

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Keemia Instituut

Kadri Künnapuu

**Aktiveeritavate rakku sisenevate peptiidide süntees ning
rakendamise geeni transpordiks *in vitro* ning *in vivo* tingimustes**

Magistritöö

Juhendajad: PhD Kaido Kurrikoff

Prof. Ülo Langel

Tartu 2014

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
1 Sissejuhatus.....	6
2 Kirjanduse ülevaade.....	7
2.1 Geeniteraapia	7
2.1.1 Nukleiinhapped vähiteraapias.....	7
2.1.2 Nukleiinhapete transport rakku.....	8
2.1.2.1 Viirusvektorid.....	8
2.1.2.2 Füüsilised meetodid.....	8
2.1.2.3 Keemilised vektorid.....	9
2.2 Rakku sisenevad peptiidid	10
2.2.1 RSP-oligonukleotiid sidumise strateegiad	12
2.2.2 RSP Transportaan ja selle analoogid	13
2.2.3 Aktiveeritavad rakku sisenevad peptiidid.....	14
2.3 Peptiidsüntees	15
2.3.1 Peptiidsüntees tahkel kandjal.....	15
2.3.1.1 Peptiidsideme teke.....	16
2.3.1.2 Tahked kandjad.....	17
3 Eksperimentaalne osa.....	18
3.1 Reagendid ja aparatuur	18
3.2 Sünteesitavad peptiidid	18
3.3 Peptiidsüntees	19
3.4 Peptiidide puhastamine ning massispektromeetria	20
3.5 RSP-pDNA kompleksid ning nende karakteriseerimine	21
3.5.1 Komplekside valmistamine.....	21
3.5.1 Komplekside hüdrodünaamilise diameetri mõõtmine	21
3.5.2 Komplekside tugevuse hindamine	21

3.6	RSP efektiivsuse hindamine in vitro tingimustes	22
3.6.1	Rakkude kultiveerimine	22
3.6.2	Rakkude transfekteerimine ning transfektsiooniefektiivsuse määramine.....	22
3.7	RSP-de tsütotoksilisuse hindamine.....	22
3.8	RSP efektiivsuse hindamine in vivo tingimustes.....	23
3.8.1	Kasutatud loomudel	23
3.8.2	In vivo reportergeeni induksioon ning selle efektiivsuse määramine.....	23
3.9	Andmeanalüüs.....	24
4	Tulemused ja arutelu.....	25
4.1	Sünteesitud peptiidid.....	25
4.2	RSP-pDNA komplekside omadused.....	26
4.3	In vitro transfektsioon	27
4.4	Tsütotoksilisus	30
4.5	In vivo geeniinduktsioon.....	31
5	Kokkuvõte.....	34
6	Kasutatud kirjandus	35
7	Summary	39
8	LISAD.....	40
	LISA 1.....	41
	LISA 2.....	42
	LISA 3.....	44
	LISA 4.....	46
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	47

Kasutatud lühendid

aPF3	aktiveeritav PepFect 3
aPF14	aktiveeirtav PepFect 14
Bzl	bensüülrühm
DCM	diklorometaan
DIEA	diisopropüületüülamiin
DLS	footonkorrelatsioon spektroskoopia (<i>dynamic light scattering</i> , ingl.k)
DMF	N,N-dimetüülformamiid
DNA	desoksüribonukleinhape
FBS	veise looteserum (<i>fetal bovine serum</i> , ingl.k)
Fmoc	9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüül rühm
HBTU	N-[1H-bensotriasool-1-üül](dimetüülamino)metüleen]-N-metüülmetaanamiinium heksaflorofosfaat N-oksiid
HF	vesinikfluoriidhape
HOBt	1-hüdroksübensotriasool
MALDI-TOF	maatriks-assisteeritud laserdesorptsioonionisatsioon-lennuaja massispektrometria
MBHA	4-metüülbenshüdrüülamiin
MeCN	atsetonitriil
MMP	maatriks-metalloproteinaas
N2A	hiire neuroblastoomi rakuliin
ON	oligonukleotiid
pDNA	plasmiidne DNA
PF3	PepFect 3
PF6	PepFect 6
PF14	PepFect 14
pGL3	Promega reportergeeni ekspressioonivektor
PyBOP	bensotriasool-1-üül-oksütripürolidinofoosooniumheksaflorofosfaat
RLU	Suhtelised luminesentsi ühikud (<i>Relative luminescence units</i>)
RNA	ribonukleinhape
RP-HPLC	pöördfaas-vedelikkromatograafia
RSP	rakku sisenev peptiid

siRNA	väike interfereeruv RNA (<i>small interfering RNA</i> , ingl.k)
t-Boc	<i>tert</i> -butüüloksükarbonüül rühm
TBTU	O-(bensotriasool-1-üül)-1,1,3,3,-tetrametüülurooniumtetrafloroboraat
t-Bu	<i>tert</i> -butüül rühm
TFA	trifluoroäädikhape
TIS	triisopropüülsilaan
U87	inimese glioblastoomi rakuliin

1 Sissejuhatus

Vähk on tänapäeval arenenud riikides üks juhtivaid surma põhjusi. Oma agressiivse kasvuprofiili ning keeruliste arengumehhanismide tõttu ei ole efektiivset ja spetsiifilist ravi veel saadaval. Üheks vähiravi võimaluseks on geeniteraapia, mille põhiliseks piiranguks on efektiivsete ja ohutute geeni transportvektorite puudumine. Transportvektorid on vajalikud, kuna nukleiinhapped degradeeruvad rakuvälises keskkonnas kiiresti ning ei ole võimelised rakumembraane läbima. Viraalsed vektorid on küll väga efektiivsed, kuid nende kasutamisega kaasnevad sageli tõsised kõrvaltoimed, mille tõttu on tarvis leida efektiivseid ja ohutuid mitte-viraalseid vektoreid.

Üheks võimalikuks alternatiiviks viraalsetele vektoritele on rakku sisenevad peptiidid (RSP-d), mis suudavad läbi rakumembraani suuri makromolekule kanda ning omavad seejuures rakkudele vähest toksilisust. Rakku sisenevaid peptiide on võimalik erinevate oligonukleotiididega konjugeerida ning neid seeläbi loomarakkudesse transportida.

Ideaalne ravimikandja peaks olema spetsiifiline ning töötama vaid soovitud kudedes. RSP-d aga sisenevad mittespetsiifiliselt kõikidesse rakkudesse. Spetsiifilisus on võimalik saavutada eelravimi strateegiaga. Üldplaanis maskeeritakse seda strateegiat kasutades RSP aktiivsus ravimi manustamise ajal ning taastatakse sihtmärgini jõudmisel. Näiteks proteaas-aktiveeritava süsteemi korral taastab RSP aktiivsuse mõni vähirakkude poolt ekspresseeritud proteaas.

Antud magistritöö peamiseks eesmärgiks oli arendada RSP-de põhine kasvajaspetsiifiline geeniekspressiooni vektori süsteem. Selle saavutamiseks oli plaanis sünteesida proteaas-aktiveeritavaid rakku sisenevaid peptiide, iseloomustada nende poolt moodustatud komplekside omadusi ning testida nende transfektsiooniefektiivsust nii rakukultuuris (*in vitro*) kui ka loomudel (*in vivo*). Töös kirjeldatud katsed viidi läbi Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.

2 Kirjanduse ülevaade

2.1 Geeniteraapia

Vastavalt Ameerika Geeni- & Rakuteraapia Ühingule (ASGCT) on geeniteraapia defineeritud kui geneetilise materjali sisseviimine või muutmise rakus või organismis, mille eesmärgiks on haiguse ravimine või leevendamine [1].

Idee kasutada nukleiinhappeid („geene“) ravimina tekkis Ameerika Ühendriikides 1970. aastatel [2]. Geeniteraapia sobib nii pärilike kui ka omandatud haiguste ravimiseks [3]. Esialgelt nähti seda pärilike retsessiivsete ühe geeni defektide, näiteks tsüstilise fibroosi ja hemofiilia ravivõimalusena [4]. Juba geeniteraapia arengu esimese faasi käigus mõisteti, et transporditavad nukleiinhapped ei pea tingimata valku kodeerima, vaid võivad koosneda ka reguleerivatest DNA või RNA fragmentidest. Need ideed laiendasid geeniteraapia perspektiive suurel määral ning panustasid selle arengu kiirenemisse [2]. Tänapäeval on geeniteraapia peamiseks sihtmärgiks saanud laialt levinud seisundid, nagu vähk, südame- ja veresoonehaigused, kesknärvisüsteemi degeneratiivsed haigused ning nakkushaigused [5].

Geeniteraapia rakendusteks on saadaval lai potentsiaalset terapeutilist mõju omavate nukleiinhapete spekter. Sinna hulka kuuluvad valku kodeerivad geenid (mis võib olla näiteks plasmiidse DNA kujul) ning väiksed mittekodeerivad nukleiinhapped, nende hulgas oligonukleotiidid, nagu ribosüümid, siRNAd, RNA ning DNA peibutised. [2]

2.1.1 Nukleiinhapped vähiteraapias

Vähi arengut seostatakse rakutasandil mitmete geneetiliste muutustega ning mutatsioonid tuumor-supressorgeenides ja onkogeenid mängivad haiguse arengus väga tähtsat rolli. Siiaamaani on peaaegu kaks kolmandikku geeniteraapia katsetustest just vähiravile keskendunud. Kuna tuumor-supressorgeenid indutseerivad apoptoosi ning onkogeenid aitavad kaasa rakujagunemisele, saab apoptootilisi geene ja anti-onkogeene efektiivselt vähi geeniteraapias kasutada. Vähk on oma olemuselt immunogeenne, seega on võimalik ka vähirakkude vastase immuunsuse tugevdamine tsütokiini (nt. interleukiin-12) kodeerivate geenidega. [7]

2.1.2 Nukleiinhapete transport rakku

Sõltumata terapeutilisest sihtmärgist on geeniteraapia põhikatsumuseks efektiivsete ja ohutute geeni transportvektorite arendamine. Teraapia efektiivseks toimimiseks on nukleiinhapetel vaja läbida mitmeid, nii rakusiseseid kui ka -väliseid barjääre [3]. Rakkude hüdrofoobne ja negatiivse laenguga plasmamembraan on suurtele polüanioonidele, nagu DNA ja RNA, läbimatu ning geenide rakku sisenemisele peab kaasa aitama, kasutades füüsikalisi, keemilisi või bioloogilisi meetodeid [2]. Raku sees on nukleiinhappel vaja vabaneda nii endosoomidest kui ka jõuda läbi tsütoplasma rakutuuma või muu rakusisese sihtmärgini [8]. Edukate geenitranspordi süsteemide tähtsamateks kriteeriumiteks on ohutus ja efektiivsus [9].

2.1.2.1 Viirusvektorid

Viirused on kõrgelt arenenud bioloogilised masinad, mis suudavad efektiivselt peremeesorganismi rakkudesse siseneda ning nende rakumehhanismi enda replitseerimiseks ära kasutada. Geeniteraapia rakenduste jaoks ideaalsed viirustel põhinevad vektorid suudavad rakke nakatada, kuid väldivad järgnevat viraalsete geenide ekspresseerimist, mis viiks viiruse paljunemise ja toksilisuseni. [5]

Erinevate viiruste arv, mida geeniteraapia vektoritena kasutatakse, kasvab pidevalt. Praegu on kasutusel viis viirusvektorite klassi, mille saab liigitada kahte gruppi lähtuvalt sellest, kas nende genoomid integreeruvad peremehe kromatiiniga (onkoretro- ja lentiviirused) või püsivad rakutuumas enamjaolt ekstrakromosomaalsete episoomidena (adeno-, adeno-seoselised ja herpesviirused). [5, 10]

Viirused on praegusel ajal eelistatuim geenitranspordi süsteem kliinilistes katsetes, kuna neil on mitteviraalsete vektoritega võrreldes kõrge *in vivo* transfektsiooni (DNA rakkusisestuse) efektiivsus [11]. Viirusvektorite kasutamisega kaasneb aga palju riske, nagu immunogeensus, tsütotoksilisus ning insertiooniline mutagenees, mis viib raku pahaloomuliste muutuste tekkeni. Kuigi neid probleeme üritatakse lahendada, on oluline arendada ka alternatiivseid transportvektoreid [12].

2.1.2.2 Füüsikalised meetodid

Füüsikalised meetodid geeni transpordiks kutsuvad rakumembraanides esile mööduvaid vigastusi või defekte, et DNA saaks rakkudesse siseneda difusiooni teel [13]. Selleks rakendatakse

rakkudele näiteks elektrivälja, kõrgsurvet või ultraheli. Rakumembraani läbilaskvuse suurendamiseks elektrivälja toimet teostatakse elektroporatsiooni. Selle tehnika puhul DNA süstitakse ning seejärel rakendatakse sihtmärkkoele elektriväli, mille toimet tekivad rakumembraanidesse hüdrofiilsed poorid [3]. Elektroporatsiooni peaks saama teostada igas koes, kuhu on võimalik elektroode sisestada [13]. Selle meetodi suurimaks probleemiks on koekahjustuste teke elektriimpulsside tõttu, mis piirab elektroporatsiooni kasutamist elusorganismides [2]. Geenipüssi ning hüdrodünaamilise süsti meetodid rakendavad DNA transpordiks kõrgsurvet [3]. Geenipüss on hea meetod geenide transportimiseks naha, limaskesta või kirurgiliselt paljastatud koe rakkudesse. Selle meetodi puhul kiirendatakse DNA-ga kaetud metalli nanoosakesed suure kiiruseni, mis lubab neil sihtmärkorganeid, kudesid paari millimeetri ulatuses läbida. Koe läbimise käigus vabaneb metalliosakeste küljest DNA ning satub rakkudesse [14]. Hüdrodünaamilise süsti meetodiga süstitakse veresoonte suur kogus DNAd, mis siseneb rakkudesse hüdroporatsiooni toimet [15]. Inimeste puhul oleks antud meetod piiratud kasutusega, kuna on rakendatav vaid sellistes keha piirkondades, kus on võimalik tekitada ajutine rõhutõus [11]. Lisaks tekitab suur süstimisruumala kõrvalmõjusid, nagu kõrge vererõhk ja madal pulsisagedus [3]. Sonoporatsiooni käigus tekitatakse membraani poorid ultraheli mõjul, kuid geeni transpordiefektiivsus on madal [13].

2.1.2.3 Keemilised vektorid

Keemilisi vektoreid on laialdaselt uuritud eelkõige selle tõttu, et neil on viirusvektorite ees mitmeid eeliseid, nagu väiksem toksilisus, võime transportida suuri gene ja valmistamise lihtsus [16]. Selle meetodi puhul kasutatakse nukleiinhapete transportimiseks põhiliselt sünteetilisi või looduses esinevaid polümeere või lipiide. Katioonsed lipiidid on geenitranspordi vektoritena väga efektiivsed ning keemilistest vektoritest kõige laialdasemalt levinud. Need on amfipaatsed molekulid, mis sisaldavad funktsioneerimiseks katioonset ning lipiidset fragmenti [9, 17]. Hüdrofiilne pea koosneb tavaliselt primaarsetest, sekundaarsetest või tertsiarsetest amiinidest ning kvaternaarsest ammooniumsooladest. Molekuli hüdrofoobsed osad põhinevad tavaliselt kas süsivesinikahelal, kolesteroolil või vitamiin D-l. Katioonsete liposoomide ning polüanioonse DNA kompleksid tekivad tänu elektrostaatilisele interaktsioonile, millele järgneb aeglasem lipiidide ümberasetumine. Paljud katioonsed lipiidid omavad rakukultuuris suurepäraselt transfektsiooniefektiivsust, kuid ei toimi nii hästi seerumi juuresolekul ega ole aktiivsed *in vivo*. Lisaks on need toksilised, põhjustades enamasti põletikulisi reaktsioone [16, 13].

Geenitranspordi eesmärgil on kasutatud suurt hulka looduslikke ning sünteetilisi polükatioone. Looduslike hulka kuuluvad valgud, näiteks histoonid, kationiseeritud inimese seerumi albumiin ning aminopolüsahhariidid. Sünteetiliste polükatioonide hulka kuuluvad peptiidid, nagu polülüsiin ja polüornitiin ning polüamiinid, näiteks polüetüleenimiin (PEI). Polükatioonid interakteeruvad samuti elektrostaatiliselt DNAGA ning kondenseerivad selle kompakseteks osakesteks diameetriga 20-200 nm [18]. Katioonsete polümeeride kompleksid DNAGA on tavaliselt stabiilsemad katioonsete lipiidide poolt moodustatud kompleksidest [16]. *In vivo* geenitranspordil on probleemiks polükatioonide interaktsioonid bioloogiliste vedelike ja ekstratsellulaarse matriksiga ning seondumine erinevate sihtmärkidesse mittekuuluvate rakutüüpidega. Pinnalaengu varjestamiseks on kasutatud steerilist stabilisatsiooni, mis hoiab ära mittespetsiifilised interaktsioonid rakukomponentidega. See saavutatakse tavaliselt polüetüleenglükooli (PEG) kovalentsel sidumisel polükatioonidega [18]. Ka katioonsete polümeeride kasutamist piirab põhiliselt toksilisus ning mõned polümeerid, näiteks PEI, ei ole biolagunevad [16]. Viimastel aastatel on geenitranspordi eesmärgil uuritud erinevaid katioonseid peptiide. Näiteks arginiinirikas peptiid, mis saadi protamiini valgust, suutis transfekteerida rakke peaaegu sama efektiivselt kui PEI, kuigi protamiin ise oli väikse aktiivsusega. Ka mitmed erinevad sünteetilised peptiidid on võimelised rakke transfekteerima [13].

2.2 Rakku sisenevad peptiidid

Üle 20 aasta tagasi leiti, et mõned valgud, põhiliselt transkriptsioonifaktorid, suudavad läbida rakumembraani ning liikuda ühest rakust teise [19]. Esimesed tähelepanekud selles vallas tehti aastal 1988, kui näidati, et HIV-1 transkriptsiooni trans-aktiveeriv valk (Tat) suudab rakkudesse siseneda ning seal rakutuuma liikuda [20]. 1991. aastal avastati, et samasugune omadus on ka äädikakärbe (*Drosophila melanogaster*) valgu Antennapedia homeodomeenil [21]. Alustades täispikkadest valkudest, näitasid mutatsiooni ja deletsioonianalüüsid, et rakkusisenemise eest vastutavad nendes valkudes väikesed domeenid ning neid lühikesi peptiidijärjestusi hakati nimetama rakku sisenevateks peptiidideks (RSP) [22]. Esimene RSP, Penetratiin avastati aastal 1994. ning see põhineb eelpoolmainitud Antennapedia homeodomeeni kolmandal heeliksil [23]. Hiljem tehti kindlaks ka minimaalne Tat valgu peptiidijärjestus, mis on rakku sisenemiseks vajalik [24]. Lisaks eelpoolmainitud looduslikest valkudest saadud RSP-dele on olemas ka kimäärsed RSP-d, nagu Transportaan, mille 12 aminohappejääki pärinevad neuropeptiid galaniinilt ning 14 vapsikumürgi koostises olevalt peptiidilt mastoparaan [25]. Kolmanda RSP-de klassi

moodustavad sünteetilised peptiidid, millest enimuuritud on polüarginiinid [26]. Nimetatud RSP-de järjestused on toodud tabelis 1.

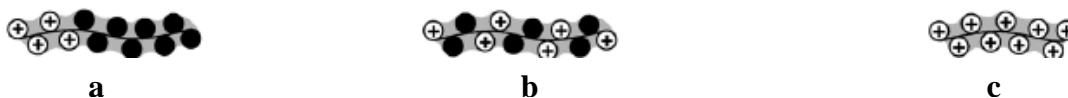
Tabel 1. Näiteid rakku sisenevatest peptiididest.

Nimi	Järjestus
Penetratiin	RQIKIWFQNRRMKWKK ^a
Tat	CGRKKRRQRRRPPQC ^a
(Arg) ₇	RRRRRRR
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKISIL- NH ₂

^a - C terminus võib, aga ei pea olema amideeritud.

Rakku sisenevad peptiidid on tavaliselt vähem kui 30 aminohappejäägist koosnevad polükatioonsed või amfipaatsed peptiidid, mis on võimelised suuri makromolekule, nagu plasmiidset DNA-d, oligonukleotide, valke ning nanoosakesi läbi rakumembraani kandma, omades seejuures rakkudele vähest toksilisust [19,27,28]. Kõik teadaolevad RSP-d on füsioloogilise pH juures positiivse üldlaenguga, sisaldades umbes 17 – 100% katioonseid aminohappeid [29].

RSP-d saab jagada kolme klassi: primaarsed amfipaatsed, nagu Transportaan, sekundaarsed amfipaatsed, nagu Penetratiin ning mitteamfipaatsed RSP-d, näiteks R₇ (joonis 1). Primaarsete amfipaatsete RSP-de primaarstruktuuri moodustavad järjestikku asetsevad hüdrofoobsed ning katioonsed domeenid. Nad on tavaliselt üle 20 aminohappejäägi pikkused ning seostuvad tugevalt nii neutraalsete kui ka anioonsete rakumembraanidega. Sekundaarsed amfipaatsed RSP-d on lühemad ning nende amfipaatsus väljendub ainult läbi peptiidi sekundaarstruktuuri muutuste pärast lipiididega interakteerumist. Elektriliselt neutraalsete membraanide suhtes on neil kehv afiinsus. Mitteamfipaatsed peptiidid koosnevad peaaegu täielikult katioonsetest aminohappejääkidest ning on kõige lühemad. Lipiidsete membraanide külge seonduvad nad ainult siis kui seal on suur hulk negatiivseid laenguid. [30]



Joonis 1. RSP-de klassid. a: primaarsed amfipaatsed RSP-d; b: sekundaarsed amfipaatsed RSP-d; c: mitteamfipaatsed RSP-d [30].

RSP-de raku tungimise mehhanism ei ole siiani täiesti selge, kuid enamus uurijaid on jõudnud üksmeelele, et peamiseks sisenemismehhanismiks võiks olla endotsütoos/makropinotsütoos. Nimelt on mitmed töögrupid näinud RSP efektiivsuse kasvu, kui RSP-oligonukleotiidi konjugaati inkubeeriti endosomolüütiliste ühendite, nagu klorokiin, juuresolekul. See näitab, et endotsütootilistest organellidest vabanemine on transfektsiooni limiteerivaks sammuks [31]. Selle tõttu on transfektsiooniefektiivsuse tõstmiseks vaja suurendada RSP endosoomidest vabanemise võimet. Üheks selliseks võimaluseks on RSP hüdrofoobsuse tõstmine näiteks lipiidfragmendi lisamise teel. Täpsem raku sisenemise mehhanism sõltub siiski mitmetest parameetritest, nagu RSP kontsentratsioon, summarne laeng ning hüdrofoobsus [30,32,33].

Kui tahta kasutada RSP-e ravimikandjatena, on vaja, et need oleksid võimalikult vähetoksilised. Üldiselt on siiani täheldatud kahte tüüpi toksilisi efekte: toksilisus raku/organellide membraanide suhtes ning RSP ja rakukomponentide interaktsioonidest tulenev toksilisus [29]. Suurimaks puuduseks RSP-de juures on olematu spetsiifilisus, mis näiteks vähiravis on ravimikandjate juures väga oluline [27].

2.2.1 RSP-oligonukleotiid sidumise strateegiad

Oligonukleotiidide transpordiks RSP-de abil on võimalik kasutada erinevaid strateegiaid, ulatudes lihtsast kaas-inkubeerimise lähenemisest RSP-oligonukleotiid konjugaatide ning mittekovalentsete komplekside valmistamiseni [31].

Kuna RSP-d saavad stimuleerida makropinotsütoosi ning rikkuda rakumembraani struktuuri, võimaldavad nad selle käigus kõrvalseisvatel makromolekulidel, nagu nukleinhapetel või valkudel raku siseneda. Kaas-inkubatsiooni lähenemisega kasutatakse RSP ning lastmolekuli segu, millega säilitatakse mõlema aktiivsused ning proovi ettevalmistus on mugav. Selleks, et olla efektiivne *in vivo* tingimustes, peavad nii lastmolekul kui ka RSP rakkudesse koos siseneda,

kuid seda on kahe erineva komponendi erinevate farmakokineetiliste omaduste tõttu raske saavutada. Antud lähenemise puhul mittekovalentseid komplekse ei moodustu. [31]

Kovalentsed RSP-oligonukleotiid konjugaadid on hästi defineeritud, mis lihtsustab nende iseloomustamist ning struktuur-aktiivsus sõltuvuste uurimist. Sellise kovalentse konjugeerimise tulemusel võib aga RSP aktiivsus kaduda, kuna negatiivse laenguga oligonukleotiid saab seostuda positiivselt laetud RSPga ning neutraliseerida aktiivsuseks olulised aluselised aminohappejäägid. Lisaks võib oligonukleotiidi keemilise modifitseerimise käigus selle bioloogiline aktiivsus muutuda. [19,31]

Mitmete RSP-de puhul on näidatud, et need suudavad biomolekulidega elektrostaatiliste interaktsioonide kaudu mittekovalentseid komplekse moodustada ning parandavad nende sisenemisvõimet loomarakkudesse [19]. See strateegia väldib RSP ning oligonukleotiidi keemilist modifitseerimist ja suur hulk oligonukleotiide liidetakse efektiivselt nanosuures kompleksidesse. Suurim bioloogiline efekt saavutatakse sellel juhul, kui RSP võetakse oligonukleotiidi suhtes liias. Samas on ka selle lähenemise puhul võimalik, et oligonukleotiidid vähendavad laengu neutraliseerimise tõttu RSP efektiivsust [31].

2.2.2 RSP Transportaan ja selle analoogid

Transportaani uurimisel täheldati, et see pärsib rakkudes GTPaasi aktiivsust. Kuigi GTPaasi inhibeerimine toimub 10 korda kõrgema kontsentratsiooni juures kui eksperimentides kasutatakse, võib see olla tõsiseks takistuseks Transportaani kasutamisele ravimikandjana. Sellest probleemist saadi jagu Transportaani järjestust N-terminaalsest otsast 6 aminohappejäägi võrra lühendades ning saadud peptiid kannab nime Transportaan10 (TP10) [34]. Muutes TP10 hüdrofoobsemaks, paranes selle transfektsiooniefektiivsus ning stearoüülrühma lisamise teel konstrueeriti RSP PepFect 3 (PF3) [35]. Et suurendada transfektsiooniefektiivsust veelgi, lisati PF3 järjestusele endosomolüütiline trifluorometüülkinoliin, saades peptiidi PepFect 6 (PF6) [36]. PepFect 14 (PF14) on PF3 analoog, kus isoleutsiinid ning enamik lüsiine on asendatud vastavalt leutsiinide ning ornitiinidega [37]. Nimetatud RSP-de järjestused on toodud tabelis 2.

Tabel 2. RSP Transportaan ja selle analoogid

Nimi	Järjestus
Transportaan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
Transportaan10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
PepFect 3	stearoüül-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
PepFect 6	stearoüül-AGYLLGK(ϵ NH ^b)INLKALAALAKKIL-NH ₂
PepFect 14	stearoüül-AGYLLGKLLLOOLAAAALLOOLL-NH ₂

^b – Nelja trifluorometüülkinoliini derivaadiga modifitseeritud lüsiinipuu.

2.2.3 Aktiveeritavad rakku sisenevad peptiidid

Ideaalne ravimikandja peaks toimima spetsiifiliselt ainult soovitud märklaudadele ja jätma muud koed puutumata. RSP-d aitavad erinevaid ühendeid toimetada läbi muidu läbitungimatute biobarjääride, kuid sisenevad sõltumata koe tüübist kõikidesse rakkudesse. Spetsiifilisus on võimalik saavutada eelravimi strateegiaga [38]. Sellised strateegiad kasutavad ära sihtmärkorgani või rakutüübi füsioloogilisi või bioloogilisi eripärasid, nagu ensümaatilise aktiivsuse või mikrokeskkonda. Sellistel juhtudel RSP domeen peidetakse enne sihtmärgini jõudmist, et vältida mittespetsiifilist transfektsiooni [32].

Kasvaja arengu ning metastaseerumise jaoks on vajalik ekstratsellulaarse matriksi kontrollitud lagundamine, milles osalevad kasvajakudede invasiooniga seotud rakutüüpide poolt ekspresseeritud proteinaasid. Matriksi-metalloproteinaasid (MMP) on perekond tsinksõltuvaid endopeptidaase, mis kollektiivselt lagundavad kõiki ekstratsellulaarse matriksi komponente. MMP-de suurenenud ekspressiooni seostatakse kasvajat pahaloomulisusega, mis võimaldab nende baasil rakendada kasvajaspetsiifilist vähiravi. [39]

Aktiveeritava RSP süsteemi rakendas esmakordselt Nobeli preemia laureaat R. Tsien 2004. aastal. Selleks pärsiti polüarginiini aktiivsust polüanioonse peptiidifragmendiga, mida ühendas omavahel MMP tundlik vahelüli (järjestusega PLGLAG). Vereringes, kus MMP kontsentratsioon on madal, peptiidi lõikamist ei toimunud ning polüarginiini mittespetsiifilist rakkudesse sisenemist ei toimunud. Kasvaja ümbruses, kus MMP kontsentratsioon tõuseb olulisel määral, vahelüli hüdrolyüsiti, polüanioonne fragment eraldus ning polüarginiin oli suuteline ümbritsevasse rakkudesse tungima [40]. Pärast seda on MMP-aktiveeritavaid RSP

süsteeme loodud veelgi, kusjuures RSP aktiivsust pärssivaks ühendiks ei pea olema ilmtingimata negatiivse laenguga peptiid. Selleks võib olla ka näiteks polüetüleenglükooli (PEG) molekul [41].

2.3 Peptiidisüntees

Peptiidide keemiline süntees arenes välja 20. sajandil. Kuigi esimesed lihtsad peptiidid sünteesiti juba sajandivahetuse paiku, mõisteti peptiidisünteesi tõelist potentsiaali alles pärast neuropeptiid oksütotsiini täissünteesi aastal 1953. Peptiidisünteesi metodoloogia arengusse panustas olulisel määral Robelt Bruce Merrifield, kes aastal 1963 töötas välja tahke faasi peptiidisünteesi tehnika [42]. Tänapäeval on see muutunud peptiidide tootmise peamiseks meetodiks. Kuna peptiidisünteesil on palju korduvaid samme, on tahke faasi kasutamisel mitmeid eeliseid. Sellise süsteemiga saab kasutada liias reagente, süntees on kiire ja lihtne ning kõik sammud on võimalik läbi viia samas reaktsiooninõus [43].

2.3.1 Peptiidisüntees tahkel kandjal

Tahke faasi peptiidisünteesi põhimõte on toodud lisas 1 (joonis 10). Sünteesi üldine printsiip seisneb peptiidiahela pikendamisel suunaga C-terminusest N-terminuseni, teostades korduvalt tsükleid, mille etappideks on aminohappe ajutise N^{α} kaitserühma eemaldamine, üleliigsete reagentide väljapesemine, järgmise aminohappe sidumine ning jälle pesu. Esimeses etapis aktiveeritakse peptiidi esimese N^{α} -kaitstud aminohappe C^{α} -karboksüülrühm, mille kaudu aminohape kinnitatakse lahustumatule kandjale, vaigule, mis on stabiilne sünteesi vältel kasutatavate reagentide suhtes. Pärast esimese aminohappe sidumist pestakse üleliigsed reagentid reaktsiooninõust välja ning eemaldatakse seotud aminohappe N^{α} -kaitserühm, mis võimaldab siduda uue N^{α} -kaitstud aminohappe. Sellist kaitserühma eemaldamise ja aminohappe sidumise protsessi korratakse kuni soovitud peptiidijärjestuse valmimiseni. Viimase sammuna vabastatakse peptiid mõne tugevama happe mõjul tahke kandja küljest, mille mõjul eemalduvad ka aminohapete kõrvalahelate püsivad kaitserühmad. Et eemaldunud kaitserühmad kõrvalahelatega ei reageeriks, lisatakse reaktsioonisegusse ka neid rühmi stabiliseerivaid ühendeid. [43]

Tahke faasi peptiidisünteesis kasutatakse kaitserühmadest tulenevalt kahte põhilist strateegiat: Boc/Bzl ning Fmoc/tBu lähenemist ajutiste ja püsivate kaitserühmade jaoks. Esimene neist põhineb kõrvalahelate kaitserühmade astmelisel happetundlikkusel, Boc rühm eemaldatakse

trifluoroäädikhappega (TFA) ning kõrvalahelate kaitserühmad vesinikfluoriidhappega (HF). Kuigi Boc/Bzl meetod lubab efektiivselt sünteesida suuri peptiide ja väiksemaid valke, on selle teostamine ülitoksilise HF kasutamise tõttu tavalistes laborites piiratud, kuna vajab spetsiaalset aparatuuri ning koolitatud spetsialiste. Fmoc/t-Bu meetod põhineb ortogonaalsete kaitserühmade strateegial, α -aminorühma kaitsemiseks kasutatakse alustele tundlikku N-Fmoc rühma, kõrvalahelate kaitserühmad on aga happetundlikud. Selle strateegia eeliseks on võimalus kasutada püsivate kaitserühmade ja tahkelt kandjalt peptiidi eemaldamisel pehmemaid tingimusi, kuna ajutised ja püsivad kaitserühmad eemaldatakse erineva mehhanismiga. Selle tõttu on Fmoc strateegial põhinev tahke faasi peptiidsüntees laiemalt kasutatav. [43]

2.3.1.1 Peptiidsideme teke

Kvaliteetse peptiidsünteesi aluseks on korrektne peptiid- ehk amiidsideme moodustumine. Peptiidside tekib kahe molekuli vahele ühe karboksüülrühma reageerimisel teise aminorühmaga, mille käigus eraldub vesi [44]. Peptiidsideme tekkimine on energiat nõudev reaktsioon ja karboksüülhapped reageerivad amiinidega ainult kõrgema temperatuuri juures. Reaktsiooniks vajaminev temperatuur on aga komplekssete peptiidide sünteesimiseks liiga kõrge ning selletõttu on reaktsiooni toimumiseks vajalik ühe amiidsidet moodustava rühma, karboksüül- või aminorühma aktiveerimine. [45]



Joonis 2. Karboksüülrühma aktiveerimine [45].

Aminorühma aktiveerimine on keeruline ning selle lahendamiseks ei ole praktilist lahendust veel leitud. Selletõttu on siiani aminohapete vaheliste reaktsioonide aluseks karboksüülrühma aktiveerimine (joonis 2), kus X-ga on tähistatud elektronegatiivne aatom või rühm, mis jätab karbonüülsele süsinikule piisavalt positiivse osalaengu, et hõlbustada aminorühma nukleofiilset atakki. Tetraeedrilise vaheühendi stabiliseerib elektronegatiivse rühma elimineerimine, mis on tavaliselt hea lahkuv rühm [45]. Eelistatumateks aktiveerivateks reagentideks on fosfoonium (bensotriasool-1-üül-oksütripürrolidinofosfooniumheksaflorofosfaat, PyBOP) või uroonium (N-[1H-bensotriasool-1-üül](dimetüülamino)metüleen]-N-metüülmetaanamiinium heksaflorofosfaat N-oksiid, HBTU) reagentid, mis muudavad N^α-kaitstud aminohapped vastavateks OBt estriteks.

N^α-kaitstud aminohappe karboksülaadi tekitamiseks, mis omakorda eelnimetatud reagentidega reageerib, kasutatakse tertsiarset amiini, milleks on tavaliselt diisopropüületüülamiin (DIEA). [43]

2.3.1.2 Tahked kandjad

Enamik tahke faasi peptiidisünteesis kasutatavatest lahustumatutest polümeersetest kandjatest on geelid, mitte tahkised. Reaktsioonid ei toimu ainult polümeeri pindmisel kihil vaid ka polümeerihelmeste sees. Seetõttu on oluline, et polümeerid punduksid kasutatavate solventide mõjul ning reagendid saaksid läbi helmeste vabalt difundeeruda. Enamik tänapäevastest polümeerikandjatest on valmistatud stüreeni ning 1% divinüülbenseeni kopolümeerisatsioonil. Viimase eesmärgiks on lahustumatuse tagamine ristsidemete tekitamise teel, kuigi liiga suures kontsentratsioonis takistab see polümeeri pundumist. Kopolümeeri modifitseerimine on oluline vahelülide loomiseks, mis teeb võimalikuks aminohappe pöörduva kinnitamise tahkele kandjale [45]. Vahelüli valik määrab C-terminuse funktsionaalrühma lõpp-produktis. Enamus vahelülisid on disainitud nii, et pärast peptiidi eemaldamist tahkelt kandjalt jääb C-terminusse vaba karboksüülhappe või amiidrühm [46].

3 Eksperimentaalne osa

3.1 Reagendid ja aparatuur

MeCN, steariinhape, piperidiin, DCM, TFA, HOBt, TIS, DIEA, hepariini sool ning Triton X olid saadud Sigma-Aldrichist, DMF ja NMP Scharlaust, HBTU MultiSynthTechist. Rink-amiid MBHA vaik, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Ala-OH saadi Orpegenist ning kõik ülejäänud aminohapped (k. a. aminoheksaanhape) Iris Biotechist. Fmoc-PEG₆₀₀-COOH oli saadud Chempepist.

Rakusöötmed ning PBS saadi Naxost, LipofectamineTM2000, kudede lüüsi puhver (*reporter lysis buffer*), tsütotoksilisuse määramise komplekt (CytoTox-GloTM) ning lutsiferaasi substraat (*Luciferase Assay Reagent*) Promegast, PicoGreen® Life Technologiast, valgumääramise komplekt (*DC protein assay*) Bioradist, aktiveeritud rekombinantne inimese maatriks-metalloproteinaas-2 (MMP-2) Calbiochemist.

Peptiidisünteesil kasutati automatiseeritud peptiidisüntesaatorit ABI 433A (Applied Biosystems). Sünteesiproductide puhastamine teostati preparatiivse kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (Agilent Technologies) abil (C3 pöördfaaskolonn parameetritega 250 mm * 10 mm, osakeste suurus 5 µm). Mass-spektrid mõõdeti MALDI-TOF mass-spektromeetriga Voyager DE-Pro (Applied Biosystems) ning MicroFlex LT (Bruker Daltonik GmbH). RSP-pDNA nanokomplekside keskmise hüdrodünaamilise diameetri määramiseks kasutati footonkorrelatsioonspektroskoopi Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks kasutati luminomeetrit GLOMAX (Promega) ning proovi valgusisalduse määramiseks mikroplaadi absorptsioonilugejat Sunrise (Tecan). Fluorestsentsi mõõtmiseks kasutati Synergy Mx monokromaatoriga mikroplaadilugejat (Biotek). Hiirekudede homogeniseerimiseks kasutati homogenisaatorit Precellys 24 (Bertin Technologies).

3.2 Sünteesitavad peptiidid

Antud magistritöö jaoks sünteesiti kaks aktiveeritavat rakku sisenevat peptiidi: aktiveeritav PF3 (aPF3), aktiveeritav PF14 (aPF14) ning aPF14-l põhinev mitteaktiveeritav kontrollpeptiid (nc-aPF14; nc – *non cleavable*). Sünteesitavate peptiidide järjestused on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Sünteesitud aktiveeritavad rakku sisenevad peptiidid (aRSP-d) ja nende järjestused.

aRSP	Järjestus
aPF3	stearoüül-AGYLLGKINLKALAALAKKILXPLG*LAG-PEG ₆₀₀ ^a
aPF14	stearoüül-AGYLLGKLLOOLAAAALLOLLXPLG*LAG-PEG ₆₀₀ ^a
nc-aPF14	stearoüül-AGYLLGKLLOOLAAAALLOLLXLALGPG-PEG ₆₀₀ ^a

^a – omega amideeritud.

X – aminoheksaanhappe jääk.

* – Maatriks-metalloproteinaas-2 lõikekoht.

3.3 Peptiidisüntees

Peptiidide sünteesimisel kasutati Fmoc/tBu tahke faasi peptiidisüntesi meetodit.

Tahke kandjana oli kasutada Rink-amiid MBHA vaik funktsionaalsete rühmade hulgaga 0,41 mmol/g. Töögrupi kogemused on näidanud, et pikkade peptiidide sünteesil tuleb kasutada madalama funktsionaalsete rühmade arvuga vaiku ning selle tõttu vähendati antud vaigu funktsionaalsete rühmade arvu umbes poole võrra. Enne sünteesi algust lasti vaigul umbes 40 min DCM-s punduda. Peptiidid sünteesiti astmeliselt 0,1 mmol skaalas, aPF14 sünteesiti käsitsi, aPF3 ning nc-aPF14 automatiseeritud peptiidisüntesaatoriga. PEG₆₀₀ (Fmoc-PEG₆₀₀-COOH) ning steariinhape lisati kõikidel juhtudel käsitsi.

Peptiidahela sünteesil võeti aminohappeid (aminoheksaanhape k.a) vastavalt vajadusele kas 5- või 10-kordses ülehulgas vaigu funktsionaalrühmade kohta, automatiseeritud peptiidisüntesaatoris kasutati ainult 10-kordset ülehulka. PEG₆₀₀ ning steariinhappe puhul kasutati vastavalt 2- ja 4-kordset ülehulka. Käsitsi sünteesil aktiveeriti liidetavad aminohapped (aminoheksaanhape, PEG₆₀₀, ja steariinhape k.a) 0,5 M HOBt, 0,5 M HBTU ning 5,8 M DIEA-ga DMF-s ning ajutised Fmoc kaitserühmad eemaldati 20% piperidiini lahusega DMF-s. Aminohape kaaluti, lahustati aktiveerimislahuses ning kanti vaigule. Automatiseeritud süntesaatoris oli kasutusel 0,45 M HOBt, 0,45 M HBTU ning 2 M DIEA NMP-s.

Käsitsi sünteesil teostati atsüülimisreaktsiooni 45 min – 2h, PEG₆₀₀ ning steariinhape sidumine toimus aktiveerimislahuse/DMF/DCM segus 16 h. Reaktsiooni kulgemist kontrolliti ninhüdriin testiga, mille teostamiseks lisati reaktsioonisegust võetud vaiguterade proovile paar tilka lahuseid A (KCN, püridiini, fenooli ja etanooli segu) ja B (5% ninhüdriin etanoolis) ning inkubeeriti paar

minutit 105 °C juures. Kui terad olid pärast atsüülimisreaktsiooni siniseks värvunud (toimub vabade aminorühmade olemasolul), lisati sama aktiveeritud aminohape uuesti vaigule ja korrati reaktsiooni.

Korrektelt kulgenud atsüülimisreaktsioonile järgnes Fmoc-kaitserühma eemaldamine kasvava peptiidahela N-terminaalselt aminohappelt. Selle teostamiseks kanti vaigule 20% piperidiini lahust DMF-s ning inkubeeriti 2+20 min. Kaitserühma eemaldumist kontrolliti samuti ninhüdrini testi abil. Seejärel toimus järgmise aminohappe lisamine.

Igale kaitserühma mahavõtmise reaktsioonile järgnes viiekordne pesu DMF-ga ning igale atsüülimisele kuuekordne pesu DMF-ga ning kolmekordne DCM-ga.

Peptiidi eemaldamiseks tahkelt kandjalt viidi eelnevalt kuivatatud vaik filtriga plastikust süstlasse ning tõmmati sinna 95/2,5/2,5 (v/v/v) TFA/TIS/H₂O segu, mis eemaldab paralleelselt ka aminohappejääkide kõrvalrühmade püsivad kaitserühmad. Pärast 3-tunnist reaktsiooni eemaldati lahus süstlast ning peptiid sadestati vee lisamisel. Saadud vesilahust ekstraheeriti jääkülma dietüüleetri, lahus külmutati ning pärast eetri eemaldamist asetati peptiidi sisaldav külmunud vesilahus lüofilisaatorisse kuivama. Saadud valget pulbrit hoiti kuni edasiste protseduurideni -70 °C juures.

3.4 Peptiidide puhastamine ning massispektromeetria

Sünteesitud produktide molekulmassid määrati MALDI-TOF massispektromeetriga, maatriksina kasutati α -tsüano-4-hüdroksükaneelhapet (CHCA).

Peptiidi lüofiliseerimise järel puhastati see kõrvalproduktidest RP-HPLC abil, mille teostamiseks lahustati peptiid 20/80 MeCN/H₂O segus (v/v), mis sisaldas ka 0,1% TFA-d. Eluentidena kasutati MeCN ning H₂O, mis mõlemad sisaldasid 0,1% TFA-d. Puhastamisel kasutati gradientelueerimist 20-100% MeCN 35-40 minutiga, voolukiirus oli 5 ml/min. Fraktsioonid korjati käsitsi ning nende puhtus analüüsiti MALDI-TOF massispektromeetria abil.

3.5 RSP-pDNA kompleksid ning nende karakteriseerimine

3.5.1 Komplekside valmistamine

Valmistati RSP ja plasmidse DNA (pDNA) mittekovalentsed kompleksid (edasises töös tähistab „kompleks“ just mittekovalentseid komplekse). *In vitro* eksperimentides kasutati lutsiferaasi ensüümi kodeerivat pGL3 plasmidi ning *in vivo* katsetes p-CMV-Gluc-Fluc2 plasmidi.

Kompleksid moodustati MQ vees RSP:plasmid teoreetilistel laengusuhtel 3:1 ning 4:1. Teoreetilised laengusuhted arvutati, võttes arvesse plasmidi negatiivset ja RSP positiivset laengut. Komplekside moodustamiseks segati rakku siseneva peptiidi (segakomplekside puhul mõlema RSP) ning plasmidi vesilahused ning saadud segul lasti tund aega toatemperatuuril komplekseeruda. Ensüümaktivatsiooni hindamisel lisati 1 h inkubeerunud kompleksidele aktiivset MMP-2 ensüümi (0,1 mg/ml) arvestusega 1 µg ensüümi 2 nmol peptiidi kohta ning saadud segu inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril.

LipofectamineTM2000 kompleksid valmistati lähtuvalt tootja protokollist.

3.5.1 Komplekside hüdrodünaamilise diameetri mõõtmine

Komplekside keskmise hüdrodünaamilise diameetri mõõtmiseks kasutati footonkorrelatsioonspektroskoopiat (Zetasizer Nano ZS). Moodustati RSP-pDNA kompleksid ning igast proovist tehti 3 mõõtmist.

3.5.2 Komplekside tugevuse hindamine

RSP-pDNA komplekside stabiilsuse hindamiseks töödeldi neid pDNA-ga konkureeriva anioonse ühendi, hepariiniga ning määrati väljatõrjutud pDNA hulk PicoGreen-ist tuleneva fluorestsentsi alusel (PicoGreen seostub vaba DNA-ga, mille tulemusena võimenduvad tema fluorestseeruvad omadused). Kompleksid moodustati eelpool mainitud viisil RSP:plasmid laengusuhtel 3:1, inkubeeriti 1 h ning pipeteeriti mustale 96-süvendilisele plaadile. Pärast seda lisati kompleksidele erineva kontsentratsiooniga hepariini (lõppkontsentratsiooniga 0,1 kuni 8 mg/ml). Hepariini lisamise järel inkubeeriti plaate 0,5 h 37 °C juures, pipeteeriti igasse süvendisse 30 µl PicoGreeni 200-kordset lahjendust, inkubeeriti veel 10 minutit ning mõõdeti fluorestsentsi intensiivsust ($\lambda_{ex}=492$ nm, $\lambda_{em}=535$ nm). Tulemused on antud nelja katse keskmisena ning normaliseeritud nullproovi suhtes.

3.6 RSP efektiivsuse hindamine *in vitro* tingimustes

3.6.1 Rakkude kultiveerimine

U87 ning N2A rakkude kasvatamisel kasutati DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) söödet, millesse oli lisatud 10% veise loote seerumit, 0,1 mM asendatavaid aminohappeid, 1,0 mM naatriumpüruvaati, 100 U/ml penitsilliini ning 100 µg/ml streptomütsiini (täissööde). Rakke kultiveeriti 5% CO₂ sisaldavas veeauruga küllastatud atmosfääris 37 °C juures ning neid lahjendati iga 3-4 päeva järel.

3.6.2 Rakkude transfekteerimine ning transfektsiooniefektiivsuse määramine

Rakkude transfekteerimiseks külvati 24 tundi enne katse algust 24-süvendilisele plaadile 50 000 rakku süvendi kohta. Järgmisel päeval eemaldati vana sööde ning pipeteeriti igasse süvendisse 450 µl täissöödet ja 50 µl RSP-pGL3 komplekse (2,1 µg pDNA süvendi kohta, RSP:pDNA laengusuhe 3:1). 4 h pärast komplekside lisamist pipeteeriti igasse süvendisse 1 ml täissöödet ning inkubeeriti veel 20 tundi. 20 tunni möödudes sööde aspireeriti ning rakud lüüsi, kasutades 100 µl 0,1% Triton X lahust PBS-is. Lüüsimine toimus 30 minutit +4°C juures.

Plasmiidi lutsiferaasi ekspressioonitaseme mõõtmiseks kasutati GLOMAX™ 96 mikroplaat luminomeetrit, mis mõõdab lutsiferaasi ja lutsiferiini vahelisel reaktsioonil eralduvat luminesentsi. Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks pipeteeriti valgele 96-süvendilisele plaadile 20 µl rakulüsaati süvendi kohta, millele lisati 80 µl lutsiferaasi substraati (*Luciferase Assay Reagent*). Vältimaks rakkude arvukuse erinevustest tulenevaid vigu, normaliseeriti saadud tulemused valgusisalduse alusel, mis mõõdeti DC valgumääramise komplektiga. Kahe korduskatse mõõtmistulemuste keskmised esitatakse seega ühikutes RLU/mg.

3.7 RSP-de tsütotoksilisuse hindamine

Toksilisuse hindamisel teostati transfektsioon nii, nagu eelnevalt kirjeldatud, kuid kasutati 96-süvendilisi plaate, kuhu külvati 24 h enne katset 10 000 rakku süvendi kohta. Järgmisel päeval pipeteeriti igasse süvendisse 90 µl täissöödet, 10 µl komplekse (0,4 µg pDNA süvendi kohta, RSP:pDNA laengusuhe 3:1) ning 4 h möödudes lisati 150 µl täissöödet ja inkubeeriti veel 20 tundi.

20 tunni möödudes hinnati *CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay* abil RSP-pDNA komplekside mõju rakkude elumusele toksilisusega seostatud proteaasi aktiivsuse kaudu. Esmalt lisati igasse

süvendisse 50 µl AAF-GLOTM substraati, millega mõõdeti surnud rakkude proteaasset aktiivsust. 15 minutit pärast substraadi pealepanekut mõõdeti luminomeetriga luminesentsi ning saadi surnud rakkude hulk. Seejärel lisati 50 µl lüüsilahust, millega lüüsi ka elusad rakud. 15 minuti möödudes mõõdeti uuesti luminesentsi ning leiti kõikide rakkude arv. See võimaldab omakorda määrata elusate rakkude arvukuse kõikide rakkude arvu kohta (elumus). Tulemustes esitatud andmetes vastab 100% pGL3 vesilahusega töödeldud rakkude elumusele.

3.8 RSP efektiivsuse hindamine *in vivo* tingimustes

3.8.1 Kasutatud loomudel

RSP-pDNA komplekside transpordiks *in vivo* kasutati Balb/c hiireliini nii emaseid kui ka isaseid hiiri, vanusega 8-12 nädalat. Hiiri hoiti 12-tunnise valguse ja pimeduse tsüklis kontrollitud temperatuuriga ruumis (20-22 °C) ning loomadel oli toidule ja veele vaba juurdepääs.

Kasvajamudelina kasutati N2A rakkudega indutseeritud nahaalust tuumorit. Selleks resuspendeeriti 1×10^6 N2A rakku 100 µl värskes DMEM söötmes, millesse ei olnud lisatud seerumit ega antibiootikume ning süstiti hiire tagumise jala naha alla.

Kõik loomadega läbiviidud protseduurid ja eksperimendid kinnitati Eesti Eetikakomitee loaga (luba nr. 69; 70, veebruar 2011) ning elusloomadega töötas vanemteadur Kaido Kurrikoff. Edasise kudede analüüsiga tegeles antud töö autor.

3.8.2 *In vivo* reportergeeni induksioon ning selle efektiivsuse määramine

RSP-pDNA kompleksid moodustati RSP:plasmiid laengusuhte 4:1 juures nii, et DNA doos ühe looma kohta oli 20 µg. Kompleksid moodustati MQ vees (V=100 µl), sellele lisati 100 µl 10% glükoosi lahust ning manustati intravenoosselt hiire sabaveeni kaudu, kui hiirel olid ilmnenud esimesed tuumori kasvu märgid (kasvaja suurus umbes 300 mm³). 24 tundi pärast süstimist koguti koed ning homogeniseeriti, kasutades automaatset homogenisaatorit. Seejärel lüüsi homogenaat ning mõõdeti sellest eraldatud supernatandist luminomeetri abil lutsiferaasi aktiivsus. Saadud tulemused normaliseeriti supernatandi valgusisalduse suhtes. Igas grupis oli kaks looma ning kuna sooefekte ei esinenud, siis tulemustes sugu välja ei toodud.

3.9 Andmeanalüüs

Andmeanalüüsil kasutati GraphPad Prism 5.03 andmetöötlusprogrammi ning Microsoft Excelit. Diagrammidel on toodud aritmeetilised keskmised nende standardveaga.

4 Tulemused ja arutelu

4.1 Sünteesitud peptiidid

Sünteesiti kaks MMP-2-tundlikku rakku sisenevat peptiidi: aktiveeritav PF3 (aPF3), aktiveeritav PF14 (aPF14) ning kontrollpeptiid nc-aPF14, mida MMP-2 ei tohiks lõigata. Sünteesiproduktid puhastati preparatiivse pöördfaasi kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil (kromatogramm on lisas 2) ning korjatud fraktsioonide puhtust ja õige peptiidi olemasolu kontrolliti MALDI-TOF massispektromeetria abil. Saadud massispektrid on toodud lisas 3. Kontrollpeptiidi nc-aPF14 massispektrit toodud ei ole, kuna selle saamiseks kasutati teist MALDI-TOF massispektromeetrit (MicroFlex LT), millest ei olnud tol hetkel võimalik massispektrit kaasa võtta. Aktiveeritavale PF3-le oli vaja teostada korduspuhastus, kuna esimese korraga ei saadud piisavalt puhast fraktsiooni.

Modifitseerimiseks valiti seni kõige aktiivsemateks osutunud PepFect-id, PF6 ning PF14. Kuna PF6 süntees on pikk ning niigi madala saagisega, otsustati selle asemel modifitseerida PF6 analoogi, PF3, ning moodustada geenitranspordiks aPF3 ning PF6 segakompleksid.

Kõikide sünteesitud peptiidide ülesehitus on sama: RSP aktiivsuse pärssimiseks on selle C-terminaalsesse otsa üle MMP-2 tundliku (nc-aPF14 puhul mittetundliku) vahelüli lisatud PEG molekul (molekulmassiga 600 g/mol), mis hüpoteeside kohaselt lisaks RSP inaktiveerimisele pikendab ühendi poolväärtusaega vereringes. Ensüümi juurdepääsu hõlbustamiseks on MMP-2 lõikesaidi ja RSP domeeni vahele lisatud aminoheksaanhappe jääk. Aktiveeritava RSP ja DNA kompleksi aktiveerimise lihtsustatud põhimõtteskeem on toodud lisas 4.

Peptiidijärjestus PLGLAG on MMP-2 spetsiifiline (kuigi seda hüdrolüüsib ka MMP-9) ning antud järjestus lõigatakse ensüümi poolt glütsiini- ja leutsiini jäägi vahelt pooleks. Kontrollpeptiidil (nc-aPF14) on lõikesaidi aminohappejääkide järjekord muudetud (LALGPG) ning seda ei tohiks maatriks-metalloproteinaasid hüdrolüüsida. Mõlemad järjestused valiti lähtudes R. Tsieni uurimisgrupi tööst [40].

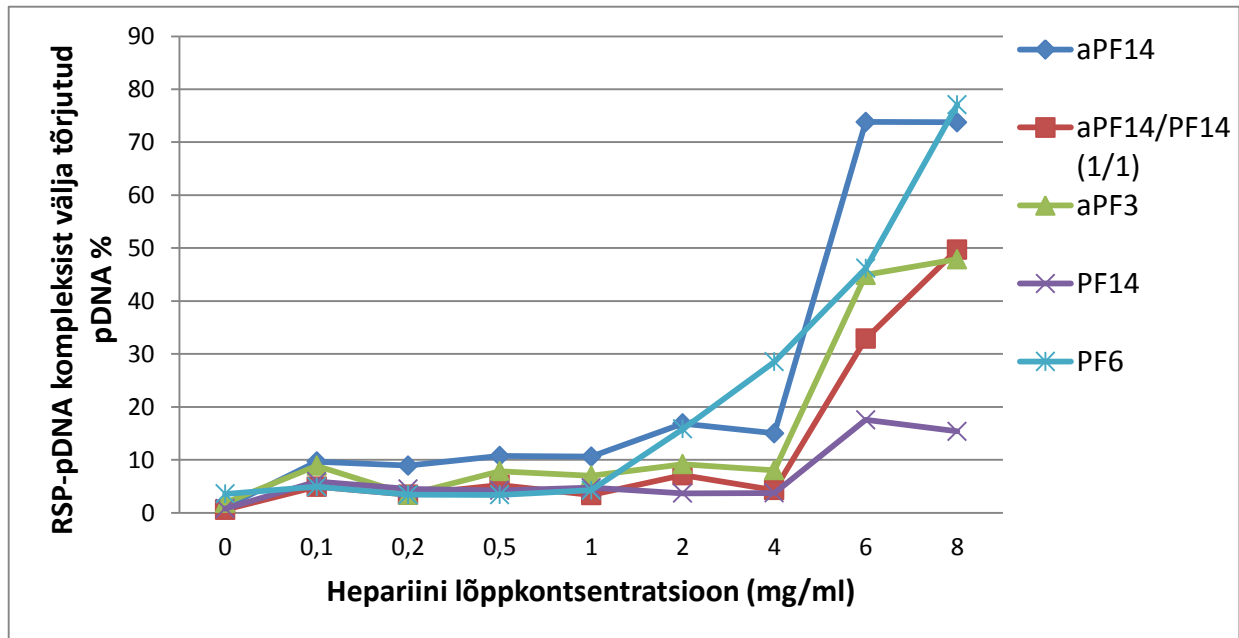
4.2 RSP-pDNA komplekside omadused

Hüdrodünaamiline diameeter on oluline nanokomplekse iseloomustav karakteristik, mille optimaalne vahemik on *in vivo* kasutatavuse seisukohast 10-150 nm. RSP-pDNA komplekside hüdrodünaamiline keskmine diameeter mõõdeti laengusuhtel 3:1 ning kompleksid olid moodustatud MQ vees. Mõõtmiseks valiti aPF3, aPF14 ning aPF14/PF14 segakompleksid. Tulemused (tabel 4) näitasid, et osakeste diameetrid jäid vahemikku 75-87 nm ning moodustunud kompleksid olid monodisperssed.

Tabel 4. RSP-pDNA komplekside hüdrodünaamilised diameetrid ning polüdisperssuse indeksid (PDI).

Peptiid	Keskmine diameeter (nm±SD)	PdI
aPF3	75,8±1,7	0,122
aPF14	81,8±2,8	0,179
aPF14/PF14 (1/1)	86,7±1,4	0,189

Analüüsimaaks RSP-pDNA komplekside stabiilsust, lisati pärast komplekside moodustumist neile hepariini soola ning PicoGreeni. Hepariin tõrjub RSP-pDNA kompleksidest pDNA välja ning olenevalt sellest, kui tugevad on RSP ning pDNA vahelised interaktsioonid, on pDNA väljatõrjumiseks vaja erinevat hepariini kogust. PicoGreen on fluorofoor, mille fluorestseeruvad omadused tugevnevad DNAGA seondumisel. RSP-pDNA kompleksides olevale DNA-le ei pääse PicoGreeni molekulid ligi ning seega väljendab fluorestsentsi intensiivsus kompleksidest välja tõrjutud pDNA hulka. Nagu saab näha jooniselt 3, on 6 mg/ml hepariini kontsentratsiooni juures üle 70% aPF14 kompleksidest lagunenu, kuid PF14 kompleksidest on lagunenu alla 20%. See viitab asjaolule, et PEG molekulid vähendavad komplekside stabiilsust, tõkestades RSP ja pDNA vahelisi interaktsioone. Segades kokku võrdsel hulgal aPF14 ning PF14, saadakse segakompleksid, mille stabiilsus on mõlema komponendi vahepealne. Aktiveeritav PF3 moodustab tugevamaid komplekse kui aPF14. Kõikide analüüsitud RSP-pDNA komplekside stabiilsus on *in vitro* ning *in vivo* rakendusteks piisav.



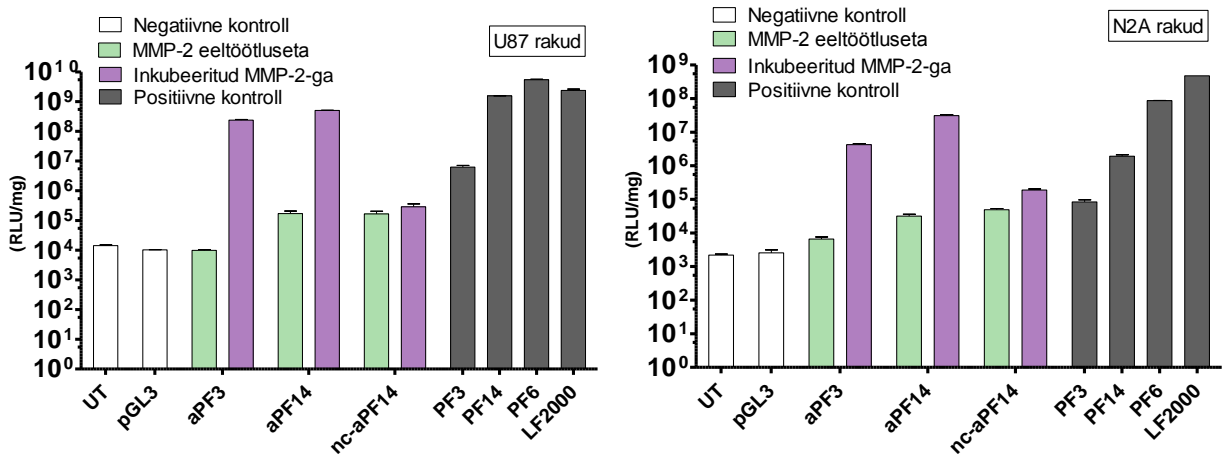
Joonis 3. Komplekside lagunemine hepariini lisamisel. 100% vastab olukorrale, kus kogu pDNA on kompleksist välja tõrjutud.

4.3 *In vitro* transfektsioon

Aktiveeritavate raku sisenevate peptiidide (aRSP) transfektsioonimaduste kirjeldamiseks uuriti nende võimet toimetada lutsiferaasi kodeerivat pGL3 plasmidi rakutuuma. Nende katsetega sooviti saada vastuseid järgnevatele küsimustele: kas PEG molekul suudab RSP aktiivsust piisaval määral pärssida ning kas aRSP töötlemine MMP-2 ensüümiga taastab RSP transfektsioonivõime?

Leidmaks nendele küsimustele vastuseid, transfektsiooni inimese glioblastoomi (U87) ning hiire neuroblastoomi (N2A) rakke aRSP-pDNA kompleksidega (laengusuhtel 3:1). Rakke töödeldi nii aRSP-pDNA komplekside kui ka eelnevalt MMP-2 ensüümiga inkubeeritud kompleksidega. Positiivse kontrollina kasutati võrdluseks PF3, PF6, PF14 ning transfektsioonireagenti Lipofectamine 2000 (LF2000). Negatiivseks kontrolliks olid töötlemata (UT – *untreated*) ning puhta pGL3 plasmiidiga töödeldud rakud. Nagu tulemustest näha (joonis 4), pärssib PEG raku sisenevate peptiidide aktiivsust, aPF3 bioloogiline aktiivsus jääb negatiivsete kontrollidega samale tasemele ning transfektsiooni praktiliselt ei toimu. Nc-aPF14 ning aPF14 suudavad rakke mingil määral transfektsioneerida, kuid nende bioloogiline aktiivsus jääb PF14-le siiski oluliselt alla. Kui PEG MMP-2-ga inkubeerides maha lõigata, kasvab transfektsiooniefektiivsus aPF3 korral

sõltuvalt rakuliinist umbes 21000 (U87 rakuliin) ja 500 (N2A rakuliin) korda ning aPF14 korral vastavalt 3000 ja 1000 korda, jõudes peaaegu samale tasemele modifitseerimata PF3 ning PF14 aktiivsustega. See näitab, et PEG molekuli eemaldamine taastab RSP aktiivsuse. Kontrollpeptiidi, nc-aPF14 eeltöötlemisel MMP-2-ga erist transfektsiooni suurenemist näha ei ole, mis kinnitab, et RSP aktiivsuse taastumine on tingitud PEG molekuli eemaldamistst MMP-2 ensüümi poolt.

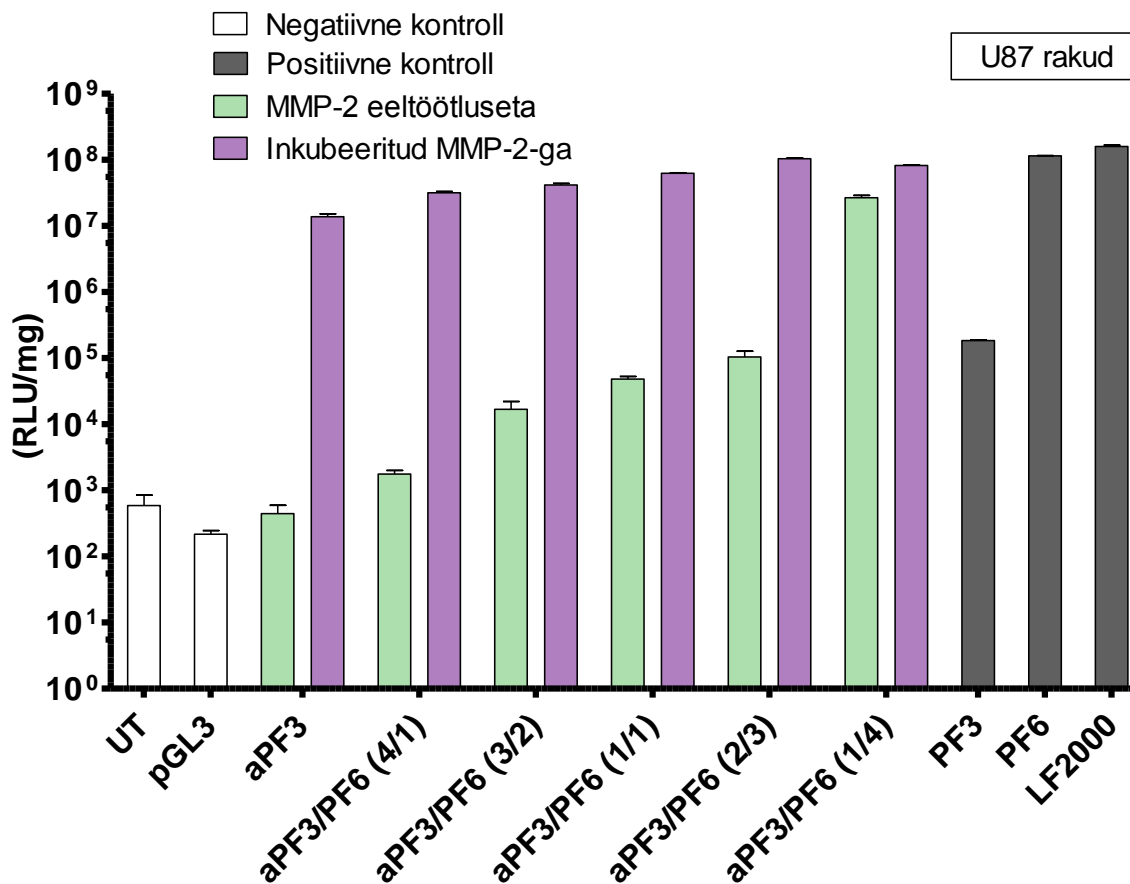


Joonis 4. pGL3 transfektsioon U87 ning N2A rakkudes. Tulemused RLU-des (*relative luminescence unit*) on normaliseeritud vastavalt proovi valgusisaldusele.

Ensüümiga töötlemata aPF14 bioloogiline aktiivsus peaks siiski jääma negatiivsete kontrollidega samale tasemele. Kõrgem aktiivsus viitab asjaolule, et PEG molekul ei suuda PF14 aktiivsust piisavalt pärssida. Ensüümiga töötlemata aPF14 kõrgemast bioloogilisest aktiivsusest hoolimata näeme siiski ensüümaktivatsiooni.

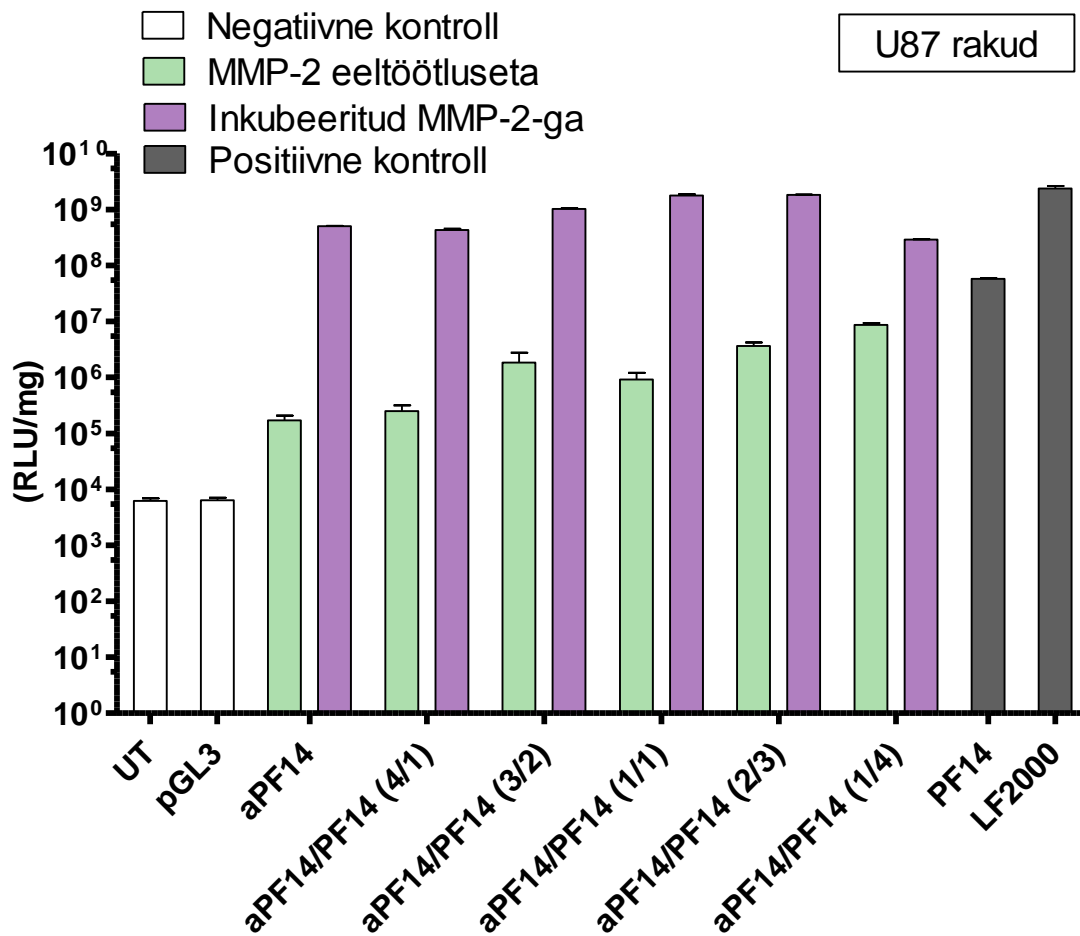
PF3 bioloogiline aktiivsus on küllaltki madal. Selle tõttu tuleb kõrgema transfektsiooniefektiivsuse saavutamiseks aPF3-e kasutada koos PF6-ga, mille transfektsioonivõime on parem. Leidmaks optimaalset PF6 osakaalu (võimalikult madal aktiivsus ensüümiga töötlemata kujul ning võimalikult kõrge transfektsiooniefektiivsus pärast ensüümiga aktiveerimist), töödeldi rakke aPF3/PF6-pGL3 segakompleksidega, milles varieeriti PF6 sisaldust. Saadud tulemused (joonis 5) näitavad, et ühes PF6 osakaalu suurenemisega kasvab nii ensüümiga aktiveeritud kui ka aktiveerimata komplekside bioloogiline aktiivsus. See tähendab, et PF6 sisaldust ei saa suurendada lõputult, kuna muidu muutub ka “inaktiveeritud”

kompleksi aktiivsus liiga suureks ning kaob spetsiifilisus. Lähtudes saadud tulemustest valiti *in vivo* katsete jaoks esialgu segakompleksid, kus aPF3 ning PF6 on lisatud võrdses hulgas.



Joonis 5. PF6 osakaalu varieerimine aPF3/PF6 segakompleksides.

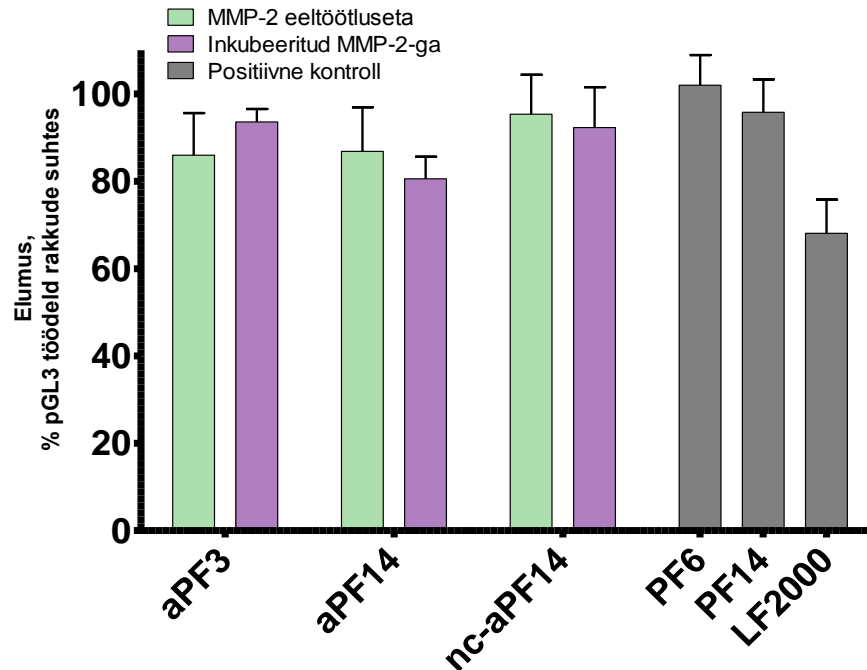
Kuigi aPF14 aktiivsus pärast ensüümiga inkubeerimist oli juba piisavalt kõrge, otsustati siiski ka sellega sarnased katsed läbi viia ning U87 rakkudel testiti segakomplekse, mis sisaldasid erineval määral modifitseerimata PF14. Saadud tulemustes (joonis 6) avaldus sarnane pilt eelmise katsega: modifitseerimata PF14 osakaalu suurendamine tõstab segakompleksi aktiivsust ning vähendab spetsiifilisust.



Joonis 6. PF14 osakaalu varieerimine aPF14/PF14 segakompleksides.

4.4 Tsütotoksilisus

Rakku sisenevate peptiidide kasutamisel transportvektoritena on olulise tähtsusega ka nende madal toksilisus. See võib RSP-de kasutamisel olla seotud näiteks peptiidi rakku tungimisel tekkivate plasmamembranai häiretega, mille tõttu on oluline RSP-de toksilist mõju uurida. Antud uuringus hinnati erinevate RSP-pGL3 komplekside mõju U87 rakkude elumusele. Saadud tulemused (joonis 7) näitavad, et kasutatud RSP-d on valdavalt vähese toksilisusega. Aktiveeritavatest RSP-dest avaldab kõige suuremat toksilist mõju aPF14, mida on ensüümiga eelnevalt töödeldud. Kõik uuritud RSP-d on siiski vähem toksilised kui Lipofectamine 2000.



Joonis 7. RSP-pDNA tsütotoksilisus U87 rakkudes. Tulemused normaliseeriti puhta pGL3-ga töödeldud rakkude suhtes, et rõhutada vaid RSP-dest tulenevat toksilisust (100% vastab puhta pGL3-ga töödeldud rakkude elumusele).

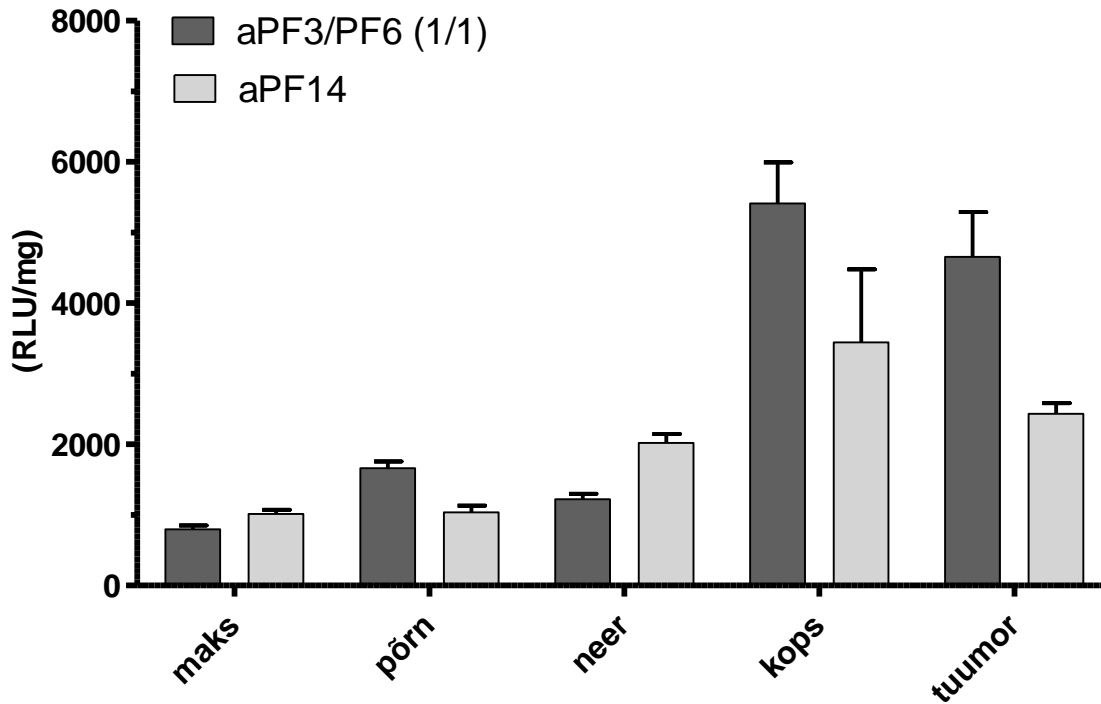
4.5 *In vivo* geeniinduktsioon

Järgnevalt testiti aRSP-de lutsiferaasi reportergeeni induksioonivõimet ning kasvajaspetsiifilisust loomudeli abil. Kuna aktiveerimata kujul ei tohiks aRSP rakkudesse siseneda, peaks lutsiferaasi ekspressiooni nägema peamiselt just kasvajas, mille poolt sekreteeritud MMP-2 ensüüm suudab sinna sattunud kompleksid aktiveerida.

Hiirtel indutseeriti kasvajakasvaja N2A rakkudega. Tekkinud N2A tuumorid olid hiirte lihaskoega hästi integreerunud ning omasid veresoonestikku.

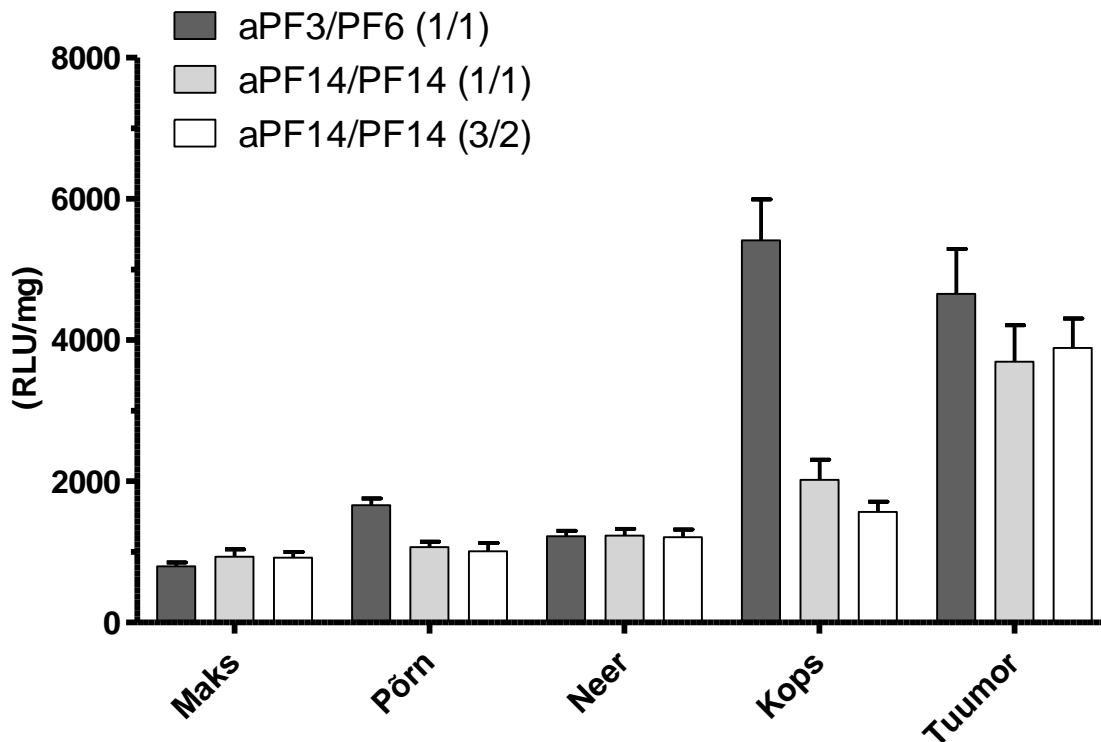
Esialgu uuriti aPF3/PF6-pDNA segakomplekside ning aPF14-pDNA komplekside geeniinduktsiooni võimet. Iga peptiidi korral kasutati RSP:pDNA laengusuhet 4:1 ning aPF3/PF6 segakompleksides oli mõlemat peptiidi lisatud võrdsel määral. Nagu jooniselt 8 näha, on aPF3/PF6 segakomplekside aktiivsus suurem aPF14 aktiivsusest ning lutsiferaasi ekspressiooni tase on kasvajakoes kõrgem, mis viitab kasvajaspetsiifilisuse olemasolule. Kahjuks on lutsiferaasi ekspressioon kõrge ka kopsus, mis võib tähendada, et antud segakompleksid on

kopsu rakkudele toksilised. Kompleksid, mis koosnesid vaid aPF14-st ning pDNAst ei näita erilist kasvajaspetsiifilisust, küll aga transfekteevad ka nemad vähesel määral kopsurakke.



Joonis 8. aPF14 ning aPF3/PF6 võime indutseerida geeniekspressiooni *in vivo*. 20 µg pDNA i.v. (intravenoosselt) 24h pärast süstimist.

Kuna sajabrotsendilise aPF14 sisaldusega kompleksid ei indutseerinud soovital tasemel geeniekspressiooni, otsustati testida ka aPF14/PF14 segakomplekside omadusi. Valmistati aPF14/PF14-pDNA segakompleksid nii mõlema peptiidi võrdse osakaalu (1/1) kui ka aPF14 kerge ülekaaluga (3/2). Nagu tulemustest näha (joonis 9), on segakompleksidel arvestatav kasvajaspetsiifilisus, mõlema aPF14 osakaalu korral on lutsiferaasi aktiivsus eelkõige näha just kasvajarakkudes ning nad ei näita nii suurt kopsuekspressiooni kui aPF3/PF6 segakompleksid. Maksa-, põrna- ning neerurakkudesse aRSP-d praktiliselt ei sisene, mis näitab, et tegu on potentsiaalse kasvajaspetsiifilise transfektsioonireagendiga.



Joonis 9. aPF14/PF14 ning aPF3/PF6 võime indutseerida geeniekspressiooni *in vivo*. 20 µg pDNA i.v. 24h pärast süstimist.

Põhjuseid, miks aPF14/PF14 segakomplekside aktiivsus on puhta aPF14 komplekside aktiivsusest suurem, võib olla mitmeid. Kuigi hepariini katsed näitasid, et aPF14 moodustab küllaltki stabiilseid komplekse, võivad nad bioloogilises koes siiski liiga kergesti laguneda. Teine, tõenäolisem põhjus on asjaolu, et aPF14 kompleksidele, milles iga peptiidimolekul on pegüleeritud, ei pääse MMP-2 nii hästi ligi ning modifitseerimata PF14 lisamine lihtsustab ensüümi ligipääsu oma lõikesaidile.

5 Kokkuvõte

Magistritöö eesmärgiks oli sünteesida maatriks-metalloproteinaas-2 poolt aktiveeritavaid kasvajaspetsiifilisi rakku sisenevaid peptiide (aRSP) ning testida nende füsikoemilisi omadusi ja geeniinduktsioonivõimet nii rakukultuuridel kui ka loomudelitel.

Püstitatud eesmärgid said täidetud, sünteesiti aktiveeritavad rakku sisenevad peptiidid aPF3, aPF14 ning kontrollpeptiid nc-aPF14. Füsiokoemiliste uuringutega näidati, et valmistatud aRSP-d on võimelised pDNA-ga komplekse moodustama, moodustunud komplekside suurus langeb sobivasse vahemikku ning interaktsioonid peptiidi ja pDNA vahel on tugevad. Transfektsioonikatsed rakukultuuridega kinnitasid, et PEG molekul suudab RSP aktiivsust inhibeerida ning maatriks-metalloproteinaas-2-ga inkubeerimisel RSP transfektsioonivõime taastub. Tsütotoksilisuse katse tulemused näitasid, et sünteesitud peptiidid on küllaltki vähetoksilised ning sobivad rakendamiseks loomudelitel. *In vivo* katsetes leiti kinnitus aktiveeritavate RSP-de kasvajaspetsiifilisusele. Kuigi RSP-pDNA kompleksid, mis sisaldasid ainult aktiveeritavaid peptiide, erilist bioloogilist aktiivsust ei näidanud, suutsid aRSP segakompleksid modifitseerimata RSP-dega indutseerida geeniekspressiooni selektiivselt ainult kasvaja rakkudes. Kuigi aPF3/PF6 segakompleksid sisenesid lisaks kasvajale küllalt palju ka kopsurakkudesse, on ilmselt võimalik selle süsteemi efektiivsust aPF3/PF6 osakaalu varieerimisega suurendada. PF14/aPF14 segakompleksid indutseerisid geeniekspressiooni enamasti ainult kasvajarakkudes. Edasiseks perspektiiviks on reportergeeni asendamine terapeutilise geeniga, et näha, kas aRSP-del baseeruvad transportsüsteemid suudavad esile kutsuda kasvaja suuruse vähenemist.

6 Kasutatud kirjandus

1. American Society of Gene and Cell Therapy. *Terminology*; http://www.asgct.org/about_gene_therapy/terminology.php#G viimati alla laetud 02.05.2014.
2. Giacca, M. *Gene Therapy*; Springer-Verlag: Milano, 2010, pp 1-63.
3. Taira, K. *Non-viral Gene Therapy: Gene Design and Delivery*; Springer-Verlag: Tokyo, 2005, pp 3-5.
4. Kay, M. A.; Woo, S. L. C. Gene-therapy for Metabolic Disorders. *Trends Genet.* **1994**, 10, 253-257.
5. Thomas, C. E.; Ehrhardt, A.; Kay, M. A. Progress and Problems With the Use of Viral Vectors for Gene Therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, 4, 346-358.
6. Merdan, T.; Kopecek, J.; Kissel, T. Prospects for Cationic Polymers in Gene and Oligonucleotide Therapy Against Cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 715-758.
7. El-Aneed, A. An Overview of Current Delivery Systems in Cancer Gene Therapy. *J. Control. Release.* **2004**, 94, 1-14.
8. Pack, D. W.; Hoffman, A. S.; Pun, S.; Stayton, P. S. Design and Development of Polymers for Gene Delivery. *Na. Rev Drug Discov.* 2005, 4, 581-593.
9. Pathak, A.; Patnaik, S.; Gupta, K. C. Recent Trends in Non-viral Vector-mediated Gene Delivery. *Biotechnol J.* **2009**, 4, 1559-72.
10. Robbins, P. D.; Tahara, H.; Ghivizzani, S. C. Viral Vectors for Gene Therapy. *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, 35-40.
11. Glover, D. J.; Lipps, H. J.; Jans, D. A. Towards Safe, Non-viral Therapeutic Gene Expression in Humans. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, 6, 299-311.
12. Romano, G.; Mitcheli, P.; Pacilio, C.; Giordano, A. Latest Developments in Gene Transfer Technology: Achievements, Perspectives and Controversies Over Therapeutic Applications. *Stem Cells.* **2000**, 18, 19-39.
13. Gao, X.; Kim, K. S.; Liu, D.X. Nonviral Gene Delivery: What We Know and What is Next. *AAAPS J.* **2007**, 9, E92-E104.

14. Yang, N.S.; Burkholder, J.; Roberts, B.; Martinell, B.; McCabe, D. In vivo and In vitro Gene-transfer to Mammalian Somatic-cells by Particle Bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 9568-9572.
15. Zhang, G.; Gao, X.; Song, Y. K.; Vollmer, R.; Stolz, D. B.; Gasiorowski, J. Z.; Dean, D. A.; Liu, D. Hydroporation as the Mechanism of Hydrodynamic delivery. *Gene Therapy*. 2004, 11, 675-682.
16. Wang, W.; Li, W.; Ma, N.; Steinhoff, G. Non-Viral Gene Delivery Methods. *Curr Pharm Biotechnol.* **2013**, 14, 46-60.
17. Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. Lipofection – A Highly Efficient, Lipid-mediated DNA-transfection Procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, 84, 7413-7417.
18. Thomas, M.; Klibanov, A. M. Non-viral Gene Therapy: Polycation-mediated DNA Delivery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 62, 27-34.
19. Heitz, F.; Morris, M. C.; Divita, G. Twenty Years of Cell-penetrating Peptides: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 157, 195-206.
20. Frankel, A. D.; Pabo, C. O. Cellular Uptake of the Tat Protein From Human Immunodeficiency Virus. *Cell.* **1988**, 55, 1189-1193.
21. Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostinibazin, H.; Prochiantz, A. Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, 88, 1864-1868.
22. Joliot, A.; Prochiantz, A. Transduction Peptides: From Technology to Physiology. *Nat. Cell. Biol.* **2004**, 6, 189-196.
23. Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The 3rd Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates Through Biological-Membranes. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 10444-10450.
24. Vives, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates Through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 16010-16017.
25. Pooga, M.; Hallbrink, M.; Zorko, M.; Langel, U. Cell Penetration by Transportan. *FASEB J.* **1998**, 12, 67-77.

26. Rothbard, J. B.; Garlington, S.; Lin, Q.; Kirschberg, T.; Kreider, E.; McGrane, P. L.; Wender, P. A.; Khavari, P. A. Conjugation of Arginine Oligomers to Cyclosporin A Facilitates Topical Delivery and Inhibition of Inflammation. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1253-1257.
27. Mae, M.; Langel, U. Cell-penetrating Peptides as Vector for Peptide, Protein and Oligonucleotide Delivery. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 509-514.
28. Rennert, R.; Neundorff, I.; Jahnke, H. G.; Suchowerskyj, P.; Dournaud, P.; Robitzki, A.; Beck-Sickinger, A. G. Generation of Carrier Peptides for the Delivery of Nucleic Acid Drugs in Primary Cells. *ChemMedChem.* **2008**, *3*, 241-253.
29. Zorko, M.; Langel, U. Cell-penetrating Peptides: Mechanism and Kinetics of Cargo Delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *27*, 529-545.
30. Ziegler, A. Thermodynamic Studies and Binding Mechanisms of Cell-penetrating Peptides with Lipids and Glycosaminoglycans. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 580-597.
31. Lee, S. H.; Castagner, B.; Leroux, J. C. Is there a Future for Cell-penetrating Peptides in Oligonucleotide Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 5-11.
32. Vives, E.; Schmidt, J.; Pelegrin, A. Cell-penetrating and Cell-targeting Peptides in Drug Delivery. *BBA-rev Cancer.* **2008**, *1786*, 126-138.
33. Deshayes, S.; Gerbal-Chaloin, S.; Morris, M. C.; Aldrian-Herrada, G.; Charnet, P.; Divita, G.; Heitz, F. On the Mechanism of Non-endosomal Peptide-mediated Cellular Delivery of Nucleic Acids. *BBA-Biomembranes.* **2004**, *1667*, 141-147.
34. Soomets, U.; Lindgren, M.; Gallet, X.; Hallbrink, M.; Elmquist, A.; Balaspiri, L.; Zorko, M.; Pooga, M.; Brasseur, R.; Langel, U. Deletion Analogues of Transportan. *BBA-Biomembranes.* **2000**, *1467*, 165-176.
35. Mae, M.; El Andaloussi, S.; Lundin, P.; Oskolkov, N.; Johansson, H. J.; Guterstam, P.; Langel, U. A Stearylated CPP for Delivery of Splice Correcting Oligonucleotides Using a Non-covalent Co-incubation Strategy. *J Control Release.* **2009**, *134*, 221-227.
36. Andaloussi, S. E. L.; Lehto, T.; Mager, I.; Rosenthal-Aizman, K.; Oprea, I. I.; Simonson, O. E.; Sork, H.; Ezzat, K.; Copolovici, D. M.; Kurrikoff, K.; Viola, J. R.; Zaghloul, E. M.; Sillard, R.; Johansson, H. J.; Hassane, F. S.; Guterstam, P.; Suhorutsenko, J.; Moreno, P. M. D.; Oskolkov, N.; Halldin, J.; Tedebark, U.; Metspalu, A.; Lebleu, B.;

- Lehtio, J.; Smith, C. I. E.; Langel, U. Design of a Peptide-based Vector, PepFect6, for Efficient Delivery of siRNA in Cell Culture and Systemically in vivo. *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39, 3972-3987.
37. Ezzat, K.; El Andaloussi, S.; Zaghoul, E. M.; Lehto, T.; Lindberg, S.; Moreno, P. M. D.; Viola, J. R.; Magdy, T.; Abdo, R.; Guterstam, P.; Sillard, R.; Hammond, S. M.; Wood, M. J. A.; Arzumanov, A. A.; Gait, M. J.; Smith, C. I. E.; Hallbrink, M.; Langel, U. PepFect14, a Novel Cell-penetrating Peptide for Oligonucleotide Delivery in Solution and as Solid Formulation. *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39, 5284-5298.
38. Huang, YZ.; Jiang, YF.; Wang, HY.; Wang, JX.; Shin, M. C.; byun, Y.; He, HN.; Liang, YQ.; Yang, V. C. Curb Challenges of the „Trojan Horse“ Approach: Smart Strategies in Achieving Effective yet Safe Cell-penetrating Peptide-based Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 64, 1299-1315.
39. Westermarck, J.; Kahari, V. M. Regulation of Matrix Metalloproteinase Expression in Tumor Invasion. *FASEB J.* **1999**, 13, 781-792.
40. Jiang, T.; Olson, E. S.; Nguyen, Q. T.; Roy, M.; Jennings, P. A.; Tsien, R. Y. Tumor Imaging by Means of Proteolytic Activation of Cell-penetrating Peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 17867-17872.
41. Zhu, L.; Kate, P.; Torchilin, V. P. Matrix Metalloprotease 2-Responsive Multifunctional Liposomal Nanocarrier for Enhanced Tumor Targeting. *ACS Nano.* **2012**, 6, 3491-3498.
42. Merrifield, R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
43. Howl, J. *Peptide Synthesis and Applications*; Humana Press: Totowa, New Jersey, 2005, pp 3-16.
44. Bailey, P. D. *An Introduction to Peptide Chemistry*; Wiley: Chichester, 1990, pp 1-7.
45. Bodanszky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, 2nd ed.; Springer-verlag: Berlin, Heidelberg, 1993.
46. Chan, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*; Oxford University Press: Oxford, 2000, p. 15.

7 Summary

Kadri Künnapu

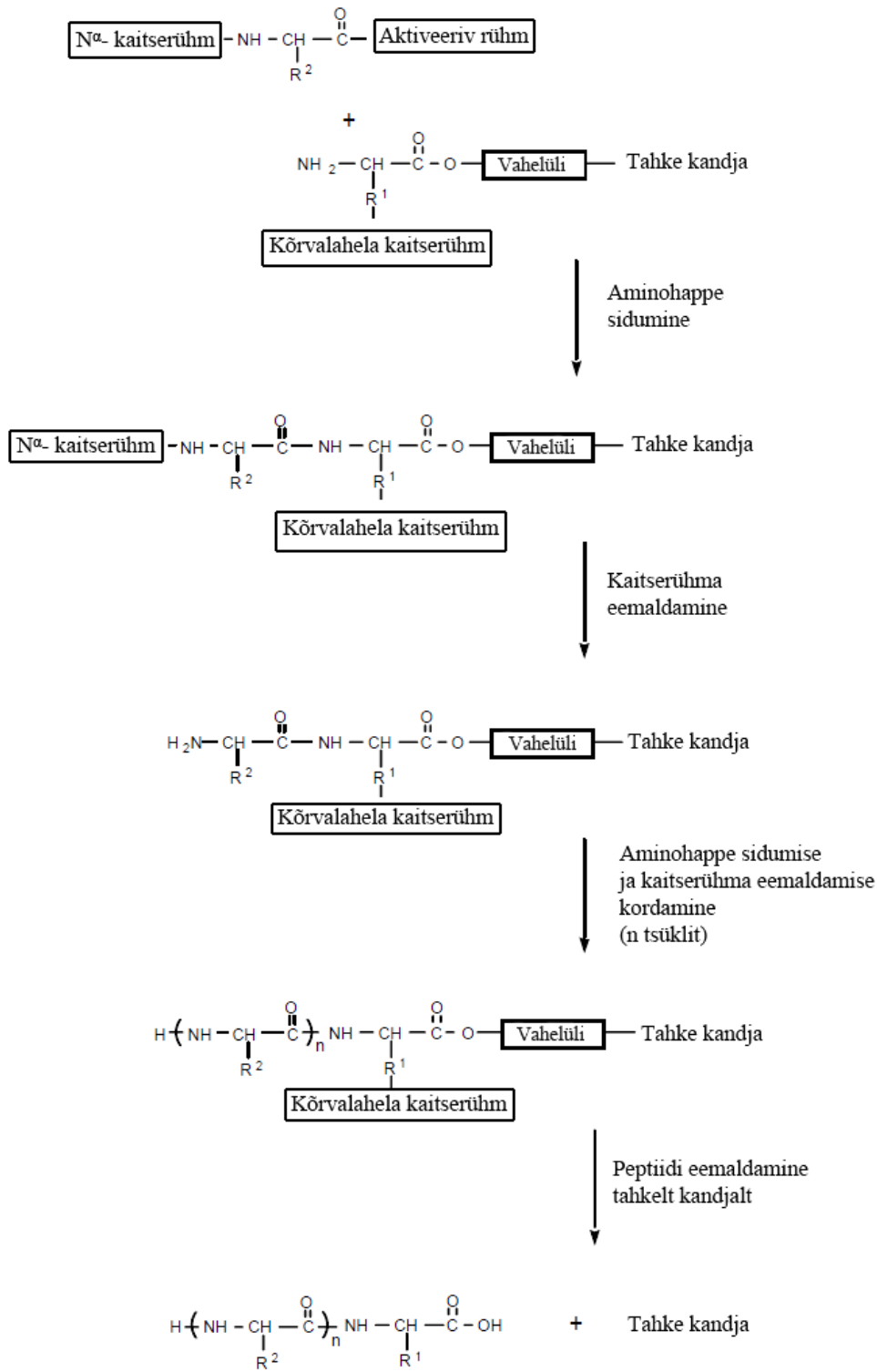
Synthesis of cell penetrating peptides and using them for gene transport in *in vitro* and *in vivo* conditions

The aim of this Master's thesis was to synthesise matrix-metalloproteinase-2 activatable tumour specific cell penetrating peptides (aCPP) and test their physicochemical properties and gene induction ability on both cell culture and animal models.

The objectives were completed, activatable cell penetrating peptides aPF3, aPF14 and a control peptide nc-aPF14 were synthesised. Physicochemical studies showed, that the synthesised aCPPs are able to form complexes with pDNA, the formed complexes are monodisperse, their size falls to an appropriate range and the interactions between the peptide and pDNA are strong. Transfection experiments confirmed that the PEG molecule can inhibit the activity of CPPs and after incubating the complexes with matrix-metalloproteinase 2, transfection ability of CPPs is recovered. Cytotoxicity experiments show that the synthesised peptides are rather non-toxic and are applicable for use on animal models. The *in vivo* experiments confirmed the tumor specificity of activatable CPPs. Although the CPP-pDNA complexes that included only activatable peptides, didn't show much biological activity, mixed complexes that incorporated aCPPs and unmodified CPPs were able to induce gene expression selectively in tumor cells. Although aPF3/PF6 mixed complexes entered lung cells in addition to tumor cells, it is probably possible to increase the efficiency of this system by varying aPF3 and PF6 ratios. PF14/aPF14 mixed complexes induced gene expression mainly in tumor tissue. A further perspective is to replace the reporter gene with a therapeutic gene to see whether gene transport systems based on aCPPs are effective at reducing tumour size.

8 LISAD

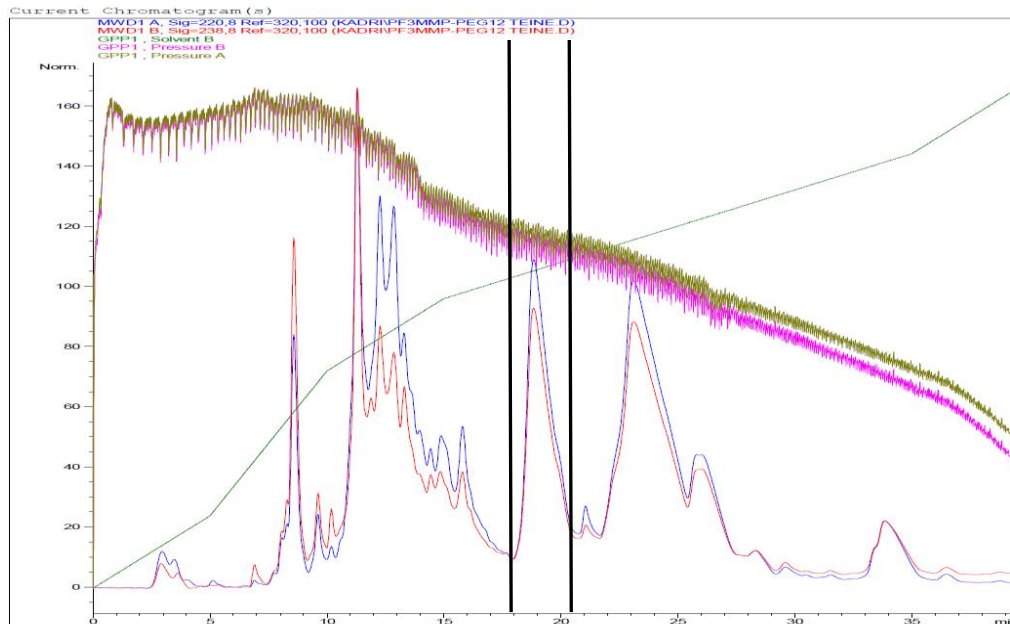
LISA 1



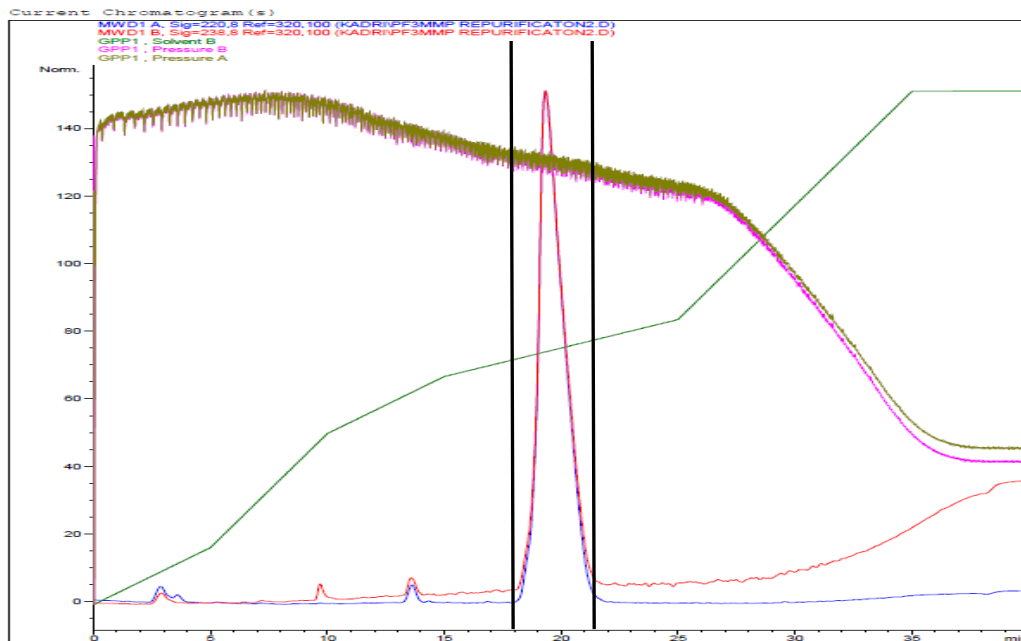
Joonis 10: Tahke faasi peptidisünteesi põhimõte.

LISA 2

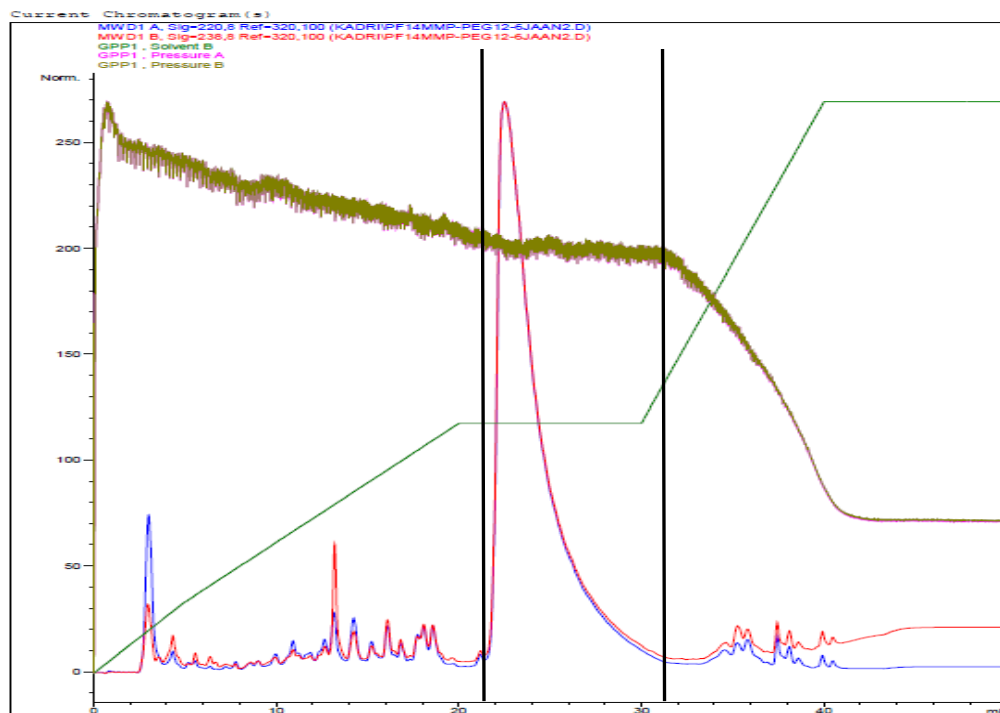
Sünteesiproductide preparatiivse RP-HPLC-ga puhastamisel saadud kromatogrammid.



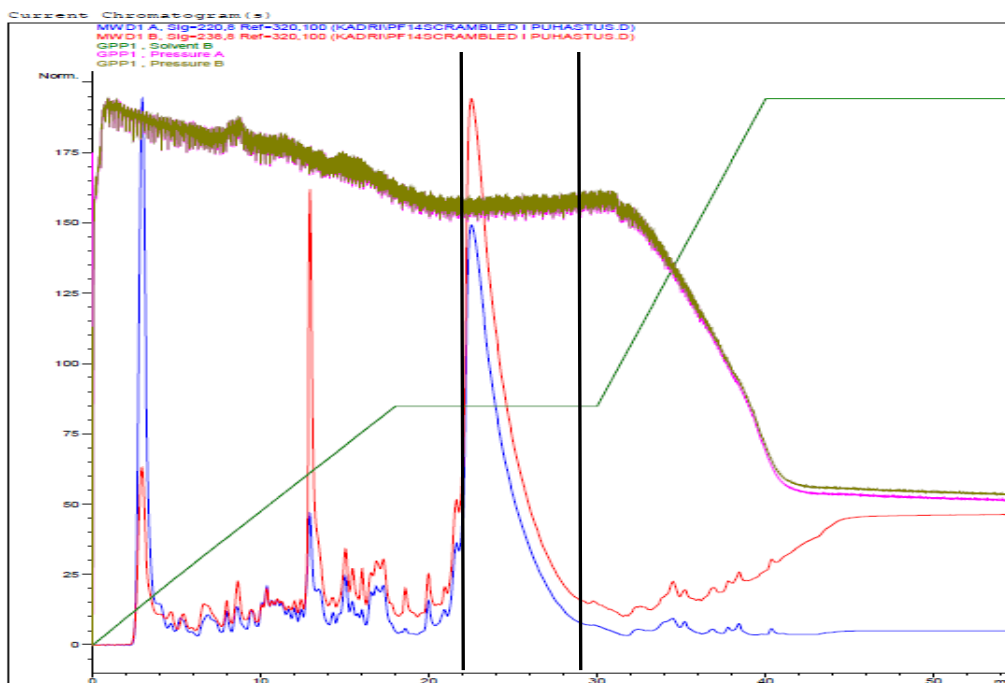
Joonis 11. aPF3 esimene puhastus preparatiivse RP-HPLC-ga. Kogutud aPF3 sisaldav fraktsioon on kahe vertikaalse musta joone vahel.



Joonis 12. aPF3 korduspuhastus preparatiivse RP-HPLC-ga. Kogutud aPF3 sisaldav fraktsioon on kahe vertikaalse musta joone vahel.



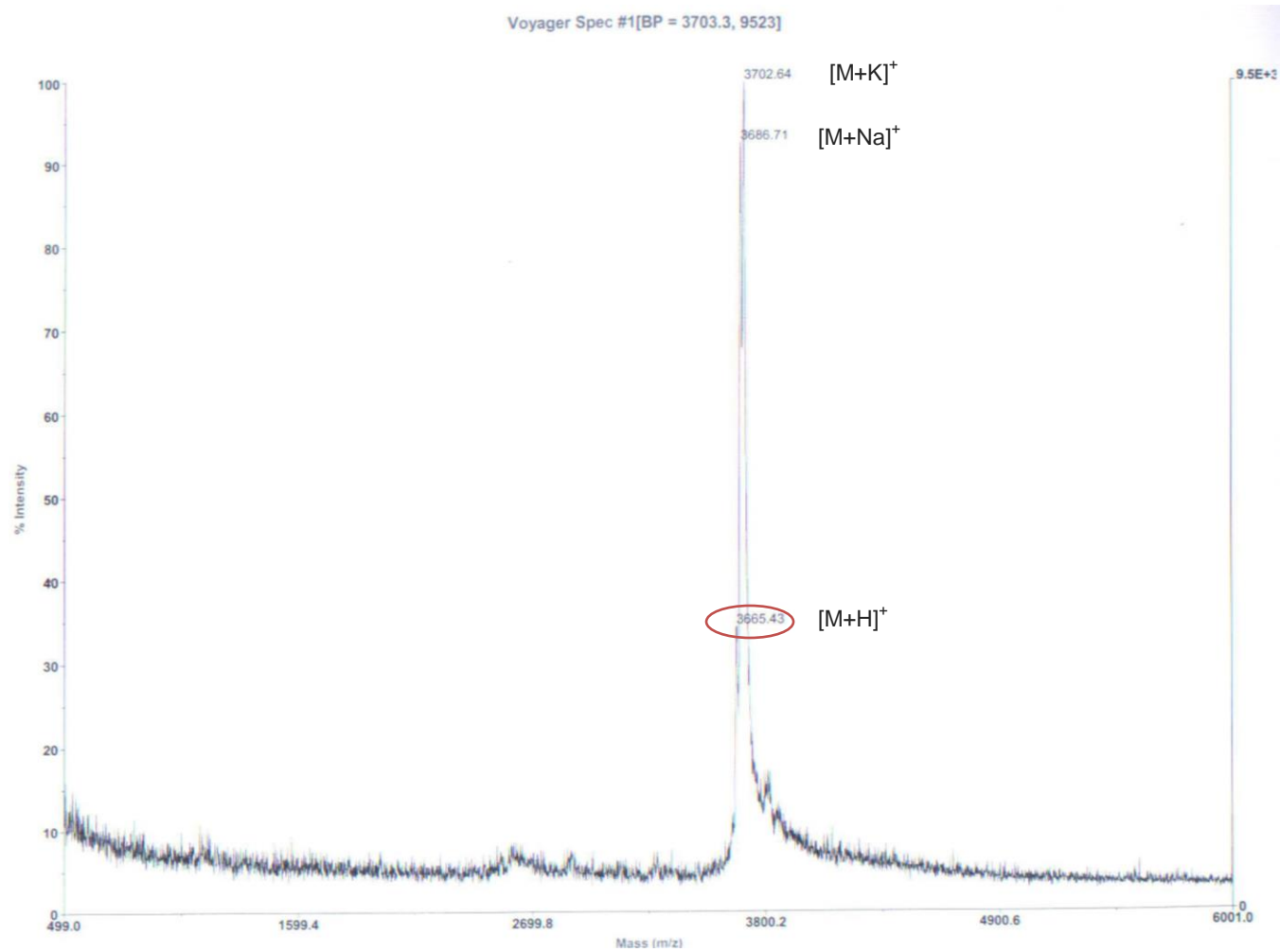
Joonis 13. aPF14 esimene puhastus preparatiivse RP-HPLC-ga. Kogutud aPF14 sisaldav fraktsioon on kahe vertikaalse musta joone vahel.



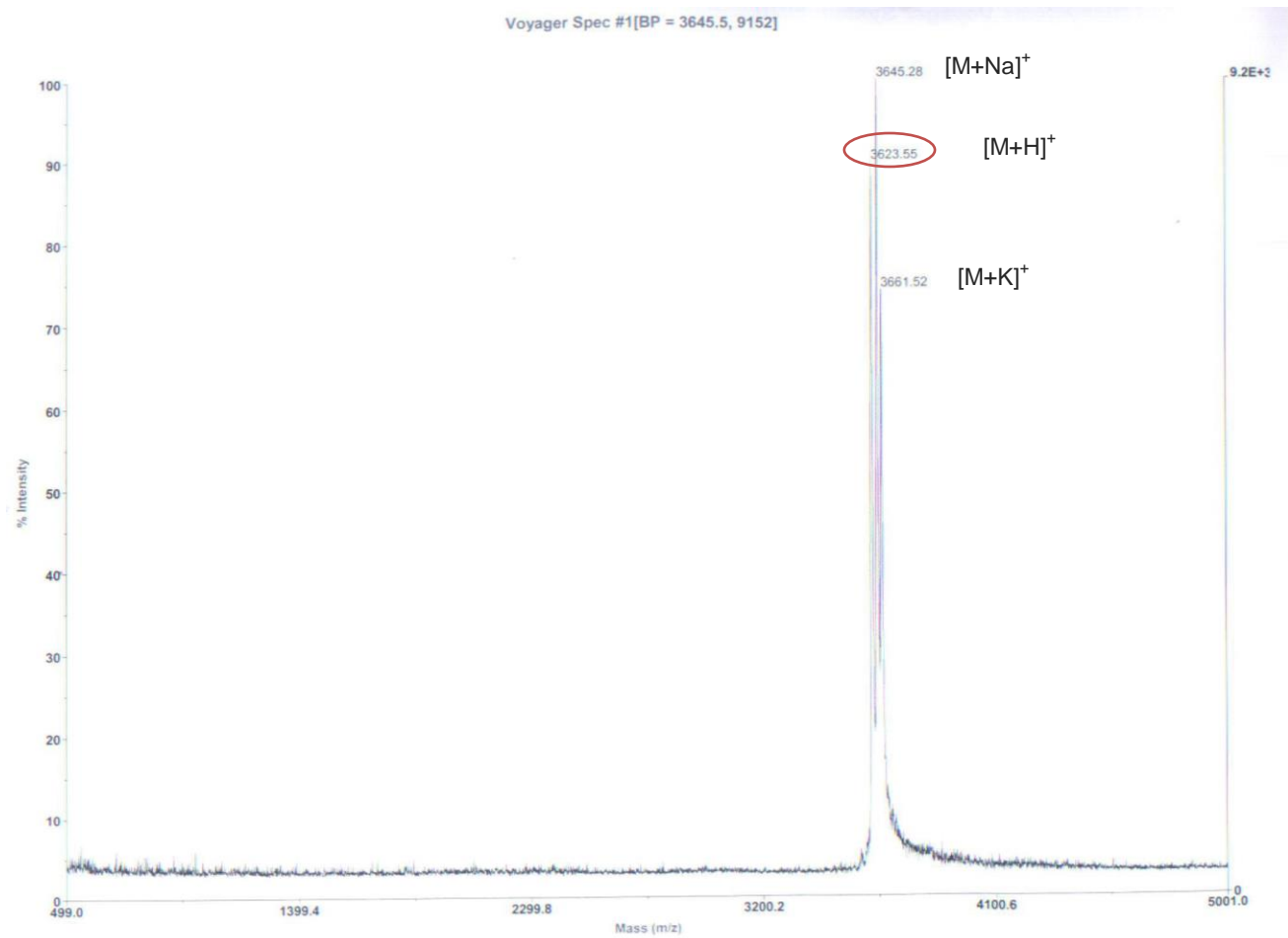
Joonis 14. nc-aPF14 esimene puhastus preparatiivse RP-HPLC-ga. Kogutud nc-aPF14 sisaldav fraktsioon on kahe vertikaalse musta joone vahel.

LISA 3

Sünteesiproduktide MALDI-TOF massispektrid pärast puhastamist.

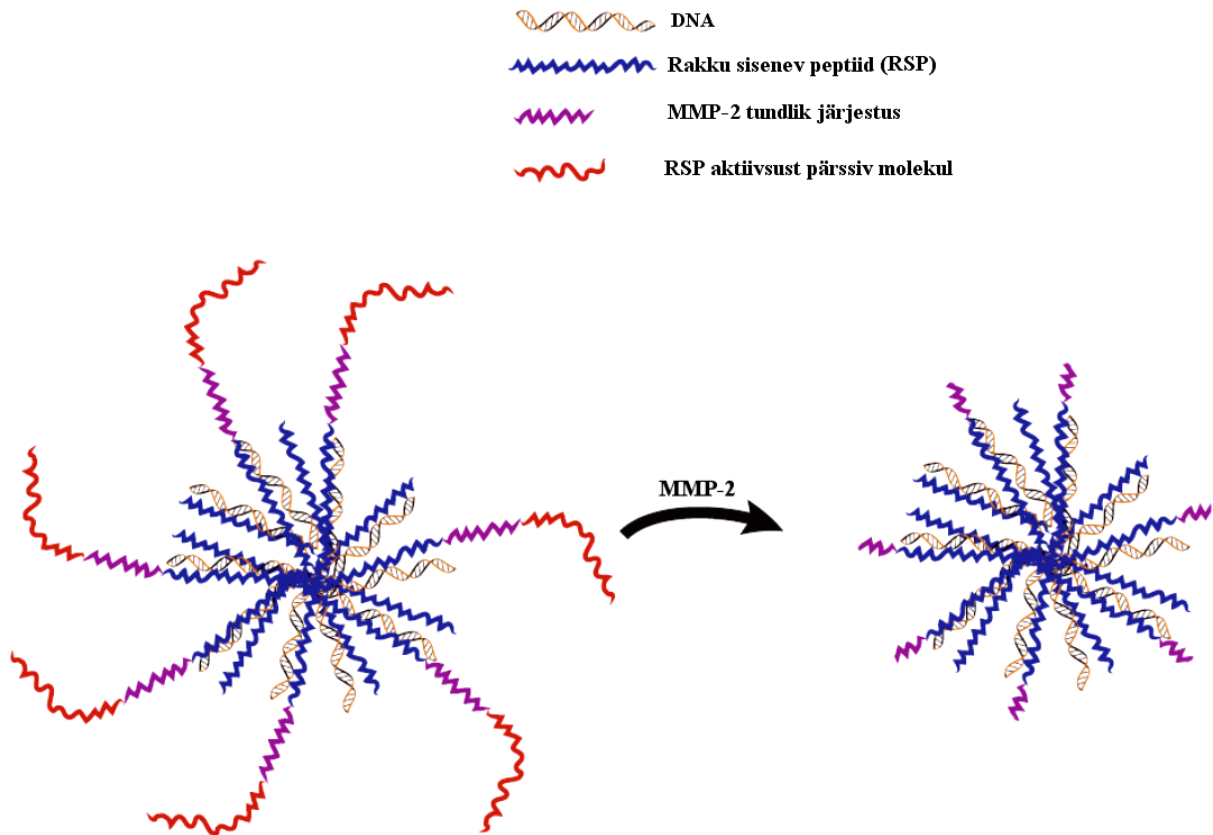


Joonis 15. aPF3 massispekter.



Joonis 16. aPF14 massispekter.

LISA 4



Joonis 17. aRSP-DNA kompleksi aktiveerimise lihtsustatud põhimõtteskeem. Näidatud on olukord, kus moodustatud on aRSP/RSP segakompleksid.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kadri Künnapuu,

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

Aktiveeritavate rakku sisenevate peptiidide süntees ning rakendamine geeni transpordiks *in vitro* ning *in vivo* tingimustes,

mille juhendajad on Kaido Kurrikoff ja Ülo Langel,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **26.05.2014**