

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Ly Pärnaste

**Rakku sisenevad peptiidid NickFect1 ja NickFect51 plasmiidse
DNA transporteritena**

Magistritöö

Juhendajad Prof. Ülo Langel
MSc Piret Arukuusk

TARTU 2013

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Nukleiinhapped terapeutiliste molekulidena	7
1.1.1. Nukleiinhapete transport rakku	10
1.2. Rakku sisenevad peptiidid	14
1.2.1. RSP/last sidumise strateegiad.....	15
1.2.2. RSP Transportaan 10 ja tema analoogid	16
1.3. Nanokomplekside rakku sisenemine	18
1.3.1. Endotsütoosi rajad	19
1.3.2. Meetodid RSP-de sisenemise ja sisenemismehhanismi uurimiseks	21
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	25
2.1. Töö eesmärgid	25
2.2. Materjalid ja metoodika.....	25
2.2.1. Peptiidide süntees.....	25
2.2.2. Rakkude kultiveerimine	26
2.2.3. Komplekside moodustumine.....	27
2.2.4. Lutsiferiin-lutsiferaas süsteem valgu tootmistaseme määramiseks	27
2.2.5. Nanopartiklite iseloomustamine.....	28
2.2.6. Endosomaalsete põiekestete eraldamine ja analüüs	28
2.2.7. PCR ja RT-PCR	29
2.2.8. Western blot	30
2.2.9. Tulemuste analüüs.....	31
2.3. Tulemused ja arutelu	32
2.3.1. RSP/pDNA partiklite iseloomustus.....	32
2.3.2. RSP-de vahendatud pDNA transport rakkudesse.....	34
2.3.3. Komplekside transport endotsütootilises rajas	35
2.3.4. NickFectid pDNA transporteritena	38
KOKKUVÕTE	39
SUMMARY	40

TÄNUSÕNAD	41
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	42
LISAD	51
LIHTLITSENTS.....	52

KASUTATUD LÜHENDID

AcN	atseetonitriil
ASO	<i>antisense-oligonucleotide</i> , antisense-oligonukleotiid
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , veise seerumi albumiin
CPP	<i>cell penetrating peptide</i> , rakku sisenev peptiid, RSP
CR	<i>charge ratio</i> , laengusuhe
DCM	diklorometaan
DIEA	N,N-diisopropüületüülamiin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMF	N,N-dimetüülformamiid
ECM	<i>extracellular matrix</i> , rakuväline maatriks, ekstratsellulaarne maatriks
EE	<i>early endosome</i> , varane endosoom
ER	endoplasmaatiline retiikulum
EtBr	<i>ethidium bromide</i> , etiidiumbromiid
EtOH	etanool
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , veiseloote seerum
Fmoc	9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüül rühm
HBTU	<i>O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate</i> , O-bensotriasool-N,N,N',N'- tetrametüülurooniumheksafluorofosfaat
HOBt	1-hüdoksübensotriasool
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , mädarõika peroksüdaas
I	isoleutsiin, Ile
K	lüsiin, Lys
LAMP2	<i>lysosome associated membrane protein 2</i> , lüsoosoom-seotud membraanivalk 2
LE	<i>late endosome</i> , hiline endosoom
LF2000	Lipofectamine TM 2000
Lys	<i>lysosome</i> , lüsoosoom
MALDI-TOF MS	<i>matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i> , maatriks-assisteeritud laserdesorptsioon-ionisatsioon lennuaja mass-spektromeeter
MBHA	metüülbensüülhüdrüülamiid
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i> , hiire embrüonaalsed fibroblastid

MQ	milliQ
NF1	NickFect1
NF51	NickFect51
O	ornitiin, Orn
ON	<i>oligonucleotide</i> , oligonukleotiid
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , fosfaat-puhverdatud füsioloogiline lahus
pDNA	<i>plasmid DNA</i> , plasmiidne DNA
PF3	PepFect3
PNA	<i>peptide nucleic acid</i> , peptiidne nukleiinhape
P-RNA	<i>decoy-RNA</i> , peibutis-RNA
PVP	polüvinüülpürrolidoon
QN	triklorokvinoliin
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> , RNA indutseeritud vaigistav kompleks
RNAi	<i>RNA interference</i> , RNA interferents
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i> , pööratud faasi kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
RSP	rakku sisenev peptiid
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , naatriumdodetsüülsulfaat
siRNA	<i>small interfering RNA</i> , väike vaigistav RNA
SKO	<i>splice correcting oligonucleotide</i> , SCO, splaissingu korrektsooni oligonukleotiid
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> , üksikahelaline DNA
T	treoniin, Thr
TFA	trifluoroäädikhape
TIS	triisopropüülsilaan
TP	Transportaan
TP10	Transportaan10
WB	<i>Western blot</i>
Y	türosiin, Tyr

SISSEJUHATUS

Mitmed haigused on põhjustatud vigadest geenide transkriptsioonilisel või post-transkriptsioonilisel tasemel. Geeniteraapiaks kasutatakse erinevaid nukleiinhappemolekule, sest need võimaldavad vigase geeni ekspressiooni allasurumist, vajaliku valgu ekspressiooni või geenilt tuleva pre-mRNA vaheltlõikuse korrigeerimist. Nukleiinhappepõhiste molekulide kasutust piirab nende vähene stabiilsus seerumi juuresolekul, suurus ning negatiivne laeng, mistõttu ei ole nad toime kohani jõudmiseks võimalised läbima bioloogilisi barjääre ning on sihtmärgiks lagundamiseks nukleasidele.

Selleks, et nukleiinhappepõhiseid molekule saaks ravi- või teaduslikel eesmärkidel rakendada, on vajalik efektiivse, mittetoksilise ja spetsiifilise transportvektori olemasolu. Rakku sisenevad peptiidid (RSP-d, *cell-penetrating peptide*, *CPP* – inglise k.) on keskmiselt kuni 30 aminohappe pikkused järjestused, mis on võimalised läbima rakumembraane ning endaga koos rakku transportima ka enam kui 100 korda suurema molekulmassiga makromolekule. RSP-dega on rakku ning rakusiseste sihtmärkideni viidud näiteks plasmiidset DNA-d, valke, antikehi, siRNA-d, ravimeid, peptiide, liposoomi jt. NickFect-id on PepFect3 järjestusel põhinevad uuema põlvkonna RSP-d, mida saab kasutada nii plasmiidse DNA, siRNA-de ja oligonukleotiidide transpordiks.

Käesoleva magistritöö eesmärkideks on:

1. Uurida NickFect1 (NF1) ja NickFect51 (NF51) transfektsiooni efektiivsust.
2. Iseloomustada NF1-ga ja NF51-ga moodustuvaid nanopartikleid.
3. Leida modifikatsioonidest tulenevad eripärad rakku sisenemisel, paiknemisel endotsütootilistes jaondites ning rakus liikumisel, analüüsides transfekteritud rakkudest eraldatud endosomaalseid põiekesi.

Magistritööks vajalikud katsed on läbi viidud Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris ning koostöös Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia arengubioloogia laboriga.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Kirjanduse ülevaade jaguneb kolmeks suuremaks teemaks. Ülevaate esimeses osas kirjeldatakse terapeutiliselt rakendatavaid nukleiinhappemolekule. Teises osas antakse lühike ülevaade erinevatest võimalustest DNA ja RNA rakku ja rakusiseste sihtmärkideni viimiseks ning täpsem ülevaade rakku sisenevatest peptiididest (RSP-dest). Kolmandas osas kirjeldatakse endotsütoosi ja selle rolli nanopartiklite sisenemisel ning lühidalt ka meetodeid RSP-dega moodustunud nanopartiklite rakusisese liikumise jälgimiseks.

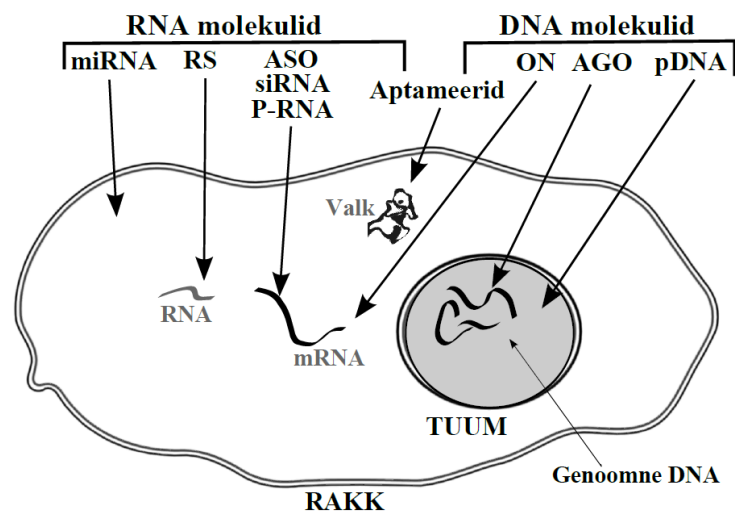
1.1. Nukleiinhapped terapeutiliste molekulidena

Rakumembraan on oluline raku stabiilse sisekeskkonna hoidmiseks, kuid samaaegselt on see takistuseks terapeutilistele molekulidele, mis oma suuruse või laengu tõttu ei ole võimelised rakku sisenema. Nukleiinhapetel põhinevad ravimid aitaksid ära hoida mitmeid praegu kasutatavatel ravimitel esinevaid kahjulikke kõrvalmõjusid ning on rakendatavad geeniteraapiaks. Geeniteraapia suurimaks eeliseks traditsiooniliste ravimeetodite ees oleks võimalus ekspresseerida terapeutilist geeni ainult soovitud rakkudes või kudedes. Kuna nukleiinhappemolekulid on fosfaatselgroo tõttu negatiivselt laetud, suured ning kergeks sihtmärgiks nukleaaasidele, on nende edukaks rakendamiseks geeniteraapias vajalik efektiivne ning spetsiifiline transportvektor.

Geeniteraapia on olemuselt geenide manipulatsioon transkriptsioonilisel või posttranskriptsioonilisel tasemel, eesmärgiga ravida geneetilisi ning omandatud haigusi või leevendada haigusseisundit (Thomas ja Klibanov 2003). Geeniteraapiat on praeguseks rakendatud mitte ainult tsüstilise fibroosi (Rich jt., 1993) vaid ka HIV-i (Asparuhova jt., 2008), vähi (Ravet jt., 2010), diabeedi (Samson jt., 2008) ja ka koe või organi funktsiooni puudulikkuse korral (Cutroneo 2003). Geeniteraapiat võib läbi viia kas organismis (*in vivo*) või patsiendilt/doonorilt isoleeritud rakkude kultuuris (*ex vivo*). *Ex vivo* lähenemisel kasvatatakse rakke tassidel, sisestatakse DNA/RNA ning viiakse seejärel patsienti (Bowie ja Chang 1998; Capowski jt., 2007). Olenevalt transpordiviisist ja nukleiinhappe molekulist integreerub nukleiinhape genoomi, püsib tuumas või tsütoplasmas (Boulaiz jt., 2005; Wang jt., 2013a).

Geeniteraapiaks on olulised nukleiinhapetel põhinevad molekulid (oligonukleotiidid, siRNA-d, pDNA jm.), sest need võimaldavad olenevalt probleemist inhibeerida vigaselt geenilt tuleva produkti tootmist, korrigeerida pre-mRNA protsessingut, modifitseerida geeni, tagada vajaliku produkti tootmist piisavalt hulgal või asendada vigast geeni. Geeniteraapias

kasutatavate molekulide võimalike sihtmärkide hulk kasvab kiirelt ning leitakse üha rohkem geene ja geenikomplekte, mis on seotud kindla haigusega (Schena jt., 1998). Nukleiinhapetel põhinevad ravimid võib oma olemuselt jagada geenide inhibiitoriteks, geenivaktsiinideks ja geeniasendajateks (Pathak jt., 2009). Geeniteraapia seisukohalt on olulised geenide inhibiitorid ja geeniasendajad. Terapeutilised nukleiinhappemolekulid ning nende toimimiseks vajalik sihtpunkt on toodud joonisel 1.



Joonis 1. DNA- ja RNA-põhised nukleiinhappemolekulid ning nende rakusisesed sihtkohad. ASO – *antisense*-oligonukleotiid; RS – ribosüüm; P-RNA – peibutis-RNA; ON – oligonukleotiid; AGO – antigeen-oligonukleotiid; pDNA – plasmiidne DNA

Geenide inhibiitorite eesmärgiks on inhibeerida geeni ekspressioon kas transkriptsioonilisel või posttranskriptsioonilisel tasemel. Geenide inhibiitorite hulka kuuluvad oligonukleotiidid (ON-id), kaasa arvatud *antisense*-oligonukleotiidid ja antigeen-oligonukleotiidid, ribosüümid, aptameerid, peibutis-RNA-d, siRNA-d ja miRNA-d. Oligonukleotiide saab kasutada haigusest mõjutatud valkude ekspressiooni selektiivseks repressiooniks läbi (pre-)mRNA translatsiooni või protsessingu takistamise või mõjutamise. Antisense-oligonukleotiidid (ASO-d) on rakuomased nukleiinhappemolekulid, mis seonduvad Watson-Crick aluspaardumise alusel mRNA komplementaarsetele osadele ja blokeerivad füüsiliselt translatsiooni või protsessinguga seotud sündmused või kutsuvad esile RNAasH toime, mille tulemusena lõigatakse sihtmärk-mRNA katki. Toime avaldumiseks peab ASO-sid rakus olema palju, seetõttu on ASO-d rakendatavad pigem valguekspressiooni vähendamiseks, mitte blokeerimiseks. Antigeen-oligonukleotiidid (AGO-d) toimivad läbi genoomse DNA-ga tripleksi moodustamise ning võimaldavad valkude ekspressiooni selektiivset allasurumist. Ribosüümid on ensümaatilise osaga ON-id, mis võimaldavad sihtmärk-RNA järjestus-

spetsiifilist lõikamist kohe sihtmärgiga seondumise järel (Merdan jt., 2002; Stull ja Szoka 1995).

DNA ja RNA aptameerid on suure spetsiifilisuse ja stabiilsusega (Jayasena 1999) nukleiinhappe segmendid, mis interakteeruvad otseselt struktuurse komplementaarsuse alusel kindla valguga ja häirivad haigusest kahjustatud valkude molekulaarseid mehhanisme või valke, mis osalevad tema transkriptsiooni või translatsiooni protsessis (Kaur ja Roy 2008; Ray jt., 2013; Stull ja Szoka 1995; Zhou ja Rossi 2011). Aptameere iseloomustab lisaks ka suur seondumisafiinsus juba nanomolaarsete kontsentratsioonide juures. Peibutis-RNA (*Decoy-RNA* – inglise k.) on konkureerivaks seondumis kohaks translatsiooni aktivaatoritele ja mRNA-d stabiliseerivatele elementidele (Liebhaber 1997). Peibutis-RNA-d destabiliseerivad ja takistavad mRNA translatsiooni ning viivad lõpuks mRNA lagundamiseni.

Väikesed vaigistavad RNA-d (*small interfering RNA*, *siRNA* – inglise k.) on 21-23 nukleotiidi pikkused RNA molekulid, mis on osa evolutsiooniliselt konserveerunud posttranskriptsioonilisest geenivaigistamise mehhanismist, RNA interferentsist (RNAi-st) (Arnaiz jt., 2003). RNAi toimib läbi RISC (*RNA-induced silencing complex* – inglise k.) vahendatud mRNA degradeerimise või valgu translatsiooni inhibeerimise. RNAi on rakuomane protsess ja võimaldab peaaegu kõikide sihtmärkgeenide ekspressiooni allasurumist (Burnett ja Rossi 2012; Rao jt., 2009). See, kui suurt efekti saab siRNA molekulidega esile kutsuda, sõltub nende kontsentratsioonist rakus, järjestusest, transpordiviisist ja rakuliinist (Sledz ja Williams 2005). MikroRNA-d (miRNA-d) on kuni 22 nukleotiidi pikkused mittekodeerivad RNA molekulid, mis on olulised organismi arengu, rakkude diferentseerumise, rakutsükli ja ka apoptoosi reguleerimisel (Boehm ja Slack 2005; Boehm ja Slack 2006; Harfe 2005). Ühel miRNA molekulil võib olla mitu sihtmärki ja teda saab kasutada mitme raja mõjutamiseks. Kuna miRNA-sid on seostatud mitmete haigustega nagu vähk ja neurodegeneratiivsed haigused (Chen jt., 2011; Tagawa jt., 2013; Weidhaas jt., 2007), on nad rakendatavad nii biomarkeritena haiguse diagnoosimisel (Shah jt., 2013) kui ka potentsiaalsete kandidaatidena erinevate haiguste raviks (Sicard jt., 2013; Wang jt., 2013b).

Geeniasendajate eesmärgiks on tagada valgu piisav tootmine või taastada defektse geeni normaalne funktsioon. Plasmiidselt DNA-lt on võimalik transkribeerida vajalik mRNA ning seejärel saada vajalik valguline produkt. Kuna pDNA vajab geeni ekspresseerimiseks peremeesraku DNA transkriptsiooni ja translatsiooni läbiviivaid mehhanisme, on ta sihtmärkspetsiifiline terapeutiline molekul, mille efekt avaldub alles rakku jõudmisel. Ainult

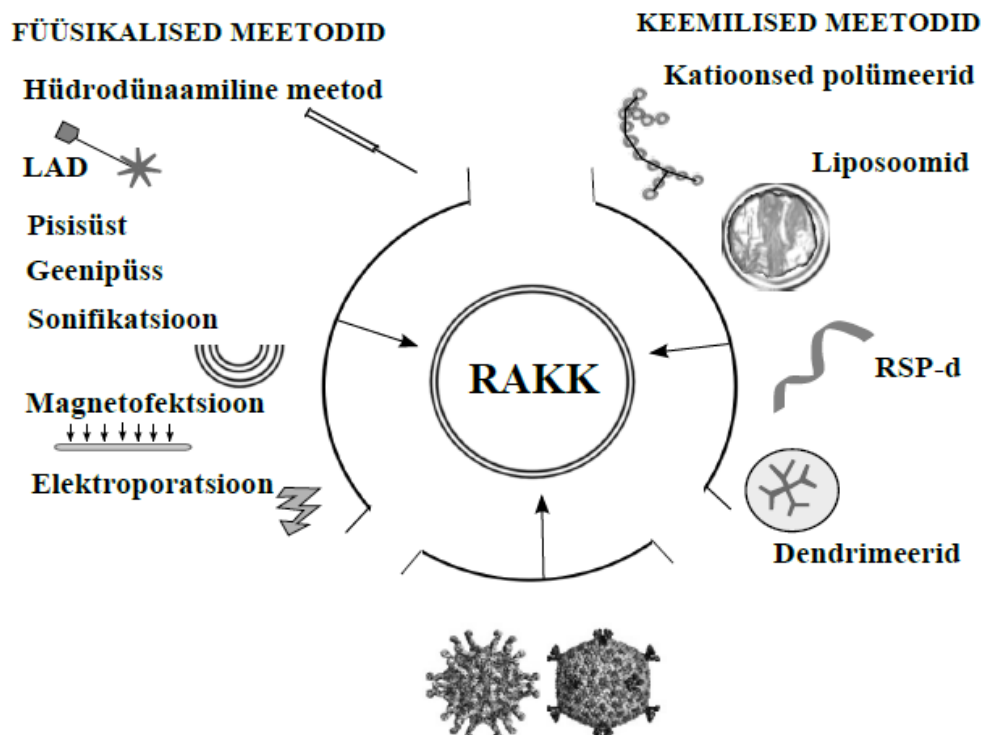
ühel või paarist plasmidi molekulist piisab, et tagada märgatav geeniekspressioon (Schwake jt., 2010).

Plasmiide saab kasutada nii geeniteraapiaks kui ka DNA vaktsiinina. Plasmiide on kerge toota, nad on võrreldes viirusvektoritega ohutumad, kuid ei suuda iseseisvalt piisavalt efektiivselt rakku siseneda. Nende konstrueerimine on lihtne ja otsene protsess, kus vajalik geen viiakse lõigatud plasmidi. Olenevalt transpordiviisist ja plasmidi tüübist võib pDNA integreeruda peremeesraku genoomi või jääda püsima eraldi genoomsest DNA-st. Terapeutilise geeni insertioon õigesse kohta genoomis on oluline faktor pDNA rakendamisel geeniteraapias. DNA insertioon valesse kohta võib kaasa tuua vähi tekke või tugeva immuunvastuse. Koht-spetsiifilist pDNA integratsiooni saab esile kutsuda näiteks homologse rekombinatsiooni esilekutsumisega tsinksõrm nukleaasidega (*zink finger nucleases* – inglise k.) lõigates.

1.1.1. Nukleiinhapete transport rakku

Uue põlvkonna terapeutiliste molekulide edukaks rakendamiseks on vajalik sobiv kandjavektor või kohaletoimetamise meetod, mis aitaks viia molekuli õigesse kohta, ei oleks tsütotoksiline ega tekitaks immuunvastust (Chowdhury 2009; Lundstrom ja Boulikas 2003; Romano jt., 2000). Lisaks peab vektor säilitama terapeutilise molekuli aktiivsuse, olema stabiilne, bioloogiliselt sobiv, odav, ei tohi olla nakkusohtlik ega põhjustada insertioonilist mutageneesi (Pathak jt., 2009).

Transpordiviisidest on praeguseni kõige efektiivsemateks viirustel põhinevad vektorid, kuid nende kasutust *in vivo* piirab väike kandevõime ning võimalik äge immuunvastus. Erinevate füüsikaliste, viirustel põhinevate ja keemiliste meetodite kõrval on üha enam kasutatud lipiidsetel ja peptiidsetel molekulidel põhinevaid transportvektoreid. Igal transpordiviisil on oma eelised aga ka puudused. Kui keemilisi transportvektoreid kasutades tuleb enne terapeutilise nukleiinhappemolekuli jõudmist sihtmärgini läbida mitmeid barjääre, siis füüsikaliste meetodite korral saame osasid neist vältida (näiteks endosoomidesse pidamajäämist ja raku väliskeskkonnas leiduvate nukleaaside poolt lagundamist). Samas saame füüsikalisi meetodeid kasutada peamiselt nukleiinhapete viimiseks maksa, nahka ja lihastesse, mitte süsteemseks manustamiseks. Keemiliste meetodite korral on oluline nanokomplekside kiire jõudmine sihtmärkkoele, rakuni ning õigetes rakusisestesse jaonditesse, vastasel korral eemaldatakse nanokompleksid kehast. Meetodid nukleiinhapete viimiseks rakku on toodud joonisel 2.



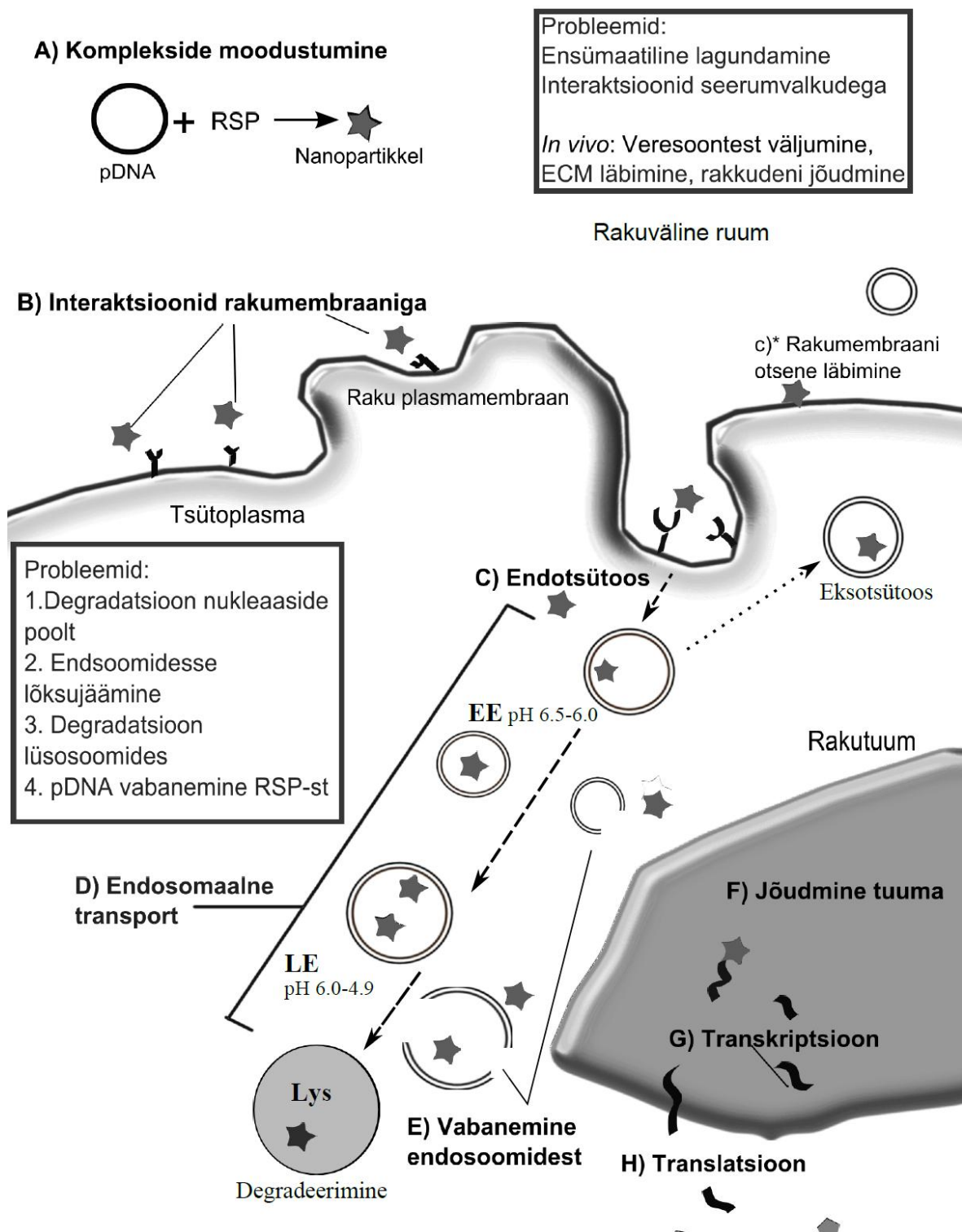
Joonis 2. Viiruslikud, keemilised ja füüsilised meetodid nukleiinhapete transpordiks rakku. Aluseks võetud Akhtar 2006 aasta artikkel (Akhtar 2006). Lisaks erinevatele viirusvektoritele kasutatakse DNA ja RNA transpordiks ka sünteetilisi katioonseid vektoreid ja erinevaid füüsilisi meetodeid. Joonisel kasutatud viiruspartiklid pärinevad veebilehelt (<http://www.virology.ws>). LAD – *laser assisted delivery*, laser-abistatud transport.

Füüsiliste meetoditega muudetakse rakumembraan nukleiinhappemolekulidele läbilaskvaks ning neid on edukalt kasutatud lokaalseks transpordiks nahka või lihastesse. Füüsilised meetodid on näiteks hüdrodünaamiline meetod, pisisüst (*microinjection* - inglise k.), elektroporatsioon ja sonoporatsioon, lisaks neile on kasutusel ka geenipüss, LAD (*laser assisted delivery* - inglise k.) ja magnetofektsioon (Gao jt., 2007a; Pathak jt., 2009; Zorko ja Langel 2005). Neid saab kasutada kas iseseisvalt või abistamaks teist, mittefüüsilist meetodit (Delalande jt., 2011). Hüdrodünaamiline meetod, kus kasutatakse pDNA või siRNA rakku viimiseks suure rõhu all ja kõrge kontsentratsiooniga DNA/RNA lahust (Yokoo jt., 2013), võimaldab lisaks nahale ja lihastele nukleiinhappemolekulide transporti ka maksa (Ma ja Liu 2013). Füüsilistest meetoditest kõige otsesem ja efektiivsem on pisisüst (*microinjection*), kuid selle kasutust piirab suur töömaht ning see, et korraga on võimalik DNA-d viia väikesesse hulka rakkudesse. Elektroporatsiooni, LAD-i ja sonifikatsiooni käigus destabiliseeritakse rakumembraan kas elektriimpulsside (Gao jt., 2007b), laseri või ultraheli abil. Geenipüssis kasutatakse DNA-ga kaetud metalliosakesi (näiteks kulda), mis suurel

kiirusel nahka või rakkudesse viiakse. Need meetodid on efektiivsed näiteks rakukultuuride puhul (Soman jt., 2011), kuid *in vivo* on nad rakendatavad peamiselt pindmiste kudede (Lee ja Tung 2013; Medi ja Singh 2008) ja lihaste jaoks (Ogunremi jt., 2013). Magnetofektsioonil kasutatakse paramagneetiliste nanopartiklite rakku viimiseks tugevaid magnetvälju (Govindarajan jt., 2013; Tencomnao jt., 2012).

Väga efektiivsed põhinev transport. Viirusvektorid on näiteks adenoviirus- ja adeno-assotsieeruvad viirusvektorid (Puntel jt., 2013; Shen jt., 2013; Wang jt., 2011), retroviirustel põhinevad vektorid (Lundstrom 1999; 2002; 2009) ning alfaviirus- ja lentiviirusvetorid (Satoh ja Manel 2013). Viirusvektorid on kõrgeltarenenud, efektiivsed ja looduslikud vektorsüsteemid, mis võimaldavad kõrget geeniekspressiooni nii *in vivo* kui ka *in vitro* tingimustes ja võimaldavad nii süsteemset kui ka lokaalset geeni sisendamist. Vektorite puuduseks on võimalik tugev immuunvastus (Zaiss ja Muruve 2005; 2008), rekombinatsioon metsiktüüpi viirusega, juhuslik integratsioon genoomi, keerukas valmistamisprotsess ja piiratud kandevõime (Boulaiz jt., 2005; Gordon 2002). Kuigi mõningaid neist puudustest saab kõrvaldada, kasutades hübriidseid viirusvektoreid (Huang ja Kamihira 2013), püütakse leida sobilik alternatiiv keemiliste vektorite näol.

Keemiliste vektorite, nagu katioonsed lipiidid (Felgner jt., 1987), katioonsed polümeerid ja rakku sisenevad peptiidid (RSP-d) eelisteks on suurem ohutus, väiksem toksilisus, valmistamise lihtsus ning lisaks saab nendega sisse viia ka suuremat geneetilist materjali (Aslan jt., 2006; De Laporte jt., 2006; Lavertu jt., 2006; Zeng jt., 2007). Puudusteks on madalam transfektsiooniefektiivsus ning madal transgeeni ekspressioonitase kudedes (Oh jt., 2007). Lisaks piiravad keemiliste vektorite jõudmist sihtmärgini mitmed rakusisesed ja – välised barjäärid. Rakuvälisteks barjäärideks on näiteks nukleaaside poolt põhjustatud lagundamine (süsteemse manustamise korral), retikuloendoteliaalse süsteemi poolt põhjustatud kliirens, ekstratsellulaarne maatriks (ECM) ja selles leiduvad nukleaasid. Limiteerivaks etapiks on ka rakumembraani läbimine. Intratsellulaarseteks barjäärideks on endotsütoosi järel endosoomidesse pidamajäämine, mis lõpuks viib nanopartikli degradatsioonini lüsoosoomides. Sõltuvalt nukleiinhappemolekulist ning tema toimekohast on oluline rakusisene transport kas tuuma või teistesse rakusisestesse jaonditesse. Erinevad barjäärid keemiliste vektorite kasutamisel pDNA transpordiks on RSP-de näitel toodud joonisel 3.



Joonis 3. Rakku siseneva peptiidi ja pDNA komplekside liikumine rakus, endosomaalne transport ning transfektsioonietapid. Transfektsioonietapid (A-H). EE – *early endosomes*, varased endosoomid; LE – *late endosomes*, hilised endosoomid; Lys – lüsoosoomid; ECM - *extracellular matrix* - rakuväline maatriks. Katkendliku noolega on märgitud endosomaalse transpordi suund ning punktidega nool tähistab eksotsütoosi suunda.

1.2. Rakku sisenevad peptiidid

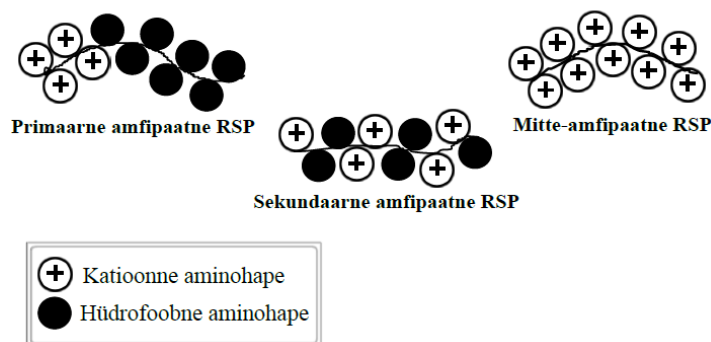
Peptiidid on valkudest lühema aminohappelise järjestusega molekulid, mis täidavad rakkudes erinevaid ülesandeid. Peptiidide eelisteks on nende kerge keemiline tootmine ja väike suurus, lisaks on nad kergesti modifitseeritavad ning sobivad erinevatesse bioloogilistesse süsteemidesse. Peptiide saab kasutada näiteks ravimikandjatena (Zhang jt., 2012) või ligandidena retseptoritele.

RSP-d on kuni 30 aminohappe pikkused järjestused, mis on võimelised ilma rakumembraani lõhkumata rakku sisenema ning rakku sisse viima ka temaga kovalentselt või mittekovalentselt seotud lastmolekule (Joliot ja Prochiantz 2004; Nartprayut jt., 2013). RSP-sid nimetatakse ka valgu transduktsiooni domäänideks (*protein transduction domain, PTD* – inglise k.), Trooja peptiidideks ja membraanis translokeeruvateks järjestusteks. Enamikku RSP-sid iseloomustab mittetoksilisus ja pikaaegne sügavkülmas säilitatavus ilma omaduste muutumiseta. Lisaks ei tekita RSP-d immuunvastust ning ei mõjuta sisse viidava makromolekuli funktsionaalsust (Vives jt., 2008).

Esimesed tähelepanekud mõnede valkude võimest läbida rakumembraane pärinevad 1980-ndatest aastatest (Frankel ja Pabo 1988). HIV-1 Tat valgust pärinev 86 aminohappe pikkune järjestus, mis suutis translokeeruda raku membraanis, oli esimene omalaadne (Green ja Loewenstein 1988; Vives jt., 1997). Mõned aastad hiljem avastati, et ka *Drosophila* Antennapedia valgu 60 aminohappe pikkune homeodomään on võimeline rakumembraane läbima (Derossi jt., 1994; Joliot jt., 1991). Püüdes mõista, mis on sisenemisevõime taga, modifitseeriti homeodomääni järjestust. Selle tulemusena selgus, et sisenemiseks on oluline domääni kolmas heeliks ja ainult heeliksit moodustav järjestuse 16 aminohappe pikkune osa on piisav translokatsiooniks. Saadud RSP nimetati Penetratiiniks ehk pAntp-ks (Derossi jt., 1994). HIV-1 Tat valgust pärit järjestus säilitas samuti järjestuse lühendamisel sisenemisevõime (Vives jt., 1997).

Mõne aasta jooksul lisandusid TAT-ile ja Penetratiinile ka teised valkudest tuletatud, sünteetilised (nt. polüarginiinid ja polülüsiinid) ning kimäärsed (nt. Transportaan) peptiidid (Rennert jt., 2008; Ziegler 2008). Järjestuse katioonsete laengute paigutuse alusel on RSP-d võimalik jagada kolmeks: primaarsed amfipaatsed (nt. Transportaan, Transportaan10), sekundaarsed amfipaatsed (nt. Penetratiin, pVEC, M918) ja mitteamfipaatsed (nt. TAT ja R9 polüarginiin) rakku sisenevad peptiidid (Ziegler 2008). See jaotus on piltlikult välja toodud

joonisel 5. Lisaks sellele suudeti näidata, et RSP-sid saab siduda teiste molekulidega, ilma sisenemisvõimet kaotamata (Joliot ja Prochiantz 2004).



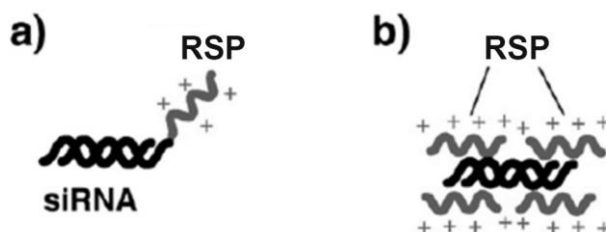
Joonis 4. Rakku sisenevate peptiidide (RSP-de) klassifikatsioon tulenevalt nende aminohappelisest koostisest. Primaarne amfipaatne, sekundaarne amfipaatne ja mitte-amfipaatne RSP. Joonis kohandatud Ziegleri järgi (Ziegler 2008).

RSP-de abil on rakku viidud siRNA-d, pDNA-d, ON-e, ravimeid ja kontrastaineid (Endoh ja Ohtsuki 2009; Khalil jt., 2006; Mäe ja Langel 2006; Oh ja Park 2009; Tunnemann jt., 2006), kuid suurte, kompleksete molekulide transport RSP-dega ei ole alati võimalik (Dietz ja Bahr 2005). RSP-sid on kasutatud erinevate imetajate rakuliinide ja taimerakkude transfektsiooniks/transduktsiooniks (Eggenberger jt., 2009; Eudes ja Chugh 2008), nad on efektiivsed nii *in vitro* kui ka *in vivo* tingimustes, vähese või puuduva toksilisusega ning ohutud (Heitz jt., 2009; Saar jt., 2005; Suhorutšenko jt., 2011).

1.2.1. RSP/last sidumise strateegiad

Peptiid-nukleiinhappe komplekside moodustamiseks saab kasutada nii kovalentset strateegiat, kus nukleiinhape seotakse kovalentse sideme abil peptiidiga, kui ka mittekovalentset strateegiat, kus RSP ja lastiks oleva nukleiinhappe vaheliste interaktsioonide tulemusena moodustub kompleks (Joonis 4.). Enamasti on RSP-del füsioloogilise pH juures positiivne laeng (Jarver ja Langel 2006), mis võimaldab RSP positiivsete laengute ja nukleiinhappe negatiivsete laengute omavaheliste elektrostaatiliste tõmbejõudude abil komplekside moodustamist. RSP katioonsed aminohapped interakteeruvad negatiivselt laetud nukleiinhappemolekulidega, kondenseerivad neid ja kaitsevad degradatsiooni eest (Jiang jt., 2010; Laurenti ja Ooi 2013). RSP ülesandeks on DNA pakkimine elektrostaatiliste interaktsioonide abil, lastmolekuliga rakku sisenemine, (pH sõltuv) vabanemine endosoomidest ja transport tuuma või teistesse organelldesse (Mann jt., 2008). Mittekovalentne strateegia on oluliselt lihtsam kui kovalentne konjugeerimine ning pDNA

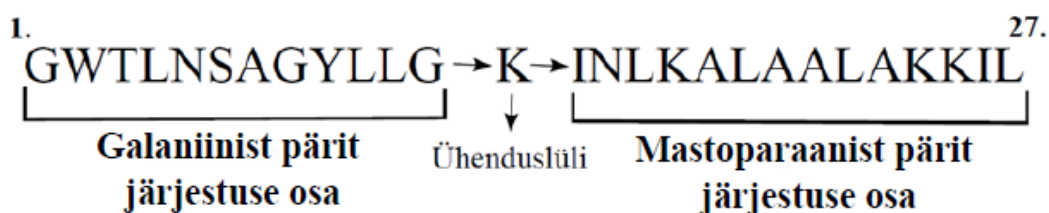
puhul ainuvõimalik meetod. Lisaks sellele on RSP vabanemine nukleiinhappest efektiivsem. Kovalentselt seotakse RSP-le linkeri abil molekulid, millel puudub laeng. Lisaks sellele võimaldab kovalentselt sidumine täpselt kontrollida, mitu lastmolekuli ühe RSP kohta lisatakse. (Crombez jt., 2011; Deshayes jt., 2008; Morris jt., 1999; Morris jt., 2001; Morris jt., 1997)



Joonis 5. Kovalentne- ja mittekovalentne komplekside moodustamise strateegia. Rakku sisenevate peptiidide kompleks siRNA molekuliga. Kohandatud Endoh ja Ohtsuki järgi (Endoh ja Ohtsuki 2009). a) Kovalentselt seotud RSP ja siRNA molekul b) Mittekovalentselt seotud RSP-d ja siRNA.

1.2.2. RSP Transportaan 10 ja tema analoogid

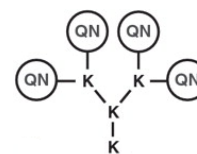
Transportaan (TP) on kimäärne 27 aminohappe pikkune RSP, mille järjestuse 12 aminoterminaalset aminohapet pärinevad neuropeptiid galaniini järjestusest, 14 karboksüülotsas paiknevat aminohapet pärinevad mastoparaanist ning neid kahte järjestust ühendab lüsiin (Higashijima jt., 1988; Pooga jt., 1998a). TP järjestus on toodud joonisel 6.



Joonis 6. Transportaani järjestus ning selle päritolu.

TP sisenemisvõime parandamiseks on tema järjestuses läbi viidud mitmeid muudatusi. Transportaan10 (TP10) on TP analoog, mille puhul on eemaldatud järjestusest esimesed kuus N-terminaalset aminohapet. Võrreldes TP-ga on TP10 vähemtoksiline ja tema peamise sisenemisteena on näidatud endotsütoosi (Padari jt., 2005). Järgnevalt lisati TP10 N-terminaalsesse otsa efektiivsuse parandamiseks stearüülhappe jääk. TP10 analoogid võib jagada kaheks suuremaks perekonnaks: PepFect-id ja NickFect-id. Ülevaade mõningatest TP10 analoogidest on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Transportaan ja tema analoogid. (TM* - transporditud molekul; ON – oligonukleotiid; SKO – splaissingut korrigeeriv oligonukleotiid; δ , ϵ - sünteesi jätkamiseks



kasutatud aminorühm (juhul kui ei ole kasutatud α aminorühma); K* - , kus QN on triklorokvinoliin.

RSP	Järjestus	TM*	Viited
Transportaan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	SKO-PNA, ON, valgud	(El-Andalousi jt., 2006; Fisher jt., 2004; Pooga jt., 2001; Pooga jt., 1998b)
Tranportaant10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	ON, pDNA	(El-Andalousi jt., 2005; Kilk jt., 2005; Soomets jt., 2000)
Perekond PepFect			
PepFect3	Stearüül-AGYLLGKINLKAKAAKAKKIL-NH ₂	ON	(Mäe jt., 2009)
PepFect14	Stearüül- AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL-NH ₂	SKO, pDNA	(Ezzat jt., 2011; Veiman jt., 2013)
PepFect15	Sterüül-AGYLLGK*LLOOLAAAALOOLL-NH ₂	ON	(Lindberg jt., 2013)
PepFect6	Stearüül-AGYLLGK*INLKALAALAKKIL-NH ₂	siRNA	(El Andalousi jt., 2011)
Perekond NickFect			
NickFect1	Stearüül-AGY(PO ₃)LLGKTNLKALAALAKKIL-NH ₂	ON	(Oskolkov jt., 2011)
NickFect51	Stearüül-AGYLLG(δ)OINLKALAALAKKIL-NH ₂	ON, pDNA, siRNA	(Arukuusk jt., 2013)
NickFect53	Stearüül-AGYLLG(ϵ)KINLKALAALAKKIL-NH ₂	pDNA	(Arukuusk jt., 2013)
NickFect61	Stearüül-AGYLLGOINLKALAALAKKIL-NH ₂	pDNA	(Arukuusk jt., 2013)

PepFectid ja NickFectid on RSP-d, mille disainil lähtuti TP10 järjestusest. Eesmärgiks oli suurendada peptiidi transfektsiooniefektiivsust. Peptiidi N-terminaalsesse otsa lisati erinevad rasvhappejäägid, millest transfektsiooniefektiivuse tõstmise seisukohalt osutus kõige paremaks stearüülhape. Stearüülrühmaga TP10 nimetati PepFect3-ks (PF3-ks) ning sellega on rakku transporditud nii ON-e kui ka pDNA-d (Mäe jt., 2009). Lisaks on erinevate modifikatsioonide tulemusena saadud ka PepFect6, PepFect14 ja PepFect15, mida on kasutatud vastavalt siRNA-de (El Andalousi jt., 2011), ON-de (Ezzat jt., 2011) ja pDNA (Veiman jt., 2013) ning ON-ide (Lindberg jt., 2013) viimiseks rakkudesse. PepFectide puhul

on näidatud, et *in vivo* ega *in vitro* tingimustes ei ole nad tsütotoksilised (Suhorutšenko jt., 2011).

NickFectid on uuema põlvkonna PF3-e analoogid, mida on edukalt kasutatud nii ON-ide kui ka pDNA rakku viimiseks (Arukuusk jt., 2013; Oskolkov jt., 2011). NickFect1 (NF1) sisaldab lisaks N-terminaalsele stearüülrühmale ka fosfaatrühma. 8. isoleutsiin (I, Ile) on asendatud treoniiniga (T, Thr) ning 3. positsioonis asuv türosiin (Y, Tyr) on fosfaatrühmaga. Fosfaatrühma lisamine suurendab NF1 hüdrofoobsust, vähendab positiivsete laengute osakaalu ning suurendab sõltuvust pH-st (Oskolkov jt., 2011). Parandamaks PF3-e transfektsiooniefektiivsust ning endosoomidest vabanemise võimet, asendati 7. positsioonis asuv kahte järjestust (neuropeptiid galaniini ja mastoparaani) ühendav lüsiin (K, Lys) ornitiiniga (O, Orn). Lisaks sellele jätkati peptiidi sünteesi δ -NH₂ grupilt, mitte tavapäraselt α -NH₂ grupilt. Mõlema uuendusega peptiidi transfektsiooniefektiivsus suurenes märgatavalt võrreldes aluseks võetud PF3-ga. Peptiid nimetati NickFect51-ks (NF51-ks). NF51 abil saab pDNA-d viia erinevatesse, ka nn raskesti transfekteritavatesse rakuliinidesse nagu suspensioonirakkudesse (Jurkat) ning MEF (hiire embrüonaalsetesse fibroblastidesse, *mouse embryonic fibroblast*, MEF – inglise k.) rakkudesse. NF51 on efektiivne RSP nii pDNA, siRNA kui ka ON-ide transpordiks (Arukuusk jt., 2013).

1.3. Nanokomplekside rakku sisenemine

Kuigi rakku tungivad peptiid on efektiivsed nukleinhappemolekulide transpordil erinevatesse rakuliinidesse ja nad on rakendatavad ka *in vivo*, ei ole teada RSP-de täpne sisenemismehhanism. Selle põhjuseks võib olla nii RSP-de perekonna suur mitmekesisus, varasemad vastuolulised andmed kui ka sisenemistee sõltuvus lastmolekuli omadustest ja suurusest, keskkonna temperatuurist, komplekside interaktsioonidest rakupinnaga ja rakkude seisundist (Trabulo jt., 2012; Tunnemann jt., 2006). Lisaks sellele võib sama RSP kasutada rohkemat kui ühte erinevat sisenemismehhanismi ja –teed (Duchardt jt., 2007).

Transfektsiooniks ehk DNA või RNA sisestamiseks nimetatakse nukleinhappemolekulide viimist rakku, kasutades mitteviiruslikke meetodeid. RSP-de korral võib protsessi jagada järgnevateks etappideks: komplekside moodustamine, interaktsioonid raku pinnaga, endotsütoos, endosomaalne transport, vabanemine endosoomidest, jõudmine sihtmärgini ja nukleinhappemolekuli toime avaldumine. Transfektsiooniprotsess on kujutatud joonisel 3. Rakku sisenemisel on esimeseks etapiks interaktsioonid RSP ja rakumembraanis leiduvate proteoglükaanide vahel (Pujals jt., 2006). See, millist teed kompleks sisenemiseks kasutab, sõltub RSP primaarsest ja sekundaarsest struktuurist, katses kasutatavast RSP

kontsentratsioonist, RSP-ga seotud lastmolekulistist, sidumisviisist, transfekteeritavast raku tüübist ning raku membraani koostisest (Walrant jt., 2013). Lisaks on olulised ka väliskeskkonna tingimused, nagu seerumivalkude olemasolu ja temperatuur. Katseliselt on näidatud, et nanokomplekside sisenemiseefektiivsus seerumi juuresolekul on madalam kui ilma seerumita söötmes (Wen jt., 2012). Selline efekt võib tuleneda peptiidi positiivselt laetud kõrvalrühmade interaktsioonist negatiivselt laetud seerumivalkudega või soolaioonidega. Sarnast efekti võib eeldada ka loomkatses, kus negatiivselt laetud plasmavalgud võivad neutraliseerida positiivselt laetud peptiidi ning muuta tema interaktsioone nii rakumembraani kui ka lastmolekuliga. Sagedasti toimub seerumi tulemusena komplekside agregeerumine, mille tõttu ei suuda RSP enam oma transport-ülesannet täita.

Nanopartiklite sisenemine rakku toimub pärast nende interaktsiooni rakumembraaniga (Pujals jt., 2006). Kõige tõenäolisemaks peetakse RSP sisenemist kas otse läbi rakumembraani või erinevaid endotsütoosi radasid kasutades (Koren ja Torchilin 2012). Otse läbi membraani sisenemine toimub energiat mittevajaval viisil ning läbimist on kirjeldatud kui invertteeritud mitselli moodustumist (Derossi jt., 1996), membraani õhendamist (Lee jt., 2005), poori moodustumist (Matsuzaki jt., 1996) ja vaibalaadse struktuuri tekitamist. Termodünaamilised seondumiskatsed on näidanud, et otse läbivad rakumembraani primaarsed ja sekundaarsed amfipaatsed RSP-d, juhul kui nad on madalates, mikromolaarsetes kontsentratsioonides. Otse läbiminekul toimub esmalt interaktsioon RSP positiivsete laengute ja membraani negatiivselt laetud komponentide vahel ning sellele järgneb kaksikkihi destabiliseerimine. Mitte-amfipaatsed RSP-d kasutavad madalatel kontsentratsioonidel endotsütoosi. (Rothbard jt., 2004; Thoren jt., 2004; Wadia jt., 2004) RSP-de tüübid on toodud joonisel 4.

1.3.1. Endotsütoosi rajad

Endotsütoos jaguneb mitmeks erinevaks rajaks ning selle abil saab rakk kontrollida retseptorite, kanalite ja transporterite arvu raku pinnal. Retseptor-vahendatud endotsütoosil tagatakse raja selektiivsus retseptorite abil ning sorteerimine tsütosoolsete adaptorvalkude abil. Endotsütoosi kasutavad rakku sisenemiseks ka viirused ja bakterid. Suurte, tahkete osakeste sissevõtmiseks kasutab rakk fagotsütoosi ja vedelikus paiknevate osakeste jaoks pinotsütoosi. Fagotsütoos toimub peamiselt spetsialiseerunud rakkudes nagu makrofaagid ja neutrofiilid. Pinotsütoos on rakkudes universaalne protsess, mis osaleb ka membraanikomponentide ja vedelike viimisel rakku. Pinotsütoos jagatakse makropinotsütoosiks, kaveoliin-, klatriin-sõltuvaks endotsütoosiks ning ka kaveoliin- ja klatriinsõltumatuks endotsütoosiks. Makropinotsütoosi käigus tekivad dünaamiini abil

plasmamembraani sissesopistused ja selle tulemusena membraansed vesiikulid, mida nimetatakse makropinosoomideks ning mille membraani koostis on sarnane plasmamembraanile. (Conner ja Schmid 2003; Mayor ja Pagano 2007; Swanson 1989)

Retseptorile seondumise järel endotsüteeritakse enamasti nii retseptor kui ka sellele kinnitunud nanokompleks. Rakumembraani sisemisel poolel asuvad kaveoliin ja klatriin osalevad retseptor-vahendatud endotsütoosil sissesopistuste tekkel. Kaveoliin osaleb ka endoplasmaatilise retiikulumi (ER-i) ja Golgi kompleksi vahel toimivas transpordis. Klatriin kontrollib mitmesuguseid füsioloogilisi funktsioone nagu neuronites toimuv klatriin-vahendatud endotsütoosi abil sünaptiliste vesiikulite sisenemine. (Ritchie jt., 2013) Sisenemise järel suunatakse moodustunud vesiikul rakusisestesse transportvesiikulitesse. Endotsütootilise raja vesiikulid, endosoomid, moodustavad heterogeensete jaondite süsteemi, mis vastutavad endotsüteeritud materjali transpordi eest ning mida iseloomustavad erinevad ensüümid ja lipiidne koostis. Transpordi koordineerimiseks on vesiikulitel erinevad Rab-GTPaas valgud, mis vastutavad transportvesiikulite sulandumise eest sihtmärkorganellide membraanidega, erinevate membraanidega interaktsioonide ja vesiikulite eraldumise eest (Pfeffer 2001). Endosomaalse transpordi lihtsustatud skeem on toodud joonisel 3.

Nii kaveoliin- kui ka klatriin-sõltuva raja puhul suunatakse vesiikulid kontrollpunkti - varastesse sorteerivatesse endosoomidesse (Arancibia-Carcamo jt., 2006). Sealt suunatakse endotsüteeritud materjal kas tagasi raku pinnale (eksotsütoosi) või hilistesse endosoomidesse. Endosoomide maturatsiooni käigus muutub vakuolaarsete ATPaas pumpade abil pH 7,4-st ~5,0-ni. Lüsosoomide madal pH ning kõrge nukleaside kontsentratsioon aitavad lagundamisprotsessi (Gruenberg ja van der Goot 2006). Erinevate endotsütootiliste jaondite kindlakstegemiseks kasutatakse erinevaid markervalke. Enimkasutatavad markervalgud endotsütootilistele jaonditele on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Markerid endotsütoosi jaonditel (Arancibia-Carcamo jt., 2006).

Jaond (<i>compartment</i>)	Marker
Klatriin-kaetud vesiikul	Klatriin, GFP-klatriin, AP2
Varane endosoom	EEA1, Rab5, GFP-Rab5, Transferiini retseptor, fluorofooriga konjugeeritud transferiin
Ringlev endosoom (<i>recycling</i>)	Transferiini retseptor, fluorofooriga konjugeeritud transferiin, Rab4, YFP-Rab4, Rab11, GFP-Rab11, GFP-Rme I, Syntaxin 13
Hiline endosoom	LAMP1, GFP-LAMP1, Rab7, GFP-Rab7, Rab9, GFP-Rab9
Lüsosoom	LAMP1, GFP-LAMP1

Pärast endosoomidesse jõudmist on vajalik nanopartiklite vabanemine, vastasel korral juhitakse nad lõpuks lüsoosoomidesse, kus toimub degradeerimine (Pujals jt., 2006). Endosoomidesse lõksujäämine on üheks suurimaks piiravaks teguriks mitte-viirusvektorite vahendatud nukleiinhapete transpordil (Varkouhi jt., 2011). Transportvektori poolt sisse viidava molekuli toimekohaks võivad olla tsütoplasma, tuum, mitokondrid või teised rakuorganellid. Endosoomidest vabanemise järel satuvad nanopartiklid tsütoplasmasse, kus neid tuleb kaitsta tsütosoolis leiduvate nukleaaaside eest. Kui sihtmärgiks on mõni organell, tuleb tagada nanopartikli või molekuli sinna jõudmine. Kui tegemist on pDNA-ga, siis on sihtkohaks rakutuum. Nanopartikli sisenemine tuuma võib toimuda mitmeti, näiteks difundeerudes tuuma rakupoolsest etapist, kui membraan on ajutiselt läbitav. Kui osakesed on väiksemad kui 10 nm läbivad nad tuumamembraane difusiooni teel ja väiksemad kui 25 nm osakesed viiakse tuuma aktiivse transpordiga tuumapoorikomplekside kaudu (Pathak jt., 2009). DNA ekspressiooniks peab transportvektor võimaldama nanopartikli lahtipakkimist piisaval määral, et saaks toimuda transkriptsioon, kuid samas tuleb kaitsta DNA-d nukleaaaside eest.

1.3.2. Meetodid RSP-de sisenemise ja sisenemismehhanismi uurimiseks

RTP-de kohta on praeguseks tehtud palju uurimistööd ja läbi viidud erinevaid katseid, kuid senini puudub kindel ja ülevaatlik seisukoht RTP-de rakku sisenemise teest ja sellega seotud mehhanismidest. Pole välja kujunenud ka kindlat meetodit sisenemise uurimiseks. RSP-de transporti läbi membraanide ja liikumist rakus on uuritud rakukultuurides, kunstlikes lipiidsetes vesiikulites, kudedel ja ka *in vivo* (Zorko ja Langel 2005). Bioloogilistes süsteemides on võimalik saada infot nanopartiklite toksilisuse, rakku sisenemise ja rakusisese transpordi kohta. Üldise suuna arendamise seisukohalt on oluline nanopartiklite süsteemne uurimine, et kindlaks teha vajalikud parameetrid efektiivsele nanopartiklile (Albanese jt., 2012). RSP-de puhul on sisenemise efektiivsus sõltuv sellest, millise lastmolekuliga ta seotakse, seetõttu tuleb kasutada erinevaid meetodeid tulemuste valideerimiseks (Madani jt., 2011). RSP-sid on uuritud erinevate meetoditega, mis hõlmavad mikroskoopilisi ja mass-spektromeetrilisi rakkudel rakendatavaid meetodeid, erinevaid mudelsüsteeme ja ka erinevate inhibiitorite mõju selgitamist.

RSP otsene jälgimine rakus on keeruline ning seetõttu on kõige levinumaks meetodiks RSP või lasti märgistamine. Märgistatud peptiidi või temaga seotud lastmolekuli võib detekteerida radioaktiivsuse, fluorestsentskiirguse või –kustutuse alusel, lastmolekuli ensümaatilise aktiivsuse või spetsiifilise värvimise abil (Zorko ja Langel 2005). Peptiidi või lasti märgis

võib mõjutada seda, millist mehhanismi RSP sisenemiseks kasutab, kuidas ta rakus jaotub ning kui toksiliselt võib ta rakule mõjuda (Fischer jt., 2002; Lundberg jt., 2007). Lisaks võib näiteks fluorestseeruvate määrgiste pikemal ajaperioodil valgustamisel määrgistatud molekuli sisaldav vesiikul lõhkeda ning sisu vabaneda tsütoplasmasse ning iga fluorestseeruv osake ei pruugi olla bioloogiliselt oluline, sest määrgis võib jääda rakku ka pärast RSP või lasti lagundamist. Paljud mikroskoopilised meetodid vajavad proovi fikseerimist näiteks formaldehüüdi või paraformaldehüüdiga, mis võivad samuti mõjutada RSP-de sisenemist rakku. (Madani jt., 2011)

Lisaks määrgistamist vajavatele meetoditele on välja töötatud ka mitmeid meetodeid, mis määrgistamist ei vaja. Subtsellulaarne fraktsioneerimine ning organellide eraldamine gradiendil võimaldab uurida komplekside käitumist endotsütootilistes jaondites aja jooksul lastmolekuli või RSP-d transfektsioonieelselt muutmata. Kuna ka sellel meetodil on mitmeid puudusi, tuleb erinevaid meetodeid kombineerida, et saada olukorrast täpsem ülevaade. Enne fraktsioneerimist on vajalik rakumembraani lõhkumine. Selleks on võimalik kasutada ultraheli, detergente, läbi peene ava surumist ja spetsiaalset uhmrit. Eesmärgiks on lõhkuda rakumembraan, kuid mitte rakutuuma ega teisi organelle. Rakutuuma lõhkumine võib viia nukleiinhappest põhjustatud agregaatide tekkeni homogenaadis. Kuna RSP-d interakteeruvad rakumembraaniga, võivad nad jääda sellega seotuks ning anda valepositiivseid tulemusi. Rakkude trüpsineerimine enne uuringute tegemist võimaldab eemaldada membraanile kinnitunud kompleksid (Richard jt., 2003). Rakumembraani lõhkumise järel tsentrifuugitakse supernatanti, saavutamaks järk-järguline organellide sedimentatsioon.

Kuna organellid erinevad oma suuruse ning tiheduse abil, on võimalik õige tsentrifugaaljõu ning tsentrifuugimise aja rakendamisel tuubi põhja tsentrifuugida vastavad organellid. Rakkude ja tuuma sedimentatsioonikiirus on suurem kui näiteks mirokondritel ja endosoomidel, sest nad on suuremad. Endosoomid ning lüsoosoomid on teineteisega sarnase suuruse ning tihedusega, seetõttu vajab nende eraldamine lisaetappide rakendamist.

Erinevate gradientide abil on võimalik üksteisest eraldada rakke ja rakuorganelle. Gradientide moodustamiseks on kasutatud sahharoosi (Völker jt., 2013), sorbitooli, Nycodenz-i, Ficoll 400-t, Percoll-i, jt. Sahharoosi ja sorbitooli eelisteks on nende odavus ja kerge eemaldamine lahusest. Seetõttu on suhkrugradient ka kõige levinum viis. Puudusteks on kõrgema kontsentratsiooniga lahuse tekitatav osmootne rõhk ja suhkrulahuse viskoossus, mis teeb temaga töötamise keerukamaks. Suhkrugradiendi tekitamine on aega ning täpsust nõudev protsess ning varieeruvus kahe katse vahel võib olla suur. Vajalik on korjatud fraktsioonide

tiheduse mõõtmine. Suhkrugradients on kasutatud enamasti viiruste ning organellidega eraldamiseks. Nycodenz on iodeeritud lahus, mille eelisteks on väiksem osmootne rõhk, kerge eemaldamine lahusest ning gradiendi moodustamine on võimalik ka tsentrifuugmise käigus. Lahuse puuduseks on kõrgem hind, interaktsioon mõningate valkudega ning osakesed neelavad UV-kiirgust, mistõttu ei sobi ta kokku kõikide analüüsi meetoditega. Meetod on sobilik rakkude ja organellide eraldamiseks. Ficoll 400 on hüdrofiilne polüsahhariid, mis lahustub kergesti vees ning võimaldab tsentrifuugimise käigus gradiendi moodustamist. Lisaks sellele ei läbi Ficoll rakumembraane ning omab väiksemat osmootset rõhku ka kõrgematel kontsentratsioonidel. Ficoll kasutatakse pigem preparatiivse etapina, kuid teda on keeruline lahusest eemaldada. See piirab analüüsimeetodite valikut. Ficoll on rakendatav viiruste ja rakkude eraldamiseks.

Percoll on PVP-kaetud (polüvinüülpürrolidoon) silikaat-põhine reagent, mis võimaldab tsentrifuugimise käigus tekitada tihendusgradiendi ning on rakendatav rakkude ja organellide eraldamiseks (Jouret jt., 2011; Noguchi jt., 2013; Sarmiento jt., 2011). Percoll ei läbi rakumembraane ega tekita osmootset rõhku, seetõttu lisatakse gradiendilahusele tavaliselt ka sahharoosi. Lisaks võimaldab see pidevgradiendi tekitamist ning on väikese viskoossusega. Percoll võib segada mitmeid analüüsimeetodeid, kuid teda on lahusest võimalik eemaldada filtreerimise või ultratsentrifuugimise abil. Gradiendi moodustumise järel saab korjata fraktsioonid, mis sisaldavad erinevaid organellipopulatsioone.

Märgistamata pDNA kindlakstegemiseks RSP/pDNA transfekteritud rakkudest eraldatud fraktsioonidest saab kasutada nii PCR-i kui ka RT-PCR-i. Mõlemal meetodil on oma eelised, kuid mõlema analüüsimeetodi rakendamisel on vajalik fraktsioonidest DNA sadestamine, et tõsta DNA kontsentratsiooni lahuses, eemaldada enamus fraktsioneerimiseks kasutatud lahustest ning võimaldada täpsemat detektsiooni. PCR võimaldab kiirelt detekteerida, kas fraktsioon sisaldab pGL3 plasmidi või mitte. Võrreldes RT-PCR-iga on traditsiooniline PCR vähemtundlik, töömahukam, madalama resolutsiooniga, odavam ning võimaldab pigem fraktsioonides sisalduva DNA omavahelist võrdlust kui kvantifitseerimist. Kvantifitseerimiseks on vajalik vähemalt nelja erineva lahjendusega korduse tegemine, et olla kindel, et reaktsioon on veel kasvufaasis, mitte küllastunud. PCR-i järel saab produkti kindlaks teha geelelektroforeesi järel produkti oletatava suuruse abil. RT-PCR võimaldab iga amplifitseerimise tsükli järel produkti automaatset mõõtmist. Tegemist on tundliku meetodiga, mis võimaldab fraktsioonidest täpset pDNA kvantifitseerimist. Kuid oma tundlikkuse tõttu tuleb arvesse võtta võimalikud veapiirid ning lisada igale plaadile kontrollproovid, mille pDNA kontsentratsioon on kindlaks tehtud.

Wester blot (WB) võimaldab spetsiifiliste antikehade abil kindlaks teha valgu olemasolu ja hulka fraktsioonis. Organellidel esinevad spetsiifilised markervalgud, mis võimaldavad nende kindlakstegemist. Endosomaalsete jaondite korral enamkasutatud markervalgud on toodud tabelis 2. Fraktsioneerimise järel on WB analüüsi teostamiseks vajalik eelnevalt Percolli eemaldamine fraktsioonidest, sest Percolli kerakesed seovad mõningal määral valke ning mõjutavad proovi liikumist geelihambas. Lisaks sellele muutub Percoll valkude denatureerimiseks kasutatud kõrgematel temperatuuridel plastikulaadseks venivaks massiks või kõrgematel kontsentratsioonidel saavutab kiirelt keemispunkti.

Transfektsiooni efektiivsuse suurendamiseks tuleb selgitada kitsaskohad transfektsioonil ning sellest lähtudes leida sobilikud meetodid või modifikatsioonid järjestuses nende kitsaskohtade ületamiseks. RSP-dega moodustatud nanopartiklite sisenemise ja rakusisese transpordi uurimiseks on võimalik kasutada mitmeid erinevaid meetodeid. Nende abiga kogutud info võimaldab kindlaks teha RSP transfektsiooniefektiivusega seotud kitsaskohad ning paremini mõista RSP-ga seotud mehhanisme.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärkideks on:

1. Iseloomustada NF1/pGL3 ja NF51/pGL3 nanopartikleid hepariini soolale resistentsuse põhjal.
2. Uurida NF1-ga ja NF51-ga moodustatud nanopartiklite transfektsiooniefektiivsust lutsiferiin-lutsiferaas mõõtmisüsteemi kasutades seerumit sisaldavas söötmes ja võrrelda seda disainil aluseks võetud PepFect3-ga (PF3).
3. Leida modifikatsioonidest tulenevad eripärad rakku sisenemisel, paiknemisel endotsütootilistes jaondites ning rakus liikumisel, analüüsides transfecteeritud rakkudest eraldatud endosomaalseid vesiikuleid.
4. Võrrelda NF1-e ja NF51-e kommertsiaalse lipofektsioonireagendiga LipofectamineTM2000 (LF2000).

2.2. Materjalid ja metoodika

2.2.1. Peptiidide süntees

Antud magistritöö jaoks sünteesiti kolm RSP-d: NickFect51, NickFect1 ja PepFect3. Võrreldes aluseks võetud PF3-ga on NF1 järjestuse 3. positsioonis asuv türosiin fosforüleeritud ning 11. positsioonis asuv isoleutsiin asendatud treoniiniga. NickFect51 järjestuses 7. positsioonis asuv lüsiin asendatud ornitiiniga ning sünteesi jätkatud δ-aminorühmalt. Järjestused on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Kasutatud rakku sisenevad peptiidid (RSP-d) ja nende järjestused. Allajoonitud on aminohapped, mis RSP-de vahel erinevad. Sulgudesse on märgitud aminohappe kõrvalrühm või sünteesi jätkamiseks kasutatud aminorühm.

RSP	Järjestus
PepFect3 (PF3)	Stearüül-AGYLLGKINLKAKAAKAKKIL-NH ₂
NickFect1 (NF1)	Stearüül-AGY(PO ₃)LLGKTNLKALAAAKKIL-NH ₂
NickFect51 (NF51)	Stearüül-AGYLLG(δ)QINLKALAAAKKIL-NH ₂

Sünteesiks kasutati tahke faasi peptiidsünteesi kandjal, kus aminohappe aminorühma kaitserühmaks on Fmoc (9-fluoreenüülmetüüloksükarbonüül rühm) ning sünteesitav peptiid on vahelüluga seotud tahkele kandjale MBHA vaigule (metüülbensüülhüdroüülamiid vaigule). Peptiidid sünteesiti 0,1 või 0,25 mM skaalas nii käsitsi ja ka peptiidsüntesaatoriga (Applied

Biosystems, ABI433A). Masinaga sünteesil võeti kõiki aminohappeid kümnekordses, ning käsitsisünteesil neljakordses ülehulgas. Stearüülrühm lisati käsitsi juba valmis peptiidi N-terminaalsesse otsa. Peptiidisünteesil kasutati aktivaatoritena 4 kordses ülehulgas HOBt-i (1-hüdrosübensotriasooli) ja 4 kordses ülehulgas HBTU-d (O-bensotriasool-N,N,N',N'-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaati) ning 8 kordses ülehulgas DIEA-d (N,N-diisopropüületüülamiini) lahustatuna DMF-is (N,N-dimetüülformamiidis) iga vaigu mmol-i kohta. Aktivaatoritest tehti eelnevalt 0,5 M lahused (0,5 M HBTU/DMF; 0,5 M HOBt/DMF), mis lisati DMF-is lahustatud aminohappele. Fmoc kaitserühm eraldati 20%-lise piperidiinilahusega DMF-is.

Peptiid eemaldati vaigult ja kõrvalahelate kaitserühmad aminohapetelt, inkubeerides sünteesitud peptiidi 3,5 tundi TFA (trifluoroäädikhape), TIS-i (triisopropüülsilaani) ja vee lahusega (vastavalt suhtele 95:2,5:2,5). Seejärel suruti lahus läbi filtri, et eemaldada peptiid vaigult. Saadud lahusele lisati 5 ml vett peptiidi lahustamiseks. Seejärel lisati külma eetrit, et ekstraheerida lahustuv orgaaniline materjal. Tekkinud kahefaasilist lahust hoiti 45 min -80 °C juures vesifaasi külmutamiseks. Eeter koos lahustunud orgaanilise materjaliga eemaldati ning vesifaasi lüofiliseeriti üleöö.

Peptiid puhastati pöördfaas-vedelikkromatograafia abil, kasutades C-18 kolonni ning AcN(atseetonitriili)/vee gradienti. Mõlemad gradiendilahused sisaldasid lisaks 0,1% TFA-d. Sünteesitud peptiidi fraktsioon identifitseeriti MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight* – maatriks-assisteeritud laserdesorptsioon-ionisatsioon lennuaja) mass-spektromeetriga, kasutades maatriksina α -tsüaano-4-hüdrosükaneelhapet. Seejärel peptiid külmutati üleöö, lüofiliseeriti ning säilitati pulbrina või 1 mM lähtelahusena.

2.2.2. Rakkude kultiveerimine

Katsetes kasutati HeLa ja HEK293 rakuliine. Rakke kasvatati 37 °C ja 5% CO₂ tingimustes ning rakukultuure lahjendati iga 2-3 päeva tagant, hoidmaks rakkude täituvust alla 100%. HeLa ja HEK293 rakke kasvatati Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) söötmes, milles oli lisandina L-glutamiini stabiilsem alternatiiv glutaMAX. Söötmele lisati 0,1 mM lõppkontsentratsiooniga asendatavaid aminohappeid, 1,0 mM lõppkontsentratsiooniga naatriumpüruvaati ja 10% lõppkontsentratsiooniga veiseloote seerumit (FBS-i) ning 100 U/ml penitsilliini ja 100 mg/ml streptomüsiini.

Transfektsooniks külvati 24 h enne katse algust kas 24-kaevulistele plaatidele 50 000 rakku kaevu kohta või 10 cm² plaatidele 1,5 miljonit rakku. Transfektsooniks peavad rakud olema saavutanud 75-90%-lise täituvuse.

2.2.3. Komplekside moodustumine

Transfektsoonil kasutati lastmolekulina 5256 aluspaari suurust pGL3-*Control* (Promega) vektorplasmidi, mis sisaldab muudetud jaanimardika (*Photinus pyralis*) lutsiferaasi tootvat osa. Selle valkprodukti on võimalik kiirelt ja efektiivselt Promega lutsiferaasi määramise komplekti abil kindlaks teha (täpsem kirjeldus peatükis 1.4). Nii tootmistaseme kui ka endosomaalsete põiekest e eraldamise katsed tehti sama plasmiidiga.

Kompleksid moodustati 1 h enne DNA sisestust ja selleks segati vastavas vahekorras peptiidilahus, 0,05 mg/ml plasmiidilahus ning vesi, saavutamaks lõppruumala 160 µl, 330 µl või 510 µl. Katsetes kasutati erinevaid teoreetilisi laengusuhteid (*charge ratio*, *CR* – inglise k.), kuid peamiselt CR2 ja CR3, mis on optimaalseks kõigile kolmele peptiidile.

Transfektsoonil moodustavad komplekside lahused 1/10 lõplikust rakkudele peale kantavast lahusest ($V_{\text{Kogu}}=500 \mu\text{l}$ 24-kaevulise plaadi korral ning $V_{\text{Kogu}}=5 \text{ ml}$ 10 cm² tassi korral). Enne transfektiooni pesti rakke PBS-iga, et eemaldada surnud ja mittekinnitunud rakud.

Lutsiferaasi tootmistaseme katsetes inkubeeriti rakke kompleksidega 4 h ning endosomaalsete organellide eraldamist nõudvates katsetes 0,2 kuni 24 h. Nii transfektiooni ajal kui pärast seda inkubeeriti rakke 37 °C ja 5% CO₂ juures kuni järgmiste etappideni.

2.2.4. Lutsiferiin-lutsiferaas süsteem valgu tootmistaseme määramiseks

Lutsiferaasi reaktsiooni mõõtmiseks pesti rakud kaks korda PBS-lahusega (PAA Laboratories GmbH) ning rakkude lüüsiks lisati 100 µl 0,1%-list Triton-X lahust PBS-is. Rakke inkubeeriti 4 °C juures 30 min ning valgele 96-kaevulisele plaadile kanti 20 µl rakulüsaati. Plasmidi lutsiferaasi tootmistaseme mõõtmiseks kasutati Promega lutsiferaasi-mõõtmisüsteemi GLOMAX TM 96 mikroplaat luminomeetrit (Promega). Lutsiferaas on oksüdatiivne ensüüm, mis reageerib lutsiferiiniga ning selle tulemusena eraldub luminestsents. Tulemused normaliseeriti valgusisalduse alusel. Valgusisalduse määramiseks kasutati DC valgumääramise komplekti (Bio-Rad Laboratories Inc, USA).

2.2.5. Nanopartiklite iseloomustamine

Selleks, et iseloomustada nanopartiklite stabiilsust, töödeldi neid pDNA-ga konkureeriva anioonse ühendiga. Nanopartiklite resistentsus hepariinile määrati moodustunud kompleksidele hepariini soola lahuse lisamisega. Kompleksid moodustati eelpool mainitud viisil ning inkubeeriti toatemperatuuril 1 h. Pärast seda lisati 100 µl-le kompleksile erineva kontsentratsiooniga hepariini (lõppkontsentratsiooniga 0,5 kuni 15 mg/ml lahuse kohta). Hepariini lisamise järel inkubeeriti lahust 37 °C juures 0,5 h ning lisati laadimispuhver. Seejärel kanti kompleksilahused 1%-lisele agarosgeelile ning elektroforeesiti 0,5 kordses TAE (Tris alus, äädikhape, EDTA) puhvris (pH 8,3). Plasmiidne DNA visualiseeriti etiidiumbromiidi (EtBr-i) abil. EtBr-i lõppkontsentratsiooniks oli 0,5 µg/ml.

Lisaks geelile kandmisele määrati peptiidi DNA pakkimisvõime EtBr-i välistamise (*exclusion assay*) abil, kus määratakse vaba pDNA hulk EtBr-ist tuleneva fluorestsentsi alusel. Meetodi puhul lisati 20 µl moodustunud (ja hepariiniga inkubeeritud) kompleksidele 135 µl vett ning proov kanti mustale 96-kaevuga plaadile (NUNC). Seejärel lisati 15 µl EtBr-i lahust, saavutamaks lõppkontsentratsioon 400 nM EtBr-i kaevu kohta. Seejärel proovid segati ning inkubeeriti 10 min toatemperatuuril. Fluorestsentsi mõõdeti kasutades Spectra Max Gmini XS fluoromeetrit (Molecular Devices, Palo Alto, CA) neelduvusega $\lambda_{ex}=518$ nm and kiirgusega $\lambda_{em}=605$ nm juures. Tulemused on antud kolme eraldi mõõtmise keskmisena ning normaliseeritud nullproovi ning komplekse mittemoodustanud DNA vastu (100%).

2.2.6. Endosomaalsete põiekestete eraldamine ja analüüs

DNA sisestuse järel eemaldati rakkudelt sööde, pesti PBS-iga ning lisati 1 ml trüpsiini. Trüpsineerimise järel pesti rakke külma PBS-iga viidi 15 ml tuubikusse ning tsentrifuugiti olenevalt rakuliinist 1200-1500 rpm (200-300 x g), 4 - 6 minutit (Sigma 2-16PK, 12071). PBS-i eemaldamise järel lisati igale proovile 1,5 ml tasakaalustuspuhvrit (3 mM imidasool; 0,25 M sahharoos (AppliChem); 1 mM EDTA vesilahus, pH 7,4 (Gibco, Life Technologies)). Lahus segati ning rakud tsentrifuugiti põhja 1200 - 1500 rpm (200-300 x g), 4-6 minutit (Sigma 2-16PK, 12071). Eemaldatud supernatant eraldati järgnevateks analüüsideks. Rakkudele lisati 1 ml puhvrit ning seejärel purustati plasmamembraan, kasutades olenevalt rakuliinist 26-29 G nõelaga süstalt (Terumo, Belgia). Rakkude lõhkumiseefektiivsust kontrolliti mikroskoobi all ning ka trüpaansinise lisamisega. Suspensioonist purunemata rakkude ja tuumade eemaldamiseks tsentrifuugiti seda 2383 rpm (800 x g) juures 10 minutit (Sigma 2-16PK, 12071). Samaaegselt valmistati ette ultratsentrifuugituubid (Beckman

Coulter), mida hoiti jääl ning lisati põhja 1,5 ml 2,5 M sahharoosi vesilahust. Percoll (Sigma-Aldrich) segati 2,5 M sahharoosiga, et saada 90%-line Percolli segu.

Supernatant segati 6,7 ml tasakaalustuspuhvriga, 2,2 ml 90% Percolliga ja 0,2 ml 20%-lise veise seerumi albumiini (*bovine serum albumine*, BSA – inglise k.) lahusega. Lahus lisati aeglaselt ultratsentrifuugituubi 2,5 M sahharoosi peale. Tuubid sisestati metallkestadesse ning tsentrifuugiti 2 h 22 000 rpm (60 000 x g) juures (Beckman Optima LE-80K, SW 41 Ti rootor) gradiendi moodustamiseks. Gradiendilt korjati 0,5 – 1 ml ruumalaga fraktsioonid, kasutades peristaltilist pumpa (Pharmacia P1, 10x kiirus, positsioon 2) või Frac-920 fraktsioonikogujat. DNA olemasolu fraktsioonides tehti kindlaks kas UVis-920 aparaadiga fraktsioonide kogumise käigus või NanoDrop2000 aparaadi abil fraktsioonide korjamise järel. Iga fraktsioon kaaluti.

Western bloti (WB-i) jaoks heljundati fraktsioonid tasakaalustuspuhvis, et saavutada lõppruumala 4 ml. Percolli eemaldamiseks tsentrifuugiti saadud fraktsioone 28 700 rpm (100 000 x g) juures 1 h (Beckman Optima LE-80K, SW 55 Ti rootor). Tsentrifugimise tulemusena moodustus põhja kõva sade ning peale jäi vedelik, mis sisaldas valke. Vedelik korjati ning valgud sadestati, kasutades 95%-lis etanooli (EtOH-i) 9:1 valgu lahuse kohta. Seejärel külmutati vedelik -80 °C juures 3 h ja tsentrifuugiti 4 °C juures, 30 minutit 14 000 rpm (pööret minutis, *rotation per minute*). Supernatant eemaldati ja sade taasheljundati SDS (*sodium dodecyl sulfate* – inglise k.) puhvis.

PCR-i jaoks kasutati igast fraktsioonist 250 µl, millele lisati 50 µl 1 M LiCl ja 250 – 350 µl 70 %-list isopropanooli. Seejärel inkubeeriti proove 4 °C juures 1 h ning tsentrifuugiti 4°C juures 30 min (14 000 rpm, Sigma 2-16PK, 12148). 450 µl supernatanti eemaldati ning sademele lisati 96%-list EtOH-i. Seejärel inkubeeriti proove 1 h -20 °C juures ning tsentrifuugiti 4 °C juures 30 minutit (14 000 rpm, Sigma 2-16PK, 12148). Supernatant eemaldati ja taasheljundati 20 µl sooja vees. RT-PCR-i jaoks võeti igast fraktsioonist 20 µl proovi, millele lisati 2 ml vett.

2.2.7. PCR ja RT-PCR

PCR-i abil saab pGL3-*Control* plasmiidilt paljundada 142 aluspaari suurust produkti, et kindlaks teha plasmidi olemasolu huvipakkavas fraktsioonis. Kasutatud praimerid on toodud tabelis 4. ja programmid tabelis 5. RT-PCR-i jaoks kasutati 5x HOT FIREPol EvaGreen HRM Mix (ROX) (Solis Biodyne, Eesti) ja PCR-i jaoks 5x FIREPol MasterMix 15,5 mM MgCl₂ segusid.

Tabel 4. Plasmidi pGL3-Control järjestusele sobilikud praimerid PCR-i jaoks.

Alglõik (Praimer)	Järjestus	Tootja	Ahel	Asukoht plasmiidis
pLuc 901784 rw	5' TGT CAA TCA GAG TGC TTT TGG CG 3'	Microsynth	-	1186-1164 (23)
pLuc 901783 fw	5' TTG ATA TGT GGA TTT CGA GTC GTC 3'	Microsynth	+	1045-1068)

Tabel 5. PCR-i ja RT-PCR-i programmid.

Etapp	PCR	RT-PCR
Faas I	95 °C, 1 min	95 °C, 15 min
Faas II	32 kordust: 95 °C, 20 sek; 59,5 °C, 30 sek; 72 °C 30 sek	40 kordust: 95 °C, 15 sek; 60 °C, 30 sek; 72 °C 1 min
Faas III	72 °C 7 min; 4° ∞	95 °C 15 sek; 60 °C 15 sek

PCR-i jaoks lisati 4 µl 5x FIREPol MasterMix 15,5 mM MgCl₂ segule 2-5 µl DNA lahust fraktsioonist, 0,8-1,2 µl 10 µM praimerite segu, et saavutada lõppruumala 20 µl. PCR-i järel kanti proovid 1,8%-lisele agarosgeelile, mis sisaldas EtBr-i. RT-PCR-i jaoks lisati 8 µl 5x HOT FIREPol EvaGreen HRM Mix lahusele 2-4 µl praimerite segu, 2-4 µl fraktsioonist pärit DNA proovi ja vett, et saavutada lõppruumala 44 µl. Iga proov kanti neljastes kordustes 10 µl kaupa PCR-i plaadile (ABI-tüüp, Bioplastics).

2.2.8. Western blot

Valgud lahutati 10%-lises SDS-polüakrüülamiidgeelis 1x SDS jooksutuspuhvris (glütserool 14,4 g/l, Tris 3,2 g/l). Positiivseks kontrolliks oli 5 µl rakulüsaati. Molekulmassi hindamiseks kanti peale *Prestained Protein Ladder (Marker)* markerit (Fermentas, Eesti). Lahutatud valgud kanti üle nitrotselluloosmembraanile *HyobndTM- ECL* (GE Healthcare), kasutades *semi-dry* ülekandemasinat (*Trans-Blot SD semi-dry transfer cell*, Biorad). Membraanid immutati eelnevalt *semi-dry* puhvris (39 mM glütsiin, 48 mM Tris, 0,037% SDS, 20% metanool). Ülekanne kestis 1 h 15 V juures.

Ülekande järel inkubeeriti valke kandvat membraani 1-24 h jooksul 5%-lises lõssilahuses pesupuhvris (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20). Primaarsete antikehadena kasutati anti-LAMP2 ja anti-Rab5 antikehi. Kasutati anti-Rab5 (abcam, ab18211), Rab5 valgu vastast jänese polükloonaalset antikeha, mis annab 25 kDa vöödi ja hiire monokloonaalset anti-LAMP2 (abcam, ab25631) antikeha 100-110 kDa suuruse LAMP2 vastu. Primaarsete antikehadega (anti-Rab5 lahjendusega 1:500 ja anti-LAMP2 lahjendusega 1:100) 2%-lises lõssilahuses

pesupuhvris inkubeeriti membraani 1 h ning seejärel pesti membraani 3 korda pesupuhvris 10 min kaupa.

Sekundaarne antikeha (HRP-konjugeeritud anti-hiir ja anti-jänes antikehad) lahustati 2%-lises lõssilahuses (lahjendusega 1:10000). Sekundaarsete antikehadega inkubeeriti membraane 1 h ning seejärel pesti 3 korda 10 minutit pesupuhvriga. WB HRP-signaali tuvastamiseks kasutati ECLTM komplekti (GE Healthcare) ja ImageQuantTM – RT ECL, versioon 1.0.1 (GE Healthcare) aparati.

2.2.9. Tulemuste analüüs

Ekspressioonikatse tulemused on näidatud vähemalt 3 iseseisva katse keskmisena, mis on tehtud triplikaatidena. Mõõtmistulemuste analüüsiks kasutati GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) ja Microsoft Office Excel 2007 programmi.

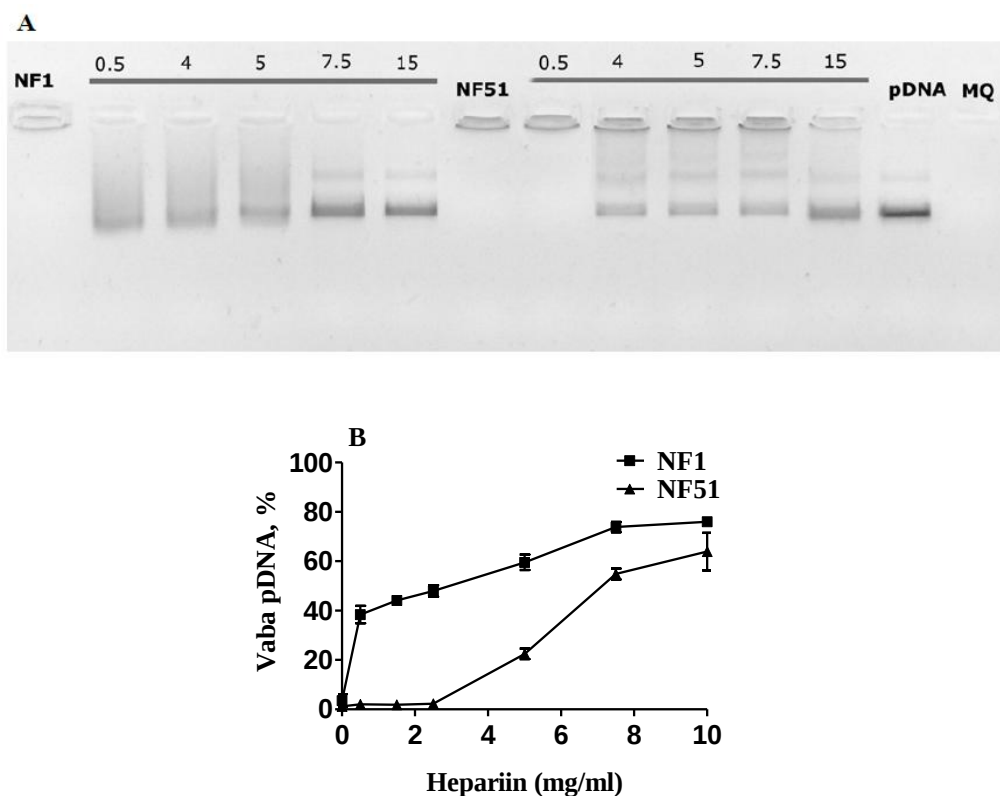
2.3. Tulemused ja arutelu

Antud töö eesmärgiks oli uurida pGL3 plasmidi transporti rakkudesse rakku sisenevate peptiididega NickFect1 ja NickFect51. Selgitamaks RSP/pDNA komplekside füüsikalise-keemilisi omadusi, kasutati hepariini kui pDNA-ga konkureerivat anioonset ühendit ning rakku sisenemise ja rakus liikumise protsesside selgitamiseks analüüsi endosomaalseid põiekesi. Transfektsiooni efektiivust hinnati lutsiferiin-lutsiferaas süsteemi abil. Antud töös läbiviidud katsed on osa suuremast tööst, mille eesmärgiks on NF1/pGL3 ja NF51/pGL3 partiklite iseloomustus, sisenemismehhanismide uurimine, sisenemiseks kasutatavate radade ning rakusisese liikumise selgitamine.

2.3.1. RSP/pDNA partiklite iseloomustus

NF-id on primaarsed amfipaatset RSP-d, mille järjestuse positiivsed laengud võimaldavad RSP mittekovalentset sidumist negatiivselt laetud plasmidse DNA-ga. RSP/pDNA komplekside moodustamisel lähtuti RSP järjestuses olevate positiivsete laengute ning pDNA negatiivsete laengute suhtest, mis saadi arvutuslikult, plasmidi suurst aluspaarides ning RSP järjestuses olevate aminohapete laenguid arvesse võttes. Kuna NF51 järjestuses on summaarselt rohkem positiivseid laenguid kui NF1-l, kulub ühe plasmidi molekuli kohta vähem peptiidi. Väiksem vajaminev kogus võimaldab ka kõrgetel laengusuhtel hoida peptiidikontsentratsiooni madalal ning vähendada võimalike kontsentratsioonist tulenevate kõrvalmõjude ohtu. Liiga vähese RSP lisamisel jääb osa pDNA-st partiklikondenseerimata.

Mittekovalentne seondumine võimaldab lisaks lihtsustatud kompleksi moodustumisele ka efektiivsemat lastmolekuli vabanemist kompleksist, sest sideme lõikamine ei ole vajalik. Kuna mittekovalentselt moodustatud nanokompleksis on pDNA ja RSP vahelised kooshoidvad jõud nõrgemad kui kovalentsel sidemel, võib see mõjutada ka nanokomplekside stabiilsust ning seeläbi ka sihtmärgini jõudmist. Analüüsima NF1/pGL3 ja NF51/pGL3 komplekside stabiilsust hepariini juuresolekul, lisati pärast komplekside moodustamist kompleksidele hepariini soola ning inkubeeriti 30 min 37 °C juures. Hepariin asendab peptiid/pDNA kompleksis pDNA osa ja olenevalt sellest, kui tugevad on moodustunud komplekside RSP ja DNA vahelised interaktsioonid, on kompleksidest pDNA väljatõrjumiseks vajalik vastav kogus hepariini. NF1-ga moodustatud nanokompleksid lagunevad juba väga väikese koguse hepariini lisamisel, kuid NF51 jaoks on vaja kordi kõrgemat kontsentratsiooni (Joonis 7.).



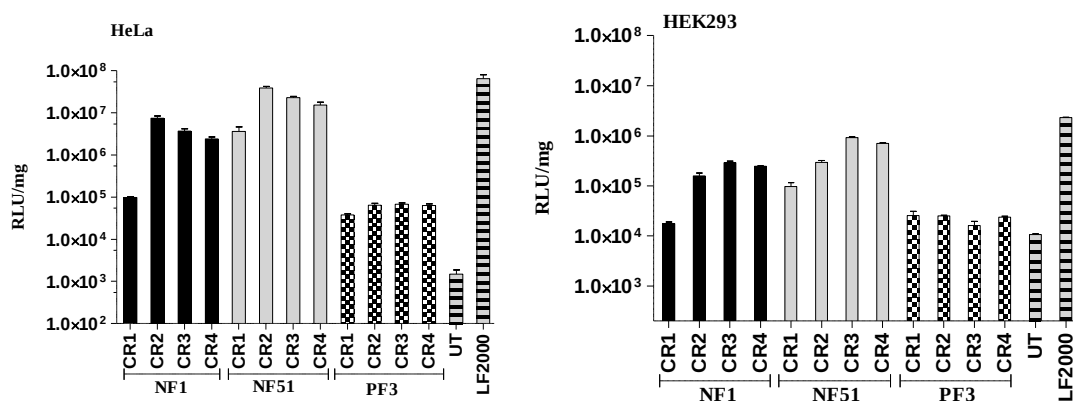
Joonis 7. NF1(NickFect1)/pDNA ja NF51(NickFect51)/pDNA komplekside stabiilsus hepariini lisamisel. Kompleksid moodustati standardtingimustel ning inkubeeriti 1 h toatemperatuuril. Katses kasutati laengusuhet 3:1 (CR3). Kompleksidele lisati erinevas koguses hepariini soola, saavutamaks lõppkontsentratsioon 0,5 – 15 mg/ml kompleksilahuse kohta. A) Analüüs EtBr-i sisaldaval 1,8 %-lisel agarosgeelil. Intaktsed kompleksid püsivad geelihambas, kompleksist vabanenud pDNA liigub hambast geeli. Kontrolliks on lisatud pDNA samas kontsentratsioonis, mis kompleksides. B) Spektromeetriline analüüs. Tulemused on normaliseeritud null-proovi ja pDNA fluorestsentsi vastu. Null-proov on võetud 0 %-ks ning pDNA, mis sisaldas kompleksidele kantud pDNA kogust, on võetud 100%-ks.

NF51-vahendatud efektiivsemat pakkimist võib selgitada rohkemate positiivsete laengute olemasoluga. Lisaks sisaldab NF51 ka ornitiini, mis soodustab DNA pakkimist kondenseeritud nanopartiklits (Ramsay ja Gumbleton 2002). DNA vabanemine kompleksist on oluline selleks, et DNA-lt saaks toimuda transkriptsioon. Samas on oluline pDNA jõudmine rakku ning juhul, kui kompleksid lagunevad enne partikli sisenemist rakku, ei suuda plasmiid iseseisvalt piisaval hulgal siseneda või DNA lagundatakse. RSP-de disainil tuleb leida tasakaal piisava kondenseerimisvõime ning õigeaegse lastmolekuli vabastamise vahel.

2.3.2. RSP-de vahendatud pDNA transport rakkudesse

RSP-de efektiivsus DNA transpordil sõltub nii nendega seotud lastmolekulidest, katsetingimustest kui ka katsetes kasutatud rakuliinidest. Lisaks ka peptiidi ja pDNA omavahelisest laengusuhtest. Rakukultuuris läbi viidud sõeluuringu tulemused parima laengusuhte kindlakstegemiseks on toodud joonisel 8. Transfektsiooniks kasutati kolme erinevat RSP-d, mille järjestused on toodud tabelis 3.

NF1 ja NF51 on PF3 edasiarendused, millel on suurenenud transfektsiooniaktiivsus. NF-ide puhul on kõige efektiivsem CR2 ja CR3, mis vastab peptiidi kontsentratsioonile 1,5-3 μM . Kõigil juhtudel oli RSP-de transfektsiooniefektiivsus madalam kui LipofectamineTM2000 (LF2000) (Joonis 8.). Kuna katsed olid läbi viidud FBS-i sisaldavas söötmes, on madalam transfektsiooniefektiivsus oodatav.



Joonis 8. Rakku sisenevate peptiidide NickFect1 (NF1), NickFect51 (NF51) ja PepFect3 (PF3) pDNA transfektsiooniefektiivsus HeLa ja HEK293 rakkudes erinevate laengusuhte juures (CR1-4). Kasutatud lutsiferiin-lutsiferaas süsteemi tootmistaseme määramiseks. Negatiivse kontrollina on kasutatud pDNA-ga töötlemata rakke (UT). Positiivse kontrollina on kasutatud LipofectamineTM2000 (LF2000). Sisestus on läbi viidud seerumit sisaldavas söötmes.

Plasmiidse DNA transport on keerulisem, sest nukleiinhappe molekul on kordades suurem kui siRNA või oligonukleotiidi molekul ning sobiliku suuruse saavutamiseks peab RSP olema võimeline teda piisavalt kokku pakkima. NF-d moodustavad pDNA-ga keskmiselt 50-190 nm suuruseid partikleid (Arukuusk jt., 2013), mis on piisavalt väikesed, et efektiivselt rakku siseneda. Seerumi lisamisel muutuvad nanopartiklid ligi kolm korda suuremaks ning negatiivselt laetuks (Arukuusk jt., 2013). Nii negatiivne laeng kui ka tõusnud partikli suurus mõjutavad partikli interaktsioone rakumembraaniga. Seerumita söötmes transfekteeerides on

MEF, Jurkat ja CHO (*chinese hamster ovary cells* – inglise k.) rakuliinides NF51 pDNA transpordil efektiivsem kui LF2000 ning transfektsiooni efektiivsus ei ole mõjutatud rakkude täituvusest enne transfektsiooni (Arukuusk jt., 2013).

Mõlemad NF-id on efektiivsed transportvektorid plasmiidsele DNA-le ning võrreldes disainil aluseks võetud PF3-ga ka suurema transfektsiooniefektiivsusega. RSP-dega moodustatud nanopartiklid jäävad samasse suurusjärku, seega suuruste erinevus ei ole otsustavaks teguriks nanopartikli sisenemisel rakku. Pigem on oluliseks järjestusse sisse viidud modifikatsioonid ning neist tulenevad eripärad peptiidiga moodustatud nanopartiklite interaktsioonidel lastmolekulidega, raku membraaniga ning liikumisel endotsütootilises rajas.

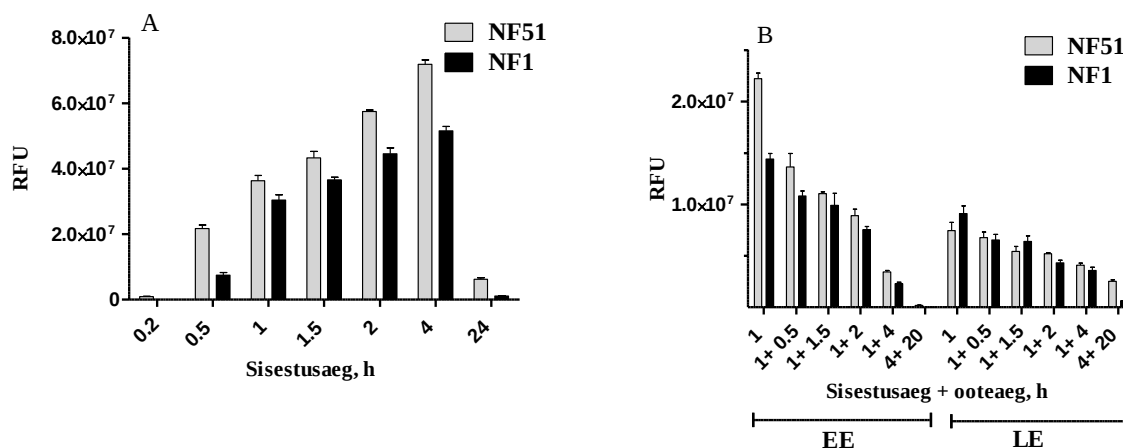
2.3.3. Komplekside transport endotsütootilises rajas

RSP-de rakusisese liikumise uurimiseks on mitmeid meetodeid, millest enamus hõlmavad kas peptiidi või lastmolekuli märgistamist. Kuigi fluorestsentsmärgistamine võib muuta nanopartikli omadusi, on see kõige informatiivsem ning enim levinud meetod. Antud töös kasutati endosomaalsete põiekestes eraldamist rakkudest ja sellele järgnevat analüüsi.

Endosomaalsete põiekestes eraldamine transfekteeeritud rakkudest võimaldab selgitada, kui palju RSP/pDNA komplekse rakku siseneb ning kuidas toimub nende rakusisene liikumine endotsütootilistes jaondites. Antud töös kasutati analüüsiks nii PCR-i kui ka RT-PCR-i, selgitamaks analüüsiks kõige sobivamat meetodit. Kogutud fraktsioonides paiknevate endosomaalsete põiekestes tüübi kindlakstegemiseks kasutati Western blot (WB) analüüsi ning markervalkude korrelatsiooni DNA paiknemisega kontrolliti fraktsioonides sisalduva DNA detekteerimise abil (Lisa 1.). Kuna endosoomide näol on tegemist bioloogiliselt tekkinud struktuuridega, moodustavad nad heterogeense populatsiooni, mis jaotub fraktsioonide vahel. Varastes ning hilistes endosoomides paiknev pDNA määrati suurima markervalku kontsentratsiooniga fraktsioonidest. Varaste endosoomide markervalkuks valiti Rab5 ning hiliste endosoomide ja lüsoosoomide markervalkuks LAMP2. Kuna LAMP2 ringleb nii raku plasmamembraani, endosoomide kui ka lüsoosoomide vahel, võib teda leida kõikidest fraktsioonidest ning täidab pigem positiivse kontrolli rolli.

PCR-i tulemused näitasid, et kuigi NF1 ja NF51 transfektsiooniefektiivsus on sarnane, käituvad nanopartiklid rakku sisenemisel ning endosomaalsetes jaondites liikudes erinevalt. NF51/pDNA partiklite sisenemine on kiirem ning juba 15 minuti möödudes on võimalik piisaval hulgal pDNA-d rakust detekteerida. NF1/pDNA partiklite sisenemine toimub aeglasemalt (Joonis 9.). NF51/pDNA partiklid paiknevad pikemalt varastes endosoomides

(EE) ning liiguvad aeglasemalt hilistesse endosoomidesse ning lüsoosoomidesse (LE), samas kui NF1/pDNA partiklid juhitakse lagundamiseks lüsoosoomidesse kiiremini ning suuremal määral (Joonis 9.). Järgnevates analüüsides kasutati PCR-i asemel RT-PCR-i, sest see võimaldab kindlaks teha fraktsioonist plasmidi koopiaarvu raku kohta.

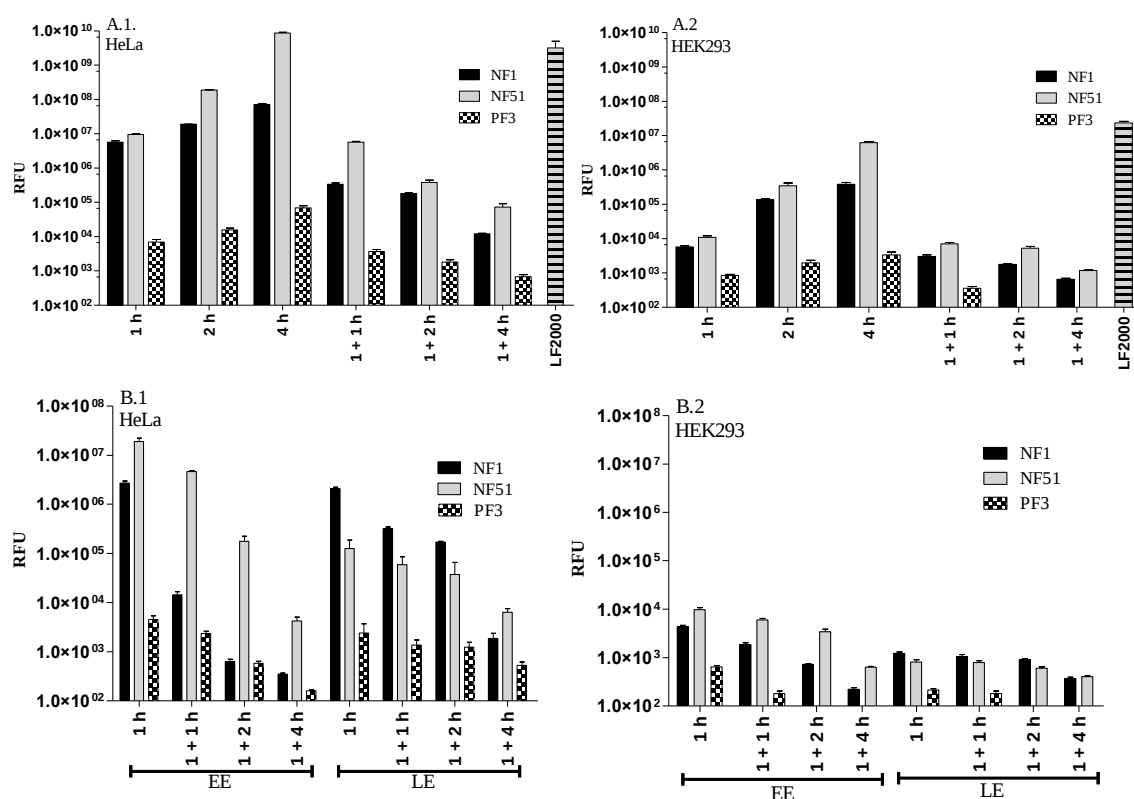


Joonis 9. NF1(NickFect1)/pGL3 ja NF51(NickFect51)/pGL3 partiklitega transfekeeritud HeLa rakud. Plasmiidne DNA detekteeriti fraktsioonidest, kasutades PCR-i. Tulemused on normaliseeritud töötlemata rakkude vastu ning igale geelile lisati teadaoleva DNA kontsentratsiooniga proovid. A) Detekteeritud DNA endosomaalsetest põiekestest ning tsütoplasmast. B) Detekteeritud DNA varastes (EE) ning hilistes endosoomides (LE). LE osa sisaldab ka lüsoosoomidest detekteeritud DNA-d.

LF2000 on lipofektsiooniks kasutatav reagent, mida iseloomustab suur transfektsiooniefektiivsus, kuid ka tsütotoksilisus. Võrreldes NF51-ga ja NF1-ga transfekeeritud rakkudega, paikneb lipofektsiooni korral rohkem pDNA-d rakus. Kuna fraktsioneerimise käigus selgus, et lipofektsiooni tulemusena toimub endosomaalsete põiekestest kergem purunemine, ei analüüsitud eraldi EE ja LE endosomaalsetes jaondites paiknevat DNA osakaalu vaid võeti arvesse ainult kogu rakkudesse jõudnud pDNA hulk (Joonis 10.).

Nii PCR-iga kui ka RT-PCR-iga on HeLa rakkudes tulemused võrreldavad (Joonis 9. ja Joonis 10.), mistõttu lisati katsete seeriasse ka PF3-ga, NF1-ga ja NF51-ga moodustatud nanopartiklitega transfekeeritud HEK293 rakud. Võrreldes HeLa rakkudega, toimub sisenemine HEK293 rakkudesse aeglasemalt ning ka väiksemas hulgas ja ajas toimub detekteeritud pDNA hulga vähenemine (Joonis 10.A.1. ja A.2.).

NF-idega ja PF3-ga transfecteeritud HeLa ja HEK293 rakkudest endosomaalsetest põiekestest detekteeritud pDNA osakaal varastes (EE) ja hilistes endosoomides/lüsoosoomides (LE) on toodud joonisel 10 B.1. ja B.2. Nii HEK293 kui ka HeLa rakkudest eraldatud endosoomidest detekteeriti kõige vähem pDNA-d PF3-ga transfecteeritud rakkudest ja kõige rohkem NF51-ga transfecteeritud rakkudest. PF3/pDNA suunati kiirelt degradeerimisele ning komplekside sisenemine toimus ajas lineaarselt, tsütoplasmasse vabanes vaid väike osa sisenenud kompleksidest. Nii HeLa kui ka HEK293 rakkude transfectsioonil on kiireim sisenemine NF51/pDNA kompleksidel, mida on võimalik detekteerida suuremal hulgal ning ka varasemal ajapunktil. NF51/pDNA vabaneb endosoomidest kergemini ning sisenemine on kiirem. HeLa ja HEK293 rakkudes toimus NF1/pDNA kiire degradeerimine kuid osa pDNA-st vabastati ka tsütoplasmasse.



Joonis 10. A) NickFect1-ga (NF1) ja NickFect51-ga (NF51) transfecteeritud HeLa ja HEK293 rakkudes pDNA koguhulk. B) NF1/pGL3 ja NF51/pGL3 partiklite paiknemine transfecteeritud HeLa ja HEK293 rakkude endosomaalsetes põiekestes. Plasmiidne DNA on detekteeritud endosomaalsetest jaonditest ning tsütoplasmast RT-PCR-i kasutades. Tulemused on normaliseeritud transfecteerimata rakkude vastu. LipofectamineTM2000-ga (LF2000) lipofektsioonilt koguti andmed peale 2 tunnist inkubatsiooni kompleksidega. PepFect3 (PF3) on võetud võrdluseks.

2.3.4. NickFectid pDNA transporteritena

Nii NF1 kui ka NF51 võimaldavad pGL3 plasmiidilt lutsiferaasi kodeeriva geeni kõrget ekspressiooni HeLa ja HEK293 rakuliinides. Kummagi peptiidi järjestusse sisse viidud modifikatsioonid suudavad tagada ekspressiooniks piisava hulga pGL3 plasmidi transpordi rakku, vabanemise endosoomidest ja jõudmise raku tuuma. Tulemused näitavad, et erinevad modifikatsioonid peptiidi järjestuses on viinud erinevate sisenemismehhanismideni, rakusisese liikumiseni ning nanopartikli füüsikalise-keemiliste omadusteni.

Modifikatsioonide tulemusena ei suuda NF1 partikleid sama efektiivselt pakkida kui NF51 ning partiklid dissotsieeruvad kergemini. Lisaks sellele ei vabane need partiklid endosoomidest sama efektiivselt ning suunatakse suurema tõenäosusega degradeerimisele lüsoosoomidesse. Kuigi NF1 partiklite dissotsieerumine on efektiivsem, suudab peptiid ka väiksema endosomaalse vabanemise korral tagada pGL3 plasmiidilt *Luc* geeni ekspressiooni. NF51-ga moodustunud partiklid vabanevad väga efektiivselt endosoomidest, kuid kuna pDNA jääb RSP-ga suure tõenäosusega seotuks, ei ole kõikides vabanenud partiklites olev pDNA funktsionaalselt kättesaadav.

Selles töös rakendatud subtsellulaarne fraktsioneerimine, endosoomide eraldamine ning endosoomide analüüs võimaldab jälgida RSP-dega rakku viidud pDNA liikumist endosomaalsetes jaondites, selgitada nanopartiklite liikumist rakus ning välja tuua kahe sarnase transfektsiooniefektiivsusega RSP erinevused. Lisaks sellele saab nanopartikleid uurida natiivses vormis, märgiseid lisamata. Tegemist on töömahuka meetodiga, mis võimaldab saada lisainformatsiooni transfektsioonil rakkudes toimuvatest protsessidest, kuid ei ole piisav iseseisvaks uurimismeetodiks. Selle abil saadud tulemused on pigem toetavaks informatsiooniks teistele katsetulemustele. Siiski annab meetod olulist informatsiooni RSP-dest bioloogilistes süsteemides.

KOKKUVÕTE

RSP-d on efektiivsed transportvektorid erinevatele molekulidele, sealhulgas ka plasmiidsele DNA-le. Magistritöö eesmärgiks oli kirjeldada kahe uuema põlvkonna RSP, NickFect1 ja NickFect51 vahendatud plasmiidse DNA transporti, kasutades lutsiferiin-lutsiferaas ekspressioonikatseid ja endosomaalsete vesiikulite analüüsi. Lisaks sellele iseloomustada ka moodustunud nanopartiklite stabiilsust

Endosomaalsete vesiikulite analüüsi protokollil väljatöötamisel selgusid meetodi mitmed kitsaskohad, kuid see meetod võimaldab pDNA detektsiooni endotsütoosiraja erinevates vesiikulites ilma märgiseid lisamata. Kuna märgise lisamine võib muuta RSP-ga moodustatud kompleksi omadusi ning liikumist rakus, annab rakkudest eraldatud endosomaalsete vesiikulite analüüs olulise info sellest, kuidas toimub kompleksi liikumine rakus.

Nii NF1 kui ka NF51 võimaldavad disainil aluseks võetud PF3-ga võrreldes efektiivsemat geeniekspressiooni plasmiidilt ning nende transpordivõime säilib ka seerumiga söötmes. Vaatamata sellele, et mõlemad RSP-d on PF3 edasiarendused ning sarnase järjestusega, on nende rakusisene transport erinev. NF51-ga moodustatud partiklid suudavad esile kutsuda kiiret ning efektiivset endosoomidest vabanemist, samas kui NF1-ga moodustatud partiklid dissotsieeruvad kergemini ning isegi vähemal määral endosoomidest vabanemisel suudavad tagada ekspresiooniks piisava hulga funktsionaalsete pDNA molekulide jõudmise rakutuumas.

Antud töö olulisus seisneb vajaliku taustinformatsiooni kogumises enne RSP-de rakendamist *in vivo* ning selgitatakse erinevate modifikatsioonide mõju rakku sisenemise efektiivsusele, rakusisesele transpordile ning nukleiinhappe funktsionaalsuse säilitamisele, et tulevikus disainida veelgi efektiivsemaid transportvektoreid. Edasisteks plaanideks on saadud tulemused valideerida, kasutades üksikpartikli jälgimise meetodit, selgitada nanopartiklite füüsikalisi-keemilisi omadusi erinevates keskkondades ning uurida RSP-de rakendatavust *in vivo* süsteemis.

Cell-penetrating peptides, NickFect1 and NickFect51 as plasmid DNA transporters

Ly Pärnaste

SUMMARY

In gene therapy, the delivery of therapeutic nucleic acids is the major obstacle curbing their use in medicine. Clinical use of nucleic acids is restricted due to their poor stability in the presence of serum and low uptake into cells due to their high molecular weight, negative charge and hydrophilic nature. Cell-penetrating peptides (CPP-s) offer an efficient, non-toxic, easy to manufacture delivery system that is capable of delivering different macromolecules into cells.

The aim of this work was to characterize NickFect1/pDNA and NickFect51/pDNA nanoparticles using different methods, to compare the transfection efficacy of CPP-s with their internalization and intracellular trafficking. Two new generation CPP-s, NF1 and NF51, which design is based on PF3, show high efficiency in delivery of pDNA. Both CPP-s are capable of transfecting different cell lines and remain non-toxic.

Although both CPP-s show similar transfection efficiency, their internalization and intracellular trafficking differ. NF51 promotes rapid endosomal escape after being internalized via endocytosis. Nanoparticles formed with NF51 are internalized faster and in greater amount, than those with NF1. Also, nanoparticles with NF51 are released into cytoplasm more efficiently.

The stability of nanoparticles in the presence of heparin sodium salt implies that nanoparticles formed with NF51 are more stable and do not dissociate as easily as the nanoparticles formed with NF1. Dissociation is important for the functionality of pDNA, but in the same time, the particles must stay intact for intracellular transport.

Although they harness different strategies, both CPP-s, NF1 and NF51 are efficient delivery vectors, allowing high gene expression from pDNA.

TÄNUSÕNAD

Eelkõige tänan oma kannatlikke juhendajaid, professor Ülo Langelit õigel kursil hoidmise ja Piret Arukuuske igapäevase laboritöö juhendamise, heade nõuannete ja õigeaegse motiveerimise eest. Tänan ka Margus Varjakut, Helin Räägelit, Sulev Ingerpuud ning Margot Heina abi eest katsete läbiviimisel, planeerimisel ning tehnilise toetuse eest. Lisaks sooviksin tänada oma toredat laboriseltskonda molekulaarse biotehnoloogia laborist, kellega on hea aega veeta nii laboris kui ka väljaspool ning kes on alati nõu või jõuga aitamas.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Akhtar, S. (2006). Non-viral cancer gene therapy: beyond delivery. *Gene Ther* 13(9): 739-740.
- Albanese, A., Tang, P. S. ja Chan, W. C. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng* 14: 1-16.
- Arancibia-Carcamo, I. L., Fairfax, B. P., Moss, S. J. ja Kittler, J. T. (2006). Studying the Localization, Surface Stability and Endocytosis of Neurotransmitter Receptors by Antibody Labeling and Biotinylation Approaches.
- Arnaiz, N. O., Kaufman, J. D., Daroowalla, F. M., Quigley, S., Farin, F. ja Checkoway, H. (2003). Genetic factors and asthma in aluminum smelter workers. *Arch Environ Health* 58(4): 197-200.
- Arukuusk, P., Pärnaste, L., Oskolkov, N., Copolovici, D. M., Margus, H., Padari, K., Möll, K., Maslovskaja, J., Tegova, R., Kivi, G., Tover, A., Pooga, M., Ustav, M. ja Langel, Ü. (2013). New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 1828(5): 1365-1373.
- Aslan, H., Zilberman, Y., Arbeli, V., Sheyn, D., Matan, Y., Liebergall, M., Li, J. Z., Helm, G. A., Gazit, D. ja Gazit, Z. (2006). Nucleofection-based ex vivo nonviral gene delivery to human stem cells as a platform for tissue regeneration. *Tissue Eng* 12(4): 877-889.
- Asparuhova, M. B., Barde, I., Trono, D., Schranz, K. ja Schumperli, D. (2008). Development and characterization of a triple combination gene therapy vector inhibiting HIV-1 multiplication. *J Gene Med* 10(10): 1059-1070.
- Boehm, M. ja Slack, F. (2005). A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*. *Science* 310(5756): 1954-1957.
- Boehm, M. ja Slack, F. J. (2006). MicroRNA control of lifespan and metabolism. *Cell Cycle* 5(8): 837-840.
- Boonsirichai, K., Sedbrook, J. C., Chen, R., Gilroy, S. ja Masson, P. H. (2003). ALTERED RESPONSE TO GRAVITY is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalization and lateral auxin transport in plant statocytes. *Plant Cell* 15(11): 2612-2625.
- Boulaiz, H., Marchal, J. A., Prados, J., Melguizo, C. ja Aranega, A. (2005). Non-viral and viral vectors for gene therapy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51(1): 3-22.
- Bowie, K. M. ja Chang, P. L. (1998). Development of engineered cells for implantation in gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 33(1-2): 31-43.
- Burnett, J. C. ja Rossi, J. J. (2012). RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem Biol* 19(1): 60-71.
- Capowski, E. E., Schneider, B. L., Ebert, A. D., Seehus, C. R., Szulc, J., Zufferey, R., Aebischer, P. ja Svendsen, C. N. (2007). Lentiviral vector-mediated genetic modification of human neural progenitor cells for ex vivo gene therapy. *J Neurosci Methods* 163(2): 338-349.
- Chen, X., Wang, J., Shen, H., Lu, J., Li, C., Hu, D. N., Dong, X. D., Yan, D. ja Tu, L. (2011). Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(3): 1193-1199.
- Chowdhury, E. H. (2009). Nuclear targeting of viral and non-viral DNA. *Expert Opin Drug Deliv* 6(7): 697-703.
- Conner, S. D. ja Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927): 37-44.

- Crombez, L., Morris, M. C., Heitz, F. ja Divita, G. (2011). A non-covalent peptide-based strategy for ex vivo and in vivo oligonucleotide delivery. *Methods Mol Biol* 764: 59-73.
- Cutroneo, K. R. (2003). Gene therapy for tissue regeneration. *J Cell Biochem* 88(2): 418-425.
- De Laporte, L., Cruz Rea, J. ja Shea, L. D. (2006). Design of modular non-viral gene therapy vectors. *Biomaterials* 27(7): 947-954.
- Delalande, A., Bouakaz, A., Renault, G., Tabareau, F., Kotopoulis, S., Midoux, P., Arbeille, B., Uzbekov, R., Chakravarti, S., Postema, M. ja Pichon, C. (2011). Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery in Achilles tendons: long lasting gene expression and restoration of fibromodulin KO phenotype. *J Control Release* 156(2): 223-230.
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. ja Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 271(30): 18188-18193.
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. ja Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 269(14): 10444-10450.
- Deshayes, S., Morris, M., Heitz, F. ja Divita, G. (2008). Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. *Adv Drug Deliv Rev* 60(4-5): 537-547.
- Dietz, G. P. ja Bahr, M. (2005). Peptide-enhanced cellular internalization of proteins in neuroscience. *Brain Res Bull* 68(1-2): 103-114.
- Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R. ja Brock, R. (2007). A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* 8(7): 848-866.
- Eggenberger, K., Birtalan, E., Schroder, T., Brase, S. ja Nick, P. (2009). Passage of Trojan peptoids into plant cells. *Chembiochem* 10(15): 2504-2512.
- El-Andaloussi, S., Johansson, H., Magnusdottir, A., Jarver, P., Lundberg, P. ja Langel, Ü. (2005). TP10, a delivery vector for decoy oligonucleotides targeting the Myc protein. *J Control Release* 110(1): 189-201.
- El-Andaloussi, S., Johansson, H. J., Lundberg, P. ja Langel, Ü. (2006). Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids. *J Gene Med* 8(10): 1262-1273.
- El Andaloussi, S., Lehto, T., Mäger, I., Rosenthal-Aizman, K., Oprea, I., Simonson, O. E., Sork, H., Ezzat, K., Copolovici, D. M., Kurrikoff, K., Viola, J. R., Zaghloul, E. M., Sillard, R., Johansson, H. J., Said Hassane, F., Guterstam, P., Suhorutšenko, J., Moreno, P. M., Oskolkov, N., Halldin, J., Tedebark, U., Metspalu, A., Lebleu, B., Lehtio, J., Smith, C. I. ja Langel, Ü. (2011). Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Res* 39(9): 3972-3987.
- Endoh, T. ja Ohtsuki, T. (2009). Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. *Adv Drug Deliv Rev* 61(9): 704-709.
- Eudes, F. ja Chugh, A. (2008). Cell-penetrating peptides: From mammalian to plant cells. *Plant Signal Behav* 3(8): 549-550.
- Ezzat, K., Andaloussi, S. E., Zaghloul, E. M., Lehto, T., Lindberg, S., Moreno, P. M., Viola, J. R., Magdy, T., Abdo, R., Guterstam, P., Sillard, R., Hammond, S. M., Wood, M. J., Arzumanov, A. A., Gait, M. J., Smith, C. I., Hällbrink, M. ja Langel, Ü. (2011a). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res* 39(12): 5284-5298.

- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. ja Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21): 7413-7417.
- Fischer, R., Waizenegger, T., Kohler, K. ja Brock, R. (2002). A quantitative validation of fluorophore-labelled cell-permeable peptide conjugates: fluorophore and cargo dependence of import. *Biochim Biophys Acta* 1564(2): 365-374.
- Fisher, L., Soomets, U., Cortes Toro, V., Chilton, L., Jiang, Y., Langel, Ü. ja Iverfeldt, K. (2004). Cellular delivery of a double-stranded oligonucleotide NFkappaB decoy by hybridization to complementary PNA linked to a cell-penetrating peptide. *Gene Ther* 11(16): 1264-1272.
- Frankel, A. D. ja Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55(6): 1189-1193.
- Gao, X., Kim, K. S. ja Liu, D. (2007a). Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J* 9(1): E92-104.
- Gao, Z., Wu, X., Song, N., Cao, Y. ja Liu, W. (2007b). Electroporation-mediated plasmid gene transfer in rat incisional wound. *J Dermatol Sci* 47(2): 161-164.
- Gordon, J. W. (2002). High toxicity, low receptor density, and low integration frequency severely impede the use of adenovirus vectors for production of transgenic mice. *Biol Reprod* 67(4): 1172-1179.
- Govindarajan, S., Kitaura, K., Takafuji, M., Ihara, H., Varadarajan, K. S., Patel, A. B. ja Gopal, V. (2013). Gene delivery into human cancer cells by cationic lipid-mediated magnetofection. *Int J Pharm* 446(1-2): 87-99.
- Green, M. ja Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55(6): 1179-1188.
- Gruenberg, J. ja van der Goot, F. G. (2006). Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(7): 495-504.
- Harfe, B. D. (2005). MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 15(4): 410-415.
- Heitz, F., Morris, M. C. ja Divita, G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol* 157(2): 195-206.
- Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T. ja Ross, E. M. (1988). Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J Biol Chem* 263(14): 6491-6494.
- Huang, S. ja Kamihira, M. (2013). Development of hybrid viral vectors for gene therapy. *Biotechnol Adv* 31(2): 208-223.
- Jarver, P. ja Langel, Ü. (2006). Cell-penetrating peptides--a brief introduction. *Biochim Biophys Acta* 1758(3): 260-263.
- Jayasena, S. D. (1999). Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* 45(9): 1628-1650.
- Jiang, Y. N., Mo, H. Y. ja Chen, J. H. (2010). [Gene transfer system mediated by PEI-cholesterol lipopolymer with lipid microbubbles]. *Yao Xue Xue Bao* 45(5): 659-666.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. ja Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(5): 1864-1868.
- Joliot, A. ja Prochiantz, A. (2004). Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* 6(3): 189-196.

- Jouret, F., Courtoy, P.J., Devuyst, O. (2011) Segmental and subcellular distribution of CFTR in the kidney. *Methods Mol. Biol.* 741:285-99
- Kaur, G. ja Roy, I. (2008). Therapeutic applications of aptamers. *Expert Opin Investig Drugs* 17(1): 43-60.
- Khalil, I. A., Kogure, K., Futaki, S. ja Harashima, H. (2006). High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression. *J Biol Chem* 281(6): 3544-3551.
- Kilk, K., El-Andaloussi, S., Järver, P., Meikas, A., Valkna, A., Bartfai, T., Kogerman, P., Metsis, M. ja Langel, Ü. (2005). Evaluation of transportan 10 in PEI mediated plasmid delivery assay. *J Control Release* 103(2): 511-523.
- Koren, E. ja Torchilin, V. P. (2012). Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends Mol Med* 18(7): 385-393.
- Laurenti, D. ja Ooi, L. (2013). Mammalian expression systems and transfection techniques. *Methods Mol Biol* 998: 21-32.
- Lavertu, M., Methot, S., Tran-Khanh, N. ja Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 27(27): 4815-4824.
- Lee, J. S. ja Tung, C. H. (2013). Lipo-oligoarginine-Based Intracellular Delivery. *Methods Mol Biol* 991: 281-292.
- Lee, M. T., Hung, W. C., Chen, F. Y. ja Huang, H. W. (2005). Many-body effect of antimicrobial peptides: on the correlation between lipid's spontaneous curvature and pore formation. *Biophys J* 89(6): 4006-4016.
- Liebhaber, S. A. (1997). mRNA stability and the control of gene expression. *Nucleic Acids Symp Ser*(36): 29-32.
- Lindberg, S., Munoz-Alarcon, A., Helmfors, H., Mosqueira, D., Gyllborg, D., Tudoran, O. ja Langel, Ü. (2013). PepFect15, a novel endosomolytic cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery via scavenger receptors. *Int J Pharm* 441(1-2): 242-247.
- Lundberg, P., El-Andaloussi, S., Sutlu, T., Johansson, H. ja Langel, Ü. (2007). Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *FASEB J* 21(11): 2664-2671.
- Lundstrom, K. (1999). Alphaviruses as tools in neurobiology and gene therapy. *J Recept Signal Transduct Res* 19(1-4): 673-686.
- Lundstrom, K. (2002). Alphavirus vectors as tools in cancer gene therapy. *Technol Cancer Res Treat* 1(1): 83-88.
- Lundstrom, K. (2009). Alphaviruses in gene therapy. *Viruses* 1(1): 13-25.
- Lundstrom, K. ja Boulikas, T. (2003). Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials. *Technol Cancer Res Treat* 2(5): 471-486.
- Ma, Y. ja Liu, D. (2013). Hydrodynamic delivery of adiponectin and adiponectin receptor 2 gene blocks high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Gene Ther.*
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü., Futaki, S. ja Graslund, A. (2011). Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys* 2011: 414729.
- Mäe, M., El Andaloussi, S., Lundin, P., Oskolkov, N., Johansson, H. J., Guterstam, P. ja Langel, Ü. (2009). A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *Journal of Controlled Release* 134(3): 221-227.

- Mäe, M. ja Langel, Ü. (2006). Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr Opin Pharmacol* 6(5): 509-514.
- Mann, A., Thakur, G., Shukla, V. ja Ganguli, M. (2008). Peptides in DNA delivery: current insights and future directions. *Drug Discov Today* 13(3-4): 152-160.
- Matsuzaki, K., Yoneyama, S., Murase, O. ja Miyajima, K. (1996). Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. *Biochemistry* 35(25): 8450-8456.
- Mayor, S. ja Pagano, R. E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(8): 603-612.
- Medi, B. M. ja Singh, J. (2008). Delivery of DNA into skin via electroporation. *Methods Mol Biol* 423: 225-232.
- Merdan, T., Kopecek, J. ja Kissel, T. (2002). Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 54(5): 715-758.
- Morris, M. C., Chaloin, L., Mery, J., Heitz, F. ja Divita, G. (1999). A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acids Res* 27(17): 3510-3517.
- Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. ja Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol* 19(12): 1173-1176.
- Morris, M. C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F. ja Divita, G. (1997). A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 25(14): 2730-2736.
- Nartprayut, K.Y., U. P., Kheolamai, P., Manochantr, S., Chayosumrit, M., Issaragrisil, S. ja Supokawej, A. (2013). Cardiomyocyte differentiation of perinatally derived mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep* 7(5): 1465-1469.
- Noguchi, M., Yoshioka, K., Hikono, H., Iwagami, G., Suzuki, C., Kikuchi, K. (2013). Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm. *Zygote*. 2013 May 9:1-8.
- Ogunremi, O., Pasick, J., Kobinger, G. P., Hannaman, D., Berhane, Y., Clavijo, A. ja van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2013). A Single Electroporation Delivery of a DNA Vaccine Containing the Hemagglutinin Gene of Asian H5N1 Avian Influenza Virus Generated a Protective Antibody Response in Chickens against a North American Virus Strain. *Clin Vaccine Immunol* 20(4): 491-500.
- Oh, S., Pluhar, G. E., McNeil, E. A., Kroeger, K. M., Liu, C., Castro, M. G., Lowenstein, P. R., Freese, A. ja Ohlfest, J. R. (2007). Efficacy of nonviral gene transfer in the canine brain. *J Neurosurg* 107(1): 136-144.
- Oh, Y. K. ja Park, T. G. (2009). siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev* 61(10): 850-862.
- Oskolkov, N., Arukuusk, P., Copolovici, D. M., Lindberg, S., Margus, H., Padari, K., Pooga, M. ja Langel, Ü. (2011). NickFects, Phosphorylated Derivatives of Transportan 10 for Cellular Delivery of Oligonucleotides. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 17(2): 147-157.
- Padari, K., Säälk, P., Hansen, M., Koppel, K., Raid, R., Langel, Ü. ja Pooga, M. (2005). Cell transduction pathways of transportans. *Bioconjug Chem* 16(6): 1399-1410.
- Pathak, A., Patnaik, S. ja Gupta, K. C. (2009). Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery. *Biotechnol J* 4(11): 1559-1572.

- Pfeffer, S. R. (2001). Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol* 11(12): 487-491.
- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M. ja Langel, Ü. (1998a). Cell penetration by transportan. *FASEB J* 12(1): 67-77.
- Pooga, M., Kut, C., Kihlmark, M., Hällbrink, M., Fernaeus, S., Raid, R., Land, T., Hallberg, E., Bartfai, T. ja Langel, Ü. (2001). Cellular translocation of proteins by transportan. *FASEB J* 15(8): 1451-1453.
- Pooga, M., Soomets, U., Hällbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., Kahl, U., Hao, J. X., Xu, X. J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hokfelt, T., Bartfai, T. ja Langel, Ü. (1998b). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol* 16(9): 857-861.
- Pujals, S., Fernandez-Carneado, J., Lopez-Iglesias, C., Kogan, M. J. ja Giralt, E. (2006). Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly. *Biochim Biophys Acta* 1758(3): 264-279.
- Puntel, M.A, K. M. G., Farrokhi, C., Vanderveen, N., Paran, C., Appelhans, A., Kroeger, K. M., Salem, A., Lacayo, L., Pechnick, R. N., Kelson, K. R., Kaur, S., Kennedy, S., Palmer, D.Ng, P., Liu, C., Krasinkiewicz, J., Lowenstein, P. R. ja Castro, M. G. (2013). Safety profile, efficacy, and biodistribution of a bicistronic high-capacity adenovirus vector encoding a combined immunostimulation and cytotoxic gene therapy as a prelude to a phase I clinical trial for glioblastoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 268(3): 318-330.
- Ramsay, E. ja Gumbleton, M. (2002). Polylysine and polyornithine gene transfer complexes: a study of complex stability and cellular uptake as a basis for their differential in-vitro transfection efficiency. *J Drug Target* 10(1): 1-9.
- Rao, D. D., Senzer, N., Cleary, M. A. ja Nemunaitis, J. (2009). Comparative assessment of siRNA and shRNA off target effects: what is slowing clinical development. *Cancer Gene Ther* 16(11): 807-809.
- Ravet, E., Lulka, H., Gross, F., Casteilla, L., Buscail, L. ja Cordelier, P. (2010). Using lentiviral vectors for efficient pancreatic cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 17(5): 315-324.
- Ray, P., Viles, K. D., Soule, E. E. ja Woodruff, R. S. (2013). Application of Aptamers for Targeted Therapeutics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*.
- Rennert, R., Neundorff, I., Jahnke, H. G., Suchowerskyj, P., Dournaud, P., Robitzki, A. ja Beck-Sickinger, A. G. (2008). Generation of carrier peptides for the delivery of nucleic acid drugs in primary cells. *ChemMedChem* 3(2): 241-253.
- Rich, D. P., Couture, L. A., Cardoza, L. M., Guiggio, V. M., Armentano, D., Espino, P. C., Hehir, K., Welsh, M. J., Smith, A. E. ja Gregory, R. J. (1993). Development and analysis of recombinant adenoviruses for gene therapy of cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 4(4): 461-476.
- Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V. ja Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* 278(1): 585-590.
- Ritchie, M., Tchistiakova, L. ja Scott, N. (2013). Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates. *MAbs* 5(1): 13-21.
- Romano, G., Michell, P., Pacilio, C. ja Giordano, A. (2000). Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 18(1): 19-39.

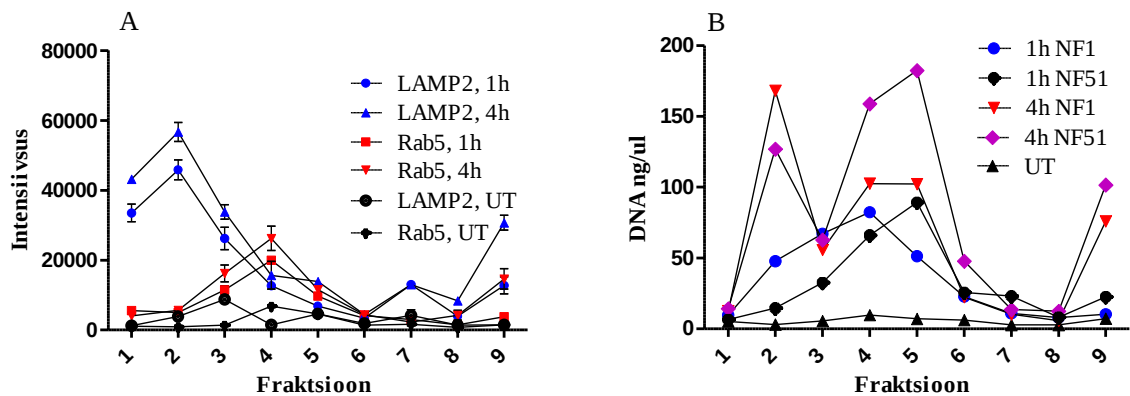
- Rothbard, J. B., Jessop, T. C., Lewis, R. S., Murray, B. A. ja Wender, P. A. (2004). Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J Am Chem Soc* 126(31): 9506-9507.
- Saar, K., Lindgren, M., Hansen, M., Eiríksdóttir, E., Jiang, Y., Rosenthal-Aizman, K., Sassian, M. ja Langel, Ü. (2005). Cell-penetrating peptides: a comparative membrane toxicity study. *Anal Biochem* 345(1): 55-65.
- Samson, S. L., Gonzalez, E. V., Yechoor, V., Bajaj, M., Oka, K. ja Chan, L. (2008). Gene therapy for diabetes: metabolic effects of helper-dependent adenoviral exendin 4 expression in a diet-induced obesity mouse model. *Mol Ther* 16(11): 1805-1812.
- Sarmiento, N., Sánchez-Yagüe, J., Juanes, P.P., Pérez, N., Ferreira, L., García-Hernández, V., Mangas, A., Calvo, J.J., Sánchez-Bernal, C. (2011) Changes in the morphology and lability of lysosomal subpopulations in caerulein-induced acute pancreatitis. *Dig Liver Dis.* 2011 Feb;43(2):132-8.
- Satoh, T. ja Manel, N. (2013). Gene transduction in human monocyte-derived dendritic cells using lentiviral vectors. *Methods Mol Biol* 960: 401-409.
- Schena, M., Heller, R. A., Theriault, T. P., Konrad, K., Lachenmeier, E. ja Davis, R. W. (1998). Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol* 16(7): 301-306.
- Schwake, G., Youssef, S., Kuhr, J. T., Gude, S., David, M. P., Mendoza, E., Frey, E. ja Radler, J. O. (2010). Predictive modeling of non-viral gene transfer. *Biotechnol Bioeng* 105(4): 805-813.
- Shah, A. K., Saunders, N. A., Barbour, A. ja Hill, M. M. (2013). Early diagnostic biomarkers for esophageal adenocarcinoma - the current state of play. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*
- Shen, F., Kuo, R., Milon-Camus, M., Han, Z., Jiang, L., Young, W. L. ja Su, H. (2013). Intravenous delivery of adeno-associated viral vector serotype 9 mediates effective gene expression in ischemic stroke lesion and brain angiogenic foci. *Stroke* 44(1): 252-254.
- Sicard, F., Gayral, M., Lulka, H., Buscail, L. ja Cordelier, P. (2013). Targeting miR-21 for the Therapy of Pancreatic Cancer. *Mol Ther.*
- Sledz, C. A. ja Williams, B. R. (2005). RNA interference in biology and disease. *Blood* 106(3): 787-794.
- Soman, P., Zhang, W., Umeda, A., Zhang, Z. J. ja Chen, S. (2011). Femtosecond laser-assisted optoporation for drug and gene delivery into single mammalian cells. *J Biomed Nanotechnol* 7(3): 334-341.
- Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R. ja Langel, Ü. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta* 1467(1): 165-176.
- Stull, R. A. ja Szoka, F. C., Jr. (1995). Antigene, ribozyme and aptamer nucleic acid drugs: progress and prospects. *Pharm Res* 12(4): 465-483.
- Suhorutšenko, J., Oskolkov, N., Arukuusk, P., Kurrikoff, K., Eriste, E., Copolovici, D. M. ja Langel, Ü. (2011). Cell-penetrating peptides, PepFects, show no evidence of toxicity and immunogenicity in vitro and in vivo. *Bioconjug Chem* 22(11): 2255-2262.
- Swanson, J. (1989). Fluorescent labeling of endocytic compartments. *Methods Cell Biol* 29: 137-151.
- Tagawa, H., Ikeda, S. ja Sawada, K. (2013). The role of microRNA in the pathogenesis of malignant lymphoma. *Cancer Sci.*

- Tencomnao, T., Klangthong, K., Pimpha, N., Chaleawler-Umpon, S., Saesoo, S., Woramongkolchai, N. ja Saengkrit, N. (2012). Acceleration of gene transfection efficiency in neuroblastoma cells through polyethyleneimine/poly(methyl methacrylate) core-shell magnetic nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 7: 2783-2792.
- Thomas, M. ja Klivanov, A. M. (2003). Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl Microbiol Biotechnol* 62(1): 27-34.
- Thoren, P. E., Persson, D., Esbjorner, E. K., Goksor, M., Lincoln, P. ja Norden, B. (2004). Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides. *Biochemistry* 43(12): 3471-3489.
- Trabulo, S., Cardoso, A. L., Cardoso, A. M., Morais, C. M., Jurado, A. S. ja de Lima, M. C. (2012). Cell-penetrating peptides as nucleic acid delivery systems: from biophysics to biological applications. *Curr Pharm Des*.
- Tunnemann, G., Martin, R. M., Haupt, S., Patsch, C., Edenhofer, F. ja Cardoso, M. C. (2006). Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB J* 20(11): 1775-1784.
- Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G. ja Haisma, H. J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J Control Release* 151(3): 220-228.
- Veiman, K. L., Mäger, I., Ezzat, K., Margus, H., Lehto, T., Langel, K., Kurrikoff, K., Arukuusk, P., Suhorutsenko, J., Padari, K., Pooga, M. ja Langel, Ü. (2013). PepFect14 peptide vector for efficient gene delivery in cell cultures. *Mol Pharm* 10(1): 199-210.
- Vives, E., Brodin, P. ja Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272(25): 16010-16017.
- Vives, E., Schmidt, J. ja Pelegri, A. (2008). Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochim Biophys Acta* 1786(2): 126-138.
- Völker, L.A., Schurek, E-M., Rinschen, M.M., Tax, B., Schutte, B.A., Lamkmeyer, T., Ungrue, D., Schemer, B., Benzig, T., Höhne, M. (2013) Characterization of short isoform of the kidney protein podocin in human kidney. *BMC Nephrology* 14:102
- Wadia, J. S., Stan, R. V. ja Dowdy, S. F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* 10(3): 310-315.
- Walrant, A., Matheron, L., Cribier, S., Chaignepain, S., Jobin, M. L. Sagan, S. ja Alves, I. D. (2013). Direct translocation of cell-penetrating peptides in liposomes: A combined mass spectrometry quantification and fluorescence detection study. *Anal Biochem* 438(1): 1-10.
- Wang, J., Faust, S. M. ja Rabinowitz, J. E. (2011). The next step in gene delivery: molecular engineering of adeno-associated virus serotypes. *J Mol Cell Cardiol* 50(5): 793-802.
- Wang, W., Li, W., Ma, N. ja Steinhoff, G. (2013a). Non-viral gene delivery methods. *Curr Pharm Biotechnol* 14(1): 46-60.
- Wang, Y., Zhang, X., Liu, L., Li, H., Yu, J., Wang, C. ja Ren, X. (2013b). Clinical Implication of MicroRNA for Lung Cancer. *Cancer Biother Radiopharm*.
- Weidhaas, J. B., Babar, I., Nallur, S. M., Trang, P., Roush, S., Boehm, M., Gillespie, E. ja Slack, F. J. (2007). MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res* 67(23): 11111-11116.
- Wen, Y., Guo, Z., Du, Z., Fang, R., Wu, H., Zeng, X., Wang, C., Feng, M. ja Pan, S. (2012). Serum tolerance and endosomal escape capacity of histidine-modified pDNA-loaded

- complexes based on polyamidoamine dendrimer derivatives. *Biomaterials* 33(32): 8111-8121.
- Yokoo, T., Kamimura, K., Suda, T., Kanefuji, T., Oda, M., Zhang, G., Liu, D. ja Aoyagi, Y. (2013). Novel electric power-driven hydrodynamic injection system for gene delivery: safety and efficacy of human factor IX delivery in rats. *Gene Ther.*
- Zaiss, A. K. ja Muruve, D. A. (2005). Immune responses to adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther* 5(3): 323-331.
- Zaiss, A. K. ja Muruve, D. A. (2008). Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Ther* 15(11): 808-816.
- Zeng, J., Wang, X. ja Wang, S. (2007). Self-assembled ternary complexes of plasmid DNA, low molecular weight polyethylenimine and targeting peptide for nonviral gene delivery into neurons. *Biomaterials* 28(7): 1443-1451.
- Zhang, S., Zhao, Y. ja Zhi, D. (2012). Non-viral vectors for the mediation of RNAi. *Bioorg Chem* 40(1): 10-18.
- Zhou, J. ja Rossi, J. J. (2011). Cell-specific aptamer-mediated targeted drug delivery. *Oligonucleotides* 21(1): 1-10.
- Ziegler, A. (2008). Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv Drug Deliv Rev* 60(4-5): 580-597.
- Zorko, M. ja Langel, Ü. (2005). Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 57(4): 529-545.

LISAD

LISA 1. Fraktsioonide analüüs. A) Western blot, kus primaarsete antikehadena kasutati anti-LAMP2 ja anti-Rab5 antikehasid, et detekteerida fraktsioonis paiknevaid endosomaalseid jaoneid. Kasutati *semi-dry* ülekandemasinat. Sekundaarse antikehana HRP-konjugeeritud antikeha. Kontrolliks kasutati töötlemata rakkudest saadud fraktsioone ning positiivse kontrollina rakulüsaati. B) Sadestamata fraktsioonidest detekteeritud DNA. Detektsooniks kasutati NanoDrop2000 aparaati. Kontrolliks kasutati MQ ja pDNA-d



LIHTLITSENTS

Mina **Ly Pärnaste** (15.12.1988) annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose **“Rakku sisenevad peptiidid NickFect1 ja NickFect51 plasmiidse DNA transporteritena”** reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

Olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile ja kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013