

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Tehnoloogiainstituut

Krista Freimann

**Rakku siseneva peptiidi NF51 transfekteeritud
oligonukleotiidi intratsellulaarne uurimine
Magistritöö (30 EAP)**

Juhendajad: Prof. Ülo Langel
Piret Arukuusk, MSc

Kaitsmisele lubatud

Juhendaja

allkiri, kuupäev

Tartu 2013

Sisukord

1	Sissejuhatus.....	4
2	Ülevaade kirjanduse põhjal.....	5
2.1	Rakku sisenevad peptiidid	5
2.1.1	Rakku sisenev peptiid transportan ja selle analoogid	6
2.1.2	Rakku sisenevate peptiidide sisenemismehhanismid	7
2.2	Antisense oligonukleotiidid	11
2.3	Transfekteeritud ühendite intratsellulaarne uurimine.....	12
3	Materjal ja meetodika	15
3.1	Eesmärgid	15
3.2	Peptiidide süntees.....	15
3.2.1	Peptiidide sünteesi meetod	15
3.2.2	Peptiidide puhastamine pöördfaasi-vedelikkromatograafia	16
3.2.3	Sünteesitud peptiidide masside määramine MALDI-TOF mass-spektromeetriga	16
3.3	Katsed rakkudega.....	17
3.3.1	Rakkude kultiveerimine	17
3.3.2	SCO transportimine HeLa plus705 rakkudesse NF51 peptiididga.....	17
3.3.3	Vesiikulite fraksioneerimine	19
4	Tulemused.....	20
4.1	NF51 süntees.....	20
4.2	NF51 peptiid ja SCO akumuleeruvad endosoomidesse	20
4.3	TP10 analoogide PF14 ja NF51 oligonukleotiidiga kompleksidel on hilisem bioaktiivsus võrreldes Lipofectamine 2000-ga.....	23
4.4	Subtsellulaarne fraksioneerimine viitab NF51 transfekteeritud Cy5-SCO kogunemisele hilistesse endolüsoosoomidesse	25
5	Arutelu	28
6	Kokkuvõte.....	32
7	Intracellular fate of splice correcting oligonucleotide transfected with cell penetrating peptide Nickfect 51 ...	33
8	Kasutatud kirjanduse loetelu	35
9	Lisad	41
9.1	Lisa 1	41
9.2	Lisa 2	42

Lühendid

ACN	atseetonitriil
DCM	diklorometaan
DIEA	diisopropüületüülamiin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium sööde
DMF	dimetüülformamiid
EDT	1,2-etaanditiool
FBS	veise loote seerum
FM	seerumiga sööde
Fmoc	9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüül rühm
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
MBHA	4-metüülbenshüdrüülamiin
MR	molaarsussuhe
Nickfect 51 (NF51)	rakku siseneva peptiidi transportan 10 analoog
PBS	fosfaat puhvriga sooladelahus
Pepfect 14 (PF14)	rakku siseneva peptiidi transportan 10 analoog
Pepfect 15 (PF15)	rakku siseneva peptiidi transportan 10 analoog
Pepfect 6 (PF6)	rakku siseneva peptiidi transportan 10 analoog
RP-HPLC	pöördfaasi- vedelikkromatograafia
RSP	rakku sisenevad peptiidid
SCO	splaissingut parandav oligonukleotiid
SFM	seerumita sööde
TFA	trifluoroatseethape
TIS	triisopropüülsilaan
TP10	rakku sisenev peptiid transportan 10

1 Sissejuhatus

Geeniteraapia võimaldab parandada mitmeid geneetilisi defekte. Transfekteerides rakke terapeutiliste nukleiinhapetega saab reguleerida tsellulaarseid protsesse ja ravida mitmeid haigusi nagu näiteks tsüstiline fibroos, Duchenne'i lihasdüstroofia, hemofiilia, pahaloomulised kasvajaad jne. Traditsioonilise geeniteraapia eesmärgiks oli viia rakkudesse valku kodeeriv DNA mis modifitseeriks või asendaks defektseid geene. Tänapäevaks on arendatud palju nukleiinhapepõhiseid terapeutilisi ühendeid ning geeniteraapia ei ole enam piiratud üksnes DNA kasutamisega. Geeniteraapiaks võib kasutada ka siRNA, antisense oligonukleotiide või miRNAd mis mõjutavad geeniekspresiooni reguleerides post-transkriptsiooni või translatsiooni. Efektiivseks geeniteraapiaks peavad nukleiinhaped jõudma sihtmärk rakudeni, neisse sisenema ning liikuma bioaktiivsuse avaldamiseks vastavasse organelli. Mitmed ekstratsellulaarsed ja intratsellulaarsed barjäärid takistavad kõrgmolekulaarsete medikamentide kasutamist (Yu et al 2009, Wang et al 2013, Kole et al 2012).

Nukleiinhapete transfektsiooni efektiivsuse suurendamiseks kasutatakse transportvektoreid. Üheks võimaluseks on kasutada rakku sisenevaid peptiide (RSP), mida viimasel ajal on uuritud ravimivektorina nende suhteliselt madala tsütotoksilisuse pärast. RSP-d on lühikesed amfipaatsed ja/või katioonsed peptiidid, mis on võimelised transportima rakku nii *in vitro* kui ka *in vivo* erineva suurusega molekule (Lindgren & Langel 2011). Paljud eelnevad uuringud RSP-dega on näidanud, et peptiidid sisenevad rakkudesse peamiselt endotsütoosiga. Rakku sisenevate peptiidide kasutamist piirab eelkõige suhteliselt madal transfektsiooniefektiivsus. Kuna RSP-d sisenevad rakkudesse endotsütoosiga, siis on oluliseks probleemiks transfekteeritud ühendite endosoomidesse akumulatsioon ning degradatsioon lüsoosoomides (Khalil et al 2006, Xiang et al 2012). Ratsionaalseks transportvektorite disainimiseks ja sünteesiks on oluline teada ühendite intratsellulaarset saatust.

Selle töö eesmärkideks on:

1. sünteesida Fmoc tahke faasi peptiidisünteesi meetodiga rakku sisenev peptiid Nickfect 51 (NF51),
2. uurida rakku siseneva peptiidi NF51 transfekteeritud splaissingut korrekteeriva oligonukleotiidi transfektsiooni efektiivsust ja bioloogilist aktiivsust *in vitro*,

3. hinnata kas ja kui palju NF51 transfekteeritud kargost akumuleerub vesiikulitesse.

2 Ülevaade kirjanduse põhjal

2.1 Rakku sisenevad peptiidid

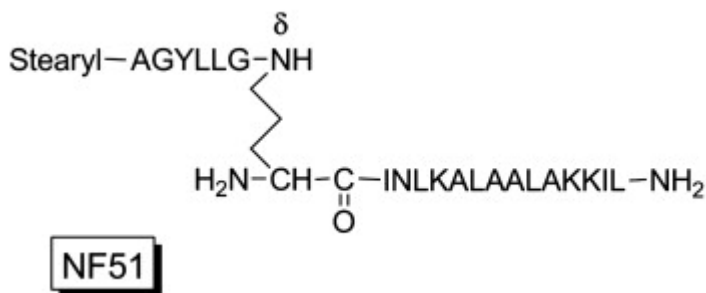
Rakku sisenevad peptiidid (RSP) on katioonsed või amfipaatsed kuni 30 aminohappe - jäägipikkused peptiidid. RSP-d on võimelised transportima rakku mitmesuguseid bioaktiivseid ühendeid nagu oligonukleotiidide, peptiide, proteiine, nanopartikleid, liposoomi jne. Esimene avastatud RSP oli Tat, mis eraldati inimese immuundefitsiitsust põhjustavast viirusest. Paar aastat hiljem leiti, et äädikakärbe (*Drosophila melanogaster*) 60 aminohappeline antennapedia transkriptsiooni faktori homeodomään on võimeline penetreerima rakku, mis viis 16 aminohappelise RSP pentraatiini avastamiseni. Katioonsed RSP koosnevad peamiselt arginiini- ja lüsiinijääkidest, amfipaatsed RSP sisaldavad katioonseid lüsiini ning nii hüdrofiilseid kui ka hüdrofoobseid aminohappeid, näiteks transportan (TP), mis on saadud neuropeptiidi galaniini liitmisel vapsikust saadud toksiini mastoparaaniga (Soomets et al 2000, Lindgren & Langel 2011). Katioonsetele peptiididele on oluline arginiini guanidiin rühm, mis võib interakteeruda membraani anioonsete gruppidega ning näiteks lüsiini homopolümeerid ei sisene rakku nii efektiivselt. Eraldatud hüdrofiilsed ja hüdrofoobsed regioonid on amfipaatsetele RSP-ele olulised α - konformatsiooni moodustamiseks neutraalsel pH-l, mida peetakse oluliseks membraani destabiliseerimiseks ja rakku sisenemiseks (Patel et al 2007).

Rakku sisenevaid peptiide on võimalik jaotada nende päritolu järgi. Rakku sisenevaks peptiidiks võib-olla valgust saadud järjestus. PSP-de võidakse ka konstrueerida, saades nii nn disainitud RSP-d, näiteks polüarginiinid. Veel eristatakse kimäärseid peptiide, mis erinevalt disainitud peptiididest esinevad osaliselt ka looduses, näiteks TP ja selle lühendatud variant transportan 10 (TP10) ja TP10 analoogid Nickfectid ja Pepfectid (Oskolkov et al 2011, Ezzat et al 2011). Erinevatest klassidest RSP-d on amfipaatsed ja/või positiivselt laetud ning suudavad erinevaid molekule rakku viia, kuid samas ei oma mingeid konkreetseid aminohappelisi järjestusi sisenemiseks. Enamikel rakku tungivatel peptiididel on ainult üks negatiivne laeng C-terminuses ning isegi see võib puududa kui C-terminaalne lõpp on amideeritud. Kuid ka peptiidid, millel on

negatiivseid laenguid võivad käituda rakku sisenevate peptiididena, näiteks nagu RSP VT5, millel on lisaks viiele positiivsele laengule ka neli negatiivset laengut (Zorko & Langel 2005).

2.1.1 Rakku sisenev peptiid transportan ja selle analoogid

Transportan (TP) on 27 aminohappe pikkune amfipaatne rakku sisenev peptiid, mis sisaldab 12 aminohapet neuropeptiidi galaniini N-terminusest ning lüsiiniga seotud mastoparaani, mis on saadud vapsiku (*Vespula lewisii*) toksiinist (Pooga et al 1998). Kuna TP sisaldab bioaktiivset neuropeptiidi galaniini, siis tuntakse see peptiid ära galaniini retseptorite poolt. Lisaks inhibeerib TP tõenäoliselt mastoparaanist pärit osaga GTPaaside aktiivsust. Galaniini retseptorite affiinsuse ja G-proteiinide interaktsioonide vähendamiseks ning rakku sisenemise parandamiseks lühendati N-terminusest transportan kuue aminohappe võrra rakku sisenevaks peptiidiks transportan 10 (Soomets et al 2000). Eelnevad uuringud on näidanud, et rasvhapete lisamine suurendab rakku sisenevate peptiidide bioaktiivsust, eriti amfipaatsematel RSP-del (Lehto et al 2011). TP10 hüdrofoobsemaks muutmine rasvhapete lisamisel transfekteerib paremini rakke (Langel et al 2010, Mäe et al 2009). Lisades stearüülhappe TP10 järjestusele konstrueeriti Pepfect 3, Pepfect 4 ja Pepfect 6 (Andaloussi et al 2011, EL Andaloussi et al 2011). Endosoomidest vabanemise suurendamiseks seoti kovalentselt stearüleeritud TP10 ja Pepfect 14 (PF14) järjestustele endosomolüütiline trifluorometüülkinoliin saades nii vastavalt peptiidid Pepfect 6 ja Pepfect 15 (EL Andaloussi et al 2011, Lindberg et al 2013). PF14 on stearüülitud TP10 analoog millel on lüsiin ja isoleutsiin asendatud ornitiini ning leutsiiniga (Ezzat et al 2011). Nickfect 51 (NF51) peptiid konstrueeriti stearüülitud TP10 järjestusest muutes peptiidi hargnevaks ning asendades lüsiini ornitiiniga. Modifikatsioonid parandavad peptiidi transfektsiooni aktiivsust aidates tõenäoliselt paremini kondenseerida DNA-d ja vähendades seerumi proteaasidega toimuvat degradatsiooni (Arukuusk et al 2013).



Joonis 1. Raku siseneva peptiidi Nickfect 51 (NF51) struktuur. (Arukuusk jt., 2013)

Tabel 1. Rakku sisenev peptiid Transportan ja selle analoogid. Viited peptiididele on toodud tekstis.

Galaniin	GWTLNSAGYLLGPHAVGNHRFSFSDKNGLTS
Mastoparaan	INLKALAALAKKIL
Transportan (TP)	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
Transportan 10 (TP10)	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
Pepfect 3	stearüül-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
Pepfect 4	AGYLLGK(εNH-stearüül)INLKALAALAKKIL-NH ₂
Pepfect 6	stearüül-AGYLLGK(εNH-K(2QN)K(2QN)INLKALAALAKKIL-NH ₂
Pepfect 14	stearüül-AGYLLGKLLLOOLAAAALLOOLL-NH ₂
Pepfect 15	stearüül-AGYLLGK(εNH-K(2QN)K(2QN)LLLOOLAAAALLOOLL-NH ₂
Nickfect 51	(δNH-GLLYGA-stearüül)OINLKALAALAKKIL-NH₂

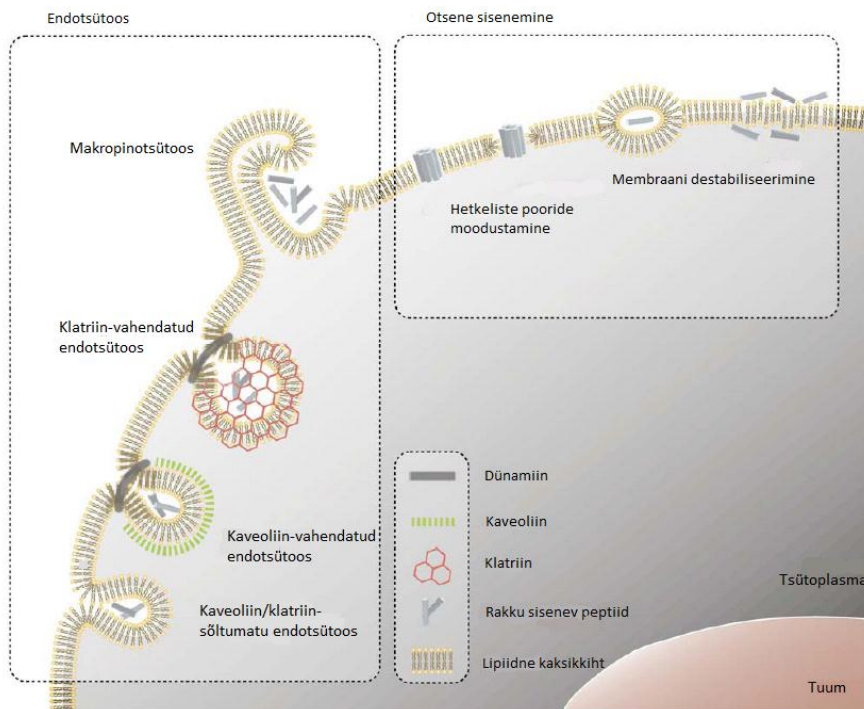
QN- trifluorometüülkinoliin, O-ornitiin

2.1.2 Rakku sisenevate peptiidide sisenemismehhanismid

Makromolekulid võivad siseneda rakku erinevaid teid pidi ning nende ühendite edasine saatus sõltub sageli sisenemismehhanismist. Seega on RSP-de arendamiseks ja efektiivsuse suurendamiseks oluline teada, mis moodi RSP-de rakku võetakse (Khalil et al 2006). RSP kasutavad transpordiks peamiselt endotsütoosi (Richard et al 2003), kuid samuti võivad nad siseneda rakku tungides otse läbi membraani (joonis 2) (Lindgren & Langel 2011, Trabulo et al 2010). Näidatud on ka, et RSP-d kasutavad rakku sisenemiseks mitmeid mehhanisme samaaegselt (Lindgren & Langel 2011, Patel et al 2007). Sisenemismehhanism ei ole siiani päris selge ning see sõltub nii temperatuurist, rakkudest, transporditavast molekulist, RSP-de

omadustest, kontsentratsioonist jne (Lindgren & Langel 2011, Lundin et al 2008, Patel et al 2007, Stewart et al 2008).

Endotsütoos on reguleeritud energiast-sõltuv protsess, mille abil sisenevad plasmamembraani sissesopistumisel paljud makromolekulid ning see on oluline raku normaalseks ainevahetuseks, arenguks, immunreaktsioonideks, rakkudevaheliseks kommunikatsiooniks, signaali edastamiseks jne (Conner & Schmid 2003). Endotsütoosil võib eristada lahustunud ainete ja vedeliku sissevõttu ehk pinotsütoosi ning suuremate ühendite puhul, nagu näiteks mikroorganismid või surnud rakud, kasutatavat fagotsüteerimist. Fagotsütoosi kasutavad spetsialiseerunud rakud, imetajatel näiteks makrofaagid ja neutrofiilid ning selle käigus moodustuvad suured, tavaliselt üle 250 nm diameetriga vesiikulid. Enamik eukarüootseid rakke kasutavad pidevalt pinotsütoosi lahustunud ainete kättesaamiseks, moodustuvad vesiikulid ehk pinosoomid, mis on üldiselt väiksemad kui fagosoomid, umbes 100 nm läbimõõduga (Alberts et al. 2008, Watson et al. 2004). Pinotsütoosi käigus võib tekkida erinevaid vesiikuleid ning kirjeldatud on vähemalt neli erinevat sisenemisteed: kaveoliin-vahendatud, klatriin-sõltuv, klatriin- ja kaveoliin-sõltumatu endotsütoos ning makropinotsütoos (Alberts et al. 2008, Watson et al. 2004, Patel et al 2007). Kõikide nende endotsütoosi liikide kasutamist on näidatud RSP-de sisenemisel rakudesse (Patel et al 2007).



Joonis 2. RSP-de sisenemine rakku (Tarbulo jt., 2010)

Pinotsütoosil tekkinud erinevad pinosoomid on erineva suurusega ning võivad oma suurusega määrata kui suured ühendid nende teel sisenevad. Samuti on nende intratsellulaarne töötlus erinev. Klatriiniga kaetud vesiikulid on umbes 100-150 nm diameetriga ning klatriin-vahendatud endotsütoosil võivad need varajased endosoomid liituda üksteisega või teiste endosoomidega ning moodutada hiliseid endosoomi, mis edasi liituvad lüsoosoomidega. Samas võib osa ühenditest väljuda eksotsütoosiga (Conner & Schmid 2003, Khalil et al 2006, Patel et al 2007). Kaveoliin-sõltuva endotsütoosi käigus tekivad väikesed 50-80 nm läbimõõduga hüdrofoobsed kolesterooli- ja glükoosfingolipiidirikad membraani mikrodomäänidega vesiikulid. Kaveoolides ei toimu olulist hapestumist ning enamus vesiikulitest transporditakse otse Golgi kompleksi ja/või endoplasmaatilisse retiikulumi (Conner & Schmid 2003, Khalil et al 2006, Patel et al 2007).

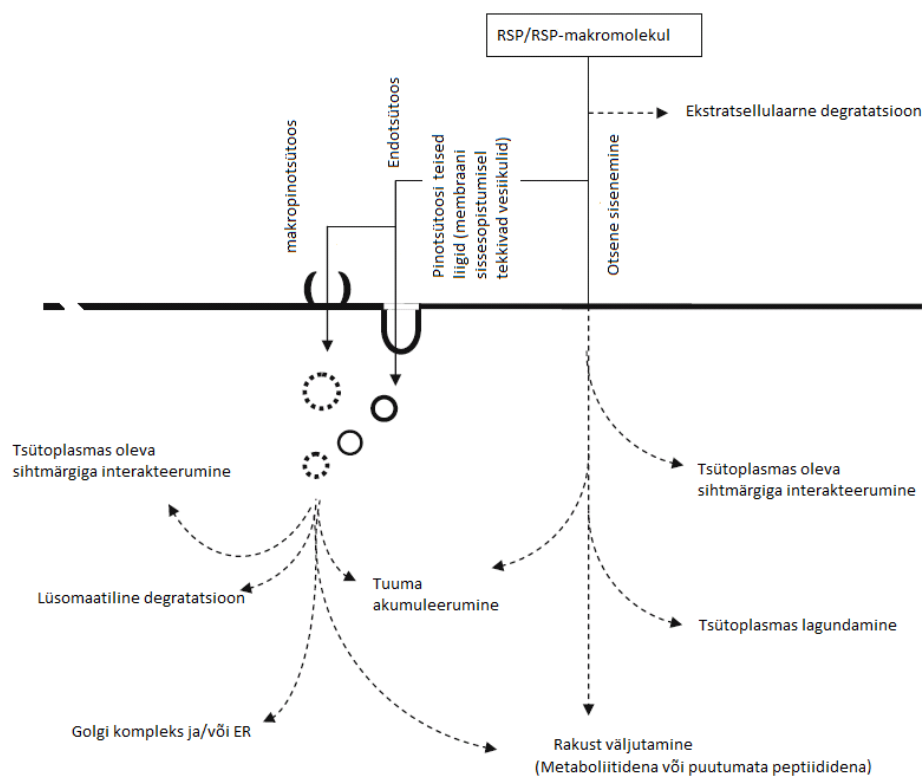
Teatakse ka teisi klatriini- ja kaveoliini-sõltumatuid RSP-de sisenemismehhanisme, kuid neid on vähem uuritud ning nende vesiikulite pinnavalkudest on vähem teada. Klatriini- ja kaveoliini-sõltumatud sisenemismehhanismiga moodustunud vesiikulid on umbes 90 nm läbimõõduga. Klatriini- ja kaveoliini-sõltumatu sisenemise rada võiks olla perspektiivikas endotsütoosirada RSP-dega seotud makromolekulidele, kuna klatriin-sõltumatu endotsütoos on vähem mõjutatud lüsoomaatilise degraatsiooni poolt (Khalil et al 2006). Makropinotsütoos on aktiivist-sõltuv endotsütoosi vorm, mida kasutavad kõik rakud kas konstitutiivselt või indutseeritult stimulaatoritega, näiteks kasvuhormoonide abil. Filopoodid on dünaamilised aktiinirikkad membraani väljakasvud, mis vajuvad ning liituvad plasmamembraaniga, tekitades suured (1-5 µm) erineva kujuga makropinosoomid. Makropinotsütoosi protsessis võetakse väga suur hulk ekstratsellulaarset vedelikku, mille kaudu lahustunud peptiidid võivad vabalt siseneda raku. Makropinosoomi peetakse teistest endosoomidest labiilsemateks vesiikuliteks ning sõltuvalt rakkudest töödeldakse neid erinevalt - makrofaagides liituvad need endosoomid lüsoosoomidega, samas kui näiteks HeLa rakkudes nende pH küll langeb, kuid nad ei liitu lüsoosoomidega ning vesiikulite sisu eksotsüteeritakse rakust välja (Conner & Schmid 2003, Khalil et al 2006, Patel et al 2007). Selgitamaks RSP-de translokaliseerumist otse läbi membraani on pakutud erinevaid sisenemise viise. RSP-d võivad siseneda raku erinevat viisi tekitatud hetkeliste pooride moodustumise läbi. Pakutud on RSP-de sisenemist membraani destabiliseerimise abil, näiteks pööratud mitsellide mudelit, mille kohaselt moodustunud mitsellides püsivad peptiidid hüdrofiilses keskkonnas kuni nende interaktsioonid membraaniga destabiliseerivad mitselli ning vabanevad nii tsütoplasmasse. Lisaks on täheldatud, et ka interaktsioonid raku membraani

pinnaga võivad põhjustada fosfolipiidide ümberkorraldust ning hetkeks destabiliseerida nii plasmamembraani (Patel et al 2007, Trabulo et al 2010).

Rakku sisenenud peptiidide saatus sõltub sisenemismehhanismist (joonis 3). Pärast otsest membraani läbimist võib peptiid seonduda oma sihtmärgiga tsütoplasmas, liikuda tuuma või hoopis laguneda proteaaside toimetel, lisaks võib rakk ka sisenedud RSP eksotsüteerida.

Endotsütoosi teel sisenenud RSP võib sõltuvalt sisenemistüübist ja peptiidi omadustest laguneda lüsoosoomides, väljuda vesiikulitest tsütoplasmasse, siseneda tuuma, samuti võidakse peptiid viia organellidesse või väljutada rakkudest lagunenuult või puutumatuult väliskeskkonda (Patel et al 2007, Stewart et al 2008).

Lisaks sisenemise meetodile sõltub RSP-de rakusisene saatus peptiidi omadustest, konjugeeritud molekulist ja selle liitumise viisist ning kindlasti ka kasutatud rakkudest. Näiteks võidakse lüsiinirohkete järjestustega peptiidid lagundada proteasoomides, NLS järjestusega modifitseeritud peptiidid tuuma transportida ja makrofaagid (erinevalt teistest rakuliinidest) ka makropinosoomide sisu lagundada (Patel et al 2007, Stewart et al 2008).



Joonis 3. RSP-de sihtkoht raku (Patel jt., 2007).

Peamiseks probleemiks RSP-de kasutamisel peetakse peptiidide ning nende abil kantud molekulide vesiikulitesse kinnijäämist. Väike osa vesiikulitega sisenenud ühenditest võib pääseda tänu endosoomide purunemist indutseerivatele ühendite iseloomule või näiteks ebastabiilsete makropinosoomide lagunemisele. RSP-de omaduste parandamiseks on hakatud peptiide modifitseerima. Eelkõige püütakse parandada RSP vabanemist endosoomidest, kuid modifitseeritakse ka rakku ja organelli spetsiifiliste peptiide saamiseks, toksilisuse vähendamiseks, RSP-de stabiliseerimiseks tsütoplasmas jne (Lindgren & Langel 2011).

2.2 Antisense oligonukleotiidid

Oligonukleotiidid on keemiliselt modifitseeritud või modifitseerimata lühikesed molekulid mis on võimelised hübridiseeruma spetsiifiliste järjestustega paljude nukleiinhapete järjestuste seast. Oligonukleotiide peetakse potentsiaalseks ravimiks. Kuid nende kasutamine on raskendatud kuna need degradeeritakse kiiresti intratsellulaarsete endo- ja eksonukleaasidega. Antisense oligonukleotiidid (asON) on tüüpiliselt lühikesed, 15-20 alusepikused üheaheelalised oligonukleotiidid (ON), mis seonduvad komplementaarse mRNA järjestusega Watson-Cricki hübridisatsiooniga (Dias & Stein 2002). AsON-d võivad vaigistada geene posttranskriptsiooni järgselt steerilise takistamisega või kasutades RNAas H ensüümi mis degradeerib moodustunud DNA-RNA kompleksist RNA. Antisense ühendid mis moduleerivad RNA funktsiooni steeriliselt blokeerides raku ensüümide ligipääsu RNA-le ei vii sihtmärk RNA-d lagundamisele. Splaissingut korrigeerivad oligonukleotiidid (SCO) muudavad pre-mRNA splaissingut blokeerides splaissinguks olulisi järjestusi ja takistades pre-mRNA interaktsioone splaissingu faktoritega splaisosoomis. See võimaldab parandada defektset RNA-d ja/või genereerida uute soovitud omadustega valkude sünteesi mida ei ole võimalik saavutada teiste antisense mehhanismidega. Kuna RNA-d blokeerivad oligonukleotiidid ei vaja raku ensüümidega äratundmist, siis võib neid palju rohkem keemiliselt modifitseerida (Dias & Stein 2002, Kole et al 2012, Yu et al 2009).

Terapeutiliste oligonukleotiidide kasutamine on piiratud peamiselt oligonukleotiidide suutmatusest läbida hüdrofoobset raku membraani. See on ka põhjuseks miks Fomivirsen, tsütomegaloviiruse retinise ravimiseks kasutatav antiviraalne ühend ja Pegaptanib, aptameer mida

kasutatakse maakula (AMD-e ehk *age related macular degeneration*) raviks, on hetkel ainukesed lubatud oligonukleotiidsed medikamendid (McGinnis et al 2012). Suurendamiseks oligonukleotiidide bioaktiivsust on neid võimalik transfekteerida RSP-dega. ON seotakse RSP-dega kas kovalentselt või mittekovalentselt. Kovalentselt konjugeerides seotakse ON RSP-ga keemilise sidemega (näiteks ester-, amiid- või disulfiidside), enamasti disulfiid sidemega, mis vabastab kargo ning peptiidi redutseerivas (näiteks tsütoplasma) keskkonnas. Mittekovalentselt seotakse oligonukleotiid ja RSP-d elektrostaatiliste ja hüdrofoobsete interaktsioonidega (Margus et al 2012, Muratovska & Eccles 2004, Stetsenko & Gait 2000, Zorko & Langel 2005).

2.3 Transfekteeritud ühendite intratsellulaarne uurimine

Sisenemismehhanismide uurimine on oluline transportvektorite edasiarendamisel, sest kasutatav internalisatsioonirada determineerib transfekteeritud molekulide edasise saatuse rakus. Kuna ühendite internalisatsiooni rakkudesse mõjutavad paljud faaktorid (komplekside suurus, kuju, laeng, kasutatav rakuliin jne.) on sisenemisraja uurimine keeruline (Khalil et al 2006). Molekulide rakusisese saatuse uurimisel on kasutatud nii erinevate endotsütoosiradade inhibiitoreid, mikroskoopilist analüüsi kui ka subtsellulaarset fraktsioneerimist (Akita et al 2004, Khalil et al 2006, Watson et al 2005, Xiang et al 2012).

Inhibiitorite kasutamine on üheks efektiivsemaks meetodiks komplekside sisenemismehhanismide uurimisel. Samas ei blokeeri ükski inhibiitor ainult ühte endotsütoosi rada. Kõik inhibiitorid mõjutavad aktiini tsütoskeleti või alternatiivseid sisenemisradu ning nende toime sõltub ka kasutatavast rakuliinist. Üldiselt on endotsütoos energiast sõltuv protsess, seega on võimalik seda inhibeerida alandades temperatuuri või kasutades ATPaase inhibeerivaid ühendeid (nt naatriumasiid). Näiteks on blokeeritud kargo transporti ER-ist Golgi võrgustikku alandades temperatuuri 15 °C-ni, sarnaselt inhibeeritakse ekspordi trans Golgi võrgustikust 20 °C juures. Transporti varastest endosoomidest hilistesse inhibeeritakse inkubeerides rakke 16 °C, nii on võimalik suurendada kargo kontsentratsiooni varastes endosoomides. Enamik transpordimehhanisme blokeeritakse 4 °C juures (Khalil et al 2006, Watson et al 2005, Xiang et al 2012). Eristamiseks fagotsütoosi ja makropinotsütoosi klatriini ning kaveoliini vahendatud endotsütoosist, blokeeritakse makropinotsütoosi ja fagotsütoosi toimumist inhibeerides

fosfoinositidi metabolismi või Na^+/H^+ vahendamise tegelevat valku tsütoplasmas. Lisaks vähendatakse fagotsütoosi ning makropinotsütoosi toimumist F aktiini depolümiseerivate ühendite kasutamisega (näiteks tsütokalasiin D). Klatriini vahendatud endotsütoosiraja inhibeerimiseks kasutatakse hüpertoonilist sahharoosi lahust (0.4-0.5M), kaaliumi kontsentratsiooni vähendamist või inhibiitoreid kloorpromasiin (50–100 μM) ja monodansüülkadaveriini (MDC). Samas inhibeerivad need ühendid ka makropinotsütoosi. Kaveooli vahendatud sisenemisraja uurimisel kasutatakse kolesterooli seondavaid või vähendavaid ühendeid nagu filipin, nüstatiin, genestein ja kolesterooli oksüdaas. Lisaks kasutatakse endotsütoosi uurimisel endosoomide küpsemist ning liitumist lüsoosomideks takistavaid ühendeid nagu näiteks bafilomütsiin A. Kasutatakse ka klorokiini mis akumulereerub madala pH tõttu vesiikulitesse ja põhjustab osmootse efektiga nende paisumise ning lõhkemise (Khalil et al 2006, Watson et al 2005, Xiang et al 2012).

Komplekside intratsellulaarsel jälgimisel kasutatakse spetsiifilisi bioloogilisi värve või molekulaarseid markereid rakku transfekteeritud ühendite ning organellide samaaegselt jälgimiseks. Varajaste endosoomide markeerimiseks kasutatakse klassikaliselt transferiini retseptorit, sest see retseptor transporditakse transferiini sisenemisega moodustunud vesiikulitesse. Varajaste endosoomide märgiseks on ka varajase endosoomi antigeen 1 (EEA-1). Immunbloti analüüs näitab, et EEA-1 on 180kDa suurune valk mis lokaliseerub tsütosooli ja membraani fraktsioonides. Immunfluoresents mikroskoobiga on leitud, et EEA-1 kolokaliseerub nii Rab5 kui transferiiniga varajastes endosoomides. Lüsoosomi markeritena kasutatakse lüsoosomiga seotud tüüp 1 membraani glükoproteiine LAMP-1 ja LAMP-2-te. Teiseks enimkasutatavaks vesiikulite märgisteks on Rab perekonna valgud. Rab valgud on väikesed GTPaasid mis kontrollivad mitmesuguseid endotsütoosiraja etappe (Khalil et al 2006, Watson et al 2005, Xiang et al 2012). Kõige rohkem on uuritud Rab5 ja Rab7 valke. Rab5 on varajaste endosoomide marker ning reguleerib plasmamembraani invaginatsiooni ning endosoomide signaalirada, liikumist ja liitumist. Rab7 kasutatakse hiliste endosoomide ja lüsoosomide märgisena ning see valk kontrollib lüsoosomide agregatsiooni ja liitumist (Khalil et al 2006, Watson et al 2005, Xiang et al 2012).

Organellspetsiifilised värvid on head komplekside ja organellide kolokalisatsiooni detekteerimiseks. Näiteks kasutatakse *Cell Light* varajaste endosoomide ja *LysoTracker* ning *LysoSensor* nimelisi värve lüsoosomide spetsiifiliseks värvimiseks. Kombineerides värvimise

konfokaalmikroskoopia analüüsiga on võimalik jälgida samaaegselt märgistatud transfekteeritud ühendite ning intratsellulaarseid organelle. Samas suudab klassikaline konfokaalmikroskoopia tehnoloogia analüüsiks pakkuda nõrke pilte mis ei ole piisavalt raku sisenevate ühendite saatuse uurimiseks (Akita et al 2004, Khalil et al 2006, Manunta et al 2007, SEIB et al 2006, Watson et al 2005, Xiang et al 2012).

Peamiselt on kasutatud rakusiseste ühendite kvantifitseerimisel konfokaalmikroskoopiat ning subtsellulaarset fraktsioneerimist. Enamik uuringuid jälgimaks molekulide protsessingut raku on tänaseni tehtud konfokaalmikroskoobiga. Kuigi see meetod on kiire, piirab selle kasutamist mikroskoobi optiline resolutsioon ning kvantifitseerimist raskendavad statistilised probleemid, näiteks väheste rakkude samaaegne uurimisvõimalus. Kasutatud on ka 3-dimensionaalset integreeritud konfokaal tehnoloogiat (*confocal image-assisted three-dimensionally integrated quantification* (CIDIQ)), millega kvantifitseeriti tsütosoolis, endosoomides/lüsoosoomides ja tuumas leiduv DNA. Selleks analüüsiti järjestikus saadud z-seerias pilte (Akita et al 2004). Lisaks on kvantifitseeritud transfekteeritud plasmide kasutades qPCR-i ning *Southern blot*-i, kuid nii on ainult analüüsitud tuuma ja tsütoplasmisse viidud pDNA-d (Akita et al 2004, Harford & Bonifacino 2001, Khalil et al 2006, Watson et al 2005, Xiang et al 2012).

Subtsellulaarset fraktsioneerimist on kasutatud palju mitmesuguste eukarüootsete rakkude organelide uurimiseks. Kasutades erineva geomeetriaga rootoreid ja erinevat meediat on võimalik suuruse ja/või tiheduse järgi isoleerida osakesi. Võrreldes mikroskoopiaga on subtsellulaarne fraktsioneerimine tõmmahukas, nõuab palju kontrolleksperimente ning fraktsioonide edasist analüüsi tagamaks, et isoleeritud organelid oleksid õiged ja terved. Samas võimaldab see meetod analüüsida suures hulgas konsentreeritud spetsiifilisi organelle.

Fraktsioneerimisega on kvantifitseeritud erinevate vektorite abil sisseviidud farmakoloogilisi polümeere nii *in vivo* kui *in vitro*. Näiteks on analüüsitud oligolüsiini-RGD ja lutsiferaasi kodeeriva pDNA kompleksi *in vitro* (Colin et al. 2000) ja *in vitro* ning *in vivo* polümeeri polüamidoamiini intratsellulaarset saatust (Richardson et al. 2010). Alternatiivina tsentrifuugimisele on kasutatud geelfiltratsiooni. Geelfiltratsiooniga organelide lahutamist piirab poori suurus. Hetkel on analüüsitud nii <100 - 200 nm vesiikuleid, kuid samas ei pruugi enamike organelide pinna laengu tihedus olla analüüsimiseks piisavalt erinev (Colin et al 2000, Harford & Bonifacino 2001, Manunta et al 2007, Richardson et al 2010, Wagner et al 1992).

3 Materjal ja metoodika

3.1 Eesmärgid

Selle töö eesmärkideks on:

1. sünteesida Fmoc tahke faasi peptiidisünteesi meetodiga rakku sisenev peptiid Nickfect 51 (NF51),
2. uurida rakku siseneva peptiidi NF51 transfekteeritud splaissingut korrekteeriva oligonukleotiidi transfektsiooni efektiivsust ja bioloogilist aktiivsust *in vitro*,
3. hinnata kas ja kui palju transfekteeritud kargost akumulereerub vesiikulitesse mõõtes Cy5 märgistatud oligonukleotiidi fluoretsentsi.

3.2 Peptiidide süntees

3.2.1 Peptiidide sünteesi meetod

Rakku sisenev peptiidi NF51 järjestus sünteesiti käsitsi kasutades Fmoc/tBu tahke faasi peptiidi sünteesi meetodi. NF51 peptiidi valmistamisel kasutati 250 mg 0.41 mmol/g Fmoc-rink amide MBHA resinit. Sünteesi skaala oli 0.1 mmol. Kõiki aminohappeid lisati 5x ülehulgas ja sidumise aeg sõltus aminohapetest. Fmoc kaitserühm eemaldati 20% piperidiini lahusega DMF-is. Liidetava aminohappe aktiveerimiseks kasutati 0.5M HOBt`i ja 0.5M HBTU lahust ja tertsiarset amiini DIEA-d (8x ülehulgas). Kasvava ahelaga peptiidi reageerimata aminorühmad blokeeriti HOBt/AcO₂ /DIEA/NMP või AcO₂ /DCM lahusega. Peale iga aminohappe lisamist või Fmoc grupi eemaldamist kontrolliti sünteesitava peptiidi vabade aminorühmade esinemist ninhüdriin testiga.

Peptiidi lõikamiseks kandjalt kasutati TFA/TIS/H₂O (95%, 2.5%, 2.5%) lahust, peptiidid lahustati vees ja dietüületris ning lüofiliseeriti. Seejärel puhastati peptiid RP-HPLC-ga ja fraktsioonid kontrolliti mass-spektromeetriga (MALDI-TOF).

3.2.2 Peptiidide puhastamine pöördfaasi-vedelikkromatograafia

Pöördfaasi-vedelikkromatograafia (RP-HPLC) abil lahutatakse molekulid üksteisest vastavalt nende hüdrofoobsusele. Peptiidid lahustatakse esmalt lahustis ning surutakse läbi kolonni kõrge rõhu all. Pöördfaasi puhul on silikageeli pinda töödeldud ja –OH rühmad asendatud mittepolaarsete rühmadega, näiteks alkaanid ja sellise kolonniga seostuvad mittepolaarsed ained. Peptiidide analüüsiks kasutatakse tavaliselt n-alküülsilikaadi-põhiseid sorbente, kust lahustunud aine elueeritakse kasvavas kontsentratsioonis orgaanilise solventiga nagu atsetonitriili (ACN) lahusega, mis sisaldab trifluoroäädikhapet (TFA-d) (Aguilar et al 2004). ACN kasvav sisaldus aitab muuta mobiilset faasi (vesi-TFA) vähem polaarsemaks, et soodustada hüdrofoobsemate ühendite väljumist kolonnist. Seega väljuvad kolonnist lahustunud peptiidid kasvava hüdrofoobsuse järgi, peptiidid, mis koosnevad hüdrofiilsematest aminohappejääkidest, tulevad välja enne hüdrofoobsemaid.

Peptiidid puhastati C4 kolonnist (Phenomenex Jupiter C4, 5µm, 300A, 250x10mm) ACN/ 0.1 % H₂O ja TFA/ 0.1 % H₂O lahustega, selleks lahustati NF51 20 % ACN/ 0.1 % H₂O lahuses ning kasutati vastavalt lineaarset gradienti 45 min voolukiirusel 5 mL/min.

3.2.3 Sünteesitud peptiidide masside määramine MALDI-TOF mass-spektromeetriga

MALDI-TOF (MALDI-TOF MS- Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry) massispektromeetria on võimas töövahend, mis võimaldab kiirelt ja täpselt kindlaks teha varieeruva suurusega makromolekulide molekulaarmassi ning iseloomustada ühendite struktuuri (Pan et al 2007).

Peptiidi molekulaarmassi analüüsimiseks segatakse väike kogus uuritavat ühendit maatriksiga, α -tsüaano-4-hüdroksükaneel happega [CHCA]), mis aitab kaitsta proovi lagunemise eest, eraldada biopolümeeri molekulid üksteisest ning aidata neelata laserist saadud energiat (Beavis & Chait 1991, Hillenkamp et al 1991). Kui proovid on plaadil kuivanud, siis viiakse need massispektromeetrise. Seejärel tekitatakse laseri abil peptiidest ioniseeritud gaas, kus iga molekul kannab ühte (valdavalt) või mitut positiivset laengut. Ioniseeritud peptiidid kiirendatakse elektriväljas ning nad lendavad, sõltuvalt oma massist ja laengust detektorini - suuremad molekulid aeglasemalt kui väiksemad. Analüüsides ühelaengulisi molekule on võimalik mõõta uuritavate peptiidide massi. Siis arvutatakse analüüdi massi-laengu suhe (m/z), kus igale detekteeritud ioonile vastab spektris spektrijoon ehk kitsas maksimum. Mass-spektri graafikul on näha intensiivsus ordinaatteljel ja massi ja laengu (m/z) suhe abstsisssteljel (Hillenkamp et al 1991, Pan et al 2007).

3.3 Katsed rakkudega

3.3.1 Rakkude kultiveerimine

Antud töös kasutati HeLa pLuc705 rakke, mida kasvatati DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), söötmesse lisati 10 % veise loote seerumit (FBS), 0,1 mM asendatavaid aminohappeid, 1,0 mM naatriumpüruvaati, 100 IU/ml penitsilliini ja 100 μ g/ml streptomütsiini. Rakke kasvatati 5% CO₂ keskkonnas veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37 °C.

3.3.2 SCO transportimine HeLa pluc705 rakkudesse NF51 peptiididga

NF51 peptiidi transfektsiooniefektiivsust kontrolliti HeLa pluc rakkudel kasutades ON705 oligonukleotiidi lutsiferaasi geeni ekspressiooni suurendamiseks. Kasutatud HeLa pluc rakkudel on pLuc/705 plasmid, mis sisaldab lutsiferaasi geeni, mis on katkestatud inimese muteeritud β -globiini introniga. See mutatsioon intronis põhjustab ebaõiget splaissingut lutsiferaasi pre-mRNA-s ning selle tõttu lutsiferaasi translatsiooni ei toimu. Viies HeLa pluc rakkudesse SCO

(*splice-correcting oligonucleotides*) oligoribonukleotiid ON-705, mille sihtmärgiks on vale 5`splaiissingu järjestus, parandatakse splaiissing ning toodetakse õiget mRNA-d, millest ekspresseeritakse funktsionaalne lutsiferaasi valk. Kuna tuuma membraanis on umbes 70 nm poorid, mille kaudu peaksid lühikesed oligonukleotiidid vabalt sisenema ja kuna splaiissing toimub tuumas, siis lutsiferaasi aktiivsuse suurenemine näitab ON-i transporti tuuma. (Kang et al 1998)

HeLa pluc rakud külvati kahte 24-kaevulisse plaati 24 h enne eksperimenti tihedusega 5×10^4 rakku kaevu kohta. Katseid rakkudega tehti nii seerumi vabas kui ka täissöötmes. PS-2`-OMe (5`CCUCUUACCUCAGUUACA) SCO segati NF51 peptiidiga molaarsuhtes MR 1:3, 1:5, 1:7 ja 1:10 200nM SCO konsentratsiooniga deioniseeritud vees. Kokku segatud NF51:SCO ruumala moodustas 1/10 (50 µl) transfektsiooni lõpp-ruumalast (500 µl). Kompleksidel lasti moodustuda toatemperatuuril 45 min. Enne komplekside pealekandmist vahetati rakudelt sööde. Positiivse kontrollina kasutati lipiidpõhist transfektsiooni ühendit Lipofectamine™ 2000 ning negatiivsena töötlemata rakke. Lipofectamine™ 2000 puhul valmistati kompleksid vastavalt tootja protokollile (Promega, USA). Komplekside kogunemist endotsütootilistesse vesiikulitesse hinnati transfekteerides rakke klorokiini juuresolekul (100 µM). Rakke inkubeeriti 4h, lisati sööde ning inkubeeriti täiendavalt 20h ning pesti PBS ühekordse lahusega ja lüüsi 30 min 4°C juures, kasutades 100 µl 0.1% Triton X-100 lahust HKR puhvrts (Sigma-Aldrich).

Lutsiferaasi aktiivsuse mootmiseks kasutati *Promega's luciferase assay system GloMax™ 96 microplate* luminometetri jaoks (Promega, Sweden). Luminessentsi mõõtmisel saadud andmed normaliseeriti valgusisalduse kasutades DC valgumääramise kitti (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA).

3.3.3 Vesiikulite fraktsioneerimine

HeLa pluc rakud külvati Petri tassi tihedusega, et konfluentsus oleks järgmiseks päevaks 70-75%. Katseid rakkudega tehti seerumivabas söötmes. Cy5-PS-2`-OMe (5`Cy5-CCUCUUACCUCAGUUACA) SCO segati NF51 peptiidiga molaarsuhtes 1:7 deioniseeritud vees. Petri tassi jaoks moodustati molaarsussuhe (MR) 1:7 (Cy5-SCO: NF51) ja kasutatud oligonukleotiidi kontsentratsioon Petri tassi kohta oli 400nM. Komplekse moodustati toatemperatuuril 45 min inkubeerides. Enne pealekandmist vahetati HeLa pluc 705 rakudelt sööde. Rakke transfekteeriti kompleksiga, inkubeeriti vastav aeg (10 min või 4h), eemaldati ning säilitati seerumivaba sööde, pesti PBS puhvriga ning töödeldi 2-3 min trüpsiiniga. Seejärel lisati rakkudele täissööde ning tsentrifugeeriti 4 min 4°C 200xg juures. Pealt eemaldatud supernatant segati eelnevalt eemaldatud PBS-iga ning säilitati analüüsiks. Sadenenud rakud suspendeeriti 1,5 ml Percolli puhvriga (0,25 M sahharoos, 3 mM imidasool ja 0,5 mM EDTA, pH 7,4) ning tsentrifugeeriti põhja 5 min 4°C 200xg juures. Sadenenud rakudelt eemaldati supernatant, lisati 1 ml Percolli puhvrit ning rakud homogeniseeriti kasutades 27G nõelaga 1 ml süstalt. Rakkude lüsaati kontrolliti faaskontrastmikroskoobi all. Terved rakud ja tuumad sadestati tsentrifugeerides 10 min 600xg juures. 0,9 ml postnukleaarsele supernatandile (PNS) lisati peale 7,8 ml Percolli puhvrit, 2,2 ml 90% Percolli lahust sahharoosis ja 0,2 ml veise seerumi albumiini (BSA). Gradiendi tuubi valmistamiseks tõsteti Percolli-PNS segu ettevaatlikult 2,5M sahharoosile ja ultratsentrifugeeriti *swing-out* SW41 Ti rootoriga 22 000 rpm 4°C juures 2 h (Beckman Optima LE-80K). Kõik fraktsioonid koguti kasutades peristaltilist pumpa (Pharmacia P1). Fraktsioonidele lisati Triton X 100 0,5% lahuse saamiseks ning fluoretsentsi mõõdeti duplikaadis kasutades lainepikusi 620/670 nm. Fluoretsentsi mõõdeti, kasutades Biotek Synergy Mx mikroplaadilugejat (BioTek Instruments, Inc., USA). Tuumade fraktsioone analüüsiti *et al* Colin artikli järgi (Colin et al 2000). Luminessentsi ning fluoretsentsi mõõtmisel saadud andmed normaliseeriti valgusisalduse alusel kasutades DC valgumääramisekiti (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA).

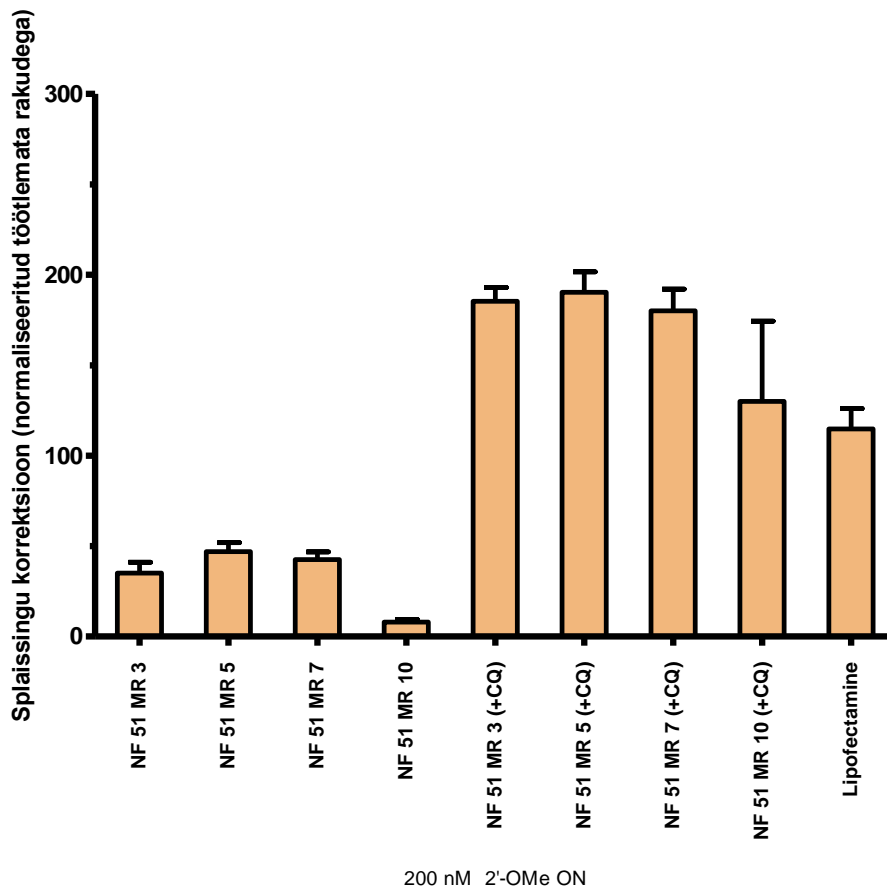
4 Tulemused

4.1 NF51 süntees

Rakku siseneva peptiidi NF51 järjestus sünteesiti käsitsi kasutades Fmoc/tBu tahke faasi peptiidi sünteesi meetodi. NF51 peptiidi valmistamisel kasutati 250 mg 0.41 mmol/g Fmoc-rink amide MBHA resinit. Sünteesi skaala oli 0,1 mmol. NF51 peptiid puhastati RP-HPLC-ga ja fraktsioonid kontrolliti mass-spektromeetriga (MALDI-TOF). Puhast peptiidi saadi 12 mg, ülejäänud fraktsioonid säilitati korduvaks puhastamiseks. Massispekter ja RP-HPLC kromatogramm on toodud lisa (vastavalt lisa 1 ja lisa 2).

4.2 NF51 peptiid ja SCO akumulatsioonid endosoomidesse

Peptiidse vektori bioloogilise aktiivsuse kontrollimiseks transfekteeriti HeLa pluc705 rakke nii seerumiga kui seerumita söötmes ON705 oligonukleotiidiga. Komplekside kogunemist endotsütootilistesse vesiikulitesse hinnati transfekteerides rake klorokiini juuresolekul. Lipofectamine 2000 transfekteeris seerumiga söötmes efektiivsemalt HeLa pluc 705 rakke kui NF51. Klorokiiniga koinkubeerides tõusis NF51:SCO bioaktiivsus märgatavalt, olles väiksemate molaarsussuhete juures peaaegu kaks korda efektiivsem kui Lipofectamine 2000 korral (Joonis 4, 5). Võrreldes klorokiiniga töötlemata NF51 kompleksi transfektsiooniga detekteeriti luminotsentsi oluliselt rohkem lüsomotroofse klorokiiniga, NF51 bioaktiivsus tõusis madalamatel molaarsussuhete kasutamisel 4-5 ning MR10 juures isegi 16 korda. (Joonis 5, 6)



Joonis 4.SCO (200 nM)

transfektsioon NF51-ga seerumiga söötmes.

Tulemused on normaliseeritud töötlemata rakkudega. HeLa plus 705 rakke inkubeeriti vastava molaarsussuhtega NF51:SCO kompleksiga 4h, vahetati sööde ning inkubeeriti bioaktiivsuse mõõtmiseks veel täiendavalt 20h. Kontrollina kasutati Lipofectamine 2000. Lisatud (+CQ) näitab NF51:SCO ko-transfektsiooni klorokiiniga seerumiga söötmes erinevate MR juures.

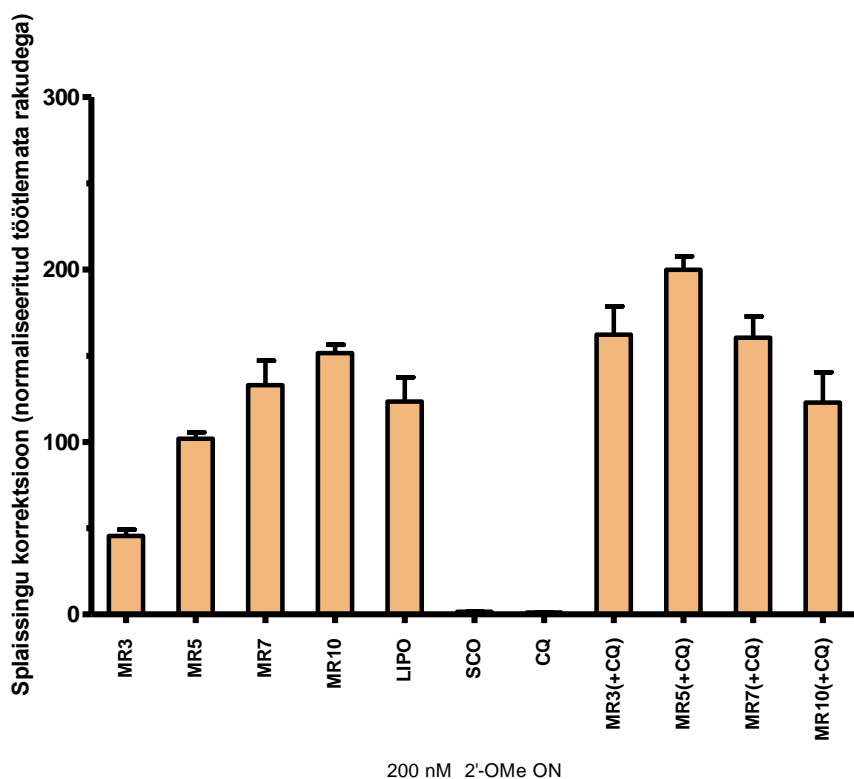
Seerum+sööde	NF51	Lipofectamine 2000	Lipofectamine 2000/NF51	NF51/Lipofectamine 2000
NF 51 MR 3	35,06	114,82	3,27	0,31
NF 51 MR 5	46,99	114,82	2,44	0,41
NF 51 MR 7	42,60	114,82	2,70	0,37
NF 51 MR 10	7,91	114,82	14,52	0,07
NF 51 MR 3 (+CQ)	185,43	114,82	0,62	1,61
NF 51 MR 5 (+CQ)	190,36	114,82	0,60	1,66
NF 51 MR 7 (+CQ)	180,15	114,82	0,64	1,57
NF 51 MR 10 (+CQ)	130,03	114,82	0,88	1,13

Joonis 5. Erinevad bioaktiivsuse suhted seerumiga söötmes võrreldes töötlemata rakkudega NF51 ja Lipofectamine 2000-ga. Tulemused on normaliseeritud valgu suhtes ja siis töötlemata rakkudega detekteeritud signaaliga.

Seerumiga sööde	NF51(+CQ)/NF51
NF 51 MR 3	5,29
NF 51 MR 5	4,05
NF 51 MR 7	4,23
NF 51 MR 10	16,44

Joonis 6. Bioaktiivsuse suhe seerumiga söötmes NF51:SCO ko-transfektsioonil klorokiiniga ja NF51:SCO kompleksi vahel. Tulemused on normaliseeritud valgu suhtes ning siis töötlemata rakkudega detekteeritud signaaliga.

Seerumita söötmes oli NF51 transfektsiooni aktiivsus suuremate molaarsusuhetega (MR7 ja MR10) efektiivsem kui Lipofectamine 2000.(Joonis 7, 8) Bioaktiivsus suurenes klorokiiniga veelgi, väljaarvatud MR10 korral, kus splaiisingu korrektsoonivõime kahanes hoopis. See on tõenäoliselt klorokiini toksilisuse tõttu. (Joonis 9) Seerumivabas söötmes kahanes NF51 kompleksi transfektsioon klorokiini lisamisel molaarsussuhte suurenemisega.



Joonis 7. SCO (200 nM) transfektsioon NF51-ga seerumita söötmes. Tulemused on normaliseeritud töötlemata rakkudega. HeLa plus 705 rakke inkubeeriti vastava molaarsussuhtega NF51:SCO kompleksiga 4h, vahetati sööde ning inkubeeriti bioaktiivsuse mõõtmiseks veel täiendavalt 20h. Kontrollina kasutati Lipofectamine 2000. Lisatud (+CQ) näitab NF51:SCO ko-transfektsiooni klorokiiniga seerumita söötmes erinevate MR juures.

Seerumita sööde	NF51	Lipofectamine 2000	Lipofectamine 2000/NF51	NF51/Lipofectamine 2000
NF 51 MR 3	45,54	123,34	2,71	0,37
NF 51 MR 5	101,92	123,34	1,21	0,83
NF 51 MR 7	132,91	123,34	0,93	1,08
NF 51 MR 10	151,52	123,34	0,81	1,23
NF 51 MR 3 (+CQ)	162,3	123,34	0,76	1,32
NF 51 MR 5 (+CQ)	200	123,34	0,62	1,62
NF 51 MR 7 (+CQ)	160,55	123,34	0,77	1,30
NF 51 MR 10 (+CQ)	122,83	123,34	1,00	1,00

Joonis 8. Erinevad bioaktiivsuse suhted seerumita söötmes võrreldes töötlemata rakkudega NF51 ja Lipofectamine 2000-ga. Tulemused on normaliseeritud valgu suhtes ja siis töötlemata rakkudega detekteeritud signaaliga.

Seerumita sööde	NF51(+CQ)/NF51
NF 51 MR 3	3,56
NF 51 MR 5	1,96
NF 51 MR 7	1,21
NF 51 MR 10	0,81

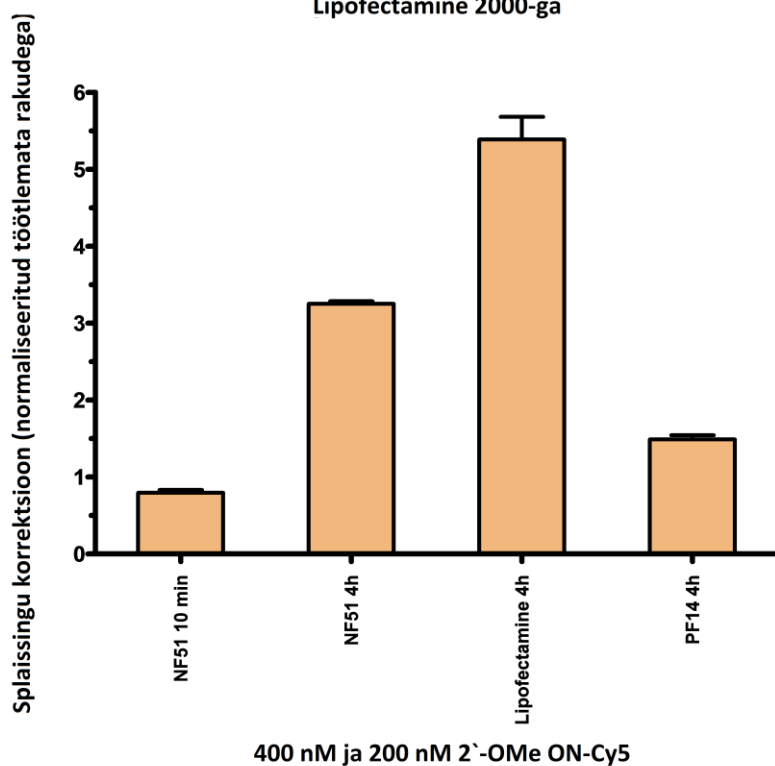
Joonis 9. Bioaktiivsuse suhe seerumita söötmes NF51:SCO ko-transfektsioonil klorokiiniga ja NF51:SCO kompleksi vahel. Tulemused on normaliseeritud valgu suhtes ning siis töötlemata rakkudega detekteeritud signaaliga.

Antud informatsiooni põhjal valiti edasiseks uurimiseks MR7, kuna selle molaarsussuhtega oli seerumiga söötmes bioaktiivsus paremini detekteeritav ning samas suurendas klorokiiniga töötlus oluliselt vesiikulitest vabanemist.

4.3 TP10 analoogide PF14 ja NF51 oligonukleotiidiga kompleksidel on hilisem bioaktiivsus võrreldes Lipofectamine 2000-ga

Subtsellulaarse fraksioneerimise käigus analüüsiti pärast tuumade sadestamist HeLa pluc705 rakkude tsütoplasmaatilist osa, et hinnata erinevate vektorite bioaktiivsust. Selleks mõõdeti splaissingu parandamisega seotud luminessentsi. Tulemused normaliseeriti valgusisalduse järgi (vt meetod). Kontrollina kasutati rakku siseneva peptiidi TP10 analoogi Pepfect 14 (PF14) ja Lipofectamine 2000. Pärast 4h inkubeerides oli Lipofectamine 2000 bioaktiivsus võrreldes töötlemata rakkudega 5 korda suurem, NF51 3 korda ja PF14 peptiidiga transfekteerides kõigest 1,5 korda suurem (Joonis 10).

Splaiisingu korrektsoon seerumita söötmes NF51 ja PF14 peptiidide ja Lipofectamine 2000-ga

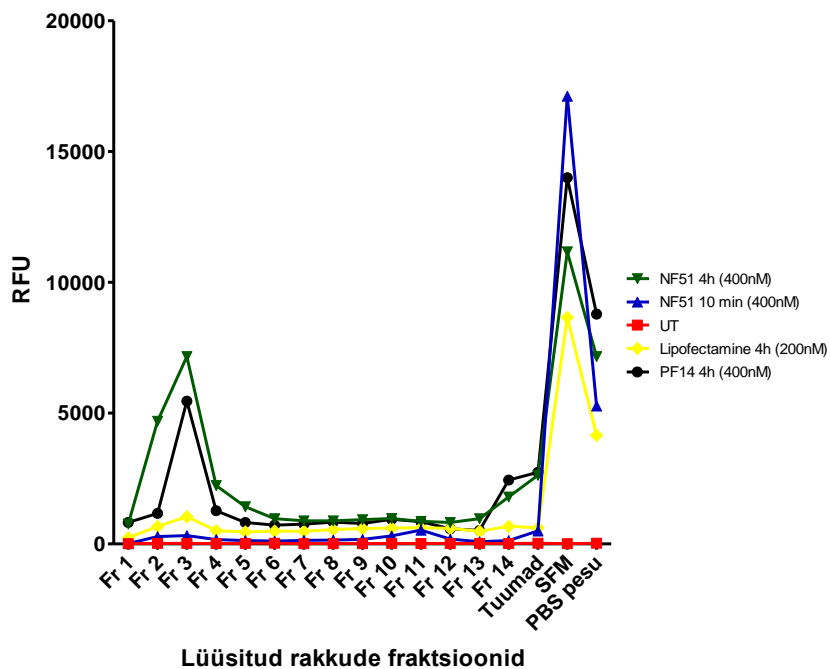


Joonis 10. NF51, PF14 ja Lipofectamine 2000 komplekside bioloogiline aktiivsus erinevatel ajapunktidel. Peptiidsete vektoritega kasutati 400nM SCO-Cy5 ja Lipofectamine 2000 transfektsioonil 200nM oligonukleiinhappe kontsentratsiooni. Analüüsi tsütoplasmaatilist osa ja normaliseeriti valgumõõtmise ning töötlemata rakkudega saadud andmete abil.

4.4 Subtsellulaarne fraktsioneerimine viitab NF51 transfekteeritud Cy5-SCO kogunemisele hilistesse endolüsoosoomidesse

Endotsütootiliste vesiikulite isoleerimiseks kasutati subtsellulaarset fraktsioneerimist. HeLa pluc705 rakke transfekteeriti NF51 ja Cy5 märgistatud splaissingut parandava oligonukleotiidiga. Rakke transfekteeriti 10 min ja 4h. Kontrollidena kasutati TP10 peptiidi analoogi PepFect 14 ja Lipofectamine 2000. Pärast rakulüsaadi tsentrifuugimist koguti peristaltilise pumbaga erineva tihedusega fraktsioonid (Fr1->Fr14, fraktsiooni nr kasvamisel tihedus väheneb), mida analüüsiti mõõtes Cy5 fluorensi. Tihedamad fraktsioonid peaksid sisaldama hiliseid endolüsoosome, kergemad varajasi endosome ning vähemtihedad ülemised fraktsioonid 13 ja 14 võiksid sisaldada homogeniseeritud rakude tsütoplasmaatilist osa. Fraktsioonide kontrolliks kasutatakse enamasti Western bloti, ensümaatilisi reaktsioone ja transmiooni elektronmikroskoobiat. Jooniselt võib näha, et 10 min NF51 kompleksi inkubatsiooniga on suurem osa detekteeritud oligonukleotiididst välismeedias ja PBS loputuslahuses või vähemtihedates fraktsioonides (fr 10-13). Pikendades transfektsiooni aega nelja tunnini nihkus detekteeritud fluorensi signaal tihedamatesse fraktsioonidesse (fr 1-5). Samaaegselt vähenes välissöötmes ja PBS pesulahuses detekteeritud Cy5-SCO ning suurenes signaal fraktsioonides 13 ja 14, mis oma tiheduse järgi võiksid näidata tsütoplasmasse jõudnud oligonukleotiidide hulka. Suur osa oligonukleotiididest jääb ka PF14 ja Lipofectamine 2000 transfekteerides hilistesse endosoomidesse. Samuti jääb suur osa nukleiinhapest transfekteerimata välismeediasse ja PBS lahusesse. Peptiidsed transfektsiooniagendid paistsid kogunevat suuremas hulgas tuumadesse võrreldes Lipofectamine 2000-ga, aga järelduste tegemiseks oleks vaja täpsemat detektsioonimehhanismi.

HeLa pluc 705 rakude transfektsioon NF51 ja PF14 peptiididega ja Lipofectamine 2000-ga seerumita söötmes

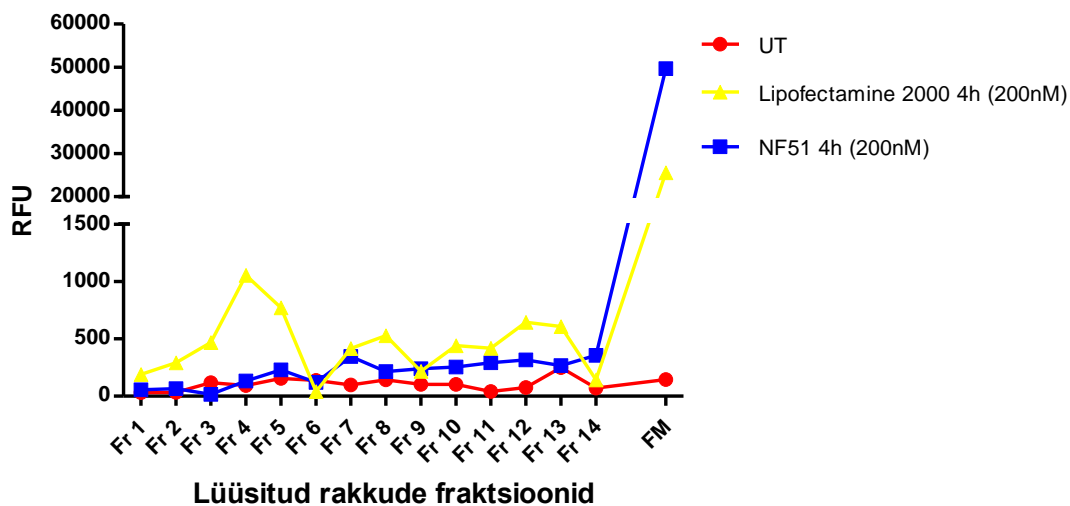


Joonis 11. Transfektsioonijärgsed rakulüsaadi fraktsioonid. Fraktsiooni nr kasvamisega fraktsiooni tihedus väheneb. HeLa pluc 705 rakke inkubeeriti NF51: Cy5-SCO kompleksi (MR7:1), PF14: Cy5-SCO (MR5:1) ja Lipofectamine 2000: Cy5-SCO kompleksiga seerumita söötmes. Sulgudes on märgitud oligonukleotiidide kontsentratsioon. Analüüsiti ka tuumas, seerumita välissöötmes (SFM) ja PBS-iga pestud lahuses (PBS pesu) sisalduvat märgistatud oligonukleotiidide kontsentratsiooni. Töötlemata rakulüsaadi fraktsioonid on tähistatud UT. Fraktsioonide kirjeldus tekstis.

Kontrollimaks Cy5-ga märgistatud oligonukleotiidide detekteerimise efektiivsust inkubeeriti HeLa pluc705 rakke seerumiga ning seerumita söötmes NF51: Cy5-SCO kompleksiga. Rakud töödeldi vastavalt meetodis toodud protokollile, ultratsentrifuugiti ning saadud fraktsioone analüüsiti fluoromeetriga. Esmalt kasutati seerumiga söödud ning 200 nM märgistatud SCO kontsentratsiooni. Detekteerimise ebaõnnestumise järel suurendati kasutatavat Cy5-SCO kontsentratsiooni 400 nM kontsentratsioonini ja katse sooritati seerumita söötmes. Antud eksperimendi sooritamise näitas samuti detekteerimise piiratust. Arvatavasti segavad Percolli osakesed samuti täpset kvantifitseerimist. Kontrolliks lisati töötlemata rakkude fraktsiooni 6,4 nmol Cy5-SCO-d (Joonis 12). Kuigi Cy5 märgis on valkudest suhteliselt hästi eristatav emisiooni spekter on kasutatav oligonukleotiidide kontsentratsioon fraktsioonidesse jagatult tõenäoliselt liiga madal täpseks detekteerimiseks. Edasise katseid tuleb tõenäoliselt teha kasutades radioaktiivselt märgistatud oligonukleotiidide.

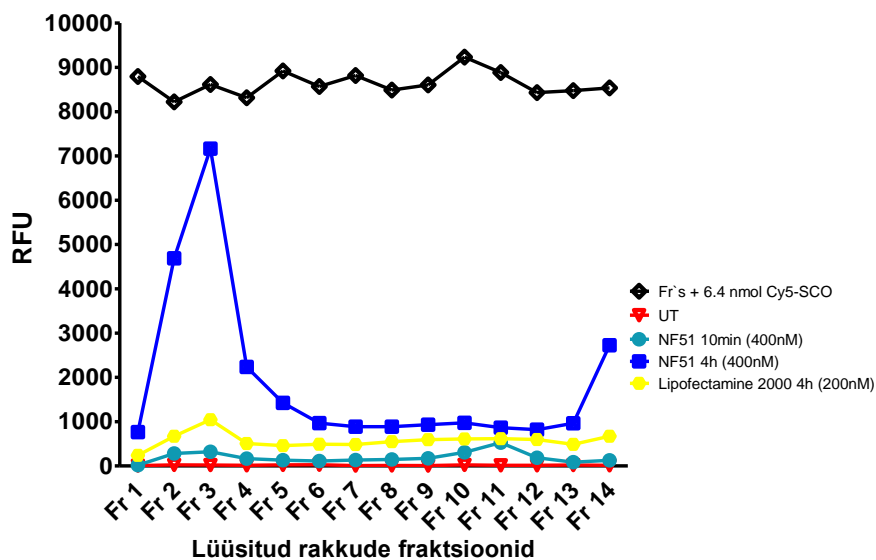
a.

HeLa pluc 705 rakkude transfektsioon NF51 ja Lipofectamine 2000-ga seerumiga söötmes



b.

HeLa pluc 705 rakkude transfektsioon NF51 ja Lipofectamine 2000-ga seerumita söötmes



Joonis 12. Subtsellulaarse fraktsioneerimisega saadud rakulüsaadi fraktsioonid NF51: Cy5-SCO kompleksiga (MR7) transfektsioneerides **a.** Seerumiga söötmes (FM) inkubeeritud 200 nM Cy-5-SCO kontsentratsiooniga saadud tulemused. **b.** Seerumita söötmes (SFM) 400nM oligonukleotiidi kontsentratsiooniga inkubeeritud katsega saadud tulemused. Kontrolliks on töötlemata raku fraktsioonidele (UT) lisatud 6.4 nmol Cy5-SCO-d.

5 Arutelu

Paljud eelnevad uuringud RSP-dega on näidanud, et peptiidid sisenevad rakkudesse kasutades peamiselt endotsütoosi. Peptiidi ja kargo akumulatsioon vesikulitesse vähendab oluliselt nende bioaktiivsust. Prof. Langeli töögrupp on eelnevalt näidanud, et TP10 ja selle analoogide RSP-de transfektsiooni inhibeerivad mitmed endotsütoosiraja inhibiitorid. Seega on endotsütoos tõenäoliselt peamiseks sisenemismehhanismiks ka antud töös kasutatud peptiididel ja endotsütoosijärgne endosoomidesse kogunemine võib vähendada transfekteeritud ühendite aktiivsust (Ezzat et al 2011, Lundin et al 2008, Mäger et al 2010, Oskolkov et al 2011).

Endotsütoosi tagajärel vesikulitesse kogunenud molekulid on võimalik vabastada tsütoplasmasse klorokiiniga. Klorokiin akumulatsioon madala pH tõttu endosoomidesse ja põhjustab osmootse efekti nende paisumise ning lõhkemise (Khalil et al 2006, Wagner et al 1992, Wattiaux et al 2000). Klorokiini kasutamine suurendab väga paljude erinevate vektorite geeniekspressiooni (Erbacher et al 1996, Legendre & Szoka Jr 1992, Midoux et al 1993, Wagner et al 1992). Hindamiseks endosoomidesse kinnijäänud NF51:SCO kompleksi hulka kasutati transfektsiooni uurimisel 100 μM lõppkonsentratsiooniga klorokiini töötlust. NF51 peptiidi SCO transfektsiooni efektiivsust hinnati Shin-Hong Kang väljatöötatud splaiissingut parandava meetodi abil (Kang et al 1998).

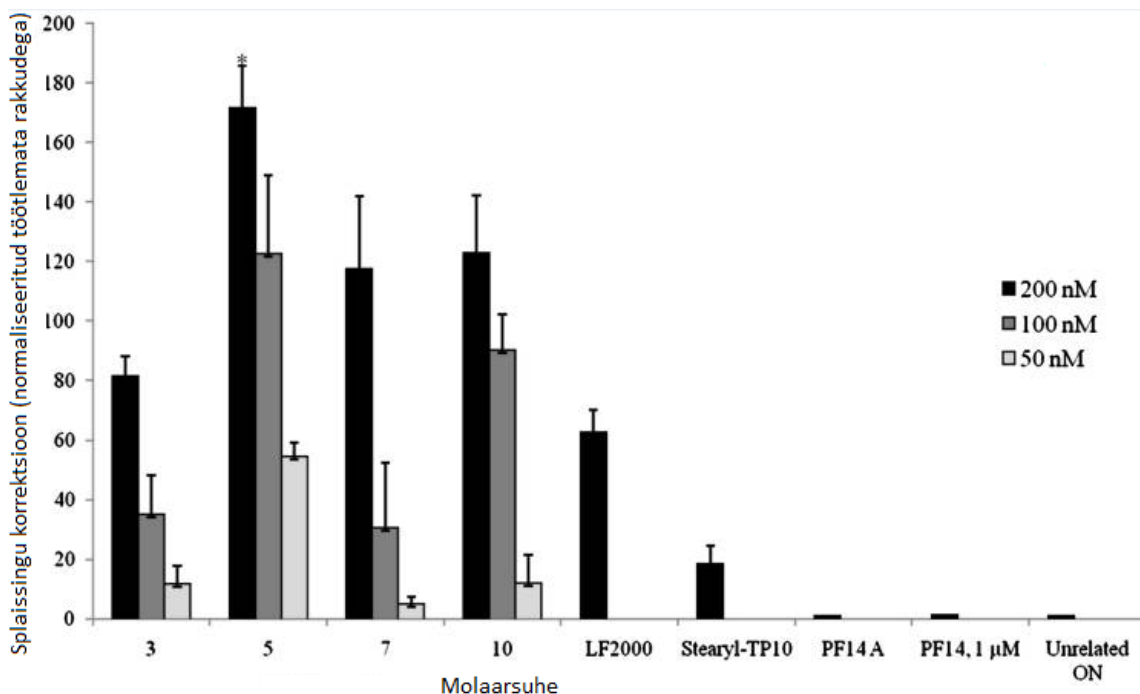
Klorokiiniga koinkubeerimine suurendas nii seerumiga kui seerumita söötmes NF51:SCO kompleksi bioloogilist aktiivsust. Suurematel molaarsussuhetega (MR7 ja MR10) transfekteeris NF51 seerumita söötmes Hela pluc 705 rakke paremini kui Lipofectamine 2000 ka ilma klorokiinita. Seerumiga söötmes kahanes suurematel molaarsussuhetega NF51 kompleksi bioaktiivsus. Selline transfektsiooni efektiivsuse vähenemine võib olla seotud suurema hulga ühendite kinnijäämisest endosoomidesse. Samuti on näidatud, et suurema konsentratsiooniga katioonsete polümeeride vektorite inkubatsiooniga võivad polümeerid täiendavaid sisenemisradu kasutada, mida madalamate konsentratsioonide juures ei kasutata (Jiao et al 2009). Suurima katsetatud molaarsussuhte juures langes klorokiini lisamisel splaiissingu parandamisvõime ka seerumivabas söötmes (MR10 juures NF51 kompleks +CQ / NF51 kompleksi suhe oli 0,8). Peptiidse kompleksi bioaktiivsuse vähenemine võib olla seotud nii klorokiini kui ka mõnigasel määral peptiidi toksilisusega. Toksilisust võib suurendada kahe ühendi koinkubatsioon seerumivabas söötmes. Edasiseks uurimiseks valiti NF51 kompleksi MR7, kuna selle

molaarsussuhtega oli seerumiga söötmes bioaktiivsus paremini detekteeritav ning samas suurendas klorokiiniga töötlus oluliselt vesiikulitest vabanemist.

Seega näitab antud eksperiment, et NF51:SCO kompleks akumuleerub vesiikulitesse ning klorokiiniga töötlus suurendab ühendite pääsemist tsütoplasmasse ning edasist bioaktiivsust. NF51:SCO endosoomidesse kogunemist näitavad ka elektronmikroskoopiaga saadud andmed (Arukuusk et al 2013).

Hindamaks paremini endotsütootilistesse vesiikulitesse kinnijäänud oligonukleotiidi hulka isoleeriti vesiikulid subtsellulaarse fraktsioneerimisega. Enne saadud fraktsioonide uurimist analüüsiti ka tsütoplasma osa bioaktiivsust erinevatel ajapunktidel. Kontrollidena kasutati TP10 analoogi Pepfect 14 ja Lipofectamine 2000. Selline bioaktiivsuse katse näitas peptiidsete vektorite hilisemat bioaktiivsust võrreldes Lipofectamine 2000-ga. Pärast 4h oli Lipofectamine 2000 bioaktiivsus võrreldes töötlemata rakkudega viis korda suurem, NF51 kolm ja PF14 peptiidiga transfekteerides kõigest poolteist korda suurem. See võib olla seotud nii moodustunud komplekside erinevast füsiokeemilisest omadustest, erinevatest rakku sisenemise mehhanismidest kui ka peptiidsete vektorite rohkemat esialgset vesiikulitesse kinnijäämist.

Sest eelnevad katsed on näidanud, et nii NF51 kui PF14 on pärast 4h seerumivabas söötmes transfekteerides ja selle järgselt 20h inkubatsiooni seerumiga söötmes efektiivsemad kui Lipofectamine 2000 (Ezzat et al 2011).



Joonis 13. PF14:SCO transfeerimine erineva MR juures seerumivabas söötmes 4h + inkubatsioon 20h seerumiga söötmes. PF14 transfeerib Lipofectamine 2000-ist efektiivsemalt HeLa plus 705 rakke (Ezzat jt, 2011).

Vesiikulite isoleerimisel saadud tulemus näitas samuti NF51 transfeeritud SCO kogunemist ja kinnijäämist endosoomidesse. Seega modifitseerides NF51 ratsionaalselt endosomolüütilisemaks, nagu seda on tehtud näiteks TP10 analoogide Pepfect 6 ja Pepfect 15-ga millele on vastavalt stearüleeritud TP10 või PF14 järjestusele lisatud kovalentselt trifluorometüülkinoliin (endosomolüütiline klorokiini analoog), võiks NF51 transfeektsiooniefektiivsust oluliselt parandada (Cheng et al 2006, EL Andaloussi et al 2011, Lindberg et al 2013).

Subtsellulaarse fraktsioneerimisega saadud fraktsioonide analüüsimine osutus probleemseks. 200nM märgistatud oligonukleotiidi kontsentratsiooni juures ja seerumiga söötmes, kus transfeektsiooni efektiivsus on madalam, ei suudetud statistiliselt oluliselt midagi detekteerida. Suurendades oligonukleotiidi kontsentratsiooni (400 nM) ja vahetades katse söötme seerumivaba söötmega oli võimalik näha fluoresentsi signaali nihkumist tihedamatesse fraktsioonidesse (hilised endolüüsosoomid), kuid väiksemaid muutusi ei ole võimalik ka nii detekteerida.

Üheahelaliste oligonukleotiidide kvantifitseerimine väikeses kontsentratsioonis on üsna keeruline. Üheks võimaluseks on kasutada analüütilist pöördfaasi kõrgrõhu vedelikkromatograafiat, kuid arvatavasti segavad Percolli osakesed analüüsimist. Percolli tsentrifugimine vähendaks kvantifitseerimise täpsust, kuna töötlemise käigus läheb kaduma ka vesiikuleid (Percoll,

Amersham Biosciences). Probleemiks jäävad tsentrifuugimisjärgselt ka valgud, mis võivad ummistada oligonukleotiidide analüüsimiseks eraldi modifitseeritud kolonne. Samas valkude eemaldamine üksikutest fraktsioonidest kahandab oligonukleotiidide kontsentratsiooni veelgi (RP-HPLC) (Arora et al 2002, Chen et al 1997, McGinnis et al 2012, Raynaud et al 1997). Percolli saab eemaldada ka filtreerides kuid see lahjendaks oligonukleotiidide kontsentratsiooni. Samuti võiks proovida analüüsida fraktsioone immunoloogiliselt. Viimast meetodi on siiski valdavalt kasutatud valkude detekteerimiseks ning oligonukleotiidide eripärast on neid raske valkude jaoks väljatöötatud meetodidega kasutada. Näiteks juba nukleiinhapete plaadile kinnitamiseks tuleks neid modifitseerida (Integrated DNA Technologies).

Seega näitas subtsellulaarne fraktsioneerimise katse, et NF51 transfekteeritud SCO tundub kogunevat endolüsoosoomidesse- fluoresents suurenes 10 min inkubatsiooni pikenemisel nelja tunnini tihedamates fraktsioonides üle seitsme korra- kuid täpsemaks uurimiseks on tõenäoliselt vaja siiski kasutada radioloogiliselt märgistatud nukleiinhappeid. Samuti on vaja kõik fraktsioonid üle kontrollida. Seda võiks teha Western blotiga, analoogiliselt *et al* Tjelle tööle, ensümaatilisel ja ka elektronmikroskoopiaga (Colin et al 2000, Manunta et al 2007, Richardson et al 2010, SEIB et al 2006, Tjelle et al 1996). Kindlasti on tulevikus vaja sooritada katseid paraleelselt ka 4°C juures, et nii saada adekvaatsemat informatsiooni membraaniga seondunud komplekside kohta, mis kindlasti mõjutavad tulemusi. Uurida võiks ka erinevate endotsütootiliste inhibiitorite toimet, et mõista paremini transfekteeritud oligonukleotiidi edasist endotsütootilist töötlust.

6 Kokkuvõte

Rakku sisenevad peptiidid on lühikesed molekulid, mis on võimelised läbima bioloogilisi membraane ja kandma mitmesuguseid terapeutilisi ühendeid rakku. Rakku sisenevate peptiidide peamiseks sisenemismehhanismiks peetakse endotsütoosi. Peptiidide efektiivset kasutamist limiteerib transfekteeritud molekulide kinnijäämine moodustunud intratellulaarsetesse vesiikulitesse. Seega aitab transfekteeritud oligonukleotiidi intratsellulaarse töötamise kohta saadud informatsioon tulevikus konstrueerida efektiivsemaid oligoterapeutilisi komplekse rakku sisenevate peptiididega.

Käesolevas töös sünteesiti Fmoc tahke faasi peptiidi sünteesi meetodiga rakku sisenev peptiid Nickfect 51 ning uuriti peptiidiga transporditud splaissingut korrigeeriva oligonukleotiidi (SCO) bioaktiivsust ja intratsellulaarset saatust HeLa pluc705 rakudes.

Nickfect 51 peptiidi SCO kompleksi bioloogilist aktiivsust hinnati Shin-Hong Kang väljatöötatud splaissingut parandava meetodi abil. Endotsütoosi ja kompleksi akumulierumist vesiikulitesse uuriti kasutades endosomolüütilist klorokiini töötlust. Nickfect 51 transfekteeris seerumita söötmes HeLa pluc705 rakke efektiivsemalt kui kommertsiaalne transfektsiooniagent Lipofectamine 2000. Koinkubatsioon klorokiiniga suurendas kompleksi bioaktiivsust kuni viis korda, mis viitab NF51:SCO kompleksi kogunemisele moodustunud vesiikulitesse. Edasine analüüs subtsellulaarse fraktsioneerimisega näitas samuti transfekteeritud Cy5-ga märgistatud oligonukleotiidi kogunemist endosoomidesse. Samuti selgus fraktsioneerimise katses, et suur osa nukleiinhapest jääb transfekteerimata välismeediasse. Erinevatel ajahetkedel mõõdetud bioaktiivsus näitas Nickfect 51-ga transfekteeritud oligonukleotiidi hilisemat bioloogilist aktiivsust võrreldes Lipofectamine 2000:SCO kompleksiga. Transfekteeritud üheaahelaliste oligonukleotiidide kontsentratsioon fraktsioonidesse jagatult oli tõenäoliselt liiga madal täpseks detekteerimiseks. Oligonukleotiidide kvantifitseerimiseks fraktsioneeritud rakulüsaadist tuleb tõenäoliselt kasutada radioaktiivselt märgistatud nukleiinhapeid.

7 Intracellular fate of splice correcting oligonucleotide transfected with cell penetrating peptide Nickfect 51

Krista Freimann

Summary

The cellular plasma membrane is an effective barrier for most hydrophilic macromolecules. Cell-penetrating peptides (CPPs) are short peptides of less than 30 amino acids that are able to penetrate cell membranes and transfect different cargoes into cells.

CPPs are believed to utilize mainly endocytosis to translocate over the plasma membrane, which raises a major concern – entrapment of the delivered cargoes in endosomal compartments that result in limited activity of the cargo. The fate of the molecules depends on their ability to escape from the vesicles before they are trafficked back to the plasma membrane for recycling or degraded in lysosomes. For that reason it is crucial to determine the amount of cargo inside vesicles to get better understanding of complex intracellular fate in order to improve the vectors.

Many studies use microscopy to monitor intracellular fate, but there is a need for more quantitative methods to define intracellular compartmentation over time. Subcellular fractionation has been used to study the intracellular fate of non-viral gene delivery systems. The bioactivity and intracellular fate of splice correcting oligonucleotide (SCO) transfected with CPP Nickfect 51 (NF51) was examined. To study the efficacy of NickFect 51 in transporting SCO into cells, peptide was complexed with the SCO and luciferase activity was measured 24 h after the treatment in HeLa pluc705 cells. NF51 was more effective for transfecting cells with SCO in serum free medium than Lipofectamine 2000. Splice-correction was significantly increased in the presence of chloroquine (known endosomolytic agent). This suggests the involvement of endocytic vesicles in the uptake of the NF51:SCO nanocomplexes and could show cargo's entrapment inside the vesicles. To determine further the subcellular localization of cargo subcellular fractionation on Percoll gradients of cells incubated with Cy5 labeled SCO: NF51 complex were performed. Subcellular fractionation studies showed that the large number of Cy5-SCO is not internalized into cells or is quickly exocytosed. Redistribution of the fluorescence from the early endosome to late endolysosome fractions suggested that significant amount of cargo is entrapped in vesicles. Although most of the transfected oligonucleotide was detected in

vesicle fractions, there was increase of fluorescence in the least dense fractions which demonstrate that cargo can escape from intracellular vesicles to cytosol. Bioactivity of transfected oligonucleotide was measured over different timepoints and results showed later biological effect of NF51 transfected oligonucleotide compared to Lipofectamine 2000 complex. Because of fluorescence low detection range further quantification studies with radiolabeled oligonucleotides are needed to confirm the results.

In conclusion, NF51 transfected oligonucleotide seems to accumulate into vesicles and further investigation of intracellular fate of NF51 transfected SCO would give more information to design new oligotherapeutic complexes in the future.

8 Kasutatud kirjanduse loetelu

- Akita H, Ito R, Khalil IA, Futaki S, Harashima H. 2004. Quantitative Three-Dimensional Analysis of the Intracellular Trafficking of Plasmid DNA Transfected by a Nonviral Gene Delivery System Using Confocal Laser Scanning Microscopy. *Mol Ther* 9: 443-51
- Andaloussi S, Lehto T, Lundin P, Langel Ü. 2011. Application of PepFect Peptides for the Delivery of Splice-Correcting Oligonucleotides In *Cell-Penetrating Peptides*, ed. Ü Langel, pp. 361-73: Humana Press
- Arora V, Knapp DC, Reddy MT, Weller DD, Iversen PL. 2002. Bioavailability and efficacy of antisense morpholino oligomers targeted to c-myc and cytochrome P-450 3A2 following oral administration in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91: 1009-18
- Arukuusk P, Pärnaste L, Oskolkov N, Copolovici D-M, Margus H, et al. 2013. New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828: 1365-73
- Chen S-H, Qian M, Brennan J, Gallo JM. 1997. Determination of antisense phosphorothioate oligonucleotides and catabolites in biological fluids and tissue extracts using anion-exchange high-performance liquid chromatography and capillary gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 692: 43-51
- Cheng J, Zeidan R, Mishra S, Liu A, Pun SH, et al. 2006. Structure–Function Correlation of Chloroquine and Analogues as Transgene Expression Enhancers in Nonviral Gene Delivery. *Journal of Medicinal Chemistry* 49: 6522-31
- Colin M, Maurice M, Trugnan G, Kornprobst M, Harbottle RP, et al. 2000. *Cell delivery, intracellular trafficking and expression of an integrin-mediated gene transfer vector in tracheal epithelial cells*. 139-52 pp.
- Conner SD, Schmid SL. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44
- Dias N, Stein CA. 2002. Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics* 1: 347-55

- EL Andaloussi S, Lehto T, Mäger I, Rosenthal-Aizman K, Oprea II, et al. 2011. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Research* 39: 3972-87
- Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, Midoux P. 1996. Putative Role of Chloroquine in Gene Transfer into a Human Hepatoma Cell Line by DNA/Lactosylated Polylysine Complexes. *Experimental Cell Research* 225: 186-94
- Ezzat K, EL Andaloussi S, Zaghoul EM, Lehto T, Lindberg S, et al. 2011. PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Research* 39: 5284-98
- Harford JB, Bonifacino JS. 2001. Subcellular Fractionation and Isolation of Organelles In *Current Protocols in Cell Biology*: John Wiley & Sons, Inc.
- Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. 1991. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry* 63: 1193A-203A
- Jiao C-Y, Delaroche D, Burlina F, Alves ID, Chassaing G, Sagan S. 2009. Translocation and Endocytosis for Cell-penetrating Peptide Internalization. *Journal of Biological Chemistry* 284: 33957-65
- Kang S-H, Cho M-J, Kole R. 1998. Up-Regulation of Luciferase Gene Expression with Antisense Oligonucleotides: Implications and Applications in Functional Assay Development†. *Biochemistry* 37: 6235-39
- Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H. 2006. Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery. *Pharmacological Reviews* 58: 32-45
- Kole R, Krainer AR, Altman S. 2012. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov* 11: 125-40
- Langel K, Lindberg S, Copolovici D, Arukuusk P, Sillard R, Langel Ü. 2010. Novel Fatty Acid Modifications of Transportan 10. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 16: 247-55

- Legendre J-Y, Szoka Jr F. 1992. Delivery of Plasmid DNA into Mammalian Cell Lines Using pH-Sensitive Liposomes: Comparison with Cationic Liposomes. *Pharmaceutical Research* 9: 1235-42
- Lehto T, Simonson OE, Mager I, Ezzat K, Sork H, et al. 2011. A Peptide-based Vector for Efficient Gene Transfer In Vitro and In Vivo. *Mol Ther* 19: 1457-67
- Lindberg S, Muñoz-Alarcón A, Helmfors H, Mosqueira D, Gyllborg D, et al. 2013. PepFect15, a novel endosomolytic cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery via scavenger receptors. *International Journal of Pharmaceutics* 441: 242-47
- Lindgren M, Langel Ü. 2011. Classes and Prediction of Cell-Penetrating Peptides In *Cell-Penetrating Peptides*, ed. Ü Langel, pp. 3-19: Humana Press
- Lundin P, Johansson H, Guterstam P, Holm T, Hansen M, et al. 2008. Distinct Uptake Routes of Cell-Penetrating Peptide Conjugates. *Bioconjugate Chemistry* 19: 2535-42
- Manunta M, Izzo L, Duncan R, Jones AT. 2007. Establishment of subcellular fractionation techniques to monitor the intracellular fate of polymer therapeutics II. Identification of endosomal and lysosomal compartments in HepG2 cells combining single-step subcellular fractionation with fluorescent imaging. *Journal of Drug Targeting* 15: 37-50
- Margus H, Padari K, Pooga M. 2012. Cell-penetrating Peptides as Versatile Vehicles for Oligonucleotide Delivery. *Mol Ther* 20: 525-33
- McGinnis AC, Chen B, Bartlett MG. 2012. Chromatographic methods for the determination of therapeutic oligonucleotides. *Journal of Chromatography B* 883–884: 76-94
- Midoux P, Mendes C, Legrand A, Raimond J, Mayer R, et al. 1993. Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Research* 21: 871-78
- Muratovska A, Eccles MR. 2004. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Letters* 558: 63-68
- Mäe M, El Andaloussi S, Lundin P, Oskolkov N, Johansson HJ, et al. 2009. A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *Journal of Controlled Release* 134: 221-27

- Mäger I, Eiríksdóttir E, Langel K, El Andaloussi S, Langel Ü. 2010. Assessing the uptake kinetics and internalization mechanisms of cell-penetrating peptides using a quenched fluorescence assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798: 338-43
- Oskolkov N, Arukuusk P, Copolovici D-M, Lindberg S, Margus H, et al. 2011. NickFects, Phosphorylated Derivatives of Transportan 10 for Cellular Delivery of Oligonucleotides. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 17: 147-57
- Pan C, Xu S, Zhou H, Fu Y, Ye M, Zou H. 2007. Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 193-204
- Patel L, Zaro J, Shen W-C. 2007. Cell Penetrating Peptides: Intracellular Pathways and Pharmaceutical Perspectives. *Pharmaceutical Research* 24: 1977-92
- Pooga M, Hällbrink M, Zorko M, Langel U, et al. 1998. Cell penetration by transportan. *The FASEB Journal* 12: 67-77
- Raynaud FI, Orr RM, Goddard PM, Lacey HA, Lancashire H, et al. 1997. Pharmacokinetics of G3139, a Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide Antisense to bcl-2, after Intravenous Administration or Continuous Subcutaneous Infusion to Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 281: 420-27
- Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, et al. 2003. Cell-penetrating Peptides: A REEVALUATION OF THE MECHANISM OF CELLULAR UPTAKE. *Journal of Biological Chemistry* 278: 585-90
- Richardson SCW, Patrick NG, Lavignac N, Ferruti P, Duncan R. 2010. Intracellular fate of bioresponsive poly(amidoamine)s in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release* 142: 78-88
- SEIB, Philipp F, JONES, T. A, et al. 2006. *Establishment of subcellular fractionation techniques to monitor the intracellular fate of polymer therapeutics. I. Differential centrifugation fractionation B16F10 cells and use to study the intracellular fate of HPMA copolymer-doxorubicin*. London, ROYAUME-UNI: Informa Healthcare. 16 pp.
- Soomets U, Lindgren M, Gallet X, Hällbrink M, Elmquist A, et al. 2000. Deletion analogues of transportan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1467: 165-76

- Stetsenko DA, Gait MJ. 2000. Efficient Conjugation of Peptides to Oligonucleotides by “Native Ligation”. *The Journal of Organic Chemistry* 65: 4900-08
- Stewart KM, Horton KL, Kelley SO. 2008. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Organic & Biomolecular Chemistry* 6: 2242-55
- Zorko M, Langel Ü. 2005. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 529-45
- Tjelle TE, Brech A, Juvet LK, Griffiths G, Berg T. 1996. Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *Journal of Cell Science* 109: 2905-14
- Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, De Lima MCP. 2010. Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals* 3: 961-93
- Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Birnstiel ML. 1992. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 7934-38
- Wang W, , Li W, Nan Ma N, Steinhoff G. 2013. Non-Viral Gene Delivery Methods. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2013 14: 46-60
- Watson P, Jones AT, Stephens DJ. 2005. Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 43-61
- Wattiaux R, Laurent N, Wattiaux-De Coninck S, Jadot M. 2000. Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 41: 201-08
- Xiang S, Tong H, Shi Q, Fernandes JC, Jin T, et al. 2012. Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. *Journal of Controlled Release* 158: 371-78
- Yu B, Zhao X, Lee LJ, Lee R. 2009. Targeted Delivery Systems for Oligonucleotide Therapeutics. *The AAPS Journal* 11: 195-203

Raamatud:

Aguilar, M-I. (2004). HPLC of Peptides and Proteins. Methods and Protocols, p. 9- 11. Aguilar, M-I , Methods in Molecular Biology vol. 251. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Alberts, B. , Johnson, A., Lewis, J., Raff, M.,Roberts, K., Walter, P. (2008). Molecular Biology of The Cell.5th Edition, p 347-351. Alberts, B. , Johnson, A., Lewis, J., Raff, M.,Roberts, K.

Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R.(2004). Molecular Biology of the Gene.5th Edition , p 379- 400. Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. Pearson Education, Inc. , San Francisco.

Protokollid:

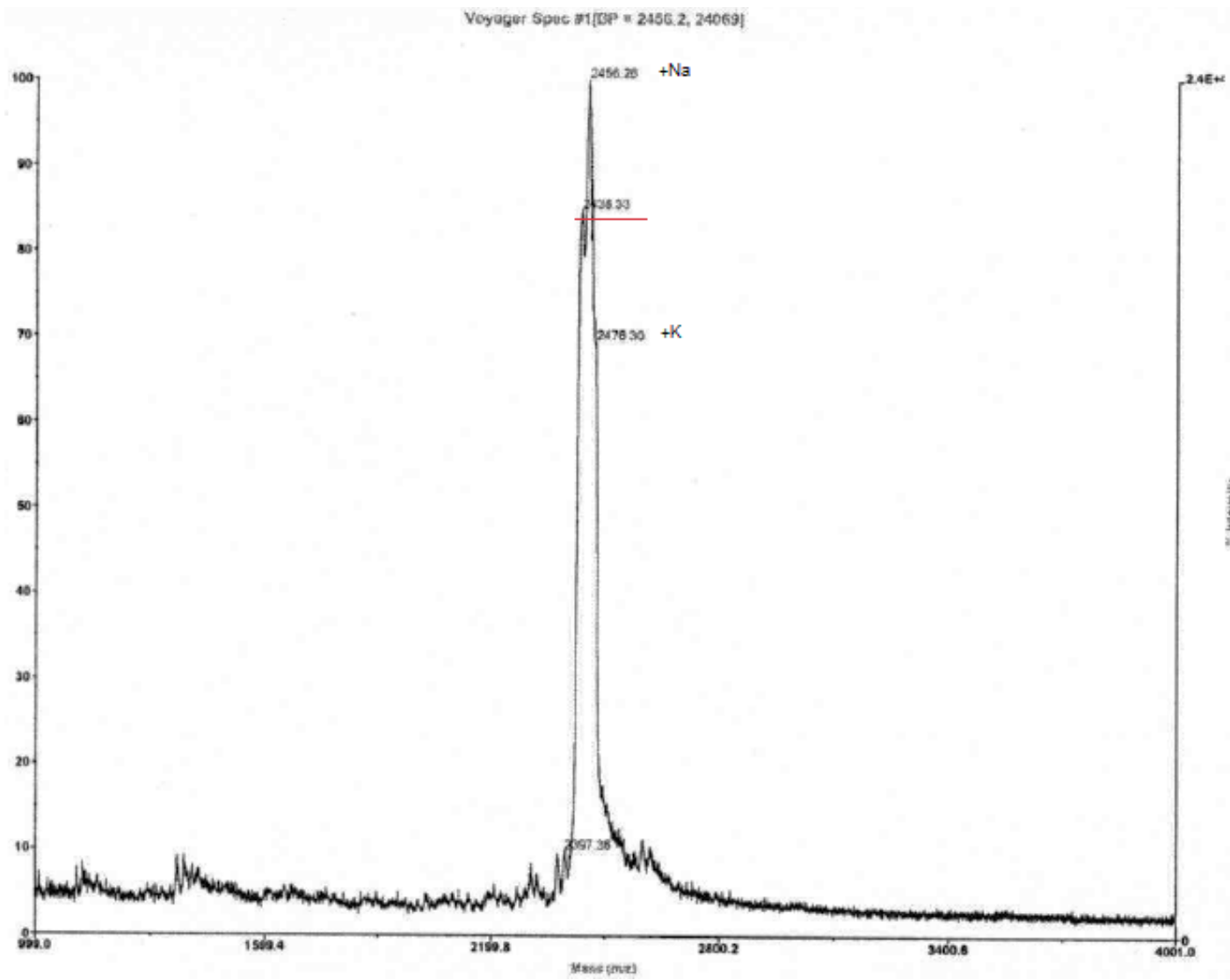
Sun, S. et al., *Analysis and quantification of oligonucleotides*. Biomarkers and Omics. AB SCIEX, USA

Percoll. Methodology and Applications. Amersham Biosciences

Strategies for Attaching Oligonucleotides to Solid Supports. Integrated DNA Technologies, 2011

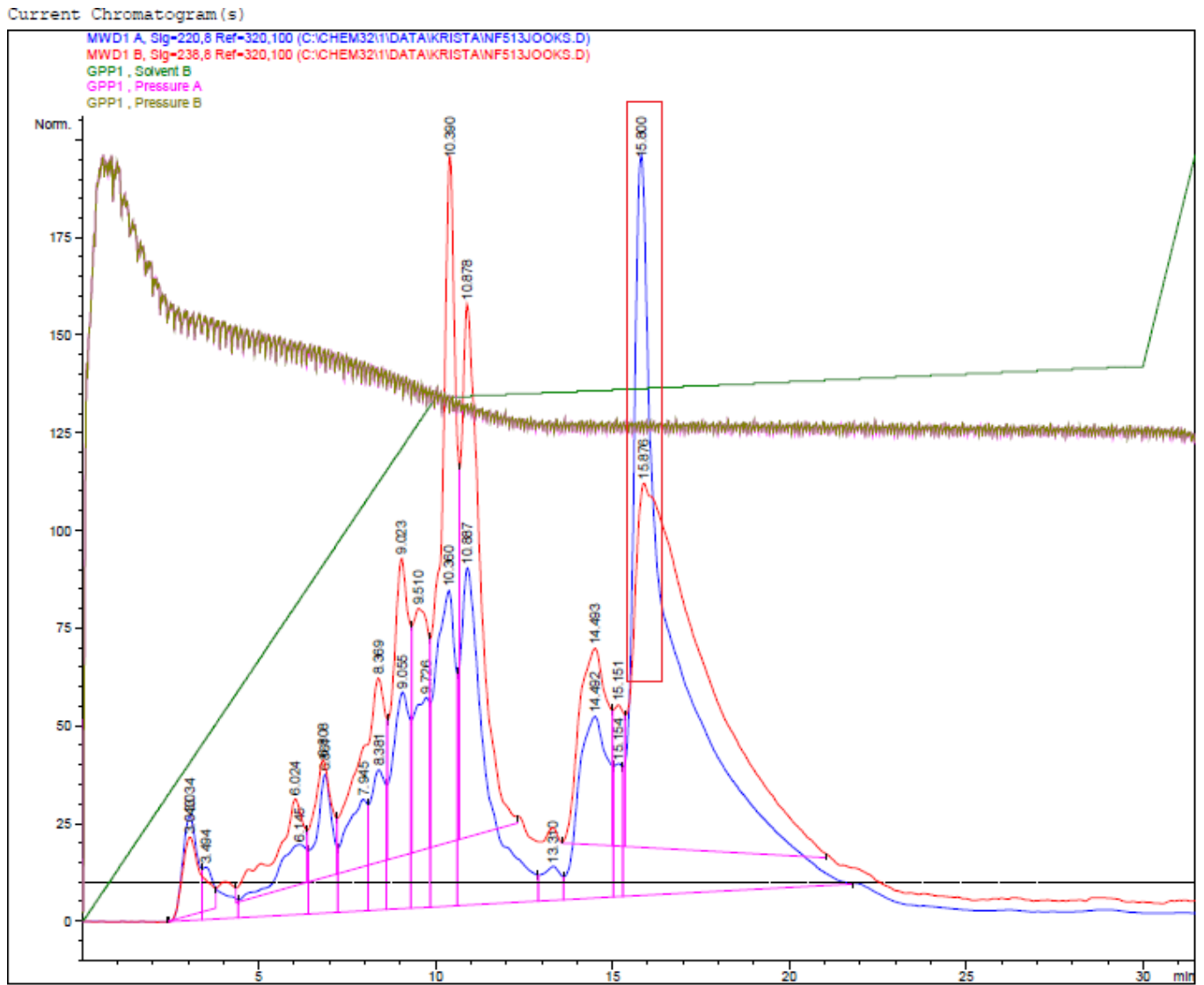
9 Lisad

9.1 Lisa 1



Lisa 1. Raku siseneva peptiidi Nickfect 51 massispekter.

9.2 Lisa 2



Lisa 2. Raku siseneva peptiidi Nickfect 51 RP-HPLC spekter.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Krista Freimann

(autori nimi)

(sünnikuupäev: 14.10.88)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Rakku siseneva peptiidi NF51 transfekteeritud oligonukleotiidi intratsellulaarne uurimine

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Piret Arukuusk, MSc, prof. Ülo Langel,

(juhendaja nimi)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.13 (*kuupäev*)