

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

**Peptiidi vahendusel laetud ekstratsellulaarsed vesiikulid omavad transfektsioonivõimet**

*in vitro ja in vivo*

Magistritöö

30 EAP

Anett Puskar

Juhendaja PhD Kaido Kurrikoff

TARTU 2020

## **Infoleht**

### **Peptiidi vahendusel laetud ekstratsellulaarsed vesiikulid omavad transfektsioonivõimet**

#### ***in vitro ja in vivo***

Ekstratsellulaarsete vesiikulite (*extracellular vesicles*, EV) puhul on tegemist väikeste, nano-suurusel osakekestega. Antud membraanseid vesiikuleid toodavad valdavalt kõik rakutüübid ja need sisaldavad erinevaid lipiide, suhkruid ning nukleiinhappeid. EV-de rolliks on rakkudevahelise kommunikatsiooni vahendamine ja seetõttu on need kergesti omastavad teiste rakkude poolt, tehes EV-dest võimaliku ravimi transpordivektori.

Antud töö eesmärgiks oli näidata, et EV-de laadimiseks nukleiinhappega on võimalik kasutada keemilist transfektsiooni rakku siseneva peptiidi PF14 vahendusel. Selliselt laetud EV-sid oli võimalik kasutada transfektsiooniks nii imetaja rakukultuuris, kui ka imetaja organismis, kusjuures EV-de füüsikalised omadused erinesid transfektsiooniks kasutatud kompleksi omadustest.

Märksõnad: ekstratsellulaarsed vesiikulid, rakku sisenevad peptiidid, PepFect 14, transfektsioon, biodistributsioon

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

### **Extracellular vesicles loaded via peptide are capable of transfection *in vitro* and *in vivo***

Extracellular vesicles (EV) are small, nano-sized membraneous vesicles. They are produced by mostly all cell types, containing lipids, sugars and nucleic acids. These vesicles are responsible for cell-to-cell communication, due to which they have the innate ability to be taken up by recipient cells. This innate ability makes EVs a lucrative choice to use as possible drug delivery vectors.

The aim of this thesis was to demonstrate that it is possible to load EVs with nucleic acid using a chemical transfection vector, called cell-penetrating peptide PF14. Loaded EVs were capable of transfecting cells in mammal tissue culture and in a mouse model. The EVs also displayed different physical attributes when compared to the plasmid and peptide nanoparticles used for transfection.

Keywords: extracellular vesicles, cell-penetrating peptides, PepFect 14, transfection, biodistribution

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

# Sisukord

Infoleht .....	2
Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus .....	7
1.1 Geeniteraapia.....	8
1.2 Rakkude poolt toodetud vesiikulid.....	9
1.3 Ekstratsellulaarsed vesiikulid.....	10
1.3.1 EV-de biodistributsioon .....	11
1.3.2 EV-de eraldamine.....	12
1.3.3 EV-de eraldamise puudused.....	14
1.3.4 EV-de laadimine lastmolekuliga ja nende kasutamine.....	14
1.4 Rakku sisenevad peptiidid.....	15
1.4.1 PepFect 14.....	16
2. Eksperimentaalne osa.....	18
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2 Materjalid ja meetodika .....	18
2.2.1 Töös kasutatud rakuliinid ja nende kasvatamine.....	18
2.2.2 Töös kasutatud plasmiidid.....	19
2.2.3 Imetaja rakukultuuri transfekteeimine .....	19
2.2.4 Töödeldud söötme kogumine ja kasutamine imetaja rakukultuuris transfektsiooniks .....	21
2.2.4.1 Töödeldud sööde pLuc transfekteeitud doonorakkudelt.....	22
2.2.4.2 Tsentrifuugitud töödeldud sööde pGFP transfekteeitud doonorakkudelt .....	23
2.2.5 Transfektsiooni edukuse hindamine imetaja rakukultuuris .....	25
2.2.5.1 Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine .....	25
2.2.5.2 Konfokaalmikroskoopa .....	26

2.2.6 EV-de tootmine ja eraldamine suures skaalas .....	26
2.2.7 EV-de biodistributsiooni iseloomustamine hiire mudelis .....	28
2.2.8 Eraldatud EV-de ning kompleksi diameetri ja zeta potentsiaali määramine.....	29
2.2.9 Andmete analüüs .....	29
2.3 Tulemused ja arutelu .....	30
2.3.1 Transfekteeritud rakkudelt kogutud sööde on transfektsioonivõimeline .....	30
2.3.2 Transfekteeritud rakkudelt kogutud söötme rakuvaba fraktsioon on transfektsioonivõimeline .	31
2.3.3 Transfekteeritud rakkudelt kogutud söötimest eraldatud EV-d on transfektsioonivõimelised hiire mudelis .....	33
2.3.4 Töödeldud rakusöötimest eraldatud EV-de iseloomustamine .....	35
Kokkuvõte .....	39
Summary .....	40
Kasutatud kirjandus.....	41
Lisad.....	48
Lihtlitsents .....	50

## Kasutatud lühendid

CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i> , hiina kääbushamstri munasarja rakud
CoA	koensüüm-A
CPP	<i>cell-penetrating peptide</i> , rakku sisenev peptiid
CR	<i>Charge ratio</i> , teoreetiline laengusuhe, mis näitab peptiidi laengu ülehulka kompleksis oleva nukleiinihappe laengu suhtes
DCM	diklorometaan
DIC	N,N-diisopropüülkarbodimiid
DIEA	N,N-diisopropüületüülamiin
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> , dünaamiline valgushajuvus
DMF	N,N-dimetüülformaniid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , rakusööde imetaja koekultuuris
DTT	ditiotreitool
EDTA	etüleendiamiintetraatsetaat
EV	<i>extracellular vesicles</i> , ekstratsellulaarsed vesiikulid
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , veise loote seerum
Fmoc	fluorenüülmetüüloksükarbonüül
HEK-Cre	<i>Human embryonic kidney cells</i> , inimese embrüonaalsed neerurakud, mis ekspresseerivad Cre-rekombinaasi
HBTU	O-bensotriasoolN,N,N,N',N'-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaat
HOBt	1-hüdoksübensotriasool
i.p.	intraperitoneaalne
i.v.	intravenoosne
MVB	<i>multivesicular body</i> , multivesikulaarne keha

NMP	N-metüül-2-pürrolidoon
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , fosfaatpuhverlahis
PF14	PepFect 14
TFA	trifluoroädikhape
TIS	triisopropüülsilaan
UT	<i>untreated</i> , töötlemata kontrollrakud

## Sissejuhatus

Tänapäeval on soov ja nõudlus järjest spetsiifilisema ravi jaoks, mis oleks võimalikult vähetoksiline. Sealhulgas esineb haiguseid, mis on põhjustatud geeni funktsiooni häirumisest. Vigase geeni tõttu tekkinud haiguse ravimiseks on võimalik rakendada geeniteraapiat, mida kasutatakse asendamaks häirunud geene ja valke, või muutmaks nende ekspressioonitaset. Selle jaoks saab kasutada nukleiinhappemolekule, mille puhul on näidatud nende võimet leevendada häirunud geenitalitlusest tulenevat haigust.

Nukleiinhappe kasutamise puhul terapeutilistel eesmärkidel on üheks suurimaks probleemiks nende transport huvipakkuvasse sihtmärki. Selle jaoks on loodud erinevaid transpordi vektoreid, nagu viirusvektorid, füüsilised meetodid ning keemilised meetodid, mille hulka kuuluvad näiteks liposoomid ja rakku sisenevad peptiidid. Siiski esineb eelmainitud vektorite kasutamisel probleeme, näiteks immuunsüsteemi aktivatsioon (Lowenstein jt., 2007), viirusvektorite integratsioon mitte sihtmärkjärjestusse (Daniel ja Smith, 2008) ning liposoomi iseloomustab toksilisus ja kiire organismist eemaldamine (Ishida jt., 2006). Seetõttu on vajadus veel arendada olemasolevaid geeniteraapia vektoreid ja leida ka uusi võimalikke vektoreid. Üheks võimaluseks oleks kasutada geeniteraapia vektorina ekstratsellulaarseid vesiikuleid. Tegemist on väikeste, nano-suuruses, membraansete vesiikulitega, mida iseloomustab loomumane võime transportida rakkudesse vesiikuli sees olevat materjali. Ekstratsellulaarsete vesiikulite puhul on varasemalt näidatud nende võimet muuta sihtmärkrakkude geeniekspressiooni. Seega oleks võimalik arendada edasi antud vesiikulite loomumast transpordivõimet, laadides vesiikuleid pDNA-ga.

Käesoleva magistritöö peamiseks eesmärgiks oli leida meetod nukleiinhappe pakkimiseks ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse, kasutades keemilist transfektsiooni, mis põhines rakku siseneval peptiidil PF14. Sealhulgas sooviti kinnitada, et ekstratsellulaarsete vesiikulite laadimine läbi keemilise transfektsiooni on võimalik ning antud vesiikulid omavad transfektsioonivõimet nii imetaja rakukultuuris kui ka loomudel. Lisaks eelnevale alustati protokollid välja töötamist ekstratsellulaarsete vesiikulite tootmiseks ja eraldamiseks suures mahus. Antud magistritöö jaoks vajalikud katsed viidi läbi Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Geeniteraapia

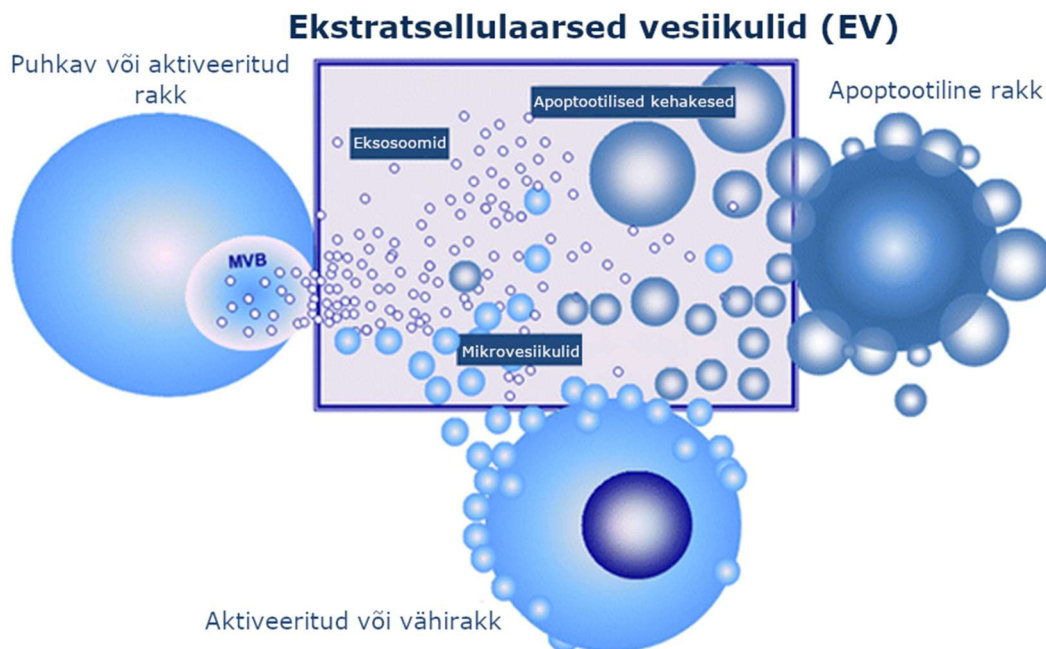
Geeniteraapia kui mõiste sai alguse juba 1970-ndatel ning kujutab endast geeni funktsiooni häirimisel tuleneva haiguse ravimist kasutades nukleiinhapet korrigeerimaks haigust põhjustavad geeni. Nukleiinhape peab läbima mitmeid barjääre nii raku sees kui ka väljas, enne sihtmärgini jõudmist. DNA ja RNA ei oma võimet ületada hüdrofoobset ja negatiivselt laetud plasmamembraani ning seetõttu ei saa puhast nukleiinhapet kasutada iseseiva ravimina (Giacca, 2010). Tihtipeale on vajalik ka biomolekuli viimine konkreesse sihtmärgini, olgu see siis konkreetne rakutüüp või asukoht genoomis. Seetõttu on geeniteraapia läbiviimiseks vajalik kasutada vektorit, mis on võimeline ületama erinevaid barjääre nii raku sees kui ka väljas ning viima nukleiinhappe vajalikku sihtkoha.

Geeniteraapia vektoreid saab üldjoontes jagada kahte gruppi: viirusel põhinevad vektorid ja mitteviraalsed vektorid. Mitteviraalsete vektorite hulka kuuluvad omakorda keemilised vektorid ning füüsilised meetodid. Viraalsete vektorite puhul saab kasutada näiteks adenoviirusel, adeno-seoselisel viirusel või lentiviirusel põhinevad vektoreid (Thomas jt., 2003). Viirusvektorite kasutamise suurem puudus on nende kõrge risk organismis immunogeensuse, tsütotoksilisuse kuid ka mutageneesi tekitamisel (Thomas jt., 2003). Füüsiliste meetodite kuuluvad näiteks lastmolekuli süstimine, osakeste püstoli kasutamine, aga ka elektroporeerimine ja sonikeerimine, kuid antud meetodid on siiski üpris ebaefektiivsed (Ramamoorth ja Narvekar, 2015).

Keemiliste geeniteraapia vektorite hulka kuuluvad näiteks polümeeril või liposoomil põhinevad vektorid, aga ka rakku sisenevad peptiidid (Ramamoorth ja Narvekar, 2015). Liposoomide ja polümeeril põhinevate vektorite puhul on näidatud, et need võivad olla toksilised (Ishida jt., 2006, Wang jt., 2013). Lisaks iseloomustab eelmainitud vektoreid ka kiire organismist eemaldamine (Wang jt., 2013). Viimasel ajal on tähelepanu kogunud ka uus võimalik mitteviraalne geeniteraapia vektor, kus nukleiinhappe transportimiseks oleks võimalik kasutada rakkude enda poolt toodetud vesiikule ja mida iseloomustab vähene toksilisus.

## 1.2 Rakkude poolt toodetud vesiikulid

Esmakordselt mainiti rakkude poolt toodetud vesiikuleid aastal 1967 Peter Wolfi poolt, kes eraldas ultratsentrifuugimise teel värskest plasmast fosfolipiidide rikka materjali. Esmalt nimetas Wolf selle materjali trombotsüütide tolmuks. Algselt arvati, et antud „tolmu“ puhul on tegemist rakust tuleneva prügiga. Hiljem näidati, et tegemist on membraansete nano-suuruses osakestega, vesiikulitega, mis sisaldavad funktsionaalseid molekule ja on võimelised esile kutsuma retsipientrakkudes muutusi (Raz jt., 1978, Trams jt., 1981).



**Joonis 1.** Ülevaade rakkude poolt toodetud ekstratsellulaarsetest vesiikulitest. Joonisel on välja toodud 3 peamist gruppi EV-sid: eksosoomid, apoptootilised kehad ja mikrovesiikulid. MVB – multivesikulaarne keha. (Tõlgitud György jt., 2011)

Rakkude poolt vabastatud vesiikuleid saab jaotada kolme gruppi: eksosoomideks, mikrovesiikuliteks ja apoptootilisteks kehakesteks. Ülevaade eelmainitud gruppidest on kujutatud joonisel 1. Antud kolme grupi erinevus põhineb vesiikulite moodustumise mehhanismi poolest. Eksosoomide puhul on tegemist 40-150 nm diameetriga vesiikulitega, mis moodustuvad plasmamebraani sissepungumisel multivesikulaarsesse kehasse (*multivesicular body*, MVB) ja

vabanevad keskkonda MVB ühinemisel plasmamembraaniga (El Andaloussi jt., 2013). Mikrovesiikulite diameeter jääb 150-1000 nm vahele ja tegemist on otse plasmamembraanilt punguvate vesiikulitega (El Andaloussi jt., 2013). Apoptootilised kehad moodustavad suuremaid, kuni 2000 nm suuruseid vesiikuleid raku apoptoosi minekul, kus plasmamembraan ümbritseb hukkuva raku sisu ja tsütoplasmat (El Andaloussi jt., 2013). Kuigi eelmainitud vesiikulite gruppide tootmiseks kasutatakse erinevaid biogeneesi radu, võivad need siiski üksteisele sarnaneda nii suuruse ja molekulaarse koostise poolest (Lee jt., 2019). Rakkude poolt vabastatud vesiikulite puhul on tegemist väga heterogeensete ja koostise poolt dünaamiliste osakestega. Kindlate vesiikulite rühma puhastamise puhul ei saa kindlalt välistada, et soovitud vesiikulite hulka ei satu ka muu rühma esindajaid. Näiteks vesiikuleid suuruse järgi eraldades võib eksosoomide fraktsiooniga kaasa tulla ka väiksemad mikrovesiikuleid ja apoptootilisi kehakesi.

Antud vesiikulid on sarnased molekulaarsel tasemel ning erinevast grupist pärit vesiikulite suurused on ülekattuvad. Lisaks eelmainitule ei leidu erinevate populatsioonide spetsiifilisi valgulisi markereid. Just sarnasus erinevate gruppide vahel teeb vesiikulite puhastamise ja tuvastamise raskeks. Seetõttu eelistatakse kasutada eraldatud vesiikulite kohta üldisemat terminit nimega ekstratsellulaarsed vesiikulid (*extracellular vesicles*, EV). Termin EV-d ei erista vesiikuleid nende biogeneesi põhjal, vaid käsitleb üldiselt rakkude poolt toodetud sekretoorseid vesiikuleid (Gould ja Raposo, 2013). Ekstratsellulaarsete vesiikulite alla kuuluvad eksosoomid, apoptootilised kehakesed ja mikrovesiikulid (Joonis 1).

### **1.3 Ekstratsellulaarsed vesiikulid**

Ekstratsellulaarsete vesiikulite puhul on tegemist nano-suuruses membraansete vesiikulitega. Antud vesiikuleid vabastatakse raku pinnalt evolutsiooniliselt konserveerunud mehhanismi alusel, nii prokarüootilistelt kui ka eukarüootilistelt rakkudelt ja taimedelt (Yáñez-Mó jt., 2015). Seega valdavalt kõiki rakke iseloomustab võime toota EV-sid. Nende suurus jääb 100-200 kuni 1000 nm vahele ja need koosnevad transmembraanseid valke sisaldavast lipiidsest kaksikkihist. EV-dele on omased membraaniseoselised valgud tetraspaniinid, näiteks CD9, CD63 ja CD81, mille olemasolu saab kasutada kinnitamaks EV-de leidumist uuritavas proovis (Koliha jt., 2016). Sealhulgas on oluline arvestada, et EV-de olemasolu kinnitavad markerid võivad erineda eri rakuliinidest saadud vesiikulite populatsioonide vahel (Koliha jt., 2016). Kaksikkihiline membraan võimaldab enkapsuleerida erinevaid materjale ja transportida näiteks valke, lipiide, suhkruid ja

nukleiinhappeid rakkude vahel (Bobrie jt., 2012, Yáñez-Mó jt., 2015). Ekstratsellulaarsete vesiikulite roll ei ole veel täpselt määratletud, kuid on teada nende olulisus rakkudevahelise kommunikatsiooni vahendamisel. Transportides erinevaid molekule vesiikulite membraanis või nende sees saavad doonorrakud mõjutada retsipientrakke.

Ekstratsellulaarsete vesiikulite puhul on näidatud nende osalemist nii füsioloogilistes kui patoloogilistes protsessides. Füsioloogilistest protsessidest on iseloomustatud EV-de osalemist näiteks tüvirakkude säilitamisel (Ratajczak jt., 2006), vere hüübimisel (Del Conde jt., 2004) ja koe reparatiivsetes protsessides (Gatti jt., 2011, Barile jt., 2014). Patoloogiliste protsesside puhul on näidatud EV-de osalemist näiteks vähkkasvajate progresseerumisel (Camussi jt., 2011) ning neurodegeneratiivsete haiguste puhul nagu Alzheimeri (Bellingham jt., 2012) ja Parkinsoni tõbi (Emmanouilidou jt. 2010). Sealhulgas on iseloomustatud ka EV-de rolli põletikuliste haiguse puhul, nagu astma (Cañas jt., 2019).

Kuna EV-d osalevad organismis erinevates bioloogilistes protsessides, esineb huvi neid kasutada terapeutilistel eesmärkidel. EV-sid soovitatakse kasutada viimaks lastmolekule huvipakkuvasse organismisse. Antud vesiikulite eeliseks on nende loomumane võime viia retsipientrakkudesse funktsionaalseid nukleiinhappeid (Valadi jt., 2007). See võimaldab vesiikuleid kasutada näiteks geeniteraapia vektorina. Varasemalt on näidatud, et modifitseeritud ja laetud ekstratsellulaarsed vesiikulid on võimelised hiire mudelis viima rinnavähi rakkudesse miRNA-d (Ohno jt., 2012). Samas ei ole teatud tingimustel EV-de modifitseerimine ja laadimine vajalik. Näiteks inimese kardiaalsetest eelrakkudest eraldatud EV-d on võimelised hiire mudelis vähendama infarkticolde suurust (Maring jt., 2019). Lisaks eelmainitule iseloomustab EV-sid minimaalne toksilisus ja immunogeensus, mis teeb neist ideaalsed võimalikud geeniteraapia vektorid (Zhu jt., 2017).

### **1.3.1 EV-de biodistributsioon**

Ekstratsellulaarseid vesiikuleid esineb erinevates kehavedelikes nagu näiteks inimese vereplasmas (Caby jt., 2005), uriinis (Pistikun jt., 2004), süljes (Palanisamy jt., 2010), ninasekreedis (Lässer jt., 2011), seemnevedelikus (Poliakov jt., 2008) ja rinnapiimas (Admyre jt., 2007). Enamus rakutüüpe on võimelised tootma EV-sid, sealhulgas rakukultuuri tingimustes. Kasutades märgistatud vesiikuleid on võimalik jälgida nende levikut üle organismi.

Erinevatest rakuliinidest pärit EV-de biodistributsioon võib olla erinev (Charoenviriyakul jt., 2017, Wiklander jt., 2015). Kõige rohkem kogunevad lipofiilse DiR värviga märgistatud EV-d intravenoossel (i.v.) manustamisel hiire maksa, põrna, seedetrakti ja kopsu (Wiklander jt., 2015). Eelmainitud kogunemismuster on nanopartiklite manustamisele iseloomulik. Osakesed kogunevad suure verevarustusega ja ekskretsioonifunktsiooniga organitesse, kus aja jooksul need väljutatakse organismist. Sarnast biodistributsiooni mustrit hiires omavad ka Renilla lutsiferaasiga (RLuc) märgistatud EV-d, kus vesiikulid kogunevad peamiselt kopsu, maksa, neeru ja põrna (Gangadaran jt., 2017).

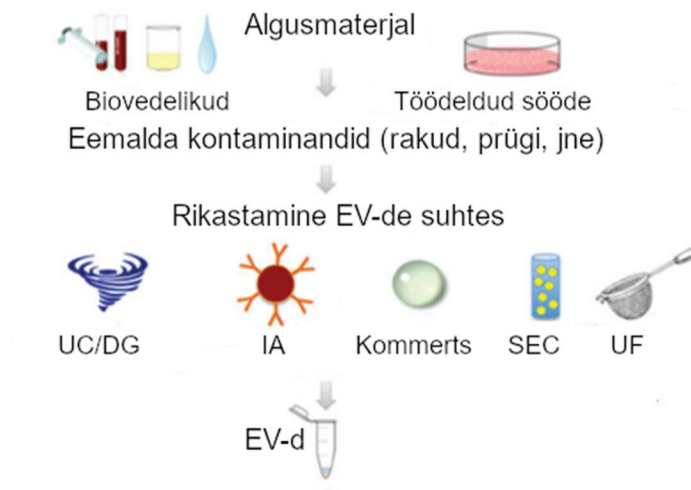
### **1.3.2 EV-de eraldamine**

Ekstratsellulaarseid vesiikuleid saab eraldada biovedelikest ja rakukultuuri puhul söötmest, mida kutsutakse töödeldud söötmeks. Tegemist on söötmega, kuhu eelnevalt transfekteeritud rakud, antud töös defineeritud kui doonorrakud, eraldavad ekstratsellulaarseid vesiikuleid. Doonorrakkudelt kogutud töödeldud söödet kasutatakse antud töös kas edasi rakkude transfekteerimiseks või EV-de eraldamiseks. Töödeldud söötmega transfekteeritud rakud on antud töös nimetatud retsipientrakkudeks. Käesoleva töö puhul keskendutakse EV-de isoleerimisele töödeldud rakusötmest, kuid erinevaid EV-de eraldamise viisid sobivad kasutamiseks nii biovedelike kui ka töödeldud rakusöötme jaoks.

Tavaliselt kasvatatakse EV-de eraldamiseks rakke eelnevalt mitu päeva, misjärel kogutakse sööde ja eraldatakse rakkude poolt toodetud EV-d. Üldjoontes on tegemist kas töödeldud või modifitseeritud rakkudega, mis toodavad mõnda huvipakkuvat biomolekuli. Samas EV-sid saab eraldada kõikide rakuliinide söötmest, olenemata asjaolust, kas doonorrakud on töödeldud või mitte. EV-de eraldamiseks saab kasutada erinevaid meetodeid, mis põhinevad näiteks osakese suuruse või pinnavalkude põhjal eraldamisel, kuid ka osakese üleslükkejõul vedelikus ja vesiikulite väljasadestamisel. Ülevaade osadest EV-de eraldamise viisidest on toodud joonisel 2.

Kõige levinum meetod EV-de eraldamiseks põhineb töödeldud rakusöötme ultratsentrifuugimisel (Gardiner jt., 2016). See hõlmab endast kas ühekordset tsentrifuugimist näiteks 100 000g juures (Momen-Heravi jt., 2012) või astmelist tsentrifuugimist kõrgetel pööretel. Viimane algab kõigepealt madalamatel pööretel, tavaliselt 300g, et vabaneda töödeldud söötmes olevatest rakkudest ja nende jääkidest. Seejärel supernatanti tsentrifuugitakse astmeliselt järjest kõrgematel pööretel, näiteks 10 000g, ja viimase sammuna kasutades tavaliselt 100 000g kuni 200 000g,

olenevalt konkreetsest protokollist (Greening jt., 2015, Konoshenko jt., 2018). Lisaks eelnevale on ekstratsellulaarseid vesiikuleid võimalik eraldada töödeldud söötmest kasutades tihedusgradient-tsentrifugimist. See põhineb söötme tsentrifugimisel, näiteks sukroosi tihedusgradiendis, kus ekstratsellulaarsed vesiikuleid saab eraldada kindla tihedusega fraktsioonist peale tsentrifugimist (Raposo jt., 1996).



**Joonis 2.** Ülevaade ekstratsellulaarsete vesiikulite eraldamisest biovedelikest ja töödeldud raku söötmest. UC – ultracentrifugimine, DG – tihedusgradient, IA – immunoafiinsus, Kommerts – kommertsiaalsed komplektid, SEC – suuseralduskromatograafia, UF – ultrafiltreerimine. (Modifitseeritud Ramirez jt., 2018)

Ekstratsellulaarsete vesiikulite isoleerimiseks on võimalik kasutada ka suuruse järgi filtreerimist. Suuseralduskromatograafia EV-de eraldamiseks põhineb vesiikulite läbimist järjest väheneva diameetriga pooridega kolonnidest. See võimaldab omandada kindla suurusega vesiikulite fraktsiooni. Seejuures on võimalik kasutada EV-de eraldamiseks ka ultrafiltreerimist, minimaalse poorisuurusega tavaliselt 0,8-1,0  $\mu\text{m}$  ning kombineerida ultrafiltreerimist suuseralduskromatograafiaga (Benedikter jt., 2017). Ühe eraldamisemeetodina kasutatakse EV-de saamiseks ka immunoafiinsust, kus mikrokerakestele on seotud antikehad, mis seovad kindlaid EV-de pinnavalke (Greening jt., 2015, Théry jt., 2006). Lisaks eelnevatele meetoditele on võimalik kasutada ka ekstratsellulaarsete vesiikulite lahusest välja sadestamist, kasutades vett siduvaid polümeere. Näiteks saab EV-sid lahusest välja sadestada kasutades polüetüleenglükooli (Ludwig

jt., 2018). Seejuures on võimalik ka kasutada kommertsiaalseid reagente ja komplekte EV-de eraldamiseks, mis põhinevad erinevatele isoleerimise meetoditele.

EV-de isoleerimiseks ei pea kasutama ainult ühte kindlat meetodit. Levinud on EV-de eraldamisel kombineeritud isolatsiooniprotokollide kasutamine, näiteks omavahel saab kombineerida EV-de väljasadestamist kasutades polümeeri, ning seejärel ultratsentrifuugimist. Tihtipeale lisatakse astmelisele ultratsentrifuugimisele ka filtreerimise samm.

### **1.3.3 EV-de eraldamise puudused**

Ekstratsellulaarsete vesiikulite eraldamise meetodikaid vajavad veel edasiarendust. Eesmärgiks on luua odavamaid ja kergemini kasutatavaid standardiseeritud meetodeid, mis oleks võimalised eraldama EV-sid võimalikult suuremahulisest algallikast. Praegused meetodid on tihtipeale ebaefektiivse saagise ja halva korratavusega ning neid antud meetodeid on raske viia edasi suurde mahtu, mis oleks vajalik rakendamaks EV-sid meditsiinilistel eesmärkidel.

Ultratsentrifuugimise puhul on piiravaks asjaolekuks EV-de eraldamisel see, et korraga saab töödelda vaid väikest kogust söödet. Vaja läheb ka kallist aparatuuri ning lisaks võivad tugevad tsentrifugaaljõud põhjustada vesiikulite agregatsiooni (Linares jt., 2015) ning esineb ka mittevsesikulaarsete valkude kontaminatsioon (Webber ja Clayton, 2013). Immuunafiinsusele põhinev meetodika on kallid ja sobilik vaid väikestele alglahustele ning EV-d ei pruugi säilitada oma funktsionaalsust peale elueerimist (Théry jt., 2006). Kasutades polümeeripõhist sadestamist on võimalus lisaks EV-dele sadestada välja ka kontaminante (Lobb et al., 2015).

### **1.3.4 EV-de laadimine lastmolekuliga ja nende kasutamine**

Kuna ekstratsellulaarsed vesiikulid osalevad organismis erinevates bioloogilistes protsessides, soovitakse neid kasutada terapeutilistel eesmärkidel. Kuigi natiivseid EV-sid saab kasutada terapeutilistel eesmärkidel (Gatti jt., 2011, Barile jt., 2014), soovitakse EV-sid modifitseerida ja laadida terapeutiliste lastmolekulidega. See võimaldaks EV-sid kasutada transportvektorina.

EV-de laadimiseks on kasutatud erinevaid meetodeid, kuid esineb kaks põhistrateegiat, kus EV-sid laetakse, kas endogeenset või eksogeenset teed pidid. Endogeense laadimise puhul viiakse huvipakkuv lastmolekul doonorrakku, näiteks transfekterides miRNA-d (Ohno jt., 2013), misjärel doonorrakud toodavad lastmolekuli sisaldavaid EV-sid. Eksogeense laadimise puhul viiakse

huvipakkuv lastmolekul juba raku poolt toodetud ja eraldatud EV-sse, näiteks EV ja lastmolekuli koos inkubatsioonil. Koos inkubatsioonil on võimalised EV-desse sisenema väikesed lipofiilsed molekuli ja madalmolekulaarsed ained, näiteks kurkumiin (Sun jt., 2010). Siiski on EV-de inkubatsioon koos lastmolekuliga väheefektiivne meetod EV-de laadimiseks. Eksogeenset laadimist saab teostada ka näiteks elektroporeerimise kaudu. EV-de laadimine siRNA-ga läbi elektroporatsiooni on võimalik (Alvarez-Erviti jt., 2011), kuid ebaefektiivne siRNA ulatusliku agregatsiooni tõttu (Kooijmans jt., 2013). Kasutades EV-de laadimiseks lastmolekulina paklitakseeli ja erinevaid eksogeenseid meetodeid, oli kõige efektiivsem meetod EV-de laadimiseks sonikeerimine, millele järgnes elektroporeerimine ja kõige ebaefektiivsemaks viisiks oli koinkubatsioon (Kim jt., 2016).

Laetud ekstratsellulaarsete vesiikulite puhul on iseloomustatud ka nende võimalikku terapeutilist efekti. Näiteks onkogeense KRAS geeni vastase shRNA laetud EV-d olid hiiremudelis võimalised vähendama pankrease adenokartsinoomi arengut (Kamekar jt., 2017). Paklitakseeliga laetud EV-d omasid antiproliferatiivset efekti imetaja rakukultuuris pankrease vähirakkudel (Pasucci jt., 204). Lisaks eelnevale olid doksorubitsiiniga laetud EV-d sebrakala mudelis võimalised läbima hematoentsefaalbarjääri ja vähendama vähirakkude arvu (Yang jt., 2015).

#### **1.4 Rakku sisenevad peptiidid**

Rakku sisenevate peptiidide (*Cell-penetrating peptide*, CPP) puhul on tegemist peptiididega, millel on võime transportida raku lastmolekule. Tavaliselt on antud peptiidide järjestused lühikesed, jäädes alla 30 aminohappe (Langel, 2019). CPP-sid iseloomustab ka laeng, enamasti on tegemist positiivse üldlaenguga peptiidide või amfipaatsete järjestustega.

Esimesed avastatud rakumembraani läbivatest valkudest tehti juba 30 aastat tagasi. 1988. aastal avastati, et HIV-1 Tat valk on võimeline läbima rakumembraani (Frankel ja Pabo, 1988, Green ja Loewenstein, 1988). Hiljem leiti ka *Drosophila* Antennapedia valgu 60 aminohappe pikkune järjestus, mis omas raku sisenevat võimet (Derossi jt., 1994).

Rakku sisenevad peptiide kasutatakse viimaks erinevaid lastmolekule raku, nagu näiteks nukleiinhappeid, terapeutilisi molekule ning valke. Antud töö raames keskenduti nukleiinhappe, täpsemini pDNA, transfektsioonile. CPP-d kondenseerivad nukleiinhappe kokku nanopartiklids ja antud kompleks on võimeline transfekteerima raku. Eelmainitud kompleksis pole peptiid

kovalentselt seotud lastmolekuliga vaid partikli kondenseerimise eest vastutavad peptiidi ja lastmolekuli vahelised hüdrofoobsed ning elektrostaatilised interaktsioonid. Antud kompleksi rakku sisenemise mehhanism põhineb endotsütoosil (Lundin et al., 2008, Veiman et al., 2013). Peale rakumembraani läbimist, võib endosoomist vabanenud terve või lagunenud kompleks väljuda rakust läbi ekstratsellulaarse vesiikuli.

Kõige levinum CPP-de sünteesimisviis on tahke-faasi peptiidisünteesi, mis on välja töötatud Bruce Merrifieldi poolt. Antud meetod põhineb tahkel kandjal vahelüli kaudu kovalentselt kinnitatud aminohappe pikendamist ühe aminohappe haaval suunaga, kus peptiid pikeneb C-terminusest N-terminuse suunas. Sünteesitavat peptiidi pikendamiseks kasutatakse aminohappeid, mille aminorühm on kaitstud kaitserühma, näiteks fluorenüülmetüülöksükarbonüüli (Fmoc) poolt.

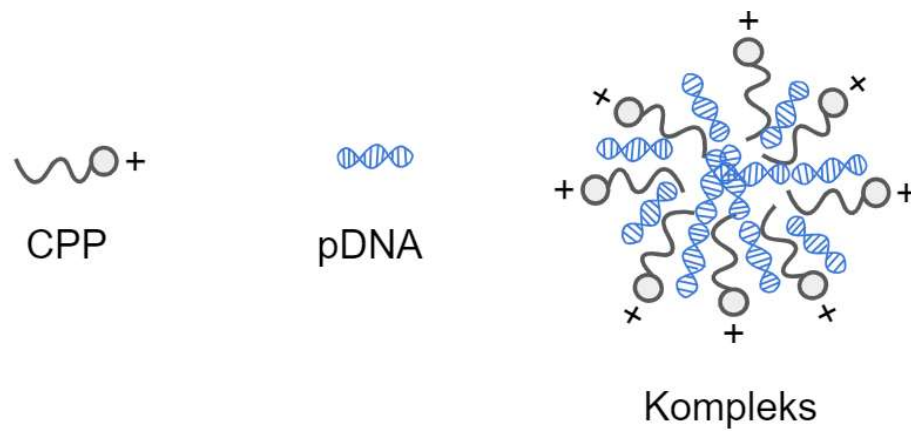
#### 1.4.1 PepFect 14

Antud töös on kasutatud rakku sisenevat peptiidi nimega PepFect 14 (PF14) (Ezzat jt., 2011). PF14 puhul on iseloomustatud selle võimet viia rakkudesse nukleiinhappeid, näiteks lühikesi oligonukleotiide (Ezzat jt., 2011), siRNA-d (Ezzat jt., 2012) ja pDNA-d (Veiman jt., 2013). PF14 aminohappeline järjestus ja üldlaeng on välja toodud tabelis 1.

**Tabel 1.** Rakku siseneva peptiidi PF14 järjestus ja peptiidi üldlaeng

CPP	Järjestus	Üldlaeng	Viide
PF14	stearoüül-AGYLLGKLLLOOLAAAALLOOLL-NH <sub>2</sub>	+5	Ezzat jt., 2011

PF14 on võimeline moodustama nanopartikleid kondenseerides nukleiinhapet. Antud peptiidi N-terminuses olev steariinhappe jääk moodustab hüdrofoobse keskme ning on võimeline moodustama mitselli, mille pealispind kujuneb suure positiivse laenguga. Antud kompleksi mudel on kujutatud joonisel 3. PF14 ja pDNA vahel moodustunud komplekside diameeter jääb 130 – 170 nm vahele ning neid iseloomustab positiivne (kuni +45 mV) zeta potentsiaal (Kurrikoff jt., 2017). Antud töös otsustati kasutada keemilise transfektsiooni vektorina CPP PF14 viimaks rakku nukleiinhapet, kuna tegu on varasemalt palju uuritud reagentiga, mille efektiivsus on teada.



**Joonis 3.** Ülevaatlük joonis CPP ja pDNA vahel kompleksi moodustumisest

Antud töö eesmärgiks oli leida meetod nukleiinhappe pakkimiseks ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse kasutades CPP PF14 põhinevat keemilist transfektsiooni. EV-de laadimise eesmärgiks oli selle kaudu leida uusi viise geeniteraapia läbiviimiseks, mis ei põhjustaks organismile toksilisust ja kasutaks ära EV-de loomuomast võimet viia rakkudesse erinevaid molekule.

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1 Töö eesmärgid

Antud töö on osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on töötada välja meetodika ekstratsellulaarsete vesiikulite laadimiseks kasutades rakku sisenevaid peptiide ning antud EV-sid rakendada terapeutiliste molekulide viimiseks sihtmärkorganisse. Käesoleva magistritöö raames on autori kitsamaks eesmärgiks kinnitada, et EV-sid on võimalik laadida lastmolekuliga, kasutades doonorrakkude keemilist transfektsiooni CPP vahendusel ning doonorrakkude poolt toodetud vesiikulid on transfektsioonivõimelised, nii rakukultuuris kui loomudelisel.

Antud magistritöö eesmärgid on täpsemalt välja toodud järgnevalt:

- Kinnitada ja iseloomustada reporter-molekuli sisaldavate EV-de kasutamist transfektsioonimeetodina rakukultuuris
- Alustada protokollide loomist suures koguses EV-de tootmiseks ja eraldamiseks
- Iseloomustada eraldatud EV-de biodistributsiooni hiireudelisel
- Kirjeldada antud töös välja töötatud protokollide alusel toodetud EV-sid

### 2.2 Materjalid ja meetodika

#### 2.2.1 Töös kasutatud rakuliinid ja nende kasvatamine

Antud töös kasutati hiina kääbushamstri munasarja rakke (*Chinese hamster ovary cells*, CHO) HEK293 Cre (*Human embryonic kidney cells*, inimese embrüonaalsed neerurakud) (AMSBIO) stabiilselt Cre-rekombinaasi ekspresseerivat rakuliini (edaspidi HEK-Cre). Cre-rekombinaas on bakteriofaagist P1 pärit tüüp I topoisomeraas. See on võimeline ära tundma spetsiifilist *loxP* järjestust ning viima antud järjestuste vahel läbi rekombinatsiooni, eemaldamaks nende vahel oleva DNA (Abremski ja Hoess, 1984)

Rakke kasvatati 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> atmosfääri juures inkubaatoris ning kõik imetaja rakukultuuri katsed viidi läbi samadel tingimustel. CHO rakkude kasvatamiseks kasutati DMEM söödet (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) (Thermo Fisher Scientific), kuhu oli lisatud 10% lõppkontsentratsiooniga veise loote seerumit (*Fetal bovine serum*, FBS) (Sigma-Aldrich), 0,1 mM lõppkontsentratsiooniga asendatavaid aminohappeid (Corning), 1mM lõppkontsentratsiooniga naatrium püruvaati (Corning) ning 100 U/ml lõppkontsentratsiooniga penitsilliini ja 100 mg/ml lõppkontsentratsiooniga streptomütsiini (Thermo Fisher Scientific). Antud söödet kasutati ka rakkude transfekteerimise ajal, kui pole mainitud teise söötme kasutamist. HEK-Cre rakkude kasvatamiseks oli lisatud eelmainitud söötmele 50 µg/ml lõppkontsentratsiooniga neomütsiini

(Sigma-Aldrich), säilitamiseks Cre-rekombinaasi tootvaid rakke pikaajalisel kasvatamisel. Rakke lahjendati iga 2-3 päeva tagant, vältimaks nende kasvamist üle 80% konfluentsuse.

### 2.2.2 Töös kasutatud plasmiidid

Antud töös kasutatud plasmiidid on välja toodud järgnevalt tabelis 2.

**Tabel 2.** Ülevaade antud töös kasutatud plasmiididest

Plasmidi nimi	Lühend töös	Tootja	Järjesus
pMC-BESPX-GLucFLuc2	pLuc	Töörühma siseselt disainitud	Lisa 1 – A
pCMV-EGFP-C1	pGFP	Clontech	Lisa 1 – B
pLV-CMV-LoxP-DsRed- LoxP-eGFP	plRedL-GFP	Addgene #65726 (Zomer jt., 2015)	Lisa 1 – C

Plasmiidid pLuc ja pGFP olid varasemalt paljundatud ja säilitati vesilahusena -20°C juures. Töö autor paljundas ise ja kontrollis restriksioonianalüüsiga plasmidi plRedL-GFP. Plasmidi plRedL-GFP paljundamiseks kasutati kompetentseid *Escherichia coli* tüve DH5α rakke. Plasmiidiga transformeeritud rakke kasvatati LB söötmes, kuhu oli lisatud 100 µg/ul lõppkontsentratsiooniga ampitsiliini ning plasmiidiga transformeeritud bakterirakke säilitati järgmiseks plasmidi juurde tootmiseks -80°C juures 50% glütseroolilahuses. Plasmidi puhastamiseks kasutati *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit* komplekti (Favorgen) järgides tootja protokollit. Plasmidi eraldamise järgselt kinnitati huvipakkuva plasmidi olemasolu kasutades restriksioonianalüüsi ja vaadeldi restrikteerimata ja restrikteeritud plasmidi agaros geelelektroforeesil. Plasmidi vesilahuste kontsentratsiooni kontrolliti kasutades *NanoDrop ND-1000* spektrofotomeetrit. Kõik plasmiidid säilitati vesilahusena -20°C juures.

### 2.2.3 Imetaja rakukultuuri transfektsioon

Imetajarakkude transfektsiooniks kasutati töörühmas arendatud keemilise transfektsiooni läbiviimiseks mõeldud raku sisenevat peptiidi. CPP PF14 iseloomustab võime moodustada läbi hüdrofoobsete ja elektrostaatiliste interaktsioonide nukleiinhappega nanoosakesi, mida edaspidi nimetatakse kompleksideks. Kompleksi puhul on tegemist mittekovalentse assotsiatsiooni CPP ja nukleiinhappe vahel vesilahuses, misjärel moodustuvad umbes 100-150 nm läbimõõduga

osakesed. Transfektsioonisegu defineeritakse läbi kahe põhiparameetri: transfekteeeritava pDNA doos ning transfektsioonireagendi ehk CPP kogus nukleiinhappe kohta. Viimast parameetrit väljendatakse suurusega teoreetiline laengusuhe (*Charge ratio*, CR), mis arvestab CPP positiivset ja nukleiinhappe, antud töös pDNA, negatiivset laengut ning näitab peptiidi laengu ülehulka nukleiinhappe laengu suhtes.

Käesolevas töös kasutatud peptiid PF14 sünteesiti väiksemas mahus töö autori poolt põhinedes tahke-faasi peptiidisünteesile ja kasutades automatiseeritud peptiidisüntesaatorit Initiator+ Alstra (Biotage). Osade eksperimentide läbiviimiseks telliti suurem kogus peptiidi PF14 firmast Pepscan. Peptiidisüntees toimus 0,125 mmol skaalas ning Fmoc kaitserühmaga aminohappeid (Iris Biotech) ja rasvhapet kasutati viiekordses ülehulgas. Tahkekandjana kasutati 0,278 g *Rink-Amide ChemMatrik* (Biotage) vaiku, funktsionaalrühmi 0,45 mmol/g kandja kohta. Sünteesile eelnevalt lasti vaigul punduda 20 minutit diklorometaanis (DCM) (Sigma-Aldrich), kasutatavad aminohapped lahustati N,N-dimetüülformaniidis (DMF) (Sigma-Aldrich). Liidetava aminohappe aktiveerimiseks kasutati viiekordses ülehulgas aktivaatoreid, täpsemalt 0,5 M Oxyma (Iris Biotech) lahust DMF-is, 0,5 M N,N-diisopropüülkarbodimiid (DIC) (Thermo Fisher Scientific) lahust DMF-is ja 2 M N,N-diisopropüületüülamiini (DIEA) (Thermo Fisher Scientific) lahust N-metüül-2-pürrolidoonis (NMP) (Scharlau). Fmoc kaitserühmade eemaldamiseks kasutati 20% piperidiini (Sigma-Aldrich) lahust DMF-is. Peale iga aminohappe lisamist kasutati 5M atseetanhüdriidi (Sigma-Aldrich) lahust DMF-is katmaks aktiveeritud aminorühmi. Sünteesitud peptiidile lisati käsitsi N-terminusse steariinhappejääk (Sigma-Aldrich), kasutades rasvhappe aktiveerimiseks viiekordses ülehulgas 0,5 M 1-hüdoksübensotriasooli (HOBt) (Sigma-Aldrich) lahust DMF-is, 0,5 M O-bensotriasool-N,N,N,N',N'-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaadi (HBTU) (Multisyntech) lahust DMF-is, ja DIEA-d. Rasvhappejäägi lisamiseks inkubeeriti tahkel kandjal olevat peptiidi aktiveeritud rasvhappe lahusega DCM-is üleöö. Valmis peptiidi vabastamiseks tahke kandja pealt, inkubeeriti peptiidi 95% trifluoroäädikhappe (TFA) (Thermo Fisher Scientific) ja 2,5% triisopropüülsilaani (TIS) (Sigma-Aldrich) seguga vees 3 h. Tahkekandja pealt eemaldatud peptiidile teostati kolm korda eetripesu, lahustati väikeses koguses vees ja lüofiliseeriti. Peptiidi puhastamiseks kasutati pöördfaas-vedelikkromatograafiat (Agilent Technologies). Puhastatud fraktsioonide õigsust kontrolliti kasutades maatriks-assisteeritud laserdesorptsioonionisatsioonlennuaja massispektromeetria (teostas teadur Piret Arukuusk).

Transfektsiooni jaoks moodustati kompleksid punktis 2.2.2 välja toodud plasmiidide ja CPP PF14 vahel. Rakukultuuri katsete komplekside moodustamise jaoks segati kokku varasemalt määratud

protokollil alusel, kasutades kahekordset plasmidi kogust (Veiman jt., 2013). Kõik rakukultuuri katsed teostati kasutades CR4. Plasmidi ja peptiidi segu vees inkubeeriti 1 h toatemperatuuril. Enne transfektsiooni teostati rakkudele täielik söötmevahetus. 96-kaevulisel plaadil transfekteeeriti rakke 10 µl kompleksi lahusega 90 µl söötme kohta, kus ühe kaevu kohta on pDNA sisaldus 0,2 µg. 24-kaevulisel plaadil transfekteeeriti rakke 50 µl kompleksi lahusega 450 µl söötme kohta, kus ühe kaevu kohta on pDNA sisaldus 1,0 µg. 8-kambrilisel plaadil transfekteeeriti rakke 25 µl kompleksi lahusega 225 µl söötme kohta, kus ühe kaevu kohta on pDNA sisaldus 0,5 µg. Loomkatsete jaoks materjali kogumiseks transfekteeeriti 175 cm<sup>2</sup> pudelis kasvavaid rakke 1 ml CR4 pLuc/PF14 kompleksiga 19 ml söötme kohta, pDNA sisaldus pudelis 0,2 mg. Loomakatse jaoks kasutati 100 µl CR2 kompleksi (Kurrikoff jt., 2017), mis segati 100 µl 10% glükoosi lahusega, kokku 200 µl. Ülevaade antud töös kasutatud komplekside valmistamisest on toodud tabelis 3.

**Tabel 3.** Retsept töös kasutatud pDNA ja CPP PF14 komplekside valmistamiseks

Formaat	Lastmolekuli kontsentratsioon kompleksis	CR	Kasutatud kompleksi ruumala
Rakukultuuri katsed			
96-kaevuline plaat	pLuc 0,02 µg/µl	4	10 µl kompleksi + 90 µl sööd
25-kaevuline plaat	pGFP 0,02 µg/µl	4	50 µl kompleksi + 450 µl sööd
8-kambriline plaat	pRedl-GFP 0,02 µg/µl	4	25 µl kompleksi + 225 µl sööd
Loomkatse jaoks materjali kogumine			
175 cm <sup>2</sup> pudel	pLuc 0,2 µg/µl	4	1 ml kompleksi + 19 ml sööd
Loomkatse			
Süstelahus	pLuc 0,44 µg/µl	2	100 µl kompleksi + 100 µl 10% glükoosi lahust

#### 2.2.4 Töödeldud söötme kogumine ja kasutamine imetaja rakukultuuris transfektsiooniks

Töödeldud söötme kogumiseks transfekteeeriti doonorrakke rakku siseneva peptiidi ja pDNA kompleksiga hüpoteesi alusel, et rakku sisenenud kompleks või lastmolekul võib pakkuda ekstratsellulaarse vesiikuli sisse, mis seejärel eraldatakse söötmesse. Töödeldud söötme puhul on tegemist raku söötmega, mis sisaldab doonorrakkude poolt toodetud EV-sid, sealhulgas osa

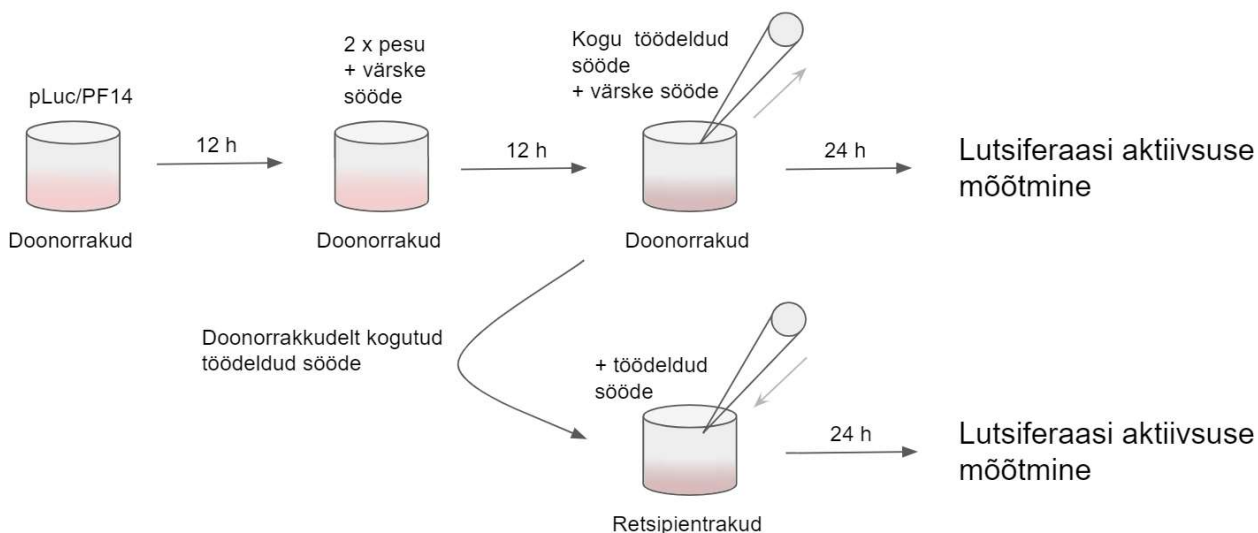
vesiikulitest peaks sisaldama ka doonorakkudega transfekteeritud komplekse või kompleksis olnud lastmolekuli. Kasutades töödeldud söödet võiks olla võimalik transfekteerida retsipientrakke.

#### **2.2.4.1 Töödeldud sööde pLuc transfekteeritud doonorakkudelt**

Näitamaks, et on võimalik transfekteerida imetajarakke kasutades doonorakkudelt pärit EV-desse pakendatud nukleiinhapet, kasutati pLuc/PF14 kompleksiga transfekteeritud doonorakkudelt kogutud töödeldud söödet. Retsipientrakke inkubeeriti kogutud töödeldud söötme ja ning transfektsiooni edukust hinnati, kasutades lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmist, nii doonor- kui retsipientrakudes. Antud katseplaani on ülevaatlilikult välja toodud joonisel 4.

Töödeldud söötme kogumise jaoks külvati doonorakkude transfektsioonile eelneval päeval 96-kaevulisele plaadile 10 000 CHO või HEK-Cre rakku 100 µl söötmes ühe kaevu kohta. Vahetult enne doonorakkude transfekteerimist teostati rakkudele täielik söötmevahetus, lisades rakkudele 90 µl värsket söödet. Doonorakkude transfektsiooniks kasutati lastmolekulina pLuc plasmidi. CHO ja HEK-Cre doonorakkudele lisati kas vett, pLuc vesilahust või pLuc/PF14 CR4 kompleksi, kus pLuc koguhulk plasmidi sisaldavates kaevudes oli 0,2 µg (tabel 3). Rakke inkubeeriti 100 µl eelmainitud lahustega 12 h, peale mida aspireeriti doonorakkudelt sööde ja pesti neid 2 korda 100 µl 1x fosfaatpuhverlahusega (*Phosphate-buffered saline*, PBS) (Thermo Fisher Scientific). Pesule järgnevalt lisati doonorakkudele igasse kaevu 100 µl värsket söödet ja inkubeeriti neid 12 h, mille käigus doonorrakud saavad söötmesse eraldada ekstratsellulaarseid vesiikule. Inkubatsioonile järgnevalt koguti igast kaevust 100 µl töödeldud söödet.

CHO ja HEK-Cre retsipientrakud külvati 24 h enne töödeldud söötme lisamist 96-kaevulisele plaadile, 10 000 rakku kaevu kohta. 100 µl töödeldud söödet tõsteti otse doonorakkudelt retsipientrakudele, vastavalt CHO doonorakkudelt CHO retsipientrakudele ja HEK-Cre doonorakkudelt HEK-Cre retsipientrakudele. Doonorakkudele lisati 100 µl värsket söödet ja nii doonor- kui retsipientrakke inkubeeriti 24 h tundi enne lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmist, et iseloomustada ja võrrelda doonor- ning retsipientrakude transfektsiooni edukust.



**Joonis 4.** Ülevaatic katseplaani doonorrakude transfektsioonist, töödeldud söötme kogumisest ja selle kasutamisest retsipientrakude transfektsiooniks

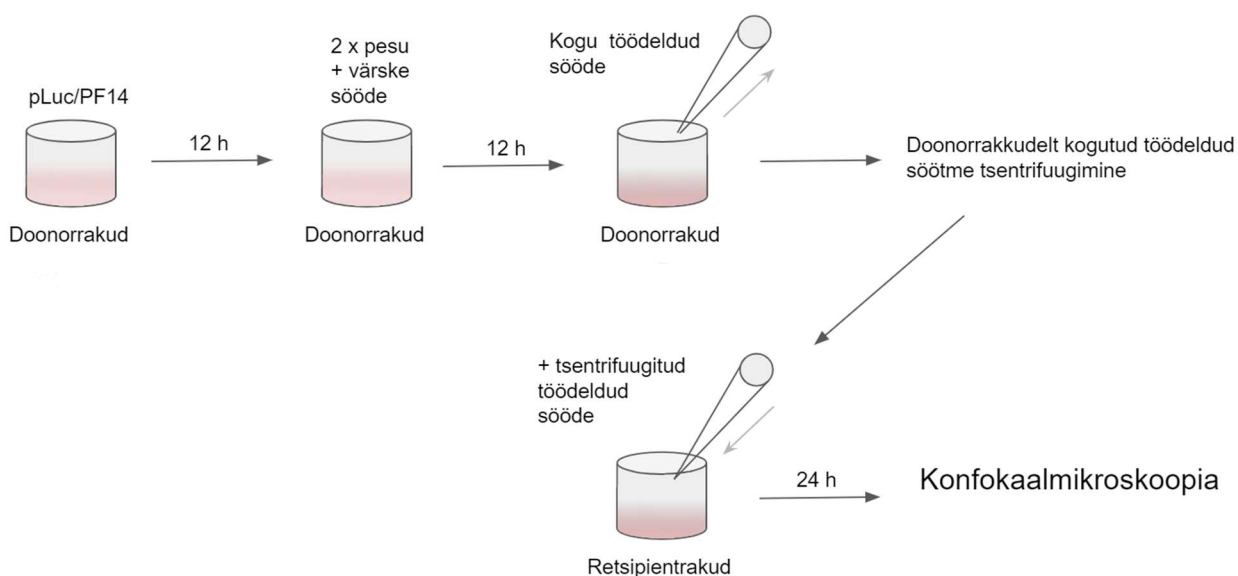
#### 2.2.4.2 Tsentrifugeeritud töödeldud sööde pGFP transfektsioonid doonorrakudelt

Demonstreerimaks, et doonorrakudelt kogutud töödeldud söötme kasutamisel retsipientrakude transfektsiooniks ei toimu doonorrakude ülekandumist koos söötmega, rakendati esimese strateegiana Cre-reporter plasmidi pRedL-GFP kasutamist. Antud plasmidi põhimõte seisneb selles, et ilma Cre-rekombinaasi juuresolekuta on rakkudes vaadeldav punane DsRed signaal ning Cre-rekombinaas juuresolekul on nähtav roheline GFP signaal. Eelmainitud plasmidi kontrollimiseks külvati 24 h tundi enne transfektsiooni 8-kambrilisele Nunc Lab-Tek (Thermo Fisher Scientific) plaadile 25 000 CHO ning HEK-Cre rakku 250 µl söötmes. Rakke transfektsiooni 24 h CR4 pRedL-GFP/PF14 kompleksiga (tabel 3), kus kambri kohta oli plasmidi sisaldus 0,5 µg. Kahjuks aga selgus, et CHO rakkudes oli nähtav roheline signaal (Lisa 2), kasutatud reporterplasmid „lekkis“ ja ei sobinud planeeritud katse jaoks.

Seetõttu mindi üle teisele strateegiale ning näitamaks, et töödeldud söötmega transfektsiooni käigus ei toimu doonorrakude ülekandumist, kasutati tsentrifugeeritud töödeldud söödet. Selle jaoks koguti töödeldud sööde pGFP/PF14 kompleksiga transfektsioonid doonorrakudelt, tsentrifugeeriti antud sööde ja inkubeeriti retsipientrakke tsentrifugeeritud töödeldud söötmega ning visualiseeriti tulemused kasutades konfokaalmikroskoopiat. Ülevaade antud katseplaani on kujutatud joonisel 5.

Töödeldud söötme kogumise jaoks külvati doonorrakkude transfektsioonile eelneval päeval 24-kaevulisele plaadile 50 000 CHO rakku 500 µl söötmes. Enne doonorrakkude transfekteerimist teostati rakkudele täielik söötmevahetus, lisades doonorrakkudele 450 µl värsket söödet. Doonorrakkude transfekteerimiseks kasutati lastmolekulina GFP-d kodeerivat plasmidi. CHO doonorrakkudele lisati kas vett, pGFP vesilahust või pGFP/PF14 CR4 kompleksi, kus pGFP koguhulk plasmidi sisaldavates kaevudes oli 1,0 µg (tabel 3). Rakke inkubeeriti 500 µl eelmainitud lahustega 12 h ning sellele järgnevalt aspireeriti doonorrakkudelt sööde ja pesti neid 2 korda 500 µl 1x PBS-iga. Peale pesu lisati doonorrakkudele 500 µl värsket söödet ja inkubeeriti neid 12 h, võimaldamaks doonorrakkudel eraldada söötmesse EV-sid. Inkubatsioonile järgnevalt koguti doonorrakkudelt 500 µl töödeldud söödet ja tsentrifugeeriti seda toatemperatuuril 30 min 2000g juures (Sigma 2-16PK, rootor 12148), eemaldamaks söötmes olevaid rakke ja rakujäätmeid ning jättes alles fraktsiooni, mis sisaldab EV-sid.

CHO retsipientrakud külvati 24 h enne töödeldud söötme ülekandmist 8-kambrilisele Nunc Lab-Tek (Thermo Fisher Scientific) konfokaalmikroskoopia plaadile, 25 000 rakku 250 µl söötmes kambri kohta. Järgneval päeval eemaldati retsipientrakkudelt sööde ja asendati 450 µl tsentrifugeeritud doonorrakkudelt pärit töödeldud söötmelega. Retcipientrakke inkubeeriti 24 h töödeldud söötmelega ja peale seda visualiseeriti tulemused kasutades konfokaalmikroskoopiat.



**Joonis 5.** Ülevaatlik katseplaan doonorrakkude transfekteerimisest, töödeldud söötme kogumisest ja tsentrifugeerimisest ning tsentrifugeeritud söötme kasutamisest retsipientrakkude transfekteerimiseks

## 2.2.5 Transfektsiooni edukuse hindamine imetaja rakukultuuris

Transfektsiooni edukuse hindamisviisina kasutati kahte meetodit: transfekteeeritud doonor- ja retsipientrakkude lüsaadist mõõdeti lutsiferaasi aktiivsust või vaadeldi tsentrifuugitud töödeldud söötmeaga transfekteeeritud retsipientrakkudes GFP signaali kasutades konfokaalmikroskoopiat.

### 2.2.5.1 Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine

Lutsiferaasi reportersüsteem põhineb lutsiferaasi ja selle substraadi lutsiferiini vahelises reaktsioonil, mille tulemusena eraldub luminesstsents. Antud meetodi eelis transfektsiooni hindamisel on selle lihtsus ja robustsus ning väga hea kvantiteeritavus. Antud töös kasutatud konkreetsem lutsiferaasi reaktsioonikeskkond on varsemalt optimeeritud Helmforsti ja kolleegide poolt (Helmfors jt., 2015). Lühidalt, peale rakkude transfektsiooni pLuc plasmiidiga punktis 2.2.4.1 välja toodud tingimustel, kasutades kompleksi või töödeldud söödet, pesti rakud 100 µl 1x PBS-iga. Seejärel lüüsi rakud, kasutades 25 µl 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) lahust 1x PBS-is. Lüüsimine on oluline vabastamaks raku sees sünteesitud lutsiferaasi, mis reaktsioonikeskkonnas on võimeline reageerima lisatava substraadi lutsiferiiniga. Rakke lüüsi loksutil, toatemperatuuril 30 minutit. 20 µl rakulüsaati tõsteti spetsiaalselt bioluminesstsentsi mõõtmiseks mõeldud 96-kaevulisse plaati. Peale rakkude lüüsimist ja vahetult enne luminesstsentsi mõõtmist segati kokku 10 ml lahust, mis sisaldas 25 mM ditiotreitooli (DTT) (Sigma-Aldrich), 1 mM D-lutsiferiini kaalium soola (Sigma-Aldrich), 1 mM ATP-d (Sigma-Aldrich), 25 µM koensüüm A-d (CoA) (Sigma-Aldrich), 1mM etüleendiamiintetraatsetaati (EDTA) (Sigma-Aldrich), 20 mM tritsiini (Sigma-Aldrich), 1 mM MgCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich), 5mM MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich). 20 µl rakulüsaadile lisatati 100 µl eelnevalt kokku segatud lutsiferaasi substraadi lahust, millele järgnevalt mõõdeti koheselt luminesstsentsi kasutades GloMax 96 mikroplaat luminomeetrit (Promega). Mõõtmised on teostatud 8 bioloogilise replikaadina igal plaadil, korrates eksperimenti 3 korda.

Lüüsimisest järelejäänud 5 µl rakulüsaati kasutati määramaks proovi valgusisaldust, normaliseerimaks luminestsentsi toorandmeid valgusisalduse suhtes. Rakulüsaadi valgusisalduse mõõtmiseks kasutati *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) komplekti järgides tootja protokollit. Tegemist on testiga, mis põhineb Lowry valguanalüüsil ja võimaldab kolorimeetriselt määrata valgu kontsentratsiooni uuritavas proovis. Rakulüsaatide valgusisaldust mõõdeti 562/0 nm juures, kasutades absorptsiooni mõõtmiseks spektrofotomeetrit Sunrise (TECAN).

### **2.2.5.2 Konfokaalmikroskoopa**

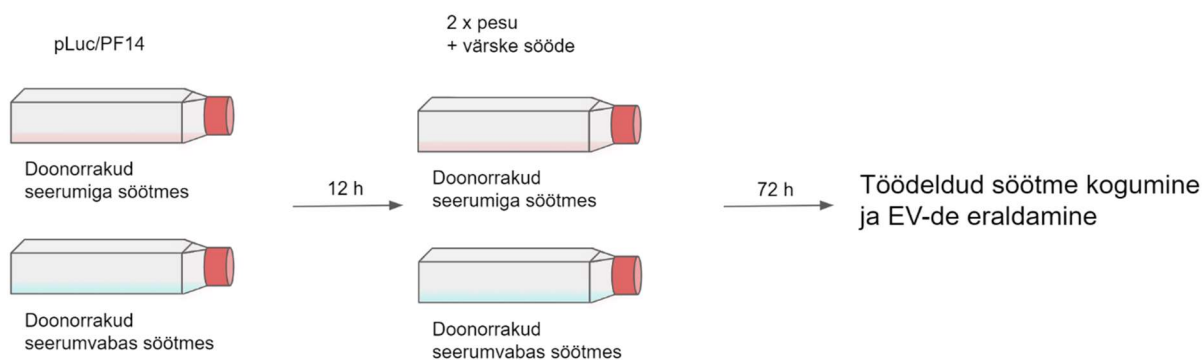
Teise transfektsiooni edukuse hindamisviisina kasutati konfokaalmikroskoopiat. Punktis 2.2.4.2 välja toodud tingimustel töödeldud doonorakkude transfektsiooni toimumise hindamiseks kasutati konfokaalmikroskoopi LSM710 (Zeiss). Vahetult enne rakkude visualiseerimist vahetati igas kambris sööde 200 µl värske söötme vastu. Rakutuumade värvimiseks lisati igasse kambrisse 50 µl 0,01 µg/ml Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) lahust 1x PBS-is, Hoechst-i lõppkontsentratsioon kambris oli 0,002 µg/ml. Sellele järgnevalt inkubeeriti rakke 30 min inkubaatoris. Hoechst-i signaali jälgimiseks kasutati 405 nm laserit, GFP signaali jälgimiseks kasutati 488 nm laserit ja DsRed signaali jälgimiseks kasutati 561 nm laserit. Hoechst 3342 ergastuskiirguse lainepikkus on 350 nm ja emissioonikiirguse lainepikkus on 461 nm. GFP ergastuskiirguse lainepikkus on 488 nm ja emissioonikiirguse lainepikkus on 509 nm. DsRed ergastuskiirguse lainepikkus on 558 nm ja emissioonikiirguse lainepikkus on 583 nm.

### **2.2.6 EV-de tootmine ja eraldamine suures skaalas**

EV-de biodistributsiooni uurimiseks hiire mudelis on vaja koguda suuremas mahus EV-sid. Selle jaoks järgiti sama põhimõtet nagu varem kirjeldatud punktis 2.2.4, kus doonorakkude transfektsioonile järgnevalt lastakse rakkudel eraldada söötmesse nukleiinhappega laetud EV-sid. Erinevalt eelmainitud protokollist viidi protseduur suuremasse mahtu. Lisaks eelnevale koguti töödeldud söödett kauem, 12 h asemel 72 h, ja saadud töödeldud söötmetest eraldati EV-d. Pikem inkubatsiooniaeg võimaldab doonorakkudel eraldada töödeldud söötmesse rohkem laetud vesikiule. EV-de tootmise katseplaani suures skaalas on ülevaatlilikult välja toodud joonisel 6. Doonorakkude transfektsioonile eelneval päeval külvati kahte 175 cm<sup>2</sup> pudelisse 2,5 miljonit CHO raku 20 ml söötmes. Vahetult enne transfektsiooni vahetati pudelites sööde. Transfektsiooniks ja töödeldud söötme kogumiseks kasutati kahte erinevat söödett, nii seerumiga kui seerumvaba. Kahte erinevat söödett kasutati, kuna EV-de eraldamise jaoks mõeldud kommertsiaalne toode eeldab vesikiulite eraldamist seerumvabast söötmetest. Kuna kõik eelnevad katsed olid tehtud seerumit sisaldava söötmega, eraldati EV-d nii seerumit sisaldavast kui seerumvabast söötmetest. Ühte pudelisse lisati 19 ml rakkude kasvatussöödett seerumiga (defineeritud punktis 2.2.1) ja teises pudelisse olevaid rakke pesti 2 korda 20 ml Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) seerumvaba söötmega ning lisati pudelisse 19 ml seerumvaba söödett. Erinevaid söötmeid kasutati võrdlemaks kahte erinevat meetodit EV-de eraldamiseks ning leidmaks antud protokollit kasutamise jaoks optimaalne sööde. Doonorakkude transfektsiooniks kasutati lastmolekulina lutsiferaasi kodeerivat

plasmidi pLuc. Seerumvaba ja seerumit sisaldava söötmega pudelile lisati punktis 2.2.3 vastavalt protokollile moodustatud CR4 pLuc/PF14 komplekse, kus pudeli kohta oli plasmidi koguhulk 0,2 mg. Peale 12 h kompleksiga 20 ml söötmes inkubatsiooni eemaldati pudelites olev sööde ja pesti rakke 2 korda 20 ml söötmega. Seejärel lisati pudelisse 20 ml värsket vastavalt seerumit sisaldavat või seerumvaba söödet. Doonorrakke inkubeeriti transfektsioonile järgnevalt 72 h. Inkubatsioonile järgnevalt koguti seerumit sisaldav ja seerumvaba töödeldud sööde eraldi.

Ekstratsellulaarsete vesiikulite eraldamiseks töödeldud söötimest kasutati *Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture media)* (Thermo Fisher Scientific) järgides tootja protokoll. Eelmainitud komplekt põhineb EV-de väljasadestamisel, kus kompleksis olev polümeer seob vee molekule ning seetõttu sadenevad välja vähem lahustuvad osakesed, nagu EV-d. Lahusest välja sadenenud EV-sid on seejärel võimalik söötimest eraldada kasutades tsentrifuugimist. EV-de eraldamiseks tsentrifuugiti kogutud töödeldud söödet 30 min 2000g 4°C juures (Sigma 2-16PK, rootor 12071), eemaldamaks söötmes olevaid rakke ja rakujäätmeid. Supernatant viidi edasi puhtasse tuubi ja sellele lisati pool kogusest EV-de eraldamiseks mõeldud reagenti ehk 20 ml-le töödeldud söötmele lisati 10 ml reagenti. Sööde segati reagentiga ja inkubeeriti üleöö 24 h. Järgneval päeval kanti töödeldud sööde üle ultratsentrifuugimiseks mõeldud polüpropüleen tuubi (Beckman Coulter) ja tsentrifuugiti 1 h 10 000g 4°C juures (Optima XE-90, rootor SW28) (Beckman Coulter). Pärast seda supernatant eemaldati ja sademes olevad ekstratsellulaarsed vesiikulid resuspendeeriti 250 µl 1x PBS-is. EV-sid säilitati PBS-i lahuses 4°C juures kuni nädal või -20°C juures pikaajaliselt.



**Joonis 6.** Ülevaatliskatseplaani doonorrakkude transfekteerimisest ja töödeldud söötme kogumisest

### 2.2.7 EV-de biodistributsiooni iseloomustamine hiire mudelis

Antud töös läbiviidud loomkatsed läbiviimiseks on saadud load Eesti loomkatse läbiviimise loakomisjonilt, luba 81 (väljastatud 04.04.2016) ja luba 110 (väljastatud 12.06.2017). Loomkatse protseduurid viis läbi autori juhendaja Kaido Kurrikoff, kes on nimetatud lubades märgitud loa taotleja ja loomkatse läbiviija. Töö autor viibis katse läbimise juures, valmistas ette kõik süstitavad lahused ning analüüsis iseseisvalt *postmortem* koed ja andmed. Katseloomadena kasutati 8-nädala vanuseid emaseid BALB/c hiiri ja biodistributsiooni määramiseks kasutati lutsiferaas-lutsiferiin reportersüsteemi. Hiirte viimiseks üldanesteesiasse kasutati isofluraani, 3% induksiooniks ja 1% anesteesia säilitamiseks.

Hiirtele manustati intravenooselt sabaveeni kaudu ühekordselt kas 200 µl seerumiga või seerumvabast söötmest eraldatud ekstratsellulaarseid vesiikule, 200 µl tabelis 2 välja toodud CR2 pLuc/PF14 kompleksi 5%-ilises glükoosilahuses või 200 µl puhast pDNA-d 1x PBS-is (pLuc kogus plasmidi sisaldavates süstelahustes 44 µg), 1 loom grupis (N=1). 24h möödudes manustati hiirtele intraperitoneaalselt (i.p.) lutsiferiini süstelahus (Perkin Elmer) 150 mg/kg. Umbes 10 minutit peale i.p. lutsiferiini manustamist kuvati elusloomad *IVIS Spectrum in vivo Imaging System* (Perkin Elmer) kuvamisseades ja teostati järjestikulased seeriamõõtmised. Selle eesmärgiks oli määrata lutsiferaasi aktiivsuse maksimumpunkt, mis on tavaliselt kuni 20 minutit pärast lutsiferiini manustamist. Seejärel teostati *postmortem ex vivo* kudede analüüs samas kuvamisseadmes.

Peale *postmortem* kudede visualiseerimist kuvamisseadmes, homogeniseeriti antud koed 1x Promega reporter lüüsi puhvris (Promega), kasutades Precellys 24 koe homogenisaatorit (Bertin Technologies), mille tööpõhimõte seisneb koeproovide füüsilises purustamises kasutades tsentrifugaaljõudu ja kudedele lisatud plastik-kuulikesi. Lühidalt, kudedele lisati 500 µl lüüsi puhvrit ja neid homogeniseeriti 2 korda 20 sekundit. Homogenisaate inkubeeriti loksuti peal 15 min, pärast mida viidi läbi 3 külmutamise-sulatamise tsüklit. Külmutamine toimus vedelas lämmastikus ja sulatamine 37°C vesivannis. Külmutamis-sulatamis tsüklid läbinud homogenisaate tsentrifuugiti 10 000g 4°C juures 3 min (Sigma 2-16PK, rootor 12148). Seejärel supernatant koguti eraldi ja algsele koe homogenaadile lisati 500 µl lüüsi puhvrit. Homogenisaate hoiti loksuti peal 15 min ja tsentrifuugiti 10 000g 4°C juures 3 min. Saadud supernatant lisati eelnevalt eraldatule ja antud segust mõõdeti nii lutsiferaasi aktiivsust kui määrati ka lüsaadi vagusisaldus.

Luminestsentsi mõõtmiseks pipeteeriti 20 µl supernatanti spetsiaalselt bioluminestsentsi mõõtmise jaoks mõeldud 96-kaevulisse plaati. Koe lüsaadile lisati 80 µl lutsiferaasi analüüsi substraati

(Promega) ja koheselt mõõdeti luminesentsi kasutades GloMax 96 mikroplaat luminomeetrit (Promega). Mõõtmised sooritati 3 tehnilise replikaadina. Koe homogenaadi valgusisalduse mõõtmiseks tehti supernatandist 20-kordne lahjendus 1x PBS-is, millest analüüsiti 5 µl proovi. Valgusisalduse mõõtmiseks kasutati *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) Lowry valguanalüüsile põhinevat komplekti, järgides tootja protokollit. Koe homogenaatide valgusisaldust mõõdeti kolorimeetriliselt 562/0 nm juures kasutades absorptsiooni mõõtmiseks spektrofotomeetrit Sunrise (TECAN).

### **2.2.8 Eraldatud EV-de ning kompleksi diameetri ja zeta potentsiaali määramine**

Punktis 2.2.6 eraldatud ekstratsellulaarsete vesiikulite suuruse ja laengu iseloomustamiseks kasutati dünaamilist valgushajuvust (*dynamic light scattering*, DLS). Tegemist on meetodikaga, mis võimaldab määrata suspensioonis olevate osakeste suuruse jaotumist. Lisaks suurusele, määrati ka osakeste zeta potentsiaal, mis iseloomustab nende nihketasapinna potentsiaali elektriväljas. Antud parameetreid ei mõõdeti DLS-i vahendusel otse ning saadud andmed on arvutuslikud hinnangud proovist kogutud andmete põhjal. Osakeste hüdrodünaamilise diameetri hindamiseks mõõdab DLS valguse intensiivsuse kõikumist ajas sellal, kui osakesed on Browni liikumises, ning zeta potentsiaali iseloomustab potentsiaalide erinevust osakese pinnal olevate ionide ja nihketasapinnal asuvate ionide vahel (Bhattacharjee, 2016).

Selleks, et määrata kompleksi või EV-de hüdrodünaamilist diameetrit ja zeta potentsiaali, tehti 50 µl seerumiga või seerumvabast söötmest eraldatud ekstratsellulaarseid vesiikulitest 40-kordne lahjendus vees ning 100 µl CR4 pLuc/PF14 (tabel 3 – loomkatse jaoks materjali kogumine) kompleksist tehti mõõtmiste jaoks 20-kordne lahjendus vees. Osakeste suuruse mõõtmiseks kasutati 1 ml kas EV-de või kompleksi lahjendust ning UV-läbipaistvaid ühekordseid küvette (Sarstedt). Zeta potentsiaali mõõtmiseks kasutati *Zetasizer Nano Series* ühekordseid küvette (Malvern). Mõõtmised sooritati kasutades *Zetasizer Nano ZS* (Malvern) footonkorrelatsioonspektroskoopiat.

### **2.2.9 Andmete analüüs**

Antud töös välja toodud tulemuste analüüsimiseks kasutati GraphPad Prism 5.03 andmetöötlusprogrammi. Konfokaalmikroskoopia piltide töötlemiseks kasutati ZEN 3.1 (blue edition) (Zeiss) tarkvara. Graafikul näidatud vearibad kujutavad standarhälvet.

## **2.3 Tulemused ja arutelu**

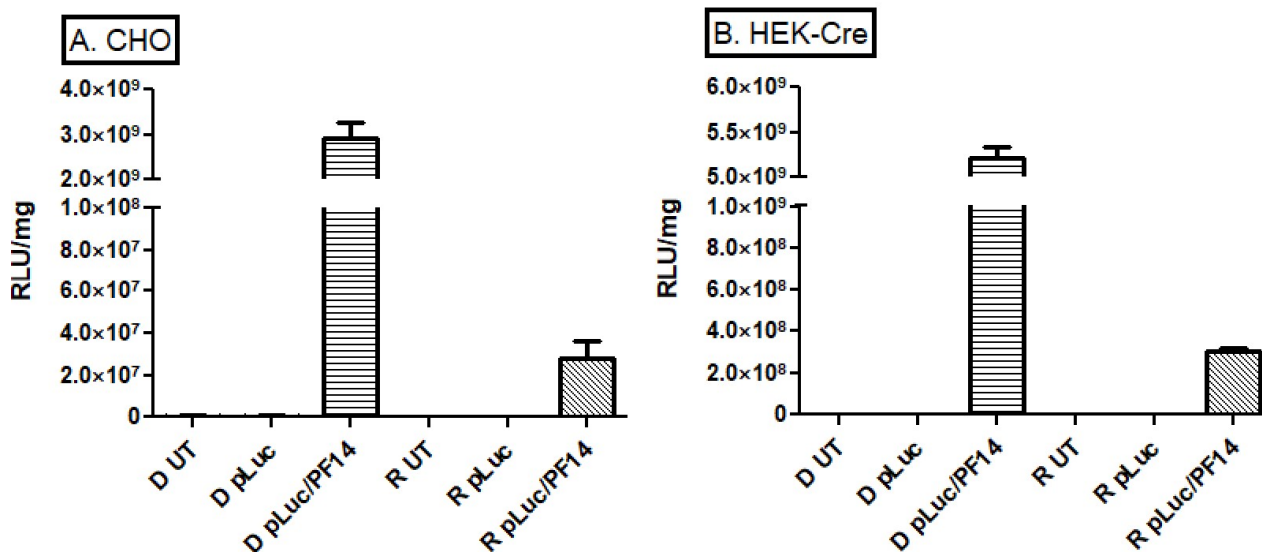
Antud töö eesmärgiks oli leida meetod nukleiinhappe pakkimiseks ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse ning selle kaudu leida uusi viise geeniteraapia läbiviimiseks. Järgnevalt on analüüsitud hüpoteesi, et kasutades keemilist transfektsiooni viimaks doonorrakkudesse nukleiinhappet sisaldavaid nanopartikleid, on võimalik kas antud nanopartikleid või lastmolekule viia doonorrakkude poolt toodetud EV-de koosseisu. Lisaks millele, saab doonorrakkude poolt toodetud EV-sid kasutada omakorda retsipientrakkude transfektsiooniks.

### **2.3.1 Transfekteeritud rakkudelt kogutud sööde on transfektsioonivõimeline**

Eelnevalt plasmidi ja rakku siseneva peptiidi kompleksiga transfekteeritud doonorrakkudelt kogutud töödeldud söödet kasutati retsipientrakkude transfekteerimiseks. Lihtsam ja kiirem viis plasmidi transfektsiooni hindamiseks on lutsiferaasi geeni sisaldava plasmidi kasutamine transfektsiooniks ning selle järgselt doonor- ja retsipientrakkude lüsaadi luminesentsi määramine. CHO ja HEK-Cre rakkude transfektsiooni tulemused on kujutatud joonisel 7 vastavalt punktides A ja B. Antud tulemused näitavad, et kasutades doonorrakkudelt kogutud töödeldud raku söödet on võimalik sellega transfekteerida retsipientrakke. Sealhulgas on oluline rõhutada, et peale doonorrakkude transfektsiooni kompleksiga toimus rakkude pesu ja söötmevahetus ning transfektsioonivõimeline sööde on pärit transfekteeritud doonorrakkudelt ning ei sisalda algse transfektsiooniseguga söödet.

Transfektsiooni tulemusel on näha nii doonor- kui retsipientrakkude edukat transfekteerimist. Doonorrakkude puhul on tegemist tavapärase tulemusega. Antud töö kontekstist vaadatuna on aga retsipientrakkude transfekteerimine olulise väärtusega ning toetab antud töös püstitatud hüpoteesi, et EV laadimiseks on võimalik kasutada pDNA ja CPP kompleksi.

CHO rakkude puhul on retsipientrakkude luminesentsi signaal 100 korda väiksem võrreldes doonorrakkudega. HEK-Cre rakuliini puhul on retsipientrakkudest tulenev luminesentsi signaal 17 korda väiksem võrreldes doonorrakkudega. Retsipientrakkude madalamat transfekteerumist põhjustab asjaolu, et nende transfekteerimiseks saadav materjal on doonorrakkudes juba lahjendatud. Lisaks eelmainitule on varasemates uuringutes näidatud, et eri rakuliinide vahel esineb ekstratsellulaarsete vesiikulite tootmise efektiivsuses erinevusi, mis võib seletada CHO ja HEK-Cre retsipientrakkude mitmekordset transfektsiooni erinevust. Seetõttu ei ole üllatav, et CHO ja HEK-Cre retsipientrakkude transfektsiooni edukus on mitmeid kordi erinev.



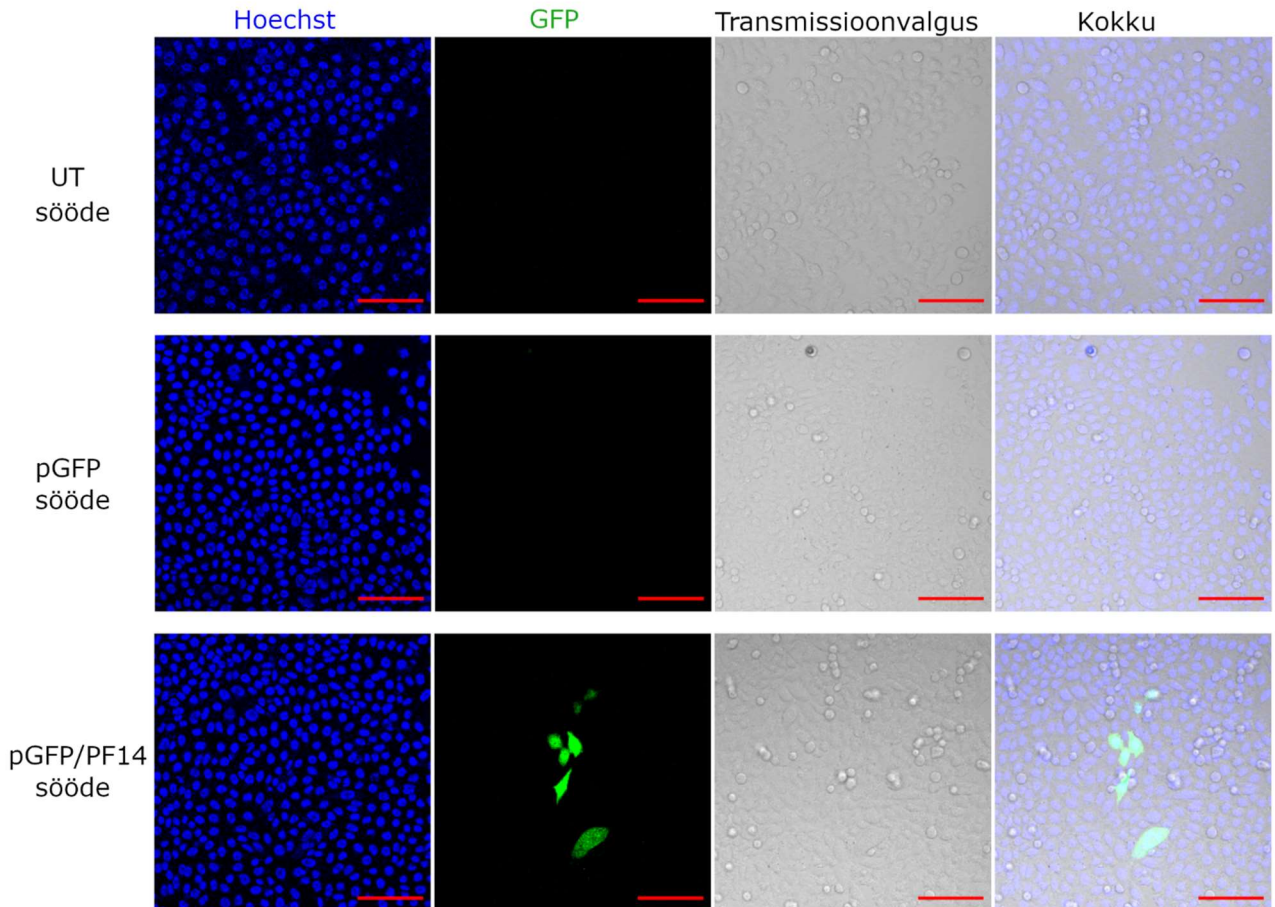
**Joonis 7.** Doonor- ja retsipientrakkude transfektsioonimäära võrdlemine. CHO (punkt A) ja HEK-Cre (punkt B) rakkudel kogutud töödeldud raku söödet on võimalik kasutada sama rakuliini retsipientrakkude transfektsioonimiseks. Doonorrakke töödeldi 12 h kas vee (UT), ainult plasmidi (pLuc) või plasmidi ja peptiidi kompleksiga (pLuc/PF14). Töödeldud söödet koguti 12 h ja kogutud töödeldud söötmelega inkubeeriti retsipientrakke 24 h. Andmed on esitatud 8 bioloogilise replikaadi 3 kordusena, veariba kujutab standardhälvet. UT – töötlemata rakud (*untreated*), D – doonorrakud, R – retsipientrakud

### 2.3.2 Transfektsioonivõimeline rakkudel kogutud söötme raku vaba fraktsioon on transfektsioonivõimeline

Kuna retsipientrakkudes oli võimalik lutsiferaasi signaali tuvastada, tasus töödeldud söötme kasutamist transfektsioonimeetodina edasi uurida. Tõestamiseks, et kasutades rakkude transfektsioonimiseks töödeldud söödet vastutavad lastmolekuli transpordi eest retsipientrakkudes söötmes leiduvad ekstratsellulaarsed vesiikulid, kasutati konfokaalmikroskoopia ning antud töö jaoks kohandatud reportersüsteemi. Antud meetodika eesmärgiks oli demonstreerida, et positiivne signaal ei saa tulla doonorrakkude ülekandmisest koos töödeldud söötmelega.

Näitamaks, et töödeldud söötme kasutamisel ei toimu doonorrakkude ülekandmist retsipientrakkudele tsentrifugeeritud eelnevalt CHO doonorrakkudel kogutud töödeldud söödet punktis 2.2.4.2 välja toodud tingimustel. Tulemused on kujutatud joonisel 8. Töötlemata ja ainult plasmiidiga inkubeeritud doonorrakkudel kogutud ja tsentrifugeeritud sööde ei ole võimeline transfektsioneerima retsipientrakke. Seevastu algselt pGFP/PF14 kompleksiga transfektsioneeritud doonorrakkudel kogutud ja tsentrifugeeritud töödeldud sööde on võimeline viima

retsipientrakkudesse lastmolekuli ja on näha doonorrakkudes positiivset GFP signaali. Seega saab järeldada, et töödeldud söötme kasutamisel retsipientrakkude transfektsiooniks ei toimu doonorrakkude ülekandumist söötmega ning transfektsiooni eest vastutavad töödeldud söötmes olevad mitterakulised osakesed. Kinnitamaks, et töödeldud söötmes vahendavad transfektsiooni seal leiduvad lastmolekuli või kompleksiga laetud EV-de, on vaja eraldada söötmes leiduvad EV-d ja näidata, et töödeldud söötmest eraldatud EV-d on transfektsioonivõimelised.



**Joonis 8.** Retsipientrakkude transfektsioon on põhjustatud doonorrakkudest pärit mitterakulise komponendi poolt. CHO retsipientrakkude transfektsioon kasutades doonorrakkudest kogutud ja eelnevalt tsentrifuugitud töödeldud söödet. Doonorrakke transfektsiooni 12 h kas vee (UT), ainult plasmidi (pLuc) või plasmidi ja peptiidi kompleksiga (pLuc/PF14), töödeldud söödet koguti 12 h ja retsipientrakke inkubeeriti töödeldud söötmega 24 h. Rakutuomad on värvitud Hoechst-iga, roheline signaal kujutab GFP-d. Mõõtjoon tähistab 100  $\mu\text{m}$ .

### **2.3.3 Transfekteritud rakkudel kogutud söötimest eraldatud EV-d on transfektsioonivõimelised hiire mudelis**

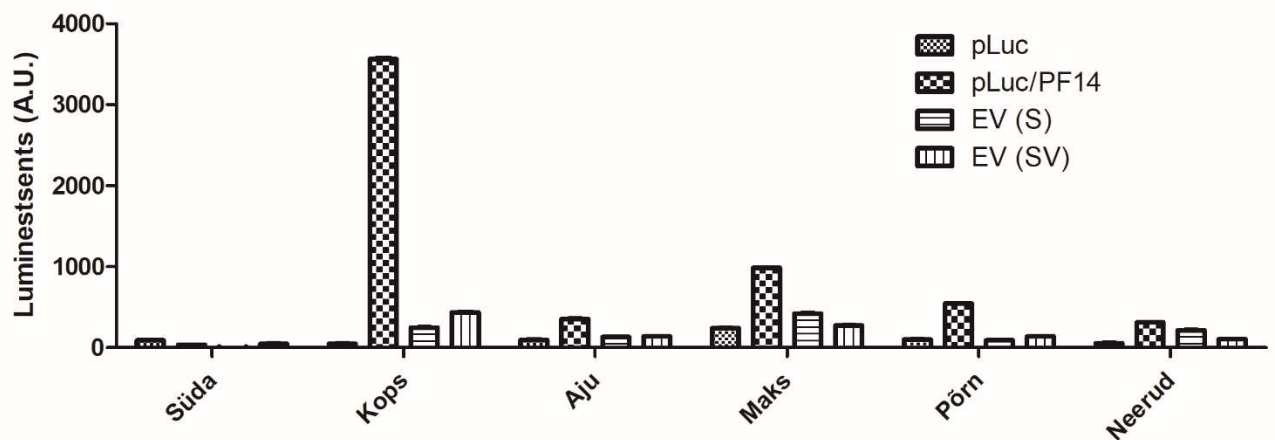
Olles eelnevalt välistanud doonorrakkude ülekandumise retsipientrakkude transfektsiooni põhjusena, uuriti edasi, kas doonorrakkude töödeldud söötimest eraldatud EV-d vahendavad transfektsiooni loomudelis. EV eelis nukleiinhappe kandja ja transfekterijana on antud osakeste biosobivus, mis teoreetiliselt võimaldaks organismi tasemel vähendada ohtlikke kõrvaltoimeid. Transfektsiooni käigus organismile toksilisuse vähendamine on olnud üks uurimissuundi CPP-de kasutamisel keemilise transfektsiooni vahendajana, mistõttu esineb huvi kasutada EV-sid transfektsioonivektoritena. Seega järgnevalt eraldati töödeldud raku söötimest EV-d ja testiti, kas eraldatud ja laetud EV-d võiks omada ravimkandjana aktiivsust imetajaorganismi tasemel.

Kuna rakukultuuri katse (joonis 7) põhjal oli näha, et kasutades retsipientrakkude transfektsiooniks doonorrakkudel kogutud söödet, oli transfektsiooni edukus mitmeid kordi madalam võrreldes doonorrakkude enda transfektsiooniga, ning seega otsustati modifitseerida protokoll, et eraldada töödeldud söötmes suurem kogus EV-sid. Katsete jaoks piisava koguses EV-de eraldamise jaoks kasvatati suures skaalas doonorrakke ning töödeldud söödet koguti pikema aja jooksul, võrreldes sooritatud katsetega imetaja rakukultuuris.

Uurimaks eraldatud ekstratsellulaarsete vesiikulite biodistributsiooni hiire mudelis, transfekteriti suures skaalas doonorrakud ja töödeldud söötimest eraldati ekstratsellulaarsed vesiikulid punktis 2.2.7 välja toodud protokollil alusel. Selleks kasutati tööruhmas varasemalt kasutatud ja teada lutsiferaasi reportersüsteemi, mis võimaldab suhteliselt kiiresti ja väga tundlikult määrata uuritavates kudedes toodetud lutsiferaasi koguseid (Kurrikoff jt., 2017). Ekstratsellulaarsed vesiikulid eraldati kas seerumit sisaldavast söötimest, edaspidi EV (S), või seerum vabast söötimest, edaspidi EV (SV), kontrollina kasutati puhast plasmidi või pDNA ja CPP kompleksi vastavalt punktis 2.2.8 välja toodud protokollile. Eelmainitud kompleksid süstiti i.v. ja mõõdeti hiiremudelis pDNA transfektsiooni ja biodistributsiooni. Antud lähenemise eesmärk on kvalitatiivselt kindlaks määrata, kas eraldatud EV omab bioloogilist aktiivsust. On oluline esile tuua, et mõõdetud lutsiferaasi aktiivsuse väärtused EV ja kompleksi grupi vahel ei ole kvantitatiivselt võrreldavad, sest EV grupis olev plasmidi doos ei ole sama, mis pLuc/PF14 grupis.

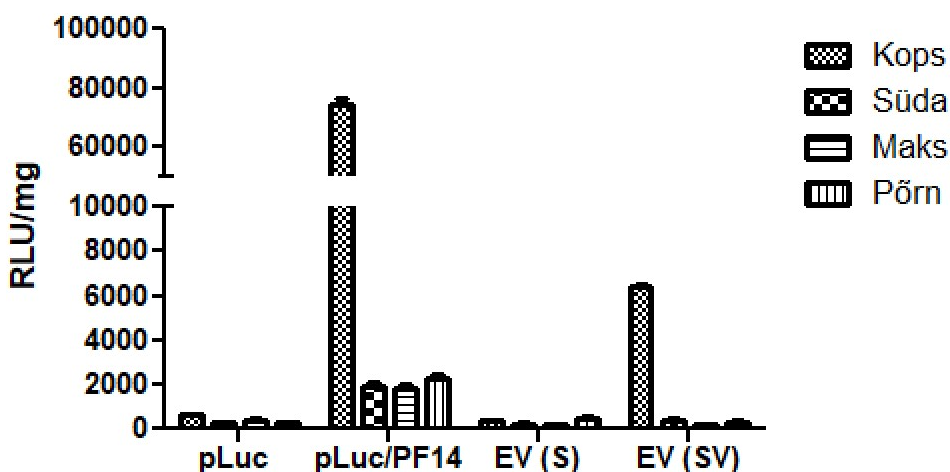
Joonisel 9 kujutatud organite lutsiferaasi aktiivsused 24 h pärast EV või kompleksi manustamist ning on näha, et EV-d on transfektsioonivõimelised hiire organismis, kuna mitmetes kudedes esineb mõõdetav lutsiferaasi aktiivsus. EV-sid iseloomustab kogunemine eelkõige kopsu ja maksa,

vähemal määral ka põrna, neerudesse ja aju. Antud kogunemismuster ühildub ka punktis 1.3.1 välja toodud andmetega. Kompleksid kogunevad eelkõige kopsu, maksa, põrna, neerudesse ja aju.



**Joonis 9.** Transfekteeritud doonorrakkude söötimest eraldatud EV-d omavad transfekteerimisvõimet imetaja organismis. Luminesentsi mõõtmine tervetest *ex vivo* organitest 24 h tundi peale puhta plasmidi (pLuc), plasmidi ja peptiidi CR2 kompleksi (pLuc/PF14) või EV-de manustamist i.v. EV (S) – ekstratsellulaarsed vesiikulid eraldatud seerumit sisaldavast töödeldud söötimest, EV (SV) - ekstratsellulaarsed vesiikulid eraldatud seerum vabast töödeldud söötimest

Lisaks *post mortem* kudede kujutamisele mõõdeti lutsiferaasi aktiivsus organi lüsaatidest, mis iseloomustab pDNA transfekteerumist konkreetse koe rakkudesse. Organi lüsaatidest mõõdetud lutsiferaasi aktiivsus on kujutatud joonisel 10. Kompleksi puhul on kõige suurem transfektsioon toimunud kopsus, kuid kompleks on võimeline lastmolekuli viima ka südamesse, maksa ja põrna, kus esineb luminesentsi signaal. Seerumiga söötimest eraldatud EV-de puhul ei ole organilüsaatides kõrgemat luminesentsi signaali võrreldes negatiivse kontrolliga. Seevastu seerumvabast söötimest eraldatud EV-de puhul esineb tugev positiivne signaal kopsus kuid mitte südames, maksas ja põrnas.



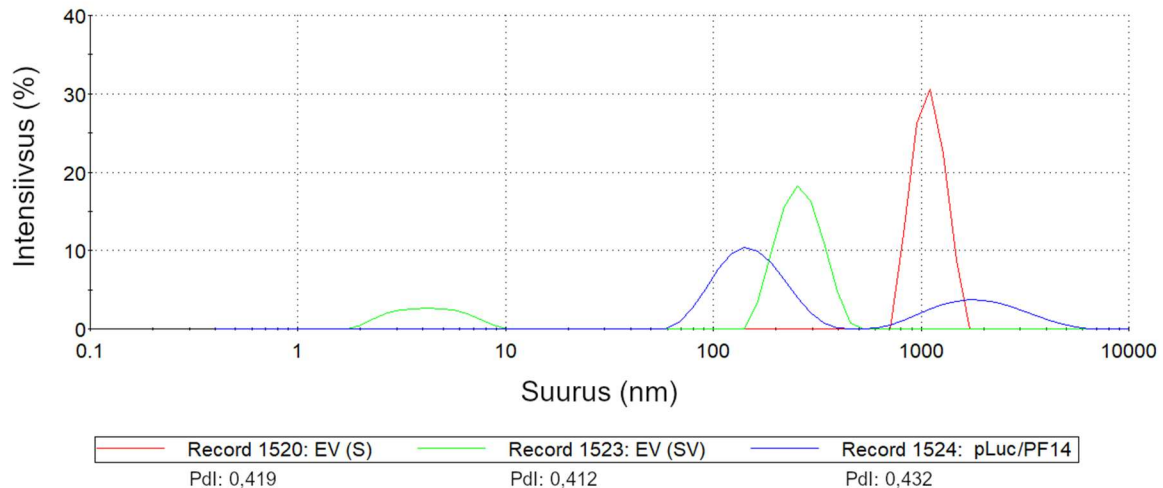
**Joonis 10.** Transfekteeritud doonorrakude söötimest eraldatud EV-d omavad transfekteerimisvõimet imetaja organismis. Luminestsentsi mõõtmise organi lüsaatidest 24 h tundi peale puhta plasmidi (pLuc), plasmidi ja peptiidi CR2 kompleksi (pLuc/PF14) või EV-de manustamist. EV (S) – ekstratsellulaarsed vesiikulid eraldatud seerumit sisaldavast töödeldud söötimest, EV (SV) - ekstratsellulaarsed vesiikulid eraldatud seerum vabast töödeldud söötimest. Andmed on esitatud kolmes tehnilises korduses, veariba kujutab standardhälvet.

### 2.3.4 Töödeldud rakusöötimest eraldatud EV-de iseloomustamine

Eelnevalt iseloomustati töödeldud söötmes olevate EV-de võimet transfekterida doonorrakke ning näidati, et töödeldud söötimest eraldatud EV-d omavad transfektsioonivõimet hiiremudelis. Nii imetaja rakukultuuris kuid ka EV-de eraldamise kaudu näidati, et transfektsiooni eest ei vastuta mitte rakulised komponendid vaid doonorrakude poolt söötmesse eraldatud komponent. Kinnitamaks, et eelmainitud komponent võiks olla vesikulaarset päritolu, iseloomustati söötimest eraldatud EV-sid kasutades dünaamilist valgushajuvust, mis on autori töögrupis varasemalt kasutusel olnud meetod nanoosakeste iseloomustamiseks.

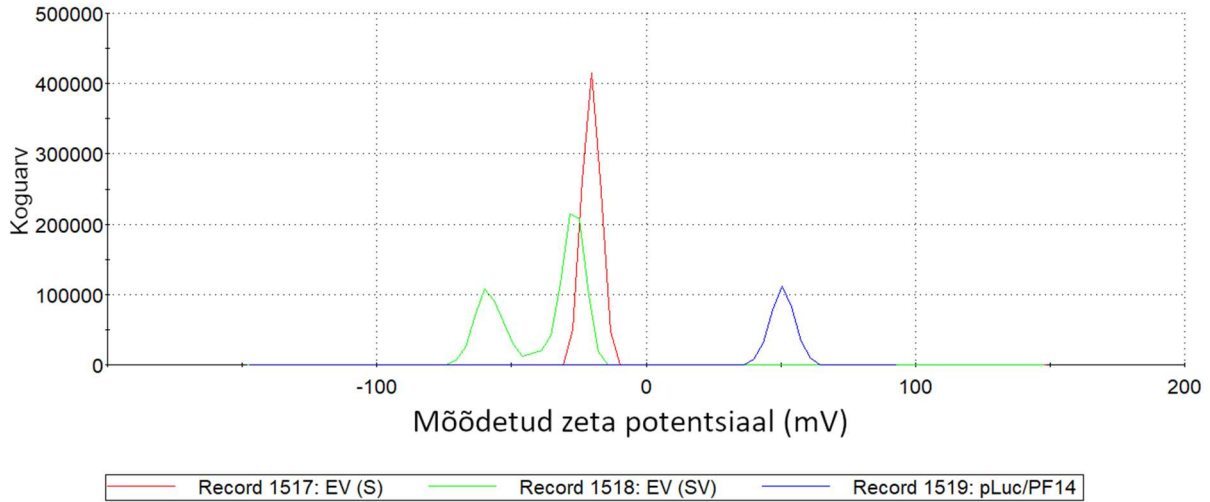
Suures skaalas toodetud EV-de ja kompleksi iseloomustamiseks kasutati DLS analüüsi, mis võimaldab määrata vesiikulite suurust ja zeta potentsiaali. Osakeste hüdrodünaamiline suurusjaotuvus on välja toodud joonisel 11. Plasmidi ja CPP kompleksi keskmine suurus jääb 160 nm juurde, esineb ka agregeerumist 2000 nm ümber. On teada, et PF14 ja nukleiinhappe komplekside keskmine diameeter jääb alla 200 nm. Kuna tegemist on *in vivo* kompleksiga, on esinev agregeerumine normaalne ning seda on varasemalt iseloomustatud (Freimann jt., 2017). Seerumit sisaldavast söötimest eraldatud EV-de ehk EV (S) keskmine suurus on 1100 nm. EV (S) suur keskmine suurus võib peegeldada seerumikomponentide või valkude interaktsiooni EV-dega.

Seerumvabast söötimest eraldatud EV-de ehk EV (SV) keskmine suurus on 280 nm. Kõige sarnasem kompleksiga on EV (SV) suurus, kuid EV (SV) puhul on tegemist umbes 80 nm suuremate osakestega võrreldes kompleksiga.



**Joonis 11.** Eraldatud ekstratsellulaarsete vesiikulite ja doonorakkude transfekteerimiseks kasutatud komplekside suurusjaotuvus. pLuc/PF14 – plasmidi ja raku siseneva peptiidi kompleks, EV (S) – ekstratsellulaarsed vesiikulid eraldatud seerumit sisaldavast töödeldud söötimest, EV (SV) – ekstratsellulaarsed vesiikulid eraldatud seerum vabast töödeldud söötimest. PDI – *polydispersity index*

Zeta potentsiaal peegeldab osakesesse nihketasapinna potentsiaali elektriväljas ning kompleksi ja ekstratsellulaarsete vesiikulite zeta potentsiaal on välja toodud joonisel 12. Plasmidi ja peptiidi kompleksi keskmine zeta potentsiaal on +50 mV. Seevastu on eraldatud EV-de mõõdetud zeta-potentsiaalid negatiivsed. EV (S) keskmine zeta potentsiaal on -20 mV ning EV (SV) puhul esineb kaks fraktsiooni, kahe kolmandiku mõõdetud zeta potentsiaal on -30 mV ning ülejäänud osakeste puhul -60 mV.



**Joonis 12.** Eraldatud ekstratsellulaarsete vesiikulite ja doonorakkude transfekteeerimiseks kasutatud komplekside zeta potentsiaali jaotumine. pLuc/PF14 – plasmidi ja rakku siseneva peptiidi kompleks, EV (S) – ekstratsellulaarsed vesiikulid eraldatud seerumit sisaldavast töödeldud söötmest, EV (SV) - ekstratsellulaarsed vesiikulid eraldatud seerum vabast töödeldud söötmest

Määratud DLS andmed on esialgne ülevaade sellest, kuidas võiksid välja näha käesoleva magistr töö käigus pDNA/ CPP kompleksiga laetud EV-d. Kindlasti tuleb antud EV-de morfoloogiat täpsemalt edasi uurida, näiteks kasutades nanopartiklite jälgimise analüüsi ja elektronmikroskoopiat. EV-de kasutamine *in vivo* on praeguste andmete põhjal samuti vaid esialgne teadmine, kuid nende kasutamise koha pealt võib olla optimistlik. Antud töös iseloomustati EV-de bioaktiivsust ja on põhjust vesiikuleid edasi arendada ja näiteks lisada neile sihtmärkorganisse suunavaid modifikatsioone. Lisaks sellele, näitas DLS EV-de negatiivset zeta potentsiaali. Tegemist on potentsiaalselt asjaoluga, mis suurendab vesiikulite bioohutust, kuna negatiivse üldlaenguga osakesed ei oma nii suurt immunoaktiveerivat toimet nagu positiivse üldlaenguga osakesed.

Antud töö käigus iseloomustati doonorakkudelt kogutud töödeldud söötme transfektsioonivõimet imetaja rakukultuuris ning välistati rakkude ülekandumise retsipientide transfektsiooni põhjusena. Lisaks sellele alustati protokolliga välja töötamist ekstratsellulaarsete vesiikulite eraldamiseks rakusöötmetest suures skaalas ning eraldati EV-d kahest erinevast söötmest. Töö käigus näidati, et seerumvabast töödeldud söötmest eraldatud EV-de omavad võimet transfekteeerida rakke hiiremudelil. Kusjuures, eraldatud EV-d erinesid kompleksist nii diameetri kui ka zeta potentsiaali

poolest. Eelmainitud asjaolud annavad alust arvata, et töödeldud söötimest eraldatud osakesed erinevad algselt doonorrakkude transfektsiooniks kasutatud kompleksist ning tegemist lastmolekuli kandvate ekstratsellulaarsete vesiikulitega.

Vesiikulite laadimine reporter-molekuliga ja eraldamine söötimest on vaid üks osa iseloomustamast uudet EV-de laadimise meetodit kasutades nukleiinhappe ja CPP kompleksi. Antud projekti edasiseks eesmärgiks on näidata kompleksi vahendusel laetud EV-de võimet viia imetaja organismi terapeutilist lastmolekuli, kus EV-d on suunatud kindlale sihtmärgile ja sisaldavad relevantset lasti. Selle jaoks on veel optimiseerida EV-de tootmise protokollid, et suurendada ja hinnata EV-de saagikust ning võimalusel ka modifitseerida EV-sid. Plaanis on eraldatud EV-de karakteriseerimine, andmaks informatsiooni kompleksi vahendusel laetud osakeste biogeneesile ning kas EV-d sisaldavad kogu kompleksi või ainult lastmolekuli mingil kujul. Lisaks eelmainitule, on veel pooleliolev meetodi arendus eesmärgiga hinnata pDNA kogust EV-des, kuid see jäi väljaspoole antud magistritöös püstitatud eesmärkide.

## **Kokkuvõte**

Antud töö eesmärgiks oli leida uudne meetod nukleiinhappe pakkimiseks ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse. Selle jaoks sooviti kinnitada ja iseloomustada reporter-molekuli sisaldavate EV-de kasutamist transfektsiooni meetodina, nii imetaja rakukultuuris kui ka loomudelisel ning kirjeldada käesolevas töös välja töötatud protokollil alusel toodetud EV-sid.

EV-de laadimise jaoks kasutati keemilist transfektsiooni, mis põhines CPP PF14 ja pDNA vahelise kompleksi transfekteerumisel rakku. Peale transfektsiooni toimub kas kompleksi või lastmolekuli pakkumine EV-sse. Transfekteeritud doonor-rakkude töödeldud söödet oli võimalik kasutada retsipient-rakkude transfektsiooniks, kusjuures transfektsiooni eest vastutas söötmes olev mitterakuline komponent ehk ei toimunud doonor-rakkude ülekandumist. Sealhulgas oli võimalik eraldada töödeldud söötimest ekstratsellulaarseid vesiikulid. Seerumvabast töödeldud söötimest eraldatud EV-d olid bioaktiivsed ning võimelised transfekteerima rakke reporter-molekuliga hiireudelisel. Eraldatud EV-d erinesid doonor-rakkude transfektsiooni jaoks kasutatud kompleksidest, nii hüdrodünaamilise diameetri kui ka zeta-potentsiaali poolest.

Käesoleva töö käigus kogutud andmete põhjal on alust arvata, et transfekteeritud doonor-rakkudel kogutud töödeldud söötmes olevate transfektsiooni eest vastutavate osakeste puhul on tegemist ekstratsellulaarsete vesiikulitega. Lisaks sellele on võimalik EV-sid edukalt laadida pDNA-ga, kasutades doonor-rakkude transfektsiooniks CPP ja pDNA vahel moodustunud kompleksi.

## **Extracellular vesicles loaded via peptide are capable of transfection *in vitro* and *in vivo***

Anett Puskar

### Summary

In order to achieve efficient and safe gene therapy, there is a need for new gene delivery vehicles. One such vehicle could possibly be extracellular vesicles, which are innately capable of delivering functional cargo to recipient cells and elicit downstream effects. In order to harness EVs as gene delivery vectors, it is necessary to load them with cargo of interest.

The main aim of this master's thesis was to develop a novel method of loading EVs using chemical transfection. In order to load nucleic acid into EVs, donor cells were transfected with nanoparticles that were produced by condensing pDNA using CPP PF14. The transfected donor cells were capable of producing bioactive EVs that were loaded with either the nanoparticles or cargo molecule. It was possible to transfect recipient CHO and HEK-Cre cells using the conditioned media collected from donor cells transfected with pLuc/PF14 complex. It was also verified that the transfection was carried out by non cellular particles in the conditioned media. EVs were isolated from the conditioned media of donor CHO cells, which were transfected with pLuc/PF14 complex. The aforementioned isolated EVs were capable of transfecting cells in a mouse model, mostly collecting in the lungs. The isolated EVs also had different physicochemical properties when compared to the nanocomplexes that were used for donor cell transfection, such as a larger hydrodynamic diameter and negative zeta-potential.

All in all, it was possible to load EVs by donor cell transfection using a nucleic acid and CPP complex. Such EVs presented to be bioactive both *in vitro* and *in vivo* making this a novel method of loading EVs.

## **Kasutatud kirjandus**

- Abremski, K., & Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J. Biol. Chem.* 259: 1509–1514.
- Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., ... Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *J. Immunol.* 17: 1969–1978.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., & Wood, M. J. A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* 29: 341–345.
- Barile, L., Lionetti, V., Cervio, E., Matteucci, M., Gherghiceanu, M., Popescu, L. M., ... Vassalli, G. (2014). Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 103: 530–541.
- Bellingham, S. A., Guo, B. B., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2012). Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front. Physiol.* 3: 124.
- Benedikter, B. J., Bouwman, F. G., Vajen, T., Heinzmann, A. C. A., Grauls, G., Mariman, E. C., ... Stassen, F. R. M. (2017). Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies. *Sci. Rep.* 7: 15297.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control Release.* 235: 337–351.
- Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G., & Théry, C. (2012). Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles.* 1: 1.
- Caby, M.-P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., & Bonnerot, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* 17: 879–887.
- Camussi, G., Deregibus, M.-C., Bruno, S., Grange, C., Fonsato, V., & Tetta, C. (2010). Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am. J. Cancer Res.* 1: 98–110.
- Cañas, J. A., Sastre, B., Rodrigo-Muñoz, J. M., & del Pozo, V. (2019). Exosomes: A new approach to asthma pathology. *Clin. Chim. Acta.* 495: 139–147.

- Charoenviriyakul, C., Takahashi, Y., Morishita, M., Matsumoto, A., Nishikawa, M., & Takakura, Y. (2017). Cell type-specific and common characteristics of exosomes derived from mouse cell lines: Yield, physicochemical properties, and pharmacokinetics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Eur. J. Pharm. Sci.* 96: 316–322.
- Daniel, R., & Smith, J. A. (2008). Integration Site Selection by Retroviral Vectors: Molecular Mechanism and Clinical Consequences. *Hum. Gene Ther.* 19: 557–568.
- Davis, C. N., Phillips, H., Tomes, J. J., Swain, M. T., Wilkinson, T. J., Brophy, P. M., & Morphew, R. M. (2019). The importance of extracellular vesicle purification for downstream analysis: A comparison of differential centrifugation and size exclusion chromatography for helminth pathogens. *PLOS. Neglect. Trop. D.* 13: e0007191.
- Del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P., & López, J. A. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 106: 1604–1611.
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., & Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 10444–10450.
- EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. A. (2013). Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Disc.* 12: 347–357.
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., ... Vekrellis, K. (2010). Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J. Neurosci.* 30: 6838–6851.
- Ezzat, K., Andaloussi, S. E. L., Zaghoul, E. M., Lehto, T., Lindberg, S., Moreno, P. M. D., ... Langel, Ü. (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res.* 39: 5284–5298.
- Ezzat, K., Zaghoul, E. M., El Andaloussi, S., Lehto, T., El-Sayed, R., Magdy, T., ... Langel, U. (2012). Solid formulation of cell-penetrating peptide nanocomplexes with siRNA and their stability in simulated gastric conditions. *J. Control. Release.* 162: 1–8.
- Frankel, A. D., & Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* 55: 1189–1193.
- Freimann, K., Arukuusk, P., Kurrikoff, K., Pärnaste, L., Raid, R., Piirsoo, A., ... Langel, Ü. (2018). Formulation of Stable and Homogeneous Cell-Penetrating Peptide NF55 Nanoparticles for Efficient Gene Delivery In Vivo. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 10: 28–35.

- Gangadaran, P., Li, X. J., Lee, H. W., Oh, J. M., Kalimuthu, S., Rajendran, R. L., ... Ahn, B.-C. (2017). A new bioluminescent reporter system to study the biodistribution of systematically injected tumor-derived bioluminescent extracellular vesicles in mice. *Oncotarget*. 8: 109894–109914.
- Gardiner, C., Vizio, D. D., Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *J. Extracell. Vesicles*. 5: 32945.
- Gatti, S., Bruno, S., Deregibus, M. C., Sordi, A., Cantaluppi, V., Tetta, C., & Camussi, G. (2011). Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol. Dial. Transplant*. 26: 1474–1483.
- Giacca, M. 2010. Introduction to Gene Therapy, p. 1-63. In: *Gene Therapy*. Springer, Milano
- Gould, S. J., & Raposo, G. (2013). As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*. 2: 20389.
- Green, M., & Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*. 55: 1179–1188.
- Greening, D. W., Xu, R., Ji, H., Tauro, B. J., & Simpson, R. J. (2015). A protocol for exosome isolation and characterization: Evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods Mol. Biol.* 1295: 179–209.
- György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., ... Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 2667–2688.
- Helmfors, H., Eriksson, J., & Langel, Ü. (2015). Optimized luciferase assay for cell-penetrating peptide-mediated delivery of short oligonucleotides. *Anal. Biochem.* 484: 136–142.
- Ishida, T., Ichihara, M., Wang, X., Yamamoto, K., Kimura, J., Majima, E., & Kiwada, H. (2006). Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J. Control. Release*. 112: 15–25.
- Kamerkar, S., LeBleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C. F., Melo, S. A., ... Kalluri, R. (2017). Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*. 546: 498–503.

- Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., ... Batrakova, E. V. (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomed. Nanotechnol.* 12: 655–664.
- Koliha, N., Wiencek, Y., Heider, U., Jüngst, C., Kladt, N., Krauthäuser, S., ... Wild, S. (2016). A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles.* 5: 29975.
- Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., & Laktionov, P. P. (2018). Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res. Int.* 2018: 8545347.
- Kooijmans, S. A. A., Stremersch, S., Braeckmans, K., de Smedt, S. C., Hendrix, A., Wood, M. J. A., ... Vader, P. (2013). Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles. *J. Control. Release.* 172: 229–238.
- Kurrikoff, K., Veiman, K.-L., Künnapu, K., Peets, E. M., Lehto, T., Pärnaste, L., ... Langel, Ü. (2017). Effective in vivo gene delivery with reduced toxicity, achieved by charge and fatty acid -modified cell penetrating peptide. *Sci. Rep.* 7: 17056.
- Langel, Ü. 2019. *CPP, Cell-Penetrating Peptides.* Springer Singapore.
- Lee, Y. X. F., Johansson, H., Wood, M. J. A., & El Andaloussi, S. (2019). Considerations and Implications in the Purification of Extracellular Vesicles – A Cautionary Tale. *Front. Neurosci.* 13.
- Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Arraud, N., & Brisson, A. R. (2015). High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles.* 4
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen Wen, S., Wong, C. S. F., Wiegmanns, A. P., Leimgruber, A., & Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J. Extracell. Vesicles.* 4.
- Lowenstein, P. R., Mandel, R. J., Xiong, W.-D., Kroeger, K., & Castro, M. G. (2007). Immune responses to adenovirus and adeno-associated vectors used for gene therapy of brain diseases: The role of immunological synapses in understanding the cell biology of neuroimmune interactions. *Curr. Gene Ther.* 7: 347–360.
- Ludwig, A.-K., Miroschedji, K. D., Doeppner, T. R., Börger, V., Ruesing, J., Rebmann, V., ... Giebel, B. (2018). Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *J. Extracell. Vesicles.* 7: 1528109.

- Lundin, P., Johansson, H., Guterstam, P., Holm, T., Hansen, M., Langel, Ü., & EL Andaloussi, S. (2008). Distinct Uptake Routes of Cell-Penetrating Peptide Conjugates. *Bioconjugate Chem.* 19: 2535–2542.
- Lässer, C., O’Neil, S. E., Ekerljung, L., Ekström, K., Sjöstrand, M., & Lötvall, J. (2011). RNA-containing Exosomes in Human Nasal Secretions. *Am. J. Rhinol. Allergy.* 25: 89–93.
- Maring, J. A., Lodder, K., Mol, E., Verhage, V., Wiesmeijer, K. C., Dingenouts, C. K. E., ... Goumans, M.-J. (2019). Cardiac Progenitor Cell-Derived Extracellular Vesicles Reduce Infarct Size and Associate with Increased Cardiovascular Cell Proliferation. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 12: 5–17.
- Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149–2154.
- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Trachtenberg, A. J., Hochberg, F. H., Skog, J., & Kuo, W. P. (2012). Impact of Biofluid Viscosity on Size and Sedimentation Efficiency of the Isolated Microvesicles. *Front. Physiol.* 3.
- Ohno, S., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., ... Kuroda, M. (2013). Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. *Mol. Ther.* 21: 185–191.
- Palanisamy, V., Sharma, S., Deshpande, A., Zhou, H., Gimzewski, J., & Wong, D. T. (2010). Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PloS One.* 5: e8577.
- Pisitkun, T., Shen, R.-F., & Knepper, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 13368–13373.
- Poliakov, A., Spilman, M., Dokland, T., Amling, C. L., & Mobley, J. A. (2009). Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *Prostate.* 69:, 159–167.
- Ramamoorth, M., & Narvekar, A. (2015). Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *J. Clin. Diagn. Res.* 9: GE01–GE06.
- Ramirez, M. I., Amorim, M. G., Gadelha, C., Milic, I., Welsh, J. A., Freitas, V. M., ... Dias-Neto, E. (2018). Technical challenges of working with extracellular vesicles. *Nanoscale.* 10: 881–906.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183:

1161–1172.

- Raz, A., Barzilai, R., Spira, G., & Inbar, M. (1978). Oncogenicity and Immunogenicity Associated with Membranes Isolated from Cell-free Ascites Fluid of Lymphoma-bearing Mice. *Cancer Res.* 38: 2480–2485.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia.* 20: 847–856.
- Sun, D., Zhuang, X., Xiang, X., Liu, Y., Zhang, S., Liu, C., ... Zhang, H.-G. (2010). A Novel Nanoparticle Drug Delivery System: The Anti-inflammatory Activity of Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes. *Mol. Ther.* 18: 1606–1614.
- Zhu, X., Badawi, M., Pomeroy, S., Sutaria, D. S., Xie, Z., Baek, A., ... Phelps, M. A. (2017). Comprehensive toxicity and immunogenicity studies reveal minimal effects in mice following sustained dosing of extracellular vesicles derived from HEK293T cells. *J. Extracell. Vesicles.* 6: 1324730.
- Zomer, A., Maynard, C., Verweij, F. J., Kamermans, A., Schäfer, R., Beerling, E., ... van Rheenen, J. (2015). In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell.* 161: 1046–1057.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell. Biol.* Chapter 3, Unit 3.22.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., & Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 4: 346–358.
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Norman Salem, Jr., & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 645: 63–70.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9: 654–659.
- Veiman, K.-L., Mäger, I., Ezzat, K., Margus, H., Lehto, T., Langel, K., ... Langel, Ü. (2013). PepFect14 peptide vector for efficient gene delivery in cell cultures. *Mol. Pharm.* 10: 199–210.
- Wang, W., Li, W., Ma, N., & Steinhoff, G. (2013). Non-viral gene delivery methods. *Curr. Pharm. Biotechno.* 14: 46–60.

- Webber, J., & Clayton, A. (2013). How pure are your vesicles? *J. Extracell. Vesicles*. 2.
- Wiklander, O. P. B., Nordin, J. Z., O'Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., Mäger, I., ... Andaloussi, S. E. (2015). Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J. Extracell. Vesicles*. 4: 26316.
- Wolf, P. (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br. J. Haematol.* 13: 269–288.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., ... Wever, O. D. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles*. 4: 27066.
- Yang, T., Martin, P., Fogarty, B., Brown, A., Schurman, K., Phipps, R., ... Bai, S. (2015). Exosome Delivered Anticancer Drugs Across the Blood-Brain Barrier for Brain Cancer Therapy in Danio Rerio. *Pharm. Res.* 32: 2003–2014.

## Lisad

**Lisa 1.** Töös kasutatud plasmiidide järjestused ja plasmiidikaardid on kättesaadavad Benchling veebikeskkonnast

**Lisa 1 – A:** pMC-BESPX-GLucFLuc2

<https://benchling.com/s/V4GBGJ8M>

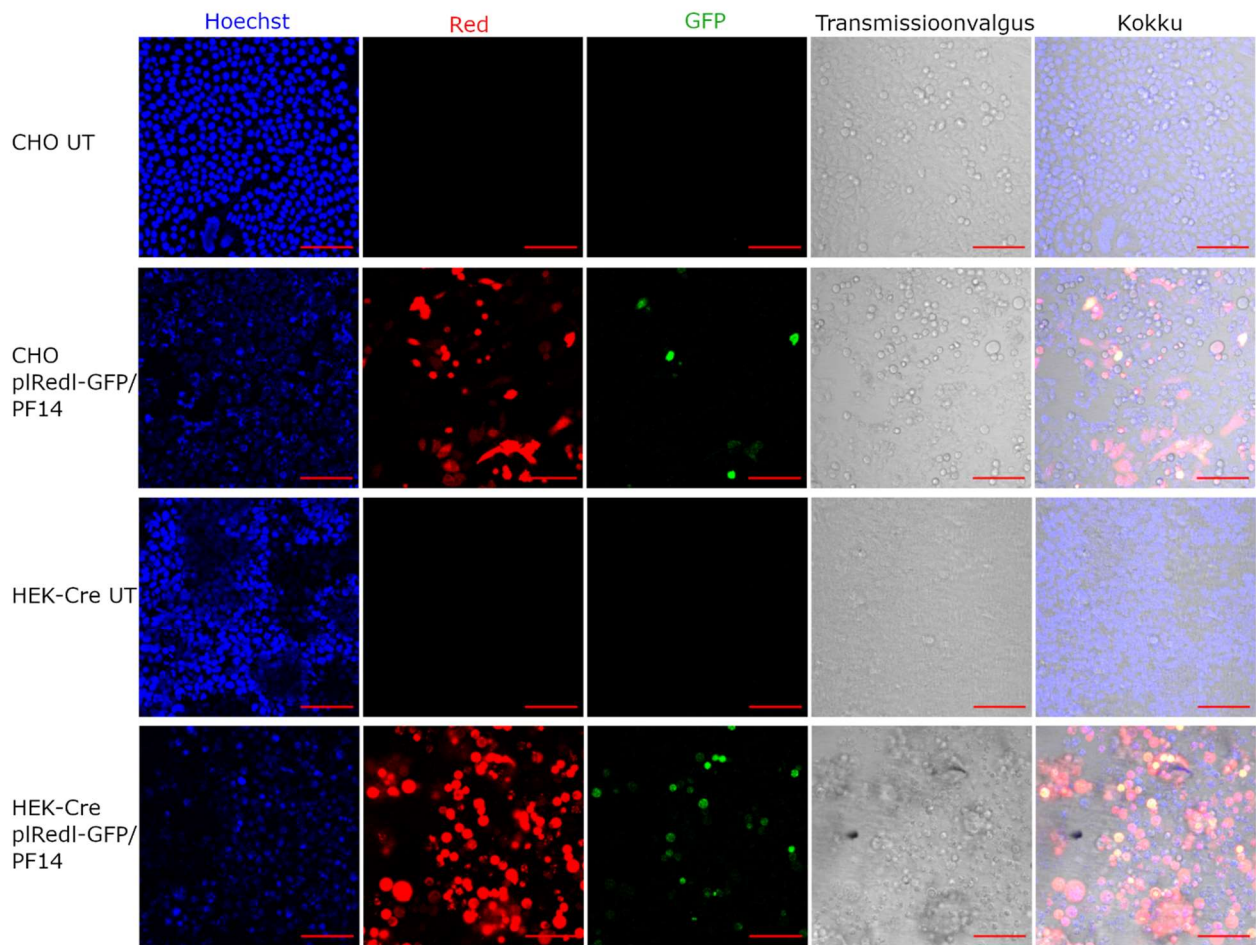
**Lisa 1 – B:** pCMV-EGFP-C1

<https://benchling.com/s/seq-DIS7TSkAfAuSBChhEhgB>

**Lisa 1 – C:** pLV-CMV-LoxP-DsRed-LoxP-eGFP

<https://benchling.com/s/seq-0UycFpmWfJ7ywOWkLMUb>

## Lisa 2.



**Joonis 13.** CHO ja HEK-Cre rakkude transfecteerimine kasutades CR4 pIRedl-GFP/PF14 kompleksi. Rakke inkubeeriti 24 h tundi kompleksiga. Rakutuomad on värvitud Hoechst-iga, punane signaal kujutab DsRed, roheline signaal kujutab GFP-d. Mõõtjoon tähistab 100  $\mu\text{m}$ .

## Lihthtsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anett Puskar,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihthtsentsi) minu loodud teose „Peptiidi vahendusel laetud ekstratsellulaarsed vesiikulid omavad transfektsioonivõimet *in vitro* ja *in vivo*“, mille juhendaja on Kaido Kurrikoff, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **01.06.2022** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihthtsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Anett Puskar

**09.06.2020**