

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

KAIDA KOPPEL
**RAKKU PENETREERUVATE PEPTIIDIDE INTERNALISEERUMISE
EFEKTIIVSUS, TRANSPORDIVÕIME JA VÕIMALIKUD MEHHANISMID**

MAGISTRITÖÖ

Juhendaja: Margus Pooga, EBK vanemteadur, Ph.D.

TARTU 2005

SISUKORD

SISUKORD	2
SISSEJUHATUS	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
ENDOTSÜTOOS	5
Klatriin-vahendatud endotsütoos	6
Kaveoliin-vahendatud endotsütoos	7
Klatriin- ja kaveoliinsõltumatu endotsütoos	8
PENETREERUVAD PEPTIIDID	9
RPP-d transportvektorina	11
Tat perekonna peptiidid	12
Penetratiinid	14
Transportaan ja selle analoogid	16
Arginiinirikkad peptiidid	17
pVEC	18
Amfipaatsed mudelpeptiidid (MAP)	19
Membraani translokeeruvad peptiidid (MTS)	20
TÖÖ EESMÄRGID	21
KASUTATUD MATERJALID JA METOODIKAD	22
RAKUD	22
KASUTATUD TRANSPORTPEPTIIDID	22
FLUORESTSENTSMIKROSKOOPIA	23
Rakuorganellide immunotsütokeemiline märkimine	24
Internaliseerumise inhibeerimine	24
RPP-DE RAKUSISESE KONTSENTRATSIOONI MÕÕTMINE:	24
I Läbivoolutsütomeetria	24
II Fluorestsents-spektrofotomeetria	25
TULEMUSED	27
Penetreeruvate peptiidide internaliseerumise efektiivsuse ja kineetika uurimine	
läbivoolutsütomeetriliselt ja fluoromeetriliselt	27
Penetreeruvate peptiidide translokeerumine erinevatesse rakuliinidesse	29
Peptiid-vahendatud transport HeLa rakkudesse	30
FLUORESTSENTSMIKROSKOOPIA	32
RPP-valk komplekside assotsiatsioon filopoodide ja rakupinnaga	32
TPb-AvFITC kompleksi lokaliseerimine primaarsetes hiire fibroplastides	34
KOKKUVÕTE	47
SUMMARY	49
KASUTATUD KIRJANDUS	51

SISSEJUHATUS

Plasmamembraani lipiidne kaksikkiht takistab enamike rakule ohtlike, ebavajalike ja/või suurte makromolekulide sattumist raku sisekeskkonda. Diffusiooniga, erinevate transmembraansete valkude vahendusel või endotsütoosiga siseneb rakkudesse eluks vajalik.

Elektroporatsiooni, mikroinjektsiooni, liposoomide ja viiruslike vektorite kõrval on viimasel aastakümnen silmas pidades plasmamembraani läbimiseks ja rakkudesse molekulide transpordiks kasutatud spetsiifilisi rakku penetreeruvaid peptiide (RPP). Vähene toksilisus, universaalsus ja suhteliselt suur efektiivsus lubavad pidada RPP-dega vahendatud transporti perspektiivikaks alternatiiviks. Positiivsed tulemused on saadud RPP-dega nii *in vitro* kui *in vivo* katsetes ja hematoensefaalbarjääri läbimisel. Lisaks väikestele molekulidele on penetreeruvate peptiididega rakku toimetatud sellest kuni sadu kordi suuremaid makromolekule. Levinumad lastmolekulid on olnud erinevad oligonukleotiidid, peptiidid ja valgud, kuid transporditud on ka plasmiidset DNA-d, peptiidse nukleiinhappe oligomeere (PNA), nanopartikliteid, ja isegi liposoomi ning faagi partikleid.

Enamik RPP-sid on väikesed, loodusliku või sünteetilise päritoluga peptiidid. Nad on suhteliselt edukalt sünteesitavad ja kergelt konjugeeritavad või komplekseeritavad transporditava molekuliga. Lihtne kasutusviis näitab RPP-de potentsiaali saada tulevikus nii biotehnoloogias kui meditsiinis hõlpsalt kasutatavaks võimaluseks ravimite või muude vajalike molekulide sihtmärki toimetamisel.

KASUTATUD LÜHENDID

ah	aminohape
Antp-HD	Antennapedia homeodomeen
BSA	veise seerumalbumiin (<i>bovine serum albumin</i>)
Con A	konkanavaliin A
DNA	desoksüribonukleiinhape
ER	endoplasmaatiline retiikulum
ERK	endotsütootiline ringluskompartiment
ET	endotsütoos
FACS	läbivoolutsütomeeter (<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>)
FITC	fluorestseini-isotiotsüanaat
FSM	fluorestsents-spektrofotomeeter (<i>Fluorescence Spectrophotometer</i>)
GPI	glükosüül-fosfatidüülinositol (<i>glycosyl-phosphatidylinositol</i>)
GTP	guanosiin trifosfaat
HIV-1	inimese immuunpuudulikkuse viirus-1 (<i>human immunodeficiency virus- 1</i>)
HS	heparaansulfaat
kDa	kilodalton
MAP	amfipaadne mudelpeptiid
MTS	membraani suunav peptiid (<i>membrane translocating sequence</i>)
NFDM	rasvavaba piimapulber (<i>non fat dry milk</i>)
NLS	tuuma lokalisatsiooni signaal (<i>nuclear localisation signal</i>)
PBS	fosfaat-puhverdatud soolalahus (<i>Phosphate buffered saline</i>)
Pen	penetratiin - <i>Drosophila</i> Antennapedia homeovalgust pärinev peptiid)
PFA	paraformaldehüüd
PNA	peptiidne nukleiinhape
RPP	rakku penetreeruv peptiid
RPP-Fl	fluorestseiniiga märgistatud RPP
pVEC	vaskulaarse endoteeli kadheriinist pärinev penetreeruv peptiid (<i>VE-cadherin protein derived peptide</i>)
SV40	Simian Virus 40
Tat	HIV-1 regulaatorvalk
TP	transportaan
TP10	transportaani analoog, millel N-terminusest puudub 6 aminohapet
TRITC	tetrametüülrhodamiin-isotiotsüanaat

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

ENDOTSÜTOOS

Rakku ümbritsev plasmamembraan on selektiivse läbilaskvusega barjäär raku ja väliskeskkonna vahel. Läbi membraani moodustava fosfolipiidse kaksikkihi toimub mõlemasuunaline ainete transport. Gaasid (O_2 , N_2 , CO_2) ja väikesed laenguta mittepolaarsed molekulid liiguvad rakku passiivse difusiooni teel kontsentratsioonigradiendi suunas ilma metaboolset energiat kulutamata. Polaarsed veeslahustuvad molekulid (ATP, aminohapped), vesi, uurea, ioonid (K^+ , HPO_4^{2-}) kasutavad rakumembraani läbimiseks spetsiifilisi transportvalke. Transmembraansed valgud, mida jaotatakse pumpadeks, kanaliteks ja transporteriteks, vahendavad ainult ionide ja väikeste polaarsete molekulide liikumist. Keskmiseid ja suuri molekule nagu peptiidid, valgud, rasvad ei ole transportvalgud võimelised rakku viima.

Makromolekulide suunatud liikumine raku sise- ja väliskeskkonna vahel on limiteeritud ja toimub ekso- ning endotsütootiliselt. Endotsütoosi (ET) puhul internaliseeritakse vastavad ekstratsellulaarsed makromolekulid rakku membraani sissesopistumise teel tekkivatesse vesiikulitesse.

Traditsiooniliselt jaguneb endotsütoos fago- ja pinotsütoosiks. Fagotsütoosil toimub suurte partiklite nagu mikroorganismide ja surnud rakkude osade omastamine, milleks on võimelised ainult spetsialiseerunud rakud (makrofaagid, neutrofiilid, dendriitrakud). Pinotsütoosi alla liigitatakse kõik ülejäänud endotsütoosi teadaolevad vormid ja seetõttu kasutatakse mittefagotsüteerivates rakkudes endotsütoosi ja pinotsütoosi sünonüümina.

Pinotsütoosi saab jaotada vedela faasi pinotsütoosiks, kus rakku viiakse ekstratsellulaarset vedelikku koos seal lahustunud molekulidega ja retseptor-vahendatud pinotsütoosiks, kus makromolekulid kontsentreeruvad rakupinnale ja seonduvad kindlate retseptoritega (Conner and Schmid, 2003). Viimast nimetatakse tihti ka „adsorbtiivseks“ pinotsütoosiks. On autoreid, kelle arvates aga eristub spetsiifiliste retseptor-molekul interaktsioonidega retseptor vahendatud pinotsütoos „adsorbtiivsest“ pinotsütoosist, mille puhul kontsentreeruvad eksogeensed valgud plasmamembraani kindlatesse limiteeritud piirkondadesse, indutseerudes vesiikulite tekke mittespetsiifiliste interaktsioonide tõttu (Kim and Malik, 2003).

Morfoloogiliselt eristatakse nelja pinotsütoosi rada, mis erinevad vesiikulite kattevalkude koostise ja suuruse poolest: klatriin-vahendatud ET, kaveoliin-vahendatud ET, klatriin- ja kaveoliin-sõltumatu ET ja makropinotsütoos.

Klatriin-vahendatud endotsütoos

Klatriin-vahendatud endotsütoos on efektiivseim ja enim iseloomustatud retseptor-vahendatud endotsütoosi liik (Lamaze and Schmid, 1995). Klatriiniga kaetud lohkudesse koonduvad molekulid endotsüteeritakse kiiresti (10-50%/min) ~100-150 nm diameetriga vesiikulite abil (Mukherjee *et al.*, 1997), milles lisaks kolmeharulise struktuuriga klatriinile osalevad mitmed valgulised komponendid, mida nimetatakse adaptorvalkudeks (AP-perekonna valgud). Viimastest on kindlaks tehtud GTPaas dünaamiini hädavajalikkus, mis seondudes ümber punguva vesiikuli kaela soodustab membraani struktuuri lõhustumist ja sellega vesiikulite eraldumist ning liikumist rakku. Peale klatriin-vahendatud endotsütoosi on dünaamiini osalus määratud ka fagotsütoosil, kaveolaarsel endotsütoosil ja osaliselt ka katmata vesiikulite endotsüteerimisel (Hinshaw, 2000).

Endosoomide formeerumisel on tähtis osa aktiini tsütoskeletil kuna on demonstreeritud selle kontaktid mitmete endotsütoosi adaptorvalkudega. Edasine rakusisene transport toimub mikrotuubulite vahendusel ja aktiini tsütoskeleti häirumine takistatab imetaja rakkudes *in vitro* katsetes ainult osaliselt klatriin-kaetud vesiikulite formeerumist ja rakusisest transporti (Fujimoto *et al.*, 2000).

Klatriin-vahendatud endotsütoosil on oluline roll kudede ja organite arengul ning rakkudevahelises kommunikatsioonis signaalülekanal kontrollides retseptorite taset raku pinnal. Ta on seotud ka raku homeöstaasiga, reguleerides väikeste molekulide ja ionide intratsellulaarset taset membraani transportpumpade internalisatsiooni teel (Conner and Schmid, 2003) ja vajalik sünapsi membraanivalkude efektiivseks ümberpaigutamiseks pärast neurontransmissiooni (Takei *et al.*, 2001). Enim on uuritud klatriin-sõltuvat endotsütoosi imetajarakkudes LDLi (*low-density lipoprotein*) ja transferriini rakkudesse sisenemist kirjeldades.

Pärast virgatsaine seondumist spetsiifilise retseptoriga raku pinnal sopistub moodustunud kompleks rakku. Tekkinud transportvesiikuli abil suunduvad endotsüteeritud molekulid rakkude sisemusse ja pärast kattevalkude eemaldumist sulandub vesiikul kokku varajaste endosoomidega.

Varased endosoomid jaotakse sorteerivateks endosoomideks ja endotsütootiliseks ringluskompartmendiks (ERK – *endocytotic recycling compartment*). Sorteerivad endosoomid on rakus perifeerselt paiknevad tubulaarvesikulaarsed struktuurid, mille funktsiooniks on suunata molekulid nende õigesse sihtmärki. Langeva pH mõjul laguneb endosoomis retseptor–ligandi kompleks ja retseptorid koos membraani komponentidega transporditakse paari minuti jooksul enamikus tagasi raku pinnale. Teine osa molekulidest saadetakse multivesikulaarsetest tsisternikujulistest regioonidest (~60 nm diameetriga) koosnevasse ERK-sse (Gruenberg, 2001). Läbi ERK suunduvad molekulid erinevatesse sihtpunktidesse, põhiliselt tagasi plasmamembraanile (nt transferriin, mis jääb retseptoriga seotuks kuni raku pinnale tagasi saabumiseni) ja osaliselt trans-Golgi võrgustikku (Maxfield and McGraw, 2004).

Läbinud varaste endosoomide kompleksstruktuurid, liiguvad ülejäänud molekulid hilistesse endosoomidesse. Edasisel materjali ümberjaotusel viiakse degradiativsesse ratta sorteeritud molekulid lüsoosoomidesse, kus endotsüteeritud materjal lõplikult lagundatakse ja mittelagundatav materjal säilitatakse (Maxfield and McGraw, 2004).

Kaveoliin-vahendatud endotsütoos.

Klatriinist sõltumatu kaetud vesiikulitega vahendatud endotsütoosi üks eriliik on endotsütoos kaveoolide kaudu. Kaveoolid on väikesed (diameeter 50-80 nm) ja staatilised plasmamembraani sissesopistused, mis on levinud enamikes rakkudes, eriti lihasrakkudes, adipotsüütides ja endoteeli rakkudes. Nende pinda katab granulaarne spiraalitaoline struktuur, mille formeerumiseks on vajalik struktuurse valgu kaveoliini (kolm isovormi) (Rothberg *et al.*, 1992) ja selle abivalkude olemasolu (van Deurs *et al.*, 1989). Kaveoolide internaliseerumine toimub aeglaselt ($t_{1/2}$ ~20 minutit) (Conner and Schmid, 2003) punguva vesiikuli „kaelal“ sissesopistust soodustava dünaamiini kaasabil (Oh *et al.*, 1998).

Viimaste aastatel on tõestatud, et kaveoolid on membraani mikropiirkondade, mida nimetatakse ka “lipiidseteks parvedeks” („*lipid raft*“), spetsiifilise morfoloogiaga vorm. “Lipiidne parv” on sfingolipiidide ja kolesteroolirikas ala membraanis, mis madalal temperatuuril ei lahustu mitteioonset detergienti sisaldavas lahuses (van Deurs *et al.*, 1989) ja kuhu on koondunud märkimisväärne hulk erinevaid membraaniga seotud valke (GPI-ankurdatud valgud) ja signaalmolekule. On näidatud kaveoliini seotust nii kolesterooli kui sfingolipiididega (Murata *et al.*, 1995) ja kooskõlas sellega kaveoolide osalust vastavalt kolesterooli transtsütoosi (Martin and Parton, 2005) ja sfingolipiidide endotsütoosiga (Singh

et al., 2003). Kontrastina pole suudetud piisavat selgitada intratsellulaarse kolesterooli transporti ja homöostaasi toimumist kaveoliin-puudulikel hiirtel (Razani *et al.*, 2002).

Kaveoliin-vahendatud endotsütootilise raja kaudu on kohastunud rakku sisenema ka mitmed patogeenid. Nii sisenevad kaveoolide kaudu rakku näiteks SV40, polüoomi viirus ja *Vibrio cholerae* toksiin. Viimast kasutatakse sageli kaveolaarse endotsütoosi markerina (Orlandi and Fishman, 1998), kuigi osa kooleratoksiinist siseneb rakkudesse nii klatriinsõltuvalt kui ka klatriin- ja kaveoliinsõltumatuid radu kasutades (Torgersen *et al.*, 2001).

Klatriin- ja kaveoliinsõltumatu endotsütoos

Klatriin- ja kaveoliinsõltumatu endotsütoosi mehhanism on vähem uuritud, kuna antud radade efektiivset osalust saab näidata ainult teisi ET liike inhibeerivatel tingimustel. Samas on tõestatud, et klatriini vahendatud internalisatsiooni blokeerimine spetsiifiliste inhibiitoritega ei peata endotsütoosi, vaid suurendab klatriiniga mittekaetud vesiikulite kaudu toimuva endotsütoosi osakaalu. Nii näiteks on leitud, et pärast neuronite ja neuroendokriinsete rakkude kõrget sünaptilist aktiivsuset leiab aset klatriinsõltumatu ET, mida tõestab kaveoolide ja klatriin-kaetud vesiikulite internalisatsiooni inhibeerimine mutantse dünaamiiniga (Artalejo *et al.*, 2002, Conner and Schmid, 2003). Ka on näidatud, et IL2 retseptor siseneb kaveoliini mitte-ekspressseerivasse lümfotsüütidesse klatriinsõltuva ET inhibeerimisel, mida võimaldab seni veel täpselt kirjeldamata endotsütootilise mehhanismi olemasolu. Internaliseerunud IL2 leidmine detergendis lahustumatutest endosoomidest demonstreerib samaaegselt klatriinsõltumatu endotsütoosi võimalikku toimumist läbi spetsiifilise kolesterooli ja sfingolipiidide poolt rikka membraanipiirkonna (Lamaze *et al.*, 2001). Viimaste aastate uuringute tulemuste järgi arvatakse, et klatriin-sõltumatu endotsütoos omab olulist rolli membraani dünaamika ja plasmamembraani ümbermodelleerimise juures vastusena välisele stimulatsioonile (Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001).

Klatriinsõltumatu endotsütoosi eriliigiks on ainete transport **mikro- ja makropinotsütootiliselt**. **Makropinotsütoos** esineb erinevates rakuüüpides ja võib olla indutseeritud kasvufaktorite või teiste signaalide poolt. Aktiiniga toetatud membraansed väljasopistused tekitavad „tagasi kukkudes“ ja membraaniga assotsieerudes erineva suurustega (0,5 – 200 nm) 5-20 minutit eksisteerivaid dünaamilisi struktuure (Lamaze and Schmid, 1995), makropinosoome. Makropinosoomide moodustumiseks vajalikke membraanijätkete teke on vahendatud Ras perekonna GTPaaside poolt ja väljasopistuste

kokkusulandumine membraaniga toimub fosfatidüülinositol 3-kinaasi ja Rab GTPaaside vahendusel (Sun *et al.*, 2003). Erinevalt teistest pinotsütoosi liikidest on makropinotsütoos sõltuv aktiini polümerisatsioonist ega vaja dünaamiini (Kruth *et al.*, 2005).

Erinevatel endotsütoosi radadel on oluline roll mitmetes füsioloogilistes ja patoloogilistes protsessides. Sinna hulka kuulub näiteks ka raku polarisatsioon, antigeenide esitlemine, glükoosi transport, viiruste ja toksiinide endotsüteerimine jne. (Mukherjee *et al.*, 1997).

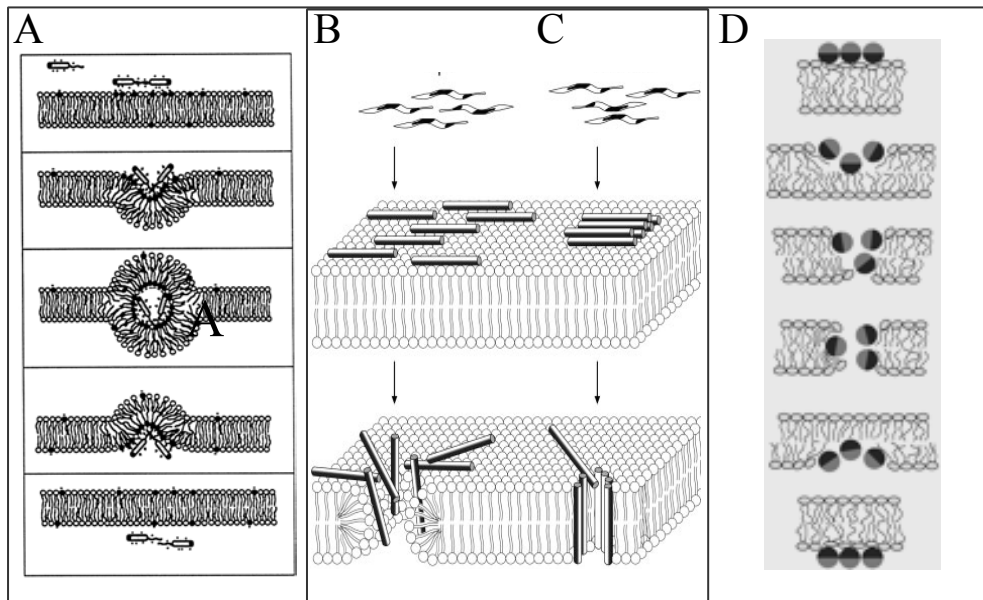
PENETREERUVAD PEPTIIDID

Rakku penetreeruvad peptiidid (RPP), kirjanduses nimetatud ka kui valgu transduktsiooni domeenid (*protein transduction domains* – PTD), membraani translokeeruvad järjestused (*membrane translocation sequence*- MTS) või integraalsed katioonsed piirkonnad (*integral cationic region* - ICR), on kuni 30 aminohappe pikkused peptiidid, mis arvati olevat võimelised tungima läbi rakumembraani (Derossi *et al.*, 1994), sõltumata näiliselt nii endotsütoosist kui ka rakulisest ATP energiast ja transportima rakkudesse erinevaid bioloogiliselt aktiivseid molekule. Aastate jooksul on kirjeldatud RPP-de sisenemist erinevatesse rakuliinidesse eri tingimustel nii *in vitro* kui ka *in vivo* katsetes (Dietz and Bahr, 2004). Täpset rahuldavat selgitust RPP-de translokeerumisele pole leitud, kuid praeguseks on välja pakutud erinevaid hüpoteese.

On kindel, et antud molekulide difusiooni teel rakku sisenemist ei saa tõenäoliseks pidada, sest suurte tugevasti laetud hüdrofiilsete molekulide jaoks on plasmamembraan läbimatu barjäär, lisaks ületab rakku penetreerunud peptiidi kontsentratsioon ekstratsellulaarses keskkonnas oleva peptiidi kontsentratsiooni (Hällbrink *et al.*, 2001). Kuna enamiku rakku penetreeruvate peptiidide puhul pole teada plasmamembraanis olevaid retseptorvalke võib arvata, et nad interakteeruvad kas membraani lipiididega või rakupinna glükosiidse komponendiga (Belting, 2003), kusjuures interaktsioon proteoglükaanide heparaansulfaadiga (HS) on oluliselt tugevam kui lipiididega (Ziegler *et al.*, 2005).

Esimene pakutud RPP-de internalisatsiooni mudelitest on pööratud mitselli mudel (joonis 1A), mille järgi peptiid kui hüdrofiilne positiivselt laetud molekul seostub elektrostaatiliselt tõmbejõu mõjul plasmamembraani negatiivselt laetud lipiididega

indutseerides pööratud mitselli moodustumise, mis liigub läbi plasmamembraani ja avaneb membraani teisele küljele, vabastades mitselli sisemuses olnud materjali tsütoplasmasse (Derossi *et al.*, 1998). Kuigi antud mudeliga võib selgitada mõnede RPP-de translokatsiooni, ei ole see piisav mõistmaks erineva hüdrofoobsusega peptiidide liikumist rakku (Lundberg and Langel, 2003).



Joonis 1. RPP-de rakkudesse penetreerumise mudelid

(A) pööratud mitselli mudel (Derossi *et al.*, 1998); translokatsioon läbi plasmamembraani poori abil (B) „carpet” mudelina (Pouny *et al.*, 1992) ja (C) „barrel-stave” mudelina (Gazit *et al.*, 1994); (D) „vakuu parve” mudel (Pokorny *et al.*, 2002)

Pööratud mitselli mudelit võib pidada vastandiks bakteriaalsete peptiidsete toksiinide poolt tekitavatele erinevatele pooride moodustamise mudelitele. Esimesel juhul (nimetatud ka „carpet” mudeliks)(joonis 1B) on positiivselt laetud peptiidid tugevalt interakteerunud fosfolipiidsete pearühmadega, mis kutsub esile membraani katkemise ja sellest tuleneva lipiidide ümberpaigutumise koos peptiidide liikumisega rakku (Pouny *et al.*, 1992). Teisel mudelil (nimetatud ka „barrel-stave” mudeliks)(joonis 1C) põhjustab membraanile paralleelselt paiknevate amfipaatsete α -helikaalsete peptiidide kogunemine lokaalse membraani õhenemise ja edasise poori tekke (Gazit *et al.*, 1994).

Hiljuti esitati Almeida ja tema grupi poolt uudne hüpotees, mis võiks sobida kirjeldama penetreeruvate peptiidide plasmamembraani läbimist ilma, et selleks oleks vaja pooride või pööratud mitselli teket. Antud mudel töötati välja lähtudes δ -lüsiini (26 ah, hemolüütiline peptiid, sekreteeritakse *Staphylococcus Aureuse* poolt) interaktsiooni kirjeldamisest fosfolipiidsete vesiikulitega (Pokorny *et al.*, 2002). Nii pakuti välja „vakuu

parve“ mudel (joonis 1D), kus läbi lipiidse kaksikkihi translokeerudes peab peptiid eelnevalt multimeriseeruma. Omavahel liitudes moodustavad α -helikaalse konformatsiooniga monomeer ja dimeer membraani pinnal trimeeri, mis “sukeldub” membraani väliskihiti. Edasi toimub heeliksiite keerumine membraanis nii, et hüdrofoobsed aminohapete kõrvalahelad on kontaktis lipiidide atsüülahelatega ja hüdrofiilsed osad on pööratud üksteise poole trimeeri keskele, kus heeliksid ei ole paralleelsed, vaid keskelt väändunud. Erinevusena teistest mudelitest paikneb helikaalne trimeer sellel translokeerumise vaheetapil paralleelselt membraani pinnaga, mitte risti (perpentikulaarselt) nagu eeldab poori või toru moodustumise mudel. Kõik trimeeri vaheseisundid membraanis kuni peptiidi translokeerumise lõpuni on väga ebastabiilsed. Antud mudeli esitajad arvavad, et trimeeri mudel sobib ka teiste oligomeersete struktuuride - dimeeride ja tetrameeride membraani läbimise kirjeldamiseks.

Kõik eelnevalt kirjeldatud mudelid kirjeldavad peptiidide sisenemist rakkudesse endotsütoosist sõltumatut. Samas on saadud kinnitust paljude avaldatud artiklite põhjal ka erinevate endotsütootiliste radade osalusest RPP-de internalisatsioonil rakkudes ja on isegi arvatud, et teatud RPP-de (Arg9, Tat) puhul tuvastatud peptiidi kontsentreerumine tuuma ja paiknemine difuusselt tsütosoolis võib olla lihtsalt rakkude fikseerimisest põhjustatud artefakt (Richard *et al.*, 2003). Antud seisukohast lähtudes põhjendati ka madalal temperatuuril täheldatud peptiidide võimalikku sisenemist rakkudesse ja nende ümberpaiknemist fikseerimise käigus. Hilisemad uurimused on näidanud, et tulemus sõltub konkreetsest peptiidist, katse tingimustest ja kasutatud fikseerimismeetoditest. Nii näiteks paraformaldehüüdiga (PFA) fikseerimine ilma permeabiliseerimiseta mõjutab raku plasmamembraani terviklikkust vähem kui töötlus metanooli ja atsetooniga (DiDonato and Brasaemle, 2003) ja PFA kasutamisest ei sõltu transportaan-alk komplekside lokaliseerumise iseloom rakkudes (Säälik *et al.*, 2004).

RPP-d transportvektorina

Nagu eelnevalt mainitud käituvad penetreeruvad peptiidid vektoritena, mis on võimelised transportima rakkudesse erinevaid makromolekule (Dietz and Bahr, 2004). RPP-dega vahendatud transpordil on seni rakkudesse viidud oligonukleotiide (Astria-Fisher *et al.*, 2000), DNA-d, peptiidset nukleiinhapet (PNA) (Pooga *et al.*, 1998b), peptiide (Vivés *et al.*, 1997), valke (Fawell *et al.*, 1994), nanopartikleid (Lewin *et al.*, 2000), isegi liposoomi (Torchilin *et al.*, 2001) ja faagi partikleid (Eguchi *et al.*, 2001). Peale eukarüootsete rakkude on RPP-dega transporditud PNA-d ka bakteri rakkudesse (Eriksson *et al.*, 2001).

Peptiidide ja lastmolekuli ühendamiseks on kasutusel erinevad keemilised ühendused – stabiilsed ja labiilsed rakus katkevad sidemed. Stabiilsete sidemete hulgas on enimkasutatav peptiidside (fuseeritud valgu ekspressioon bakteris, liitpeptiidi süntees) (Derossi *et al.*, 1998, Nagahara *et al.*, 1998), esterside oligonukleotiidide lisamisel (Stetsenko and Gait, 2005) ja homo- (Fawell *et al.*, 1994) või bifunktsionaalne (Pooga *et al.*, 2001) keemiline ristside. Labiilsetest kasutatakse peamiselt disulfiidsidet, mis moodustatakse peptiidi N-terminuses oleva tsüsteiini ja transportmolekuli küljes oleva tsüsteiini vahele (Derossi *et al.*, 1998) ning mis katkeb tsütosooli redutseerivas keskkonnas (Hällbrink *et al.*, 2001). Rakendust on leidnud ka pH-tundlik side, mis oli püsiv happelises keskkonnas, kuid laguneb füsioloogilistel tingimustel (Rothbard *et al.*, 2000). Peale loetletud variantide on alternatiiviks RPP ja transporditava molekuli liitmine mittekovalentsete laenguliste interaktsioonide kaasabil. Näitena võib tuua avidiini/streptavidiini transporti biotinüleeritud peptiidide kaasabil, kus kompleksi tekkeks kasutatakse biotiini suurt afiinsust avidiini suhtes (Pooga *et al.*, 2001) ja oligonukleotiidi komplekseerimist RPP-ga (Oehlke *et al.*, 2002). Internaliseerumiseks rakkudesse on piisavaks osutunud ka RPP-de inkubatsioon koos huvipakkuva lastiga, mille puhul on kompleksi tekkeks ja edasiseks translokatsiooniks olulised tugevad hüdrofoobsed interaktsioonid (Morris *et al.*, 2001).

Tat perekonna peptiidid

Tat valk on inimese immuunpuudulikkust põhjustava viiruse (HIV-1) replikatsioonis osalev 86-102 aminohappest koosnev regulaatorvalk. Sarnaselt mõnedele homeovalkudele (Joliot *et al.*, 1997) ja herpesviiruse struktuurvalgule VP22 (Elliott and O'Hare, 1997), sekreteeritakse Tat rakkudest ja internaliseeritakse seejärel teiste rakkude poolt (Frankel and Pabo, 1988, Green and Loewenstein, 1988).

Erinevate Tat- valgust pärit peptiidide testimisel leiti, et efektiivseim oli rakkudesse sisenemisel 48-60 aminohappe vaheline piirkond (Vivés *et al.*, 1997), mille internalisatsioon nagu Tat valgulgi, on osaliselt sõltuv kontsentratsioonist, ajast ja inhibeeritud madalatel temperatuuridel. Samal ajal on Tat valkudega näidatud, et mõnede rakkude puhul temperatuurisõltuvus puudub (Mann and Frankel, 1991). Ka arvati senini, et Tat-i internalisatsioon on retseptorsõltumatu, kuna translokatsioon toimus sama tulemuslikkusega nii D-aminohapetest kui ka L-aminohapetest koosneva peptiidi puhul. Praeguseks seostatakse täispika Tat-i translokeerumist rakku eelkõige pinnal olevate heparaansulfaatidega, aga ka LRP-ga (*low density lipoprotein receptor-related protein*) (Tyagi *et al.*, 2001).

Heparaansulfaadi ja LRP inhibiitorite lisamisel rakusöötmesse langes oluliselt valgu neuronitesse internalisatsiooni efektiivsuse tase (Liu *et al.*, 2000). Samas on leitud, et Tat-i fragmendi (48-60 ah) internalisatsioon heparaansulfaat-defitsiitsetesse rakkudesse toimub sarnase efektiivsusega kui HS proteoglükaani ekspresseerivatesse rakkudesse (Silhol *et al.*, 2002). Seetõttu arvatakse, et kuigi enamik Tat-peptiidist on interaktsioon HS retseptoritega, osaleb peptiidi sidumises ka teisi negatiivselt laetud rakupinna komponente (Richard *et al.*, 2005).

Täispikk Tat (1-86) valk ja Tat-i fragment (37-72) lokaliseeruvad nii tsütoplasmasse kui tuuma (Fawell *et al.*, 1994). Konfokaalmikroskoopia tulemustest selgub, et tuuma lokaliseerumine toimub peptiidi kõrgemal kontsentratsioonil (alates 7µM), madalamal kontsentratsioonil paikneb Tat peamiselt vaid vesikulaarsetes struktuurides (Potocky *et al.*, 2003). Tat valgu sisenemine rakkudesse endotsütootiliselt pakuti välja juba 15 aastat tagasi (Mann and Frankel, 1991), hiljem on saadud kinnitust ka Tat-fragmendi akumuliseerumisele endotsütootilistesse vesiikulitesse. Täpsemad uuringud erinevatest ET radade kasutamisest internalisatsiooni on andnud vastuolulisi tulemusi. Leiti, et täispika Tat-GFP fuseeritud valk siseneb elus rakkudesse kaveolaarse ET-ga spetsiifiliste membraanipiirkondade (nimetatud ka „lipiidseid parved“) kaudu (Ferrari *et al.*, 2003) ja ei kolokaliseeru klatriin-kaetud vesiikulitega (Fittipaldi *et al.*, 2003). Kontrastina eelmistele tulemustele näidati, et mittekonjugeeritud Tat-valk (Vajanaphanich *et al.*, 1994) ja tema translokeeruv domeen (Richard *et al.*, 2005) internaliseeruvad pigem klatriin-sõltuva raja kaudu. Tat-Cre konjugaadi korral on täheldatud „lipiidsete parvekeste“ kaasabil toimuvat makropinotsütoosi (Wadia *et al.*, 2004). Nii vastandlikud tulemused osutavad Tat-peptiidi, täispika Tat-valgu ja Tat-lastmolekuli konjugaadi kompleksi transduktsioonimehhanismide erinevustele ja võivad olla sõltuvuses ka sihtmärk raku tüübist ja transporditavast üksusest. Ära märkimist väärib fakt, et paljudes artiklites peetakse oluliseks Tat-i suunamist hilisemas endotsütoosi faasis hapustatud vesiikulitesse ja edasist vabanemist tsütosooli (Fischer *et al.*, 2004).

Kõige efektiivsemalt siseneb rakkudesse Tat-fragment (48-60), mis sisaldab tuumalokalisatsiooni (NLS) signaali, kuigi viimase olemasolu pole piisavaks tingimuseks penetreerumisel (Vivés *et al.*, 1997). Erinevate Tat peptiidi (49-57) deletsioonimutantide uurimisel on leitud, et internaliseerumisel on olulisemad N-terminuses asuvad aminohapped ja arginiinide eemaldamine peptiidi aminohappelisest järjestusest pärsib translokatsiooni (Wender *et al.*, 2000), kuigi deletsioonid helikaalses domeenis ei häiri rakku sisenemist (Vivés *et al.*, 1997).

Sarnaselt teistele penetreeruvatele peptiidile, transpordivad Tat valgud rakku erinevaid bioloogiliselt aktiivseid molekule. On näidatud, et Tat peptiid on võimeline läbima sealjuures ka hematoentsefaalset barjääri. Näiteks on silmatorkavalt tõhus olnud peptiidiga liidetud β -galaktosidaasi *in vivo* internalisatsioon erinevatesse kudedesse, kaasa arvatud ajju (Schwarze *et al.*, 1999). Vastupidiselt eelnevale on mõnede uuringute tulemused vähem positiivsed (Lee and Pardridge, 2001). Nende arvates hematoentsefaalset barjääri läbimine ja rakkudesse penetreerumine pole Tat peptiidide ja makromolekuliga konjugeeritud Tat-i puhul võrreldavad ja konjugaatide tulemuslikkus märgatavaks mõjuks liiga väike. Peale valguliste ühendite on olnud edukas ka kuni 45-nm läbimõõduga superparamagnetiliste raudoksiidi ja teiste nanopartiklite transport (Lewin *et al.*, 2000) ning liposoom-vahendatud transpordi efektiivsuse tõus Tat-peptiidi lisamisel (Torchilin *et al.*, 2001).

Penetratiinid

Drosophila Antennapedia homeovalk oli koos HIV Tat valguga esimene transkriptsioonifaktor, millel kirjeldati elusate rakkude poolt sekreteerimine ja internaliseerimine ning esimene RPP, mida kasutati võõrmolekulide transpordiks (Perez *et al.*, 1992). Antennapedia seondub DNA-ga 60 aminohappest koosneva homeodomeeniks (HD) nimetatava spetsiifilise järjestuse kaudu. Viimane koosneb omakorda kolmest α -heeliksist, millest teine ja kolmas on omavahel ühendatud β -pöördega. Translokeerumiseks rakku on minimaalselt vajalik kolmas heeliks ehk aminohapetest 43-58 koosnev järjestus, mida nimetatakse ka penetratiiniks.

Penetratiini internaliseerumine rakku ja lokaliseerumine tuuma leiab aset nii 37 °C kui ka 4 °C juures (Derossi *et al.*, 1994), mis välistab endotsütoosi tavalises mõttes. Spetsiifilise retseptori olemasolu kontrollimiseks inkubeeriti rakke peptiidiga mille aminohappeline järjestus vastas penetratiini pöördjärjestusele. Vaatamata antud peptiidi täiesti teistsugusele sekundaarstruktuurile ei olnud rakku translokeerumine takistatud (Derossi *et al.*, 1996). Penetratiini edasisel muteerimisel näidati, et kuni kolme aminohappe asendamisel proliinidega, mis märkimisväärselt muudab penetratiini sekundaarstruktuuri ja välistab helikaalse struktuuri tekke, säilib samuti peptiidi internalisatsioonivõime (Derossi *et al.*, 1996). Kuigi helikaalne struktuur pole antud tulemuste põhjal peptiidide rakku sisenemiseks oluline on kindlaks tehtud, et vesikulaarses mudelsüsteemis suureneb fosfolipiidide juuresolekul helikaalse struktuuri teke (Christiaens *et al.*, 2004). Biofüüsikaliste uuringute tulemuste põhjal (Dom *et al.*, 2003) on näidatud, et seostumisel negatiivselt laetud

lipiididega, arvatavalt laengute neutraliseerimise tõttu, stabiliseerub helikaalne konformatsioon, mis soodustab penetratiini ümberpaiknemist hüdrofiilsest hüdrofoobsesse keskkonda. Samas on see ainult soodustav, mitte hädavajalik ja ainuke tingimus internaliseerumisel.

Uurides penetratiini ja selle analooge SDS geelil leiti, et SDS soodustab peptiidide agregeerumist. Sellest tulenevalt postuleeriti, et peptiidid käituvad detergendi mitsellides ja lipiidses kaksikkihis analoogselt (Lemmon *et al.*, 1992) ning agregeerumisvõime mängib olulist rolli peptiidide translokeerumisel (Derossi *et al.*, 1994).

Tuuma magnetresonantsi uuringute alusel on välja pakutud penetratiini translokeerumiseks eelnevalt kirjeldatud pööratud mitselli mudel (Derossi *et al.*, 1996) ja on välja toodud ka trüptofaanijääkide olulisus penetratiini internaliseerumisel ning pööratud mitselli induktsioonil (Pen2W2F, kus kaks trüptofaanijääki on asendatud fenüülalaniinidega, on kaotanud täielikult võime rakkudesse siseneda). Samas on tõendatud, et nii penetratiin kui tema analoog Pen2W2F näitavad sarnaseid translokatsiooniomadusi (Thorén *et al.*, 2003), mis vähendab trüptofaani tähtsust ja hädavajalikkust läbi membraani tungimisel. Võrdlusena analoog PenLys-1 (kõik arginiinid asendatud lüsiinidega) puudub internalisatsioonivõime ja on väga väike afiinsus plasmamembraaniga interakteerumisel (Thorén *et al.*, 2003).

Sarnaselt Tat-peptiidiga on konfokaalmikroskoopilised tulemused näidanud penetratiini paiknemist toatemperatuuril tsütosoolis peamiselt happelistes vesikulaarsetes struktuurides ja 4 °C juures ainult membraanis ja tsütosoolis, kuid mitte vesiikulites (Christiaens *et al.*, 2004). Antud tulemused näitavad penetratiini sisenemist rakkudesse osaliselt endotsütoosi teel.

Erinevate penetratiini analoogidega on rakku transporditud erineva pikkusega peptiide ja kuni 25 nt pikkusi üheaahelalisi DNA oligomeere. Kaheaahelalise DNA-ga seondudes väheneb homeodomeeni ja selle kolmanda heeliksi translokeerumisvõime (Derossi *et al.*, 1998). Antp-HD puhul on leitud, et see soodustab viirus-vahendatud (adenoviirused, retroviirused) geenide transporti koos valkude ekspressiooni suurendamisega sihtmärg-rakkudes (Gratton *et al.*, 2003). Artikli autorite arvates interakteerub tugevalt positiivselt laetud Antp-HD viiruse valgulise- või lipiidse kestaga, tõhustades viiruspartiklite kinnitumist rakkudele ja sisenemist.

Edukalt on kasutatud Antp ja Tat-peptiidi antisens-oligonukleotiidide fosforiitioaatide rakku sisestamiseks, et maha suruda kasvajakude ravimresistentsusega seotud geeni (MDR1) ekspressiooni (Fischer *et al.*, 2002). Ka teiste oligonukleotiidide transport

penetreeruvate peptiididega on olnud rakukultuurides suure tulemuslikkusega ja madala tsütotoksilisusega, mis annab eelised teiste transpordimeetodite ees.

Transportaan ja selle analoogid

Transportaan on sünteetiline peptiid (27 ah), mille eellasmolekul galparaan kombineeriti kahest fragmendist: neuropeptiid galaniinist (aminohapped 1-13) ja herilase mürgis leiduvast mastoparaanist (aminohapped 14-27) (Langel *et al.*, 1996). Asendades galparaani 13. positsioonis oleva proliini lüsiiniga, mille külghelaga saab konjugeerida mitmesuguseid molekule (näiteks biotiiniga märgistamine, oligonukleotiidi sidumine, valkude ristsidumine jne), saadi peptiid, mis nimetati transportaaniks (Pooga *et al.*, 1998a).

Transportaani internalisatsioon toimub kiiresti. Juba 1 minuti pärast rakkude inkubatsiooni on transportaan detekteeritav nii plasmamembraanis kui ka tsütoplasmas, hiljem tuumaümbrises ja tuumas. Transportaani penetreerumine rakkudesse toimub ka madalal temperatuuril ja hüperosmolaarsetes lahustes. Tuuma sisenemist madal temperatuur siiski takistab, 0 °C juures tuumalokalisatsioon puudub (Pooga *et al.*, 1998a). Samas tasub tähele panna, et esmased katsed viidi läbi fikseeritud ja permeabiliseeritud rakkudes, mis võis viia internaliseerunud peptiidi koguse ja lokalisatsiooni ülehindamisele.

Transportaanil puudub teadaolev retseptor (Lindgren *et al.*, 2000) ja seni pole täheldatud peptiidil ka rakuspetsiifikat. Transportaani erinevate analoogide puhul on uuritud erinevate transportaani piirkondade tähtsust penetreerumise juures, deleteerides aminohappeid kas peptiidi C- või N-terminustest või keskelt. Olulisteks osutusid vähemalt 10 aminohappe pikkune ala mastoparaanist ja galaniini C-terminaalne piirkond (Soomets *et al.*, 2000). Sellest tulenevalt arvatakse, et antud struktuurielemendid on transportaani internalisatsiooni puhul määravateks teguriteks ja ilma nendeta on peptiidi sisenemine rakkudesse häiritud. Struktuurne analüüs näitab peptiidi mastoparaanse regiooni eelistatud helikaalset struktuuri ja transportaani paiknemist paralleelselt membraani/rakupinnaga (Barany-Wallje *et al.*, 2004).

Transportaan inhibeerib rakkudes GTPaasset aktiivsust ja kõrgemal kontsentratsioonil võib rakkudele osutada toksiliseks. Analüüsides erinevaid transportaani analooge pole ainsana GTPaase inhibeerivat aktiivsust TP10-l, millel puudub N-terminusest galaniini osast kuus esimest aminohapet (Soomets *et al.*, 2000) samal ajal, kui rakku translokeerumise võime on säilinud.

Transportaan ja tema analoogid on võimelised suure efektiivsusega rakkudesse viima teisi erineva suurusega hüdrofiilseid molekule. Väikeste molekulide transpordil on rakku

sisenenud konstruktide kontsentratsioon kuni 400 korda suurem ekstratsellulaarsest. Peale siiani rakku viidud lühikeste peptiidide (3-8 kDa) (Hällbrink *et al.*, 2001), peptiidse nukleiinhappe (PNA) oligomeeride (Pooga *et al.*, 1998a) ja 30-150 kDa suuruste valkude (GFP, streptavidiin, antikehad) on transportaan võimeline rakku transportima ka ligi 1 MDa suuruseid kolloidses kulla partikleid. (Pooga *et al.*, 2001).

On leitud, et transportaani rakusisene lokaliseerimine ei kattu spetsiifiliselt tähtsamate rakustruktuuridega. Peptiid-valk komplekse on rakkudes detekteeritud granulaarsetes ja/või vesikulaarsetes struktuurides, elektronmikroskoopia näitab paiknemist ka tubulovesikulaarsetes struktuurides ja vabalt tsütoplasmas (Padari, 2001).

Arginiinirikkad peptiidid

Tat-peptiidi, Antp ja herpesviiruse translokeeruvast valgust VP22 pärinevate peptiidide jaoks on tulemuslikuks internaliseerimiseks oluline positiivselt laetud aminohapete olemasolu peptiidjärjestuses (Arg, Lys) (Derossi *et al.*, 1994, Elliott and O'Hare, 1997, Vivés *et al.*, 1997). Sõltuvalt arginiinijääkide arvust internaliseeruvad ja lokaliseeruvad nii oligoarginiinid kui ka arginiine sisaldavad peptiidid rakkudesse erinevalt. Kui tetrameerse oligoarginiini translokeerumise efektiivsus on väga madal, siis 8 arginiiniga peptiidil on Tat(48-60)-ga sarnane internaliseerimine ja rakusisene lokaliseerimine. Samuti tõuseb kuni 16 ah jäägini iga juurdelisatud arginiiniga penetreerumise efektiivsus (Nakase *et al.*, 2004), alates millest väheneb peptiidide internaliseerimine rakkudesse ootamatult ja peptiidid jäävad valdavalt rakumembraani (Mitchell *et al.*, 2000). Sama grupi poolt on näidatud ka kuue või enama arginiiniga peptiidide suuremat internaliseerimiseefektiivsust kui sarnase hulga lüsiini, ornitiini või histidiiniga oligomeeridel.

D-aminohapetest sünteesitud oligoarginiinid on internaliseerimisel rakkudesse suurema efektiivsusega kui L-aminohapetest koosnevad peptiidid (Wender *et al.*, 2000), millest järeldatakse kiraalse retseptoriga vahendatud endotsütoosi vähest tähtsust rakku sisenemise juures (Mitchell *et al.*, 2000). Võrreldes mõlema järjestuse internaliseerimise kineetikat Tat(49-57) peptiidiga on nad üllatuslikult viimasest üle 20 korra kiiremad. Sellest tulenevalt rõhutatakse arginiini kõrvalahela guanidinorühmade kui põhilise determinandi tähtsust penetreerumise juures. Sünteesitud polüguanidiini sisaldavad peptoid-derivaadid näitavadki internaliseerumisel rakkudesse suurt efektiivsust (Mitchell *et al.*, 2000). Penetreerumiseks peetakse polüarginiinil seega olulisemaks guanidinorühma, mitte niivõrd laenguid või põhiahela iseloomu.

Edasised struktuuriuuringud näitasid ka arginiinide asukoha tähtsust. Dekameerse oligoarginiinil 2., 5., 8. arginiini asendamine samaväärsete ah-ga ei muutnud peptiidide sisenemise efektiivsust (Rothbard *et al.*, 2000). Ka pole peptiididel internaliseerumiseks vajalik olla lineaarses konformatsioonis, kuna arginiinide neljajaruline ahel on võimeline liikuma Hela rakkudesse sarnaselt lineaarsega (Futaki *et al.*, 2002).

Viimastel aastatel on välja pakutud arginiinirikaste RPP-de sisenemiseks rakkudesse lisaks varem esitatud võimalustele endotsütoosi, eelistatult kaveolaarset ET ja makropinotsütoosi (Nakase *et al.*, 2004).

Arginiinirikad peptiidid omavad ka kõrget rakenduslikku potentsiaali. Paljud ravimid on väheefektiivsed nende halva imendumisvõime tõttu, näiteks tsüklosporiin A. Imendumisvõime suurendamiseks konjugeeriti arginiini heptameer tsüklosporiin A-ga pH-tundliku keemilise sideme abil. Konjugaat tungis efektiivselt nii hiire kui ka inimese transplanteeritud epidermise keratinotsüütidesse, makrofaagidesse ja fibroblastidesse (Rothbard *et al.*, 2000), surudes neis maha põletikulise protsessi.

Lisaks arginiinirikaste peptiidide võimele transportida ravimeid, võivad mõned neist ise ravimitena toimida. Nii on mitmed sünteesitud Tat-peptiidi analoogid potentsiaalseteks HIV-1 replikatsiooni inhibeerijateks (Friedler *et al.*, 2000). Ka on näidatud Arg peptiidide (7- ja 9- ah jäägiga) poolt stimuleeritud lämmastikoksiidi (NO) produktsiooni tõusu ja sellega hüperplaasia vähenemist (Uemura *et al.*, 2000). Oligoarginiini konjugaadid adenosiiniga on teada kui efektiivsed proteiinkinaaside inhibiitorid ja võimelised ka rakkudesse sisenema (Uri *et al.*, 2002).

pVEC

pVEC on hiire vaskulaarse endoteeli kadheriinist pärinev (615-632 ah) penetreeruv peptiid (*VE-cadherin protein derived peptide*). Ta koosneb VE kadhedriini 13 positiivselt laetud tsütosooli poolsest ja 5 transmembraansest regioonist pärit aminohappest. Peptiidi amfipaatne iseloom on oluline faktor rakku translokeerumisel (Elmqvist *et al.*, 2001).

pVEC-i penetreerumine rakkudesse on sarnaselt erinevate RPP-dega retseptor-ja temperatuurisõltumatu. Peptiid ja tema D-aminohapetega analoog translokeeruvad mõlemad efektiivselt endoteelirakkudesse ja fibroblastidesse (Elmqvist *et al.*, 2001). pVEC-i sõltumatus rakuspetsiifikast ja internalisatsiooni efektiivsus lubavad kasutada peptiidi erineva suurusega molekulide transpordiks (PNA, streptavidiin). Inkubatsioonil erinevas proteolüütilise aktiivsusega keskkonnas eemaldatakse peptiidi C-terminusest lüsiin, pärast

mida säilitab peptiid stabiilsuse edasise degradatsiooni suhtes (Elmqvist and Langel, 2003). Membraani intaktsuse kontrollil ei ole tuvastatud internaliseerunud peptiidi leket rakust, mis näitab, et pVEC ei sisene rakkudesse läbi pooride ega põhjusta pooride teket (Elmqvist *et al.*, 2001).

Huvitavaks omaduseks on pVEC-l tema antibakteriaalne toime juba madalatel kontsentratsioonidel, mis on kahjutu HeLa rakkudele ja erütrotsüütidele (Nekhotiaeva *et al.*, 2004). Lisaks seni teadaolevalt TP10-le (Elmqvist *et al.*, 2001), mis võib pärssida patogeensete bakterite ja seente kasvu, on näidatud pVEC-i inhibeeriv toime *Mycobacterium smegmatis* kasvule (TP10 inhibeerib *Staphylococcus Aureus*).

Amfipaatsed mudelpeptiidid (MAP)

Amfipaatsed mudelpeptiidid disainiti algselt polükatioonsete peptiidide ja membraanilipiidide vaheliste interaktsioonide analüüsiks (Dathe *et al.*, 1996). Antud peptiididel on α -helikaalsel kujul koondunud laengutega aminohapped ühele heeliksi küljele ja hüdrofoobsed teisele küljele. Selline paigutus soodustab mudelpeptiidide seostumist negatiivselt laetud fosfolipiide sisaldavate vesiikulitega elektrostaatiliselt interaktsiooni tõttu, neutraalsete vesiikulite puhul toimib ilmselt hüdrofoobne interaktsioon.

Amfipaatsed mudelpeptiidid sisenevad rakku nii energiast sõltuvat kui ka sõltumatut mehhanismi kasutades. Temperatuuril 0 °C detekteeritakse peptiidi internalisatsiooni vähenemist 50 % võrra, mis viitab rakku sisenemise erinevatele mehhanismidele (Oehlke *et al.*, 1998). Modifitseerides amfipaatses ahelas pikkust, laengut ja muid omadusi, on kindlaks tehtud, et MAP-peptiidi internalisatsiooniks on vajalik võime moodustada nelja täispöört hõlmavat α -heeliksit, mis näitab vähemalt 16 ah olemasolu vajalikkust. Muude parameetrite muutmisega ei ilmnenud olulisi erinevusi MAP-i internaliseerumise efektiivsusel (Scheller *et al.*, 1999). Hilisemate andmete põhjal ei osutu amfipaatsus translokeerumisel tähtsaks (Scheller *et al.*, 2000) ja varasemaid tulemusi põhjendatakse pigem rakkude töötlusel mitteamfipaatsede peptiidide rakkudest väljapesuga.

Oluline on kasutada MAP-e arvestada nende rakke lüüsivat toimet ja omadust kontsentratsioonil üle 4 μ M moodustada rakkude plasmamembraani poore.

Membraani translokeeruvad peptiidid (MTS)

Liiderjärjestuste või membraani translokeeruva järjestusega (MTS) peptiidide sünteesil on põhiliseks eesmärgiks luua bioloogiliselt aktiivne tervikkompleks, mis ühendab endas eri funktsioonidega järjestusi: sihtmärk-järjestust, penetreerumist põhjustavat regiooni ja efektorpiirkonda (Langel, 2002).

Nii on disainitud 21 ah pikkune amfipaatne peptiid Pep-1, mis koosneb kolmest domeenist: (1) hüdrofoobsest trüptofaanirikkast järjestusest, mis vastutab sihtmärk-membraani ja transporditava valguga seondumise eest; (2) SV40 suure T-antigeeni (large T antigen) NLS-st tuletatud hüdrofiilsest lüsiinirikas domeenist, mis aitab kaasa rakku sisenemisele; ja (3) proliini sisaldavast speisseralast (Morris et al., 2001). Internaliseerudes rakkudesse ja translokeerudes tuuma ka madalal temperatuuril erineb Pep-1 teistest signaaljärjestustest pärinevatest penetreeruvatest peptiididest. Tsirkulaarse dikroismi (CD) ja tuuma magnetresonants uuringute põhjal on leitud Pep-1 helikaalse sekundaarstruktuuri teke kontsentratsiooni suurenedes ja fosfolipiidide juuresolekul. Kompleksis transporditava valguga toimuvad osalised konformatsioonilised muutused vaid fosfolipiididega kokkupuutes. Sellest tulenevalt pakutakse välja membraani läbimine ajutise poorilaadse struktuuri moodustumise abil (Deshayes et al., 2004) olemata sealjuure tsütotoksilise mõjuga ja võimaldades transportida valke mittekovalentse kompleksina rakkudesse (Morris et al., 2001).

Sarnane mudel pakutakse välja Pep-1- ga analoogse disainiga peptiidi MPG puhul, mille hüdrofoobne piirkond on pärit HIV-1 valgust gp41. Erinevuseks on fosfolipiidide ja lastmolekuli juuresolekul helikaalse struktuuri asemel β -lehe konformatsiooni teke. Vahe võib tuleneda ka lastmolekulide eelistustest, mis Pep-1 puhul on suured peptiidid ja valgud, mitte oligonukleotiidid vastupidiselt MPG-le (Deshayes et al., 2004) Gerbal.

TÖÖ EESMÄRGID

- Võrrelda erinevate fluorestseerimisega rakku penetreeruvate peptiidide internalisatsiooni efektiivsust ja kineetikat HeLa rakkudesse.
- Selgitada peptiid-valk komplekside sisenemise mehhanismi, uurides nende interaktsioone plasmamembraaniga ja paiknemist rakuorganellide ning erinevate endotsütoosi markerite suhtes

KASUTATUD MATERJALID JA METOODIKAD

RAKUD

Inimese emakakaela kartsinoomi rakud (HeLa), inimese melanoomi rakud (Bowes), heparaansulfaat- defitsiitsed Hiina hamstri munasarja rakud (CHO) ja primaarsed hiire fibroblastid kasvatati IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) söötmes, millele oli lisatud 10% veise looteserumit (FCS), 100 IU/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. Rakke kasvatati 5% CO₂ keskkonnas veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37 °C.

KASUTATUD TRANSPORTPEPTIIDID

Fluorestseeruva märgisega peptiididest kasutati fluorestseiiniga märgitud pVEC-i (18 ah pikkune hiire vaskulaar-endoteliaalsest kadheriinist pärinev penetreeruv peptiid), Tat-i, (Arg)₉, penetratiini, transportaani, tema analoogi TP10, mudel amfipaatsed peptiidi MAP. Biotinüleeritud peptiididest kasutati pVEC-i, Tat-i, penetratiini ja Pen(2W2F) (penetratiini analoog, millel on trüptofaanid asendatud arginiinidega), MAP-i, transportaani ja selle analooge TP10, rTP, Pro-TP (tabel 1). Biotiini märgis võimaldas peptiidide komplekseerimist avidiin-β-galaktosidaasi, Alexa Fluor 488 või fluorestseiin-isotiotsüanaadiga (FITC) märgitud avidiiniga.

Tabel 1

Peptiid		Ah järjestus
Nimi	sünonüüm	
TP	M384	GWTLNSAGYLLGK*INLKALAALAKKIL
TP10	L262	-----AGYLLGK*INLKALAALAKKIL
TP2		GWTLNSAGYLLGK*INLKAKAALAKKLL
rTP		LIKKALAALAKLNI*KGLLYGASNLTWG
ProTP		GWTLNSAGYLLGK*INLPALAALAKKIL
Penetratin	pAntp	R*QIKIWFQNRMRKWK
Penetratin(2W2F)		R*QIKIRFQNRMRKRK
Tat		G*RKKRRQRRRPQ
pVEC	AMP-1	L*LIILRRRIRKQAHASK
(Arg) ₉		R*RRRRRRRR
MAP		K*LAKLAKLAKLAKLA
* biotinüleeritud või fluorestseiiniga märgitud aminohape		

Kõik peptiidid sünteesiti Stockholmi Ülikooli neurokeemia ja neurotoksikoloogia instituudis Applied Biosystem M431A peptiidi süntesaatoriga *t*-Boc strateegiat kasutades tahkel kandjal.

Peptiidide detekteerimist hõlbustavad fluorestseini- ja biotiinmärgis konjugeeriti peptiidiga manuaalselt. Peptiidid puhastati kõrglahutusega vedelikkromatograafiat kasutades C₁₈ pöördfaasikolonnil ja nende puhtus oli >99%. Kõigi peptiidide molekulmassid kontrolliti mass-MALDI-TOF mass-spektromeetril (Voyager-DE STR, Applied Biosystems, Foster City, CA).

FLUORESTSENTSMIKROSKOOPIA

Petri tassile kinnitunud rakke töödeldi trüpsiiniga (Gibco BRL, Life Sciences), mille tulemusena saadi vabanenud rakkude suspensioon. Rakususpensioon kanti 24-kaevuliste plaatide kannudesse ümmargustele katteklaasidele (Menzel-Glazer, #1, diameetriga 12 mm). Rakkudel lasti klaasidele kinnituda ja paljuneda (24-48 tundi) arvestusega, et katsepäeval oleks nad 40-60% konfluentsusega. Vana sööde eemaldati aspireerimisel ja lisati seejärel uus sööde (vajaduse korral seerumivaba), mis sisaldas biotinüleeritud peptiidi (0,5-5 µM) ja FITC-i või Alexa Fluor 488-ga (Molecular Probes, Leiden, Holland) märgitud avidiini (0,15 µM). Rakke inkubeeriti RPP-dega sõltuvalt katsest temperatuuril 37 °C või 4 °C 1 tund. Pärast inkubeerimisaja lõppu pesti rakke PBS-ga (pH 7,3). Olenevalt katsest jäeti rakud fikseerimata või fikseeriti 20 minutit 4% paraformalaldehüüdi (PFA) lahusega PBS-s.

Fikseerimata rakud sulundati fluorestsentsi pleekimist vähendava sulundusvedelikuga (Slow Fade, Molecular Probes). Fluorestsentskujutised salvestati ja analüüsiti CCD kaameraga DX70 varustatud Olympos BX41 fluorestsentsmikroskoobiga ning töödeldi arvutiprogrammi DB Manager abil. Fluorestsentsfotode viimistlemiseks kasutati arvutiprogrammi Adobe Photoshop 6.0.

Fikseeritud rakud permeabiliseeriti vajadusel 3 minutit 0,1% Triton X-100-ga PBS-s jään. Seejärel pesti rakke veel PBS-ga ning blokeeriti mittespetsiifilise seondumise vältimiseks 5% (w/v) piimapulbri lahusega fosfaatpuhvis. Blokeerimislahus eemaldati ja rakke pesti PBS-s.

Pärast soovitud rakusiseste struktuuride immuunotsütokeemilist märkimist sulundati ja analüüsiti töödeldud rakkudega katteklaasid sarnaselt fikseerimata rakkudega töötlusele.

Rakuorganellide immunotsütokeemiline märkimine

Aktiinifilamentide märkimiseks kasutati 66 nM Texas Red-iga konjugeeritud falloidiini (Molecular Probes) 1% NFDL lahuses PBS-s. Rakud (HeLa) olid eelnevalt fikseeritud 4% PFA-s ja seejärel permeabiliseeritud 0,1% Triton X-100-ga PBS-s.

Rakumembraani **kolesteroolirikaste piirkondade** visualiseerimisel inkubeeriti fikseerimata või fikseeritud ja permeabiliseerimata rakke (HeLa, Bowes või CHO-HS) toatemperatuuril filipiiniga (Sigma) kontsentratsioonil 100 µg/ml 1% NFDL lahuses PBS-s 45 minutit.

Klatriin- ja kaveoliin-sõltuvat endotsütoosi vahendavate struktuuride esiletoomiseks kasutati vastavalt Alexa Fluor 594-ga (Molecular Probes) konjugeeritud transferriini (10 µg/ml) ja kooleratoksiini B-subühikut (5 µg/ml), millega koinkubeeriti rakke 1 tund koos RPP-avidiin kompleksidega. Hilisemal töölusel rakud (primaarsed hiire fibroblastid) fikseeriti 4% PFA-s.

Internaliseerumise inhibeerimine

Kolesterooli ekstraheerimiseks plasmamembraanist inkubeeriti HeLa rakke seerumvabas IMDM-s, kuhu oli lisatud 10 mM **metüül-β-tsüklodekstriin** (Sigma), mis põhjustab „lipiidsete parvede“ ja kaveoolide kadumist. Rakke töödeldi 1 tunni jooksul inhibiitoriga 37°C juures, mille möödudes lisati samasse lahusesse RPP-valk kompleksid ja jätkati inkubatsiooni 1 tund.

Heparaansulfaat proteoglükaanide kõrvaldamiseks inkubeeriti HeLa rakke enne peptiid-valk komplekside lisamist seerumvabas IMDM-s **heparinaasII**-ga (0,5 Unit/ml) (Sigma) 30 minutit, mille järel jätkus inkubatsioon veel 1 tund koos samasse söötmesse lisatud peptiid-valk kompleksidega 37 °C juures.

RPP-DE RAKUSISESE KONTSENTRATSIOONI MÕÕTMINE:

I Läbivoolutsütomeetria

Rakkude analüüsiks läbivoolutsütomeetril (FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter*) külvati HeLa rakud 6-kaevuliste plaatide kannudesse (250 000 rakku kannu kohta) ja

kasvatati ~24 tundi. Sööde aspireeriti ja rakke inkubeeriti (3 μ M) fluorestseiiniga märgistatud RPP-ga IMDM söötmes. Sõltuvalt katsest kestis inkubatsioon temperatuuril 37 °C 15 minutit kuni 4 tundi.

Inkubeerimise järel pesti HeLa rakke 2 korda PBS-i lahusega ja töödeldi trüpsiinilahusega (Gibco BRL, Life Sciences) 15 minutit temperatuuril 37 °C. Rakud suspendeeriti IMDM-s, koguti tsentrifuugides (250 xg 5 min) ja resuspendeeriti 0,35 ml PBS-ga.

Rakkudesse internaliseerunud fluorestseiiniga märgistatud peptiidide edasiseks analüüsiks kasutati firma "Becton Dickinson" läbivoolutsütomeetrit FACS Calibur ja sama firma tarkvara CellQuest (BD Biosciences, Heidelberg, Saksamaa). Tulemused töödeldi MS Exelis.

II Fluorestsents-spektrofotomeetria

a) RPP-FI kontsentratsiooni määramine rakulüsaadis

HeLa rakkude kasvatamine, inkubeerimine fluorestseeruvate peptiididega ja järgnev töötlemine trüpsiiniga viidi läbi analoogselt tsütomeetrias kasutatud meetodikale. Pärast rakkude kogumist tsentrifuugides (250 xg 5min) ja resuspendeerimist PBS-s tsentrifuugiti suspensioon veel kord 1-2 sekundit 400 xg ja aspireeriti supernatant. Rakusade lahustati 1 ml-s 0,1 M NaOH-s. Rakulüsaadi fluorestsentsi intensiivsus mõõdeti Hitachi fluorestsents-spektrofotomeetril F-4500, kasutades ergastuslainepikkusena 490 nm ja mõõtes emissiooni lainepikkusel 520 nm.

b) RPP-FI ja RPP-avidiin komplekside kontsentratsiooni määramine rakkudes

Rakud (primaarsed hiire fibroblastid, HeLa) külvati 96-kaevuliste plaatide kannudesse (10 000 rakku kannu kohta) ja kasvatati ~24 tundi. Sööde aspireeriti ja rakke inkubeeriti 37 °C juures sõltuvalt katsest kas (3 μ M) fluorestseiiniga märgistatud RPP-ga 1 tund, peptiid-avidiin-FITC kompleksiga 1 tund kuni 4 tundi või peptiid-avidiin- β -galaktosidaasi kompleksiga 4 tundi. Inkubatsioon toimus kõikidel juhtudel IMDM seerumiga söötmes. Biotinüleeritud peptiidi komplekseerumine avidiini-FITCiga või avidiin- β -galaktosidaasiga toimus eelnevalt 2-3 minuti jooksul minimaalses ruumalas, mille järel lisati

inkubatsioonilahus nii, et peptiidi, avidiini-FITC-i ja avidiin- β -galaktosidaasi kontsentratsioonid olid vastavalt 1 μ M, 0.15 μ M ja 0.1mg/ml.

Inkubatsiooni järel pesti rakke kaks korda PBS-ga, töödeldi 1 minuti jooksul 0,1 % trüpaansinise lahusega PBS-s ja pesti kaks või kolm korda PBS-ga. Fluorestseiiniga märgistatud peptiidide ja peptiid-avidiin-FITC kompleksite rakkudega seondumiste analüüsiks mõõdeti seejärel fluorestsentssignaali intensiivsus 100 μ l PBS-s fluorestsentspektromeetril Genios Plus (TECAN). Ergastus- ja emissiooni lainepikkused olid vastavalt 485 nm ja 535 nm.

Peptiid-avidiin- β -galaktosidaasi kompleksidega inkubeeritud ja PBS-ga pestud rakke fikseeriti 15 minutit jääl kasutades fiksaatorina 2 % PFA ja 0,2 % glutaaraldehüüdi lahust PBS-s. Pärast kolm korda PBS-ga pesemist inkubeeriti rakke ilmutuslahuses (1 mg/ml X-Gal, 5mM kaaliumheksatsüanoferraat(III), 5mM kaaliumheksatsüanoferraat(II) PBS-s) toatemperatuuril ~24 tundi pimedas ja mõõdeti TECAN-l absorptsioon 540 nm juures.

TULEMUSED

Penetreeruvate peptiidide internaliseerumise efektiivsuse ja kineetika uurimine läbivoolutsütomeetriliselt ja fluoromeetriliselt.

Rakubioloogias kasutatakse erinevate rakuliste parameetrite (DNA hulga analüüs, asukoht rakutsükli jne) mõõtmiseks kasutatakse laialdaseks läbivoolutsütomeetrit (FACS). FACS-i tulemused on hästi kvantifitseeritavad, kuid fluorestseeriniga märgitud RPP-de kasutamisel internaliseerumise parameetrite mõõtmisel alahinnatakse tihti intratsellulaarse fluorestseiini kontsentratsiooni, mistõttu internaliseerumise täpne ajaline kulg jääb selgitamata.

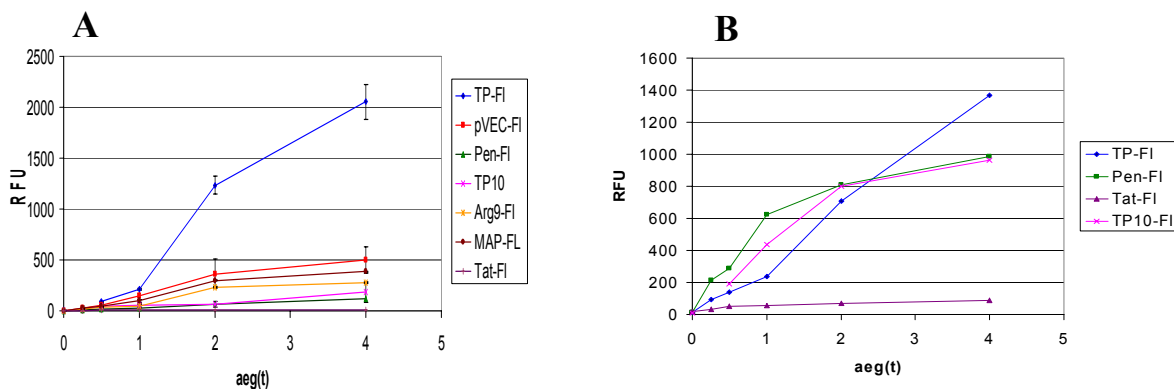
Seetõttu kvantifitseeriti fluorestseerinmärgisega RPP-de internaliseerumist lisaks FACS-le ka spektrofotomeetriliselt (FSM). Enne FSM-i lüüsi peptiididega töödeldud rakud, et viia kogu rakkudes olev (kaasa arvatud membraanides ja vesiikulites asetsev ning agregeerunud) fluorestseeriniga märgitud peptiid homogeensetesse keskkonnatingimustesse. Antud meetodeid kasutades võrreldi erinevate RPP-de rakkudes sisenemise efektiivsust ja ajalist kulgu.

Katsetes inkubeeriti HeLa rakke temperatuuril 37 °C erinevate fluorestseeriniga märgitud peptiididega: TP-Fl (transportaan), TP10-Fl, Pen-Fl (penetratiin), Tat-Fl, pVec-Fl, MAP-Fl, Arg9-Fl.

Meetodite (FACS, FSM) võrdlemiseks kasutati peptiide on TP-Fl, TP10-Fl, Pen-Fl ja Tat-Fl. Internaliseerumise efektiivsus ja sõltuvus ajast antud peptiidide puhul on esitatud mõõdetuna läbivoolutsütomeetril (joonis 2A) ja spektrofotomeetriliselt (joonisel 2B).

Võrreldes RPP-de internaliseerumist pikema aja jooksul näeme, et 4-tunnilise inkubeerimise järel on erinevate RPP-de rakku sisenemise efektiivsus oluliselt erinev. Transportpeptiidide TP-Fl, TP10-Fl, Pen-Fl kontsentratsioonid ei erine pärast 2-tunnist inkubeerimist HeLa rakkudes FSM-ga mõõdetult (joonis 2B) oluliselt. Pikemaajalisel inkubeerimisel aga olukord muutub. Kui Pen-Fl ja TP10-Fl rakkudes sisenemise intensiivsus pärast 2-tunnist inkubeerimist on maksimumilähedane ja tõuseb edasi aeglaselt, siis TP-Fl internaliseerumise efektiivsus pärast 4 tundi on oluliselt kõrgem. Ka FACS-il mõõdetuna (joonis 2A) eristub transportaan teistest peptiididest tunduvalt ja seda juba pärast 1-tunnist inkubatsiooni. Kõige suuremad erinevused peptiidide efektiivsustel ongi mõlemat meetodit võrreldes just 1-tunnisel ajapunktil, kus fluoromeetriliselt on kõige kõrgema kontsentratsiooniga rakus Pen-Fl koos TP10-Fl-ga ja läbivoolutsütomeetriliselt TP-Fl. Võib

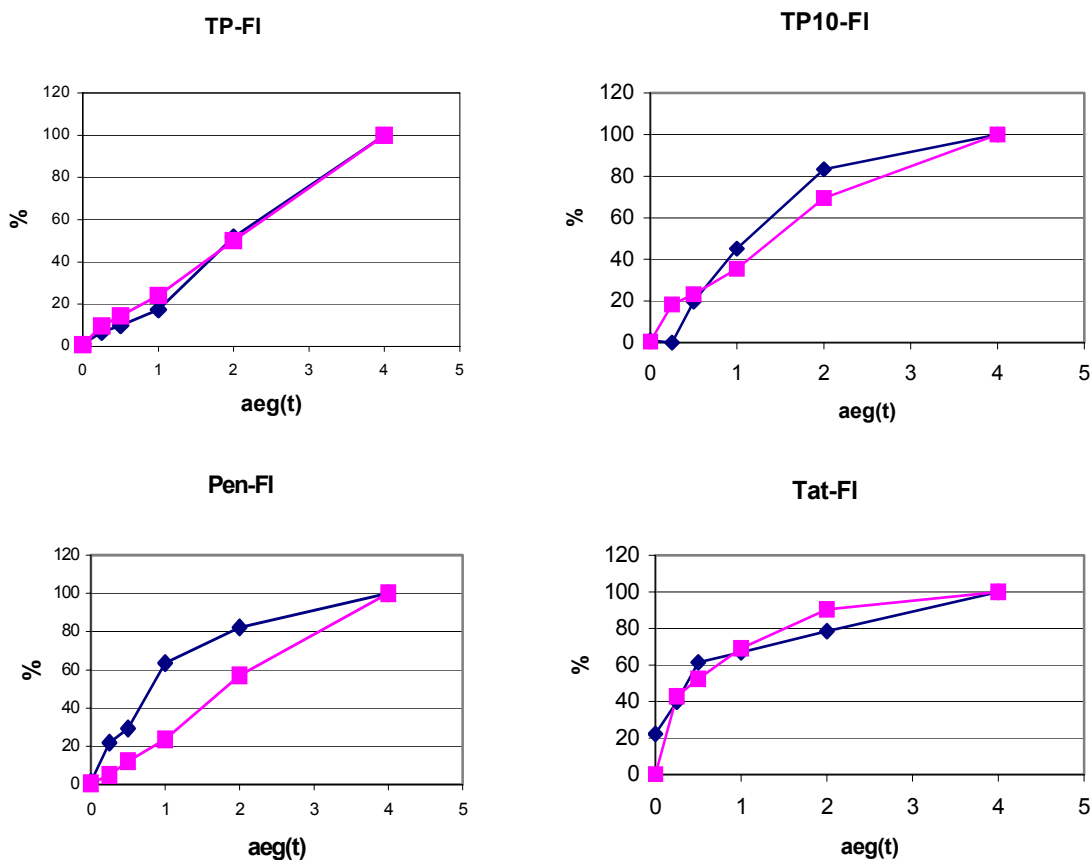
õelda, et teatud ajast alates ei väljenda FACS-ga detekteeritav fluorestsentsi intensiivsus rakkudes sisenenud peptiidi kontsentratsiooni õigesti.



Joonis 2. RPP-FI rakkudesse liikumise efektiivsus.

Fluorestsensiiniga märgitud RPP-de ($3\mu\text{M}$) sisenemine HeLa rakkudesse temperatuuril 37°C mõõdetud läbivoolutsütomeetril (A) elus rakkudes ja spektrofotomeetril (B) rakulüsaadis.

Ühesugust madalat tulemuslikkust rakkudesse sisenemisel näitab mõlema meetodi puhul Tat-FI.



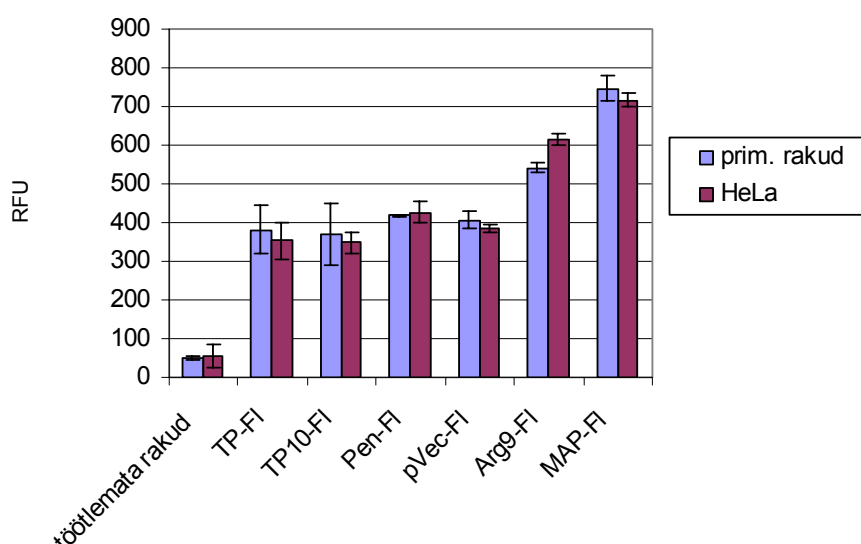
Joonis 3. RPP-FI rakkudesse liikumise kineetika.

Fluorestsensiiniga märgitud RPP-de ($3\mu\text{M}$) sisenemine HeLa rakkudesse temperatuuril 37°C mõõdetud läbivoolutsütomeetril (punane) elus rakkudes ja spektrofotomeetril (sinine) rakulüsaadis. Eri meetoditel saadud tulemused viidud iga peptiidi puhul kokku samale graafikule ($4t=100\%$).

Vaadeldes seejärel peptiidide rakkudesse penetreerumise kineetikat (Joonis 3) näeme, et TP-Fl, TP10-Fl ja Tat-Fl puhul ei erine see kumbagi meetodit kasutades. Pen-Fl kineetika on erinevate meetodite puhul näiliselt erinev. Pen-Fl siseneb rakkudesse ühtlase kiirusega vähemalt 4 tunni jooksul sarnaselt TP-Fl-le, kui peptiidi rakusisest kontsentratsiooni hinnata fluorestsents-spektrofotomeetriaga. Samal ajal läbivoolutsütomeetria näitab penetratiini rakusisese kontsentratsiooni lineaarset tõusu kuni 2 tunnini nagu Tat-Fl ja TP10-Fl ning näilist maksimumi saabumist 4-tunnilise inkubatsiooni järel.

Penetreeruvate peptiidide translokeerumine erinevatesse rakuliinidesse.

RPP-de translokeerumise võimalike erinevuste uurimiseks rakuliini ja primaarsete rakkude vahel võrreldi nende sisenemist immortaliseeritud HeLa rakkudesse ja primaarsetesse hiire fibroblastidesse. Erinevate fluorestseiniiga märgitud peptiididega inkubeeriti rakke temperatuuril 37 °C 1 tund ja internaliseerunud peptiidide hulka hinnati Genios Plus fluorestsents-spektromeetriga "TECAN". Tulemused näitavad, et peptiidide sisenemine rakkudesse on sõltuv eelkõige konkreetse internaliseeruva peptiidi omadustest, mitte niivõrd kasutatavatest rakkudest (joonis 4). Vaadeldud RPP-dest on antud tingimustel kõige efektiivsemad amfipaatne mudelpeptiid MAP-Fl ja oligoarginiin Arg9-Fl. Teised peptiidid (TP-Fl, TP10-Fl, Pen-Fl, pVec-Fl) on 1 tunni jooksul assotsieerunud rakkudega sarnase efektiivsusega.



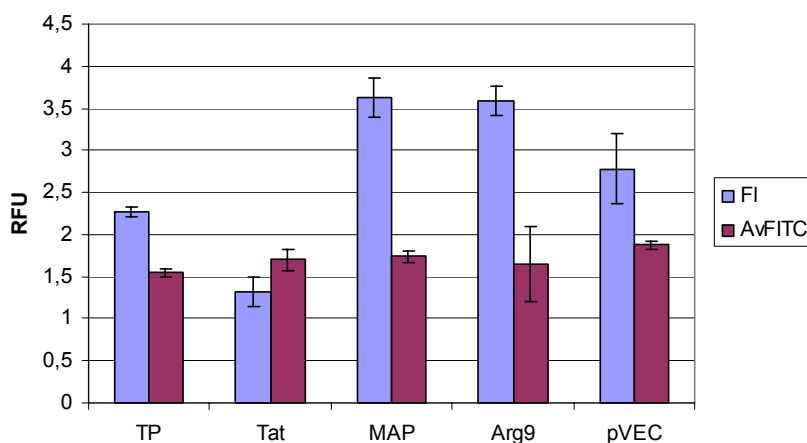
Joonis 4. RPP-Fl internalisatsioon erinevatesse rakuliinidesse.

Fluorestseiniiga märgitud RPP-de (3μM) internaliseerumine primaarsetesse hiire fibroblastidesse ja inimese immortaliseerunud emakakaela kartsinoomi rakkudesse (HeLa) 1 tunni jooksul temperatuuril 37 °C.

Peptiid-vahendatud transport HeLa rakkudesse

Peptiididega HeLa rakkudesse vahendatud transpordi uurimiseks kasutati erinevaid biotinüleeritud RPP-sid. Lastmolekuliks oli FITC-ga või β -galaktosidaasiga konjugeeritud avidiin. Eelnevalt minimaalses ruumalas paari minuti jooksul assotsieeritud peptiid-avidiin kompleksiga inkubeeriti rakke temperatuuril 37°C 1 tunni jooksul, misjärel seondumata kompleksid eraldati PBS-ga pestes. Spektrofluorimeetril “TECAN” mõõdeti fluorestsentsi intensiivsust peptiid-avidiin-FITC-ga ja optilist tihedust peptiid-avidiin- β -galaktosidaasiga töödeldud rakkudes pärast substraadireaktsiooni. Graafikutel on toodud võrdluseks fluorestseiniiga märgitud peptiidi enese internalisatsioon samadel tingimustel.

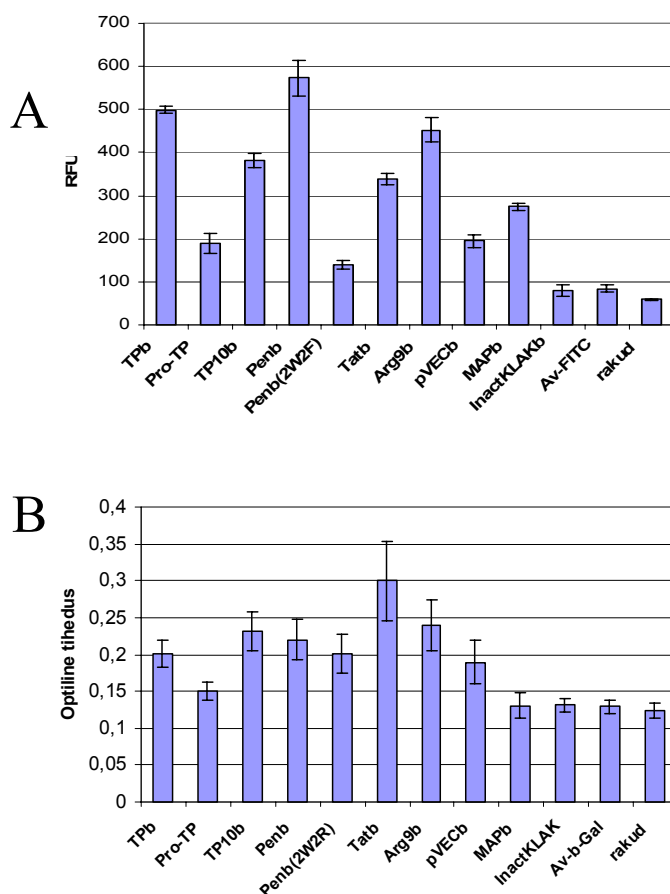
Väikeste RPP-de translokeerumine rakkudesse (joonis 5, punased tulbad) on üllatavalt väheses korrelatsioonis nende transpordivõimega. Lastmolekuli (avidiooni) juurdelisamine mõjutab enamiku biotinüleeritud peptiidide translokeerumist tunduvalt (joonis 5, sinised tulbad). Väiksemat mõju avaldab transporditava molekuli komplekseerimine transportaanile ja pVEC-le, kus sisenemise efektiivsuse langus pole niivõrd suur. Kui Tat-peptiidi enese internalisatsioon rakkudesse on teistest RPP-dest oluliselt väiksem, siis kompleksis avidiiniga on tema efektiivsus võrreldav teiste RPP-dega.



Joonis 5. Biotinüleeritud peptiid-avidiin komplekside rakkudesse translokeerumine.

Biotinüleeritud peptiidi (1 μ M)-Av-FITC (0,15 μ M) komplekside (punane) sisenemine HeLa rakkudesse 1 tunni jooksul temperatuuril 37 °C ja selle võrdlus fluorestseiniiga märgistatud RPP (3 μ M) (sinine) enese internalisatsiooniga. Fluorestsentsi intensiivsus on esitatud suhtena töötlemata rakkudesse.

Komplekseerides biotinüül-peptiide avidiin-FITC ja avidiin- β -galaktosidaasiga vaadeldi penetreeruvate peptiidide vahendatud transpordi sõltuvust erinevast lastmolekulist. Transportides rakkudesse fluorestseerimärgisega avidiini on kõige tulemuslikum peptiid 4 tunni jooksul penetratiin (joonis 6A). Ebaefektiivsed vektorid avidiinile on proliiniga transportaan ja penetratiin, kus 2 trüptofaanijääki on asendatud fenüülalaniinidega. Avidiin- β -galaktosidaasi viimisel rakkudesse on parim HIV-st pärit Tat-peptiid ja praktiliselt sobimatu biotinüleeritud MAP (joonis 6B). Viimase peptiidi poolt vahendatud transpordil puudub avidiin- β -galaktosidaas rakkudest täielikult või pole seal niivõrd väikesel kontsentratsioonil detekteeritav. Tulemustest on näha, et rakkudesse viidavast lastmolekulist oleneb peptiidse kompleksi translokeerumise efektiivsus.



Joonis 6. Avidiini ja avidiin β -galaktosidaasi konjugaadi suunamine rakkudesse kompleksis biotinüleeritud peptiidiga .

Biotinüleeritud peptiid ($1\mu\text{M}$)-Av-FITC ($0,15\mu\text{M}$) (A) või peptiid-Av- β -galaktosidaasi ($0,1\text{mg/ml}$) (B) komplekside sisenemine HeLa rakkudesse 1tunni jooksul temperatuuril 37°C . Tulemused mõõdetud Genios Plus spektrofotomeetrial “TECAN”

FLUORESTSENTSMIKROSKOOPIA

Rakuorganellide märkimiseks kasutati fluoresteeruvat spetsiifiliselt kontsentreeruvat värvi filipiin, falloidiini konjugaati Texas Red-ga ning fluorestsentsmärgisega kooleeratoksiin B-subühikut ja transferriini endotsüotiliste radade eristamiseks. Aktiinifilamente uuriti HeLa rakkudes, ülejäänute puhul kasutati peale HeLa ka hiire primaarseid fibroblaste, Bowesi ja heparaansulfaat-defitsiitseid CHO rakke.

RPP-valk komplekside assotsiatsioon filopoodide ja rakupinnaga

„Lipiidsed parved“ on spetsiifilised sfingolipiidide ja kolesteroolirikkad plasmamembraani piirkonnad (van Deurs *et al.*, 1989), mis on seotud klatriinsõltumatu endotsütoosiga, sealhulgas nii kaveoolide vahendusel (Murata *et al.*, 1995) kui kaveoliin-sõltumatu ET-ga (Torgersen *et al.*, 2001). Uurides „lipiidsete parvede“ osalust RPP-de rakkudega interakteerumisel ja võimalikku rakumorfoloogia muutusi pepiidide poolt vahendatud valgutranspordil, kasutati membraani märgistamiseks filipiini, mis lisaks seondumisele plasmamembraanis asuvate steroolidega, visualiseerib hästi ka rakujätked (filopoodid) ja Golgi kompleksi vastavad piirkonnad (joonis 7).

Filipiini kasutati kolesteroolirikaste piirkondade märkimiseks fikseeritud rakkudes. Mitmete artiklite fluorestsentsmikroskoopilised katsed on näidanud, et fikseerimine mõjutab RPP-de paiknemist rakkudes ja võib tekitada artefakte. Sellepärast kontrollisime elus rakkudes (joonis 7A), et filopoodid, mida me raku pinnal nägime (kuhu kompleksid seondusid), ei ole fikseerimise artefakt. Kuna filipiin on kultuuris kasvavatele rakkudele toksiline, siis oli hea kvaliteediga rakufotode saamine komplitseeritud elus rakkude vähesel arvul tõttu.

Vaadeldes filipiini lokaliseerumist rakkudes on näha kolesterooli koondumist perinukleaarses piirkonnas. Plasmamembraanis markeerib filipiin HeLa rakkudes ühtlaselt kogu membraani ja eriti tugevalt filopoodid. Hinnates peptiid-avidiin kompleksi asukohta filipiiniga märkunud piirkondade suhtes ei ole võimalik tuvastada ühegi kasutatud RPP puhul komplekside eelistatud lokaliseerumist rakumembraanil antud piirkondadesse (joonis 8D,E). Osalist kolokalisatsiooni saab siiski detekteerida filopoodidel ja rakkude sees perinukleaarselt. Sama (va paiknemine filopoodidel) kehtib ka kasutades substraadina Bowesi rakke (joonis 8B). Kuigi Bowesi mitmetele rakupopulatsioonidele on iseloomulik kolesterooli koondumine suurte rakuliste väljakasvete tippudesse, ei ole see soodustanud kompleksite suundumist antud spetsiifilistesse piirkondadesse.

Teiseks eesmärgiks oli vaadata võimalikke rakumorfoloogilisi muutusi sõltuvalt RPP-avidiini kompleksidega inkubatsioonist. On näidatud, et üheks RPP-de internaliseerumise võimaluseks rakkudesse on endotsütootiliste radade kasutamine. Endotsütootiliste vesiikulite (endosoomide) moodustumisel ja eriti makropinotsütoosi puhul on teada nende sõltuvus aktiini tsütoskeletist (Wadia *et al.*, 2004). **Aktiinifilamendid** on raku tsütoskeleti komponendid, mis tagavad raku kuju ja mida mööda toimub raku sisestruktuuride ja ka mitmete membraansete vesiikulite transport. Seetõttu uuriti, kas erinevad RPP-d võiksid oma rakusisestel liikumistel kasutada antud struktuure, vaadati nende kolokalisatsiooni ja kontrolliti kas peptiididega töötlus stimuleerib aktiinifilamentsete rakuliste väljakasvete ja fiibrite teket. Võrreldes töötlemata ja erinevatel peptiidi kontsentratsioonidel (0,5-5µM) kompleksidega töödeldud HeLa rakke, pole märgata filipiiniga märgistatud rakkudel (HeLa, Bowes, CHO) filopoodide hulga suurenemist või nende tekke indutseerimist (joonis 8C, D, peptiid-avidiin kompleksiga töödeldud rakud) (joonis 7A, B, töötlemata rakud) ühelgi kasutatud kontsentratsioonil analüüsitud rakuliinides (tulemused ei ole toodud).

Aktiini filamentide täpsem detekteerimine toimus Texas Red-iga konjugeeritud falloidiiniga, näidates paiknemist paralleelsete kimpudena üle kogu raku. Võrreldes erinevate penetreeruvate peptiididega vahendusel rakkudesse viidud avidiini paiknemist tsütoskeleti suhtes võib öelda, et kasutades vektorina biotinüleeritud transportaani või tema analoogi TP 10 puudub RPP-valk kompleksidel valdav kolokalisatsioon aktiiniga (joonis 9C-F). Samas Tat-peptiidi kasutamisel paiknevad avidiini kompleksid eelistatult filopoodidel ja plasmamembraani aluses piirkonnas aktiinifiibritel (joonis 9A,B).

Töödeldes rakke **metüül-β-tsüklodekstriiniga** kõrvaldati HeLa rakkude membraanist kolesterool. Kolesterooli kõrvaldamine rakkudest ei ole täielik, kuid on samas muutnud oluliselt ka rakkude kuju vähendades nende välispinda. Metüül-β-tsüklodekstriiniga inkubeerimine viiakse läbi seerumvabas keskkonnas, mis ise ei mõjuta rakkude morfoloogiat (joonis 10E). Kolesterooli ekstraheerimine on vähendanud oluliselt Tat-peptiidi kompleksi seondumist membraanile ja takistanud tema internaliseerumist (joonis 10D). Kui metüül-β-tsüklodekstriiniga töötlemata kultuuris on võimalik näha peptiid-valk kompleksi paiknemist ka perinukleaarses piirkonnas, siis tsüklodekstriiniga töödeldud rakkudes on kompleksile vastav roheline signaal jälgitav vaid plasmamembraanis või selle lähedal. RPP-avidiini komplekside erinev afiinsus eri rakkude suhtes sama kultuuri piires võib olla põhjustatud erinevast rakutsükli faasist, sellega kolesterooli estrite sünteesi ja/või kolesterooli hulgast rakus. TP-avidiin komplekside korral pole võimalik detekteerida seondunud komplekside koguhulga olulist vähenemist kolesterooli eemaldamise järel plasmamembraanist. Pigem on

näha TP-avidiini ümberpaigutumist (joonis 10A) raku pinnal ja suuremate multimeersete kompleksite koondumist raku perifeeriasse ja jätketele.

Täispika Tat-valgu internaliseerumisel rakkudesse peetakse oluliseks tema interaktsioone heparaansulfaat-proteoglükaanidega (Tyagi *et al.*, 2001), samas Tat-peptiidi rakkudesse sisenemiseks ei peeta proteoglükaane oblikatoorseteks. Eemaldades rakupinnalt heparaansulfaatsed glükosiidid **heparinaasiga**, ei muutu HeLa rakkude morfoloogia (joonis 11A), kuid Tatb-Av assotsiatsioon rakkudega väheneb kardinaalselt. Avidiin paikneb enamikel rakkudel juhuslikult suurte agregaatidena. Üksikutes populatsioonirakkudes on näha Tatb-Av lokalisatsiooni membraanil ka väiksemates kompleksites, mis võib tulla ka biotinüleeritud Tat-peptiidi interaktsioonidest muude membraani negatiivselt laetud molekulidega/komponentidega (joonis 11B).

Heparaansulfaat-defitsiidsete CHO rakkude inkubeerimisel Tatb-Av kompleksiga on selle lokalisatsioon jälgitav üle kogu raku (joonis 11C), kuid väiksemal kogusel kui HS-i ekspresseerivas rakuliinis (joonis 8D). Võrreldes heparinaasiga töödeldud rakkudega, puuduvad suured koondunud agregaadid. Transportaaniga vahendatud avidiini transpordil on kompleksi detekteerimine heparaansulfaat-defitsiidsetes CHO rakkudes raskendatud, avidiini signaal nõrk.

Kontrollina on kõigil katsetel viidud läbi eksperimendid identsetel tingimustel ainult FITC-avidiiniga töödeldud rakkudest, kus ühelgi puhul pole võimalik tuvastada avidiini rakkude sisemuses ega ka pinnal. Antud kontrollkatsete tulemused on esitatud joonis 12.

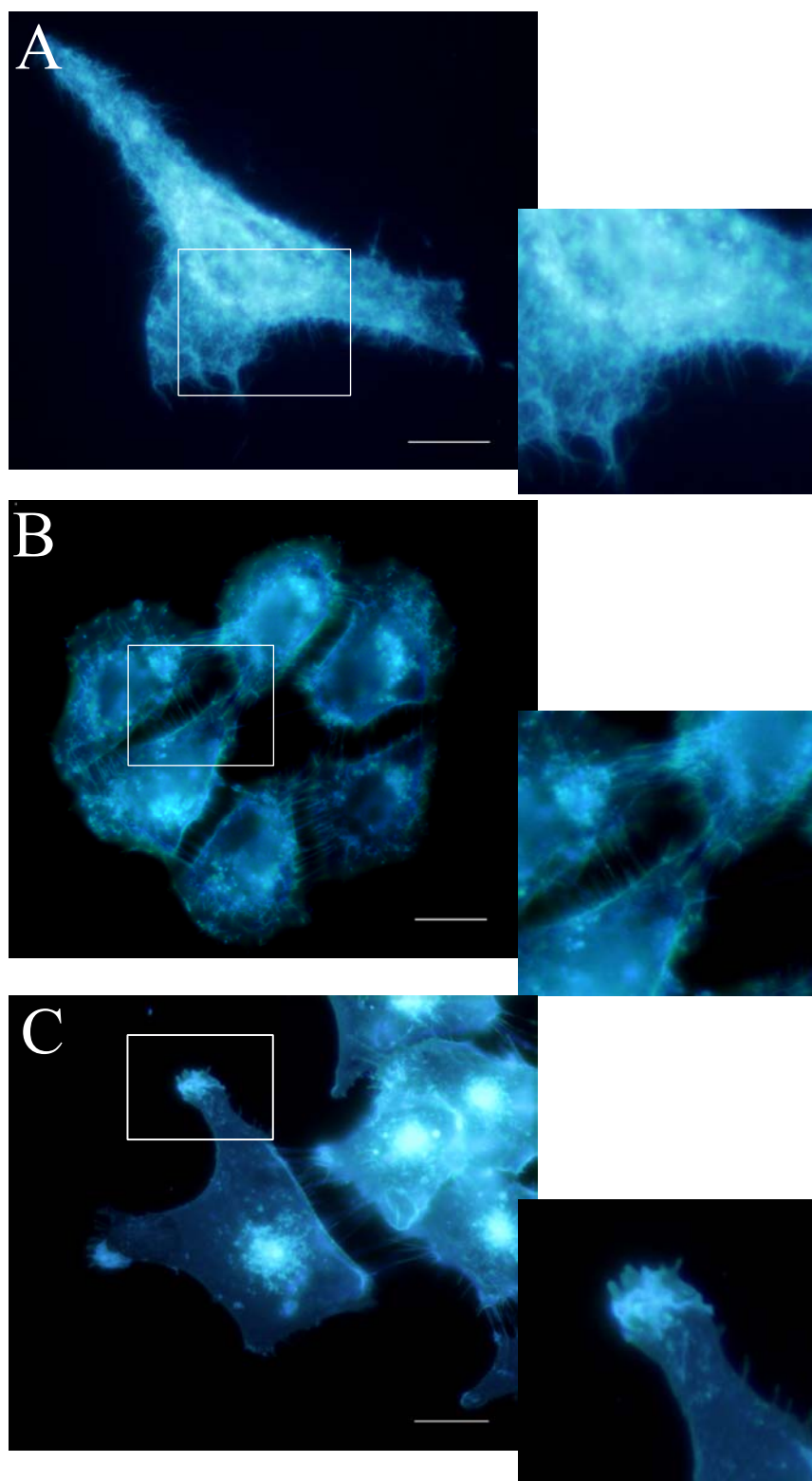
TPb-AvFITC kompleksi lokalisatsioon primaarsetes hiire fibroplastides

Primaarseid hiire fibroblaste inkubeeriti TPb-AvFITC konjugaadiga temperatuuril 37°C 1 tunni jooksul ja seejärel vaadeldi tema lokalisatsiooni rakkudes. Hinnates peptiid-avidiin kompleksi paigutumist fibroplastides näeme, et enamik interaktsioone on toimunud plasmamembraaniga ja vähemal määral on kompleksid leitavad rakkudest (joonis 13B). TPb-AvFITC lokaliseerub tihedalt üle kogu raku pinna koondudes sageli raku perifeerias mingitesse suurematesse membraanistruktuuridesse (joonis 13A).

Transferriin, mis siseneb rakkudesse klatriin-sõltuva ET teel paikneb fibroblastides kogu tsütoplasmas, olles tihedamalt koondunud perinukleaarses piirkonnas (joonis 14 A,E punane). Transportaan-avidiin kompleksid on ebaühtlasema suurusega ja mitte nii hulgaliselt

detekteeritavad rakkudes (joonis 14C). Piltide ühildamisel on näha, et transferriini sisaldavad vesiikulid ei kolokaliseeru avidiini kompleksitega, millest võib järeldada, et transportaan-avidiin kompleksid ei sisene rakku klatriinvahendatud endotsütoosi teel.

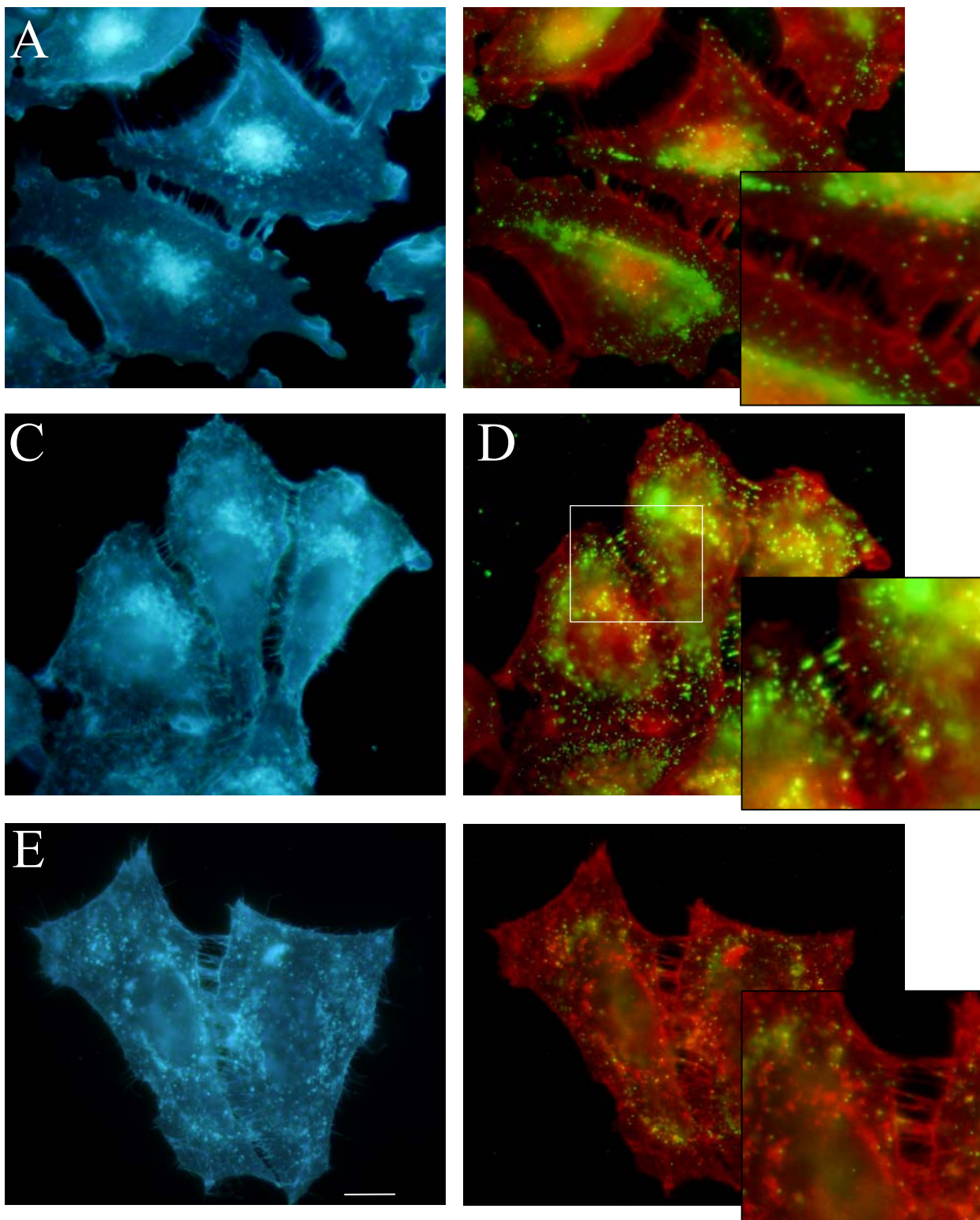
Vaadeldes TPb-AvFITC-i (joonis 14D) võimalikku paiknemist **kooleratoksiiniga** märkunud piirkondades (joonis 14B) on ühildatud piltidel näha suurel määral kattuv lokaliseerumine (joonis 14F). Lisaks kattuvat lokalisatsiooni näitavat kollase signaaliga struktuuridele on eristatavad ka üksikud punase mäkega vesiikulid. Antud tulemused viitavad kooleratoksiini ja transportaaniga vahendatud avidiini transpordi ühisele rakkudesse sisenemise rajale.



Joonis 7. Kolesteroolirikaste piirkondade erinevus HeLa ja Bowesi rakkudes.

Kolesteroolirikad piirkonnad visualiseeriti HeLa (A, B) ja Bowesi (C) rakkudes inkubeerides 45 minutit filipiiniga (100 mg/ml). Rakud (B, C) fikseeriti 20 minutit 4% paraformaldehüüdi lahusega PBS-s.

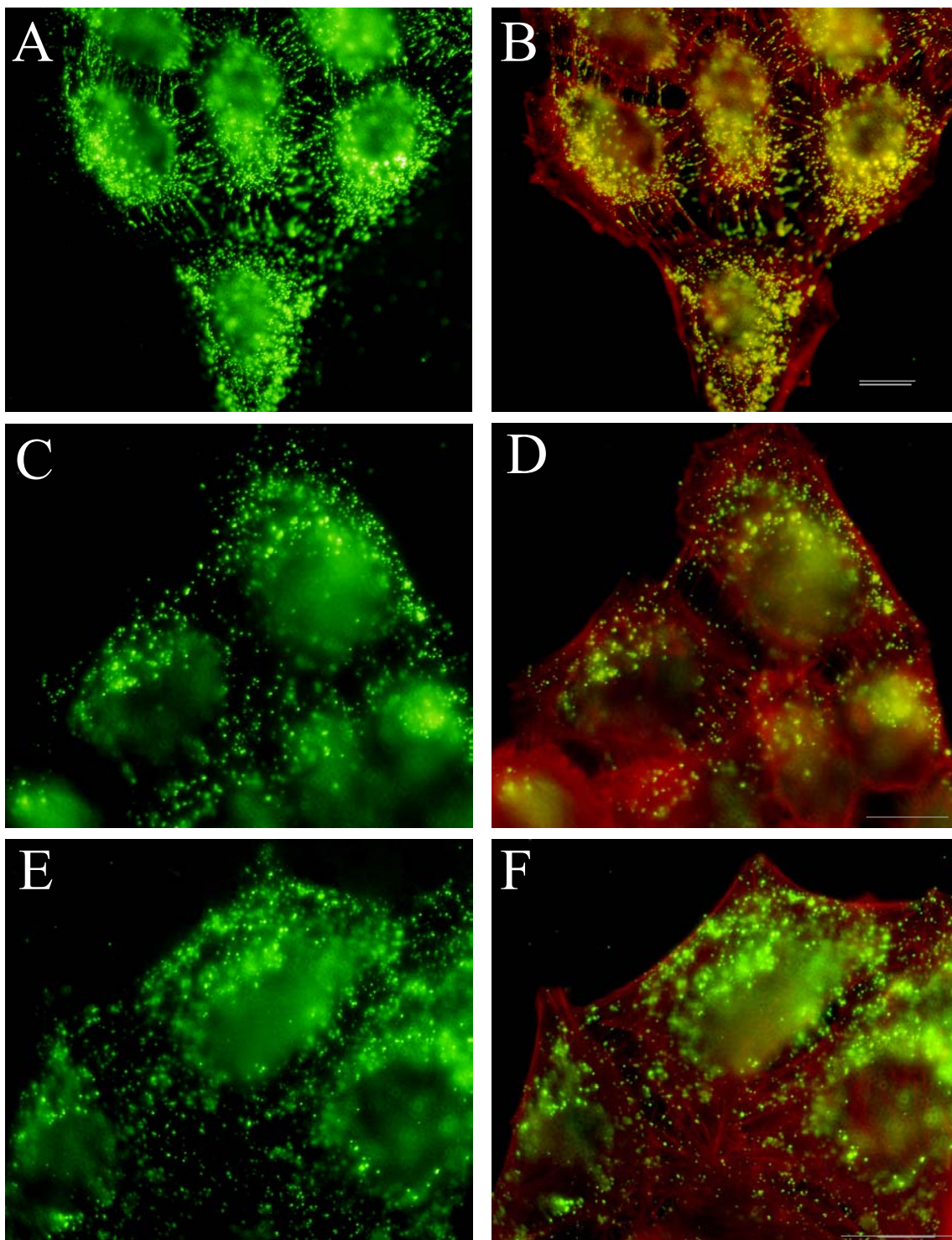
Mõõtejoon 14 μ M



Joonis 8. RPP-avidiin komplekside paiknemine Hela ja Bowesi rakkudes kolesteroolirikaste piirkondade suhtes.

Rakke inkubeeriti Tat-avidiin-FITC (B, D) ja transportaan-avidii-FITC (F) kompleksidega. Kolesteroolirikad piirkonnad visualiseeriti HeLa (B, C) ja Bowesi (A) rakkudes filipiiniga (100 mg/ml). Ühendatud kujutistes (B, D, F) on filipiini signaal punane. Rakud fikseeriti 20 minutit 4% paraformaldehüüdi lahusega PBS-s.

Kasutatud kontsentratsioonid biotinüül-RPP 1 μ M, avidiin-FITC 0,15 μ M

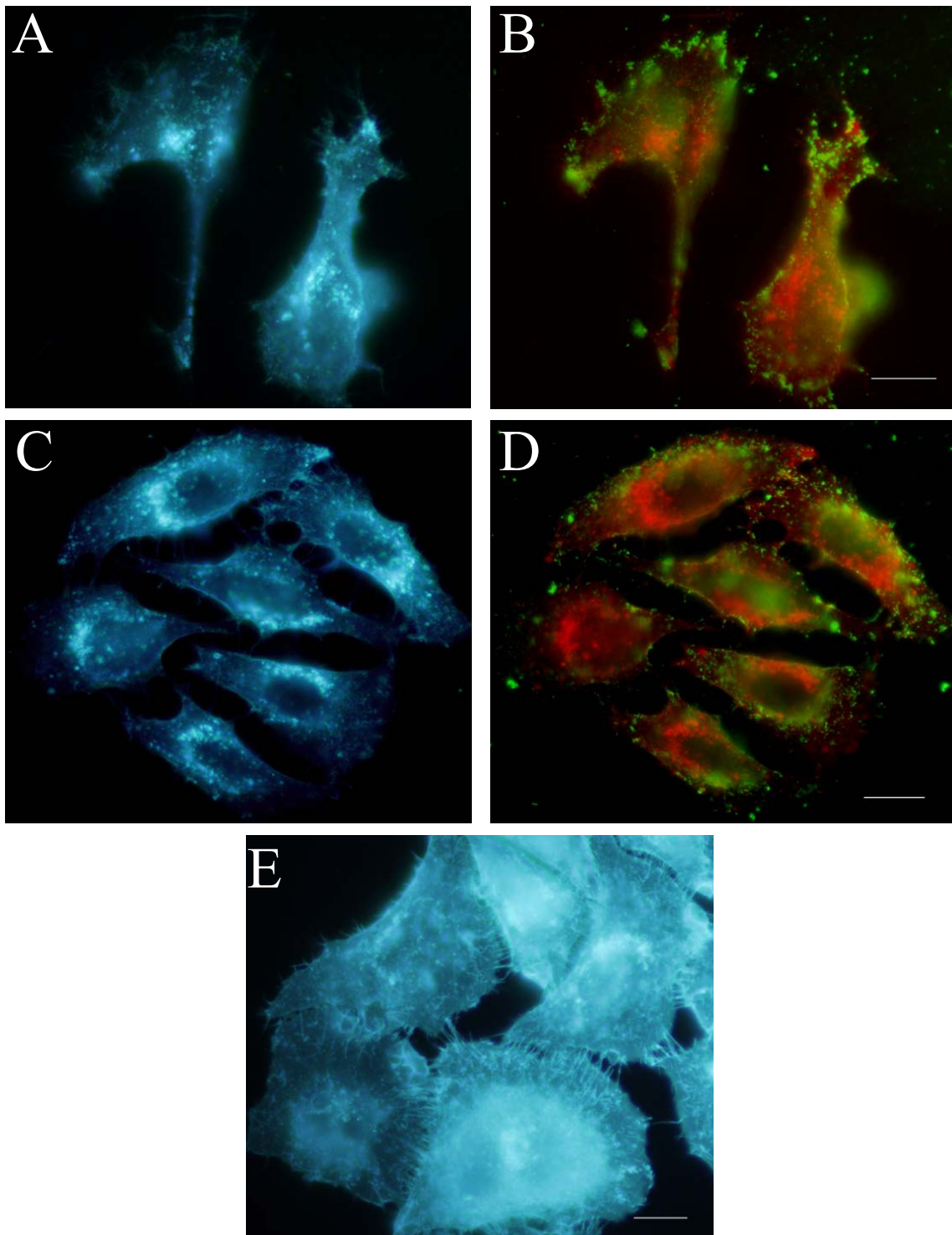


Joonis 9. RPP-avidiin komplekside paiknemine HeLa rakkudes aktiinifilamentide suhtes.

HeLa inkubeeriti Tat-avidiin (A, B), TP-avidiin (C, D), TP10-avidiin (E, F) kompleksidega (roheline signaal) 1 tunni vältel 37°C juures. Aktiinifilamendid visualiseeriti falloidiin-Texas-Red-ga (66nM) (B, D, F punane signaal). Rakud fikseeriti 4% paraformaldehüüdi lahusega PBS-s 20 minutit ja permeabiliseeriti 3 minutit jääl 0,1 % Triton-X-100-ga.

Kontsentratsioonid: biotinüül-RPP 1 μ M, avidiin-Alexa488 0,15 μ M.

Mõõtejoon 14 μ M



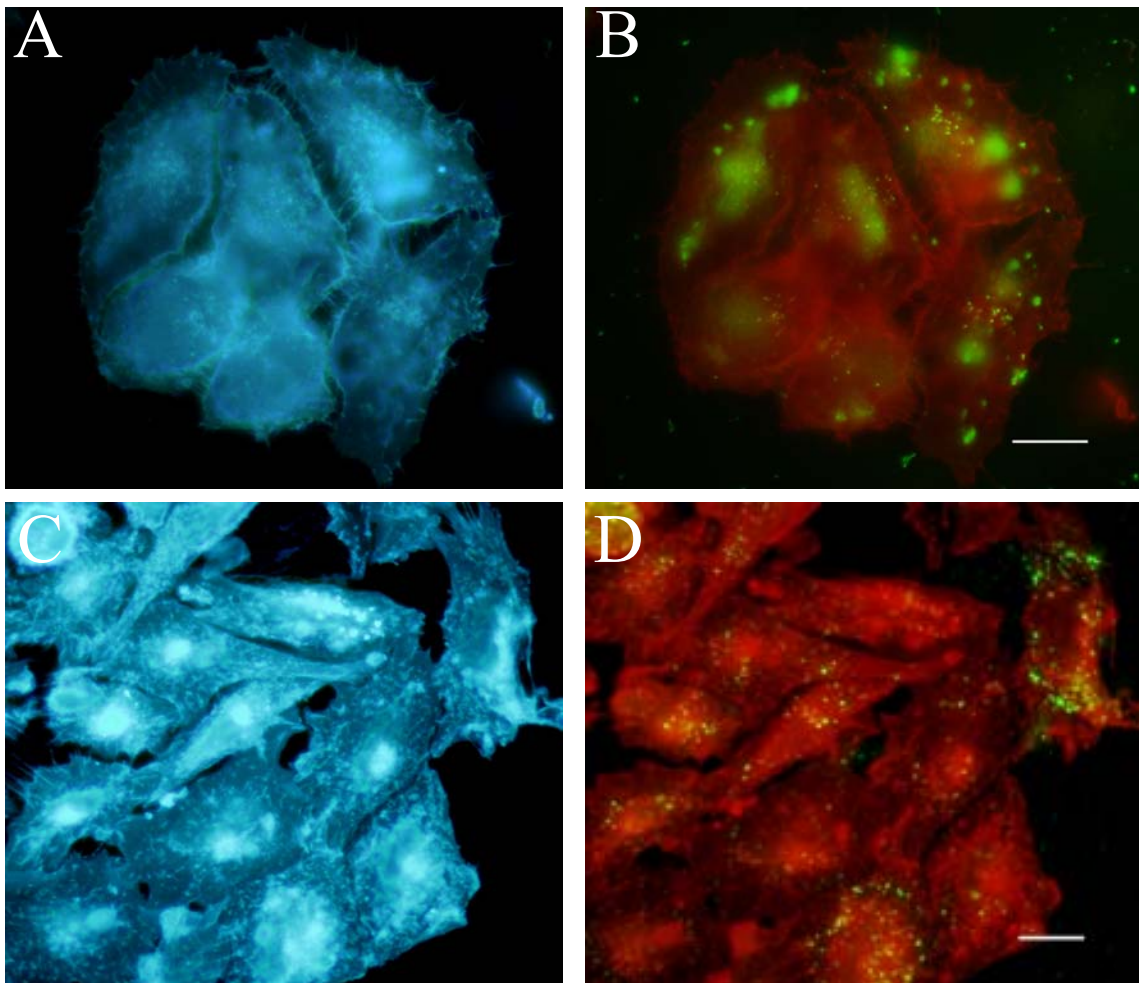
Joonis 10. RPP-avidiin komplekside internaliseerumine Hela rakkudesse pärast kolesterooli eemaldamist membraanist.

Kolesterool ekstraheeriti plasmamembraanist metüül- β -tsüklodekstriiniga (10 mM) seerumvabas IMDM-s 37 °C juures 1 tund. Seejärel inkubeeriti rakke samas keskkonnas Tat-avidiin-FITC (C, D) ja transportaan-avidini-FITC (A, B) kompleksidega 1 tund. Kolesterool visualiseeriti filipiiniga (100 mg/ml). Ühendatud kujutistes (B, D,) on filipiini signaal punane.

Kasutatud kontsentratsioonid biotinüül-RPP 1 μ M, avidiin-Alexa488 0,15 μ M

Töötlemata kontrollrakud (E) inkubeeritud seerumvabas IMDM-s. Rakud on fikseeritud 20 minutit 4% paraformaldehüüdi lahusega PBS-s.

Mõõtejoon 14 μ M



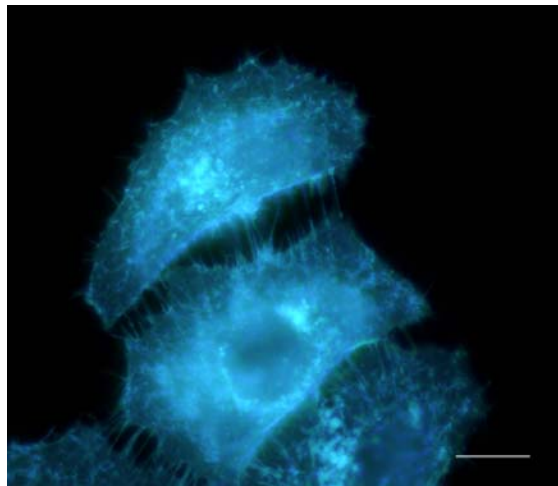
Joonis 11. RPP-avidiin komplekside paiknemine Hela rakkudes kolesteroolirikaste piirkondade suhtes heparaansulfaat-defitsiidsetes CHO ja heparinaasigaII töödeldud HeLa rakkudes.

Heparaansulfaat-proteoglükaanid eemaldati HeLa (A, B) membraanilt heparinaasII (0,5 ü/ml) töötlusega 37°C juures 30 minutit. Seejärel inkubeeriti rakke samas keskkonnas edasi Tat-avidiiini (B) kompleksidega 1 tund.

Heparaansulfaat-defitsiidseid CHO rakke (C, D) inkubeeriti Tat-avidiin-FITC kompleksiga 1 tund. Kolesteroolirikad piirkonnad visualiseeriti filipiiniga (100 mg/ml). Ühendatud kujutistes (B, D,) on filipiini signaal punane.

Rakud fikseeriti 4% paraformaldehüüdi lahusega 20 minutit PBS-s. Kasutatud kontsentratsioonid: biotinüül-Tat 1 μM , avidiin-FITC 0,15 μM

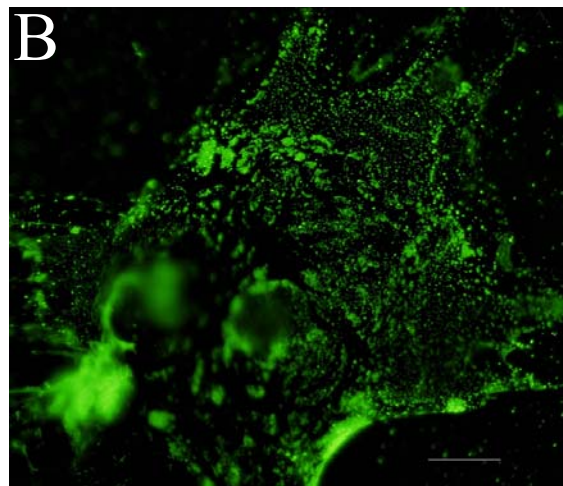
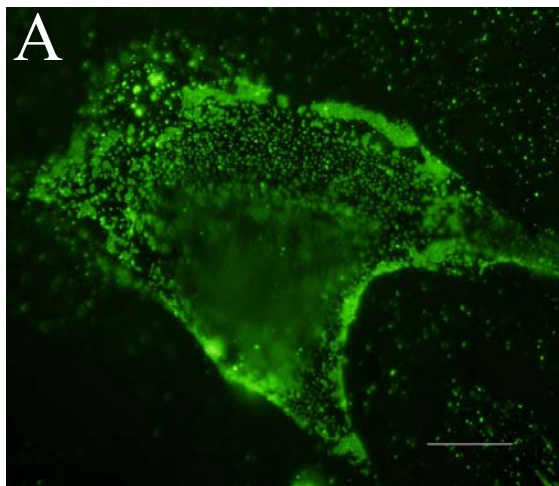
Mõõtejoon 14 μM



Joonis 12. Avidiin-FITC-ga töödeldud HeLa rakud

Rakke inkubeeriti avidiin-FITC-ga ($0,15 \mu\text{M}$) 1 tunni jooksul 37°C juures ja fikseeriti 20 minutit 4% paraformaldehüüdi lahusega PBS-s. Kolesteroolirikkad piirkonnad visualiseeriti HeLa rakkudes inkubeerides 45 minutit filipiiniga (100 mg/ml).

Mõõtejoon $14 \mu\text{M}$

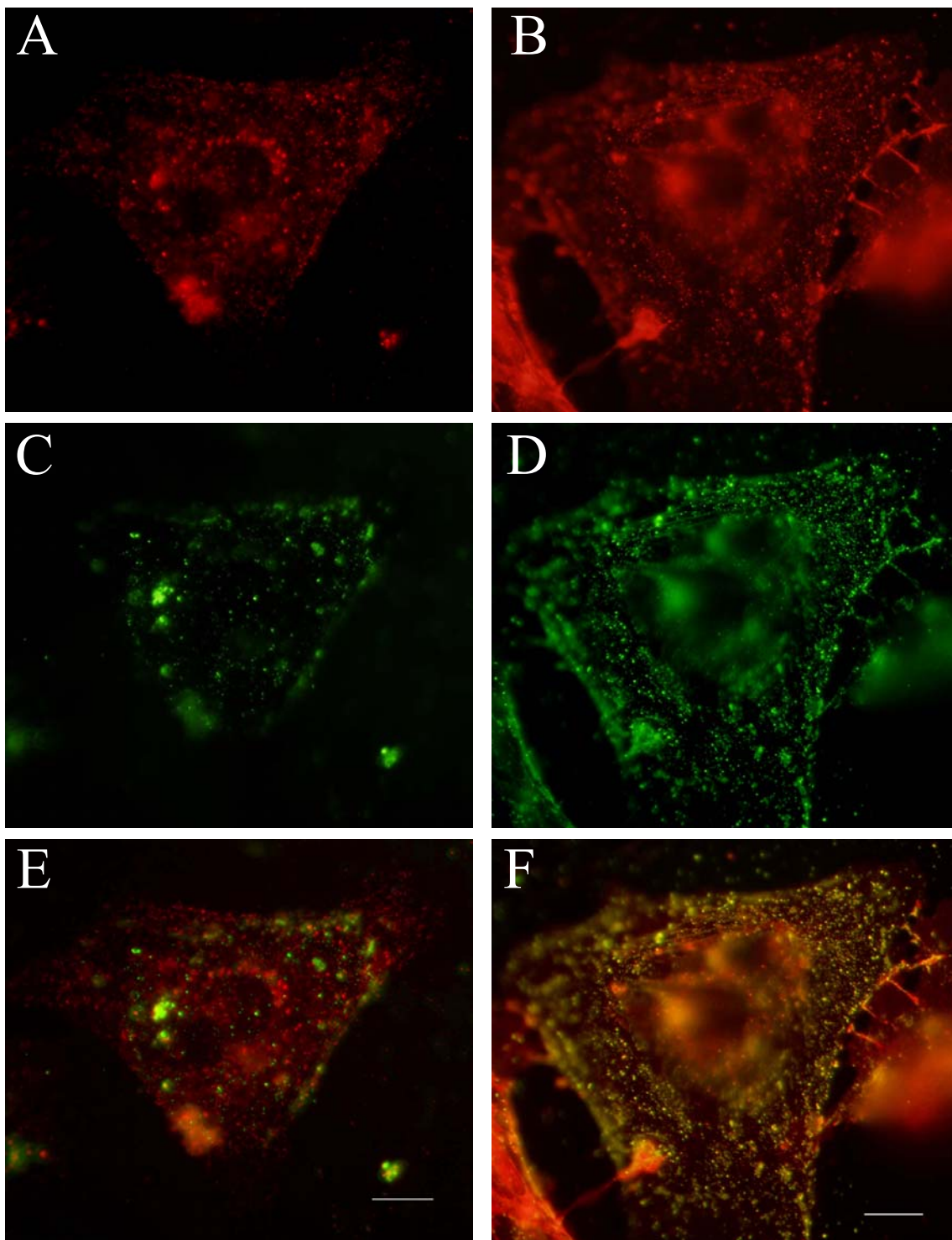


Joonis 13. Transportaan-avidiin komplekside paiknemine primaarsetes hiire fibroplastides

Rakke inkubeeriti TP-avidiin-FITC (A,B) kompleksidega 1 tunni jooksul 37°C juures ja fikseeriti 4% paraformaldehüüdi lahusega PBS-s 20 minutit.

Kontsentratsioonid: biotinüül-TP $1 \mu\text{M}$, avidiin-FITC $0,15 \mu\text{M}$

Mõõtejoon $14 \mu\text{M}$



Joonis 14. Transportaan-avidiin komplekside paiknemine hiire fibroblastides endotsütoosi markervalkude suhtes.

Primaarseid hiire fibroblaste inkubeeriti TP-avidiin komplekside (C, D ja E, F, roheline signaal) ja Alexa Fluor 594-märgitud transferriniga (A, E punane signaal) või kooleeratoxiin B subühikuga (B, F, punane signaal) 1 tunni vältel 37 °C juures. Kolokalisatsioon on ühildatud piltidel (E, F) detekteeritav kollase signaalina. Rakud on fikseeritud 4% PFA lahusega PBS-s 20 minutit. Transportaan-avidiin kompleksid moodustati 1 μM biotinüül-transportaani ja 0,15 μM avidiin-FITC koinkubeerimisel.

Mõõtejoon 14 μM

ARUTELU

Fluorestsentsmikroskoopia tulemused näitasid internaliseerunud peptiid-vahendatud transpordil avidiini, kui transporditava molekuli erinevat jaotust rakkudes sõltuvalt peptiidist. Kõikide kasutatud RPP-de puhul on võimalik detekteerida avidiini peamiselt granulaarset paigutust üle kogu raku nii HeLas (TP, TP10, Tat), Bowesis (TP, Tat), heparaansulfaat-defitsiitses CHO-s (Tat) kui primaarsetes hiire fibroblastides (TP), kusjuures lokaliseerimine erineb nii rakuliinilt kui sõltuvalt kasutatud peptiidist. Intratsellulaarselt paiknevad kompleksid HeLa ja Bowesi rakkudes üle kogu tsütoplasma ja tihedamalt HeLa perinukleaarses piirkonnas. Samas paiknevad Tat-avidiiniga kompleksid rakuväliselt eelistatult filopoodidel kolesteroolirikastes piirkondades, mis märguvad intensiivselt filipiiniga ning kolokaliseeruvad raku perifeerias ja membraani lähedal aktiinifilamentsete väljakasvetega. Üks võimalikke mehhanisme on, et avidiini transpordil seondub Tat kõigepealt filopoodidele, millel suunatakse neid seejärel edasi raku suunas ja omastatakse raku poolt filopoodide vahelistes piirkondades vesiikulite teket indutseerides. Huvipakkuv on sealjuures see, et niivõrd spetsiifiline assotsieerumine filopoodidega toimub ainult Tat-peptiidiga transpordil HeLa rakkudes ja tunduvalt väiksemal määral teistel vaadeldud RPP-del. Ka Tat-i puhul eksisteerib nii selge spetsiifilisus eelkõige HeLa rakkudes. Bowesi rakkudel on fluorestsentsmikroskoopiliselt filipiini värvingu järgi otsustades rakkudel vahel suurema läbimõõduga filopoodide pseudopoodide-laadsed struktuurid, on komplekside paiknemine nendel harvem ja pigem juhuslik.

Tat on üks põhjalikumalt uuritud RPP-sid. Sõltuvalt, kas tegu on täispika Tat-valgu, tema translokeeruva domeeni või nende konjugaatidega, pakutakse välja erinevaid mehhanisme rakkudesse sisenemise jaoks. Täispika Tat-valgu konjugaadid sisenevad kirjanduse andmetel rakkudesse kolesteroolirikaste “lipiidsete parvede” vahendusel. Meie poolt kasutatud Tat-peptiidi kompleksid avidiiniga paiknevad juba eelnevalt mainitud filopoodidel ja osaliselt perinukleaarselt. Täpsemat struktuuride defineerimist, milles Tat-avidiin kompleksid asuvad, on antud piltidel raskem kindlaks teha. Kolesterooli kõrvaldamisel membraanist tsüklodekstriiniga väheneb Tat-kompleksi sisenemine rakkudesse ja suureneb raku pinnal suurte agregaatide teke, mis näitab “lipiidsete parvede” osalust Tat-avidiooni internalisatsioonil. Kolesterooli eemaldamisest tulenevat rakkudesse sisenemise efektiivsuse muutusi saaks vaadata ja kvantifitseerida täielikumalt ka läbivoolutsütomeetria, kuid samas ei saaks kindlaks teha, kui suur osa internaliseerumise langusest on põhjustatud

kolesterooli eemaldamisest membraanist ja kui suur osa on seotud raku morfoloogia muutumisega ning raku pinna vähenemisega kolesterooli membraanist kõrvaldamisel. Nagu fluorestsentsmikroskoopia näitab, väheneb rakkude pindala ja muutub morfoloogia oluliselt.

Täispika Tat-valgu (Tyagi *et al.*, 2001), kuid mitte Tat-peptiidi (Silhol *et al.*, 2002) internalisatsioon sõltub heparaansulfaatidega interakteerumisest. Heparaansulfaate vajavad ka antud töös kasutatud Tat-peptiidi konjugaadid avidiiniga, mis ei suuda efektiivselt seostuda ega siseneda heparinaasiga töödeldud rakkudesse. Samas internaliseerumine HS-defitsiidsetesse CHO rakkudesse toimub, nagu Tat peptiidil, kuid oluliselt väiksema intensiivsusega. Põhjuseks võivad olla interaktsioonid muude tugevalt negatiivselt laetud glükoproteiinidega, mida ei õnnestu detekteerida heparinaasiga töödeldud rakkude pinnal moodustunud avidiini agregaatide signaali taustal.

Peptiid- Valk kompleksite raku paiknemise granulaarsus näitab nende võimalikku asetsemist endotsütootilistes vesiikulites, mis on kooskõlas ka teiste uurimisgruppide poolt pakutuga. Samas on 4 °C juures TP-Av konjugaat rakkudes detekteeritav, kuigi endotsütoos peaks nii madalal temperatuuril blokeeritav olema. Osutatud tulemustest lähtudes võib oletada, et nii TP kui tema analoogi TP10 vahendatud valgu transport rakkudesse toimub endotsütootiliste protsesside vahendusel, kuid on asendatav endotsütoosi takistavatel tingimustel vähem rakuenergiast sõltuva protsessiga (penetratsioon madalal temperatuuril). Mikroskoopiliselt detekteeritav granulaarne rakkude värvumine võib olla põhjustatud nii komplekside paiknemisest vesiikulites kui ka peptiidide oligomeriseerumisest ja kontsentreerumisest plasmamembraani spetsiifilistes piirkondades, mis indutseerivad adsorptiivse endotsütoosi. Transportaanil on ka afiinsus membraanete struktuuride, näiteks plasmamembraani suhtes tugevam kui Tat-peptiidil (Pooga *et al.*, 1998a), mis võib soodustada efektiivset internalisatsiooni (joonis FACS ja joonis FM) ja transpordivõimet (Säälik *et al.*, 2004). Samas ei saa välistada, et helikaalse mastoparaanist pärineva domeeni interaktsioonid rakupinnaga stimuleerivad lisaks vesiikulite tekkele ka peptiidi sisenemist rakku otse läbi lipiidse kaksikkihi. Viimast võimalust toetab uurimus, milles demonstreeriti penetratiini translokeerumist otse läbi sünteetiliste mudelvesiikulite membraani (Leifert and Whitton, 2003) sõltuvalt vesiikulite lipiidsest koostisest ja membraanipotentsiaalist. Üheks variandiks membraani läbimiseks on lipiidse kaksikkihi destabiliseerimisest põhjustatud ajutise poori abil, mille mudel esitati hiljuti avaldatud töös sünteetiliste peptiidide Pep-1 ja MPG jaoks (Deshayes *et al.*, 2004). Selline mehhanism selgitaks transportaani toksilisust kõrgetel konsentratsioonidel, sest ka nii Pep-1 kui ka MPG on kõrgetel konsentratsioonidel tsütotoksilised.

ET markeritega on leitud, et transportaan kasutab avidiini transpordil HeLa rakkudesse klatriin-sõltumatuid endotsütootilisi radu. Sama on näha ka primaarsetes hiire fibroblastides, kus komplekside paiknemine erineb transferriini (klatriinsõltuva ET marker) lokalisatsioonist ja kattub märgatavalt kooleratoksiini sisaldavate struktuuridega. Kooleratoksiini puhul on elektronmikroskoopia ja immunofluorestsentsi abil näidatud tema sisenemine “lipiidsete parvede” vahendusel (Parton and Richards, 2003) eelistatult kaveoliiniga kaetud lohkudest läbi sorteerivate endosoomide Golgisse ja sealt edasi endoplasmaatilisse retiikulumi. Antud faktidele põhinedes saab väita, et vähemalt TP-ga seotud endotsütootiline transport on seotud klatriinsõltumatu ET-ga ja võib suunduda Golgisse või ka vabaneda endosoomide membraane destabiliseerides tsütosooli.

Nagu eelnevalt mainitud sõltub RPP-de internaliseerumise tee (Tat) kasutatud peptiidi omadustest ja transporditava molekuli olemasolust ning selle iseloomust. Võrreldes fluoromeetriselt erinevate peptiidide rakkudesse sisenemist sõltuvalt lastmolekuli olemasolust ja iseloomust on näha, et transporditava üksuse lisamine muudab enamikel RPP-del rakkudesse sisenemise efektiivsust. Põhjuseks võib olla lastmolekul, mis takistab või nõrgendab peptiidide spetsiifilisi interaktsioone plasmamembraaniga või laetud glükoproteiinidega ja sellest tulenevalt ka mõjutab translokeerumise kulgu. Teiseks võimaluseks on, et suuremad kompleksid võivad koonduda ja multimeriseeruda selliselt, et fluorestseeruvad molekulid kustutavad oligomeerses kompleksis üksteise fluorestsentsignaali. Muidugi ei saa ka välistada RPPdega konjugaadi aeglasemat sisenemist ka teise ET ratta suunamise tõttu. Avidiini asendamine avidiin- β -galaktosidaasiga näitab osadel peptiididel (Pen, Arg, MAP) translokeerumise sõltuvust ka lastmolekuli iseloomust, eriti nii suurest nagu valk või laetud nagu oligonukleotiid, mis mõjutavad sisenemise efektiivsust laengu ja suuruse muutumise tõttu. Teistest peptiididest käitub erinevalt Tat-peptiid, mille puhul vastupidiselt kõikidele uuritud RPP-dele soodustab valgulise ühendi lisamine internalisatsiooni, tõenäoliselt proteolüütilise degradatsiooni vähenemise tõttu.

Tat-peptiidi väiksem translokatsiooni võime on jälgitav ka katsetes, kus vaadati RPP-de rakkudesse sisenemist ja selle efektiivsust eri meetoditel (FACS, FSM) aja jooksul. Võrreldes erinevaid transportpeptiide, saab väita, et uuritud fluorestseiiniga märgistatud peptiididest on Tat ka kõige väiksema ja transportaan kõige suurema efektiivsusega. Pikemaajalisel inkubatsioonil, üle 2 tunni ja enam, on transportaani rakusisene kontsentratsioon üle 2 korra kõrgem kui teistel RPP-del. Üks võimalusi selle seletamiseks on, et erinevatel penetreeruvatel peptiididel võivad olla rakkudesse sisenemiseks erinevad internalisatsiooniteed või nad seonduvad erineva afiinsusega internaliseerumist vahendavate

plasmamembraani piirkondadega. Seda saab järeldada ka RPP-de rakkudesse sisenemise kineetikast. Transportaani puhul toimub translokeerumine rakkudesse ühtlase kiirusega, kontsentratsiooni lineaarse tõusuga kuni 4 tunnini, sõltumatult peptiidi intertsellulaarsest kontsentratsioonist. Teistel RPP-del (TP10, Tat mõlema meetodiga ja Pen FSM-ga) suureneb rakkudesse siseneva peptiidi hulk ajaühikus esialgu kiiresti, saavutades 1-2 tunni jooksul tasakaalu internaliseeruva ning lagundatava ja/või eksotsüteeritava peptiidi hulga vahel. Penetratiini puhul võib FACS-ga vaadeldav kineetika erinevus FSM-ga täheldatust osutada penetratiini algele koondumisele plasmamembraani, mille jooksul pole fluorestsentssignaal jälgitav ja alles seejärel rakku sisenemisele. FSM-l kasutatud rakulüsaat näitab samal ajal antud ajahetkel rakkudes ja ka membraanis peitunud peptiidi koguhulka.

Suure osa RPP-de puhul on tavaliselt rõhutatud internalisatsioonil rakuspetsiifika puudumist, mida näitasid ka katsed primaarse ja immortaliseeritud rakkudega, kus samade penetreeruvate peptiidide transpordi efektiivsus oli lähedane mõlemates rakkudes. Fluorestsentsmikroskoopias HeLa ja Bowesi tuvastatud Tat-avidiin kompleksi membraanse lokalisatsiooni erinevus võib osutada siiski ka erinevatel rakuliinidel sama peptiidi sarnase efektiivsusega translokatsiooni juures sisenemisradade erinevustele.

Kokkuvõttena fluorestsentsmikroskoopias saadud tulemustele saab öelda, et meie poolt uuritud RPP-avidiin kompleksidel, et antud RPP-d ei põhjustanud häireid tsütoskeleti organisatsioonis ega mõjutanud kasutatud kontsentratsioonidel raku normaalset elutegevust, mistõttu ei oma ka kultuuris kasvavatele rakkudele kõrvalmõjusid.

KOKKUVÕTE

Rakku penetreeruvad peptiidid (RPP) on lühikesed kuni 30 aminohappe pikkused peptiidid, mis sisenedes rakkudesse võivad sinna viia ka erinevaid lastmolekule. Üha enam on hakatud uurimistöös kasutama RPP-sid suurte polaarsete makromolekulide nagu valgud, oligonukleotiidid, PNA, jne rakku viimiseks. Algselt väidetud retseptor-sõltumatus ja mitte-endotsütootiline internaliseerumine rakkudesse pole erinevate RPP-de puhul valdav. Enamikul peptiididel on füsioloogilistel tingimustel näidatud endotsütoosi suurt osakaalu rakkudesse liikumisel. Siiski pole veel senini kindlaks tehtud täpne mehhanism, mida kasutades toimub penetreeruvate peptiidide rakkudesse sisenemine ja tõenäoliselt sõltuvalt rakutüübist, lastmolekulist ja RPP-st võib mehhanism ka erinev olla.

Selgitades võimalikke internalisatsioonimehhanisme uurisime RPP-de ja nende lastmolekulide rakku liikumist erinevate meetodite kaasabil. Fluorestsentsmikroskoobiliselt jälgisime peptiid-vahendatud valgutransporti, peptiidide interaktsioone plasmamembraanil ja paiknemist erinevates rakuliinides (HeLa, Bowes, heparaansulfaat-defitsiidne CHO, primaarsed hiire fibroblastid). Tulemustest nähtub, et 1-tunnise inkubatsiooni järel on RPP-avidiin kompleksid detekteeritavad granulaarselt kõikjal raku pinnal ja sisemuses, mis võib tulla nende koondumisest endotsütootilistesse vesiikulitesse. Eelistatud assotsiatsioon filopoodidega ja aktiinifilamentidega on täheldatav eriti Tat-peptiidi poolt vahendatud transpordil, aga väiksemal määral ka teiste peptiididega. Komplekside selline paiknemine võib olla tingitud nende esialgsest seondumisest filopoodidele ja seejärel liikumisest mööda antud struktuure raku suunas, kuni aktiinifilamentide kaasabil indutseeritud endotsütoosini.

Hinnates Tat-valgu puhul kirjanduses tähtsaks peetud heparaansulfaat-proteoglükaanide osalust interaktsioonidel plasmamembraaniga, vaatlesime avidiini transporti Tat-peptiidi abil heparinaasiga töödeldud HeLa ja heparaansulfaat-defitsiidsetes CHO rakkudes. Mõlemal puhul on seondumine raku pinnaga vähenenud ja valgu transport rakkudesse takistatud, mis rõhutab heparaansulfaatide olulisust ka Tat-peptiidi poolt vahendatud makromolekulide internaliseerumisel.

Kontrollimaks penetreeruvate peptiidide komplekside rakkudesse sisenemist erinevate endotsütootiliste radade kaudu, jälgisime TP-avidiin kompleksi internalisatsiooni üheaegselt koos klatriin-sõltuva ET markeri transferriini ja lipiidsete parvede markeri kooleratoksiin B-subühikuga. Katsete tulemusel selgus, et avidiini transport rakkudesse ei toimu klatriiniga kaetud vesiikulite kaudu ja on seotud kooleratoksiini sisaldavate struktuuridega, arvatavasti

spetsiifiliste kolesteroolirikaste „lipiidsete parvede“ vahendusel. Kolesterooli ekstraheerimine membraanist vähendab nii transportaani, kui Tat-petiidiga kompleksite sisenemist rakku ja muudab lipiidse kaksikkihiga interakteerunud komplekside paigutuse iseloomu.

Uuritud fluorestseiiniga märgistatud peptiididest on kõige suurema rakku sisenemise efektiivsusega transportaan, eriti pikemate inkubatsiooniaegade korral. Lastmolekuli juurdelisamine ja selle iseloom muudavad vaadeldud RPP-de translokatsiooni efektiivsust.

Saadud tulemustest võib järeldada, et RPP-de rakku sisenemise mehhanism võib erineda peptiid- Valk komplekside internaliseerumisest ning sõltub lastmolekulist ja kasutatud peptiidist. Nende peptiid-Valg komplekside rakku sisenemine on vahendatud kolesteroolirikaste piirkondade, aktiini filamentide ja heparaansulfaatidega ning erinevatel RPP-del erineval määral. Translokeerumine toimub arvatavasti erinevaid internaliseerumismehhanisme kasutades, kaasa arvatud erinevat tüüpi endotsütootilised rajad ja peptiidide korral ka penetreerumine, kusjuures ühe sisenemistee blokeerimine võib indutseerida teiste osakaalu tõusu.

SUMMARY

Cell penetrating peptides (CPP) are short, (up to 30 amino acid) peptides, which can carry different payload molecules into the cell while entering it. The use of CPPs for transporting large polar macromolecules such as proteins, PNA, oligonucleotides into cells has become more popular in recent years. The originally suggested receptor-independent and non-endocytotic internalization into the cells is not dominant for major CPPs. For some peptides and conditions, the involvement of endocytotic processes has been observed. However, the exact mechanism CPPs use for crossing the plasma membrane and entering cells has yet to be determined.

To determine possible internalization mechanisms, the cellular uptake of CPPs were studied using different methods. The peptide-mediated protein transport, interactions of CPPs with the plasma membrane, and their localization in different cells (HeLa, Bowes, heparanesulfate-deficient CHO, mouse embryonic fibroblasts) were characterized by fluorescence microscopy. The results indicate that following 1-hour incubation period the peptide-avidin complexes are detectable over all cell surface and the cells in granular structures, which might be explained by the localization in endocytotic vesicles. The association preferentially with filopodia and actin filaments is especially characteristic for Tat-peptide mediated transport, but also (to a smaller extent) for other peptides. Such localization pattern of complexes might be caused by initial concentration to filopodia and following sliding towards the cell on abovementioned structures until actin-filament induced endocytosis takes place at the cell surface.

To evaluate the role of heparane sulfate proteoglycans in interactions with CPPs, considered important in the literature, the transduction of avidin by the Tat peptide into HeLa cells treated with heparanase II and heparanesulfate-deficient CHO cells was studied. In both cases the binding to the cell surface was decreased and the transport of protein into the cell was inhibited, which underlines the importance of heparane sulfates also in Tat-peptide mediated delivery of macromolecules.

To analyze the endocytotic routes involved in the internalization of peptide-protein complexes by different CPPs the cellular uptake of TP-avidin complex in parallel with clathrin-dependent EC marker transferrin or lipid raft marker cholera toxin B-subunit was assessed. The results show, that the TP-induced uptake of avidin by cells is not mediated by clathrin coated vesicles but structures containing cholera toxin, most probably with the specific involvement of cholesterol-rich "lipid rafts". The extraction of cholesterol from the

membrane decreases both the uptake of transportan- and Tat-peptide complexes with protein and changes the localization pattern of complexes interacting with the plasma membrane.

Most efficient among the studied CPPs labelled with fluorescein is transportan, especially at longer incubations. The coupling of cargo molecules and their nature strongly influences the efficiency of cellular translocation of studied CPPs.

The results allow us to conclude that the internalization of CPP-s can be different from the internalization of peptide-protein complexes, and the latter is dependent on the character of the cargoes and the peptide used. Their internalization is, depending the peptide, mediated by cholesterol-rich areas of plasma membrane, actin filaments and heparane sulfate proteoglycans. The translocation of CPP-cargo constructs into cells probably takes place by several mechanisms acting in parallel, including different types of endocytosis and penetration, and blocking of one specific pathway is compensated by the induction of others.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Artalejo, C. R., Elhamdani, A. and Palfrey, H. C. (2002). "Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 6358-6363
- Astriab-Fisher, A., Sergueev, D. S., Fisher, M., Shaw, B. R. and Juliano, R. L. (2000). "Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide- oligonucleotide conjugates." *Biochem Pharmacol* **60**(1): 83-90
- Barany-Wallje, E., Andersson, A., Graslund, A. and Maler, L. (2004). "NMR solution structure and position of transportan in neutral phospholipid bicelles." *FEBS Lett* **567**(2-3): 265-269
- Belting, M. (2003). "Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier." *Trends Biochem Sci* **28**(3): 145-151
- Christiaens, B., Grooten, J., Reusens, M., Joliot, A., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Prochiantz, A. and Rosseneu, M. (2004). "Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides." *Eur J Biochem* **271**(6): 1187-1197
- Conner, S. D. and Schmid, S. L. (2003). "Regulated portals of entry into the cell." *Nature* **422**(6927): 37-44.
- Dathe, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O. and Bienert, M. (1996). "Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes." *Biochemistry* **35**(38): 12612-12622.
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1994). "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes." *J. Biol. Chem.* **269**(14): 10444-10450
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. and 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., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1998). "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery." *Trends. Cell Biol.* **8**(2): 84-87
- Deshayes, S., Gerbal-Chaloin, S., Morris, M. C., Aldrian-Herrada, G., Charnet, P., Divita, G. and Heitz, F. (2004). "On the mechanism of non-endosomal peptide-mediated cellular delivery of nucleic acids." *Biochim Biophys Acta* **1667**(2): 141-147

- Deshayes, S., Heitz, A., Morris, M. C., Charnet, P., Divita, G. and Heitz, F. (2004). "Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis." *Biochemistry* **43**(6): 1449-1457
- DiDonato, D. and Brasaemle, D. L. (2003). "Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy." *J Histochem Cytochem* **51**(6): 773-780
- Dietz, G. P. and Bahr, M. (2004). "Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach." *Mol Cell Neurosci* **27**(2): 85-131
- Dom, J., Shaw-Jackson, C., Matis, C., Bouffieux, O., Picard, J., Prochiantz, A., Mingeot-Leclercq, M.-P., Brasseur, R. and Rezsöházy, R. (2003). "Cellular uptake of Antennapedia Penetratin peptides is a two-step process in which phase transfer precedes a tryptophan-dependent translocation." *Nucl Acids Res* **31**(2): 556-561
- Eguchi, A., Akuta, T., Okuyama, H., Senda, T., Yokoi, H., Inokuchi, H., Fujita, S., Hayakawa, T., Takeda, K., Hasegawa, M. and Nakanishi, M. (2001). "Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells." *J. Biol. Chem.* **276**(28): 26204-26210.
- Elliott, G. and O'Hare, P. (1997). "Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein." *Cell* **88**(2): 223-233
- Elmqvist, A., Lindgren, M., Bartfai, T. and Langel, Ü. (2001). "VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions." *Exp. Cell. Res.* **269**(2): 237-244.
- Elmqvist, A. and Langel, Ü. (2003). "In vitro uptake and stability study of pVEC and its all-D analog." *Biol Chem* **384**(3): 387-393
- Eriksson, M., Nielsen, P. E. and Good, L. (2001). "Cell permeabilization and uptake of antisense peptide-PNA into Escherichia coli." *J Biol Chem* **5**(5)
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B. and Barsoum, J. (1994). "Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(2): 664-668
- Ferrari, A., Pellegrini, V., Arcangeli, C., Fittipaldi, A., Giacca, M. and Beltram, F. (2003). "Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time." *Mol. Ther.* **8**(2): 284-294
- Fischer, R., Waizenegger, T., Kohler, K. and 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.
- Fischer, R., Köhler, K., Fotin-Mleczek, M. and Brock, R. (2004). "A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides." *J. Biol. Chem.* **279**(13): 12625-12635

Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppe, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F. and Giacca, M. (2003). "Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins." *J. Biol. Chem.* **278**(36): 34141-34149

Frankel, A. D. and Pabo, C. O. (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." *Cell* **55**(6): 1189-1193.

Friedler, A., Friedler, D., Luedtke, N. W., Tor, Y., Loyter, A. and Gilon, C. (2000). "Development of a functional backbone cyclic mimetic of the HIV-1 Tat arginine-rich motif." *J Biol Chem* **275**(31): 23783-23789.

Fujimoto, L. M., Roth, R., Heuser, J. E. and Schmid, S. L. (2000). "Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells." *Traffic* **1**(2): 161-171

Futaki, S., Nakase, I., Suzuki, T., Youjun, Z. and Sugiura, Y. (2002). "Translocation of branched-chain arginine peptides through cell membranes: flexibility in the spatial disposition of positive charges in membrane-permeable peptides." *Biochemistry* **41**(25): 7925-7930

Gazit, E., Lee, W. J., Brey, P. T. and Shai, Y. (1994). "Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study." *Biochemistry* **33**(35): 10681-10692

Gratton, J. P., Yu, J., Griffith, J. W., Babbitt, R. W., Scotland, R. S., Hickey, R., Giordano, F. J. and Sessa, W. C. (2003). "Cell-permeable peptides improve cellular uptake and therapeutic gene delivery of replication-deficient viruses in cells and in vivo." *Nat Med* **9**(3): 357-362

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

Gruenberg, J. (2001). "The endocytic pathway: a mosaic of domains." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**(10): 721-730.

Hinshaw, J. E. (2000). "Dynamin and its role in membrane fission." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**(483-519)

Hällbrink, M., Florén, A., Elmquist, A., Pooga, M., Bartfai, T. and Langel, Ü. (2001). "Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides." *Biochim. Biophys. Acta* **1515**(2): 101-109.

Joliot, A., Trembleau, A., Raposo, G., Calvet, S., Volovitch, M. and Prochiantz, A. (1997). "Association of Engrailed homeoproteins with vesicles presenting caveolae-like properties." *Development* **124**(10): 1865-1875

Kim, K. J. and Malik, A. B. (2003). "Protein transport across the lung epithelial barrier." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**(2): L247-259

Kruth, H. S., Jones, N. L., Huang, W., Zhao, B., Ishii, I., Chang, J., Combs, C. A., Malide, D. and Zhang, W. Y. (2005). "Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein." *J Biol Chem* **280**(3): 2352-2360

Lamaze, C. and Schmid, S. L. (1995). "The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways." *Curr Opin Cell Biol* **7**(4): 573-580.

Lamaze, C., Dujancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A. and Dautry-Varsat, A. (2001). "Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway." *Mol Cell* **7**(3): 661-671

Langel, Ü., Pooga, M., Kairane, C., Zilmer, M. and Bartfai, T. (1996). "A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na⁺,K⁺-ATPase and reverses its inhibition by ouabain." *Regul Pept* **62**(1): 47-52

Lee, H. J. and Pardridge, W. M. (2001). "Pharmacokinetics and delivery of tat and tat-protein conjugates to tissues in vivo." *Bioconjug Chem* **12**(6): 995-999

Leifert, J. A. and Whitton, J. L. (2003). "Translocatory proteins" and "protein transduction domains": a critical analysis of their biological effects and the underlying mechanisms." *Mol Ther* **8**(1): 13-20

Lemmon, M. A., Flanagan, J. M., Hunt, J. F., Adair, B. D., Bormann, B. J., Dempsey, C. E. and Engelman, D. M. (1992). "Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices." *J Biol Chem* **267**(11): 7683-7689

Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C. H., Tang, X. W., Cory, D., Scadden, D. T. and Weissleder, R. (2000). "Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells." *Nat Biotechnol* **18**(4): 410-414.

Lindgren, M., Gallet, X., Soomets, U., Hällbrink, M., Brakenhielm, E., Pooga, M., Brasseur, R. and Langel, Ü. (2000). "Translocation properties of novel cell penetrating transportan and penetratin analogues [In Process Citation]." *Bioconjug Chem* **11**(5): 619-626

Liu, Y., Jones, M., Hingtgen, C. M., Bu, G., Laribee, N., Tanzi, R. E., Moir, R. D., Nath, A. and He, J. J. (2000). "Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands." *Nat Med* **6**(12): 1380-1387

Lundberg, P. and Langel, Ü. (2003). "A brief introduction to cell-penetrating peptides." *J Mol Recognit* **16**(5): 227-233

Mann, D. A. and Frankel, A. D. (1991). "Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein." *EMBO J* **10**(7): 1733-1739

- Martin, S. and Parton, R. G. (2005). "Caveolin, cholesterol, and lipid bodies." *Semin Cell Dev Biol* **16**(2): 163-174
- Maxfield, F. R. and McGraw, T. E. (2004). "Endocytic recycling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(2): 121-132
- Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G. and Rothbard, J. B. (2000). "Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers." *J. Pept. Res.* **56**(5): 318-325.
- Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. and Divita, G. (2001). "A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells." *Nat Biotechnol* **19**(12): 1173-1176.
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N. and Maxfield, F. R. (1997). "Endocytosis." *Physiol Rev* **77**(3): 759-803.
- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V. and Simons, K. (1995). "VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22): 10339-10343
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A. and Dowdy, S. F. (1998). "Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration." *Nat Med* **4**(12): 1449-1452
- Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J. C., Jones, A. T., Sugiura, Y. and Futaki, S. (2004). "Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement." *Mol Ther* **10**(6): 1011-1022
- Nekhotiaeva, N., Elmquist, A., Rajarao, G. K., Hällbrink, M., Langel, U. and Good, L. (2004). "Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides." *Faseb J* **18**(2): 394-396
- Nichols, B. J. and Lippincott-Schwartz, J. (2001). "Endocytosis without clathrin coats." *Trends Cell Biol.* **11**(10): 406-412.
- Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., Melzig, M. and Bienert, M. (1998). "Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non- endocytically." *Biochim Biophys Acta* **1414**(1-2): 127-139
- Oehlke, J., Birth, P., Klauschenz, E., Wiesner, B., Beyermann, M., Oksche, A. and Bienert, M. (2002). "Cellular uptake of antisense oligonucleotides after complexing or conjugation with cell-penetrating model peptides." *Eur. J. Biochem.* **269**(16): 4025-4032.

- Oh, P., McIntosh, D. P. and Schnitzer, J. E. (1998). "Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium." *J Cell Biol* **141**(1): 101-114
- Orlandi, P. A. and Fishman, P. H. (1998). "Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains." *J Cell Biol* **141**(4): 905-915
- Padari, K. (2001). *Magistritöö*
- Parton, R. G. and Richards, A. A. (2003). "Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms." *Traffic* **4**(11): 724-738
- Perez, F., Joliot, A., Bloch-Gallego, E., Zahraoui, A., Triller, A. and Prochiantz, A. (1992). "Antennapedia homeobox as a signal for the cellular internalization and nuclear addressing of a small exogenous peptide." *J Cell Sci* **102** (Pt 4)(717-722
- Pokorny, A., Birkbeck, T. H. and Almeida, P. F. (2002). "Mechanism and kinetics of delta-lysine interaction with phospholipid vesicles." *Biochemistry* **41**(36): 11044-11056.
- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M. and Langel, Ü. (1998a). "Cell penetration by transportan." *FASEB J.* **12**(1): 67-77
- Pooga, M., Soomets, U., Hällbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., Kahl, U., Hao, J. X., Xu, X. J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Bartfai, T. and Langel, Ü. (1998b). "Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo." *Nat. Biotechnol.* **16**(9): 857-861
- Pooga, M., Kut, C., Kihlmark, M., Hällbrink, M., Fernaeus, S., Raid, R., Land, T., Hallberg, E., Bartfai, T. and Langel, Ü. (2001). "Cellular translocation of proteins by transportan." *FASEB J.* **15**(6): 1451-1453
- Potocky, T. B., Menon, A. K. and Gellman, S. H. (2003). "Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells." *J. Biol. Chem.* **278**(50): 50188-50194
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. and Shai, Y. (1992). "Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes." *Biochemistry* **31**(49): 12416-12423
- Razani, B., Woodman, S. E. and Lisanti, M. P. (2002). "Caveolae: from cell biology to animal physiology." *Pharmacol Rev* **54**(3): 431-467
- Richard, J. P., Melikov, K., Vivés, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V. and Lebleu, B. (2003). "Cell penetrating peptides: a reevaluation of the mechanism of cellular uptake." *J. Biol. Chem.* **278**(585-590

Richard, J. P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B. and Chernomordik, L. V. (2005). "Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors." *J Biol Chem* **280**(15): 15300-15306

Rothbard, J. B., Garlington, S., Lin, Q., Kirschberg, T., Kreider, E., McGrane, P. L., Wender, P. A. and Khavari, P. A. (2000). "Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation." *Nat Med* **6**(11): 1253-1257.

Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R. and Anderson, R. G. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." *Cell* **68**(4): 673-682.

Säälik, P., Elmquist, A., Hansen, M., Padari, K., Saar, K., Viht, K., Langel, U. and Pooga, M. (2004). "Protein cargo delivery properties of cell-penetrating peptides. A comparative study." *Bioconjug Chem* **15**(6): 1246-1253

Scheller, A., Oehlke, J., Wiesner, B., Dathe, M., Krause, E., Beyermann, M., Melzig, M. and Bienert, M. (1999). "Structural requirements for cellular uptake of alpha-helical amphipathic peptides." *J. Pept. Sci.* **5**(4): 185-194

Scheller, A., Wiesner, B., Melzig, M., Bienert, M. and Oehlke, J. (2000). "Evidence for an amphipathicity independent cellular uptake of amphipathic cell-penetrating peptides." *Eur J Biochem* **267**(19): 6043-6050.

Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. and Dowdy, S. F. (1999). "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse." *Science* **285**(5433): 1569-1572

Silhol, M., Tyagi, M., Giacca, M., Lebleu, B. and Vivés, E. (2002). "Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat- derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat." *Eur. J. Biochem.* **269**(2): 494-501.

Singh, R. D., Puri, V., Valiyaveetil, J. T., Marks, D. L., Bittman, R. and Pagano, R. E. (2003). "Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids." *Mol Biol Cell* **14**(8): 3254-3265

Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R. and Langel, Ü. (2000). "Deletion analogues of transportan." *Biochim. Biophys. Acta* **1467**(1): 165-176

Stetsenko, D. A. and Gait, M. J. (2005). "Chemical methods for peptide-oligonucleotide conjugate synthesis." *Methods Mol Biol* **288**(205-224

Sun, P., Yamamoto, H., Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T. and Endo, T. (2003). "Small GTPase Rac/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation." *J Biol Chem* **278**(6): 4063-4071

- Ziegler, A., Nervi, P., Durrenberger, M. and Seelig, J. (2005). "The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence." *Biochemistry* **44**(1): 138-148
- Takei, Y., Inoue, K., Ando, K., Ihara, T., Katafuchi, T., Kashiwagi, M. and Hirose, S. (2001). "Enhanced expression and release of C-type natriuretic peptide in freshwater eels." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**(6): R1727-1735.
- Thorén, P. E., Persson, D., Isakson, P., Goksör, M., Önfelt, A. and Nordén, B. (2003). "Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**(1): 100-107.
- Torchilin, V. P., Rammohan, R., Weissig, V. and Levchenko, T. S. (2001). "TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15): 8786-8791.
- Torgersen, M. L., Skretting, G., van Deurs, B. and Sandvig, K. (2001). "Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms." *J. Cell. Sci.* **114**(Pt 20): 3737-3747.
- Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M. and Giacca, M. (2001). "Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans." *J Biol Chem* **276**(5): 3254-3261. Epub 2000 Oct 3256.
- Uemura, S., Fathman, C. G., Rothbard, J. B. and Cooke, J. P. (2000). "Rapid and efficient vascular transport of arginine polymers inhibits myointimal hyperplasia." *Circulation* **102**(21): 2629-2635.
- Uri, A., Raidaru, G., Subbi, J., Padari, K. and Pooga, M. (2002). "Identification of the ability of highly charged nanomolar inhibitors of protein kinases to cross plasma membranes and carry a protein into cells." *Bioorg Med Chem Lett* **12**(16): 2117-2120.
- Wadia, J. S., Stan, R. V. and 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
- Vajanaphanich, M., Schultz, C., Rudolf, M. T., Wasserman, M., Enyedi, P., Craxton, A., Shears, S. B., Tsien, R. Y., Barrett, K. E. and Traynor-Kaplan, A. (1994). "Long-term uncoupling of chloride secretion from intracellular calcium levels by Ins(3,4,5,6)P4." *Nature* **371**(6499): 711-714
- van Deurs, B., Petersen, O. W., Olsnes, S. and Sandvig, K. (1989). "The ways of endocytosis." *Int Rev Cytol* **117**(131-177
- Wender, P. A., Mitchell, D. J., Pattabiraman, K., Pelkey, E. T., Steinman, L. and Rothbard, J. B. (2000). "The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(24): 13003-13008.

Vivés, E., Brodin, P. and 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

Tänuõnad

Täna oma juhendajat Margust kannatlikkuse, vastupidamise ja vajalike õpetussõnade eest.
Suur tänu ka laborikaaslastele- Pillele, Kärdile, Helinile, Annelyle ja kõigile teistele
rakubioloogia õppetooli inimestele ning oma perekonnale toetuse ja abi eest.