juhul moodustub stabiilne ~150nm suurusega nanopartikkel, mis on võimeline sisenema paljudesse erinevatesse pindkultuuridesse (Veiman *et al.*, 2013).

Tabel 1. Rakku sisenevad peptiidid (Regberg *et al.*, 2012; modifitseeritud)

Peptiid	Järjestus	Päritolu
Tat	GRKKRRQRRRQC	Valguline
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK-NH ₂	Valguline
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	Kimäärne
Transportan10 (TP10)	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	Kimäärne
PepFect 6 (PF6)	Stearüül-AGYLLGK(εNH ^a)INLKALAALAKKIL-NH ₂	Kimäärne
PepFect 14 (PF14)	Stearüül-AGYLLGKLLLOOLAAAALLOOLL-NH ₂	Kimäärne
Polüarginiin	R _n (n=6-12)	Süntetiline

1.3. RSP rakku sisenemise viisid

Rakku sisenevate peptiidide rakumembraani läbimise mehhanismid pole endiselt täiesti selged. Arvatakse, et väiksema lastiga RSP-d on võimelised otse rakkudesse translokeeruma ning suurema lastiga RSP-d kasutavad sisenemiseks peamiselt endotsütoosi, kuid esineb ka vastupidiseid arvamusi (Farkhani *et al.*, 2014).

Otsene peptiidide tungimine rakkudesse toimub oletatavalt kas pööratud mitsellide või pooride moodustumise abil. Mõlemad viisid koosnevad kolmest etapist: seondumine rakumembraaniga, selle läbimine ning RSP-de vabanemine tsütoplasmasse. Antud sisenemisviis esineb amfipaatsel RSP-del nagu Transportanil ja selle analoogidel (Patel *et al.*, 2007; Madani *et al.*, 2011).

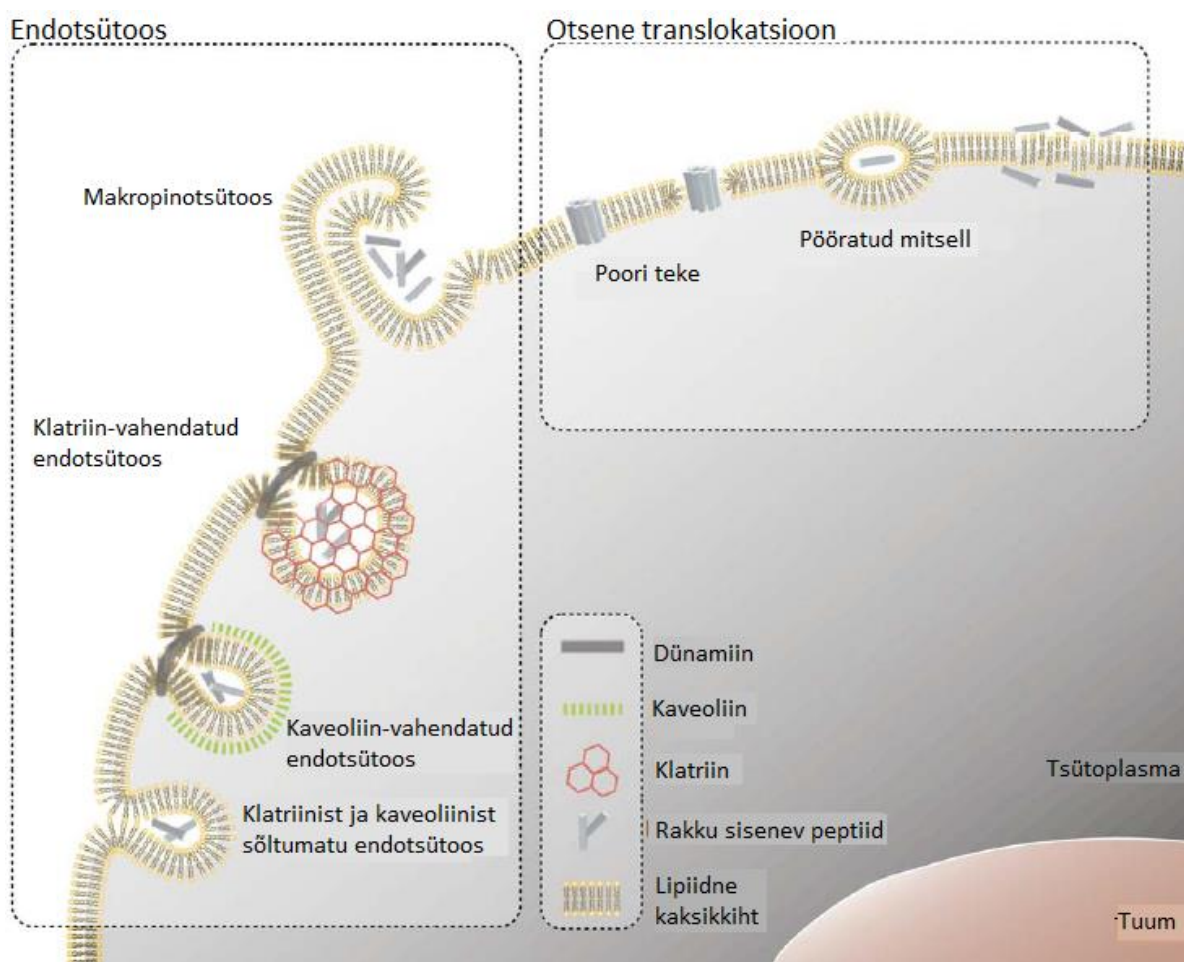
Teine sisenemisviis ehk endotsütoos tähendab mõistena raku neelamismehhanismi, mille kaudu omastatakse makromolekule väljaspoolt rakumembraani. See tähendab, et rakku sisenev molekul ümbritsetakse plasmamembraaniga, seejärel toimub raku sisemusse sopistumine ja tekib vesiikul. Seda meetodit rakendab näiteks Penetratin (Madani *et al.*, 2011; Kornilova 2014).

Endotsütoosi saab kaheks jaotada: fagotsütoosiks ja pinotsütoosiks. Fagotsütoosi käigus rakk ümbritseb ja võtab sisse üle 0,5 µm diameetriga mikroorganisme ja surnud rakke toitumise (ainuraksetel organismidel) või raku kaitsmise eesmärgil. Sellist mehhanismi esineb vaid spetsialiseerunud rakkudel nagu makrofaagidel ja leukotsüütidel (Patel *et al.*, 2007; Tollis *et al.*, 2010). Pinotsütoos on aga kõikide rakkude seas laialtlevinud protsess, mille kaudu sisenevad lahustunud ained, mis muidu plasmamembraaniga ei seondu (Steinman *et al.*, 1983). Antud viisil translokeerub rakkudesse Tat peptiid (Subrizi *et al.*, 2012).

Pinotsütoosil esineb omakorda mitmeid mehhanisme, mida eristatakse nende sisenemisradade järgi: klatriin-vahendatud, kaveoliin-vahendatud või klatriinist ja kaveoliinist sõltumatu endotsütoos ja makropinotsütoos (Tollis *et al.*, 2007). Klatriin vahendatud endotsütoosi puhul toimub endosoomide sees kargo sorteerimine vastavalt nende sihtmärgile ja sellest lähtuvalt saadetakse lastmolekul edasi kas lüsoosoomi, Golgi aparati, rakutuuma või rakumembraani (Khalil *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2009). Kaveoliini vahendatud endotsütoosi puhul satub molekul membraanis paiknevasse lohku, mida nimetatakse kaveooliks. Rakku sisenedes suunatakse molekulid kaveoliini sisalduvatesse organellidesse ehk kaveosoomidesse, kus toimub jällegi sorteerimine ning lasti suunamine Golgi aparati või endoplasmaatilisse retiikulumi. Kaveoliin-vahendatud endotsütoosi peamiseks erinevusteks klatriin-vahendatud endotsütoosiga on pH-muutuse puudumine ja lüsoosoomide vältimine (Khalil *et al.*, 2006). Siiani kõige paremini uuritud RSP-de

sisenemismeetodiks peetakse klatriin sõltuvat endotsütoosi. Seda rada kasutab Tat peptiid näiteks HeLa, CHO rakkudesse sisenemiseks, kuid nagu eelnevalt mainitud, saab antud peptiid vajadusel ka teiste sisenemisradade kaudu rakku translokeeruda (Patel *et al.*, 2007).

Kõikides rakkudes esineb lisaks üldisele endotsütoosile ka aktiivist sõltuv endotsütoosi vorm, mida nimetatakse makropinotsütoosiks. Selle mehhanismi käigus moodustuvad varieeruva suuruse ja kujuga vesiikulid ehk mikropinosoomid, millel puudub kattekiht ja nende diameetriks on tavaliselt 1-5 µm. Need vesiikulid võivad oma olemuselt olla nii pidevad kui ka indutseeritud (Khalil *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007). Erinevaid endotsütoosi radasid inhibiitorite abil blokeerides on tõestatud, et näiteks peptiidid Tat ja Penetratin on võimelised makropinotsütoosi kasutama (Yesylevskyy *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014).



Joonis 1. RSP rakku sisenemise mehhanismid (Trabulo *et al.*, 2010, modifitseeritud)

Rakku sisenevate peptiidide saatus peale penetreerumist sõltub peptiidist, selle kontsentratsioonist ja ka transporditavast molekulist (Patel *et al.*, 2007; Madani *et al.*, 2011). Peale otsest translokatsiooni rakku võib RSP tsütoplasmas oma sihtmärgiga seonduda ja

tuuma liikuda, aga see võidakse ka hoopis proteaaside poolt lagundada või rakust välja transportida. Endotsütoosi radasid kasutades järgnevad RSP-de lüsosomaalne lagundamine või transport tsütoplasmasse, rakutuuma. Samas võidakse rakku sisenev peptiid ka Golgi aparati, endoplasmaatilisse retiikulumi transportida või jällegi rakust uuesti väljutada (Patel *et al.*, 2007).

1.4. Reportersüsteemid ja nende töömehhanism

Reporterina kasutakse sageli fluorestsentsi või luminesstsentsi kodeerivaid gene, mille produkte/fenotüüpi on võimalik erinevate tehnikate abil kergesti tuvastada (Singh *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2010). See tähendab, et reportergeenide abil saab erinevate geenide ekspressiooni, signaalide ülekanderadasid, retseptorite aktiivsust ja isegi proteiinide omavahelist interaktsiooni uurida ja visualiseerida. Tavaliselt konstrueeritakse selleks rekombinantne plasmid, mis sisaldab reportergeene ja saadud konstrukt sisestatakse seejärel uuritavatesse rakkudesse. Rakus toimub terapeutiliste- ja reportergeenide samaaegne transkriptsioon ja translatsioon, seega peegeldab reporteri produkt ehk proteiin uuritava geeni ekspressiooni. Samuti on võimalus reportereid kasutada uuritava geeni ekspressiooni asukoha, kestvuse ja tugevuse määramiseks (Kang *et al.*, 2008).

Paljude proteiinide transkriptsiooni aktiivsuse uurimiseks konstrueeritakse aga reportersüsteeme, mille reportergeenid lisatakse huvipakkuva promooteri ja võimenduselemendi (ingl *enhancer*) kontrolli alla (Doran *et al.*, 2011). See tähendab, et spetsiifiliste endogeensete transkriptsioonifaktorite olemasolul promooter aktiveerub, toimub vastavate endogeensete geenide ekspressioon ja samaaegselt ka reportergeeni avaldumine. Lisaks on võimalik ka mitut reporterit kombineeritult kasutada (Kang *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008).

1.4.1. Rohelise fluorestseeruva proteiini reportersüsteem

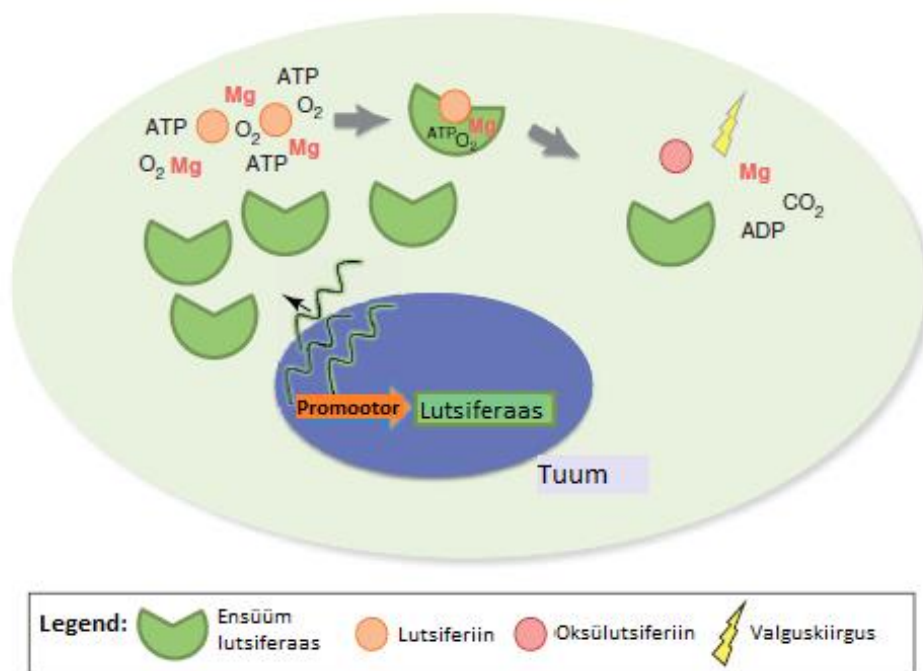
Tihti kasutatakse reporteritena meduusist (*Aequorea victoria*) pärinevat rohelist fluorestseeruvat proteiini (ingl *green fluorescent protein*, GFP), mille ergastamisel valgusega saadakse soovitud signaal (Kang *et al.*, 2008; Doran *et al.*, 2011; Youn *et al.*, 2013). Selle proteiini avastamise eest väljastati 2008ndal aastal ka Nobeli preemia: Osamu Shimomurale valgu isoleerimise eest, Martin Chalfiele GFP eduka ekspresseerimise eest *E.coli*-s ja *C.elegans*-is ning Roger Tsienile, kes lõi erinevalt fluorestseeruvate proteiinide paleti (Zimmer 2009). Tänu R.Tsienile on erinevate GFP-de samaaegsel rakendamisel võimalik mitut huvipakkuvat sihtmärki korraga uurida (Chudakov *et al.*, 2010). Probleem seisneb aga selles, et eralduva signaalvalguse hulk sõltub märklaua asukohast proovis, mis tähendab, et

sügavamal paiknevaid signaale on raskem tuvastada. Järelikult on *in vivo* tingimustes fluorestsentsignaali kasutades suureks probleemiks autofluorestsentsi olemasolu, sest see raskendab signaali eristamist taustast (Kang *et al.*, 2008; Youn *et al.*, 2013).

1.4.2. Lutsiferaasi reportersüsteem

Bioluminestsentsed reporterid on samuti laialt levinud. Neist üheks edukamaks ensüümiks on lutsiferaas, mis võrreldes teiste ensüümidega omab suuremat tundlikkust ja mitmekülgust ning sobib tõttu ideaalselt reporterina kasutamiseks (Mašek *et al.*, 2013; Rijn *et al.*, 2013). Lutsiferaasi geeni nukleotiidseid järjestusi on isoleeritud mitmetest liikidest: *Photinus pyralis* (FLuc), *Gaussia princeps* (GLuc) ja *Renilla reniformis* (RLuc) (Gomi *et al.*, 2001).

Jaanimardikast pärit *Photinus pyralise* lutsiferaas (FLuc) molekulmassiga 60 kDa kasutab substraadina lutsiferiini, mis reageerib adenosinotriifosfaadi (ATP), magneesiumi ja hapniku olemasolul oksülutsiferiiniks (joonis 2). Kõrvalproduktidena tekivad reaktsiooni käigus CO₂, fosfaat ja valgus (Gomi *et al.*, 2001). FLuc-i uusimaks versiooniks on Luc2, mis on modifitseeritud imetajarakkudes optimaalse geeniekspressiooni saavutamiseks ning seda peetakse erinevate rakuliinidega teostatud uuringute põhjal hetkel kõige tundlikumaks bioluminestsentsseks reporteriks (Liang *et al.*, 2012; www.promega.com).



Joonis 2. Skeem *firefly* lutsiferaasi reaktsioonist (Keyaerts *et al.*, 2012, modifitseeritud). Tuumas paiknev FLuc geen transleeritakse valguks, mis seejärel reageerib substraadiga ning kõrvalproduktina eraldub valgus.

Gaussia lutsiferaas pärineb bioluminestsentsest mere aerjalgselt, keda leidub vetes umbes 350-1000 m sügavusel. GLuc on FLuc-ga võrreldes väiksema molekulmassiga (19.9 kDa), see on rakust välja sekreteeritav ning omab paremat vastupidavust pH-muutustele, temperatuuritõusule. Sageli kasutatakse seda immuunanaluüsidel või imetaja rakkudes katsete puhul, mille korral ei soovita rakke või kude signaali mõõtmiseks hävitada või soovitakse teostada samalt populatsioonilt korduvaid mõõtmisi ilma kallist kuvamisaparatuuri kasutamata (Wiles *et al.*, 2005; Rathnayaka *et al.*, 2010).

Kolmas sageli kasutatav lutsiferaas on ainuõsse *Renilla reniformis* ensüüm, mis võimaldab praktikas konstrueeritud reportersüsteeme kontrollida ja transfekteerimisel, proovide käsitlemisel saadud erinevaid tulemusi normaliseerida (Wiles *et al.*, 2005; Shifera *et al.*, 2010). Nii RLuc-i kui GLuc-i substraadiks on koelenterasiin, mis reaktsiooni käigus muutub koelenteramiidiks, lisaks väljuvad produktidena CO₂ ja valgus (Gomi *et al.*, 2001). Oluliseks erinevuseks RLuc-i ja FLuc-i vahel on RLuci sõltumatus ATP olemasolust (Kang *et al.*, 2008).

Lutsiferaasi geenide kasutust leidub tihti *in vivo* uuringutes, sest vastupidiselt GFP rakendamisele, on bioluminestsentse signaali eristamine tänu autofluorestsentsi puudumisele lihtne ning reaktsioone saab vajadusel ka korrata (Kang *et al.*, 2010; Prescher *et al.*, 2010). *In vivo* tingimustes lutsiferaase kasutades sõltuvad saadava signaali omadused substraadist. Nimelt peetakse lutsiferiini suhteliselt stabiilseks molekuliks ja selle sisestamine organismi tagab tavaliselt pikaajalise ühtlase luminescentse signaali. Samas koelenterasiin lagundatakse organismist suhteliselt kiiresti ja seetõttu on signaal nõrgem ning see kaob peale substraadi manustamist kiirelt (Wiles *et al.*, 2005; Prescher *et al.*, 2010).

Bioluminestsentne visualiseerimine võimaldab ka erinevaid rakusiseseid transportmehhanisme uurida. Näiteks Dubikovskaya *et al.* kasutasid seda meetodikat arginiini derivaatide ja teiste transporterite efektiivsuse hindamiseks *in vivo* tingimustes. Lutsiferiin seoti kovalentselt transporteriga ja seejärel jälgiti reaajas FLuc-i ekspresseerivate rakkude ja transgeense looma abil konjugaadi rakku sisenemist, lutsiferiini vabanemist (Dubikovskaya *et al.*, 2008).

1.4.3. Reporterrakuliinid

Rakkude transformatsioon võib olla nii stabiilne kui ka ajutine. Stabiilse ehk pideva reportergeeni ekspressiooni saavutamiseks tuleb soovitud geneetiline materjal koos selektsioonimarkeriga sisestada peremeesraku tuuma, kus seejärel leiab aset huvipakkuva järjestuse integreerumine raku genoomi. Selline lähenemine tagab võõr-DNA stabiilse püsima jäämise ka peremeesrakkude jagunemise korral. See tähendab omakorda, et saadava

luminescentse signaali intensiivsus ja asukoht peegeldab samaaegselt ka rakkude arvukust ning paiknemist (Kim *et al.*, 2010; Prescher *et al.*, 2010).

Ajutise transformatsiooni puhul ei toimu genoomi integreerumist ning seetõttu kaovad antud geenid teatud aja jooksul peremeesrakkude replikatsiooni või keskkonna tingimuste muutumise tagajärjel, kuid selline meetod võimaldab sellegipoolest geenide või geeni produktide funktsioone uurida (Kim *et al.*, 2010; Prescher *et al.*, 2010).

Reporterite kasutamise abil on võimalik jälgida näiteks tuumorkasvajaga hiirte allumist ravile. On tõestatud, et inimese hepatoomi rakkudes sisestatud hNIS ja FLuc geenid CMV (tsütomegaloviiruse) promooteri kontrolli all võimaldasid efektiivse teraapia toimimisega samaaegselt jälgida ka muutust vähirakkude arvus (Kang *et al.*, 2010). Järelikult on rakuliini kasutamisel võimalik väga täpseid tulemusi saada.

Lisaks on reporterrakuliinide ja RNA interferentsi (RNAi) abil võimalik *knock down* ehk geenide vaigistamise eksperimente teha (Kim *et al.*, 2010). Nimelt on üheks RNAi rakenduseks haigust soodustavate või patogeenseid proteiine kodeerivate mRNA-de vaigistamine. Selliste uuringute tulemused võivad samuti väga informatiivsed olla (Davidson *et al.*, 2011).

Näiteks meie molekulaarse biotehnoloogia töögrupis uuritakse U87 ajutuumorit ning RSP, siRNA komplekside abil soovitakse geene vaigistada. Katse läbiviimiseks on rakuliini integreeritud Luc2 ekspresseeriv plasmiid, mis siis peaks pakkuma sihtmärgi hilisemaks inhibeerimiseks. Seega katse õnnestumisel ehk eduka lastmolekuli (siRNA) transpordi ja geenide (*luc2*) vaigistamise korral ei tuvastata reporteri produkte. Tegelikuses aga puudub kontrollmehhanism: kui reporteri ekspressiooni ei tuvastata, ei pruugi põhjuseks olla ainult õnnestunud geeni vaigistamine, vaid tegemist võib olla ka rakkude arvu vähenemisega. Kuna meid huvitab ka HT1080 rakuliini kasutamine, on vajadus luua uus kahte lutsiferaasi ekspresseeriv rakuliin, mis võimaldaks läbiviidavaid katseid täpsemalt jälgida ehk teisiõnu võimaldaks reporterrakuliin tuumori parameetreid ja nende muutumisi paremini mõõta.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks on:

1. Konstrueerida RSP uuringute läbiviimiseks vajalik reporterplasmiid, mis sisaldab kahte varaselt ekspresseeritavat reportergeeni, millest üks on rakusisene lutsiferaas (Luc2) ja teine on rakkudest välja sekreteeritav (GLuc).
2. Testida PF14-ga transfekteerimise abil disainitud plasmidi efektiivsust *in vitro*.
3. Saavutada reporterplasmidi integreerumine HT1080 rakkude genoomi ning selekteerida nende hulgast kõige suurema geeniekspressiooni määraga koloonia.

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Eksperimendis kasutatud rakuliinid

Katsetes kasutati CHO (hiina hamstri munasarja rakud) ja HT1080 rakuliine. HT1080 rakud on inimese fibrosarkoomi (pehmete kudede pahaloomuline kasvaja) rakud. Rakke kasvatati DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Invitrogen) söötmes, millele lisati 10% veise looteserumit FBS (*Fetal Bovine Serum*), 0,1 mmol/l asendatavaid aminohappeid, 1,0 mmol/l naatriumpüruvaati ja 100 IU/ml penitsilliini, 100 µg/ml streptomüsiini. Rakke kasvatati 5% CO₂ sisaldavas veeauruga küllastatud keskkonnas temperatuuril 37 °C ja neid külvati ümber 2-3 päeva järel.

2.2.2. Plasmidi disainimine

Kasutades programmi Clone Manager 5, disainiti soovitud plasmiid pGL4-GLuc (joonis 3). Plasmidi konstrueerimisel valiti vektoriks plasmiid pGL4.51 (neo) (Promega), lühendatult pGL4.51, mille järjestusse sooviti inserteerida GLuc geen pMC.BESPX.GauFLuc2 (BESPX) plasmiidist (saadud A.Meritsa ja M.Ustavi töögruppidele). Disainiti vajaminevad praimerid ning sünteesimise teostas ettevõtte Microsynth (Tabel 2).

2.2.2.1. PCR-i läbiviimine

PCR viidi läbi kasutades *Pfu* DNA polümeraasi ja vastava tootja (Thermo Scientific) protokoll. 50 µl lõppmahuga reaktsioonisegu sisaldas 5 µl *Pfu* puhvrit MgSO₄-ga, 1 µl dNTP

segu, 0,5 µl nii *forward* kui *reverse* praimereid, 1 µl märklaud DNA-d ehk pMC.BESPX.GauFLuc2-te, 1 µl *Pfu* DNA polümeraasi ning 41 µl MQ vett.

PCR-i programm:

- | | | |
|---------|--------|--------------|
| 1. 95°C | 3 min | |
| 2. 95°C | 30 sek | } 35 tsüklit |
| 3. 54°C | 30 sek | |
| 4. 72°C | 4 min | |
| 5. 72°C | 15 min | |
| 6. 4°C | ∞ | |

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid

<i>Forward</i>	5'-ATGCGGCCGCGAATTCGAGC-3'
<i>Reverse</i>	5'-GATCTGCAGGGAGGTCGAGGGTATA-3'

2.2.2.2. Plasmiidi süntees

Inserdi (GLuc geeni) sisestamiseks vektorisse (pGL4.51) viidi PCR produktiga ning vektoriga läbi restriksioon, kasutades ensüüme PstI ja NotI Orange reaktsioonipuhvris. Saadud segu inkubeeriti 37°C juures 3h. Lõikamisele järgnes vektori ning inserdi puhastamine MSB® Spin PCRapace Kit (Invitek) abil ja ligeerimine kasutades T4 ligaasi ning puhvrit. Saadud reaktsioonisegu inkubeeriti toatemperatuuril 2 tundi.

2.2.2.3. Transformatsioon

Disainitud plasmiidi paljundati transformatsiooni abil *E.coli* (*Escherichia coli*) XL-10 tüve rakkudes. Selleks lisati 10 µl ligeerimisosegu 100 µl bakterirakkudele. Saadud segu hoiti 30 min jääl. Järgnes kuumašokk 42°C juures 90 sek ja uuesti 1 min jääl jahutamist. Töödeldud segule lisati 800 µl SOC lahust (SOB + 1% mahust 40% glükoosi) ning inkubeeriti 37°C juures 45 min. Rakud plaaditi selektiivsele ampitsilliini sisaldavale agarsöötmele ning inkubeeriti termokapis 24 h. Saadud transformeeritud rakke kasvatati seejärel LB söötmes (10 g/l bakto-trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 10 g/l NaCl), millele oli lisatud ampitsilliini 1 µg/ml ning glükoosi. Kasutades FavorPrep *Plasmid DNA Extraction Mini kit*-i (Favorgen Biotech Corp.) ning NucleoBond® *Xtra Midi Endofree kit*-i (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) eraldati bakterirakkudest soovitud plasmiidne DNA ning Thermo Scientific NanoDrop 1000 spektrofotomeetri abil määrati kindlaks saadud DNA kontsentratsioon.

2.2.2.4. Geelektroforees

Eraldatud DNA korrektsust kontrolliti restriksiooni ja geelektroforeesi abil. Restriksiooniks kasutati FastDigest ensüüme EcoRI ning XhoI ning saadud DNA ahela pikkused tuvastati kasutades 0,8% agarosgeeli TAE puhvisis, millele lisati 10 µl EtBr (10mg/ml) ning markerina oli kasutusel GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

2.2.3. Plasmidi efektiivsuse kontrollimine CHO rakkudes

Enne katse läbiviimist külvati CHO rakud DMEM söötmega 24-kaevulise plaadi 15-sse kaevu. Kui kaevud oli 70-80% ulatuses rakkudega täitunud, moodustati vastavalt protokollile (tabel 3) kolmes korduses kompleksid, kasutades PF14 RSP-d, pDNA-d 0,5µl kaevu kohta ja MQ vett.

Tabel 3. Transfektsiooni kompleksid

DMEM sööde	PepFect14	MQ H₂O	pGL4-GLuc	BESPX	pGL4.51
450 µl	31,5 µl	98,5 µl	27,3 µl	-	-
450 µl	31,5 µl	124,425 µl	-	1,575 µl	-
450 µl	31,5 µl	123,59 µl	-	-	2,41 µl
500 µl	-	-	8,73 µl	-	-
500 µl	-	-	-	-	-

2.2.3.2. FLuc aktiivsuse mõõtmine

Transfekteeritud CHO rakkude lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks eemaldati rakkudelt sööde, lisati 100 µl 1xReporter Lysis Buffer (Promega) ning 25 µl lüüsitud rakke kanti edasi valgele 96-kaevulisele plaadile. Kõikidele proovidele lisati 80 µl lutsiferiini (vastavalt Promega Luciferase Assay Reagent protokollile) ning reporteri aktiivsust mõõdeti GLOMAX 96 mikroplaat luminomeetrit (Promega) kasutades. Lisaks mõõdeti lüsaadi valgusisaldus kasutades BioRad DCTM Protein Assay protokollile ning Sunrise Tecan mikroplaadi absorptsioonlugejat. Saadud RLU tulemused normaliseeriti valgu suhtes ning analüüsiti seejärel Microsoft Exceli andmetöötlusprogrammiga.

2.2.3.3. GLuc aktiivsuse mõõtmine

Rakust välja sekreteeritava *Gaussia* lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks kanti 20 µl söödett, milles transfekteeritud rakud kasvasid, valgele 96-kaevulisele plaadile. Proovidele lisati vastavalt protokollile 80 µl GLuc regenti (*Gaussia luciferase assay reagent*;

TargetingSystems, USA) ning 1 µl substraati ehk koelenterasiini (*100x Gaussia Substrate*; TargetingSystems). Kasutades GLOMAX 96 mikroplaat luminomeetrit (Promega) mõõdeti proovide lutsiferaasset aktiivsust ning saadud RLU tulemused normaliseeriti valgu suhtes, analüüsiti Exceli tabelitöötlusprogrammiga.

2.2.4. HT1080 rakkude tundlikkus antibiootikumile

Sünteesitud plasmidi sisaldavate HT1080 rakkude selekteerimiseks plasmiidita rakkudest sooviti kasutada antibiootikum neomütsiini. Saamaks teada madalaimat antibiootikumi kontsentratsiooni, mis on võimeline resistentsust mitteomavaid rakke hävitama, külvati HT1080 rakud 24-kaevulise plaadi 11-sse kaevu ning lisati 500 µl DMEM söödet, mis sisaldas erinevates kontsentratsioonides antibiootikumi (100 µg/ml, 300 µg/ml; 500 µg/ml, 700 µg/ml, 900 µg/ml, 1000 µg/ml, 1200 µg/ml, 1400 µg/ml, 1600 µg/ml, 1800 µg/ml ja 2000 µg/ml). 2 nädala jooksul vahetati 1-2 päeva järel söödet ning jälgiti rakkude elulemust.

2.2.5. Elektroporatsioon

HT1080 rakkude transfekteerimiseks kasutati elektroporatsiooni. Elektroporatsioonile eelnevalt teostati rakkudesse sisestatava DNA (pGL4-GLuc plasmidi) lineariseerimine. Restrikteerimiseks kasutati ensüümi Eco81I ning Tango puhvrit ja reaktsioonisegu inkubeeriti 37°C juures 2 h. Elektroporeerimiseks suspendeeriti HT1080 rakud 400 µl Opti-MEM söötmes (*Opti-MEM® Reduced-Serum Medium 1x*, Invitrogen), millele lisati 13 µl pGL4-GLuc plasmidi, segu kanti 4 mm läbimõõduga küveti ning elektroporatsioon viidi läbi vastavalt allpool väljatoodud protokollile kasutades *Gene Pulser Xcell™* süsteemi (Bio-Rad). Transfekteeritud rakud külvati vahekorras 1:1, 1:4 ja 1:10 3-le plaadile, mis sisaldasid neomütsiiniga (500 µg/ml) DMEM söödet. Söödet vahetati 3-4 päeva möödudes.

Elektroporatsiooni protokoll:

1. Jääl inkubeerimine 5 min
2. Elektroporatsioon 250 µF, 400 V, 1 pulss
3. Jääl inkubeerimine 5 min

2.2.6. Rakuliini efektiivsuse kontrollimine, paljundamine

Transfekteeritud ning antibiootikumi abil selekteeritud HT1080 rakkude efektiivsuse kontrollimiseks selekteeriti plaatidelt üksikud kolooniad ning külvati ümber 24-kaevulisele plaadile, kuhu lisati 500 µl neomütsiini sisaldavat (500 µg/ml) DMEM söödet. Lutsiferaasse aktiivsuse hindamiseks valiti samalt 24-kaevuliselt plaadilt kolooniad, mis visuaalselt võrdsel hulgal rakke sisaldasid. Antud rakkude söödet kasutati GLuc aktiivsuse määramiseks eelnevalt kirjeldatud viisil.

Kõrgeima GLuc signaali andnud koloonia külvati edasiseks paljundamiseks 6-kaevulisele plaadile, millele lisati 2 ml G148 sisaldavat (500 µg/ml) DMEM söödet. Kahe päeva möödudes külvati rakkude koloonia ümber 100 mm diameetriga plaadile, mis sisaldas samuti selektiivset söödet. Kui plaat oli täitunud 70-80% ulatuses rakkudega, jaotati paljunenud rakud 8-le uuele värske selektiivse söötmega 58,95 cm² pindalaga plaadile ning kasvatati taas plaadi 70-80% täitumiseni. Järgnes rakkude külmutamine. Külmutamiseks külvati 500 µl söötmega rakke külmutamisviaali, millele lisati 500 µl FBS ja DMSO (*Dimethyl sulfoxide Cell culture grade*; PanReac AppliChem) segu (vahekorras 4:1). Rakke jahutati jääl, paigutati penoplastist karbis -80°C külmkappi ning hiljem kanti rakud ümber vedela lämmastikuga täidetud säilitustünni.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Plasmidi konstrueerimine

Antud töö peamiseks eesmärgiks oli disainida ning sünteesida rakuliin, mis võimaldaks rakku sisenevate peptiidide uuringuid *in vivo* kiiremini analüüsida ning kontrollida ehk teisisõnu hinnata tuumorite suuruseid *in vivo* ning vaigistada RNAi abil genee.

Sellest lähtuvalt tuli eesmärgi täitmiseks kasutada reporterit sisaldavat plasmidi. Olles eelnevalt võrrelnud ning kaalunud erinevate reporterite häid ja halbu omadusi, nagu signaali intensiivsus, selle mõõtmise lihtsus (vajadus rakkude lüüsiks (FLuc-i puhul) või selle otse söötmest mõõtmise võimalus (GLuc-i puhul)), otsustati käesolevas töös kasutada bioluminestsentseid reportereid, mida saaks lihtsasti kvantifitseerida. Nimelt soovitakse pikemas perspektiivis loodavat rakuliini kasutada *in vivo* katsetes ning lutsiferaasi geeni rakendamisel on efektiivse signaali saamine tagatud, sest vastupidiselt fluorestsentssele signaalile ei teki probleeme taustkiirgusega. Lutsiferaas on väga tundlik ensüüm ehk reaktsioon leiab aset ka substraadi madala kontsentratsiooni olemasolul ning see on rakkudes kiiresti tuvastatav, mis oli ka selle töö koostamisel peamiseks eelduseks.

Rakuliini loomise põhjaks valiti välja kommertsiaalne plasmid pGL4.51 (LISA 1). Valitud plasmid on suhteliselt väikse suurusega ning sisaldab spetsiaalselt imetaja rakkudes kasutamiseks mõeldud modifitseeritud reportergeeni Luc2, mis paikneb CMV promooteri kontrolli all. See omakorda tähendab, et tegemist on tugeva kohese varajase (ingl *immediate-early*) promooteriga, mis tagab kodeeritavate geenide kiire ja stabiilse ekspressiooni.

Lisaks eelpool mainitud komponentidele, esinevad antud plasmidis ka kaks antibiootikumresistentsuse geeni (Amp^R ja Neo^R). Ampitsilliini resistentsus on oluline

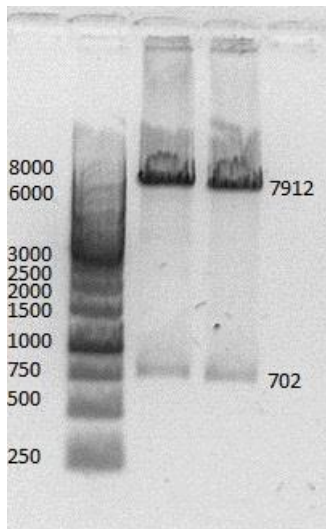
plasmidi selekteerimisel bakterirakkudest, millel puudub sisestatud plasmiidist sõltuv resistentsus. Resistentsus neomütsiinile võimaldab plasmidi sisaldavaid eukarüootseid rakke koekultuuri tingimustes välja selekteerida. Siinkirjeldatud katsete puhul on kasutatud HT1080 rakke. Kõik need loetletud omadused peegeldavad selle plasmidi sobivust rakuliini konstrueerimisel kasutamiseks, kuid plasmidi pGL4.51 järjestuse hulka tuli lisada ka teine, rakust välja sekreteeritava signaaliga reportergeen (GLuc), et luua reportersüsteem, mida saaks kasutada *in vivo* katsetes ning mis pakuks võimalust võrrelda signaali mahasurumist teise sama plasmidi poolt ekspresseeritava reporteriga (Luc2).

Varasemate uuringute käigus on *Gaussia* lutsiferaasi sisaldavaid plasmide kasutatud Andres Meritsa ja Mart Ustavi töögruppides (Gläsker *et al.*, 2013; Ustinova *et al.*, 2014). Nimetatud töögruppides disainitud ning konstrueeritud pMC.BESPX.GauFLuc2 olemasolu tõttu otsustati antud töös seda plasmidi reporteri doonorina kasutada (LISA 2). Teisisõnu sooviti eraldada eelnevalt nimetatud plasmiidist GLuc ekspressioonikassett, kuhu kuuluvad CMV promooter, tümidiini kinaasi (tk) *leader*, GLuc geen, intron ning tümidiini kinaasi polüA saba, ja sisestada see pGL4.51 plasmidi. Seega peaks disainitud plasmiid pGL4-GLuc sisaldama kõiki pGL4.51 osi ning lisaks GLuc ekspressioonikasseti komponente (joonis 4).

Gaussia lutsiferaasi kodeeriva geeni eraldamiseks BESPX plasmiidist, disainiti vajalikud praimerid, sest GLuc ekspressioonikasseti otstes puudusid vajaminevad lõikejärjestused. Vastavad ensüümi seondumiskohad tuli praimerite 5' otstesse üleulatuvate osadena lisada ning huvipakkuv regioon paljundati PCR-i kasutades. Kuna nimetatud ekspressioonikassett sooviti plasmidi sisestada ilma teisi geene katkestamata, valiti inserdi sisestamiseks regioon plasmidi pGL4.51 teises kolmandikus, mille lõikamisel ei esineks plasmidi ühegi komponendi inaktiveerimist (LISA 1). Kleepuvate saitidega ligeerimine saab toimuda vaid omavahel sobivate otste olemasolul, seetõttu tuli nii inserti kui vektorit unikaalset lõikesaiti omavate ensüümidega (PstI, NotI) restrikteerida. Töödeldud PCR-i produkti ehk GLuc ekspressioonikasseti ja plasmidi ühendamiseks ligeeriti need omavahel kokku ning saadud produkt sisestati paljundamise eesmärgil *E.coli* tüvedesse.

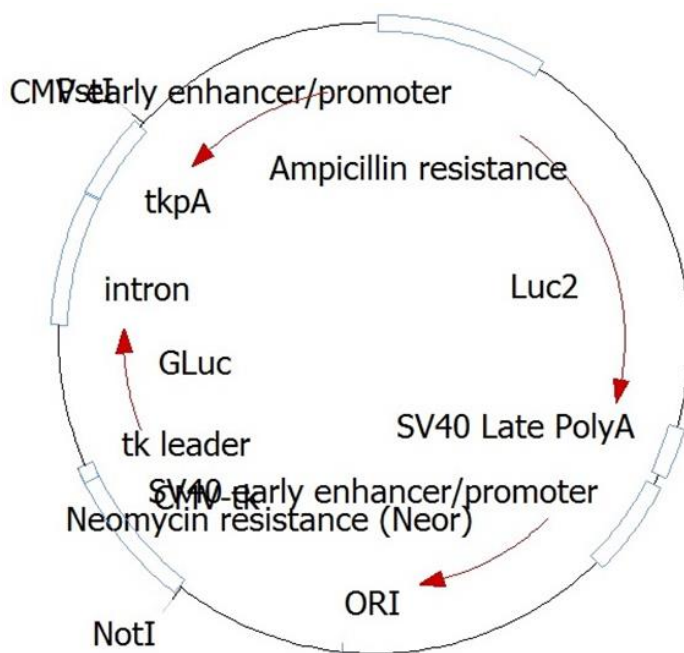
Peale konstrueeritud plasmidi sisestamist ja paljundamist, tuli pGL4-GLuc plasmidi sisaldavad XL10 tüved eristada plasmiidita tüvedest. Selleks kasutati ampitsilliini abi, mis tagas plasmiidita bakteritüvede hukkumise ning alles jäid vaid plasmidi sisaldavad kolooniad, sest resistentsusgeeni olemasolul polnud nende tüvede kasv ja metabolism takistatud. Selekteerimisele järgnes *E.coli* XL-10 tüve rakkudest pDNA eraldamine ja puhastamine. Mõõdeti saadud DNA kontsentratsioon ning valmistati produkti korrektsuse kontrollimiseks restriksioonisegu. Plasmiidse DNA lõikamiseks kasutati ensüüme EcoRI ja

XhoI ning restrikteeritud produkte visualiseeriti geelelektroforeesi abil, kus õiged soovitud fragmendid peaksid olema suurusega 7912 ja 702 bp.



Joonis 3. Geelelektroforees. Pilt kujutab sünteesitud konstrukti peale restrikteerimist ensüümidega EcoRI ja XhoI. Joonisele on kantud markeri ja plasmidi lõikamisel saadud fragmentide suurused.

Saadud geelelektroforeesi pilt (joonis 3) näitab, et lõigatud fragmendid vastavad oodatud tulemusele ning järelkult kinnitab antud katse, et eraldatud DNA on korrektne, soovitud pGL4-GLuc (joonis 4).

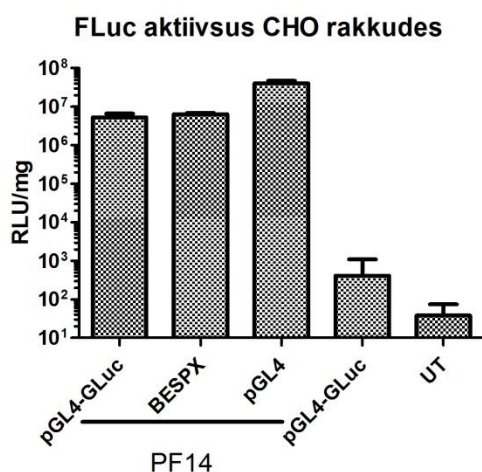


Joonis 4. Plasmidi pGL4-GLuc järjestus

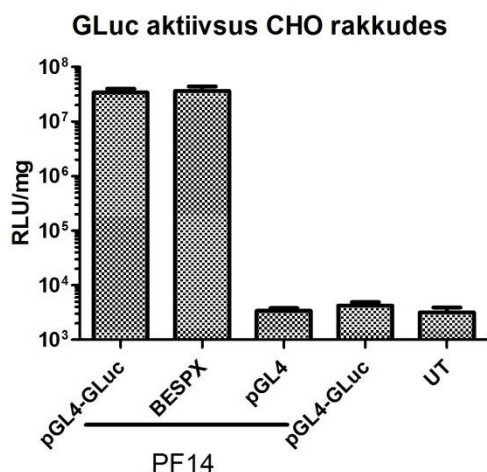
2.3.2. PGL4-GLuc efektiivsus

Disainitud plasmidi töövõime kontrollimiseks *in vitro* kasutati PepFect 14-ga transfekteeritud CHO rakke, millest mõõdeti plasmidi poolt kodeeritavate lutsiferaasi geenide produktide aktiivsust. Meie töögrupi kogemuse põhjal on nende rakkude kasvatamine kerge- rakud paljunevad kiiresti ning neid on suhteliselt lihtne efektiivselt transfekteerida. PF14 osutus sobivaks valikuks, sest antud töö edasiseks eesmärgiks on plasmidi kasutamine *in vivo* ja võrreldes teiste RSP-ga omab see peptiid seerumi olemasolul suuremat transfektsiooni efektiivsust.

FLuc-i valguekspressiooni mõõtmisel saadud tulemused on kujutatud joonisel 5. Ekspressioon tuvastati erineval määral kõikides transfekteeritud CHO rakkudes. Sellest lähtuvalt järeldati, et disainitud plasmidid on töövõimelised, siiski on oluline välja tuua, et pGL4-GLuc plasmidi lutsiferaasi ekspressioon on madalam kui alguses vektoris pGL4.51-s. Selle põhjusteks võivad olla loodud plasmidi pikem järjestus ja sellest tingitud suurem metaboolne koormus rakule või ka omavahel konkureerivad CMV promooterid.



Joonis 5. FLuc aktiivsus CHO rakkudes. Võrreldud on PF14 abil transfekteeritud CHO rakkude normaliseeritud valguekspressiooni. Negatiivse kontrollina kasutati pGL4-GLuc-i ja töötlemata rakke



Joonis 6. GLuc aktiivsus CHO rakkudes. Võrreldud on PF14 abil transfekteeritud CHO rakkude normaliseeritud valguekspressiooni. Negatiivse kontrollina kasutati pGL4-GLuc-i ja töötlemata rakke.

Gaussia lutsiferaasi valguekspressiooni tulemused on näha joonisel 6. Sünteesitud pGL4-GLuc plasmidis ja päritoluplasmidis pMC.BESPX.GauFLuc2 avaldub GLuc geeni valguekspressioon umbkaudu võrdsel määral. Järelikult on teostatud kloneerimine olnud väga edukas, loodud konstruktsioon töötab ning plasmidi võib edasisteks uuringuteks kasutada ehk antud töö eesmärgist lähtuvalt saab plasmidist hakata rakuliini looma.

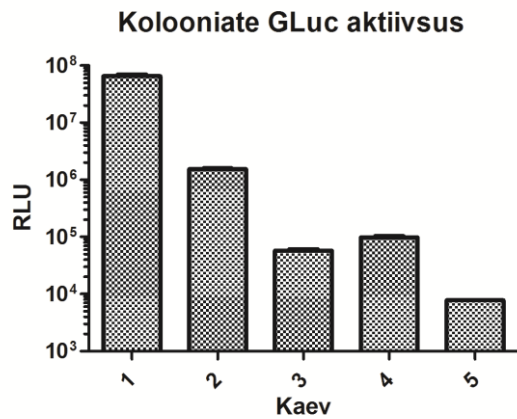
2.3.3. HT1080 rakkude põhjal reporterrakuliini loomine

Käesolevas töös otsustati kasvatada HT1080 rakke, sest töögrupi senine kogemus näitab, et *in vivo* tingimustes on nimetatud rakud varustatud rohkete veresoontega, mis omakorda tähendab, et tänu kiirele ainete transpordile võimaldaks loodud rakuliin tulevikus suhteliselt kergelt hiirtel põhinevates mudelsüsteemides kasvajaid tekitada ning läbi selle kiirelt ka RSP-sid uurida.

Rakuliini loomisel ehk pGL4-GLuc sisestamisel HT1080 rakkudesse oli selekteerimise eesmärgil vajalik kindlaks määrata, milline neomütsiini kontsentratsioon HT1080 rakkudele toksiline on. Selleks kasvatati enne elektroporatsiooni läbiviimist nimetatud rakke erinevaid antibiootikumi kontsentratsioone sisaldavates söötmetes ning katse tulemusena valiti optimaalseks kontsentratsiooni tasemeks 500 µg/ml. Olles teada saanud rakkude seleksiooniks vajaliku infomatsiooni, lineariseeriti efektiivsema tulemuse saamiseks rakkudesse sisestatav pDNA Eco81I ensüümi ja Tango puhvri abil ning teostati elektroporatsioon.

Töödeldud rakke kasvatati seejärel neomütsiini sisaldavas söötmes, mille tulemusena selekteeriti välja soovitud plasmidi sisaldav rakuliin. Rakud, mis ei sisaldanud pGL4-GLuc plasmidi (ja sellel paiknevat neomütsiini resistentsusgeeni), polnud antibiootikumi toksilisuse tõttu võimelised elama ning hukkusid.

Kuna sisestatud plasmiidne järjestus on suuteline genoomis suvalisse kohta integreeruma, tekib võimalus, et vastav regioon on erinevate genoomi struktuuride tõttu (nagu kromosoomi tihedalt pakitud regioonid) kas madala transkriptionilise aktiivusega või hoopis inaktiivne. Seetõttu oli vajalik lisaks rakuliini loomisele ka välja selgitada efektiivseimalt reportergeene ekspresseeriv koloonia, seda seejärel paljundada ning edasiste uuringute tarbeks külmutada. Lähtuti eeldusest, et kui GLuc-i ekspresseeritakse palju, siis FLuc-i ekspressioon on samavõrd suur, sest vastupidiselt *Gaussia* lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmisele, pole FLuc-i taset võimalik rakke häirimata mõõta. Viie efektiivseimalt GLuc-i ekspresseeriva koloonia geeniekspressiooni mõõtmise tulemused on kujutatud joonisel 7, millelt võib näha, et suurimat aktiivsust osutas koloonia, mis on tähistatud numbriga 1. Kolooniate geeniekspressiooni erinevused võisid olla esiteks tingitud inserteerunud pGL4-GLuc plasmidi asukohast genoomis, teiseks võis tulemusi mõjutada genoomi sisenenud koopiate arv.



Joonis 7. Erinevate transfekteeritud HT1080 kolooniate Gaussia lutsiferaasi ekspressioon.

Lähtudes saadud tulemustest paljundati kolooniat number 1 ning soovitud koguse olemasolul külmutati rakud kasutades DMSO ja FBS põhjal valmistatud külmutamisseguga. Antud segu on oluline, sest seal leiduv DMSO kaitseb rakke külmutamise ajal osmootse rõhu muutuste ning rakusiseste kristallide tekke eest, mis võib viia rakumembraani ja biomolekulide kahjustumiseni. Seega teisisõnu tagab DMSO, FBS-i kasutamine rakkude suurema ellujäämise ja järelkult on võimalik neid rakke peale sulatamist edukalt järgmiste uurimistöde otstarbel kasutada ehk nagu eelnevalt mainitud, järgneksid sellele tööle *in vivo* katsed.

KOKKUVÕTE

Geeniteraapia võimaldab tänapäeval erinevaid haiguseid ennetada ja ravida, kuid efektiivseks terapeutiliste ühendite sisestamiseks tuleb tihti abistavate vektorite, nagu RSP-de, abi kasutada. Rakku sisenevad peptiidid on 5-30 aminohapet pikad peptiidid, mis kuuluvad mitteviiruslike transfekteerimismeetodite hulka ning nende RSP-de abil on võimalik väga erinevaid molekule rakkudesse transportida.

Antud töös disainiti ning konstrueeriti plasmiid pGL4-GLuc, mis ekspresseerib kahte erinevat reportergeeni: Luc2 ja GLuc. Reportergeenide ekspressiooni efektiivsust testiti PepFect 14 RSP abil transfekteeritud CHO rakkudes ning katsete tulemused näitasid, et *in vitro* tingimustes toimus mõlema lutsiferaasi geeni pealt aktiivne valguekspressioon. Järgnes soovitud rakuliini loomine, kus reporterplasmiid sisestati elektroporatsiooni abil HT1080 rakkudesse, mille tulemusena leidis aset genoomi integreerumine. Selekteeriti suurima geeniekspressiooni määraga rakukoloonia, paljundati seda soovitud hulga täitumiseni ning külmutati edasiste uuringute tarbeks.

Käesolevas töös saadud tulemused tõestavad HT1080 rakkude põhjal sünteesitud rakuliini efektiivsust *in vitro* ning sellest lähtuvalt võiks järgmise etapina alustada katseid ka *in vivo* tingimustes.

SUMMARY

„Design of reporter cell line for *in vivo* research of CPPs “

Anet Kivihall

The interest of men in improving their health and quality of life has led to a great number of discoveries in medicine. Among these discoveries there is also gene therapy, which allows to cure and prevent different diseases. To use the therapeutic compound effectively, helpful vectors, such as CPPs are often needed. Cell penetrating peptides are 5 to 30 amino acids long peptides and are classified as non-viral transfection methods, in which different molecules are transported into cells.

In this research, a plasmid pGL4-GLuc was designed and constructed expressing two different reporter genes: Luc2 and GLuc. Reporter genes expression effectivity was tested using PepFect 14 CPP on CHO cells. The *in vitro* results showed, that active protein expression occurred on both luciferase genes. Next the reporterplasmid was inserted into HT1080 cells using electroporation and integration into the genome followed. Cell colony with the largest gene expression rate was selected, replicated to a needed amount and frozen for upcoming researches.

The results of this research prove the *in vitro* effectivity of designed cell line based on HT1080 cells and as next step, *in vivo* experiments could take place.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Anko M., Majhenc J., Kogej K., Sillard R., Langel Ü., Anderluh G., Zorko M. (2012) Influence of stearyl and trifluoromethylquinoline modifications of the cell penetrating peptide TP10 on its interaction with a lipid membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818: 915–924.

Arukuusk P., Pärnaste L., Oskolkov N., Copolovici D.-M., Margus H., Padari K., Möll K., Maslovskaja J., Tegova R., Kivi G., Tover A., Pooga M., Ustav M., Langel Ü. (2013) New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1828(5): 1365–1373.

Bárány-Wallje E., Gaur J., Lundberg P., Langel Ü., Gräslund A. (2007) Differential membrane perturbation caused by the cell penetrating peptide Tp10 depending on attached cargo. *FEBS Letters* 581(13): 2389–2393.

Chen L., Harrison S.D. (2007) Cell-penetrating peptides in drug development: enabling intracellular targets. *Biochemical Society Transactions* 35: 821–825.

Cheng Z., Garvin D., Paguio A., Stecha P., Wood K., Fan F. (2010) Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways. *Current Chemical Genomics* 4: 84–91.

Chudakov D. M., Matz M. V., Lukyanov S., Lukyanov K. A. (2010) Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiological Reviews* 90(3): 1103–1163.

Crystal R. G. (2014) Adenovirus: The First Effective In Vivo Gene Delivery Vector. *Human Gene Therapy* 25(1): 3–11.

Dash-Wagh S., Jacob S., Lindberg S., Fridberger A., Langel Ü., Ulfendahl M. (2012) Intracellular Delivery of Short Interfering RNA in Rat Organ of Corti Using a Cell-penetrating Peptide PepFect6. *Molecular Therapy Nucleic Acids* 12: e61.

Davidson B. L., McCrey Jr P. B. (2011) Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature Reviews. Genetics* 12(5):329-40.

Doran D. M., Kulkarni-Datar K., Cool D. R., Brown T. L. (2011) Hypoxia activates constitutive luciferase reporter constructs. *Biochimie* 93(2): 361–368.

Dubikovskaya E. A., Thorne S. H., Pillow T. H., Contag C. H., Wender P. A. (2008) Overcoming multidrug resistance of small-molecule therapeutics through conjugation with releasable octaarginine transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 : 12128–12133.

EL Andaloussi S., Lehto T., Mäger I., Rosenthal-Aizman K., Oprea I. I, Simonson O. E., Sork H., Ezzat K., Copolovici D. M., Kurrikoff K., Viola J. R., Zaghoul E. M., Sillard R., Johansson H. J., Hassane F. S., Guterstam P., Suhorutšenko J., Moreno P. M., Oskolkov N., Hälldin J., Tedebark U., Metspalu A., Lebleu B., Lehtiö J., Smith C. I., Langel Ü. (2011) Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Research* 39(9): 3972–3987.

Ezzat K., Andaloussi S. E., Zaghoul E. M., Lehto T., Lindberg S., Moreno P. M., Viola J. R., Magdy T., Abdo R., Guterstam P., Sillard R., Hammond S. M., Wood M. J., Arzumanov A. A., Gait M. J., Smith C. I., Hällbrink M., Langel Ü. (2011) PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Research* 39(12): 5284–5298.

Ezzat K., Zaghoul E. M., Andaloussi S. E., Lehto T., El-Sayed R., Magdy T., Smith C.I., Langel Ü. (2012) Solid formulation of cell-penetrating peptide nanocomplexes with siRNA and their stability in simulated gastric conditions. *Journal of Controlled Release* 162 (1): 1–8.

Farkhani S. M., Valizadeh A., Karami H., Mohammadi S., Sohrabi N., Badrzadeh F. (2014) Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. *Peptides* 57: 78–94.

Giacca M., Zacchigna S. (2012) Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *Journal of Controlled Release* 161: 377–388.

Gläsker S., Lulla A., Lulla V., Couder T., Drexler J. F., Liljeström P., Lecuit M., Drosten C., Merits A., Mareike B. (2013) Virus replicon particle based Chikungunya virus neutralization assay using *Gaussia luciferase* as readout. *Virology Journal* 10: 235

Gomi K., Kajiyama N. (2001) Oxyluciferin, a Luminescence Product of Firefly Luciferase, Is Enzymatically Regenerated into Luciferin. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 36508-36513.

Green M, Loewenstein P. M. (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55(6): 1179-1188.

- Heitz F., Morris M. C., Divita G. (2009) Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British Journal of Pharmacology*, 157: 195–206.
- Juliano R., Md. Alam R., Dixit V., Kang H. (2008) Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* 36(12): 4158–4171.
- Kaestner L., Scholz A., Lipp P. (2015) Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25: 1171–1176.
- Kang J. H., Chung J.-K. (2008) Molecular-Genetic Imaging Based on Reporter Gene Expression. *The Journal of Nuclear Medicine* 49: 164-179.
- Keyaerts M., Caveliers V., Lahoutte T. (2012) Bioluminescence imaging: looking beyond the light. *Trends in Molecular Medicine* 18(3): 164-172.
- Khalil I. A., Kogure K., Akita H., Harashima H. (2006) Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery. *Pharmalogical reviews* 58: 32–45.
- Kim T. K., Eberwine J. H. (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry* 397(8): 3173–3178.
- Kornilova E. S. (2014) Receptor-Mediated Endocytosis and Cytoskeleton. *Biochemistry (Moscow)*, 79(9): 865-878.
- Lebleu B., Moulton H. M., Abes R., Ivanova G. D., Abes S., Stein D. A., Iversen P. L., Arzumanov A. A., Gait M. J. (2008) Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(4–5): 517–529.
- Lehto T., Simonson O. E., Mäger I., Ezzat K., Sork H., Copolovici D.-M., Viola J. R., Zaghoul E. M., Lundin P., Moreno P. M., Mäe M., Oskolkov N., Suhorutšenko J., Smith C. I., Andaloussi S. E. (2011) A Peptide-based Vector for Efficient Gene Transfer In Vitro and In Vivo. *Molecular Therapy* 19(8): 1457–1467.
- Liang Y., Walczak P., Bulte J. W. (2012) Comparison of red-shifted firefly luciferase Ppy RE9 and conventional Luc2 as bioluminescence imaging reporter genes for in vivo imaging of stem cells. *Journal of Biomedical Optics* 17(1): 016004
- Lindgren M., Hällbrink M., Prochiantz A., Langel Ü. (2000) Cell-penetrating peptides. *Trends in Pharmacological Sciences* 21(3): 99-103.

- Liu F., Wu D., Wua X., Chenc K. (2015) Analyses of the cell mechanical damage during microinjection. *Soft Matter* 11: 1434-1442.
- Madani F., Lindberg S., Langel Ü., Futaki S., Gräslund A. (2011) Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *Journal of Biophysics* Volume 2011: 414729
- Margus H., Padari K., Pooga M. (2011) Cell-penetrating Peptides as Versatile Vehicles for Oligonucleotide Delivery. *Molecular Therapy* 20(3): 525–533.
- Mašek T., Vopalenský V., Pospíšek M. (2013) The Luc2 gene enhances reliability of bicitronic assays. *Central European Journal of Biology* 8(5): 423-431.
- Merlen C., Ledoux J. (2015) Single-Cell Microinjection Coupled to Confocal Microscopy to Characterize Nuclear Membrane Receptors in Freshly Isolated Cardiomyocytes. *Methods in Molecular Biology* 1234: 9-16.
- Morris M. C., Deshayes S., Heitz F., Divita G. (2008) Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biology of the Cell* 100: 201–217.
- Muratovska A., Eccles M. R. (2004) Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Letters* 558(1-3): 63-68.
- Mäe M, El Andaloussi S., Lundin P., Oskolkov N., Johansson H. J., Guterstam P. (2009) A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *Journal of Controlled Release* 134: 221-227.
- Mäe M., Langel Ü. (2006) Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Current Opinion in Pharmacology* 6:509–514.
- Mäger I., Langel K., Lehto T., Eiríksdóttir E., Langel Ü. (2012) The role of endocytosis on the uptake kinetics of luciferin-conjugated cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818: 502–511
- Parissis J. T., Nikolaou V. N. (2003) Gene Therapy in the Management of Cardiovascular Disease. *Hellenic Journal of Cardiology* 44: 271-276.
- Patel L. N., Zaro J. L., Shen W.-C. (2007) Cell Penetrating Peptides: Intracellular Pathways and Pharmaceutical Perspectives. *Pharmaceutical Research* 24(11): 1977-92.
- Pooga M., Hällbrink M., Zorko M., Langel Ü. (1998) Cell penetration by transportan. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12: 67-77.

- Prescher J. A., Contag C. H. (2010) Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence. *Current Opinion in Chemical Biology* 14: 80–89.
- Rathnayaka T., Tawa M., Sohya S., Yohda M., Kuroda Y. (2010) Biophysical characterization of highly active recombinant Gaussia luciferase expressed in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804(9): 1902-1907.
- Regberg J., Eriksson J. N., Langel Ü. (2013) Cell-penetrating peptides: from cell cultures to in vivo applications. *Frontiers in Bioscience* 5: 509-516
- Robertson A. S., Smythe E., Ayscough K. R. (2009) Functions of actin in endocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 2049–2065.
- Schiøtz B. L., Rosado E. G., Bækkevold E. S., Lukacs M., Mjaaland S., Sindre H., Grimholt U., Gjøen T. (2011) Enhanced transfection of cell lines from Atlantic salmon through nucleofection and antibiotic selection. *BMC Research Notes* 4:136.
- Schwarze S. R., Ho A., Vocero-Akbani A., Dowdy S. F. (1999) In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science* 285: 1569-1572
- Shifera A. S., Hardin J. A. (2010) Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays. *Analytical Biochemistry* 396(2): 167–172.
- Singh A., Massoud T. F., Deroose C., Gambhir S. S. (2008) Molecular Imaging of Reporter Gene Expression in Prostate Cancer: An Overview. *Seminars in Nuclear Medicine* 38: 9-19.
- Steinman R. M., Mellman I. S., Muller W. A., Cohn Z. A. (1983) Endocytosis and the Recycling of Plasma Membrane. *The Journal of Cell Biology* 96: 1-27.
- Subrizi A., Tuominen E., Bunker A., Róg T., Antopolsky M., Urtti A. (2012) Tat(48-60) peptide amino acid sequence is not unique in its cell penetrating properties and cell-surface glycosaminoglycans inhibit its cellular uptake. *Journal of Controlled Release* 158(2): 277–285.
- Suhorutšenko J., Oskolkov N., Arukuusk P., Kurrikoff K., Eriste E., Copolovici D.-M., Langel Ü. (2011) Cell-Penetrating Peptides, PepFects, Show No Evidence of Toxicity and Immunogenicity In Vitro and In Vivo. *Bioconjugate Chemistry* 22(11): 2255–2262.

- Zimmer M. (2009) GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond. *Chemical Society Reviews* 38: 2823-2832.
- Zorkoa M., Langel Ü. (2005) Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 529 – 545.
- Tollis S, Dart A. E., Tzircotis G., Endres R. G. (2010) The zipper mechanism in phagocytosis: energetic requirements and variability in phagocytic cup shape. *BMC Systems Biology* 4:149.
- Torchilin V. P. (2007) Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 548–558.
- Trabulo S., Cardoso A. L., Mano M., Pedroso de Lima M. C. (2010) Cell-Penetrating Peptides- Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals* 3(4): 961-993.
- Ustinova J., Zusinaite E., Utt M., Metsküla K., Reimand K., Huchaiiah V., Merits A., Uibo R. (2014) Development of a luciferase-based system for the detection of ZnT8 autoantibodies. *Journal of Immunological Methods* 405: 67–73.
- van Asbeck A. H., Beyerle A., McNeill H., Bovee-Geurts P. H. M., Lindberg S., Verdurmen W. P. R., Hällbrink M., Langel Ü., Heidenreich O., Brock R. (2013) Molecular Parameters of siRNA-Cell Penetrating Peptide Nanocomplexes for efficient cellular delivery. *ACS Nano* 7(5): 3797–3807.
- van Rijn S., Nilsson J., Noske D. P., Vandertop W. P., Tannous B. A., Würdinger T. (2013) Functional multiplex reporter assay using tagged Gaussia luciferase. *Scientific Reports* 3: 1046.
- Wang W., Li W., Ma N., Steinhoff G. (2013) Non-Viral Gene Delivery Methods. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 14: 46-60.
- Veiman K.-L., Mäger I., Ezzat K., Margus H., Lehto T., Langel K., Kurrikoff K., Arukuusk P., Suhorutšenko J., Padari K., Pooga M., Lehto T., Langel Ü. (2013) PepFect14 Peptide Vector for Efficient Gene Delivery in Cell Cultures. *Molecular Pharmaceutics* 10(1): 199–210
- Wiles S., Ferguson K., Stefanidou M., Young D. B., Robertson B. D. (2005) Alternative Luciferase for Monitoring Bacterial Cells under Adverse Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 71(7): 3427-3432.

Wu X., Gehring W. (2014) Cellular uptake of the Antennapedia homeodomain polypeptide by macropinocytosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443(4): 1136–1140.

Yandek L. E., Pokorny A., Florén A., Knoelke K., Langel Ü., Almeida P. F. (2007) Mechanism of the Cell-Penetrating Peptide Transportan 10 Permeation of Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* 92(7): 2434-2444.

Yao S., Gutierrez D. L., Ring S., Liu D., Wise G. E. (2010) Electroporation to Deliver Plasmid DNA into Rat Dental Tissues. *The Journal of Gene Medicine* 12(12): 981–989.

Yesylevskyy S., Marrink S.-J., Mark A. E. (2009) Alternative Mechanisms for the Interaction of the Cell-Penetrating Peptides Penetratin and the TAT Peptide with Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* 97(1): 40-49.

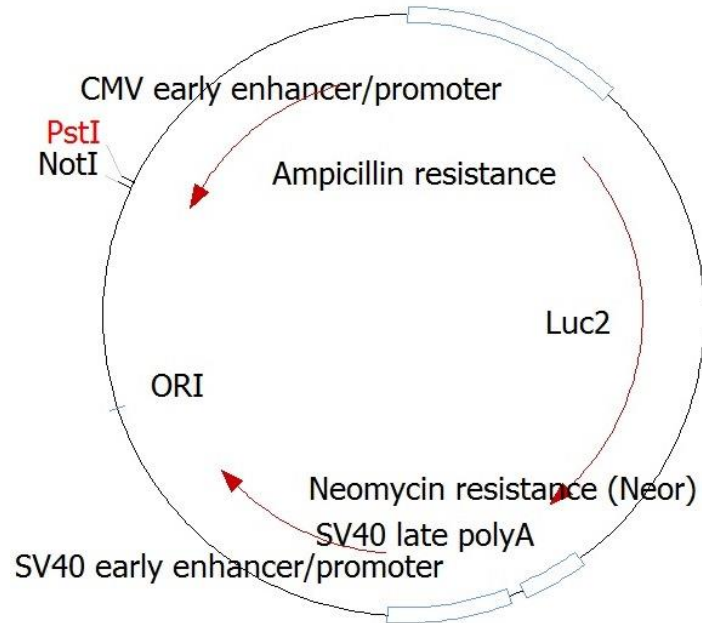
Youn H., Chung J.-K. (2013) Reporter Gene Imaging. *American Journal of Roentgenology* 201(2): 206-214.

Kasutatud veebiaadressid:

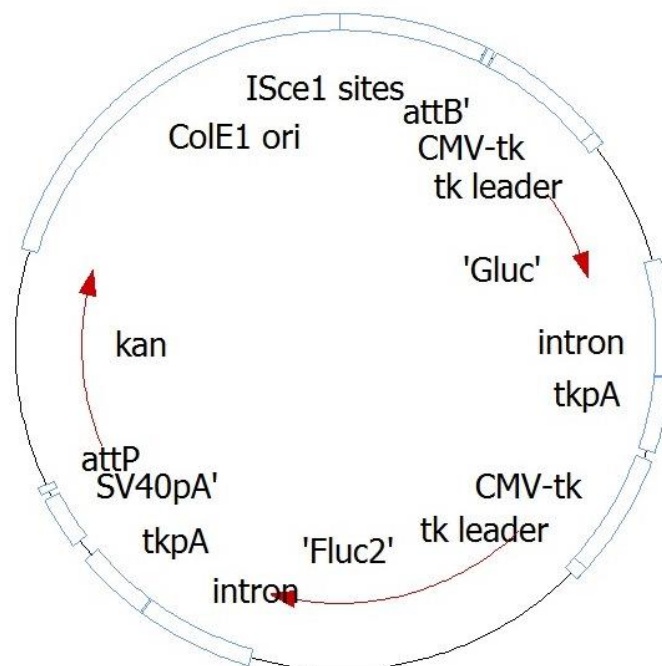
<http://www.promega.ee/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/a/pgl4%2051%20vector.pdf>

LISAD

LISA 1. Plasmiidi pGL4.51(neo) järjestus



LISA 2. Plasmiidi pMC.BESPX.GauFLuc2 järjestus



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Anet Kivihall

(sünnikuupäev: 03.04.1993)

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

“Reporterrakuliini loomine RSP *in vivo* uuringuteks“,
mille juhendajad on MSc Kalle Pärn ja PhD Kaido Kurrikoff

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

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 05.25.2015 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 25.05.2015