

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Margot Hein

**PEPTIID-VALK KOMPLEKSIDE VABASTAMINE ENDOSOOMIDEST
FOTODÜNAAMILISE EFEKTI ABIL JA NENDE LAGUNDAMINE RAKUS**

Magistritöö

Juhendajad: Helin Räägel, PhD

Prof. Margus Pooga, PhD

Tartu 2014

SISUKORD

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Rakku sisenevad peptiidid	6
1.2. RSP-de rakku sisenemise mehhanismid	7
1.2.1 Klatriin-sõltuv endotsütoos	9
1.2.2 Kaveoliin-sõltuv endotsütoos	11
1.2.3 Makropinotsütoos	11
1.2.4 TP10 sisenemismehhanism	12
1.3 Rakusisene sorteerimine	13
1.4 Fotodünaamiline efekt	14
1.4.1 Fotoinduktsiooni mehhanismid	15
1.4.2 Fotodünaamilise efekti rakendused	16
Töö eesmärgid	17
2. Eksperimentaalne osa	18
2.2 Materjal ja meetoodika	18
2.2.1 Kasutatud rakuliinid	18
2.2.2 Kasutatud RSP-d ja valgud	18
2.2.3 Streptavidiini seondumine biotinüleeritud TP10b(N) peptiidiga	19
2.2.4 Fotoinduktsioon, konfokaalmikroskoopia	19
2.2.5 Endosoomide karakteriseerimine, pH määramine	20
2.2.6 Endosoomide hapustumise inhibeerimine klorokviiniga	20
2.2.7 Endotsütoosi inhibeerimine	20
2.2.8 Toksilisuse test AnnexinV ja MTT meetodil	21
2.2.9 RSP-valk komplekside stabiilsuse hindamine	21
3. Tulemused	23
3.1 TP10b(N)–SA-AF633 komplekside puhul põhjustab fotoinduktsioon efektiivset endosoomidest vabanemist	23

3.2. Fotoinduktsiooni efektiivseks toimumiseks peab RSP olema lastmolekuli suhtes suures ülehulgas	26
3.3 Sobivaim aeg rakkude fotoindutseerimiseks on vähemalt 6 tundi pärast peptiidiga inkubeerimist	26
3.4 Lekkivaks muutuvad hilised, neutraalse pH-ga endosoomid	27
3.5 Fotoinduktsiooni toimumist võimaldavad endotsütoosirajad	29
3.6 Fotoinduktsioon ei ole rakkudele toksiline	32
3.7 Rakkudesse TP10-ga sisestatud valk on aktiivne ka 12h pärast fotoindutseerimist.....	34
Arutelu	37
Kokkuvõte	41
Summary.....	42
Kirjanduse loetelu.....	44

Kasutatud lühendid

AF	<i>Alexa Fluor</i>
AIPcS	alumiinium ftalotsüaniin sulfonaat
AP-2	adaptorvalk 2
BMP	bis(monoatsüülglütsero)fosfaat
CLSM	konfokaalne skaneeriv lasermikroskoopia
EGFR	epidermaalne kasvufaktori retseptor
EIPA	etüülisopropüülamiloriid
FITC	fluorestseiniisotiotsüanaat
FV1000	<i>FluoView1000</i>
HIV	inimese immuunpuudulikkuse viirus
LBPA	lüsobisfosfatidüülhape
MAP	amfipaatne mudelpeptiid
MEF	hiire embrüonaalne fibroblast
MTT	3-(4,5-dimetüül-tiasool-2-üül)-2,5-difenüül-tetrasooliumbromiid
NA	neutravidiin
NFDM	lössipulber
PEI	polüetüleenimiin
Pen	penetratiin
RIP	ribosoomi inaktiveeriv valk
ROCK	Rho-kinaas
ROI	analüüsitav piirkond (<i>region of interest</i>)
ROS	reaktiivne hapnikuühend
RSP	rakku sisenev peptiid (RSP, <i>cell penetrating peptide, CPP</i>)
SA	streptavidiin
siRNA	väike interferents RNA
STS	staurosporiin
TAMRA	karboksütetrametüülrodamiin
TP10	transportaan 10
TPPS2a,	disulfoonitud meso-tetrafenüülporfüriin
TPCS2a	disulfoonitud tetrafenüülkloriin
TRITC	tetrametüülrodamiin isotiotsüanaat
TxR	<i>Texas Red</i>

Sissejuhatus

Paljude potentsiaalsete ravimikandidaatide kasutuselevõtu takistuseks on saanud sobiva transpordimehhanismi puudumine, mille tõttu terapeutilised molekulid kas ei jõua soovitud sihtpunkti organismis, ei ole piisavalt spetsiifilised või avalduvad ravimi manustamisega kaasnevad kõrvaltoimed. Erinevate ainete transportimiseks rakkudesse on kasutusel mitmeid meetodeid: viirusvektorid, nanopartiklid, mikrosüstimine, elektroporatsioon, liposoomid, kuid paljude puhul neist on probleemiks madal efektiivsus, toksilisus ja/või vähene spetsiifilisus ning neid arendatakse pidevalt. Üheks paljulubavaks meetodiks ainete transportimiseks rakkudesse on rakku sisenevate peptiidide kasutamine.

Rakku sisenevad peptiidid (RSP-d) on lühikesed, kuni 30 aminohappe pikkused molekulid, millel on võime peamiselt endotsütoosi teel rakkudesse siseneda ning endaga kaasa viia ka erinevaid lastmolekule. Seega on need headeks potentsiaalseteks transpordimolekulideks, mida saaks kasutada nii biotehnoloogias kui ka terapeutilistel eesmärkidel. Nende eeliseks on madal tsütotoksilisus, võime siseneda paljudesse eri tüüpi rakkudesse ning erineva suuruse ja omadustega lastmolekulide rakkudesse transportimise võime.

RSP-d on näidanud väga efektiivset rakkudesse sisenemist, kuid üheks puuduseks on nende omadus jääda rakus endosoomidesse. pH langetamisel saavad endosoomidest lüsoosomid ning kui peptiid-valk kompleksid endosoomidest õigel ajal ei vabane, lagundatakse peptiid ja transporditav lastmolekul hüdrolyüütiliste ensüümide poolt. Lastmolekulide degradatsiooni vältimiseks endo-lüsoomaalses süsteemis on kasutatud erinevaid meetodeid, muuhulgas Ca^{2+} töötlust, klorokviinitöötlust, stearüülrühma lisamist ja viimasel ajal on uuritud ka fotodünaamilise efekti võimalusi. Antud töös kasutati endosoomidest vabanemise indutseerimiseks fotodünaamilist efekti, mis seisneb fotosensitiseerivate molekulidega töödeldud rakumembraanide destabiliseerimises valgusimpulsi toimetel (fotoinduktsioon).

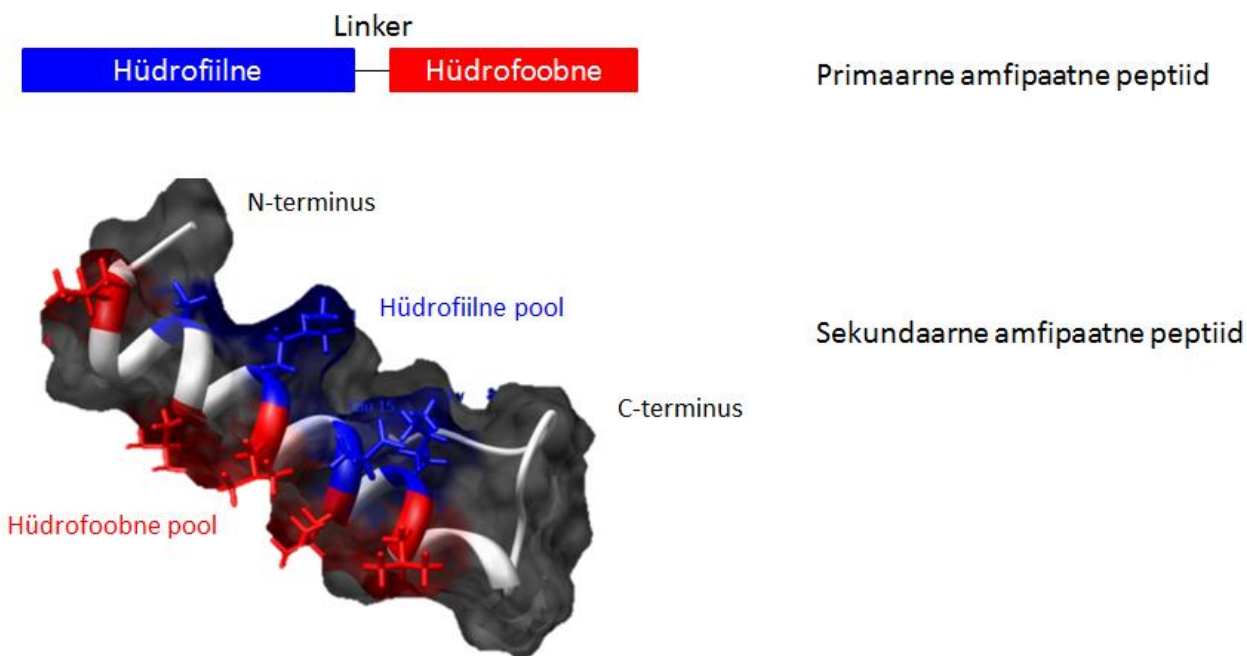
Töö eesmärgiks oli välja selgitada fotoindutseerimise efektiivsus lastmolekulide vabastamisel endosoomidest, kasutades fotosensitiseeriva ühendina kombinatsiooni fluorestseeruvast märgisest ja rakku sisenevast peptiidist TP10, ning karakteriseerida lekkivaks muutuvaid endosoomide. Lisaks uuriti ka fotodünaamilise efekti võimalikku toksilisust koekultuuri rakkudele ja endotsütoosimehhanisme, mis fotodünaamilise efekti toimumisel rolli mängivad.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Rakku sisenevad peptiidid

Rakku sisenevad peptiidid (RSP) on lühikesed katioonsed, enamasti kuni 30 aminohappest koosnevad järjestused, mis on võimelised rakku sisenema ja seejuures sinna transportima ka erinevaid molekule nagu siRNA, nukleiinhapped, valgud jm (Robert *et al.* 2012, Freire *et al.* 2013, Ramakrishna *et al.* 2014). Seetõttu peetakse neid ka potentsiaalselt headeks ravimitranspordi kandidaatideks (Meade *et al.* 2007, Song *et al.* 2011). Rakku sisenevaid peptiidide (RSP) ja valke on uuritud 1988. aastast, mil leiti, et HIV transkriptsioonivalgu transaktivaatori järjestus, Tat peptiid, on võimeline rakumembraani läbima (Green *et al.* 1988). Lisaks Tat peptiidile on ühed enim uuritud peptiidid veel penetratiin (Pen), mis pärineb äädikakärbse *Antennapedia* homeodomeenist (Liu *et al.* 2014), transportaan, mis koosneb neuropeptiid galaniini ja mastoparaani järjestusest (Pooga *et al.* 1998) ning erineva pikkusega polüarginiinid (Takechi *et al.* 2011).

RSP-d on üldjuhul positiivse laenguga ja mõned neist on amfipaatsed. Amfipaatus seisneb peptiidil mõlema, nii hüdrofoobse kui hüdrofiilse osa olemasolus (Joonis 1) ning see annab peptiidile eelise seonduda ühelt poolt elektrostaatiliste jõudude abil plasmamembraani komponentidega ning teisalt võimaldab interakteeruda ka hüdrofiilsete plasmamembraani komponentide ning lipiidse kaksikkihi pearühmadega (Yandek *et al.* 2007, Crombez *et al.* 2009). Katioonsed (positiivse laenguga) RSPd on näiteks penetratiin, polüarginiin, Tat peptiid. Amfipaatsetest on tuntumad transportaan ja MAP. Ka antud töös kasutatud peptiid TP10b(N) on positiivse laenguga ning kuulub amfipaatsete peptiidide hulka, sisaldades järjestuses nii hüdrofoobset kui ka hüdrofiilset osa (Song *et al.* 2011). Töös kasutatud TP10b(N) on N-otsast biotinüleeritud transportaani analoog järjestusega biotiin-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-amiid ning koosneb kahest osast: 6 aminohappe pikkune järjestus neuropeptiid galaniinist ja 14-aminohappeline järjestus herilase (*Vesputula lewisii*) mürgis sisalduvast mastoparaanist, mis on omavahel ühendatud lüsiinijärjestuse kaudu.



Joonis 1. Ampfipaatsse peptiidi struktuur. Ampfipaadne peptiid sisaldab nii hüdrofoobset kui hüdrofiilset järjestust. Sekundaarne amfipaadne peptiid (nt TP10) moodustab rakumembraaniga seondues alfa-heeliksi, moodustades poolused nii, et hüdrofoobne osa jääb ühele ning hüdrofiilne osa teisele poole. (Andreotti *et al.* 2006), modifitseeritud.

TP10 võib raku pinnaga interakteerudes moodustada amfipaatsse α -heeliksi, mis aitab peptiidil membraani lipiididega paremini seonduda ja see teeb ta lastmolekulide transportimisel efektiivseks (Eiriksdóttira *et al.* 2010, Song *et al.* 2011). Ampfipaatsete peptiidide eeliseks on sageli ka võime edukalt membraani lipiidstruktuure destabiliseerida, võimaldades mõningatel juhtudel ajutiste pooride teket (Anko *et al.* 2012, Almeida 2014, Islam *et al.* 2014). Seonduda aitavad veel lisaks elektrostaatilistele interaktsioonidele ka hüdrofiilsed interaktsioonid membraani pinnal olevate negatiivselt laetud struktuuridega, aga ka lipiidi pearühmadega ning hüdrofoobsed interaktsioonid membraanilipiidi sabaga (Hristova *et al.* 1999, Anko *et al.* 2012).

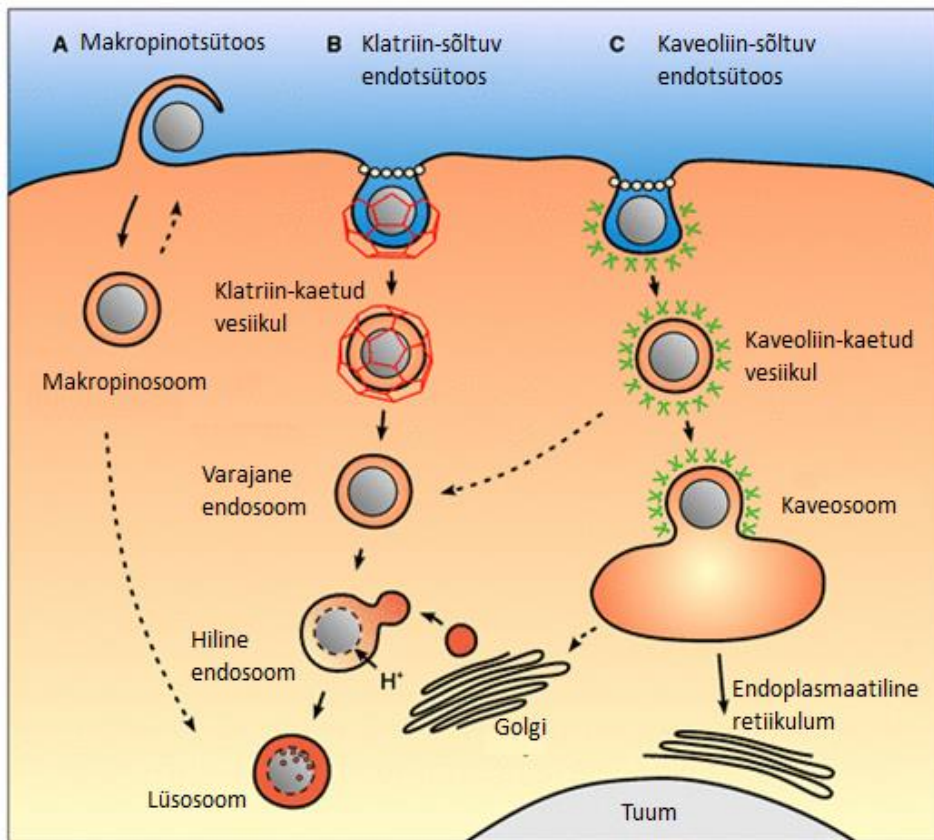
1.2. RSP-de raku sisenemise mehhanismid

Rakumembraan on selektiivseks barjääriks rakusisese ja -välise keskkonna vahel, takistades valikuliselt molekulide liikumist ühest keskkonnast teise, täites sellega rakkude kaitsefunktsiooni. Rakku sisenevad peptiidid on aga võimelised seda barjääri läbima, kas

tekitades poore (Deshayes *et al.* 2004, Ciobanasu *et al.* 2010, Islam *et al.* 2014) või indutseerides erinevate endotsütoosiradade aktiveerumist (Padari *et al.* 2005, Räägel *et al.* 2009). RSP-de puhul on kirjeldatud erinevaid rakkudesse sisenemise mehhanisme. Protsess algab RSP elektrostaatilisest interaktsioonidest raku plasmamembraani proteoglükaanidega, mis indutseerib rakku sisenemiseks vajaliku signaalraja aktivatsiooni (Belting *et al.* 2007, Amand *et al.* 2011).

Kui osade RSP-de puhul on näidatud, et nad üksi on võimelised membraani otse läbima, siis suuremate komplekside puhul, kui peptiid on koos transporditava lastmolekuliga, toimub sisenemine pea alati erinevate endotsütoosi radade kaudu (Bárány-Wallje *et al.* 2007, Mäger *et al.* 2012). Põhiliselt on kirjeldatud nende puhul klatriin- ja kaveoliin-sõltuva endotsütoosi (Säälik *et al.* 2004) ja makropinotsütoosi (Wu *et al.* 2014) ning mõnikord ka klatriin- ja kaveoliin sõltumatu endotsütoosi (Mayor *et al.* 2007) toimumist. Rakkudesse sisenemise mehhanism sõltub ka RSP märgistusest (kas on küljes fluorofoor või mitte), transporditava lastmolekuli omadustest ning sellest, kuidas lastmolekul peptiidi suhtes asetseb (Bárány-Wallje *et al.* 2007). On kirjeldatud ka mitme erineva mehhanismi esinemist samaaegselt (Asaia *et al.* 2014).

Antud töö keskendub eelkõige klatriin- ja kaveoliin-sõltuva endotsütoosi ning makropinotsütoosi osalusele TP10-lastmolekuli rakusiseses toimes, mistõttu alljärgnevalt kirjeldatakse eelkõige nende endotsütoosiradade toimemehhanisme.



Joonis 2. Pinotsütoosi mehhanismid (a) Makropinotsütoosi käigus moodustuvad aktiini filamentide osalusel membraanijätked, mille abil võetakse partiklid makropinosoomidesse ning suunatakse edasi raku sisemusse ning lõpuks lüsoosoomidesse. (b) Klatriin-sõltuva endotsütoosi puhul siseneb lastmolekul klatriin-kaetud vesiikulitesse, klatriinkate eemaldatakse ning vesiikul fuseerub varajase endosoomiga, kus toimub edasine sorteerimine. (c) Kaveoliin-sõltuva endotsütoosi puhul toimub sisenemine kaveoliin-kaetud vesiikulite teel, mis fuseeruvad endosoomidega, moodustades kaveosoomi. Kaveosoomist transporditakse endotsüteeritud molekul edasi lüsoosoomidesse, golgi kompleksi või endoplasmaatilisse retiikulumi. (Hillaireau *et al.* 2009), modifitseeritud.

1.2.1 Klatriin-sõltuv endotsütoos

Klatriin-sõltuv endotsütoos on eukarüootsetes rakkudes toimuv põhjalikult uuritud protsess, mille käigus endotsüteeritakse plasmamembraanist punguvate klatriin-kaetud vesiikulite abil rakkudes erinevaid retseptoreid, toitaineid, kasvufaktoreid jt molekule (Huang *et al.* 2004).

Klatriin-kaetud vesiikuli tekkimise protsessis osaleb üle kolmekümne erineva valgu (Conner *et al.* 2003), nendest peamised on:

- 1) adaptorvalgud nagu AP-2, epsiin jt, mis muudavad võimalikuks klatriini seondumise raku plasmamembraaniga ning osalevad endotsüteeritavate lastmolekulide selekteerimises (Nunez *et al.* 2011),
- 2) faktorid nagu GTPaas dünamiin ja selle seondumispartnerid, mis vahendavad punguva endosoomi eraldamist plasmamembraanist (Marks *et al.* 2001),
- 3) auksiliin ja Hsc70, mis vastutavad endotsütootiliselt vesiikulilt klatriinkatte eelmaldamise eest. See on vajalik selleks, et vesiikul saaks fuseeruda sihtmärkmolekuliga ning lastmolekuli soovitud kohta transportida (Böcking *et al.* 2011)

Klatriin-sõltuva endotsütoosi olulisus seisneb rakusisese signaliseerimise, toitainete omandamise ja membraanitranspordi protsesside läbiviimises (Huang *et al.* 2004). Endotsütoos algab lohu moodustumisega raku plasmamembraani sisemisel kihil, mis sisaldab klatriini, AP-2 adaptorvalgu kompleksi ning lisavalke. Klatriin ise ei ole võimeline plasmamembraani valkude või lipiididega seonduma ning selleks ongi vaja adaptorvalke. Need adaptorid on võimelised spetsiifiliselt seonduma ka endotsüteeritava lastmolekuliga, kindlustades selle transpordi vesiikulitesse. Adaptorvalgud käivitavad klatriinvõre moodustumise plasmamembraani spetsiifilistes kohtades ja lastmolekuli ning klatriini vahelise interaktsiooni. See omakorda viib membraani lohu tekkimise ning klatriin-kaetud vesiikuli pungumiseni (Kaksonen *et al.* 2003).

Vesiikuli eraldumiseks membraanilt on vaja GTPaas dünamiini. Dünamiin on justkui vedru ümber punguva vesiikuli kaela. GTP hüdrolyüüsi korral muutub dünamiini konformatsioon, see pinguldub, lõigates membraani sissesopistuse ühenduse membraaniga ning moodustub vabanenud vesiikul (Marks *et al.* 2001). Kui klatriin-kaetud vesiikulid on membraanist eraldunud, peavad nad enne edasi suunamist oma kattekihist vabanema. Selle eest vastutavad Hsc70 ja auksiliin. Klatriinkihist vabanenud vesiikulid fuseeruvad varajaste endosoomidega, kus toimub edasine sorteerimine. Klatriin-sõltuva endotsütoosi mehhanism on kujutatud joonisel 2.

1.2.2 Kaveoliin-sõltuv endotsütoos

Klatriin-sõltuva endotsütoosi kõrval on üheks levinud rakkudesse sisenemise mehhanismiks ka kaveoliin-sõltuv endotsütoos. Selles protsessis osalevad kaveoolid, 60-80 nm plasmamembraani sopistused, mis on rikastatud sfingolipiidide ja kolesterooliga, moodustades dimeere ja suuremaid oligomeere (Bastiani *et al.* 2010). Kaveoolid võtavad osa paljudest erinevatest rakulistest protsessidest nagu signaliseerimine, kolesterooli transport, rakkude kasvamine, mehaanilise stressi talumine ja erinevad transpordiprotsessid nagu transsütoos ning endotsütoos (Nabi *et al.* 2003, Hillaireau ja Couvreur 2009).

Kaveoliin-kaetud vesiikuli membraanist pungumine nõuab membraani invaginatsiooni tekkimist, millele järgneb formeerunud vesiikuli äralõikamine membraanist ja transportvesiikuli vabanemine. Kaveoolid moodustuvad raku plasmamembraanist läbi kaveoliin-1 ja kaveoliin-2 ATP-, GTP- ja Mg^{2+} sõltuva polümerisatsiooni. Vesiikuli eemaldab membraanilt dünaamiin, nagu klatriin-sõltuva endotsütoosigi puhul (Hillaireau ja Couvreur 2009).

Endotsütoosi käigus sisestavad kaveoolid rakkudesse erinevaid ligande ja fuseeruvad vesikulaarsete struktuuride, varajaste endosoomidega. Kaveoolide poolt sisestatud ligandid koonduvad endosoomidesse ja lõpuks lüsoosoomidesse, mitte-degradatiivse raja kaudu transpordivad kaveoolid erinevaid molekule ka endoplasmaatilisse retiikulumi ja Golgi kompleksi (Joonis 2).

1.2.3 Makropinotsütoos

Makropinotsütoos on protsess, mille käigus rakk omastab membraani jätkete (lamellopoodide) tekitatud vesiikulite abil rakuvälisest keskkonnast vedelikku ja selles sisalduvaid molekule makropinosoomidesse (Joonis 2). Tekkivad makropinosoomid on dünaamilised endotsütootilised struktuurid, mis suunatakse raku plasmamembraanilt mööda mikrotoobileid raku sisemusse. Selline süsteem võimaldab rakkudel ümbritsevast keskkonnast korraga suurel hulgal toitaineid omandada.

Arvatakse, et makropinotsütoos ei vaja spetsiifilise retseptori olemasolu, vaid aktiveerimine toimub kasvufaktorite (nt epidermise kasvufaktori retseptor EGFR) signaalraja kaudu, aktiini osalusel (Kerr *et al.* 2009). Aktiini polümeriseerumise tulemusena pungub

membraanist jätke, mille tagasilangemisel plasmamembraanile moodustub makropinosoom ning jätke ja membraani vahelisse tühimikku jääb ekstratsellulaarne vedelik ning selles leiduvad osakesed. Makropinosoomidega suudab rakk endotsüteerida paljusid erinevaid molekule ja ka erinevad RSP-d on võimelised makropinotsütoosi aktiveerima ning see teeb makropinotsütoosi potentsiaalselt efektiivseks terapeutiliste makromolekulide transpordirajaks.

1.2.4 TP10 sisenemismehhanism

TP10 on efektiivselt võimeline seonduma raku pinnaga läbi elektrostaatiliste ja hüdrofoobsete interaktsioonide ning üksi võimeline ka membraani läbima, kuid lastmolekuli lisamine peptiidile takistab otsese penetratsiooni toimumise läbi plasmamembraani. Sellised kompleksid transporditakse RSP-de abil läbi endotsütootiliste protsesside, näiteks erinevate plasmamembraanilt punguvate vesiikulite vahendusel (Säälik *et al.* 2009).

TP10-ga vahendatud transpordimehhanisme ning rakusisest sorteerimist on palju uuritud (Lundin *et al.* 2008, Mäger *et al.* 2012), näiteks elektronmikroskoopia katsed (Padari *et al.* 2005) on näidanud, et TP10-streptavidiin kompleksid sisenevad rakkudesse peamiselt makropinotsütoosi, vähemal määral ka klatriin- ja kaveoliin- sõltuva endotsütoosi teel ning paiknevad 10 minuti jooksul inkubeerimisest kortikaalses tsütoplasmas. Hiljem, 1-2 tunni jooksul levivad transportaan-streptavidiin kompleksid üle tsütoplasma, olles enamasti vesikulaarsetes struktuurides. Rakku sisenenud peptiid-valk kompleksidide agregaadid paiknevad peamiselt korrapärase kujuga vesiikulites, viidates endo-lüsoomaalsele rajale (Padari *et al.* 2005). Osad uurimused viitavad ka transportaan-streptavidiin komplekside paiknemisele kaveosoomi sarnastes struktuurides, peamiselt kortikaalses tsütoplasmas (Säälik *et al.* 2009), millest võib järeldada, et RSP-lastmolekul kompleksid on võimelised kasutama erinevaid endotsütoosi radasid samaaegselt. Seda tõestavad ka katsed inhibiitoritega erinevate endotsütoosiradade inhibeerimisel (Mäger *et al.* 2012).

1.3 Rakusisene sorteerimine

Endosoomid sorteerivad membraan-seotud valke ja lipiide erinevatesse transpordiradadesse. Varajased endosoomid (pH 6.8–5.9) on esimesed endotsütootilised organellid, mis sorteerivad keskkonnast omastatud molekule. See on valkude ja lipiidide transpordirajas oluliseks etapiks, sest just varajases endosoomis tehakse peamine otsus - kas need komponendid sorteerida või lüsoosoomides lagundada. Kui molekulid suunatakse degradatiivse raja kaudu lagundamisele, siis varajases endosoomis on spetsiifilised domeenid, kus endosoomi membraan remodelleeritakse moodustama intraluminaalseid vesiikuleid. Endosoomi eluea jooksul koguneb neid vesiikuleid endosoomi järjest rohkem ja varajane endosoom muutub hiliseks endosoomiks (teatakse ka nimega multivesikulaarne keha). Paralleelselt transporditakse endosoomi lumenisse membraanitranspordiga degradatiivsed proteaasid ning endosoomi sisene pH langetatakse prootonpumpade abil (hilises endosoomis on pH 6.0–4.9) (Huotari *et al.* 2011). Hilised endosoomid fuseeruvad lüsoosoomidega (pH ~4.5), moodustades hübriidorganelli, kus luumeni sisu, kaasa arvatud need lastmolekule sisaldavad intraluminaalsed vesiikulid, lagundatakse pH-tundlike ensüümide toimel (Geuze *et al.* 2001).

Osa endotsüteeritud molekulidest (nt erinevad plasmamembraani retseptoreid) aga ei saadeta rakus lagundamisele, vaid sorteeritakse varajases endosoomis ja transporditakse tagasi plasmamembraanile või muudesse rakusisestesse sihtkohtadesse (nt Golgi kompleksi). See saavutatakse nende molekulide suunamisega tubulaarsetesse endosomaalsetesse subdomeenidesse, mis reguleerivad membraanset transporti (Weeringa *et al.* 2012). Üks endosoom võib moodustada mitu erinevat sorteerimistuubulit, millesse valitud molekulid kontsentreeruvad ning mille abil need vajalikku lõppsihtkohta suunatakse. Pidevalt moodustuvad uued sorteerimistuubulid, mis teeb selle võrgustiku väga dünaamiliseks. Erinevad endotsütoosirajad juhivad endotsüteeritud molekuli kas lagundavatesse organellidesse (lüsoosoomid), plasmamembraanile, endoplasmaatilisse retiikulumi või Golgi kompleksi.

Antud töös kasutatud RSP TP10 sorteeritakse rakus sarnaselt eespool kirjeldatud degradatiivse raja mehhanismidele. Elektronmikroskoopia abil tehtud uurimused (Padari *et al.* 2005) on näidanud, et kui inkubeerida rakke transportaan-streptavidiin kompleksidega, siis 20-72

tunni pärast on kompleksid kontsentreerunud hiliseid endosoomide ja lüsoosoomide meenutavatesse struktuuridesse. Mõned partiklid olid ka difuusselt tsütoplasmas, viidates võimalikule endosoomi membraani destabiliseerumisele. Valdavalt jäävad TP10 kompleksid aga siiski endosoomidesse (Padari *et al.* 2005). See näitab, et rakk suudab sisenenud materjali lagundada ning seega väheneb komplekside akumulatsioon ning sellega kaasneva toksilisuse oht. Kuna aga ka transporditavate RSP-valk komplekside efektiivsus sellega seoses langeb, siis RSP-vahendatud lastmolekulide transpordis efektiivsuse suurendamiseks on vaja täiustada endosoomidest vabastamise meetodeid.

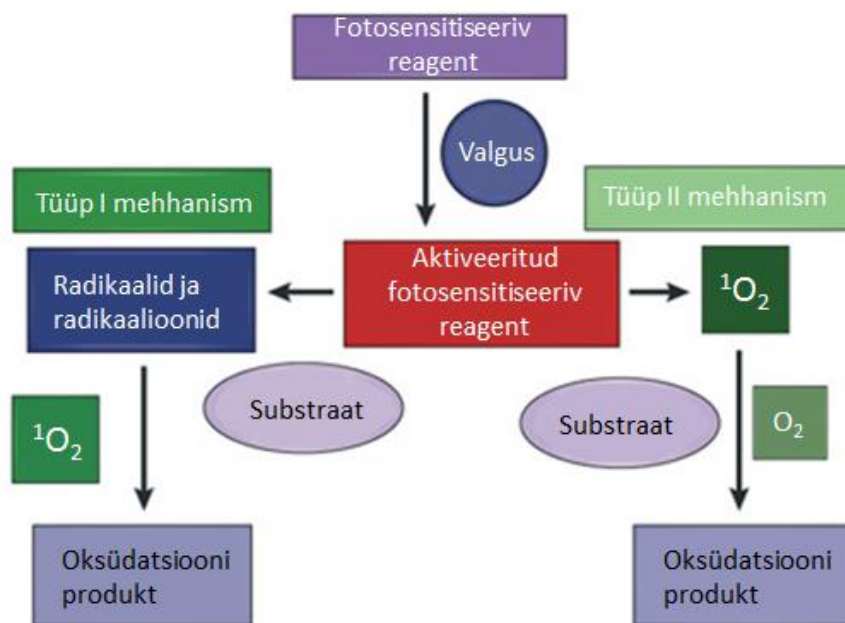
1.4 Fotodünaamiline efekt

Fotodünaamiline teraapia on juba varem tuntud ja kasutusel olev meetod (Moan *et al.* 2003), kuid fotodünaamilise efekti abil makromolekulide endosoomidest vabastamise tehnoloogia töötati välja Norra Radium haiglas 1999. aastal (Berg *et al.* 1999). Fotodünaamiline teraapia seisneb valguse, hapniku ja fotosensitiseeriva molekuli koostoimel tekkivas reaktsioonis, mis destabiliseerib raku membraani ja kutsub seeläbi esile rakusurma. Seda tehnoloogiat on kasutatud näiteks vähiteraapias, indutseerides vähirakkudes apoptoosi ja nekroosi. Lisaks sellele on fotodünaamilise efekti kaudu võimalik ka samamoodi valguse, hapniku ning fotosensitiseeriva molekuli abil vabastada endosoomidest makromolekule rakke kahjustamata (Maiolo *et al.* 2004), seda protsessi nimetatakse fotoinduktsiooniks ehk fotodünaamiliseks efektiks. Sõltuvalt eesmärgist (kas rakkude apoptoosi suunamine või endosoomidest põgenemise indutseerimine) valitakse vastav fotosensitiseeriv molekul. Tuntuimad neist on näiteks Bengaali roosa, TPPS2a, AIPcS ja TPCS2a. Viimasel ajal on aga hakatud uurima fotosensitiseeriva reagentina ka RSP-fluorofoor ühendit, nt fluorestseiin-R7W, Tat-TAMRA jt. (Maiolo *et al.* 2004, Meerovich *et al.* 2014).

Rakendatavad fotosensitiseerivad molekulid paiknevad üldjuhul endosoomide ja lüsoosoomide membraani (Rosenkranz *et al.* 2000), samas on täheldatud nende jõudmist ka mitokondritesse (Oleinick *et al.* 2002), tuuma (Patito *et al.* 2001) ja jäämist rakumembraani (Rosenkranz *et al.* 2000). Fotoinduktsiooni käivitamiseks kasutatakse enamasti laserit, kuna laseri abil saavutatakse piisavalt tugev valgusimpulss ning lisaks on võimalik valida kindla lainepikkusega ergastus ja fotosensitiseerivale molekulile vastav neelduvusvahemik.

1.4.1 Fotoinduktsiooni mehhanismid

Fotoinduktsiooni puhul on kirjeldatud kahte mehhanismi: tüüp I ja tüüp II, mille põhiline erinevus seisneb esimeses etapis (Joonis 3). Tüüp I mehhanismi puhul reageerib ergastatud fotosensitiseeriv molekul lähedalasuva substraadiga, nt rakumembraaniga. Selle käigus tekkivad radikaalid reageerivad molekulaarse hapnikuga ning moodustuvad reaktiivsed hapnikuühendid nagu peroksiidid või singletne molekulaarne hapnik. Tüüp II puhul, mis on fotodünaamilise efekti puhul enim levinud variant, reageerib ergastatud fotosensitiseeriv molekul kõigepealt hapnikuga, moodustades singletse molekulaarse hapniku ning see reageerib substraadiga (Redmond *et al.* 2006). Singletsel hapniku molekulil on väga väike difusiooniulatus (10-20 nm) ja lühike eluiga (<200 ns) (Niedre *et al.* 2005). Fotodünaamilise efekti mõistes on see kasulik, kuna see suurendab fotodünaamilise teraapia spetsiifilisust. Singletses olekus hapniku molekul on võimeline oksüdeerima aminohappeid (trüptofaan, tsüsteiin, histidiin, metioniin), küllastumata rasvhappeid ja kolesterooli, mõjutades sellega membraani stabiilsust (Dennis *et al.* 2003).



Joonis 3. Fotodünaamilise efekti tüüp I ja tüüp II mehhanism. Fotosensitiseeriv reagent ergastatakse valguse toimel ning aktiveerituna reageerib see substraadiga (tüüp I), tekitades radikaalid. Radikaalid reageerivad molekulaarse hapnikuga, mille tagajärjel tekib singletne hapnik. Tüüp II puhul reageerib aktiveeritud fotosensitiseeriv reagent otse molekulaarse hapnikuga, põhjustades singletse hapniku tekke. Modifitseeritud, (Dennis *et al.* 2003).

Fotodünaamilise efekti füsioloogilisi mõjusid on uuritud nii raku tasandil, kudedes kui ka katseloomades *in vivo* (Nishiyama *et al.* 2005, Selbo *et al.* 2010) ning leitud, et toksilisuse avaldumise määr sõltub mitmetest faktoritest, sealhulgas kasutatavast fotosensitiseerivast molekulist, kontsentratsioonidest, valguse intensiivsusest kiiritamisel ja kiiritamise ajalisest kestvusest. Kui fotoindutseerimise eesmärgiks on rakusurm (nt vähiteraapias), siis on tsütotoksilisus oodatud efekt, kuid kui seda meetodit soovitakse kasutada lastmolekuli efektiivsemaks vabanemiseks endosoomidest, siis on oluline toksilisust vältida, et rakk selle tõttu ei kahjustuks.

Mitmetes uurimustes kasutatatud fluorestseeruv Tat peptiid tetrametüülrodamiiniga (Tat-TAMRA) omab kiiritamisel rakkudele toksilist efekti (Srinivasan *et al.* 2011, Muthukrishnan *et al.* 2012). Fluorokroomiga konjugeeritud Tat seondub raku membraaniga ning fotoinduktsioonil vabanevad reaktiivsed ühendid muudavad peptiidi bioloogiliste membraanide suhtes fotolüütiliseks. Samas aga kutsub Tat-TAMRA esile ulatusliku rakkude hävimise, mis lastmolekuli endosoomist vabanemise eesmärki silmas pidades on äärmiselt ohtlik kõrvalnähtus.

Antud töös uuritakse, kas TP10-t koos fluorofooriga on võimalik kasutada fotodünaamilise efekti koostoimel lastmolekuli vabanemiseks endosoomidest, ilma et see tooks kaasa massilise rakkude hävimise.

1.4.2 Fotodünaamilise efekti rakendused

Fotodünaamilist efekti on edukalt kasutatud erinevate molekulide vabastamiseks endosoomidest fotosensitiseerivate reagentide abil nii *in vitro* kui *in vivo* eksperimentides, näiteks ribosoomi inaktiveeriva valgu (RIP) abil valgusünteesi inhibeerimisel (Selbo *et al.* 2000), siRNA abil geenivaigistamisel (Matsushita-Ishiodori *et al.* 2012), bleomütsiini abil vähirakkude kasvu takistamisel *in vitro* ja *in vivo* (Berg *et al.* 2005) ning ribosoomi inaktiveeriva valgu geloniin vahendusel valgusünteesi inhibeerimisel *in vivo* (Selbo *et al.* 2001).

Selle tehnoloogia üheks põhiliseks eeliseks terapeutilistel eesmärkidel rakendamisel on spetsiifilisus. Kuna fotosensitiseerivad molekulid on aktiveeritavad valguse toimele, siis on võimalik fotodünaamiline efekt esile kutsuda kindlat ala valgustades nii, et teistes piirkondades fotosensitiseeriv molekul mõju ei avalda. Fotodünaamilise efekti abil saab optimeeritud

tingimustel endosoomidest vabastada nii makromolekule kui väiksemaid terapeutilisi molekule (Selbo *et al.* 2010), seega on fotoinduktsioon paljulubav tehnoloogia terapeutiliste molekulide tsütosoolseks transportimiseks *in vitro* ja *in vivo*.

Töö eesmärgid

Rakku sisenevad peptiidid suudavad efektiivselt mitmesuguseid lastmolekule rakkudesse transportida, kuid kuna sisenemine toimub enamasti endotsütootiliste protsesside teel, jäävad peptiidid koos transporditavate molekulidega endosoomidesse. Kuna aga enamus terapeutilisi sihtmärke paikneb endosoomidest väljaspool, näiteks tsütoplasmas, tuumas või mõnes muus organellis, on oluline, et lastmolekul vabaneks endosoomidest. Lisaks sellele toimub endo-lüsoomaalse raja endosoomides aktiivne pH langetamine, tekitades ohu, et transporditavad molekulid lagundatakse endo-lüsoomaalses rajas enne kui molekul jõuab rakus soovitud efekti avaldada. Üks võimalus selle probleemi ületamiseks on endosoomidest väljumise esile kutsumine rakku siseneva peptiidi, fluorofoori ning valgusimpulsi koostoimel, indutseerides fotodünaamilise efekti tekke, mis kutsub esile endosoomide lõhkumise ning lastmolekuli vabanemise raku tsütosooli.

Antud töö eesmärgiks oli:

- 1) Selgitada välja optimaalseimad tingimused fotoinduktsiooni toimumiseks:
 - sobiv fluorofoor ja lastmolekul,
 - optimaalne RSP:valk kontsentratsioonide suhe,
 - optimaalne inkubatsiooniaeg.
- 2) Iseloomustada fotoinduktsiooni toimel lekkivaks muutuvate endosoomide omadusi.
- 3) Analüüsida erinevate endotsütoosiradade osalust lekkivaks muutuvate endosoomide tekkel.
- 4) Kontrollida fotoinduktsiooni võimalikku toksilisust rakkudele.
- 5) Analüüsida transporditava lastmolekuli funktsionaalsuse säilimist rakus.

2. Eksperimentaalne osa

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud rakuliinid

Hiina hamstri munasarja rakke (CHO) kultiveeriti F-12 söötmes (PAA Laboratories GmbH, Austria), mis sisaldas 10% veiseloote seerumit (FBS, PAA Laboratories, Austria), 100 IU/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomüsiini (Gibco, Invitrogen, USA). Rakke kasvatati veeauruga küllastatud inkubaatoris 5 % CO₂ keskkonnas 37 °C juures ning jagati iga 2 päeva tagant.

Kaveoliin-sõltuva endotsütoosi uurimiseks kasutati paralleelselt metsiktüüpi hiire embrüonaalseid fibroblaste (MEF) ja Kaveoliin-1 knock-out MEF-e (MEF cav-). Mõlemad MEF rakke kultiveeriti IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) söötmes (Gibco, Invitrogen, UK), millele oli lisatud 10% veiseloote seerum (FBS, PAA Laboratories, Austria), 100 IU/ml penitsilliin ja 100 µg/ml streptomüsiin (Gibco, Invitrogen, USA). Kasvatamis- ja jagamistingimused olid samad, mis CHO rakkude puhul.

2.2.2 Kasutatud RSP-d ja valgud

Peptiid TP10b(N) sünteesiti ABI 433A peptiidisüntesaatoriga (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) Ü. Langeli töögrupi poolt TÜ Tehnoloogiainstituudis või Stockholmi ülikoolis (Arukuusk *et al.* 2013) kirjeldatud meetodil.

RSP-valk komplekside moodustamiseks inkubeeriti 4 µM N-otsast biotinüleeritud TP10 (TP10b(N)) ja 500 nM Alexa Fluor 633 märgisega streptavidiin (SA-AF 633, Invitrogen, UK) 5 minuti jooksul deioniseeritud vees toatemperatuuril. Et võrrelda erinevaid fluorestseeruvaid märgiseid ja nende võimet destabiliseerida endosoomi, kasutati TP10b(N)-ga komplekside moodustamiseks ka Texas Red märkega neutravidiini (NA, Invitrogen, UK) ning FITC või Texas Red märkega avidiini (Invitrogen, UK). Erinevad katsetatud moolisuhted olid 3:1, 5:1 ja 8:1.

2.2.3 Streptavidiini seondumine biotinüleeritud TP10b(N) peptiidiga

TP10b(N)- Streptavidiin-Alexa Fluor 633 kompleksid (suhtes 1:1 kuni 8:1) moodustati 5 minuti jooksul toatemperatuuril. Seejärel lisati lahjenduspuhver (0.25M Tris pH6.8 ja 20% glütserool) ning proove analüüsiti geelelektroforeesi abil, kandes need SDS-vabas Tris puhvril (pH~8.3) (0.025M Tris pH 8.3 ja, 0.192M glütsiin) 10% PAGE geelile. Fluorestsentsi visualiseeriti Typhoon Trio abil (GE Healthcare, USA), ergastades streptavidiini küljes olevat fluorofoori.

2.2.4 Fotoinduktsioon, konfokaalmikroskoopia

Fotoinduktsiooni läbiviimiseks kasutati meetodit, mis seisnes rakkude inkubeerimises peptiid- Valk kompleksidega 1 tunni jooksul seerumivabas söötmes ning seejärel 1, 3, 6, 12 või 24 tunni pikkuses järelinkubatsioonis seerumiga söötmes.

Selleks külvati kaks päeva enne katse läbiviimist 8000 – 10 000 CHO rakku 8-kambrilisele alusklaasile (Lab-Tek, Nalge Nunc International, NY). Katse läbiviimise päeval inkubeeriti rakke kas TP10b(N)-SA-AF 633, TP10b(N)-NA-Texas Red, TP10b(N)-avidiin-Texas Red või TP10b(N)-SA-FITC kompleksidega seerumivabas F-12 söötmes (Gibco, UK) 1 tund 37 °C juures. Pärast 1 tunni inkubatsiooni pesti rakke viis korda 0,5 mg/ml hepariini sisaldava PBS-iga, et eemaldada rakkude membraanilt seondunud, kuid sisenemata jäänud kompleksid. Seejärel inkubeeriti rakke inkubatsioonikapis veel 1, 3, 6, 12 või 24 tundi seerumiga söötmes ning vahetult enne mikroskoobiga visualiseerimist vahetati sööde fenoolpunaseta ehk värvitu F-12 söötme vastu (Gibco, UK).

Rakkudes olevaid komplekse visualiseeriti 37 °C juures Olympus IX81 mikroskoobiga, millel on FluoView 1000 CLSM konfokaalsüsteem (Olympus, Jaapan) ja elusrakkude vaatamiseks sobivate tingimuste säilitamiseks termostateeritav kamber (Okolab, Itaalia). Fotoinduktsiooni teostamiseks rakkudes kasutati kas rakkude 10 sekundi pikkust valgustamist elavõhbedalambiga, kasutades 545-580 nm filtrit või 1 minut kestvat ergastamist 635 nm laseriga (laseri võimsus 10%). 545-580 nm filtriga elavõhbedalambi korral oli kasutusel 60x suurendusega vesiimmersioon objektiiv ning 635 nm laseri puhul 100x õliimmersioon objektiiv.

Laserite ergastus lainepikkused olid FITC ja Alexa Fluor 488 puhul 488 nm, Texas Red puhul 559 nm ja Alexa Fluor 633 puhul 635 nm. Rakke pildistati enne ja pärast fotoindutseerimist, osad joonised avaldatud Räägel *et al* 2013.

2.2.5 Endosoomide karakteriseerimine, pH määramine

Kaks päeva enne katse läbiviimist külvati 8000 – 10 000 CHO rakku 8-kambrilisele alusklaasile (Lab-Tek, Nalge Nunc International, NY) ning teostati peptiid-valk kompleksidega töötlus ja fotoinduktsioon nagu eelnevalt kirjeldatud. Endosoomide pH taseme hindamiseks kasutati 2 μ M LysoSensor markerit (Invitrogen, UK), mis annab pH-st sõltuva intensiivsusspektri happelises keskkonnas, vahemikus pH 4.5 - 6. LysoSensor lisati söötmesse 2 tundi enne rakkude fotoindutseerimist ja visualiseerimist ning LysoSensori signaali intensiivsust hinnati vaatlusel Olympus IX81 mikroskoobiga nagu eelnevalt kirjeldatud. Kvantifitseerimine teostati FluoView 1000 programmiga, määrates piltidel manuaalselt huvipakkuvad piirkonnad (ROI, *region of interest*). FluoView 1000 abil saadud intensiivsuste väärtuseid analüüsiti Microsoft Excel programmi abil.

2.2.6 Endosoomide hapustumise inhibeerimine klorokviiniga

Et kontrollida, kas fotoinduktsiooni efektiivsus sõltub endosoomide pH-tasemest, töödeldi rakke klorokviiniga, mis takistab nende vesiikulite hapustumist, pärssides happelist keskkonda vajavate ensüümide toimet. Selleks inkubeeriti CHO rakke 8-kambrilisel alusklaasil (Lab-Tek, Nalge Nunc International, NY) 8:1 TP10b(N)-SA-AF 633 kompleksidega 1 + 6 h koos või ilma 100 μ M klorokviiniga. Fotoinduktsioon elavhõbedalambi ning 635 nm laseriga teostati Olympus IX81 mikroskoobiga nagu eelnevalt kirjeldatud.

2.2.7 Endotsütoosi inhibeerimine

Kaks päeva enne katse läbiviimist külvati 8000 - 10 000 CHO rakku 8-kambrilisele alusklaasile. Katse läbiviimise päeval töödeldi rakke 0,5 tundi inhibiitoriga (30 μ M kloorpromasiin, 100 μ M genisteiin või 100 μ M EIPA), et vastavaid endotsütoosimehhanisme pärssida. Sellele järgnes 1 tund töötlust peptiid-valk kompleksidega (4 μ M TP10b(N) ja 500 nM SA-AF 633) inhibiitori juuresolekul ning 6 tundi järelinkubatsiooni kompleksideta söötmes 37 °C

juures, millest 3 või 6 tundi oli lahuses ka 30 μM või 100 μM inhibiitor (kloorpromasiin, genisteiin või EIPA) klatriin-, kaveoliin-sõltuva endotsütoosi või makropinotsütoosi mahasurumiseks. Inhibiitorite toimet fotoinduktsiooni toimumisele hinnati Olympus IX81 mikroskoobiga nagu eelnevates katsetes.

Lisaks inhibiitor genisteiini toimele kasutati kaveoliin-sõltuva endotsütoosiraja olulisuse uurimiseks ka hiire embrüonaalse fibroblasti kaveoliin-defektseid (MEF cav-) rakke ning teostati fotoinduktsioon nagu eelnevates katsetes kirjeldatud.

2.2.8 Toksilisuse test AnnexinV ja MTT meetodil

Kaks päeva enne katse teostamist 8-kambrilisele alusklaasile (Lab-Tek, Nalge Nunc International, NY) külvatud CHO rakke inkubeeriti 1 tund TP10b(N)-SA-AF633 kompleksidega ning 6 tundi kompleksideta söötmes nagu eelnevalt kirjeldatud. 30 minutit enne visualiseerimist lisati rakkudele 1:100 suhtes AnnexinV-Alexa Fluor 488 (Invitrogen, UK). Fotoinduktsioon elavhõbedalambi ning 635 nm laseriga teostati Olympus IX81 mikroskoobiga nagu eelnevalt kirjeldatud. Kontrollina kasutati 10 μM staurosporiini, mis lisati rakkudele 3 tundi enne visualiseerimist. Kõik rakud, millel oli pärast indutseerimist näha Annexin V märke, loeti Annexin V positiivseks, olenemata signaali intensiivsusest.

MTT katse puhul külvati 50 000 CHO raku 24-kaevulise plaadi (Santa Cruz Biotechnology, USA) kannu kohta ja kasvatati üleöö F-12 söötmes (Gibco, Invitrogen, UK). Rakke inkubeeriti 1 tund TP10b(N)-SA-AF633 kompleksidega 37 °C juures ning 6 tundi seerumiga F-12 söötmes nagu eelnevalt kirjeldatud. Seejärel asendati sööde 0,5 mg/ml MTT [3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüül-tetrasooliumbromiid] lahusega seerumiga söötmes ning inkubeeriti 4 tundi 37°C juures. Tekkinud sade (MTT formasaan) lahustati samas mahus 20% SDS-iga 0,02 M HCl-s üleöö toatemperatuuril ning lahuse optiline tihedus mõõdeti spektrofotomeetriga (Genios plus, Tecan, Austria) lainepikkusel 540 nm. Andmeanalüüs teostati Microsoft Exceliga.

2.2.9 RSP-valk komplekside stabiilsuse hindamine

6-kannulisele koekultuuriplaadile (Santa Cruz Biotechnology, USA) külvati 2.5×10^5 CHO raku /kann. 1 päeva pärast inkubeeriti rakke 1 tund RSP-valk kompleksidega nagu

eelnevates katsetes. Pärast inkubatsiooni pesti rakke 5 korda 0.5 mg/ml hepariini sisaldava PBS-iga, et eemaldada rakkude pinnalt sisenemata jäänud kompleksid ning inkubeeriti kompleksideta söötmes veel 2, 5, 11, 23 või 47 tundi. Seejärel pesti rakke 2x PBS-iga, teostati 15-minutiline trüpsiinitöötlus ning koguti rakud kokku. Rakud tsentrifugeeriti 2500 rpm lauatsentrifuugiga 5 minuti jooksul ning 50 mg sademe kohta lisati 1 ml mitte-denatureerivat puhvrit (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% sahharoos, bromofenool sinine). Rakke tsentrifugeeriti 10000 rpm juures 5 minutit ning saadud supernatant sisaldas mitte membraaniseoselist ehk tsütosoolset (ND) fraktsiooni kompleksidest. Membraaniseoselise (D) fraktsiooni saamiseks lahustati tsentrifugeeritud rakusade, lisades 50 mg sademe kohta 1 ml 4x SDS proovipuhvrit ning sonikeerides rakke 10 minuti jooksul intervalliga 1 minut sonikeerimist ja 30 sekundit pausi (Bioruptor, Diagenode, Belgia).

Fraktsioneerimistulemusi kontrolliti Western Blot meetodi abil, 10% PAGE geelis (Makarava *et al.* 2008). Valgud kanti geelilt PVDF membraanile (Perkin Elmer, USA), blokeerimiseks kasutati 10% NFDN ning antikehaga inkubeerimiseks 1% NFDN lahust. Mitte membraaniseoselise ehk tsütoplasmaatilise (ND) fraktsiooni tuvastamiseks kasutati Rho-kinaas (ROCK), kitse polükloonaalset anti-ROCK1 antikeha 1:250 lahjenduses, (Santa Cruz Biotechnology, USA) ning membraaniseoselise (D) fraktsiooni jaoks Caveolin-1 küüliku polükloonaalset kaveoliini vastast antikeha (BD, Belgia) samuti 1:250 lahjendus. Visualiseerimiseks kasutati aluselise fosfataasiga seotud sekundaarset antikeha ja see visualiseeriti membraanil NBT/BCIP reaktsiooniga.

3. Tulemused

3.1 TP10b(N)–SA-AF633 komplekside puhul põhjustab fotoinduktsioon efektiivset endosoomidest vabanemist

Rakku sisenevad peptiid- Valk kompleksid sisenevad edukalt rakkudesse, kuid jäävad endosoomidesse ning seega transporditav lastmolekul ei ole sageli võimeline rakus soovitud toimet avaldama. Komplekside vabastamiseks rakendati antud töös fotodünaamilist efekti, mis seisneb valguse poolt saadava lisaenergia abil endosoomide membraani destabiliseerimises ning aitab transporditaval molekulil, antud juhul valgul, endosoomidest väljuda. Tavaliselt on fotodünaamilises teraapias kasutatud erinevaid fotosensitiseerivaid molekule ning antud töös uuriti RSP võimet koos fluorestseeruva märgiga käituda fotosensitiseeriva molekulina.

Rakku sisenevate peptiidide seast valiti hea sisenemisvõime tõttu transportaani analoog TP10, mis oli N-otsast biotinüleeritud (TP10b(N)) ja transporditava valguna kasutati fluorestseeruva märgisega streptavidiini (SA-AF 633), neutravidiini (NA-TxR) või avidiini (Av-TxR). Võrreldavateks lastmolekulideks valiti just need 3 valku, et hinnata lastmolekuli laengu olulisust fotodünaamilise efekti avaldumisel. Selgus, et nõrga negatiivse laenguga lastmolekulid on efektiivsemad kui suure positiivse laenguga valgud, järjestudes efektiivsuse poolest SA > NA > Av (tabel 1). Kuna kõige efektiivsem vabanemine endosoomidest toimus TP10b(N)-SA puhul, siis kasutati järgnevat katsetes just antud kompleksi.

Lastmolekul kompleksis TP10b(N)	Järelinkubatsiooni aeg	Peptiid : lastmolekul		
		8:1	5:1	3:1
SA-AlexaFluor633	24h	90%	90%	25%
	12h	90%	75%	15%
	6h	90%	20%	50%
	3h	25%	15%	10%
	1h	15%	15%	5%
NA-TxR	24h	5%	15%	0%
	12h	1%	20%	5%
	6h	70%	5%	0%
	3h	0%	0%	0%
	1h	0%	0%	0%
Avidin-TxR	24h	50%	0%	0%
	12h	50%	40%	0%
	6h	40%	0%	0%
	3h	0%	0%	0%
	1h	0%	0%	0%

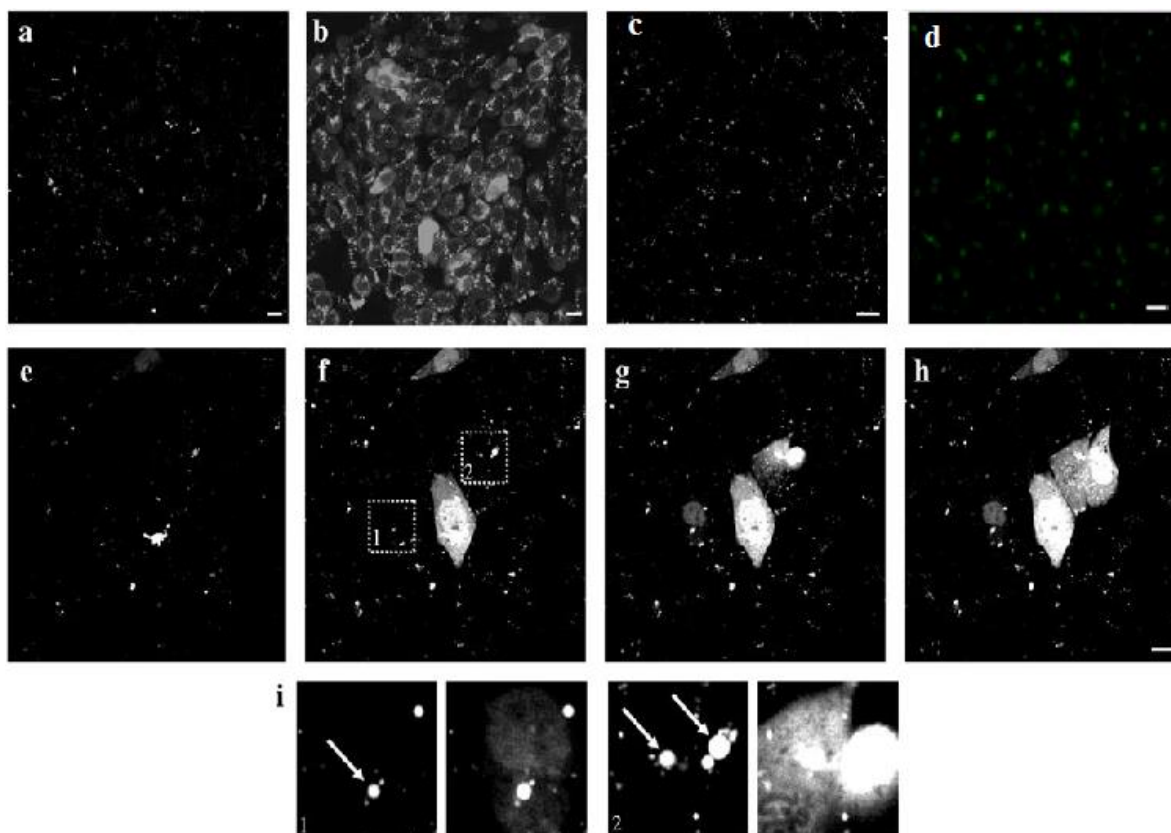
Tabel 1. Fotoinduktsiooni efektiivsus sõltuvalt lastmolekulist, peptiid:lastmolekul suhtest ja inkubatsiooniajast. CHO rakke inkubeeriti 8:1 suhtes peptiid:valk kompleksidega 1 tund ning järelinkubatsioon toimus 1, 3, 6, 12 või 24 tundi, misjärel sooritati fotoinduktsioon, kasutades elavhõbeda lampi ja ergastusvahemikku 545-580 nm. Lastmolekulina kasutati fluorestseeruva märgisega streptavidini, avidiini või neutravidini.

Kui rakkudesse imporditud RSP-valk kompleksid paiknevad üldjuhul rakkudes kompaktselt endosoomides (Joonis 4a), siis fotodünaamilise efekti puhul, laseriga ergastamise tagajärjel toimival endosoomide lõhkumisel on näha difuusse signaali ilmumist ehk fluorestseeruva märgisega materjali vabanemist endosoomidest ja jaotumist ühtlaselt kogu rakus (Joonis 4b). Kõige efektiivsem oli fotodünaamiline efekt TP10b(N)-SA-AF 633 komplekside puhul, kui 545-580 nm elavhõbedalambiga kiiritades oli endosoomide lekkivaks muutumist näha 90 % rakkudes (Tabel 1). Neutravidini ja avidiini puhul oli efekt väiksem, vastavalt 70 ja 40 % (Tabel 1).

Paralleelselt elavhõbedalambiga (545-580 nm) kiiritamisele kasutati fotoinduktsiooniks ka 635 nm laserit, mis on pikema lainepikkusega ning sellega kaasneb väiksem oht rakkudele kahjuliku mõju avaldamiseks. Rakkude kiiritamisel skaneerivalt 635 nm laseriga 1 minuti jooksul toimus fotoinduktsioon võrreldes elavhõbedalambiga väiksemal määral, kuid oli ikkagi olemas 10-15 % rakkudes (Joonis 4 (e-h)). Joonisel 4 (e-h) on esitatud 1 minuti jooksul tehtud piltide seeria, kus on näha järjest endosoomide lõhkumine valgusimpulsi toimetel. Lisaks selgub, et

lekkivaks muutuvad just suured ja tugevalt fluorestseeruvad endosoomid (Joonis 4 (i), suurendatud 4 (f)-st), viidates, et fotoinduktsioon toimub eelkõige kõrge RSP-valk kontsentratsiooniga endosoomides.

Kiiritamata rakkudes ei ilmnenud detekteeritavat difuusset signaali ka 24 tunni jooksul pärast peptiid-valk kompleksidega inkubeerimist (Joonis 4c), viidates, et valgusimpulss on endosoomidest vabanemiseks antud meetodi puhul väga oluline komponent. FITC fluorofooriga töötlemisel ei ilmnenud ka fotodünaamilist efekti (Joonis 4d). Kokkuvõttes näitavad need tulemused, et fotodünaamilise efekti avaldumiseks on oluline nii sobivate omadustega fluorofoori kui ka lastmolekuli valik.

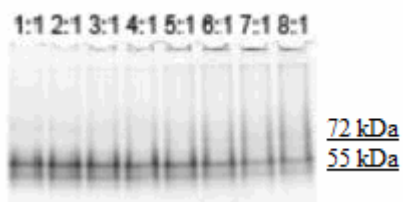


Joonis 4. Endosoomid muutuvad fotoinduktsiooni tagajärjel lekkivaks. Rakke inkubeeriti 8:1 TP10b(N) : SA-AF 633 (a-c, e-i) või 8:1 TP10b(N)-SA-FITC (d) kompleksidega 1 tund ning kompleksideta lisaks 6 tundi. Enne fotoindutseerimist paiknesid kompleksid endosoomides (a), fotoindutseerimise tulemusena muutusid endosoomid lekkivaks ja kompleksid vabanesid tsütosooli (b). Valgusimpulsita ei muutunud endosoomid lekkivaks ka 24 h jooksul (c). Lekkivaks muutuvad suured, eredalt fluorestseeruvad endosoomid, milles on kõrges kontsentratsioonis RSP:valk komplekse (e-h). (i) on väljasuurendatud osa (f)-st. TP10b(N)-SA-FITC puhul fotoinduktsiooni ei toimunud (d). Mõõtlõik 10 µm.

3.2. Fotoinduktsiooni efektiivseks toimumiseks peab RSP olema lastmolekuli suhtes suures ülehulgas

Kuna eelnevalt leiti, et eelkõige vabaneb peptiid- Valk kompleks endosoomidest, kus on suurem hulk komplekse (Joonis 4h), ning membraani destabiliseerimine toimub eelistatult peptiidide kõrgema kontsentratsiooni juures (Yandek *et al.* 2007), siis uuriti järgmisena fotoinduktsiooni toimumise efektiivsuse sõltuvust kompleksis olevast peptiidi hulgast. Selleks kasutati antud töös 3:1, 5:1 ja 8:1 RSP:valk vahekorras komplekse, et leida sobivaim suhe, mis soodustaks fotoinduktsiooni toimumist.

Kuigi streptavidiinil on neli biotiini seondumiskohta, näitab komplekside võrdlemine geelelektrofooresil natiivsetes tingimustes (Joonis 5), et streptavidiin suudab siduda rohkem kui neli biotinüleeritud TP10 peptiidi (TP10b(N)), tulemus on nähtav tugevneva hägusa sabana geelirajas kõrgemate peptiid:valk kontsentratsiooni suhete puhul. Fotodünaamilise efekti uurimisel selgus, et just 8:1 suhte puhul toimus endosoomidest vabanemine kõige efektiivsemalt (Tabel 1), see tähendab, kui peptiidi oli valgu suhtes suuremas ülehulgas kui spetsiifiline biotiini kaudu sidumine võimaldaks. 3:1 ja 5:1 suhte puhul oli fotoinduktsiooni efekt väiksem (Tabel 1). Seega, sõltumata ainult neljast biotiini seondumiskohast valgul, on kompleks võimeline siduma enda külge rohkem peptiidi, mis on vajalik efektiivseks fotodünaamilise efekti avaldumiseks.



Joonis 5. Streptavidiini seondumine biotinüleeritud RSP-ga. Streptavidiin-Alexa Fluor 633 -TP10b(N) kompleksid (suhtes 1:1 kuni 8:1) on kantud SDS-vabas Tris puhvril (pH~8.3) (0.025M Tris pH 8.3 ja, 0.192M glütsiin) 10% PAGE geelile ning analüüsitud Typhoon Trio abil (GE Healthcare, USA).

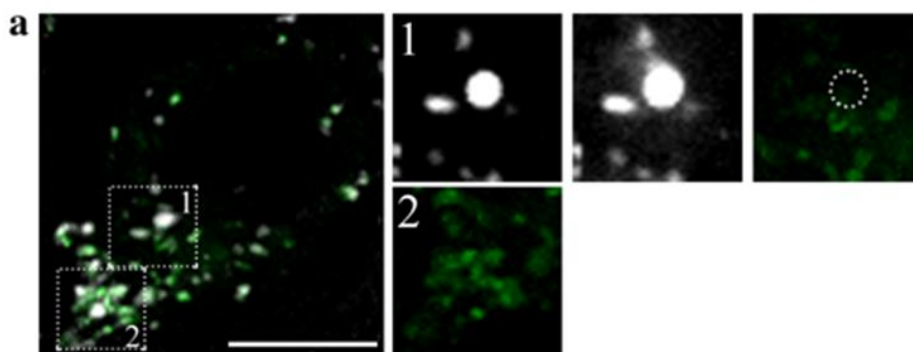
3.3 Sobivaim aeg rakkude fotoindutseerimiseks on vähemalt 6 tundi pärast peptiidiga inkubeerimist

Et leida, millistest endosoomidest (varasematest või hilisematest) komplekside vabanemine eelkõige toimub, uuriti fotoinduktsiooni efektiivsust erinevatel hetkedel. Selleks inkubeeriti CHO rakke RSP-valk kompleksidega 1 tunni jooksul ning järelinkubatsioon toimus kompleksideta, seerumiga söötmes 1, 3, 6, 12 või 24 tundi. Seejärel teostati rakkude kiirirradiatsioon

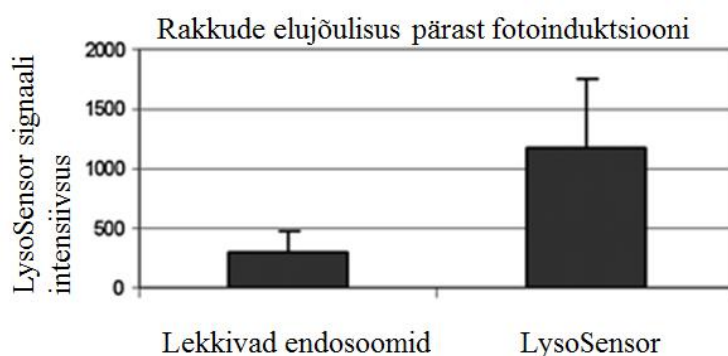
laseri või elavhõbedalambiga ehk fotoinduktsioon. Pärast 1- ja 3-tunnist järelinkubatsiooni muutusid kiiritamise tagajärjel endosoomid lekkivaks 15-25 % rakkudes (Tabel 1). 6 tunni järelinkubatsiooni puhul toimus kiiritamise toimetel endosoomide lõhkumine 90 % ning 12 ja 24 tunni järel samuti 90% rakkudes (Tabel 1), mis näitab, et fotoinduktsiooni edukaks toimumiseks oli vaja vähemalt 6-tunnist inkubatsiooni. Sellest võib järeldada, et endosoomid, mille membraan destabiliseeritakse, on küpsemad endosoomid ja kuna vajalik järelinkubatsiooni aeg on pikem, siis on tõenäoline, et toimuvad protsessid, mis soodustavad endosoomi membraani destabiliseerimist.

3.4 Lekkivaks muutuvad hilised, neutraalse pH-ga endosoomid

Kuna varasemad katsed näitasid, et efektiivne fotodünaamiline efekt toimub eelkõige 6 tunni möödudes ja selle aja jooksul peaks sisenenud materjal olema juba lüsoosoomides ehk võib-olla juba lagunenu (mis toimub eelkõige madala pH juures), siis kontrolliti ka lekkivate endosoomide pH-d, et teada saada, kas transporditav lastmolekul võib olla endiselt terve. Kui tuvastatakse, et lekkivad endosoomid on tugevalt happelise pH-ga, siis on lastmolekul tõenäoliselt lagundatud. Selle välja selgitamiseks kasutati LysoSensor markerit, mis omab pH-tundlikku intensiivsusspektrit, olles intensiivsem happelises ning vähemintensiivsem neutraalse pH-ga keskkonnas. Pärast 1-tunnist CHO rakkude inkubeerimist 8:1 TP10b(N)-SA-AF 633 kompleksidega toimus järelinkubatsioon kompleksideta söötmes 6 tundi. Kaks tundi enne fotoindutseerimist töödeldi rakke LysoSensor markeriga, mis on pH indikaatoriks, muutudes happelises keskkonnas eredalt fluorestseeruvaks. Selle katse puhul elavhõbedalampi kasutada ei saanud, sest see pleegitas LysoSensor markerit ning LysoSensori signaali ei olnud võimalik usaldusväärset ja reprodutseeruvat tuvastada. Seetõttu kasutati siin fotoinduktsiooni teostamisel ainult 635 nm laserit. Laseriga indutseerides oli näha suuri, TP10b(N)-SA-Alexa Fluor 633 komplekse sisaldavaid endosoomide, mille lagunemine tundus tõenäoline (noolega näidatud joonisel 4, suurendatult välja toodud piirkonnad 1 ja 2 joonisel 10). Joonisel 10 on näha ka ereda LysoSensori signaaliga lüsoosoomid (Joonis 6a, 2), mille pH tase oli LysoSensori signaali tugevuse põhjal oluliselt madalam kui komplekse sisaldavates endosoomides (Joonis 6a,1).



b

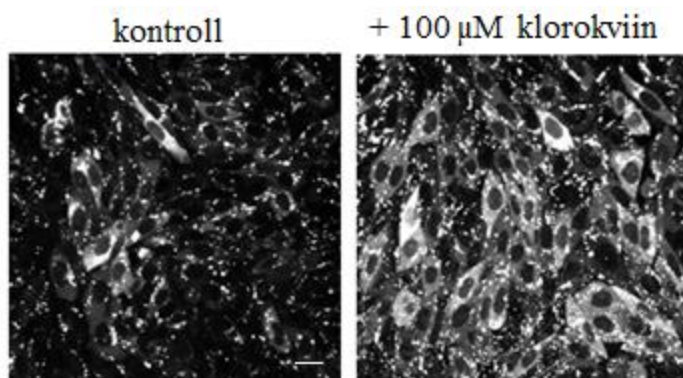


Joonis 6. Endosoomide ja lüsoosoomide pH määramine LysoSensor markeriga. Suured eredad lekkivaks muutuvad endosoomid (a,1) ei ole nii happelise pH-ga kui lüsoosoomid (a,2, roheline signaal).Rakke inkubeeriti 8:1 TP10b(N)-SA-AF 633 kompleksidega 1 h + 6h, millest 2h 2 μ M LysoSensor markeriga. Mõõtlõik 10 μ m. Kvantitatiivne analüüs (b) teostati FV1000 programmi ja Microsoft Exceli abiga.

Ka kvantitatiivne analüüs (Joonis 6b) näitas, et erinevus lagunevate endosoomide ja happeliste endosoomide/lüsoosoomide vahel oli märgatav. Sellest võib järeldada, et fotoinduktsiooni tulemusena katkevad ennekõike komplekse sisaldavad vähemhappelised endosoomid. Seega vabaneb transporditav lastmolekul tsütosooli eelkõige neutraalsele pH-ga endosoomidest, ehk, enne kui endosoomi pH jõuab happeliseks muutuda ning lastmolekul kahjustuda.

Kinnitust hüpoteesile, et hapustumise takistamine aitab kaasa endosoomide lekkivaks muutumisele fotoinduktsiooni teel, näitas ka katse klorokviiniga. Klorokviin takistab endosoomide hapustumist ja muudab endosoomide membraani hapramaks, soodustades fotoinduktsiooni efektiivsust. Rakkudes, mis olid töödeldud 100 μ M klorokviiniga, oli näha efektiivsem endosoomide lõhkumine kui töötlemata rakkudes (Joonis 7), viidates, et lekkivaks

muutuvad pigem mitte happelise pH-ga endosoomid.



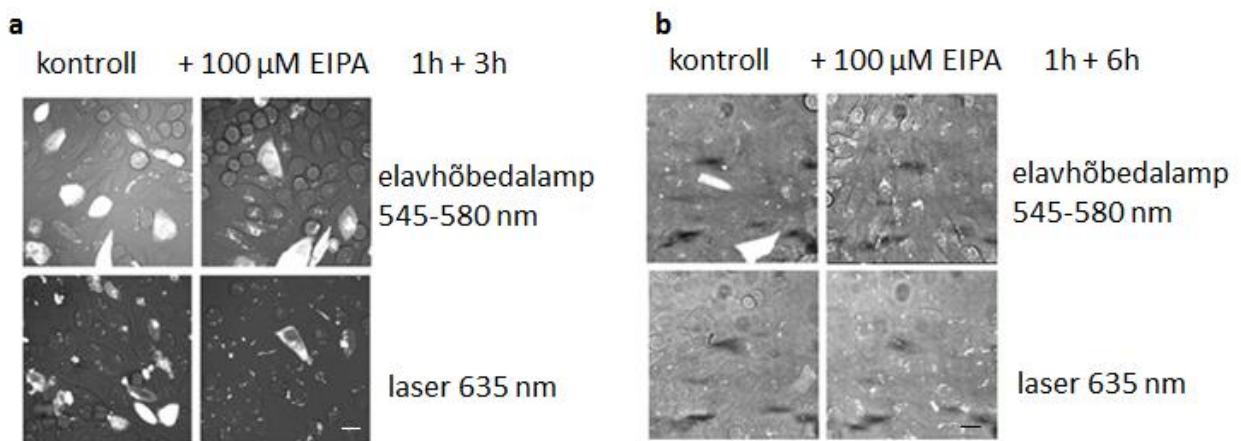
Joonis 7. Endosoomide hapustumise takistamine klorokviinitöötlaste abil. CHO rakke inkubeeriti 1 tund TP10b(N)-SA-AF 633 kompleksidega ning 6 tundi kompleksideta koos või ilma 100 μ M klorokviiniga. Mõõtlõik 10 μ m.

3.5 Fotoinduktsiooni toimumist võimaldavad endotsütoosirajad

Välja selgitamaks, kas mõni endotsütoosirada on RSP-valk komplekside rakkudesse sisenemisel eelistatud ja kas fotoindutseerimise toimele lekkivaks muutuvad endosoomid on eristatavalt mõne kindla endotsütoosiraja tulemus, analüüsiti fotoinduktsiooni toimumist erinevate endotsütoosimehhanismide mahasurumise järgselt erinevate farmakoloogiliste inhibiitoritega.

Makropinotsütoos

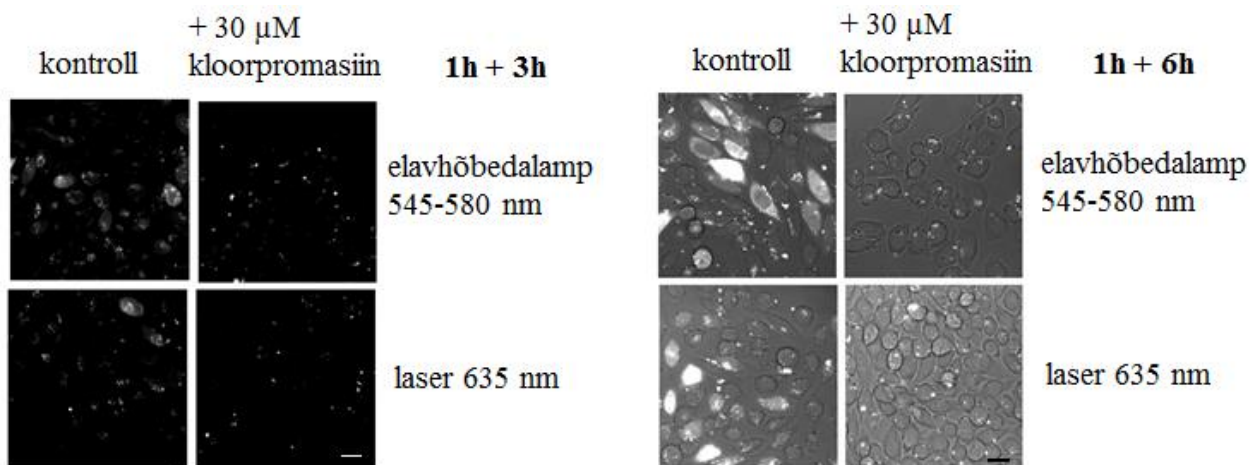
Et hinnata makropinotsütoosi osaluse määra lekkivate endosoomide moodustumisel, kasutati 100 μ M inhibiitorit EIPA (etüülisopropüülamiloriid). EIPA inhibeerib Na^+/H^+ antiporterit, takistades sellega makropinotsütoosi toimumist. Makropinotsütoosi osaluse hindamiseks töödeldi CHO rakke 8:1 suhtes peptiid-RSP kompleksidega inhibiitori juuresolekul 1 tund ja kompleksideta 6 tundi, millest 3 või 6 tundi koos inhibiitoriga. Katse tulemustest selgus, et kui inhibiitorit hoida rakkudel peal 3 tundi, siis oli kiiritamisel näha endosoomide lekkivaks muutumist nii 635 nm laserit kui ka elavhõbedalampi kasutades, see tähendab, et fotodünaamiline efekt ilmnes hoolimata makropinotsütoosi inhibeerimisest (Joonis 8a). Kui EIPA-t hoida aga rakkudel kogu järelkubatsiooni aja (6 tundi), siis fotoinduktsiooni enam ei toimunud (Joonis 8b). Sellest võib järeldada, et osad fotoinduktsiooniks sobivad lekkivad endosoomid võivad tekkida makropinotsütoosi teel.



Joonis 8. Makropinotsütoosi inhibeerimise mõju fotodünaamilise efekti avaldumisele. Rakke inkubeeriti 30 min 100 μ M etüülisopropüülamiloriidiga (EIPA), seejärel 8:1 TP10b(N)-SA-AF633 kompleksidega inhibiitori juuresolekul 1 tund ja kompleksideta 6 tundi, millest EIPA oli lahuses 3 (a) või 6 (b) tundi. Mõõtlõik 10 μ m.

Klatriin-sõltuv endotsütoos

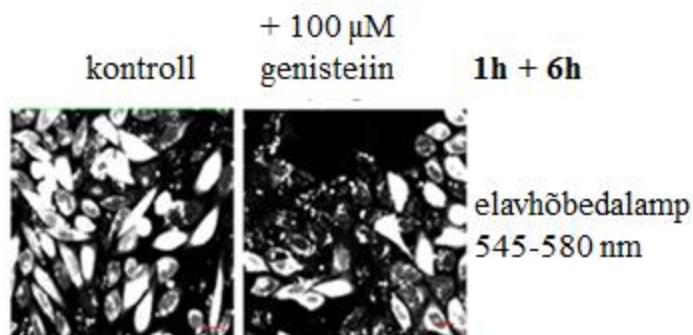
Klatriin-sõltuva endotsütoosi inhibiitor kloorpromasiin takistab klatriini ja AP2 adaptor kompleksi omavahelist seondumist ja seeläbi klatriin-kaetud vesiikulite pungumist membraani pinnalt (Vercauteren *et al.* 2010). 30 μ M kloorpromasiini kasutades ei toimunud endosoomide lõhkumist ei 3- ega 6- tunnise inhibiitoriga inkubeerimise puhul (Joonis 9), viidates, et klatriin-sõltuv endotsütoos võib olla fotodünaamilise efekti avaldumiseks oluline protsess ning et lekkivaks muutuvad endosoomid võivad olla tekkinud peptiid-valk komplekside sisenemisel rakkudesse klatriin-sõltuva endotsütoosi teel. Samas ei saa ka välistada, et kloorpromasiin takistab fotoinduktsiooni mõnel teisel moel kui klatriin-vahendatud endotsütoosi blokeerimine.



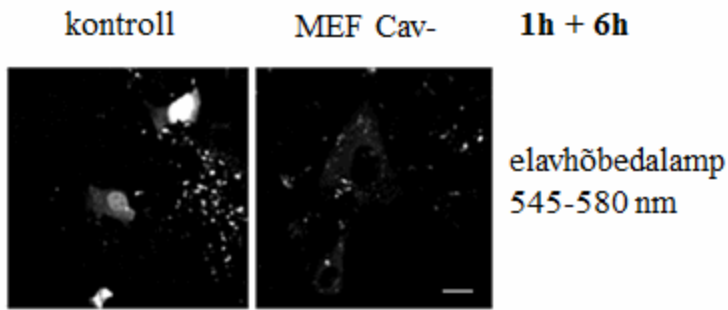
Joonis 9. Klatriin-sõltuva endotsütoosi inhibeerimise mõju fotodünaamilise efekti avaldumisele. Rakke inkubeeriti 30 μ M kloorpromasiiniga 0,5 h, 8:1 TP10b(N)-SA-AF633 kompleksidega inhibiitori juuresolekul 1 tund ja kompleksideta 6 tundi ning lisati 30 μ M kloorpromasiin veel 3 või 6 tunniks enne fotoindutseerimist. Mõõtlõik 10 μ m.

Kaveoliin-sõltuv endotsütoos

Kaveoliin-sõltuva endotsütoosi inhibeerimisel 100 μ M genisteiiniga, mis on türosiinkinaasi inhibiitor ning lõhub endotsütoosikohas aktiini võrgustiku ja takistab dünaamiini seondumist (Vercauteren *et al.* 2010), avaldus fotodünaamiline efekt 73,5 % rakkudes, võrdluseks kontrollrakkude 82% (Joonis 10). Paralleelselt katsetati ka kaveoliin- „knock-out“ hiire fibroblasti rakke MEF cav-, mille puhul samuti fotoinduktsioon küll toimus, kuid selle efektiivsus vähenes (Joonis 11). See näitab, et kaveoliin-vahendatud endotsütoosiraja kaudu moodustuvad endosoomid võivad olla osaliselt sobilikud fotodünaamilise efekti toimumiseks, seda ka erinevates rakutüüpides.



Joonis 10. Kaveoliin-sõltuva endotsütoosi inhibeerimise mõju fotodünaamilise efekti avaldumisele. CHO rakke inkubeeriti 0,5 tundi inhibiitoriga, 1 tund 8:1 TP10b(N)-SA-AF633 kompleksidega ja 6 tundi kompleksideta ning teostati fotoinduktsioon. 100 μ M inhibiitor genisteiin oli lahuses kogu inkubeerimise aja.

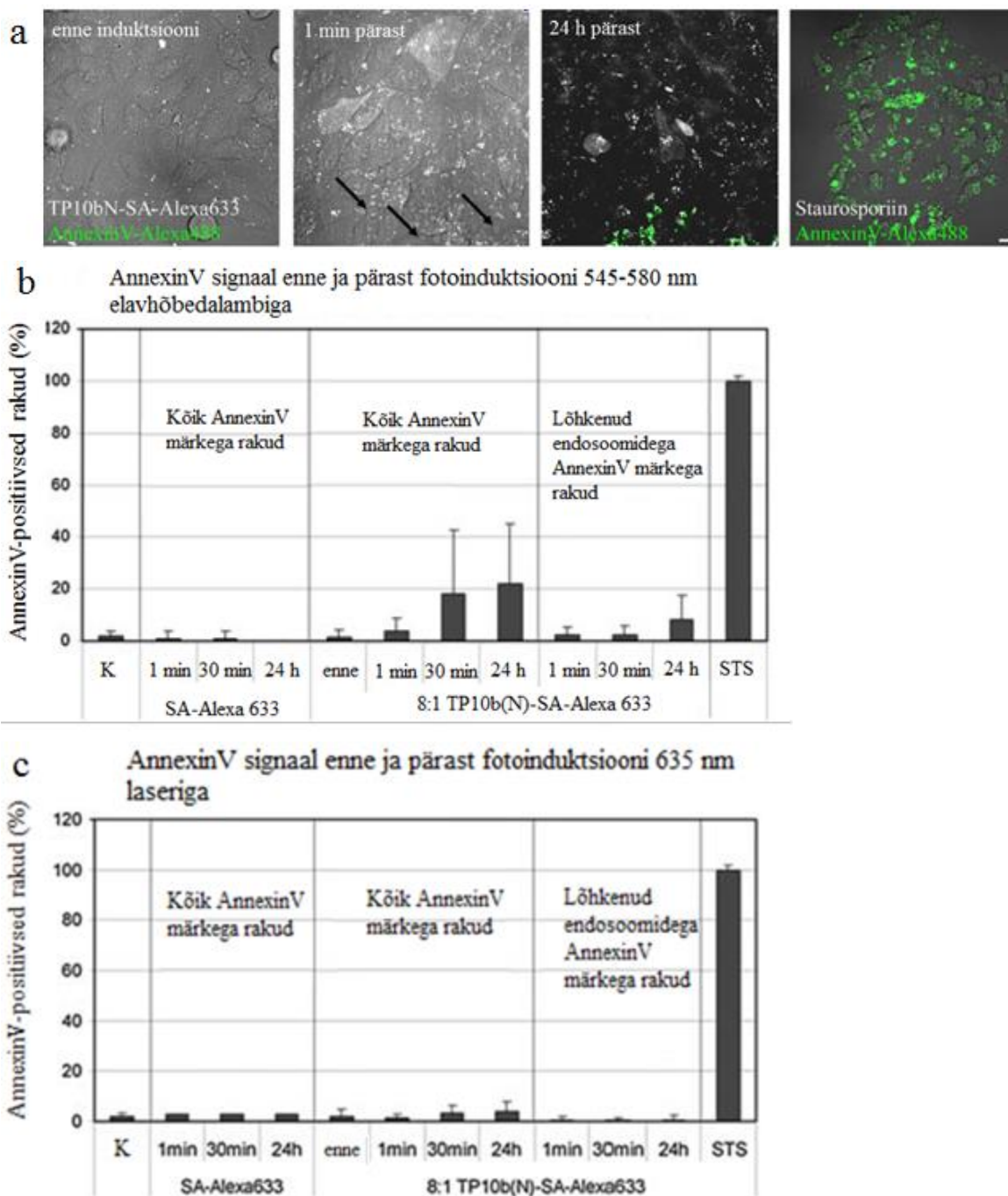


Joonis 11. Kaveoliin-sõltuva endotsütoosi puudumise mõju fotodünaamilise efekti avaldamisele. Metsiktüüpi MEF rakke ja kaveoliin-defektseid MEF rakke (MEF Cav-) inkubeeriti 8:1 TP10b(N)-SA-AF633 kompleksidega 1 tund ja kompleksideta 6 tundi.

3.6 Fotoinduktsioon ei ole rakkudele toksiline

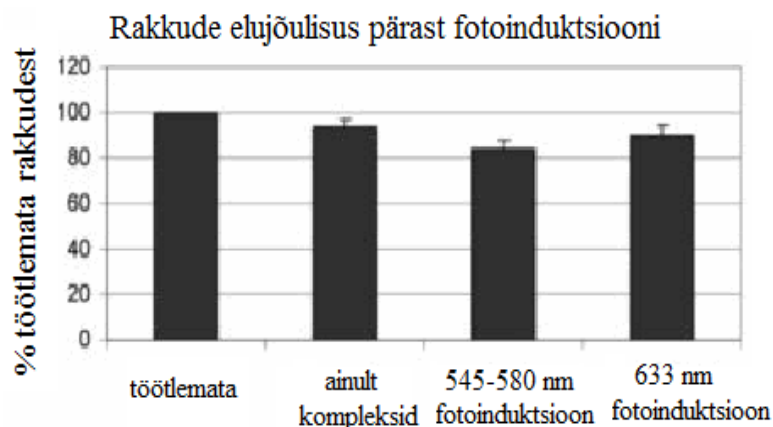
Kuna on võimalus, et kiiritamine avaldab rakkudele toksilist efekti, uuriti ka rakkude võimalikku kahjustumist fotoinduktsiooni toimet. Selleks inkubeeriti CHO rakke 1 tunni jooksul 4 μM TP10b(N) ja 500 nM SA-AF 633 kompleksidega (8:1 suhe) ning järelinkubeeriti kompleksideta söötmes 6 tundi nagu varem kirjeldatud. Seejärel teostati fotoinduktsioon elavhõbedalambi või laseriga mõjutamisega ning visualiseeriti apoptootilised/nekrootilised rakud Annexin V - Alexa Fluor 488 abil. Kõik rakud, millel oli Annexin V signaal (Joonis 12a), loeti apoptootiliseks. Positiivse kontrollina oli kasutusel 10 μM staurosporiin, mis soodustab Annexin V seondumist rakkudele. Staurosporiin põhjustab türosiin kinaaside inhibeerimise kaudu fosfatidüülseriini translokeerumise raku välismembraanile ning seda saab detekteerida Annexin V abil (Arrebola *et al.* 2005).

635 nm laseriga kiiritamisel oli AnnexinV märkunud vaid 5% rakkudest, mis on sarnane tulemus kiiritamata rakkude hulga (Joonis 12c). Elavhõbedalambiga (545-580 nm vahemikus) kiiritatud rakkudest olid AnnexinV märkega 20% (joonis 12b). Nendest rakkudest, millel oli näha komplekside vabanemist tsütoplasmasse, oli Annexin V märkunud 10%. Sellest võib järeldada, et 635 nm laseriga kiiritamine ja selle tagajärel toimuv endosoomide lagunemine ei ole rakkudele toksiline ning ka lühema lainepikkusega kiiritamisel on toksiline efekt väga väike.



Joonis 12. Fotoinduktsiooni toime TP10b(N)-SA-AF 633 kompleksidega töödeldud rakkudele. CHO rakke inkubeeriti kas ainult SA-AF 633-ga või 8:1 TP10b(N)-SA-AF633 kompleksidega 1h ja kompleksideta 6h. Fotoinduktsioon teostati 545 - 585 nm elavhõbedalambiga (a), (b) või 635 nm laseriga (c) ning toksilisuse hindamiseks töödeldi rakke 1:100 annexinV-AF 488-ga. Positiivseks kontrolliks olid 10 μ M staurosporiiniga töödeldud rakud, negatiivseks kontrolliks töötlemata rakud. Nooled (a) viitavad raku kahjustunud kohtadele.

Rakkude elujõulisust pikema aja jooksul pärast fotoinduktsiooni kontrolliti ka MTT abil rakkude metaboolset aktiivsust analüüsid, see annab informatsiooni ka võimaliku pikaajalise toksilisuse efekti kohta. Tulemustest selgus, et fotoinduktsioon ei ole TP10b(N)-SA-AF 633 töödeldud rakke kahjustav. Rakkude elulemus elavhõbedalambiga fotoindutseerides oli 85% ja 635 nm laseriga 90%, viidates, et fotoinduktsioon ei ole antud tingimustel CHO rakkudele toksiline (Joonis 13).



Joonis 13. CHO rakkude elujõulisus pärast fotoinduktsiooni. CHO rakke inkubeeriti 1 tunni jooksul 8:1 TP10b(N)-SA-AF633 kompleksidega ning 6 tundi kompleksideta, fotoindutseeriti elavhõbedalambiga lainepikkustel 545-580 nm ning mõõdeti rakkude elujõulisus MTT meetodil.

3.7 Rakkudesse TP10-ga sisestatud valk on aktiivne ka 12h pärast fotoindutseerimist

Selleks, et transporditav molekul saaks rakus soovitud mõju avaldada, peab see olema kaitstud degradeerimise eest ning püsima aktiivne ka pärast rakkudesse sisenemist ja endosoomidest vabanemist. Antud töös hinnati rakku transporditud lastmolekuli võimalikku degradeerimist katse abil, kus rakke töödeldi 1.5, 2.5 või 4 μ M TP10b(N) ja 500 nM SA-AF 633 kompleksidega (vastavalt 3:1, 5:1 või 8:1 peptiid-valk suhe) 1 tunni jooksul ning järelinkubeeriti 3, 6, 12, 24 või 48 tundi. Seejärel töödeldi rakke 15 minutit trüpsiiniga, mis eemaldas kompleksid rakkude pinnalt ning võimaldas analüüsida rakke ja nendesse sisenenud peptiid-valk komplekse. Rakud lüüsiiti esmalt mitte-denatureerivas puhvril, mille abil saadi analüüsiks membraanidega mitteseotud osa peptiid-valk kompleksidest ja seejärel ülejäänud osa lahustati denatureerivas puhvril, et analüüsida ka ülejäänud, membraaniga seotud komplekse. Fraksioneerimise korrektsust kontrolliti Western Blot katse abil, mis näitas, et tsütoplasmas

leiduv ROCK kinaas oli tuvastatav vaid tsütosoolses valgufraktsioonis (ND) ja Kaveoliin vaid membraaniseoselises (D) fraktsioonis (Joonis 14).

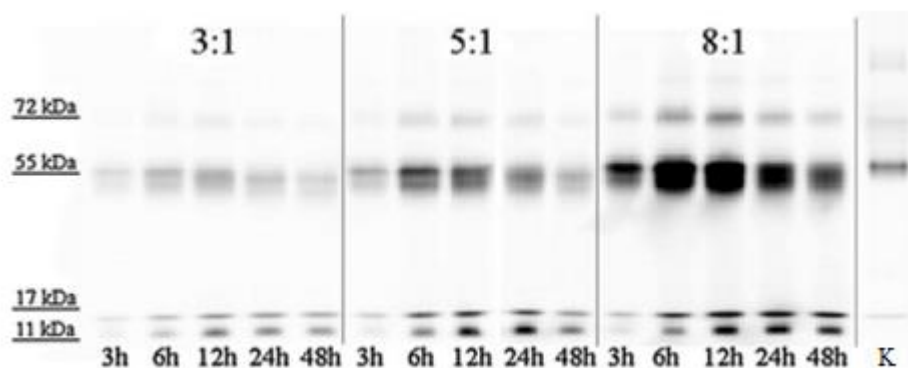


Joonis 14. Rakkude tsütosoolse ja membraanse fraktsiooni puhas kontroll.

Fraktsioonide analüüsimiseks kasutati Western Blot meetodit. Tsütoplasmaatilist fraktsiooni kontrolliti Rho-kinaas (ROCK), kitse polükloonaalse anti-ROCK1 antikeha abil, (1:250 lahjendus, Santa Cruz Biotechnology, USA) ning membraanset fraktsiooni küüliku polükloonaalse kaveoliin-vastase antikeha abil (BD, Belgia, 1:250 lahjendus).

Et välja selgitada lastmolekuli seisund pärast fotoinduktsiooni, kanti kõik TP10b(N)-SA-AF 633 komplekside proovid (tsütosoolsed fraktsioonid mitte-denatureerivas puhvril ja membraaniseoselised vastavalt denatureerivas puhvril) SDS-PAGE geelile ja valgud visualiseeriti Typhoon Trio abil, ergastades streptavidiini küljes olevat fluorofoori. Streptavidiin-TP10b(N) kompleksid olid analüüsivates proovides tuvastatavad 72- ja 55- kDa molekulmassile vastavatena, viidates valgu intaktsusele ja kompleksi säilimisele antud tingimustes ning 17 ja 11 kDa suuruse streptavidiini monomeeri ja laguproduktina (Joonis 15).

Kontrollina kanti 8:1 suhtes TP10b(N)-SA-AF 633 moodustatud kompleksid otse PAGE geelile (kompleksid rakuvabas keskkonnas) ning saadi samad tulemused, viidates, et analoogsed kompleksid tuvastati ka rakkudes. Kuna peptiid on umbes 2 kDa ja streptavidiin 55 kDa molekulmassiga, siis 72-kDa vastav signaal geelis, mis ilmneb ainult siis kui streptavidiin on kompleksis peptiidiga, on tõenäoliselt streptavidiini tetrameer, mis on kompleksis rohkem kui 4 peptiidiga. Kvantifitseerimise põhjal võib öelda, et 8:1 peptiid-valk suhte juures ei lagundata streptavidiini rakkudes (molekulmass tetrameerina ≥ 55 kDa) vähemalt 12 tunni jooksul (Joonis 15).



Joonis 15. Transporditava lastmolekuli degradatsiooni analüüs. Rakke inkubeeriti 3:1, 5:1 või 8:1 suhtes TP10b(N)-SA-AF633 kompleksidega 1 tund ning järelinkubeeriti kompleksideta söötmes 3, 6, 12, 24 või 48 tundi. Tsütosoolsed fraktsioonid kanti 10% SDS-PAGE geelile ning visualiseeriti Typhoon Trio abil. Kontrollina (K) kanti geelile rakuvabad 8:1 suhtes TP10b(N)-SA-AF633 kompleksid.

Lastmolekuli terveks jäämist fotoindutseerimise järel tõestab ka Räägel jt poolt teostatud funktsionaalne katse tubuliiniga, mis näitas, et TP10 abil rakkudesse viidud TRITC ja SA-AF 633 märkega tubuliin jääb pärast fotoinduktsiooni aktiivseks ning suudab tubulaarsetete struktuuridega liituda (Räägel *et al.* 2013).

Arutelu

Rakku sisenevad peptiidid on väga efektiivsed võõrmolekulide ja nanopartiklite rakkudesse transportijad, kuid jäävad sageli koos transporditavate molekulidega endosoomidesse ja ei avalda seega soovitud toimet. Et takistada toimeainete endo-lüsoosomaalsetes organellides lagundamist, on oluline indutseerida nende väljumine vastavatest struktuuridest.

Üks võimalus selleks on fotodünaamilise efekti rakendamine. See on fotosensitiseeriva reagenti ning valgusimpulsi koostoimel saavutatav efekt, mille abil on võimalik raku membraane destabiliseerida ning endosoomi lekkivaks muuta. Antud töös oli fotosensitiseerivaks ühendiks rakku sisenev peptiid TP10 koos fluorestseeruva märkega. TP10 oli biotinüleeritud, et tagada stabiilne seondumine lastmolekuliga. Tavaliselt lisatakse biotiin TP10 lüsiini kõrvalahela külge, aga antud töös kasutati N-terminalist biotinüleeritud peptiidi, sest nii saadi suurem fotodünaamiline efekt. Streptavidiinil, mis vabanes fotoinduktsioonil endosoomidest kõige efektiivsemalt, on 4 biotiini seondumiskohta, seega 3:1 suhte juures on teoreetiliselt kogu peptiid streptavidiiniga seondunud. Geelelektroforeesi katsetulemused (Joonis 5) näitasid aga, et streptavidiin suudab antud tingimustel seondada ka rohkem kui 4 biotinüleeritud TP10 molekuli. Võib oletada, et TP10 mittestöhhiomeetriline seostumine streptavidiiniga on põhjustatud peptiidi ja valgu või peptiidi ja peptiidi vaheliste elektrostaatilistest ja/või hüdrofoobsetest interaktsioonidest. Kõige efektiivsem oli fotoinduktsioon 8:1 TP10:SA suhte juures (Tabel 1), mis viitab, et suuremas ülehulgas peptiid aitab kaasa fotodünaamilise efekti efektiivsele avaldumisele. Seda võib põhjustada peptiidi koondumine endosoomi membraanil spetsiifilistesse kohtadesse, mis ühelt poolt aitab membraani destabiliseerida ning teisalt viib fluorofoori endosoomi membraanilipiidide vahetusse lähedusse, võimaldades seega ergastamisel tekkivatel reaktiivsetel hapnikuühenditel membraani lipiide oksüdeerida (Meerovich *et al.* 2014).

Transporditava lastmolekulina katsetati erinevaid valke (streptavidiin, neutravidiin ja avidiin) ning nendest andis fotoinduktsiooni abil kompleksis RSP-ga endosoomidest vabanemisel kõige parema tulemuse väikese negatiivse laenguga streptavidiin (SA) (Tabel 1). Kuna neutravidiin ja avidiin on erinevalt streptavidiinist vastavalt neutraalse lähedase ja positiivse laenguga, siis on võimalik, et lastmolekuli laeng võib mõjutada fotoinduktsiooni abil toimuvat endosoomidest vabanemist. Positiivse laenguga avidiini puhul võib vähese efektiivsuse põhjuseks

olla tugev seondumine negatiivselt laetud molekulidega endosoomide sisemembraani pinnal (näiteks proteoglykaanidega), mistõttu endosoomi membraan võib küll katkeda, kuid lastmolekul ei pruugi vabaneda, kuna on membraaniga tugevalt seondunud. Teiseks võimaluseks võib olla avidiini kui tugevalt positiivse laenguga valgu vähene võime seondada rohkem kui 3-4 biotinüleeritud peptiidi, kuna laengute tõukumine takistab katioonse peptiidi seondumist avidiinile. Kuna aga peptiidi ülehulk oli eelduseks efektiivsele fotoinduktsioonile, siis ei olnud avidiiniga kompleksid võimelised efektiivselt endosoomidest vabanema. Mõlemaid hüpoteese toetab ka neutravidiini endosoomidest vabanemise efektiivsus, mis on väiksem kui streptavidiini ning suurem kui avidiini puhul, olles kooskõlas efektiivsuse alusel laengute järjestusega $SA > NA > Av$ (Tabel 1).

Antud töö üheks eesmärgiks oli fotoinduktsiooni tulemusena lekkivaks muutuvate endosoomide karakteriseerimine. Kuna efektiivne fotodünaamiline efekt avaldus alates 6 tunni ajapunktist, siis on põhjust arvata, et endosoomid vajavad ettevalmistuseks aega, arvatavasti RSP-valk komplekside jõudmiseks endosoomidesse ning akumulereerumiseks endosoomide membraanidel. Sel ajal võib toimuda ka endosoomide küpsemine, mille käigus endosoomi membraani kompositsioon muutub. Näiteks toimub endosoomide tavapärase küpsemise ajal anioonsete lipiidide (nt bis(monoatsüülglütsero)fosfaat (BMP) ja lüsobisfosfaathappe (LBPA) lisamine endosoomi membraani, mis soodustab RSP seondumist membraaniga ja selle destabiliseerimist (Yang *et al.* 2010, Wadhvani *et al.* 2012).

Kuue tunni jooksul peaks toimuma juba endosoomide hapustumine H^+ ATPaaside toimel ning lastmolekul võidakse madala pH toimel aktiveeritavate hüdrofüütiliste ensüümide mõjul osaliselt või täielikult degradeerida. Seetõttu oli oluline määrata lekkivaks muutuvate endosoomide pH, et teada saada, kas lastmolekul võib olla pärast 6 tunni inkubatsiooni veel aktiivne. pH tundlikku LysoSensorit kasutades näidati, et endosoomid, mis indutseerimise tagajärjel lekkivaks muutusid, olid valdavalt neutraalse pH-ga ning sisaldasid kõrgel kontsentratsioonil fluorestseeruva määrgisega RSP:valk komplekse (Joonis 6a). Seda, et lekkivaks muutuvad pigem neutraalse pH-ga endosoomid, kinnitas ka katse klorokviiniga, kus endosoomide hapustumise takistamine klorokviini abil suurendas fotoinduktsiooni efektiivsust (Joonis 7). Endosoomide neutraalne pH aitab kaasa RSP:valk komplekside terviklikkuse

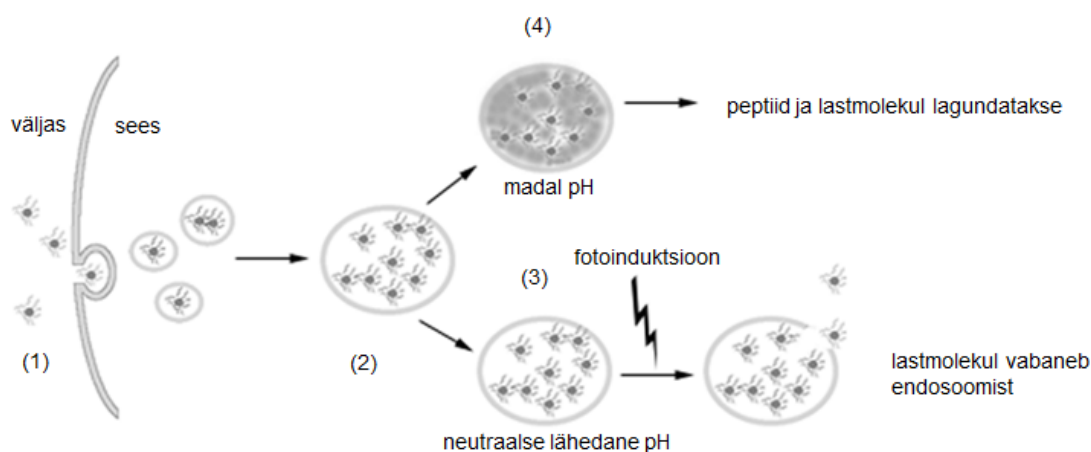
säilimisele, mida kinnitas ka lastvalgu degradatsiooni analüüs, mis näitas streptavidiini olemasolu rakkudes ka 12 tundi pärast fotoindutseerimist (Joonis 15).

Põhjuseid, miks TP10:valk komplekse sisaldavates endosoomides nii kaua neutraalse lähedane pH säilib, võib olla mitmeid, näiteks võib membraaniaktiivne RSP pärssida prootonpumpade aktiivsust, moodustada poore endosoomi membraani või takistada endosoomide küpsemist (Räägel *et al.* 2009). Peptiidid võivad ka lihtsalt membraani destabiliseerida, ilma et poorid oleksid piisavalt stabiilsed või suured, et kompleks eelnevalt vabaneda suudaks, aga pH langust endosoomis võib see takistada. See, kas peptiid võib Na^+/H^+ pumbale mõju omada ja selle aktiivsust mingil moel inhibeerida, ei ole kindel, aga see võimaldaks samuti selgitada, miks rohkelt komplekse sisaldavad endosoomid ei hapustu. Üheks võimaluseks on ka komplekside sisenemine rakkudesse kaveoliin-sõltuva endotsütoosi teel ning paiknemine neutraalsetes vesiikulites nagu kaveoliin-sõltuva endotsütoosimehhanismi puhul näidatud (Pelkmans *et al.* 2001). Selle hüpoteesi kontrollimiseks teostati fotoinduktsiooni katsed erinevate inhibiitoritega nagu EIPA, kloorpromasiin ning genisteiin, mis selektiivselt pärssivad erinevaid endotsütoosimehhanisme. Saadud tulemused aga väga selgelt ühele kindlale endotsütoosimehhanismile ei viidanud, vaid selgus, et nii makropinotsütoosi kui ka klatriin- ja kaveoliin-sõltuva endotsütoosi inhibeerimisel toimus jätkuvalt fotoinduktsiooni toimel endosoomide lõhkumine, kuid selle efektiivsus oli vähenenud iga endotsütoosiraja blokeerimisel. Sellest võib järeldada, et ei ole kindlat endotsütoosi rada, mis oleks üksi vastutav fotodünaamilise efekti avaldamiseks sobivate endosoomide tekke eest ning mehhanisme, mille abil TP10b(N)-SA-AF633 kompleksid rakkudesse sisenevad, võib olla mitmeid.

Et välja segitada, kas fotoinduktsioon võib rakkudele toksilist efekti avaldada, kasutati rakkude määrgistamist AnnexinV-ga. Kui rakk on kahjustunud, on üheks apoptoosi tunnuseks fosfatidüülseriini suunamine raku pinnale. AnnexinV seondub raku pinnal fosfatidüülseriiniga ja kõik rakud, millel ilmnes fotoindutseerimise järel AnnexinV märke, loeti positiivselt märkunuks ehk kahjustunuks. Selgus, et fotoindutseerimine TP10b(N)-SA-AF 633 komplekse sisaldavatele rakkudele kahjulik ei olnud. Toksilisuse hindamisel Annexin V töötamise puhul jäävad märkamata aga need rakud, mis on töötamise käigus substraadilt dissotsieerunud ning selleks, et välistada kallutatud andmete saamist, analüüsiti fotoinduktsiooni toimet ka MTT meetodil. Ka MTT katse kinnitas, et fotoinduktsioon ei oma tsütotoksilist toimet, seda ka pikema aja jooksul pärast

induktsiooni. Tänu sellele, et kompleksid ei sisene otse läbi plasmamembraani vaid endotsütoosi teel ning plasmamembraanil fotodünaamilist efekti ei avalda, võib olla toksiliste efektide tõenäosus vähenenud. Teostatud katsete põhjal võib oletada, et lekkivaks muutunud endosoomid raku elujõulisusele pärssivad ei ole ning rakk suudab sellest taastuda, mis oleks oluline edasiseks rakendusliku tehnoloogia väljatöötamiseks.

Fotosensitiseerivaid molekule on kasutatud edukalt induktsiooniks nii *in vitro* kui *in vivo* ning osadest nendega on jõutud ka kliiniliste katseteni (Norum *et al.* 2009). Rakku sisenevate peptiidide konjugaate fluorofooriga on fotosensitiseeriva molekulina hakatud kasutama suhteliselt hiljuti ning seni kõige enam rakendatud TAMRA-ga märgitud Tat peptiidi, mille kasutamine fotoindutseerimisel on rakkudele toksiline (Srinivasan *et al.* 2011). TP10 tundub koostoimel fluorofooriga olevat aga heaks potentsiaalseks madala fototoksilisusega sensitiseerivaks molekuliks, mis suudab lastmolekuli Streptavidiin-Alexa Fluor 633 edukalt rakkudesse transportida ning aidata fotodünaamilise efekti abil endosoomidest väljuda, sealjuures rakke kahjustamata. Seega oleks huvitav uurida, kas TP10 toimiks sama efektiivselt ka teiste, streptavidiinile sarnase omadustega lastmolekulide transportimisel ning edasi, kas TP10-fluorofoor ühendid oleksid fotoinduktsioonil edukad ka *in vivo* süsteemides.



Joonis 16. RSP-dega raku transporditud molekulide vabastamine endosoomidest fotodünaamilist efekti kasutades. RSP-valk kompleksid endotsüteeritakse rakkude poolt (1), kus nad jäävad endosoomidesse (2) ning fotoindutseerimise toimele vabanevad intaktsed lastmolekulid neutraalse pH-ga endosoomidest ja on säilitanud aktiivsuse. Kui fotoinduktsiooni ei kasutata, toimub happelise pH-ga lüsoosoomides komplekside lagundamine (4).

Kokkuvõte

Erinevate terapeutiliste molekulide rakku transportimiseks on kasutatud mitmeid meetodeid, sealhulgas rakku sisenevaid peptiide (RSP). RSP-d transpordivad edukalt lastmolekule rakkudesse, kuid need jäävad „lõksu“ endosoomidesse ning suunatakse sealt endosomaalse raja kaudu lagundamisele. RSP-lastmolekul komplekside endosoomidest vabastamiseks enne lagundamisele suunamist on üheks meetodiks fotoindutseerimine. Selle käigus ergastatakse valgusimpulsi abil endosoomi membraani sisenenud fotosensitiseeriv molekul ning tekkivad reaktiivsed hapnikuühendid destabiliseerivad endosoomi membraani, mistõttu lastmolekul pääseb endosoomist välja ning saab soovitud toimet avaldada. Antud töös uuritigi TP10b(N)-Streptavidiin-Alexa Fluor 633 komplekside võimet toimida fotosensitiseeriva molekulina ja iseloomustati lekkivaks muutuvaid endosoomide ning fotodünaamilise efekti mõju rakkudele.

Töö tulemusena selgitati optimaalsed tingimused, mille juures TP10 on kompleksis fluorofooriga võimeline käituma fotosensitiseeriva reagentina. Leiti, et fotodünaamilise efekti jaoks sobivaks kompleksiks oli 8:1 suhtes TP10b(N)-SA-Alexa Fluor 633 ning et teised katsetatud lastmolekulid kompleksis TP10-ga nii mõjusat fotodünaamilist efekti ei põhjustanud. Oluline oli ka 6-tunnine järelinkubatsiooniaeg pärast RSP-valk komplekside lisamist, et endosoomid jõuaksid küpseda ning kompleksid endosoomides akumuldeeruda. Kuna 6 tunni jooksul peaks toimuma endosoomide hapustumine H⁺ATPaaside toimel, hinnati ka endosoomide pH väärtust, et kontrollida, kas transporditav lastmolekul on endosoomis intaktne. Selgus, et nendes endosoomides, mis fotoindutseerimise tagajärjel lekkivaks muutusid, oli säilinud neutraalse lähedane pH ning lastmolekulid olid intaktsed. Katsed Annexin V ja MTT-ga näitasid, et fotoinduktsioon TP10b(N)-SA-Alexa Fluor 633 toimel ei olnud kasutatud tingimustel rakkudele toksiline.

Seega antud uurimuse põhjal võib väita, et TP10 kombineerituna sobiva fluorofooriga on heaks potentsiaalseks fotosensitiseerijaks ning vastavate komplekside täiendav disainimine võiks olla rakendatav aktiivsete molekulide transportimiseks rakkudesse *in vitro* ja *in vivo*.

Endosomal escape of CPP-protein complexes via photo-induction and their cellular degradation

Margot Hein

Summary

Various methods have been applied to overcome one of the major limitations in the application of therapeutic macromolecules – cellular uptake. One potent delivery strategy is to harness cell penetrating peptides (CPPs), mostly cationic molecules which have shown the capability to efficiently internalize cells and also transport macromolecules along with them. As their internalization occurs via different routes of endocytosis, peptide-cargo complexes remain trapped into endosomes. In order to retain activity, the cargo has to escape from endo-lysosomal organelles, and therefore, several methods have been proposed to induce endosomal escape to increase the delivery efficiency of various therapeutic molecules.

One of these, photochemical internalization or photo-induction is a novel method for increasing efficiency of cellular cargo delivery via promoting endosomal escape. Cargo is released from endosomes by light-triggered activation of membrane-bound photosensitizer, which destabilizes endosomal membrane and therefore enables releasing of cargo molecules to cytosol.

In the current study the complexes of TP10 with different fluorophore-tagged proteins were used as photosensitizers and it was shown that in case of TP10 and fluorophore cooperation, the cargo protein was able to efficiently escape from endosomes via photo-induction treatment. Endosomal escape was the most efficient with TP10-Streptavidin-Alexa Fluor 633 complexes when high peptide to cargo ratio (8:1) was used. Also it appeared that endosomes require rather long time for maturation before a prominent photo-induction effect can be obtained, optimally 6 hours. During this incubation period the pH in complex-condensing endosomes remained near to neutral, suggesting that cargo might avoid degradation and remain active in these endosomes. That was also corroborated by degradation analysis, which showed that cargo is intact in cells even for 12 h after photo-induction treatment, suggesting that it had remained functional. Photo-induction exerted no toxic effect on used cells. In conclusion, based on these results, TP10

complexes with fluorophore-coupled proteins are potent non-toxic photosensitizers for inducing endosomal escape and therefore could have potential for the delivery of therapeutic molecules.

Kirjanduse loetelu

Almeida, P. F. (2014). "Membrane-active peptides: Binding, translocation, and flux in lipid vesicles." Biochimica et Biophysica Acta In press, online from 25.04.2014.

Amand, H. L., C. L. Boström, P. Lincoln, N. B. and E. K. Esbjörner (2011). "Binding of cell-penetrating penetratin peptides to plasma membrane vesicles correlates directly with cellular uptake." Biochim Biophys Acta **1808**(7): 1860-1867.

Andreotti, G., B. L. Méndez, P. Amodeo, M. A. C. Morelli, H. Nakamuta and A. Motta. (2006). from <http://maptest.rutgers.edu/drupal/?q=node/252>.

Anko, M., J. Majhenc, K. Kogej, R. Sillard, U. Langel, G. Anderluh and M. Zorko (2012). "Influence of stearyl and trifluoromethylquinoline modifications of the cell penetrating peptide TP10 on its interaction with a lipid membrane." Biochim Biophys Acta **1818**(3): 915-924.

Arrebola, F., S. Zabiti, F. J. Cañizares, M. A. Cubero, P. V. Crespo and E. Fernández-Segura (2005). "Changes in intracellular sodium, chlorine, and potassium concentrations in staurosporine-induced apoptosis." Cellular Physiology **204**(2): 500-507.

Arukuusk, P., L. Pärnaste, N. Oskolkov, D.-M. Copolovici, H. Margus, K. Padari, K. Möll, J. Maslovskaja, R. Tegova, G. Kivic, A. Tover, M. Pooga, M. Ustav and Ü. Langel (2013). "New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids." Biochim Biophys Acta **1828**(5): 1365–1373.

Asaia, T., T. Tsuzukua, S. Takahashia, A. Okamotoa, T. Dewab, M. Nangob, K. Hyodoc, K. Ishiharac, H. Kikuchic and N. Okua (2014). "Cell-penetrating peptide-conjugated lipid nanoparticles for siRNA delivery." Biochim Biophys Acta **444**(4): 599–604.

Bárány-Wallje, E., J. Gaur, P. Lundberg, U. Langel and A. Gräslund (2007). "Differential membrane perturbation caused by the cell penetrating peptide Tp10 depending on attached cargo." FEBS Lett **581**(13): 2389–2393.

Bastiani, M. and R. G. Parton (2010). "Caveolae at a glance." J Cell Sci **123**(22): 3831-3836.

Belting, M., A. Wittrup and S. Sandgren (2007). Proteoglycans as endocytosis receptors, CRC Press.

Berg, K., A. Dietze, O. Kaalhus and A. Høgset (2005). "Site-Specific Drug Delivery by Photochemical Internalization Enhances the Antitumor Effect of Bleomycin." Clin Cancer Res **11**: 8476-8485.

Berg, K., P. K. Selbo, L. Prasmickaite, T. E. Tjelle, K. Sandvig, J. Moan, G. Gaudernack, Ø. Fodstad, S. Kjølørud, H. Anholt, G. H. Rodal, S. K. Rodal and A. Høgset (1999). "Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol." Cancer Res **59**(6): 1180-1183.

Böcking, T., F. Aguet, S. C. Harrison and T. Kirchhausen (2011). "Single-molecule analysis of a molecular disassemblase reveals the mechanism of Hsc70-driven clathrin uncoating." Nature Structural & Molecular Biology **1808**(7): 1860–1867.

Ciobanasu, C., J. P. Siebrasse and U. Kubitscheck (2010). "Cell-Penetrating HIV1 TAT Peptides Can Generate Pores in Model Membranes." Biophys J **99**(1): 153-162.

Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis." JCB **162**(5): 773-780.

Crombez, L., G. Aldrian-Herrada and G. Divita (2009). "A New Potent Secondary Amphipathic Cell–penetrating Peptide for siRNA Delivery Into Mammalian Cells." Mol Ther **17**(1): 95-103.

Dennis, E. J. G., J. Dolmans, D. Fukumura and R. K. Jain (2003). "Photodynamic therapy for cancer." Nature Reviews Cancer **3**: 380-387.

Deshayes, S., A. Heitz, M. C. Morris, P. Charnet, G. Divita and F. Heitz (2004). "Insight into the Mechanism of Internalization of the Cell-Penetrating Carrier Peptide Pep-1 through Conformational Analysis." Biochemistry **43**(6): 1449–1457.

Eiríksdóttira, E., K. Konateb, U. Langel, G. Divita and S. Deshayes (2010). "Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion." Biochimica et Biophysica Acta **1798**(6): 1119–1128.

Freire, J. M., A. S. Veiga, I. R. de Figueiredo, B. G. de la Torre, C. S. Nuno, D. Andreu, A. T. D. Poian and M. A. R. B. Castanho (2013). "Nucleic acid delivery by cell penetrating peptides derived from dengue virus capsid protein: design and mechanism of action " FEBS Journal **281**(1): 191–215.

Geuze, H. J., W. Stoorvogel, G. J. Strous, J. W. Slot, J. E. Bleekemolen and I. Mellman (2001). "Sorting of Mannose 6-Phosphate Receptors and Lysosomal Membrane Proteins in Endocytic Vesicles " The Journal of Cell Biology **107**(6): 2491-2501.

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

Hillaireau, H. and P. Couvreur (2009). "Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery." Cell. Mol. Life Sci. **66**: 2873–2896.

Hristova, K., W. C. Wimley, V. K. Mishra, G. M. Anantharamiah, J. P. Segrest and S. H. White (1999). "An amphipathic α -helix at a membrane interface: a structural study using a novel X-ray diffraction method." Journal of Molecular Biology **290**(1): 99–117.

Huang, F., A. Khvorova, W. Marshall and A. Sorkin (2004). "Analysis of Clathrin-mediated Endocytosis of Epidermal Growth Factor Receptor by RNA Interference." J Biol Chem **279**(16): 16657-16661.

Huotari, J. and A. Helenius (2011). "Endosome maturation." EMBO J **30**(17): 3481-3500.

Islam, M. Z., H. Ariyama, J. M. Alam and M. Yamazaki (2014). "Entry of Cell-Penetrating Peptide Transportan 10 into a Single Vesicle by Translocating Across Lipid Membrane and Its Induced Pores." Biochemistry **53**(2): 386–396.

Kaksonen, M. T., C. P. and D. G. Drubin (2003). "Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis." Nature Reviews Molecular Cell Biology **7**: 404-414.

Kerr, M. C. and R. D. Teasdale (2009). "Defining Macropinocytosis." Traffic **10**: 364-371.

Liu, C. T., L. W. Zhang, G. Wei, W. Pan and W. Lu (2014). "Penetratin, a Potentially Powerful Absorption Enhancer for Noninvasive Intraocular Drug Delivery." Mol. Pharmaceutics **11**(4): 1218–1227.

Lundin, P., J. Johansson, P. Guterstam, T. Holm, M. Hansen, U. Langel and S. El Andaloussi (2008). "Distinct Uptake Routes of Cell-Penetrating Peptide Conjugates." Bioconjug Chem **19**(12): 2535–2542.

Maiolo, J. R., 3rd, E. A. Ottinger and M. Ferrer (2004). "Specific redistribution of cell-penetrating peptides from endosomes to the cytoplasm and nucleus upon laser illumination." J Am Chem Soc **126**(47): 15376-15377.

Makarava, N. and I. V. Baskakov (2008). "The same primary structure of the prion protein yields two distinct self-propagating states." J Biol Chem **283**(23): 15988-15996.

Marks, B. S., M. H. B. , Y. Vallis, I. G. Mills, A. Gibson, C. R. Hopkins and H. T. McMahon (2001). "GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis." Nature **410**: 231-235.

Matsushita-Ishiodori, Y. and T. Ohtsuki (2012). "Photoinduced RNA Interference." Acc. Chem. Res. **45**(7): 1039–1047.

Mayor, S. and R. E. Pagano (2007). "Pathways of clathrin-independent endocytosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(8): 603-612.

- Meade, B. R. and S. F. Dowdy (2007). "Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides." Advanced Drug Delivery Reviews **59**(2-3): 134-140.
- Meerovich, I., N. Muthukrishnan, G. A. Johnson, A. Erazo-Oliveras and J. P. Pellois (2014). "Photodamage of lipid bilayers by irradiation of a fluorescently labeled cell-penetrating peptide." Biochimica et Biophysica Acta **1840**(1): 507–515.
- Moan, J. and Q. Peng (2003). "An outline of the hundred-year history of PDT." Anticancer Res **23**(5A): 3591-3600.
- Muthukrishnan, N., G. A. Johnson, J. Lim, E. E. Simanek and J. P. Pellois (2012). "TAT-mediated photochemical internalization results in cell killing by causing the release of calcium into the cytosol of cells." Biochim Biophys Acta **1820**(11): 1734–1743.
- Mäger, I., K. Langel, T. Lehto, E. Eiríksdóttir and U. Langel (2012). "The role of endocytosis on the uptake kinetics of luciferin-conjugated cell-penetrating peptides." Biochimica et Biophysica Acta **1818**(3): 502–511.
- Nabi, I. R. and P. U. Le (2003). "Caveolae/raft-dependent endocytosis." J Cell Biol **161**(4): 673-677.
- Niedre, M. J., M. S. Patterson, A. Giles and B. C. Wilson (2005). "Imaging of Photodynamically Generated Singlet Oxygen Luminescence In Vivo." Photochemistry and Photobiology **81**: 941-943.
- Nishiyama, N., A. Iriyama, W. D. Jang, K. Miyata, I. K., Y. Inoue, H. Takahashi, Y. Yanagi, Y. Tamaki, H. Koyama and K. Kataoka (2005). "Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer." Nature Materials **4**: 934 - 941.
- Norum, O. J., P. K. Selbo, A. Weyergang, K. E. Giercksky and K. Berg (2009). "Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: From bench towards bedside medicine." Journal of Photochemistry and Photobiology **96**(2): 83-92.
- Nunez, D., C. Antonescu and G. Danuser (2011). "Hotspots organize clathrin-mediated endocytosis by efficient recruitment and retention of nucleating resources." Traffic **12**(12): 1868-1878.
- Oleinick, N. L., R. L. Morris and I. Belichenko (2002). "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how." Photochem. Photobiol. Sci **1**: 1-21.
- Padari, K., P. Säälík, M. Hansen, K. Koppel, R. Raid, Ü. Langel and M. Pooga (2005). "Cell transduction pathways of transportans." Bioconjug Chem **16**(6): 1399-1410.
- Patito, I. A., C. Rothmann and Z. Malik (2001). "Nuclear transport of photosensitizers during photosensitization and oxidative stress." Biology of the Cell **93**: 285–291.

Pelkmans, L., J. Kartenbeck and A. Helenius (2001). "Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER." Nature Cell Biology **3**: 473 - 483.

Pooga, M., M. Hällbrink, M. Zorko and U. Langel (1998). "Cell penetration by transportan." The FASEB Journal **12**(1): 67-77.

Ramakrishna, S., A. B. K. B. Dad, J., R. Gopalappa, S. K. Lee and H. Kim (2014). "Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA." Genome Res **24**(5): 1-8.

Redmond, R. W. and I. E. Kochevar (2006). "Spatially Resolved Cellular Responses to Singlet Oxygen." Photochemistry and Photobiology **82**: 1178-1186.

Robert, H. M., J. L. Zaro and W.-C. Shen (2012). "Comparison of Cationic and Amphipathic Cell Penetrating Peptides for siRNA Delivery and Efficacy." Mol Pharm **9**(2): 299-309.

Rosenkranz, A. A., D. A. Jans and A. S. Sobolev (2000). "Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency." Immunology and Cell Biology **78**: 452–464.

Räägel, H., M. Hein, A. Kriiska, P. Säälük, A. Florén, U. Langel and M. Pooga (2013). "Cell-penetrating peptide secures an efficient endosomal escape of an intact cargo upon a brief photo-induction." Cell Mol Life Sci **70**(24): 4825-4839.

Räägel, H., P. Säälük, M. Hansen, Ü. Langel and M. Pooga (2009). "CPP-protein constructs induce a population of non-acidic vesicles during trafficking through endo-lysosomal pathway." J Control Release **139**(2): 108-117.

Selbo, P. K., K. Sandvig, V. Kirveliene and K. Berg (2000). "Release of gelonin from endosomes and lysosomes to cytosol by photochemical internalization." Biochimica et Biophysica Acta **1475**(3): 307–313.

Selbo, P. K., G. Sivam, Ø. Fodstad, K. Sandvig and K. Berg (2001). "In Vivo Documentation of Photochemical Internalization: a Novel Approach to Site Specific Cancer Therapy." Int J Cancer **92**(5): 761-766.

Selbo, P. K., A. Weyergang, A. Hogset, O. J. Norum, M. B. Berstad, M. Vikdal and K. Berg (2010). "Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules." J Control Release **148**(1): 2-12.

Song, J., M. Kai, W. Zhanga, J. Zhanga, L. Liua, B. Zhanga, X. Liua and R. Wanga (2011). "Cellular uptake of transportan 10 and its analogs in live cells: Selectivity and structure–activity relationship studies." Peptides **32**(9): 1934–1941.

Srinivasan, D., N. Muthukrishnan, G. A. Johnson, A. Erazo-Oliveras, J. Lim, E. E. Simanek and J. P. Pellois (2011). "Conjugation to the cell-penetrating peptide TAT potentiates the photodynamic effect of carboxytetramethylrhodamine." PLoS One **6**(3): e17732.

Säälik, P., A. Elmquist, M. P. Hansen, K., K. Saar, K. Viht, U. Langel and M. Pooga (2004). "Protein Cargo Delivery Properties of Cell-Penetrating Peptides. A Comparative Study." Bioconjug Chem **15**(6): 1246–1253.

Säälik, P., K. Padari, A. Niinep, A. Lorents, M. Hansen, E. Jokitalo, Ü. Langel and M. Pooga (2009). "Protein Delivery with Transportans Is Mediated by Caveolae Rather Than Flotillin-Dependent Pathways." Bioconjug Chem **20**: 877-887.

Takechi, Y., H. Yoshii, M. Tanaka, T. Kawakami, S. Aimoto and H. Saito (2011). "Physicochemical mechanism for the enhanced ability of lipid membrane penetration of polyarginine." Langmuir **27**(11): 7099–7107.

Wadhvani, P., R. F. Epanand, N. Heidenreich, J. Bürck, A. S. Ulrich and R. M. Epanand (2012). "Membrane-active peptides and the clustering of anionic lipids." Biophys J **103**(2): 265-274.

Weeringa, J. R. T., P. Verkade and P. J. Cullenb (2012). "SNX–BAR-Mediated Endosome Tubulation is Co-ordinated with Endosome Maturation." Traffic **13**: 94-107.

Vercauteren, D., V. R. E., A. T. Jones, J. Rejman, J. Demeester, S. C. De Smedt, N. N. Sanders and K. Braeckmans (2010). "The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls." Mol Ther **18**(3): 561-569.

Wu, X. and W. Gehring (2014). "Cellular uptake of the Antennapedia homeodomain polypeptide by macropinocytosis." Biochem Biophys Res Commun **443**(4): 1136-1140.

Yandek, L. E., A. Pokorny, A. Florén, K. Knoelke, Ü. Langel and P. F. Almeida (2007). "Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers." Biophys J **92**(7): 2434-2444.

Yang, S. T., E. Zaitseva, L. V. Chernomordik and K. Melikov (2010). "Cell-penetrating peptide induces leaky fusion of liposomes containing late endosome-specific anionic lipid." Biophys J **99**(8): 2525-2533.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ MARGOT HEIN _____

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: _____ 28.07.1989 _____)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Peptiid-valk komplekside vabastamine endosoomidest fotodünaamilise efekti abil ja nende lagundamine rakus,

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on _____ Prof. MARGUS POOGA _____,

(*juhendaja nimi*)

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 26.05.2016 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, _____ 26.05.2014 _____ (*kuupäev*)