

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

Laura Liivamägi

**Glükoosaminoglükaanide osalus rakku sisenevate peptiidide
penetratsioonis plasmamembraani vesiikulitesse**

Magistritöö

Juhendajad: *MSc*, Janely Pae

PhD, prof. Margus Pooga

TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 Rakku sisenevad peptiidid.....	5
1.1.1 Arginiinirikkad rakku sisenevad peptiidid	6
1.1.2 Amfipaatsed rakku sisenevad peptiidid.....	7
1.2 RSP-de sisenemismehhanismid.....	8
1.2.1 RSP-de endotsütootiline sisenemine	9
1.2.2 RSP-de sisenemine penetratsiooni teel	10
1.2.3 RSP-de sisenemismehhanismi valik	12
1.3 Glükoosaminoglükaanid	12
1.3.1 Kerataansulfaadid.....	14
1.3.2 Dermataansulfaadid.....	15
1.3.3 Kondroitiinsulfaadid.....	15
1.3.4 Heparansulfaadid	16
1.3.5 Hüaluroonhapped	16
1.3.6 RSP-d ja glükoosaminoglükaanid	17
1.4 Gransüümid	19
1.5 Membraani mudelsüsteemid	20
1.5.1 Plasmamembraani vesiikulid.....	21
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	23
2.1 Töö eesmärgid.....	23
2.2 Materjal ja meetodika.....	23
2.2.1 Kasutatud rakuliinid	23
2.2.2 Kasutatud rakku sisenevad peptiidid ja gransüüm B	23
2.2.3 Plasmamembraani vesiikulite moodustamine	24
2.2.4 Plasmamembraani vesiikulite töötlus ensüümidega.....	24
2.2.5 Konfonkaalmikroskoopia	25
2.2.6 Lävivoolutsütomeetria.....	26
2.3 Tulemused	27
2.3.1 RSP-d sisenevad erineva efektiivsusega metsiktüüpi ja erinevatesse GAG- mutantsetesse plasmamembraani vesiikulitesse	27
2.3.2 Glükoosaminoglükaanide hulga vähendamine membraani pinnalt takistab amfipaatsete RSP-de sisenemist plasmamembraani vesiikulitesse.....	28
2.3.3 PMV-de pinnalt glükoosaminoglükaanide eemaldamine ei mõjuta gransüüm B sisenemist plasmamembraani vesiikulitesse	36
2.4 Arutelu	38
KOKKUVÕTE	41
SUMMARY	42
KIRJANDUSE LOETELU.....	43
TÄNUSÕNAD	52
LIHTLITSENTS.....	53

KASUTATUD LÜHENDID

Arg ₉	nonaarginiin
chABC	kondroitinaas ABC
CHO	Hiina hamstri munasarja rakud (i. k. <i>Chinese Hamster Ovary cells</i>)
DIC	diferentsiaal-interferents kontrastmikroskoopia (i. k. <i>differential interference contrast</i>)
DTT	ditiotreitool
FA	formaldehüüd
FACS	fluorestsents-aktiveeritud läbivoolutsütomeeter (i. k. <i>fluorescence-activated cell sorter</i>)
FITC	fluorestseiin-isotiotsüanaat
GAG	glükoosaminoglükaan
grnB	gransüüm B
hepIII	heparinaas III
HS	heparaansulfaat
hyal	hüaluronidaas VIII
PMV	plasmamembraani vesiikul
pTat(48-60)	HI-viiruse Tat-valgust pärinev 13 aminohappejäägi pikkune peptiid
RSP	rakku sisenev peptiid
TP	transportaan
TP10	transportaani analoog
WGA	nisuidu aglutiniin (i. k. <i>wheat germ agglutinin</i>)
wt	metsiktüüp (i. k. <i>wildtype</i>)
β ₁ A	β ₁ adrenergilisest retseptorist pärinev peptiid

SISSEJUHATUS

Raku plasmamembraan on selektiivne läbilaskev barjäär, mille kaudu toimub molekulide transport raku välis- ja sisekeskkonna vahel. Rakku sisenevad peptiidid ehk RSP-d on lühikesed, enamasti positiivselt laetud aminohappelised järjestused, mis suudavad edukalt transportida rakku selliseid bioaktiivseid molekule, mis iseseisvalt plasmamembraani läbida ei suuda. Kuigi RSP-sid on tänaseks uuritud ligi kolmkümmend aastat, ei ole nende täielik rakupinnale seondumise spetsiifika ja internalisatsioonimehhanismide arusaam veel täpselt selge, mistõttu on nende kasutamine meditsiinis ja biotehnoloogias piiratud. Arvatakse, et enne rakkudesse sisenemist, interakteeruvad RSP-d elektrostaatiliste jõudude vahendusel plasmamembraani anioonsete komponentidega – glükoosaminoglükaanidega. Glükoosaminoglükaanid (GAG-id) on lineaarsed polüsahhariidid, mis moodustavad raku pinnale anioonse platvormi, reguleerides erinevate molekulide voogu ja ülesandeid. Tänapäevaks on teada, et RSP-d võivad siseneda rakkudesse kahel vastandlikul teel – erinevate endotsütoosiradade vahendusel või otse läbi membraani liikumisega ehk penetratsiooniga. Siiski pole üksüheselt selge, kas glükoosaminoglükaanid võiksid mängida olulist rolli mõlemas internalisatsioonimehhanismis.

Gransüümid on rakkudes apoptoosi esile kutsuvad seriinproteasaasid, mis on samuti võimelised interakteeruma teatud proteoglükaanidega ning liikuma läbi membraani penetratsiooni teel, ent gransüümide rakkudesse sisenemise täpsed mehhanismid on veel jätkuvalt ebaselged.

Käesoleva magistritöö eesmärk oli uurida mitmete rakku sisenevate peptiidide ja gransüüm B sisenemist plasmamembraani vesiikulitesse, et välja selgitada erinevate glükoosaminoglükaanide osalus nende penetratsioonis. Plasmamembraani vesiikulid (PMV-d) on oma rakulise päritolu tõttu hea mudelsüsteem, mis võimaldab analüüsida gransüümide ja RSP-de interaktsioone membraani anioonsete komponentidega ning uurida nende penetreerumist läbi membraani süsteemis, kus rakuenergiast sõltuvad protsessid on välistatud.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Rakku sisenevad peptiidid

Rakku sisenevad peptiidid (RSP-d) on lühikesed, enamasti katioonsed ja/või amfipaatsed, kuni 30 aminohappejäägist koosnevad järjestused (Zorko ja Langel, 2005). RSP-d suudavad efektiivselt läbida bioloogilisi membraane ilma neid kahjustamata, mistõttu on neid rakendatud mitmete molekulide (väikesed terapeutilised molekulid, nukleiinhapped, peptiidid, valgud jpt) rakku transportimiseks (Lindgren jt, 2006; Tünnemann jt, 2006; Gump jt, 2010; Zeller jt, 2015). Nende hulgast on mõned RSP-d transportvektoritena jõudnud ka kliiniliste uuringute erinevatesse faasidesse (Milletti, 2012).

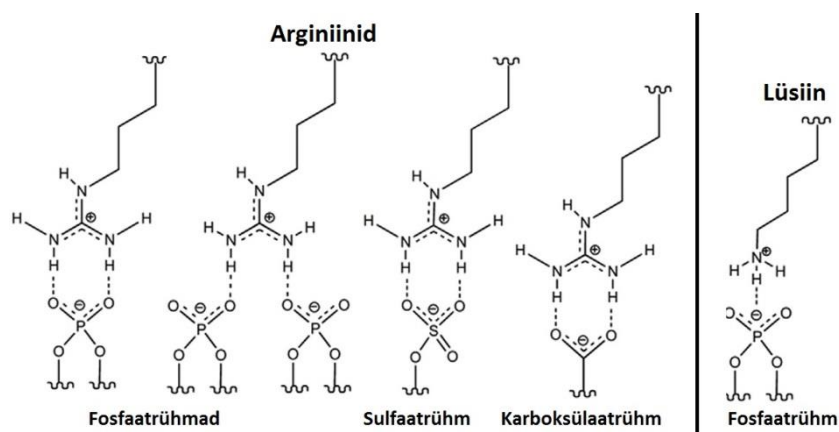
RSP-de valdkonna ajalooliselt esimene avastus oli ligi 30 aastat tagasi kui kirjeldati, et inimese immuunpuudulikkust põhjustava viiruse (HIV-1) transkriptsiooni aktivaatorvalgul (Tat-valk) on efektiivne membraani läbimisvõime (Frankel ja Pabo, 1988; Green ja Loewenstein, 1988). Mõned aastad hiljem avastati, et äädikakärbse transkriptsioonifaktor *Antennapedia* homeodomeen suudab siseneda närvirakkudesse, reguleerides ka neuraalset morfogeneesi (Joliot jt, 1991). Mõlema valguga membraani läbimisvõime põhjustas ulatuslikud struktuuri ja funktsiooni uuringud, et leida aminohappeline järjestus, mis on optimaalne antud valguga sisenemiseks rakkudesse. Selle tulemusena kirjeldati esimesed rakku sisenevad peptiidid: 16-st aminohappejäägist koosnev penetratiin, mis pärineb *Antennapedia* kolmandast heeliksist ning erinevad Tat-peptiidid, mis pärinevad 86 aminohappejäägi pikkusest Tat-valgust (Derossi jt, 1994; Vives jt, 1997).

Nüüdseks on kirjeldatud juba üle 100 rakku siseneva peptiidi, mis erinevad üksteisest nii primaarstruktuuri kui ka füsioloogiliste omaduste poolest ning seetõttu puudub ka konkreetne RSP-de klassifikatsioon (Zorko ja Langel, 2005). Siiski on RSP-sid süstematiseeritud näiteks päritolu alusel: sünteetilised (nt. oligoarginiinid), kimäärsed (nt. transportaanid) ning looduslikest valkudest pärinevad järjestused (nt. penetratiin ja Tat-peptiidid). Kimäärsed RSP-d võivad sisaldada järjestusi ka looduses esinevatest valkudest, kuid sünteetilised on läbinisti tehislikud (Zorko ja Langel, 2005). RSP-sid võib klassifitseerida ka nende keemilis-füüsikaliste omaduste ja membraani interaktsioonide põhjal: primaarsed amfipaatsed, sekundaarsed amfipaatsed ning mitteamfipaatsed RSP-d (Ziegler, 2008). Kahte esimesse klassi kuuluvad peptiidid sisaldavad rohkesti hüdrofoobseid ja katioonseid aminohappejääke, mitteamfipaatsed peptiidid koosnevad peamiselt katioonsetest aminohappejääkidest,

sealhulgas enamasti arginiinist. Tuginedes ainult RSP-de aminohappelisele koostisele võib neid tinglikult jagada kaheks: arginiinirikkad ning amfipaatsed RSP-d.

1.1.1 Arginiinirikkad rakku sisenevad peptiidid

Arginiinirikaste RSP-de enim uuritud peptiidid on penetratiin, Tat-peptiidid ja oligoarginiinid. Kõige tuntum Tat-peptiididest on 13 aminohappejäagi pikkune pTat(48-60), mille primaarstruktuuris esinevad kuus arginiini- ning kaks lüsiinijääki (Vives jt, 1997). On näidatud, et pTat(48-60) efektiivne internalisatsioon rakkudesse on tagatud peptiidi primaarstruktuuris esinevate positiivsete aminohapete (arginiin, lüsiin) olemasolul (Vives jt, 1997). Eksperimendid lühema Tat-peptiidiga, pTat(49-57), on aga näidanud, et selle RSP rakupinnaga seondumist soodustavad pigem arginiini kui lüsiini aminohappejäägid (Wender jt, 2000). Arginiini hõlbustavat mõju on kinnitanud katsed ka erinevate oligomeeridega (Mitchell jt, 2000). Rohkem kui kuuest arginiinist koosnevad oligomeerid sisenesid rakkudesse palju efektiivsemalt kui sama hulka lüsiini, histidiini või ornitiini sisaldavad peptiidid (Mitchell jt, 2000). Samuti on arginiini olulisust näidanud katsed ka penetratiiniga, mille internalisatsioonivõime rakkudesse vähenes märgatavalt kui selle RSP primaarstruktuurist vahetati arginiinid lüsiini aminohappejääkide vastu (Åmand jt, 2012). Selline erinevus tuleneb arginiini kõrgelt aluselise guanidonorühma võimest moodustada rakupinna anioonsete komponentidega üheaegselt kaks vesiniksidet (joonis 1) (Mitchell jt, 2000). Guanidonorühm on omane ainult arginiinile, teiste kationsete aminohapete (ornitiin, histidiin, lüsiin) struktuurist vastav rühm puudub. Ka arvutistimulatsioonide põhjal on näidatud, et guanidonorühmad hõlbustavad üheksast arginiinist koosneva RSP (nonaarginiin) membraani läbimist, kusjuures kuus või enam guanidonorühma on vajalik selleks, et toimuks efektiivne peptiidi läbi poori penetreerumine (Herce jt, 2009; Herce jt, 2014).

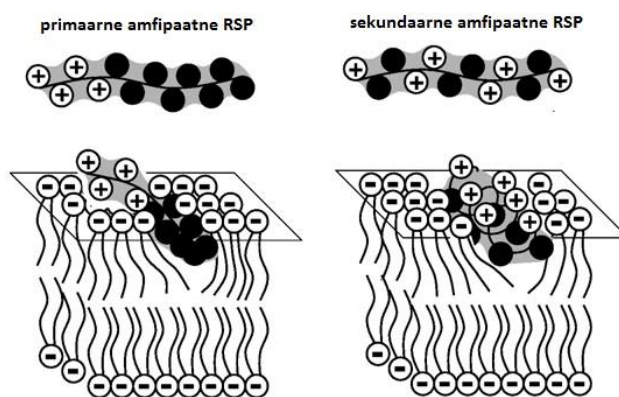


Joonis 1. Arginiini guanidonorühma vesiniksidemed erinevate membraanil paiknevate anioonsete molekulidega. Võrdluseks on toodud lüsiini ühe vesiniksideme moodustamine fosfaatrühmaga (Jobin ja Alves, 2014).

Oligoarginiinide optimaalne rakkudesse sisenemine ja tuuma akumulatsioon on efektiivne 8-st kuni 9-st arginiinist koosneva oligomeeri puhul, sellest lühemad on halvema internalisatsioonivõimega ning pikemad on rakkudele tsütotoksilised (Futaki jt, 2001).

1.1.2 Amfipaatsed rakku sisenevad peptiidid

Ziegleri klassifikatsiooni alusel jagunevad amfipaatsed RSP-d kaheks – primaarsed ning sekundaarsed (Ziegler, 2008). Nendest esimeste puhul eristuvad peptiidi primaarstruktuuris järjestikku paiknevad hüdrofoobsed ja katioonsed domäänid (joonis 2). Sekundaarsed amfipaatsed RSP-d sisaldavad vaheldumisi paiknevaid hüdrofoobseid ja katioonseid aminohappeid, kuid nende RSP-de puhul saavutatakse amfipaatsus peale membraaniga seondumist, kui nad muudavad oma sekundaarstruktuuri nii, et hüdrofoobsed aminohappejäägid on ühel poolel ning katioonsed teisel pool (joonis 2) (Ziegler, 2008).



Joonis 2. Amfipaatsete RSP-de klassifikatsioon tulenevalt nende aminohappelisest koostisest. Joonisel on toodud erinevate amfipaatsete RSP-de primaarstruktuur ning seondumine membraaniga. Sekundaarsed amfipaatsed RSP-d võtavad membraaniga seondumisel helikaalse struktuuri. (+) katioonsed ja (●) hüdrofoobsed aminohapped (Ziegler, 2008).

Primaarsete amfipaatsete RSP-de hulka kuuluvad transportaan (TP) ja selle erinevad derivaadid (Pooga jt, 1998; Soomets jt, 2000). Arvatakse, et selle grupi RSP-de ja lipiidide omavahelised interaktsioonid on pigem hüdrofoobsed kui elektrostaatilisid, kuna nad seostuvad kõrge afiinsusega nii neutraalsete kui ka anioonsete kunstlike membraanidega (Ziegler, 2008). TP on kimäärne peptiid, mis koosneb kahest fragmendist: aminohapped 1-12 tulenevad neuropeptiid galaniini aminotermiinaalsest otsast ning aminohapped 14-27 vastavad herilase mürgis leiduvale mastoparaanile (fragmendid on ühendatud lüsiini vahendusel) (Pooga jt, 1998). TP sisenemine rakkudesse toimub kiiresti, akumulatsioon toimub hästi nii raku plasmamembraani, organellide membraanidesse kui ka tuuma (Pooga jt, 1998). Transportaan 10 (TP10) on transportaani derivaat, mille aminotermiinaalsest otsast on

eemaldatud 6 aminohappejääki (Soomets jt, 2000). Mõlema amfipaatses RSP struktuurist puuduvad arginiini aminohappejäägid, kuid siiski omavad neutraalse pH juures positiivset laengut (+4), mis on tagatud nelja lüsiinijäägi olemasolust (Pooga jt, 1998; Soomets jt, 2000). Hoolimata arginiinijääkide puudumisest, suudavad mõlemad RSP-d edukalt plasmamembraaniga seonduda ja rakku siseneda, ka erinevate lastmolekulidega konjugeeritult (Pooga jt, 2001; Padari jt, 2005; Mäger jt, 2012). Näiteks on TP abil rakkudesse viidud erineva suurusega valke (30 kDa kuni 150kDa) (Pooga jt, 2001) ning TP10 kaasabil on transporditud vähirakkudesse spetsiifilisi oligonukleotiide (El-Andaloussi jt, 2005). TP10 stabiilsuse ja transpordi efektiivsuse täiustamiseks on seda stearüülrühmaga aminotermiinaalsest otsast modifitseeritud, olles aluseks ka uue põlvkonna RSP-dele ehk PecFect-idele ja NickFect-idele (Mäe jt, 2009; Oskolkov jt, 2011). On näidatud, et N-terminaalselt stearüülitud TP10 on märgatavalt parema oligonukleotiidide transfektsiooni efektiivsusega kui modifitseerimata TP10 (Mäe jt, 2009).

Transportaanid sarnanevad oma aminohappelise koostise, laengu ja ka omaduste poolest mitmete antimikroobsete peptiididega, mis on samuti lühikesed, positiivselt laetud amfipaatsed järjestused (Nekhotiaeva jt, 2004). Antimikroobsed peptiidid tuvastavad organismis leiduvaid patogeenseid organisme ning on neile toksilised (Nekhotiaeva jt, 2004). TP10 suudab analoogselt antimikroobsete peptiididega mikromolaarsetel kontsentratsioonidel efektiivselt inhibeerida pärmseene *Candida albicans*'i ja grampositiivse bakteri *Staphylococcus aureus*'e kasvu (Nekhotiaeva jt, 2004).

Sekundaarsete amfipaatses RSP-de hulka kuuluvad näiteks penetratiin ja MAP (Derossi jt, 1994; Oehlke jt, 1998). Neutraalsete membraanide suhtes omavad antud grupi RSP-d madalamat afiinsust kui primaarsed amfipaatsed RSP-d, kuid nende afiinsus suureneb kui membraanis tõuseb anioonsete lipiidide osakaal (Ziegler, 2008).

1.2 RSP-de sisenemismehhanismid

RSP-d võivad rakkudesse siseneda kahel vastandlikul viisil – rakuenergiast sõltumata penetratsiooni teel või energiast sõltuvalt erinevate endotsütootiliste radade vahendusel (Jiao jt, 2009). Peamised RSP-de poolt kasutatavad endotsütoosirajad on makropinotsütoos (Nakase jt, 2004, Mäger jt, 2012), klatriin-sõltuv ja (Richard jt, 2005; Mäger jt, 2012), kaveoliin-sõltuv endotsütoos (Ferrari jt, 2003; Säälük jt, 2009). RSP-d võivad rakkudesse sisenemisel kasutada ka alternatiivseid klatriin- ja kaveoliin-sõltumatuid endotsütootilisi radu nagu näiteks flotilliin-sõltuv endotsütoos (Glebov jt, 2006), ent neid on kõige vähem uuritud,

mistõttu on antud raja toimumismehhanismides veel palju ebaselget ning seetõttu ei ole täpselt teada, kui suur on nende osalus RSP-de sisenemisel rakkudesse.

Hoolimata paljudest uuringutest, ei ole veel päris selge, kuidas penetratsioon toimub, kuid on pakutud erinevaid mudeleid, millest põhilised on pööratud mitselli mudel (i. k. *inverted micelle model*) (Derossi jt, 1996), vajuva parve mudel (i. k. *carpet model*) ning pooride moodustamise mudel (i. k. *pore formation*). Kaks viimast mudelit on esialgselt pakutud antimikroobsete peptiidide raku sisenemismehhanismina (Pouny jt, 1992; Yang jt, 2001), ent arvatakse, et need võivad kehtida ka mõndade RSP-de penetreerumisel (Zorko ja Langel, 2005).

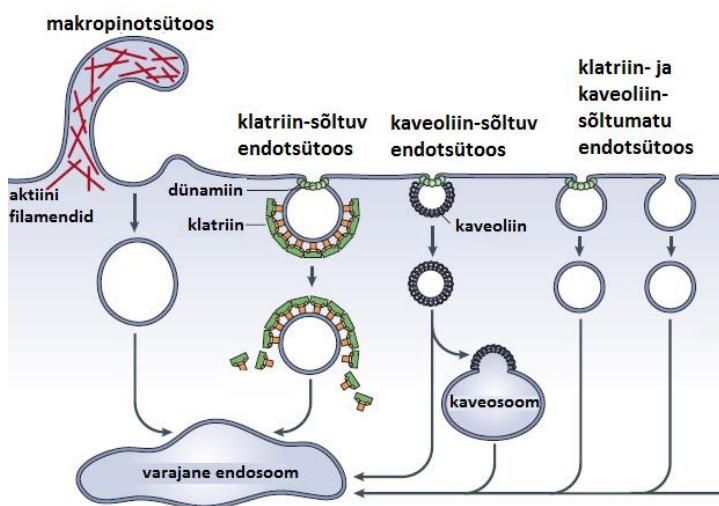
1.2.1 RSP-de endotsütootiline sisenemine

Endotsütoos on rakkudes põhiline transportsüsteem, mille vahendusel pääsevad erinevad biomolekulid raku väliskeskkonnast sisekeskkonda. Endotsütoos jaguneb fagotsütoosiks, mis hõlmab endas suurte partiklite omastamist spetsiifiliste rakkude poolt (näiteks makrofaagide), ja pinotsütoosiks, mille vahendusel omastab rakk vedelikes lahustunud aineid. Pinotsütoos jaotatakse omakorda makropinotsütoosiks, klatriin- ning kaveoliin-sõltuvaks ning klatriin- ja kaveoliin-sõltumatuks endotsütoosiks (Doherty ja McMahon, 2009).

Makropinotsütoos on retseptor-sõltumatu endotsütoos, mis raku ekstratsellulaarse stiimuli (näiteks fibroblasti kasvufaktor) mõjul põhjustab raku plasmamembraani aktiinifilamentides dünaamika muutust, kutsudes esile intensiivse membraanijätkete väljasopistumise (i. k. *membrane ruffling*) (Doherty ja McMahon, 2009). Raku pinnal moodustuvad pikkade jätketega väljasopistused, mis membraanile tagasi langedes moodustavad suuri vesiikule ehk makropinosoome ($>1 \mu\text{m}$) (joonis 3) (Mayor ja Pagano, 2007). Mitmetel juhtudel on näidatud makropinotsütoosi osalust arginiinirikaste RSP-de sisenemises rakkudesse (Nakase jt, 2004; Wadia jt, 2004; Duchardt jt, 2007). Näiteks kui kasutati aktiinifilamentide polümerisatsiooni ja makropinosoomide moodustamist pärssivat inhibiitorit, vähenes polüarginiinide (Nakase jt, 2004) ja pTat(48-60) (Wadia jt, 2004) sisenemiseefektiivsus rakkudesse märgatavalt.

Klatriin- ning kaveoliin-sõltuva endotsütoosi puhul moodustavad vastavate valkude abil endotsütootilised vesiikulid (joonis 3). Klatriin-kaetud vesiikulite puhul toimub enne endosoomiga ühinemist klatriin-katte eemaldamine (joonis 3) (Mayor ja Pagano, 2007). Mõlemas endotsütoosirajas moodustunud vesiikulid on mõõtnemelt tunduvamalt väiksemad kui makropinosoomid – klatriin-kaetud endosoomid on ligikaudu 120 nm suurused ja kaveoliin-endosoomid ehk kaveosoomid on ~ 80 nm (Doherty ja McMahon, 2009). Mõlemas

endotsütoosirajas osaleb abivalk dünaamin, millel võib olla ka funktsioon klatriin- ja kaveoliin-sõltumata endotsütoosirajas (joonis 3) (Mayor ja Pagano, 2007). Klatriin-sõltuvat endotsütoosi on kirjeldatud näiteks pTat(48-60) sisenemisel rakkudesse (Richard jt, 2005), kargomolekuli juuresolekul on vastav kompleks sisenenud aga kaveoliin-sõltuva endotsütoosiraja vahendusel (Ferrari jt, 2003; Fittipaldi jt, 2003).



Joonis 3. Erinevad endotsütoosirajad (Mayor ja Pagano, 2007), mida RSP-d sisenemiseks kasutavad.

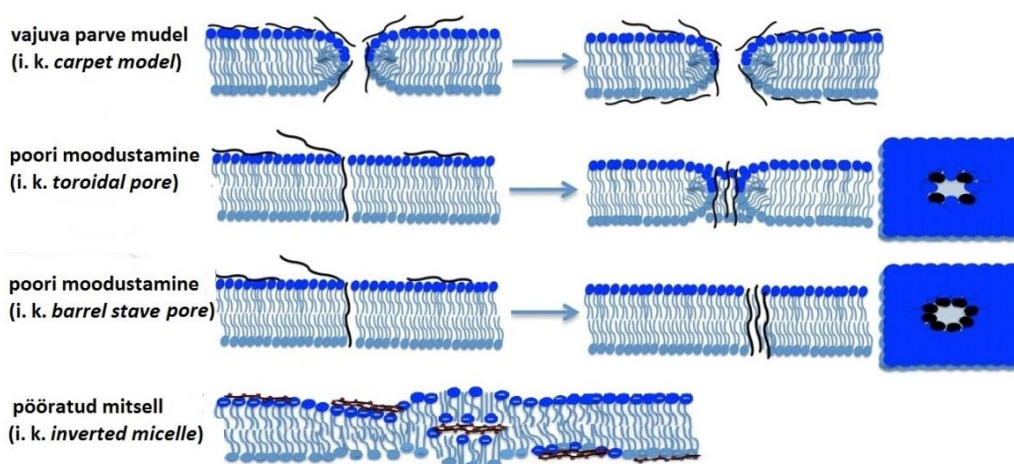
Samuti pole välistatud, et mitmed RSP-d võivad rakkudesse sisenemisel kasutada samaaegselt mitut endotsütoosirada, sealjuures võib esineda teatud raja eelistusi (Duchardt jt, 2007; Mäger jt, 2012). Näiteks sisenesid penetratiin, pTat(48-60) ja nonaarginiin rakkudesse samaaegselt nii makropinotsütoosi, klatriin- ning kaveoliin-sõltuva endotsütoosi vahendusel (Duchardt jt, 2007).

1.2.2 RSP-de sisenemine penetratsiooni teel

Penetratsiooniks nimetatakse RSP-de võimet läbida membaane ilma rakuenergiat vajavate protsesside (sealhulgas endotsütoos) osaluseta (Derossi jt, 1994). Antud mehhanismi on võimalik uurida nii elusrakkudel kui ka erinevates membraanmudelsüsteemides (Derossi jt, 1996; Åmand jt, 2011). Arvatakse, et arginiinirikaste RSP-de penetreerumisele aitab kaasa peptiidi positiivne laeng ning amfipaatsete RSP-de puhul vastavalt hüdrofoobsete aminohapete esinemine peptiidi järjestuses (Derossi jt, 1996; Ziegler, 2008).

Kõige esimeseks penetratsiooni kirjeldavaks mudeliks oli pööratud mitselli moodustumine, mis pakuti välja uurides penetratiini rakku sisenemismehhanismi (Derossi jt, 1996). Antud mudeli puhul interakteeruvad penetratiini positiivse laenguga aminohapped negatiivselt laetud

fosfolipiididega, mille tagajärel indutseeritakse pööratud mitsell, avanedes membraani teisele küljele ja võimaldades RSP-del rakku siseneda (joonis 4) (Derossi jt, 1996). Sellise pööratud mitselli moodustamisega on RSP-d koguaeg membraanipinnaga seotud ning ei puutu lipiidse barjääri hüdrofoobse osaga kokku (joonis 4) (Derossi jt, 1996). Lisaks arvatakse, et penetratiini trüptofaani aminohappejääkidel võib olla määrav roll mitselli moodustamisel, mis põhjustab RSP-de penetreerumise läbi membraani (Derossi jt, 1994; Derossi jt, 1996). Teise pakutava mudeli alusel läbivad peptiidid membraani vertikaalselt kahesuguste pooride abil, millest ühe puhul osalevad poori moodustamisel ainult RSP-d (i. k. *barrel stave pore*) ja teise puhul kaasatakse pooride moodustamisse ka lipiide (i. k. *toroidal pore*) (joonis 4) (Pisa jt, 2014). Pooride moodustamist on pakutud arginiinirikaste RSP-de [näiteks pTat(48-60) ja nonaarginiin] ja amfipaatse TP10 sisenemisel rakkudesse (Deshayes jt, 2004; Yandek jt, 2007; Hecce jt, 2009). Kolmanda mudeli „vajuva parve“ põhjal interakteeruvad katioonsed RSP-d negatiivselt laetud fosfolipiididega, mille tulemusena katavad RSP-d „vaibana“ membraani. Jõudes teatud lokaalse kontsentratsioonini, tekitavad RSP-d fosfolipiidides ümberkorraldusi, mille tagajärel sisenevad RSP-d rakku (joonis 4) (Pisa jt, 2014).



Joonis 4. Võimalikud RSP-de penetreerumismudelid (Pisa jt, 2014).

RSP-de penetreerumine otse läbi plasmamembraani väldib kargo-molekulide kinnijäämist endosoomidesse, mis on RSP-de endotsütootilisel sisenemisel tihtipeale põhiliseks probleemiks (Tünnemann jt, 2008). Samas on leitud, et RSP-de modifitseerimine hüdrofoobsete rühmadega võib parandada RSP-de vabanemist endosütootilisest lõksust (Mäe jt, 2009).

1.2.3 RSP-de sisenemismehhanismi valik

RSP-de sisenemismehhanism sõltub oluliselt peptiidi aminohappelisest järjestusest, selle laengust, peptiidi kontsentratsioonist, kargomolekuli omadustest, rakutüübist ning selle membraanilisest koostisest (Mitchell jt, 2000; Futaki jt, 2001; Tünnemann jt, 2006; Jiao jt, 2009; Åmand jt, 2012). On näidatud, et kõrgema nonaarginiini kontsentratsiooni korral esineb rakkude tsütoplasmas tugev difuussne fluorestsents, viidates penetratsioonile ning madalama kontsentratsiooni puhul toimub akumulatsioon sekretoorsetesse vesiikulitesse, viidates peptiidi endotsütootilisele sisenemisele (Tünnemann jt, 2008). Katsed penetratiiniga on näidanud, et otsene läbi membraani penetreerumine saab toimuda ainult madalal peptiidi kontsentratsioonil (Jiao jt, 2009). Nimetatud peptiidide kontsentratsiooni ja internalisatsiooni uuringutes on kasutatud erinevaid RSP-sid ja rakuliine, mistõttu võib arvata, et peale peptiidi keemilis-füüsikaliste omaduste, sõltub RSP-de sisenemismehhanism veel oluliselt kasutatavast rakutüübist, selle membraanilisest koostisest ning afiinsusest (Åmand jt, 2012). Näiteks hõlbustavad mõnede RSP-de raku kontsentreerumist nende interaktsioonid raku pinnal olevate glükoosaminoglükaanidega, millede omavaheline afiinsus määrab ka peptiidide sisenemiseefektiivsuse (Ziegler ja Seelig, 2008; Åmand jt, 2012).

RSP-de sisenemine sõltub suuresti ka transporditava molekuli füsioloogilistest iseärasustest nagu suurus ja laeng (Tünnemann jt, 2006). Tünnemann ja kaasautorid näitasid, et suurema lastmolekuli juuresolekul sisenesid RSP-d pigem endotsütootilist rada pidi, seevastu väiksema lastmolekuli olemasolul internaliseerusid RSP-d rakkudesse nii endotsütoosi kui ka penetratsiooni kaudu (Tünnemann jt, 2006).

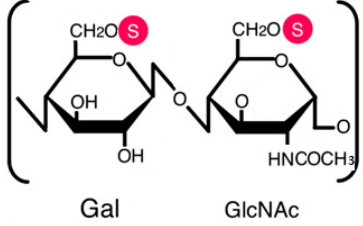
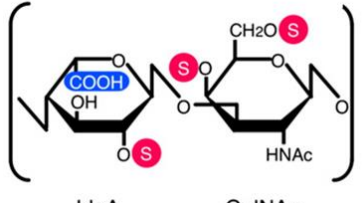
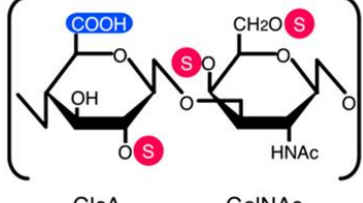
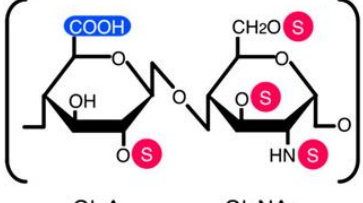
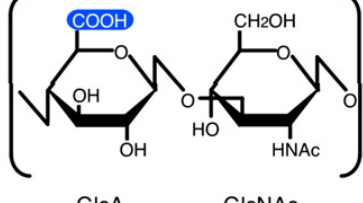
1.3 Glükoosaminoglükaanid

Glükoosaminoglükaanid (GAG-id) on pikaahelalised polüsahhariidid, mis koosnevad korduvstruktuuridest: galaktoos või uroonhape (glükuroonhape või iduroonhape) ning aminosuhkur (N-atsetüülgalaktoosamiin või N-atsetüülglükoosamiin) (tabel 1) (Ernst jt, 1995). Eristatakse järgmisi glükoosaminoglükaane: kerataansulfaadid, kondroitiinsulfaadid, heparaansulfaadid/hepariin, dermataansulfaadid ja hüaluroonhapped (tabel 1) (Ernst jt, 1995). GAG-id esinevad raku kas vaba ahelana või moodustavad valkudele kinnituses erinevaid proteoglükaane (Ernst jt, 1995). Proteoglükaane võib liigitada asukohaspetsiifiliselt kolmeks: transmembraansed ehk membraanist läbiulatuvad (näiteks sündekaanid ja glüpikaanid), ekstratsellulaarsed (näiteks agrekaanid ja perlekaanid) ning intratsellulaarsed (näiteks serglütsiinid). GAG-ide struktuuris on erineval määral karboksüül- ning sulfaatühmi,

mistõttu omavad proteoglükaanid tugevat negatiivset laengut, olles seeläbi rakkudes olulised veesidujad ning koe homöostaasi reguleerijad (Hitchcock jt, 2008). Kusjuures sulfaatrühmade positsioon (v.a hüaluroonhapped) võib GAG-ide struktuuris oluliselt varieeruda (tabel 1) (Ernst jt, 1995). Samuti osalevad GAG-id mitmesugustes rakkudevahelise kommunikatsiooniga seotud bioloogilistes protsessides, reguleerides rakkude morfogeneesi ja proliferatsiooni (Bishop jt, 2007). Lisaks võivad GAG-id osaleda patoloogilistes protsessides, näiteks tuumori moodustumisel ja arenemisel (Matsuda jt, 2001; Thelin jt, 2012). Arvatakse, et erinevates patoloogilistes rakkudes on iseäralik glükoosaminoglükaanide muster, mis võib olla perspektiivne rakendus haiguste diagnoosimisel ja nende ravimisel (Matsuda jt, 2001; Thelin jt, 2012).

Glükoosaminoglükaanide biosüntees võib toimuda kas Golgi kompleksis või plasmamembraanis (hüaluroonhapped). Golgi kompleksis toimub ka GAG-ide edasine modifitseerimine – sulfaatimine ja isomerisatsioon. Erineva pikkusega GAG-ahelad transpordikse Golgi kompleksist sekretoorsete vesiikulite vahendusel raku ekstratsellulaarsesse ruumi, kus nad moodustavad koos kinnitusvalkudega proteoglükaane (Ernst jt, 1995). GAG-id on rakupinna valkudega seotud kas O-seoselise (heparaansulfaadid/hepariin, dermatansulfaadid, kondroitiinsulfaadid, kerataansulfaadid) või N-seoselise glükosüleerimisega (kerataansulfaadid) (Ernst jt, 1995). Neist viimane toimub asparagiini lämmastiku aatomi kaudu ning O-seoseline glükosüleerimine vastavalt seriini või treoniini hapniku aatomi vahendusel (Ernst jt, 1995).

Tabel 1. Erinevad glükoosaminoglükaanid. Tabelis on toodud polüsahhariidide struktuur, varieeruv suurus (kDa) ning sulfaatrühmade võimalik positsioon (Ernst jt, 1995; Mikami ja Kitagawa, 2013).

Glükoosaminoglükaanid	Korduvstruktuur
Kerataansulfaadid 5-26 kDa	 <p style="text-align: center;">Gal GlcNAc</p>
Dermataansulfaadid 15-55 kDa	 <p style="text-align: center;">IdoA GalNAc</p>
Kondroitiinsulfaadid 15-70 kDa	 <p style="text-align: center;">GlcA GalNAc</p>
Heparaansulfaadid 25-70 kDa	 <p style="text-align: center;">GlcA GlcNAc</p>
Hüaluroonhapped 100-1000 kDa	 <p style="text-align: center;">GlcA GlcNAc</p>

Gal – galaktoos

GlcNAc – N-atsetüülglükoosamiin

GalNAc – N-atsetüülgalaktoosamiin

IdoA – iduroonhape

GlcA – glükuroonhape

1.3.1 Kerataansulfaadid

Kerataansulfaadid on laialt levinud kõhrkoe, luukoe ja närvikoe ekstratsellulaarses maatriksis (Krusius jt, 1986; Sommarin jt, 1998). Nende polüsahhariidse ahela moodustavad vaheldumisi paiknevad sulfaaditud galaktoos ja N-atsetüülglükoosamiin (Ernst jt, 1995).

Sulfaatrühma asukoht varieerub mõlema monosahhariidi kuuendas positsioonis, kuid modifikatsioon toimub sagedamini N-atsetüülglükoosamiini struktuuris (tabel 1) (Ernst jt, 1995). Erinevalt teistest GAG-idest ei ole kerataansulfaatide struktuuris happelist korduvstruktuuri (iduroonhape või glükuroonhape), selle asemel esineb monosahhariid galaktoos. Samuti on kerataansulfaadid ainukesed GAG-id, mis võivad olla valkudele kinnitunud nii läbi N-seoselise kui ka O-seoselise glükosüleerimise (Ernst jt, 1995).

Kerataansulfaatide põhiliseks funktsiooniks on veemolekulide sidumine, mis toob kaasa koe tasakaalustatud hüdratsiooni (Fullwood jt, 1996). Näiteks vastutavad kerataansulfaadid sarvkesta niiskustaseme eest, mistõttu on need polüsahhariidid eriti olulised nägemises (Fullwood jt, 1996). Samuti on nendel GAG-idel väike roll kõhrkoes, reguleerides üheskoos hüaluroonhapete ning kondroitiinsulfaatidega liigestevahelist vedeliku hulka, soodustades seeläbi liigutuste elastsust ja sujuvust (Sommarin jt, 1998).

1.3.2 Dermataansulfaadid

Dermataansulfaadid koosnevad iduroonhappe ja N-atsetüülgalaktoosamiini vahelduvatest korduvstruktuuridest (Ernst jt, 1995). Antud polüsahhariidi sulfaatrühma asukoht varieerub N-atsetüülgalaktoosamiini neljandas ja kuuendas positsioonis ning iduroonhappe teises positsioonis (tabel 1) (Ernst jt, 1995). Dermataansulfaadid on valdavalt nahas paiknevad GAG-id, kus nendega seonduvad näiteks erinevad kasvufaktorid ning signaalmolekulid, mis osalevad rakkude proliferatsioonis ja haava paranemises (Thelin jt, 2012; Nikolovska jt, 2014). Naha taastumisel vabastakse normaalsest rohkem dermataan- ning heparaansulfaate, millega seonduvad fibroblastide kasvufaktorid, vahendades seeläbi rakkude proliferatsiooni (Penz jt, 1998). Samuti on leitud, et dermataansulfaadid osalevad inimese söögitoru vähirakkude arenemisel ja kasvamisel, kus nad on normaalsega võrreldes üleekspressioonunud (Thelin jt, 2012).

1.3.3 Kondroitiinsulfaadid

Kondroitiinsulfaatide struktuuri moodustavad vaheldumisi paiknevad glükuroonhapped ning N-atsetüülgalaktoosamiinid (Ernst jt, 1995). Antud polüsahhariidid on sulfaatrühmade asukoha suhtes kõige mitmekesisemad, nimelt võib sulfaatrühma positsioon varieeruda N-atsetüülgalaktoosamiini neljandas ja kuuendas positsioonis (või mõlemas korraga) ning glükuroonhappe teises positsioonis (tabel 1) (Ernst jt, 1995). Sellest lähtudes on kondroitiinsulfaatide struktuur väga varieeruv, mistõttu osalevad need polüsahhariidid ka erinevates bioprotsessides, olles laialdaselt levinud näiteks luukoes, kõhrkoes, veresoontes

ning ajus (Faissner jt, 1994; Hitchcock jt, 2008). Ajus seonduvad kondroitiinsulfaatidega erinevad kasvufaktorid ja kemokiinid, mis on vajalikud neurogeneesis (Faissner jt, 1994). Sama oluline roll on kondroitiinsulfaatidel kõhrkoes, kus need polüsahhariidid on võimelised siduma veemolekule ja pehmemdama seeläbi liigestevahelist hõõrdumist (Hitchcock jt, 2008).

1.3.4 Heparansulfaadid

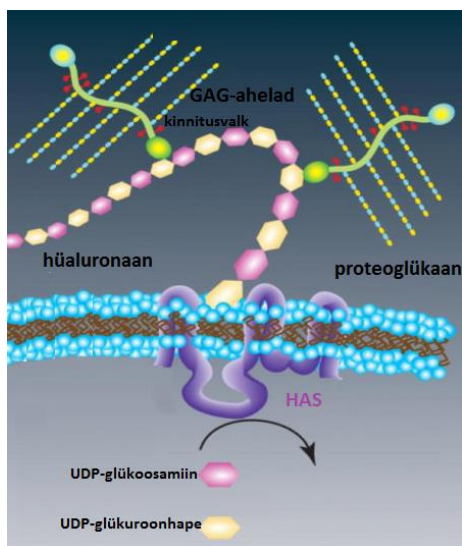
Heparansulfaadid koosnevad vahelduvatest glükuroonhappe ning N-atsetüülgalaktoosamiini monosahhariididest (Ernst jt, 1995). Antud polüsahhariidid on võrreldes teiste GAG-idega kõige rohkem sulfaaditud: sulfaatrühma asukoht varieerub N-atsetüülglükoosamiini teises, kolmandas ja kuuendas positsioonis ning glükuroonhappe teises positsioonis (tabel 1) (Ernst jt, 1995). Hepariin on struktuurilt heparaansulfaatide analoog, kuid sünteesitakse ainult neumrakkudes ning on erinevalt heparaansulfaatidest rohkem sulfaaditud (Ernst jt, 1995).

Tulenevalt tugevast anioonselt laengust, seonduvad katioonsed molekulid kõige tõenäolisemalt just heparaansulfaatidega, vahendades näiteks erinevaid proliferatsiooni, angiogeneesi ja infektsiooniga seotud molekulaarseid protsesse (Bishop jt, 2007). Samuti on leitud, et heparaansulfaadid osalevad ka patoloogiate kujunemisel, näiteks tuumori kasvamisel (Matsuda jt, 2001). Matsuda töögrupp kirjeldas, et heparaansulfaadid on tugevalt ekspresseeritud inimese rinnavähirakkudes, normaalsetes rakkudes on nende ekspressioon madal (Matsuda jt, 2001).

1.3.5 Hüaluroonhapped

Hüaluroonhape ehk hüaluronaan on glükoosaminoglükaan, mille struktuuri moodustavad glükuroonhapped ning N-atsetüülglükoosamiinid (tabel 1) (Ernst jt, 1995). Hüaluronaan on biosünteesi poolest teistest GAG-idest erinev, sest see sünteesitakse spetsiifilise ensüümide poolt plasmamembraanis, mitte Golgi kompleksis (Ernst jt, 1995). Hüalurooni süntetaasid kasutavad substraadina UDP-dega seotud glükoosamiini või glükuroonhapet ning kasvav hüaluronaan surutakse ekstratsellulaarsesse ruumi (joonis 5) (Dicker jt, 2014). Sellisel moel tekkinud hüaluronaaani polümeerid on võrreldes teiste GAG-idega kõige pikemad ning ka massiivsemad, koosnedes kuni 1000 disahhariidist, molekulmassiga 100-1000 kDa (Ernst jt, 1995). Kuna hüaluronaan sünteesitakse plasmamembraanis, siis ei modifitseerita seda edasi Golgi kompleksis, mistõttu puuduvad hüaluroonhappel erinevalt teistest GAG-idest sulfaatrühmad (tabel 1) (Ernst jt, 1995).

Erinevad glükoosaminoglükaan-ahelad moodustavad valkudele kinnituses proteoglükaane, mis massiliselt ja kovalentselt seonduvad omakorda ka hüaluroonaanile (joonis 5) (Ernst jt, 1995). Hüaluroonaan ei ole proteoglükaan, kuna ei seonu ise valkudele (Laurent ja Fraser, 1992). Sellegipoolest seonduv hüaluroonaan erinevate rakupinna retseptoritega, mis toob kaasa mitmesuguste signalisatsiooniradade aktivatsiooni (Dicker jt, 2014).



Joonis 5. Hüaluroonaani biosüntees ning proteoglükaanide kinnitumine. Hüalurooni süntetaasid (HAS) kasutavad substraadina UDP-ga seotud glükoosamiini või glükuroonhapet, kasvav hüaluroonaan surutakse ekstratsellulaarsesse ruumi. Hüaluroonaanile seonduvad kinnitusvalkude abil erinevad proteoglükaanid (Xu jt, 2012).

Hüaluroonaani leidub kõikide selgroogsete rakkude ekstratsellulaarses maatriksis, kuid hüaluroonhapete kontsentratsioon võib varieeruda (Dicker jt, 2014). Näiteks on vereseerumis hüaluroonaani kontsentratsioon madal (0,01-0,1 µg/g), kuid munarakus võib hüaluroonhapete kontsentratsioon ulatuda kuni 1 mg/ml (Zhou jt, 2000; Dicker jt, 2014). Lisaks sellele võib hüaluroonaan paikneda ka raku intratsellulaarses ruumis, näiteks tsütoplasmas ja tuumas (Ripellino jt, 1988).

1.3.6 RSP-d ja glükoosaminoglükaanid

Viimastel aastatel on hakatud järjest rohkem uurima RSP-de ja GAG-ide omavahelisi interaktsioone ja selle rolli RSP-de rakkudesse sisenemisel (Jiao jt, 2009; Alves jt, 2011; Åmand jt, 2012). Mitmed uurimistööd on näidanud, et RSP-de kontsentratsioon võib olla määravaks, kas RSP-de internalisatsioon on GAG-idest sõltuv või sõltumatu (Jiao jt, 2009; Alves jt, 2011). Madalamatel peptiidi kontsentratsioonidel (1 µM) võib RSP-de internalisatsioon raku toimuda GAG-idest sõltumatult ning kõrgematel kontsentratsioonidel toimub eelkõige klasterdumine GAG-ahelatele ja RSP siseneb rakkudesse endotsütoosi teel

(Jiao jt, 2009; Alves jt, 2011). Brocki töögrupp näitas, et kõrgem Arg₉ kontsentratsioon (<15 µM) stimuleerib sfingomüelinaasi aktiivsust, mis soodustab sfingomüeliini hüdrofüüsi tseramiidiks (Verdurmen jt, 2010). Selle tulemusel tekivad raku plasmamembraani suured tseramiidiga rikastatud domeenid (Verdurmen jt, 2010). Hiljutised uuringud viitavad, et tseramiid-platvormid võivad hõlbustada GAG-ide klasterdumist, mis omakorda soodustab RSP-de (penetratiin ja R₆W₃) sisenemist rakkudesse kas endotsütoosi või penetratsiooni teel (Bechara jt, 2014).

RSP-d moodustavad raku pinna glükoosaminoglükaanidega klastreid, millel võib olla rakkudesse sisenemisel nii inhibitoorne kui ka hõlbustav efekt (Verdurmen jt, 2013; Bechara jt, 2014). Näiteks kui uuriti TP10 analoogide klasterdumist GAG-idega, leiti, et nende RSP-de vahendusel tekivad massiivsed GAG-klasid, mille tagajärel halveneb peptiidide internalisatsioon rakku (Verdurmen jt, 2013). Arginiinirikad RSP-d võivad samuti GAG-idega klastreid moodustada ning arvatakse, et GAG-ahelatele kontsentreerumine võib soodustada nende peptiidide sisenemist rakkudesse (Ziegler ja Seelig, 2008, Åmand jt, 2012; Verdurmen jt, 2013; Bechara jt, 2014). Siiski pole täpselt teada, missugune roll võib olla GAG-ide ja RSP-de vahelistel klastritel peptiidide sisenemisel rakkudesse erinevate mehhanismide vahendusel.

RSP-de interaktsioon GAG-idega ning nende internalisatsioon rakku sõltub oluliselt peptiidi aminohappelisest järjestusest ja selle omadustest (Jiao jt, 2009). Esbjörner töögrupp võrdles arginiini- ning lüsiinirikaste RSP-de rakkudesse sisenemise võimet, hinnates nende peptiidide afiinsust raku pinna glükoosaminoglükaanide suhtes (Åmand jt, 2012). Tulemuste kohaselt on arginiinirikastel RSP-del suurem afiinsus glükoosaminoglükaanidele kui lüsiinirikastel RSP-del, mistõttu sisenevad arginiinirikad RSP-d rakku efektiivsemalt (Åmand jt, 2012). Lisaks on näidatud, et trüprofaani esinemine RSP-de järjestuses suurendab peptiidi afiinsust raku pinnal paiknevate glükoosaminoglükaanidele, mis omakorda parandab peptiidide sisenemist rakkudesse nii penetratsiooni kui ka endotsütoosi teel (Bechara jt, 2013; Bechara jt, 2014).

Arvukad tulemused viitavad, et heparaansulfaadid osalevad eelkõige arginiinirikaste RSP-de endotsütootilisel sisenemisel (Futaki jt, 2001; Tyagi jt, 2001; Fuchs ja Raines, 2004; Wadia jt, 2004; Richard jt, 2005; Letoha jt, 2010). Fuchs töögrupp näitas, et nonaarginiin sisenes oluliselt vähem rakkudesse, millel puudusid vastavalt kondroitiin- ning heparaansulfaadid või ainult heparaansulfaadid (Fuchs ja Raines, 2004). Heparansulfaatide olulisust on täheldatud ka pTat(48-60) interakteerumisel raku plasmamembraaniga (Tyagi jt, 2001; Wadia jt, 2004; Richard jt, 2005). Vaatamata heparaansulfaatide puudumisele kontsentreerus pTat(48-60)

siiski mingil määral rakkudesse, mistõttu võib arvata, et pTat(48-60) on võimeline sisenema rakku ka ilma heparaansulfaatide osaluseta (Silhol jt, 2002; Gump jt, 2010). Viimaste aastate jooksul on tähelepanu all heparaansulfaatidest koosnev proteoglükaan sündekaan-4, millel võib olla arginiinirikaste RSP-de seondumisel membraaniga retseptori funktsioon (Letoha jt, 2010; Nakase jt, 2014). Vaatamata rohketele GAG-ide ja RSP-de omavaheliste interaktsioonide uurimistöödele, pole täpselt selge, kas GAG-idel on määrav roll RSP-de sisenemises rakku ning kas spetsiifiline GAG-ide klass võib osaleda RSP-de transpordis.

1.4 Gransüümid

Loomulikud tappurrakud ehk NK-rakud (i. k. *natural killer cells*) ning tsütotoksilised T-lümfotsüüdid ehk T-rakud on äärmiselt vajalikud organismi kaitsereaktsioonis erinevate patogeense mikroorganismide vastu (King jt, 2008). Mõlemad osalevad nakatunud rakkude apoptoosis ehk programmeeritud rakusurmas – ligand-seoselise apoptoosi vahedusel või sekreteerides keskkonda kas tsütotoksilisi graanuleid või tsütokiine (Garcia-Sanz jt, 1988; Chua jt, 2004; Reefman jt, 2010). Ligand-seoselise apoptoosi puhul indutseeritakse tapjarakul Fas-ligandide süntees, mis seonduvad märklaudrakus Fas-retseptorile, aktiveerides seejärel rakus kaspas-sõltuva apoptoosi (Chua jt, 2004). NK-rakud kui ka T-rakud sekreteerivad antigeeni äratundmisel tsütokiine, stimuleerides omakorda teisi immuunrakke (Reefman jt, 2010). Samuti sekreteerivad nimetatud immuunrakud keskkonda tsütotoksilisi graanuleid (n-ö lüütilisi lüsoosome), mis sisaldavad membraani kahjustavat valku perforiini, lüütilist molekuli granulüsiini ning erinevaid seriinproteaase ehk gransüüme (Masson jt, 1990; Saini jt, 2011). Inimese genoomis on kirjeldatud 5 erinevat gransüümi (gransüümid A, B, H, K, M), mille vastavaid ortolooge on leitud ka näiteks hiires (Grossman jt, 2003). Kui gransüümid on edukalt jõudnud raku tsütoplasmasse, siis aktiveeritakse kas kaspas-sõltuv (gransüüm B) või kaspas-mittesõltuv (gransüüm A) apoptootiline rada (Beresfold jt, 1999). Vaatamata rohketele uurimustöödele on tänaseni gransüümide sisenemismehhanismid apoptoosi suunatud rakkudesse veel ebaselged.

Varasemalt arvati, et perforiin tekitab raku plasmamembraani poori, mille kaudu võiksid gransüümid rakku siseneda (Garcia-Sanz jt, 1988; Keefe jt, 2005). Kui perforiini on keskkonnas ülehulga, siis moodustub plasmamembraani hulgaliselt poore, põhjustades kahjustavate toimete tagajärel raku nekroosi ehk programmeerimata rakusurma (Keefe jt, 2005). Samas kui perforiini on vajaminevas füsioloogilises kontsentratsioonis, siis toimub efektiivne gransüüm-sõltuv apoptoos, vallandamata põletikulisi faktoreid (Keefe jt, 2005). Mitmed erinevad andmed viitavad aga sellele, et gransüümid on võimelised apoptoosi

määratud rakku sisenema ka ilma perforiini abita (Froelich jt, 1996; Metkar jt, 2002; Gondek jt, 2005). Perforiini rolli seostatakse pigem gransüümide vabanemisega endotsütootilistest vesiikulitest, mis vastasel juhul endosoomidesse lõksu jääksid (Froelich jt, 1996; Pinkoski jt, 1998; Metkar jt, 2002; Thiery jt, 2011). Viimast teooriat toetavad ka gransüüm B järjestuses kirjeldatud konserveerunud katioonsed domäänid (Bird jt, 2005). Need domäänid on olulised seondumiseks negatiivselt laetud membraani komponentidega, mis toob endaga kaasa endotsütootilise raja aktiveerimise (Bird jt, 2005). Uuemad tulemused siiski näitavad, et perforiin võib soodustada fosfatidüülseriini liikumist sisemembraanist välismembraani (Metkar jt, 2011; Metkar jt, 2015). See omakorda hõlbustab gransüümi interakteerumist plasmamembraaniga, mis võimaldab gransüümil translokeeruda läbi membraani ilma endotsütoosi osaluseta (Metkar jt, 2011; Metkar jt, 2015).

Kuna gransüümid on tugeva katioonse laenguga, siis nad on võimelised moodustama ka elektrostaatilisi interaktsioone negatiivselt laetud proteoglykaanidega, eelistatult serglütsiiniga (Metkar jt, 2002; Raja jt, 2005). Arvatakse, et juba lüütiliste lüsoosoomide sees moodustab gransüüm B serglütsiiniga komplekse, mis võib hõlbustada gransüümi transporti apoptoosi suunatud rakku (Raja jt, 2002; Bird jt, 2005; Raja jt, 2005). Serglütsiini leidub endoteeli- ning vereloomerakkudes, kuid selle täpne funktsioon on veel senini teadmata (Kolset ja Pejler, 2011; Meen jt, 2011). Kuigi serglütsiin paikneb põhiliselt rakusiseselt, on näidatud, et see proteoglykaan võib olla ka sekretoorne, mis esineb seejärel ekstratsellulaarses maatriksis või rakupinnal (Theocharis jt, 2006; Kolset ja Pejler, 2011). Serglütsiin on tugevalt ekspresseeritud tuumorirakkudes, kus tema funktsioon võib olla seotud põletikuliste reaktsioonide edendamise, kiirendades kasvajakaraku arengut (Theocharis jt, 2006; Li jt, 2011).

Kuna uuemad tulemused viitavad sellele, et gransüümid võivad penetreeruda läbi membraani rakuenergiast sõltumata ja membraani kahjustamata (Metkar jt, 2015), siis tulevikuperspektiivis võiks gransüümide membraanisõbraliku sisenemismehhanismi mõistmine tagada suuna ka vähivastases raviteraapias, kus neid võiks rakendada näiteks erinevate ravimolekulide kandjatena.

1.5 Membraani mudelsüsteemid

Rakumembraan on struktuurilt äärmiselt kompleksne ning muutlik, seetõttu on RSP-de sisenemise ja plasmamembraani komponentide osaluse välja selgitamiseks võetud kasutusele lihtsustatud mudelmembraansüsteemid (Åmand jt, 2011; Säälük jt, 2011; Pae jt, 2014). Kuna

kunstlikes membraansüsteemides on rakuenergiast sõltuvad protsessid inhibeeritud, siis võimaldab antud süsteem analüüsida RSP-de otse läbi membraani penetreerumist ilma endotsütoosi osaluseta (Säälik jt, 2011). Rakkudes saab RSP-de penetratsiooni uurida ainult madalal temperatuuril (4°C) või erinevate endotsütoosi inhibiitorite juuresolekul (Jiao jt, 2009; Suzuki jt, 2002). Selliste inhibiitorite kasutamine võib aga muuta raku morfoloogiat ja häirida teisi rakus toimuvaid bioloogilisi protsesse või ei inhibeerita endotsütoosi täielikult, mistõttu eelistatakse penetratsiooni uurimiseks kasutada erinevaid mudelsüsteeme.

RSP-de ning plasmamembraani komponentide vaheliste interaktsioonide uurimiseks on kasutatud erinevaid membraani mudelsüsteeme, mis varieeruvad nii koostiselt, suuruselt kui ka membraankihtide arvult (Alves jt, 2008; Säälik jt, 2011). Näiteks on RSP-de seondumist fosfolipiididega uuritud erineva suurusega ühelamellaarsetes vesiikulites (i. k. *unilamellar vesicles*) ja multilamellaarsetes vesiikulites (i. k. *multilamellar vesicles*) (Alves jt, 2008; Anko jt, 2012). Eelnimetatud mudelsüsteemide moodustamiseks kasutatakse kindlaid lipiidseid ja valgulisi komponente (Goncalves jt, 2005). Sellised kunstlikud süsteemid võivad olla siiski liiga lihtsustatud, erinedes suurel määral tegelikust rakumembraani koostisest.

Raku plasmamembraanist indutseeritud vesiikulid ehk PMV-d sisaldavad rakumembraanile omaseid komponente (lipiidid, valgud ja polüsahhariidid), mistõttu on antud mudelsüsteem kõige sarnasem raku plasmamembraani koostisega (Scott, 1976; Bauer jt, 2009). Näiteks on PMV-des fosfolipiidide ja kolesterooli suhe vastavalt 2:1, mis on samuti iseloomulik rakkude plasmamembraanile (Fridriksson jt, 1999).

1.5.1 Plasmamembraani vesiikulid

Plasmamembraani vesiikulid (PMV-d) on enamasti korrapärase sfäärilise kujuga ning nende suurus varieerub 5-10 µm (Bauer jt, 2009). Nende vesiikulite sisekeskkond on täidetud rakuvedeliku ehk tsütosooliga, kuid seal puuduvad rakkudele iseloomulikud organellid ja aktiinifilamentidest koosnev tsütoskelett (Baumgart jt, 2007). Füsioloogilistes tingimustes moodustuvad PMV-d plasmamembraani vesikulatsiooni käigus (i. k. *blebbing*), näiteks apoptoosi, tsütokineesi ja rakkude migratsiooni protsessides (Coleman jt, 2001; Hickson jt, 2006). Kunstlikult saab plasmamembraani vesikulatsiooni indutseerida mitmetest rakuliinidest erinevate kemikaalide mõjul (Sarabipour ja Hristova, 2013). PMV-de saamiseks on kasutatud põhiliselt kahte meetodit, millest ühe puhul indutseeritakse PMV-d ditiotreitooli (DTT) ja formaldehüüdi (FA) abil (Scott jt, 1976). DTT lõhub valkudes disulfiidsillad ning FA blokeerib valkudes sulfaatühendid, takistades uute disulfiidsildade tekkimist (Bauer jt,

2009; Keller jt, 2009). Teise protokollid puhul kasutatakse PMV-de indutseerimiseks N-
etüülmaleimiidi (NEM), mis moodustab tsüsteiini sulfhüdrüülrühmadega kovalentseid
sidemeid, blokeerides seeläbi disulfidsildade moodustumist (Hollowka ja Baird, 1983; Sezgin
jt, 2012). Mõlema meetodi keemilised ühendid põhjustavad lõpptulemusena rakkudesse
kaltsiumioonide sissevoolu, tuues kaasa fosfolipiid C aktiveerimise (Baumgart jt, 2007;
Keller jt, 2009). Ensüümide kaasmõjul toimub plasmamembraanis fosfolipiidide
ümberpaiknemine, näiteks liigub anioonne fosfatidüülseriin membraani sisemisest kihist
välimisse lipiidkihti (Keller jt, 2009). Lisaks nõrgenevad ühendused aktiivivõrgustiku ja
plasmamembraani vahel ning rakumembraan kaotab järk-järgult asümeetrilisuse (Keller jt,
2009). Rakusisese rõhu tõttu hakkab membraan välja punguma, mis lõpuks võib viia vesiikuli
eraldumiseni (Keller jt, 2009).

PMV-d on oma koostiselt väga sarnased rakkudega, mistõttu on PMV-d hea mudel, mis
võimaldab samaaegselt uurida RSP-de interaktsioone nii plasmamembraani erinevate
komponentidega kui ka RSP-de otse läbi membraani liikumist (Åmand jt, 2011; Säälük jt,
2011; Pae jt, 2014).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

- ✓ Välja selgitada, kas ja millised glükoosaminoglükaanid mõjutavad amfipaatsete ning arginiinirikaste RSP-de penetreerumist läbi bioloogiliste membraanide, kasutades mudelsüsteemina plasmamembraani vesiikuleid (PMV-sid).
- ✓ Uurida erinevate glükoosaminoglükaanide osalust gransüüm B membraani läbimisel.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud rakuliinid

Antud töös kasutati kolme Hiina hamstri munasarjast pärinevat rakuliini (i. k. *Chinese Hamster Ovary cells*, CHO): metsiktüüp (CHO-K1; *wildtype*, wt), GAG-defitsiitne (CHO pgsA-745; GAG-/-) ja heparaansulfaat-defitsiitne (CHO pgsD-677; HS-/-) (tabel 2).

CHO rakke kultiveeriti L-glutamiini sisaldavas *Ham F12* söötmes (*PAA Laboratories*, Austria), millele oli lisatud 10% veise looteseerumit (*PAA Laboratories*, Austria) ning 100 IU/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (*Invitrogen*, CA, USA). Rakke kasvatati 5% CO₂ sisaldavas veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37 °C. Rakke jagati ümber iga kahe päeva tagant.

Tabel 2. Kasutatud rakuliinidele iseloomulikud glükoosaminoglükaanid ning ensüümide toime.

Glükoosaminoglükaanid	Rakuliinid			Ensüümid ja nende toime CHOwt PMV-dele		
	wt	HS-/-	GAG-/-	hyalVIII	hepIII	chABC
Dermataansulfaadid	+	+	-	+	+	-
Heparaansulfaadid	+	-	-	+	-	+
Kondroitiinsulfaadid	+	+*	-	-	+	-
Hüaluroonhapped	+	+	+	-	+	+
Kerataansulfaadid	+	+	-	+	+	+

* antud GAG on võrreldes metsiktüüpi CHO rakuliiniga kolm korda üleekspressseeritud
+/- antud GAG on rakuliinis vastavalt olemas või eemaldatud

2.2.2 Kasutatud rakku sisenevad peptiidid ja gransüüm B

Käesolevas töös kasutati järgmisi RSP-sid: TP, TP10, pTat(48-60), Arg₉ (tabel 3). Negatiivseks kontrolliks kasutati β₁ adrenergilise retseptori C-terminusest pärinevat peptiidi (β₁A) (tabel 3), mis ei sisene plasmamembraani vesiikulitesse ega ka rakkudesse (Säälik jt, 2011; Pae jt, 2014). Kõik nimetatud peptiidid on märgitud karboksüfluorestseiiniga. TP ja

TP10 puhul paikneb fluorestseeruv märgis vastavalt 13. või 7. positsioonis asuva lüsiini ϵ -aminorühma küljes, ülejäänud peptiidide korral N-terminuses (tabel 3). Eksperimentides kasutatud peptiidid sünteesiti *t-Boc* või *Fmoc* (TP10) strateegiat kasutades Stockholmi Ülikooli Neurokeemia ja Neurotoksikoloogia Instituudis või Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis. Kõik kasutatud peptiidid olid C-terminaalselt amideeritud.

Tabel 3. Töös kasutatud peptiidide aminohappelised järjestused.

Peptiid	Aminohappeline järjestus
TP	GWTLNSAGYLLGK*INLKALAALAKKIL-amiid
TP10	AGYLLGK*INLKALAALAKKIL-amiid
pTat(48-60)	*GRKKRRQRRRPQ-amiid
Arg ₉	*RRRRRRRRR-amiid
β_1A	*CSSLDEPGRGGFSESSESKV-amiid

* fluorestseeruv märgis

Alexa Fluor 488-fluorokroomiga märgitud inimese gransüüm B (kingitus Christopher J. Froelich'ilt; NorthShore Ülikool, Chicago, USA) lisati plasmamembraani vesiikulitele lõppkontsentratsioonis 0,3 μ M.

2.2.3 Plasmamembraani vesiikulite moodustamine

Plasmamembraani vesiikulite moodustamiseks kasutati eelnevalt välja töötatud meetodit (Scott jt, 1976), mida on järgnevalt täiendatud (Holowka ja Baird, 1983).

CHO rakud külvati 6-kaevulistele plaatidele (*Greiner Bio-One*, Saksamaa) 48 tundi enne eksperimenti tihedusega 2×10^5 rakku kannu kohta. Enne PMV-de indutseerimist pesti rakke kaks korda PMV puhvriga (2 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.4). Seejärel lisati 0,5 ml värskest valmistatud PMV puhvrit ühe kaevu kohta, mis sisaldas lisaks 25 mM formaldehüüdi (*Fluka Chemie GmbH*, Šveits) ning 2 mM ditiotreitooli (*AppliChem GmbH*, Saksamaa). Plaati inkubeeriti loksutil (300 rpm, *Thermomixer comfort*, *Eppendorf AG*) 37 °C juures 2,5 tundi. Seejärel tõsteti rakkudel olnud puhver koos sinna eraldunud PMV-dega 5 ml tuubi (*BD Falcon*, USA) ning asetati tunniks jääle. Eksperimentides kasutati samal päeval indutseeritud PMV-sid.

2.2.4 Plasmamembraani vesiikulite töötlus ensüümidega

Plasmamembraani vesiikulid moodustati CHO metsiktüüpi rakkudest, mida töödeldi vastavalt hüaluronidaas VIII-ga, heparinaas III-ga või kondroitinaas ABC-ga (*Sigma-Aldrich*, Saksamaa) (tabel 2). RSP-de sisenemist ensüümtöödeldud ja töötlemata PMV-desse analüüsiti konfokaalmikroskoobiga ning tulemuste kvantifitseerimiseks kasutati arvutiprogramme

AutoQuant X3 ja *MS Excel*. P-väärtuse leidmiseks kasutati statistilise hüpoteesi T-testi (paarikaupa t-test).

Hüaluronidaas VIII, mis lagundab PMV-de pinnalt hüaluroonhapped ning mõningal määral ka kondroitiini ning kondroitiinsulfaate, lisati PMV-de suspensioonile lõppkontsentratsioonis 2 mg/ml. Heparansulfaatide eemaldamiseks töödeldi PMV-sid heparinaas III-ga lõppkontsentratsioonis 1 IU/ml. Kondroitinaas ABC, mis lagundab PMV-de pinnalt kondroitiini, kondroitiinsulfaadid, dermataansulfaadid ning ülivähesel määral ka hüaluroonhapped (2%), lisati PMV-de suspensioonile lõppkontsentratsioonis 2 IU/ml.

Kõik vastavad ensüümtöötused viidi läbi filtritel (2 ml, 0.45 µm poor, *Ultrafree-MC-HV*, Saksamaa), et vabaneda ensüümtöötuse järgselt eemaldunud glükoosaminoglükaanidest ning ensüümist. Esmalt lisati filtrituubi 600 µl PMV-de suspensiooni ja tsentrifuugiti toatemperatuuril 200 g 2 minutit. Järgmisena lisati vastav ensüüm ning inkubeeriti 37 °C juures 30 minutit hüaluronidaas VIII või 1 h heparinaas III ja kondroitinaas ABC puhul. Peale inkubatsiooni tsentrifuugiti filtrituubi toatemperatuuril 1 minut 100 g. Edasi pesti PMV-sid kaks korda: filtrile lisati 200 µl PMV puhvrit ning tsentrifuugiti 100 g 1 minut. Seejärel resuspendeeriti vesiikulid 200 µl PMV puhvrts.

Erinevate GAG-ide eemaldamise kontrolliks lisati ensüümtööteldud vesiikulatele *Alexa Fluor 647*-märgisega nisuidu aglutiniini (i. k. *wheat germ agglutinin*, WGA; *Life Technologies*, USA), mis seondub vesiikulite pinnal paiknevate N-atsetüülglükoosamiinidega, seega eelistatult hüaluroonhapete, heparaansulfaatide ja kerataansulfaatidega, ning lisaks ka siaalhapetega. WGA-d lisati PMV-dele lõppkontsentratsioonis 1 µg/ml ning inkubeeriti toatemperatuuril 60 minutit.

Vesiikulite terviklikkuse kontrollimiseks lisati PMV-de suspensioonile 1 µM kontsentratsiooniga β₁A-peptiid ning FITC-märgisega dekstraan (molekulaarmass 3000 Da, *Pharmacia*, Rootsi) ning inkubeeriti toatemperatuuril 60 minutit.

2.2.5 Konfonkaalmikroskoopia

Proove vaadeldi 8-kambriisel alusklaasil (*Nalge Nunc International*, USA), mis saadi vastavalt pealmise plastkambri eemaldamisel allesjäänud silikoonraamist, mille peale asetati katteklaas (24 x 24 mm, *Menzel-Gläser*, Saksamaa). Ühte kambriks lisati 50 µl PMV suspensiooni koos 1 µM kontsentratsiooniga RSP või kontrollpeptiidi β₁A või FITC-märgisega dekstraani või 0,3 µM kontsentratsiooniga gransüüm B. Kõik eksperimendid

teostati toatemperatuuril, kasutades *Olympus FV100* (*Olympus Corporation*, Jaapan) mikroskoopi ja 60x vesiimmersioonobjektiivi. Fluorokroomide ergastamiseks kasutati 488 nm (fluorestseini; laseri täisvõimsus 40 mW, laseri intensiivsus 5%) ning 635 nm (*Alexa Fluor 647*; laseri täisvõimsus 23 mW, laseri intensiivsus 5%) lasereid. Pildid salvestati arvutiprogrammiga *Olympus FluoView1000* ning piltide töötamiseks kasutati programmi *Adobe Photoshop CS6*. Eksperimendid tehti kolme kordusena ja parameetrid jäeti katsete lõikes samaks.

2.2.6 Läbivoolutsütomeetria

RSP-de akumulatsioon CHO metsiktüüpi ja mutantsetest rakuliinidest saadud PMV-desse analüüsiti fluorestsents-aktiveeritud läbivoolutsütomeetrial (FACS, i. k. *fluorescence activated cell sorter*; *BD Biosciences*, USA). Enne eksperimendi algust loendati vesiikuleid, et igas proovis ja erinevate katsete lõikes oleks PMV-de hulk samaväärne ($3,9 \times 10^6$ vesiikulit/ml). Vahetult enne FACS analüüsi lisati PMV-de suspensioonile 1 μ M kontsentratsiooniga RSP-d ning fluorestsentsi intensiivsus mõõdeti 0, 5, 10, 20, 30, 45 ja 60 minuti möödudes. Igas ajapunktis loendati 10^4 vesiikulit. Fluorokroomide ergastamiseks kasutati 488 nm (fluorestseini) laserit. Eksperimendid teostati toatemperatuuril ning andmete analüüsiks kasutati tarkvara *FACSDiva* (*BD Biosciences*, Saksamaa) ja *MS Excel*. Tulemused on esitatud vähemalt kolme katse keskmisena ja standardhälbega. P-väärtuse leidmiseks kasutati statistilise hüpoteesi T-testi (paarikaupa t-test).

2.3 Tulemused

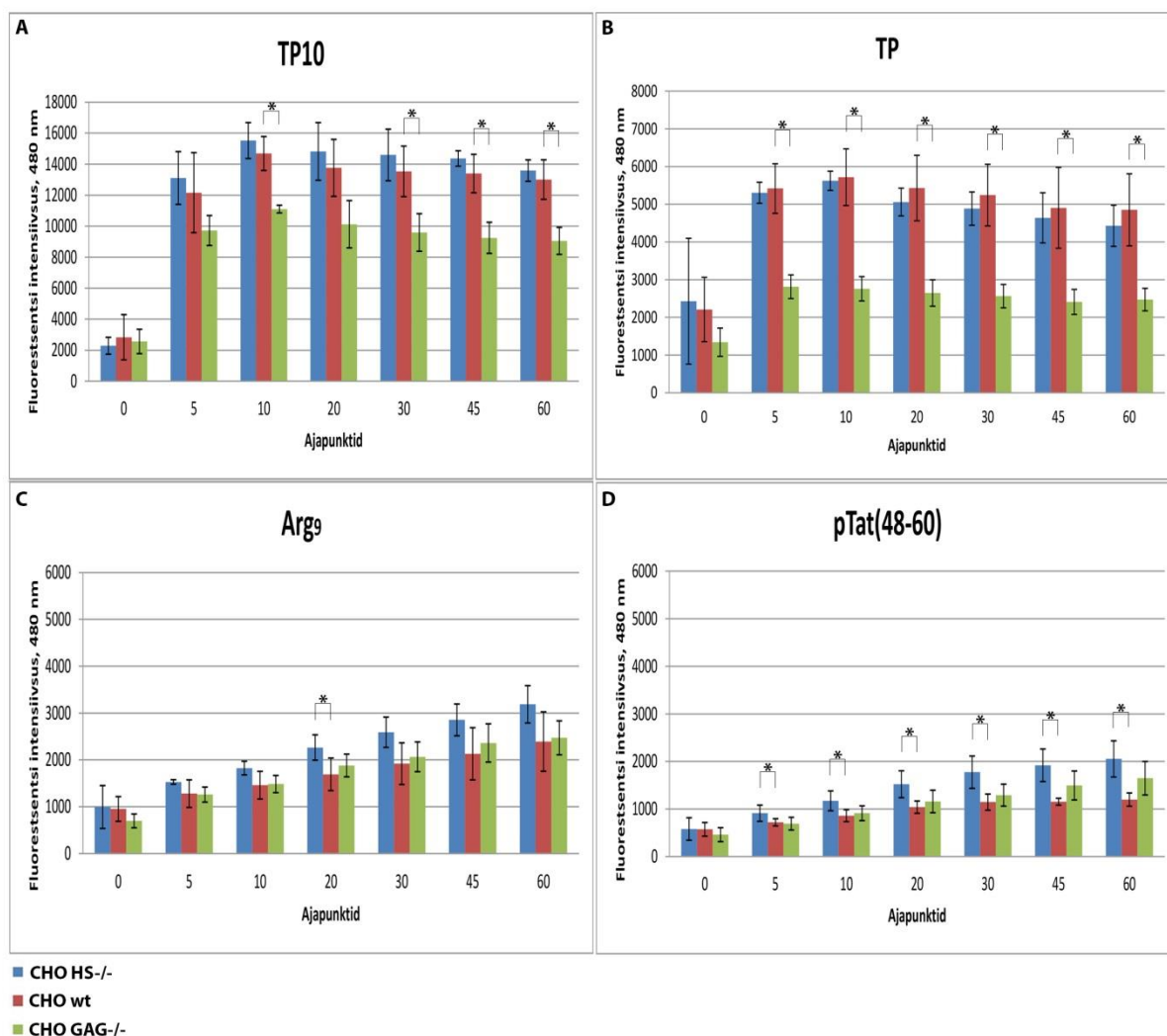
2.3.1 RSP-d sisenevad erineva efektiivsusega metsiktüüpi ja erinevatesse GAG-mutantsetesse plasmamembraani vesiikulitesse

GAG-ide rolli hindamiseks RSP-de penetratsioonis võrreldi fluorestseeruva märgisega RSP-de (tabel 3) internalisatsioonivõimet erinevatest CHO rakuliinidest indutseeritud plasmamembraani vesiikulitesse. Metsiktüüpi CHO (CHO wt) rakuliinil on esindatud kõik GAG-id (tabel 2). Heparaansulfaat-defitsiitsel CHO (CHO HS-/-) rakuliinil puuduvad N-atsetüülglükoosaminüül- ja glükosüültransferaasid, mille tagajärel ei sünteesita heparaansulfaate, kuid kondroitiinsulfaadid on metsiktüüpi CHO rakuliiniga võrreldes ligi kolm korda üleekspressseeritud (tabel 2) (Lidholt jt, 1992). Glükoosaminoglükaan-defitsiitsel CHO (CHO GAG-/-) rakuliinil on mutatsioon ksüloostransferaasi rajas, mistõttu ei sünteesita Golgi kompleksis O-seoselise glükosüleerimisraja vahendusel glükosaminoglükaane (tabel 2) (Esko jt, 1985). Hüaluroonhapped on nimetatud rakuliinis siiski olmas, kuna neid sünteesitakse erinevalt teistest GAG-idest plasmamembraanis spetsiifiliste hüalurooni süntetaaside poolt (Esko jt, 1985; Dicker jt, 2014).

RSP-d on fluorestseeruva mäkega, mistõttu peegeldab fluorestsentsi intensiivsus PMV-des otseselt peptiidi sisenemise efektiivsust. Esmalt hinnati RSP-de akumulereerumist eri tüüpi PMV-desse kvantitatiivselt, kasutades läbivoolutsütomeetriat ning analüüsiti peptiidide keskmist fluorestsentsi intensiivsust. PMV-dele lisati 1 μ M kontsentratsiooniga RSP-d ning fluorestsentsi intensiivsus mõõdeti seitsmel ajapunktil 60 minuti jooksul. Läbivoolutsütomeetria tulemuste põhjal jaotuvad RSP-d kahte gruppi. Amfipaatsed RSP-d (TP10 ja TP) kontsentreeruvad vesiikulitesse kõige intensiivsemalt ning vesiikulitesse akumulereerumine saavutab maksimumi 5 kuni 10 minuti jooksul peale inkubatsiooni algust (joonis 6 A ja B). Arginiinirikkad RSP-d [Arg₉ ja pTat(48-60)] akumulereeruvad PMV-desse seevastu madalama intensiivsusega ning vesiikulitesse kontsetreerumine on ajas järk-järgult kasvav (joonis 6 C ja D).

Samuti jaotusid uuritud RSP-d kahte klassi vastavalt nende sisenemise efektiivsuse alusel erinevatesse GAG-mutantsetest rakkudest saadud PMV-desse. Amfipaatsed RSP-d akumulereerusid nii metsiktüüpi kui ka HS-/- vesiikulitesse samal määral, seevastu sisenemine GAG-/- PMV-desse oli vastavalt TP ja TP10 puhul umbes 50% ja 40% madalam (joonis 6 A ja B). Erinevalt amfipaatsetest RSP-dest, akumulereerusid arginiinirikkad RSP-d sama efektiivselt nii metsiktüüpi kui ka GAG-/- vesiikulitesse (joonis 6 C ja D). Samas oli

mõnevõrra intensiivsem sisenemine HS-defitsiitsetest rakkudest saadud PMV-desse (joonis 6 C ja D).



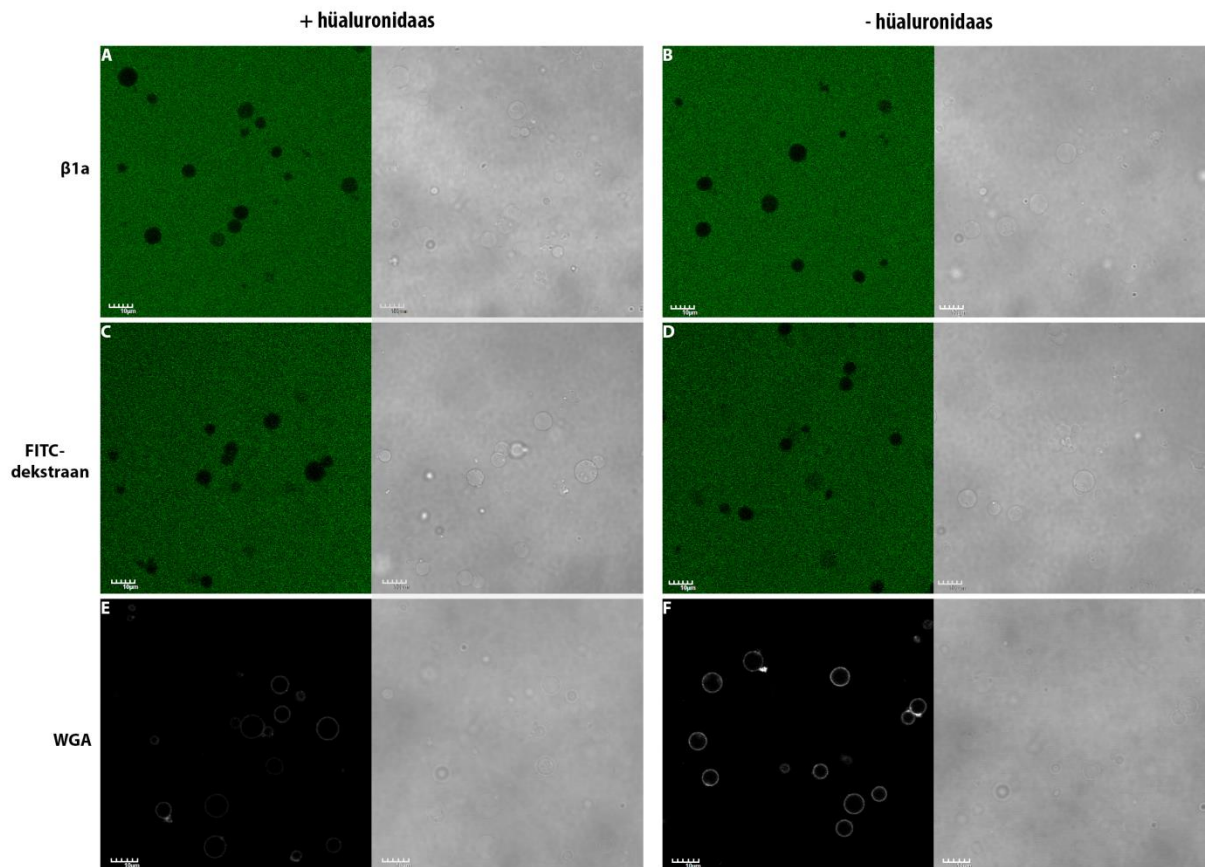
Joonis 6. RSP-de sisenemine metsiktüüpi ja mutantsetest rakuliinidest indutseeritud PMV-desse. PMV-dele lisati 1 μ M kontsentratsioonis RSP-d ning fluorestsentsi intensiivsus mõõdeti seitsmel ajapunktil 60 minuti jooksul. Tulemused on esitatud vähemalt 3 eksperimendi keskmisena ning koos standardhällbega. X-teljel on esitatud ajapunktid (minutid) ning Y-teljel fluorestsentsi intensiivsus (488 nm). Tärniga on toodud statistiliselt erinev sisenemine metsiktüüpi ja GAG-/- või HS-/- PMV-desse (p-väärtus < 0,05).

2.3.2 Glükoosaminoglükaanide hulga vähendamine membraani pinnalt takistab amfifaatsete RSP-de sisenemist plasmamembraani vesiikulitesse

Kuna mõlemas CHO mutants es rakuliinis on hüaluroonhapped olemas, siis ei saa läbivoolutsütomeetria tulemuste põhjal analüüsida hüaluroonhapete osalust RSP-de penetreerumisel läbi membraani. Samuti on raske hinnata kondroitiinsulfaatide ja heparaansulfaatide osalust RSP-de membraani läbimisel, sest HS-defitsiitses CHO rakuliinis on küll heparaansulfaadid puudu, aga kondroitiinsulfaadid on võrreldes metsiktüüpi

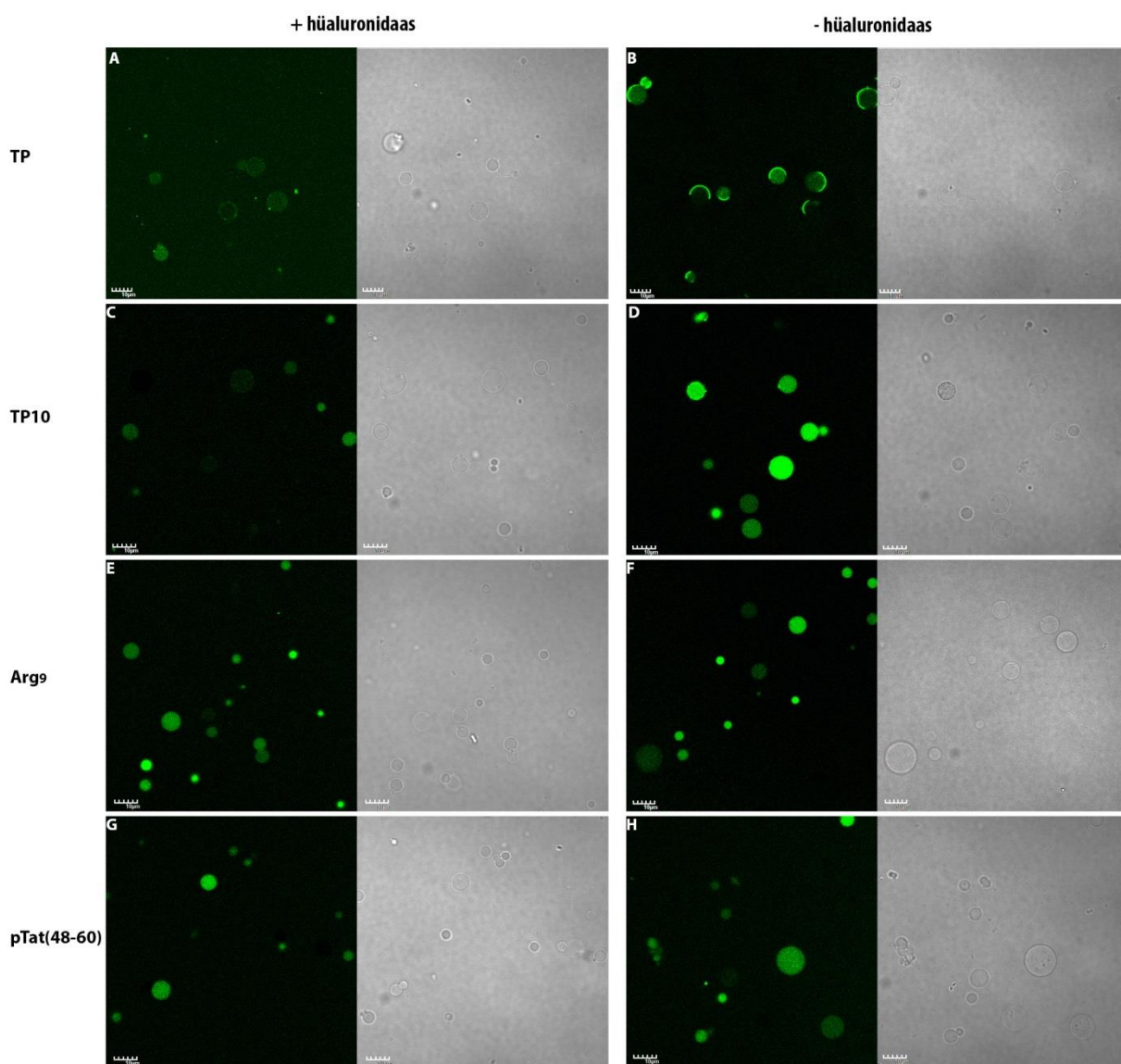
rakuliiniga kolm korda üleekspresseritud. Antud kontekstis on keeruline spekuloida, millest võis olla tingitud arginiinirikaste RSP-de efektiivsem sisenemine HS-/- PMV-desse. Sellest tulenevalt töödeldi CHO metsiktüüpi rakuliinist moodustunud vesiikuleid hüaluronidaas VIII-ga, heparinaas III-ga ning kondroitinaas ABC-ga (tabel 2). Peale PMV-de erinevaid ensüümtötlusi hinnati esmalt vesiikulite terviklikkust negatiivsete kontrollide FITC-dekstraani ja $\beta 1$ adrenergilisest retseptorist pärineva peptiidi $\beta 1A$ abil, mis ei ole võimeline vesiikulitesse sisenema (Säälik jt, 2011; Pae jt, 2014). Selleks, et kontrollida hüaluronidaas VIII ja heparinaas III käigus efektiivset GAG-ide eemaldamist, lisati PMV-dele *Alexa Fluor 647*-märkega nisuidu aglutiniini (i. k. *wheat germ agglutinin*, WGA). WGA on lektiin, mis seondub raku plasmamembraanis N-atsetüülglükoosamiinidega ehk eelistatult hüaluroonhapete, heparaan- ning kerataansulfaatidega (Nagata ja Burger, 1974). Kuna WGA ei seondu N-atsetüülgalaktoosamiinidega, mis on iseloomulikud kondroitiin- ning dermatansulfaatide struktuuris, siis ei saa vastavat lektiini kasutada kondroitinaas ABC efektiivse GAG-ide eemaldamise kontrollina.

Hüaluroonhapete rolli väljaselgitamiseks RSP-de penetratsioonis, töödeldi CHO metsiktüüpi rakuliinist moodustunud vesiikuleid hüaluronidaas VIII-ga, mis eemaldab PMV-de membraanilt hüaluroonhapped ning mõningal määral kondroitiinsulfaadid ja kondroitiini (tabel 2). Kontrollkatsetega kinnitati, et hüaluronidaasitötlus ei muuda PMV-de terviklikkust (joonis 7 A-D). Ensüümtötluse tagajärel vähenes WGA seandumine PMV-dega märgatavalt, kinnitades, et hüaluronidaasi mõjul on vesiikulite pinnal vähem hüaluroonhappeid (joonis 7 E-F). WGA seandumine ei ole ensüümtötluse järgselt täielikult takistatud, kuna WGA seondub lisaks veel heparaan- ja kerataansulfaatidega ning mõningal määral ka siaalhapetega (Bhavanandan ja Katlic, 1979), mida ensüümtötluse käigus ei eemaldata.



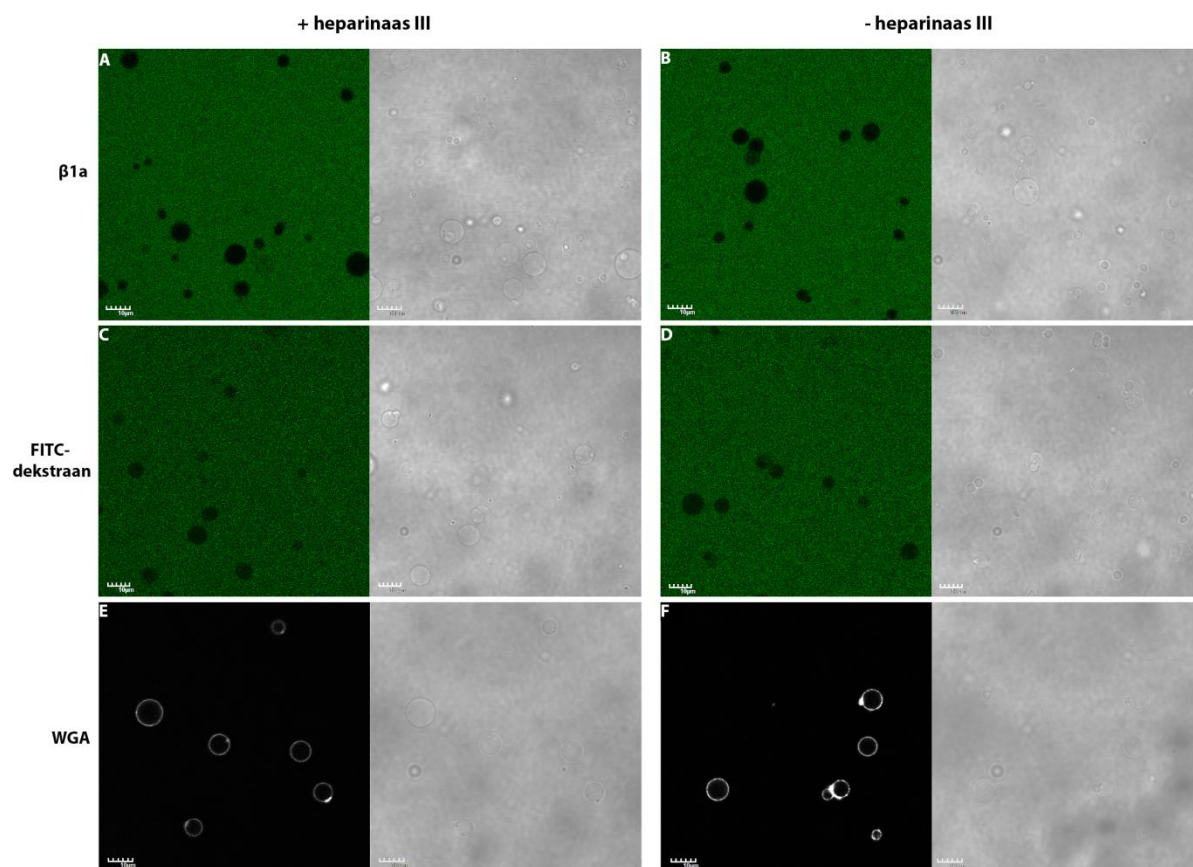
Joonis 7. Hüaluronidaas VIII efektiivsuse kontroll ja mõju vesiikulite membraani terviklikkusele. CHO metsiktüüpi rakkudest moodustunud PMV-sid töödeldi hüaluronidaas VIII-ga (lõppkontsentratsioon 2 mg/ml) 30 minutit, seejärel lisati PMV-dele *Alexa Fluor 647*-märgisega WGA kontsentratsioonis 1 $\mu\text{g/ml}$ või 1 μM β1A -peptiid või 1 μM FITC-dekstraan ning inkubeeriti 60 minutit. **A, C, E** – hüaluronidaasiga töödeldud PMV-d ja vastav kontroll; **B, D, F** – hüaluronidaasiga töötlemata PMV-d ja vastav kontroll; **A-D** vasakpoolsed paneelid FITC; **E-F** vasakpoolsed paneelid AF647; **A-F** parempoolsed paneelid DIC kujutis. Mõõtlõik 10 μm .

RSP-d lisati hüaluronidaas VIII-ga töödeldud PMV-dele kontsentratsioonis 1 μM ning peptiidide sisenemist vesiikulitesse hinnati konfonkaalmikroskoobiga 60 minuti jooksul. Eksperimentidest selgus, et hüaluronidaas VIII vähendas mõlema amfipaatse RSP (TP10 ja TP) sisenemist vesiikulitesse märgatavalt (joonis 8 A-D), seevastu ei mõjutanud ensüümtöölus arginiinirikaste RSP-de [Arg₉ ja pTat(48-60)] akumulierumist vesiikulitesse (joonis 8 E-H).



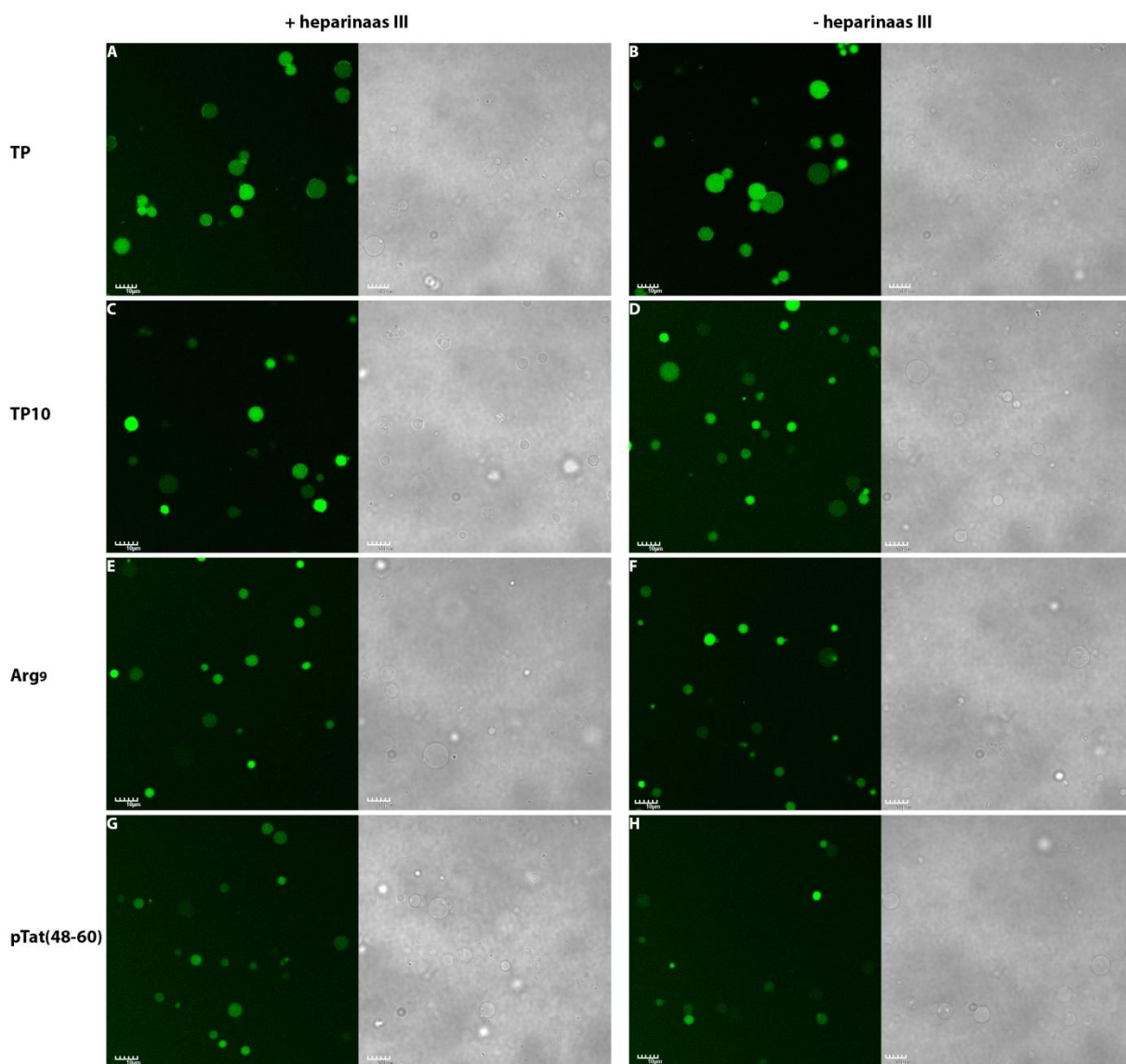
Joonis 8. Hüaluronidaas VIII töotluse mõju RSP-de sisenemisele plasmamembraani vesiikulitesse. CHO metsiktüüpi rakkudest pärinevaid PMV-sid töödeldi hüaluronidaas VIII-ga (lõppkontsentratsioon 2 mg/ml) 30 minutit ning lisati 1 μ M RSP ja inkubeeriti 60 minutit. **A, C, E, G** – hüaluronidaasiga töödeldud PMV-d ja RSP; **B, D, F, H** – töötlemata PMV-d ja RSP; **A-H** vasakpoolsed paneelid FITC; **A-H** parempoolsed paneelid DIC kujutis. Mõõtlõik 10 μ m.

Järgmisena uuriti, kuidas mõjutavad heparaansulfaadid RSP-de sisenemist PMV-desse, töödeldes CHO metsiktüüpi rakkudest indutseeritud PMV-sid heparinaas III-ga (tabel 2). Kontrollkatsete abil näidati, et ensüüm ei kahjusta vesiikulite membraani: FITC-dekstraan ning β 1A-peptiid ei sisenenud töödeldud PMV-desse (joonis 9 A-D). *Alexa Fluor 647*-märkega WGA fluorestsentsi signaal langes heparinaas III-ga töödeldud PMV-des, kinnitades, et ensüümtöotluse mõjul on PMV-de pinnal vähem heparaansulfaate (joonis 9 E-F). WGA seondumine pole ensüümtöödeldud PMV-de puhul täiesti takistatud, kuna WGA seondub ka hüaluroonhapete ja kerataansulfaatidega, mida heparinaas III töotlusega ei eemaldata.



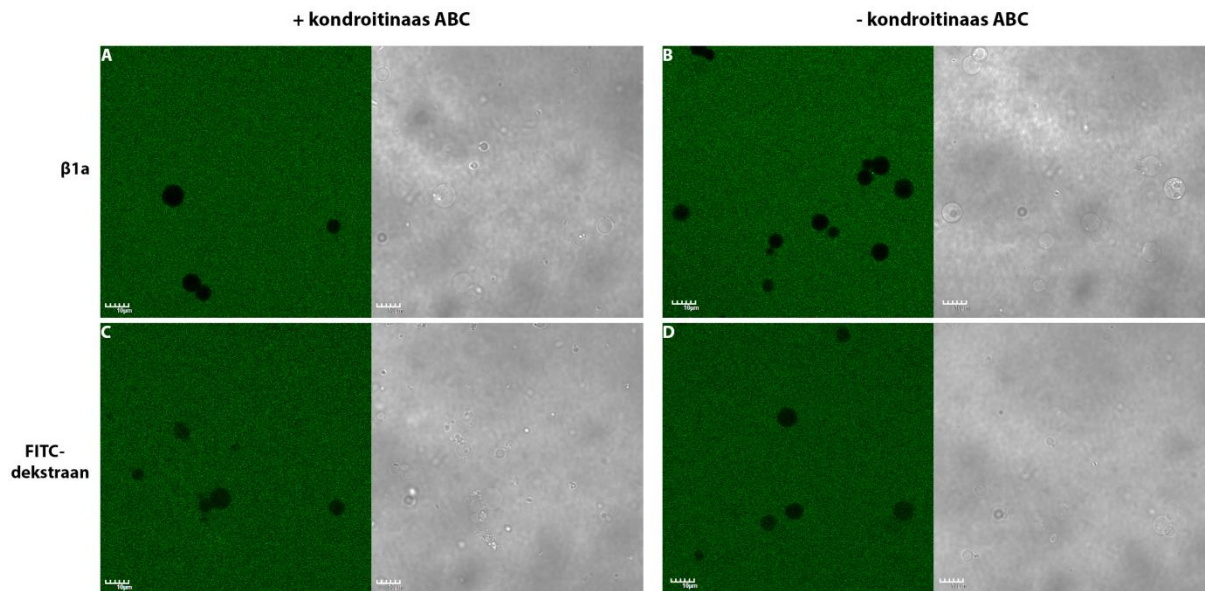
Joonis 9. Heparinaas III efektiivsuse kontroll ning mõju vesiikulite membraani terviklikkusele. CHO metsiktüüpi rakkudest moodustunud PMV-sid töödeldi heparinaas III-ga (lõppkontsentratsioon 1 IU/ml) 60 minutit, seejärel lisati PMV-dele *Alexa Fluor 647*-märgisega WGA kontsentratsioonis 1 µg/ml või 1 µM β1A-peptiid või 1 µM FITC-dekstraan ning inkubeeriti 60 minutit. **A, C, E** – heparinaas III töödeldud PMV-d ja vastav kontroll; **B, D, F** – töötlemata PMV-d ja vastav kontroll; **A-D** vasakpoolsed paneelid FITC; **E-F** vasakpoolsed paneelid AF647; **A-F** parempoolsed paneelid DIC kujutis. Mõõtlõik 10 µm.

Heparinaas III-ga töödeldud PMV-dele lisati 1 µM kontsentratsioonis RSP-d ning peptiidide sisenemist vesiikulitesse hinnati konfonkaalmikroskoobiga 60 minuti jooksul. Eksperimentidest selgus, et heparinaas III ei mõjuta amfipaatsete ega ka arginiinirikaste RSP-de vesiikulitesse kontsentreerumiseefektiivsust (joonis 10).



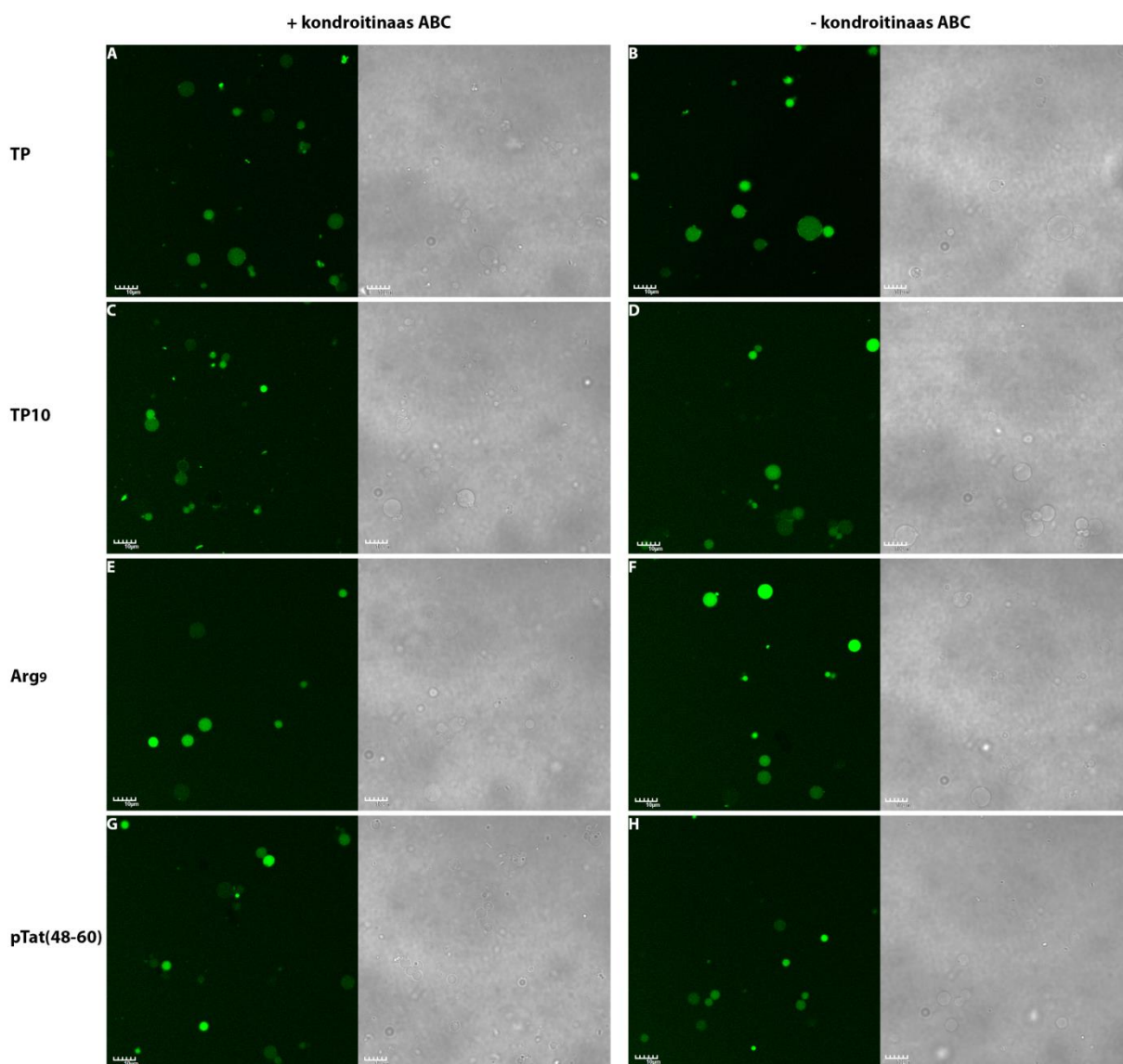
Joonis 10. Heparinaas III töötuse mõju RSP-de sisenemisele plasmamembraani vesiikulitesse. CHO metsiktüüpi rakkudest pärinevaid PMV-sid töödeldi heparinaas III-ga (lõppkontsentratsioon 1 IU/ml) 60 minutit. Seejärel lisati PMV-dele 1 μ M RSP ning inkubeeriti 60 minutit. **A, C, E, G** – heparinaas III töödeldud PMV-d ja RSP; **B, D, F, H** – töötlemata PMV-d ja RSP; **A-H** vasakpoolsed paneelid FITC; **A-H** parempoolsed paneelid DIC kujutis. Mõõtlõik 10 μ m.

Kondroitiinsulfaatide osaluse väljaselgitamiseks RSP-de penetratsioonis töödeldi CHO metsiktüüpi PMV-sid kondroitinaas ABC-ga, mis eemaldab vesiikulite pinnalt kondroitiinsulfaadid, dermatansulfaadid ning ülivähesel määral hüaluroonhapped (tabel 2). Kontrollkatsetega kinnitati, et ensüümtöötus ei kahjusta vesiikulite membraani, kuna β 1A-peptiid ja FITC-dekstraan ei pääsenud ka peale töötlust PMV-desse (joonis 11).



Joonis 11. Kondroitinaas ABC mõju vesiikulite membraani terviklikkusele. CHO metsiktüüpi rakkudest moodustunud PMV-sid töödeldi kondroitinaas ABC-ga (lõppkontsentratsioon 2 IU/ml) 60 minutit. Seejärel lisati PMV-dele 1 μ M β 1A-peptiid või 1 μ M FITC-dekstraan ning inkubeeriti 60 minutit. **A, C** – kondroitinaas ABC töödeldud PMV-d ja vastav kontroll; **B, D** – töötlemata PMV-d ja vastav kontroll; **A-D** vasakpoolsed paneelid FITC; **A-D** parempoolsed paneelid DIC kujutis. Mõõtlõik 10 μ m.

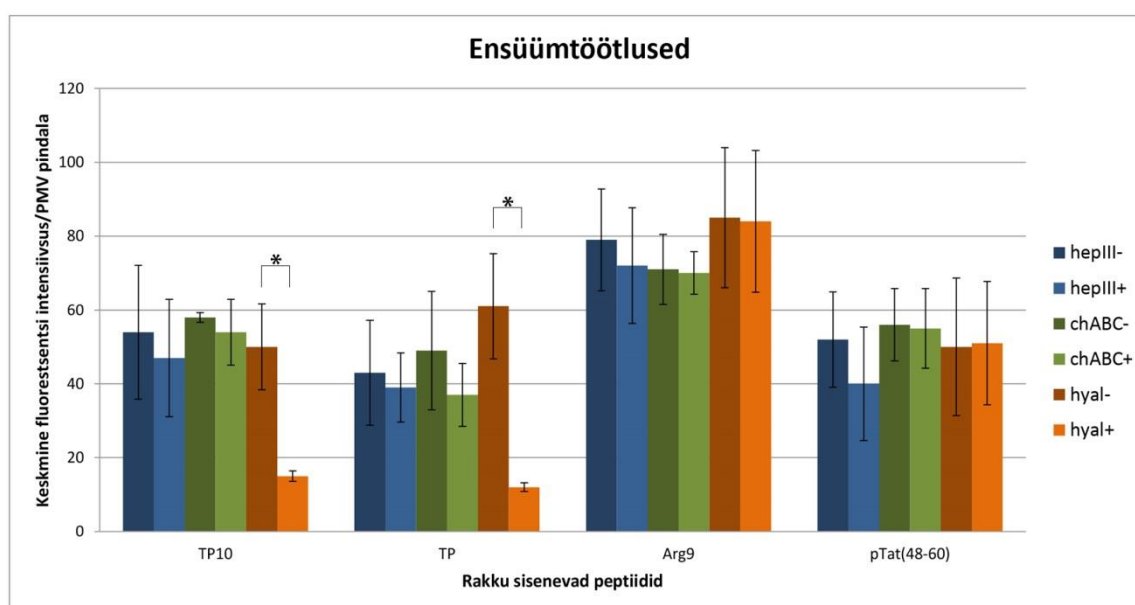
Kondroitinaas ABC-ga töödeldud PMV-dele lisati 1 μ M kontsentratsioonis RSP-d ning analüüsiti konfonkaalmikroskoobiga 60 minuti jooksul. Eksperimentidest selgus, et vastavate GAG-ide eemaldamine ei mõjutanud arginiinirikaste RSP-de akumulierumist vesiikulitesse (joonis 12 E-H). Amfipaatsete RSP-de puhul oli tuvastatav väga vähene TP vesiikulitesse sisenemise efektiivsuse langus (joonis 12 A ja B).



Joonis 12. Kondroitinaas ABC töötluse mõju RSP-de sisenemisele plasmamembraani vesiikulitesse. CHO metsiktüüpi rakkudest pärinevaid PMV-sid töödeldi kondroitinaas ABC-ga (lõppkontsentratsioon 2 IU/ml) 60 minutit. Seejärel lisati PMV-dele 1 μ M RSP ning inkubeeriti 60 minutit. **A, C, E, G** – kondroitinaas ABC töödeldud PMV-d ja RSP; **B, D, F, H** – töötlemata PMV-d ja RSP; **A-H** vasakpoolsed paneelid FITC; **A-H** parempoolsed paneelid DIC kujutis. Mõõtlõik 10 μ m.

Selleks, et kvantitatiivselt hinnata RSP-de kontsentreerumist ensüümtöödeldud ja töötlemata PMV-desse, mõõdeti *AutoQuant X3* arvutiprogrammi abil vesiikulitesse akumulunud peptiidide fluorestsentsi keskmist intensiivsust. Vähemalt kolmest erinevast ensüümtööluse eksperimendist (hüaluronidaas VIII, heparinaas III, kondroitinaas ABC) analüüsiti iga RSP kohta kokku 80 vesiikulit, millel mõõdeti keskmine peptiidi fluorestsentsi intensiivsus PMV pindala ühiku kohta. Kõige drastilisem ensüümtööluse efekt oli hüaluronidaas VIII-ga, mis programmi abil mõõdetult vähendas amfipaatsete RSP-de (TP10 ja TP) sisenemist PMV-desse vastavalt 70% ja 79% (p-väärtus < 0,05) (joonis 13, TP10 ja TP oranžid tulbad). PMV-de fluorestsentsi kvantifitseerimine näitas, et see ensüüm arginiinirikaste RSP-de [pTat(48-60)

ja Arg₉] akumulereerumist vesiikulitesse ei mõjutanud (p-väärtus > 0,05) [joonis 13, pTat(48-60) ja Arg₉ oranžid tulbad]. Kondroitinaas ABC mõjul vähenes TP kontsenteerumine ensüümtöödeldud PMV-desse umbes 24%, kuid tulemus ei olnud statistiliselt oluline (p-väärtus > 0,05) (joonis 13, TP rohelised tulbad). Ülejäänud RSP-de puhul [TP10, pTat(48-60), Arg₉] oli kondroitinaas ABC mõju peptiidide vesiikulitesse akumulereerumisele väga väike, vastavalt 7%, 2% ja 1% (p-väärtus > 0,05). Heparinaas III vähendas pTat(48-60) sisenemist PMV-desse umbes 21%, ent erinevus ei olnud statistiliselt oluline (p-väärtus > 0,05) [joonis 13, pTat(48-60) sinised tulbad]. Heparinaas III ei avaldanud statistiliselt olulist mõju ka ülejäänud RSP-dele (TP10, TP ja Arg₉), mille sisenemine vähenes vastavalt 13%, 9% ja 9% (p-väärtus > 0,05).

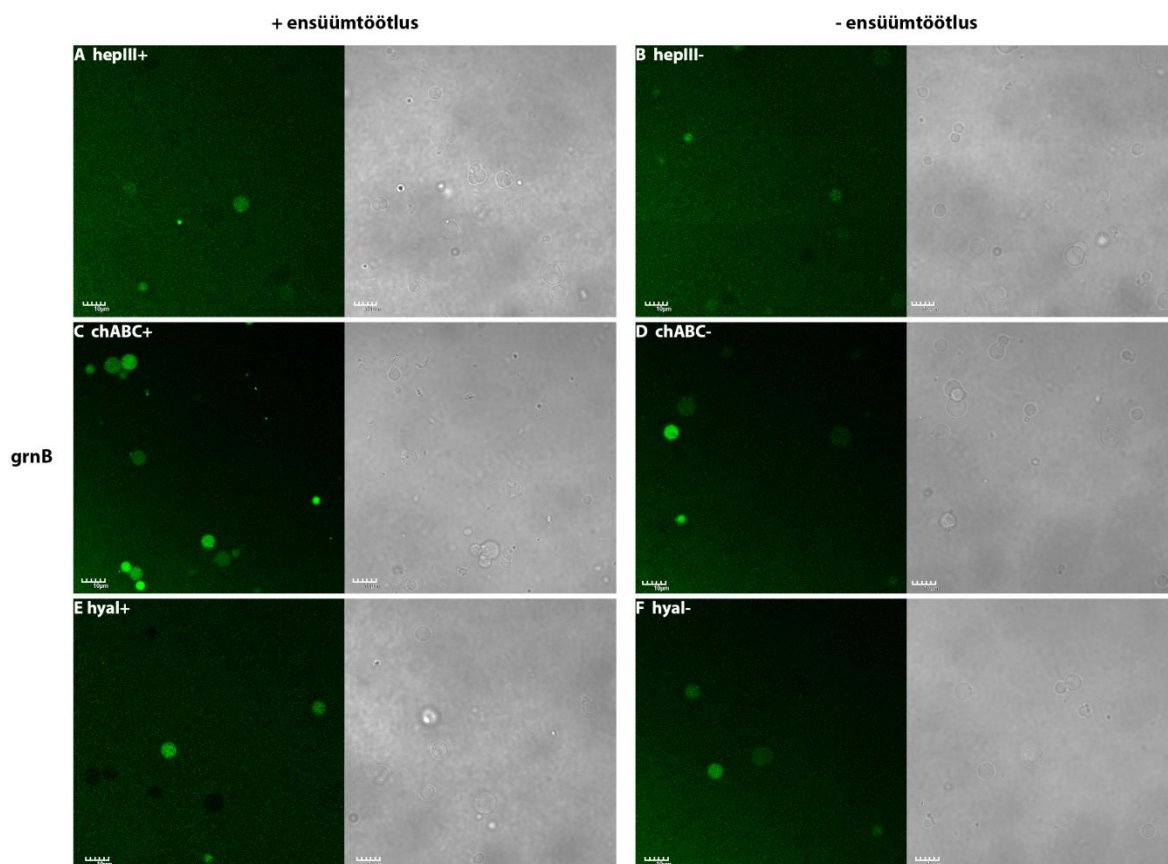


Joonis 13. Kvantitatiivne hinnang RSP-de sisenemisele ensüümtöödeldud plasmamembraani vesiikulitesse. Vähemalt kolmest erinevast ensüümtöötuse eksperimendist (hüaluronidaas VIII, heparinaas III ja kondroitinaas ABC) analüüsiti iga RSP kohta kokku 80 vesiikuli fluorestsentsi intensiivsus. X-teljel on esitatud rakku sisenevad peptiidid ning Y-teljel on keskmine peptiidi fluorestsentsi intensiivsus PMV-s pindala ühiku kohta.

2.3.3 PMV-de pinnalt glükoosaminoglükaanide eemaldamine ei mõjuta gransüüm B sisenemist plasmamembraani vesiikulitesse

Antud töös uuriti ka erinevate glükoosaminoglükaanide rolli gransüüm B sisenemises plasmamembraani vesiikulitesse. Selleks töödeldi CHO metsiktüüpi rakuliinist moodustunud vesiikuleid hüaluronidaas VIII-ga, heparinaas III-ga ning kondroitinaas ABC-ga (tabel 2), seejärel lisati PMV-de suspensioonile *Alexa Fluor 488*-fluorestseeruva märgisega gransüüm B (grnB) lõppkontsentratsiooniga 0,3 µM.

Nii heparinaas III, kondroitinaas ABC kui ka hüaluronidaas VIII puhul vastavate GAG-ide eemaldamine gransüüm B akumulierumist vesiikulitesse ei mõjutanud (joonis 14).



Joonis 14. Gransüüm B sisenemine ensüümtöödeldud ning töötlemata plasmamembraani vesiikulitesse. CHO metsiktüüpi rakkudest pärinevaid PMV-sid töödeldi heparinaas III, kondroitinaas ABC ja hüaluronidaas VIII-ga. Seejärel lisati PMV-dele 0,3 μ M gransüüm B (grnB) ning inkubeeriti 60 minutit. **A, C, E** – vastava ensüümiga töödeldud PMV-d ja grnB; **B, D, F** – töötlemata PMV-d ja grnB; **A-F** vasakpoolsed paneelid FITC; **A-F** parempoolsed paneelid DIC kujutis. Mõõtlõik 10 μ m.

2.4 Arutelu

Rakku sisenevad peptiidid (RSP-d) on alla 30 aminohappejäägi pikkused järjestused, mis on võimelised läbima erinevaid bioloogilisi membraane, sealjuures ka erinevate lastmolekulidega seotuna. RSP-d sisenevad rakkudesse kas erinevate endotsütootiliste radade kaudu või otse läbi membraani liikumise ehk penetratsiooni teel. Samuti pole täpselt selge, millised plasmamembraani komponendid vahendavad RSP-de interaktsioone rakumembraaniga.

Gransüümid on rakkudes apoptoosi esile kutsuvad seriinproteasaasid (Metkar jt, 2002). Arvatakse, et gransüümide transporti rakkudesse vahendab poore moodustav perforiin, ent nende sisenemismehhanismides on veel paljugi ebaselget (Keefe jt, 2005; Thiery jt, 2011; Metkar jt, 2015). Kuna gransüümid on tugeva katioonse laenguga, siis interakteeruvad nad ka negatiivselt laetud proteoglykaanidega, mis arvatavasti soodustavad gransüümide sisenemist rakkudesse (Metkar jt, 2002; Raja jt, 2005).

Glükoosaminoglükaanid (GAG-id) on raku pinnal paiknevad polüsahhariidid, mis osalevad erinevates raku bioloogilistes protsessides, vahendades mitmete molekulide voogu ja funktsioone. GAG-ide rohkuse ning negatiivse laengu tõttu võib arvata, et nad interakteeruvad positiivselt laetud RSP-de ja gransüümidega enne viimaste sisenemist rakkudesse. Sellest tulenevalt oli käesoleva töö eesmärgiks uurida, kas ja millised glükoosaminoglükaanid (GAG-id) mõjutavad erinevate rakku sisenevate peptiidide (RSP-de) ning rakus apoptoosi indutseeriva valgu gransüüm B penetreerumist läbi plasmamembraani, kasutades mudelsüsteemina plasmamembraani vesiikuleid (PMV-sid). PMV-des puuduvad rakuenergiast sõltuvad protsessid (sealhulgas endotsütoos), mistõttu võimaldab antud süsteem keskenduda vaid penetratsiooni uurimisele. Kunstlikud membraansüsteemid on tihtipeale liiga lihtsustatud koostisega, see-eest on PMV-d rakumembraanile väga sarnased, mis võimaldab uurida RSP-de interaktsioone membraaniga rakkudele väga sarnases süsteemis. Antud töös kasutati PMV-de indutseerimiseks ja GAG-ide osaluse hindamiseks metsiktüüpi ja kahte erinevat GAG-mutantset Hiina hamstri munasarja rakuliini (i. k. *Chinese hamster ovary cells*, CHO). Lisaks analüüsiti RSP-de ning gransüüm B sisenemist PMV-desse, mille pinnalt eemaldati ensüümtöötamise käigus kindlad glükoosaminoglükaanid. Tulemusi analüüsiti läbivoolutsütomeetria ja konfonkaalmikroskoopia abil.

Varem on näidatud, et raku pinna GAG-ide puudumine võib mõjutada erinevate arginiinirikaste RSP-de sisenemist rakkudesse (Tyagi jt, 2001; Fuchs ja Raines, 2004; Richard jt, 2005). Märksa vähem on aga uuritud amfipaatsete RSP-de GAG-sõltuvaid interaktsioone ja nende rolli peptiidide sisenemisel rakkudesse (Verdurmen jt, 2013). Veelgi vähem on aga

uuritud GAG-ide osalust RSP-de translokatsioonis, mistõttu ei ole ka teada, kui suur on nende polüsahhariidide osalus RSP-de penetreerumisel läbi membraani. Neist teadmistest lähtudes analüüsiti läbivoolutsütomeetri abil arginiinirikaste ning amfipaatsete RSP-de sisenemist erinevatesse GAG-mutantsetest ning metsiktüüpi rakkudest moodustunud PMV-desse, et hinnata raku pinna polüsahhariidide osalust peptiidide penetreerumisel läbi membraani. Amfipaatsed RSP-d (TP ja TP10) sisenesid märgatavalt halvemini GAG-defitsiitsetesse (GAG-/-) PMV-desse võrreldes akumulatsiooniga heparaansulfaat-defitsiitsetesse (HS-/-) ja metsiktüüpi PMV-desse. Arginiinirikad RSP-d [pTat(48-60) ja Arg₉] kontsentreerusid mõningal määral paremini HS-/- vesiikulitesse võrreldes GAG-/- ja metsiktüübiga ning viimase kahe puhul oli sisenemiseefektiivsus võrdväärne. Tulemustest võib järeldada, et amfipaatsed RSP-d interakteeruvad enne membraani läbimist glükoosaminoglükaanidega, mis muudavad nende sisenemise efektiivsuse vesiikulitesse paremaks. Arginiinirikad RSP-d aga membraani penetratsioonil arvatavasti glükoosaminoglükaane ei vaja. Läbivoolutsütomeetria tulemuste põhjal on aga keeruline seletada, millest võis olla tingitud arginiinirikaste RSP-de mõningane efektiivsem sisenemine HS-/- PMV-desse, kas heparaansulfaatide puudumisest või kondroitiinsulfaatide üleküllusest, sest CHO HS-/- rakuliinil on küll heparaansulfaadid puudu, ent kondroitiinsulfaadid on võrreldes metsiktüüpi rakuliiniga kolm korda üleekspressioneeritud. Samuti on raske tõlgendada RSP-de penetratsioonil hüaluroonhapete osalust, kuna mõlemas GAG-mutantses rakuliinis on hüaluroonhapped olemas. Sellest tulenevalt töödeldi CHO metsiktüüpi rakuliinist moodustunud PMV-sid erinevate ensüümidega (hüaluronidaas VIII, heparinaas III, kondroitinaas ABC), et vastavalt hinnata hüaluroonhapete, heparaansulfaatide ja kondroitiinsulfaatide osalust RSP-de penetreerumisel plasmamembraani vesiikulitesse. Eksperimentides kasutatud ensüümidest oli hüaluronidaas ainus, mille puhul vähenes amfipaatsete RSP-de sisenemine ensüümtöödeldud PMV-desse drastiliselt. Kuigi hüaluronidaas eemaldab vesiikulite pinnalt ka vähesel määral kondroitiinsulfaadid, võib eeldada, et mõlema amfipaatses RSP PMV-desse sisenemise efektiivsus sõltub suurel määral just hüaluroonhapetest, kuna kondroitinaas ABC töötamise järgselt ei vähenenud nimetatud RSP-de sisenemine ensüümtöödeldud PMV-desse. Hüaluroonhape ehk hüaluroonaan koosneb kuni 1000 järjestikku paiknevast disahhariidist, olles teistest GAG-ahelatest tunduvamalt pikem (Ernst jt, 1995). Lisaks võivad ülejäänud GAG-id hüaluroonaani külge läbi kinnitusvalkude ka massiliselt seonduda (Ernst jt, 1995). Sellest tulenevalt võib eeldada, et hüaluronidaasitöötamise järgselt eemaldatakse ka need GAG-ahelad, mis olid hüaluroonhappe küljes, mistõttu võib amfipaatsete RSP-de penetreerumine läbi membraani sõltuda pigem GAG-ide üldkogusest kui konkreetsest GAG-ahelast. Kuigi GAG-id koosnevad erinevatest korduvstruktuuridest (galaktoos, uroonhapped,

aminosuhkrud), siis on nende molekulaarne koostis üsna sarnane (Ernst jt, 1995), mistõttu ei tarvitse esineda amfipaatsete RSP-de seandumisel GAG-idega kindlaid eelistusi ning nende penetreerumine sõltub pigem GAG-ide üldisest kogusest. Seda kinnitavad ka läbivoolutsütomeetria tulemused kui nimetatud RSP-d kontsentreerusid GAG-defitsiitsetest rakkudest pärinevatesse vesiikulitesse vähem kui metsiktüüpi PMV-desse. Kuigi GAG-/rakuühik on hüaluroonhapped olemas, ei sünteesita seal ksülostransferaasi mutatsiooni tõttu teisi GAG-ahelaid, mistõttu on ka üldine GAG-ide hulk väiksem ning sellest tulenevalt kontsentreerusid amfipaatsed RSP-d GAG-/ vesiikulitesse vähem. Ükski ensüümtootlus ei mõjutanud arginiinirikaste RSP-de penetreerumist PMV-desse, olles kooskõlas läbivoolutsütomeetria tulemuste ja järeldustega, et arvatavasti glükoosaminoglükaanid arginiinirikaste RSP-de penetreerumisel olulist rolli ei oma. Võimalik, et arginiinirikad RSP-d vajavad enne läbi membraani liikumist seandumist pigem mingi valgulise komponendiga, mis seejärel hõlbustab nende sisenemist vesiikulitesse (Pae jt, 2014).

Inimese gransüüm B on 32 kDa molekulmassiga apoptoosi esile kutsuv valk (Poe, 1991; Metkar jt, 2002). Kuigi gransüümid sisenevad rakku membraani kahjustamata, on nende täielik arusaam rakumembraaniga seandumise komponentidest ja sisenemismehhanismidest veel puudulik. Meie kasutatud mudelsüsteem võimaldab samaaegselt uurida gransüümide interaktsioone glükoosaminoglükaanidega ja hinnata nende läbi membraani liikumist sõltumata raku energeetilistest protsessidest. Eksperimentaalses osas töödeldi CHO metsiktüüpi rakuühik moodustunud PMV-sid erinevate ensüümidega (hüaluronidaas VIII, heparinaas III, kondroitinaas ABC), et analüüsida vastavate GAG-ide osalust gransüüm B penetreerumisel läbi membraani.

Varasemalt on näidatud, et gransüümid võivad interakteeruda eelistatult nende proteoglükaanidega, mille struktuuris on esindatud kondroitiinsulfaadid ning heparaansulfaadid/hepariin (Metkar jt, 2002; Kolset ja Pejler, 2011). Meie tulemused aga näitasid, et kondroitiin- või heparaansulfaatide eemaldamine ei mõjuta gransüüm B penetreerumist läbi membraani, viidates, et gransüümide sisenemiseefektiivsus vesiikulitesse ei sõltu konkreetsest GAG-ahelast. Hüaluronidaasitöötlus, mis eemaldab vesiikulite pinnalt hüaluroonhapped ning vähesel määral ka kondroitiinsulfaadid, ei mõjutanud samuti gransüüm B akumulereerumist vesiikulitesse. Kuna GAG-ide kõrvaldamine ei vähendanud gransüüm B penetratsioonivõimet vesiikulitesse, siis on võimalik, et gransüümide sisenemist vahendavad hoopis teised raku pinna komponendid, mistõttu vajab gransüümide sisenemismehhanismide väljaselgitamine veel täiendavat uurimist.

KOKKUVÕTE

Rakku sisenevad peptiidid (RSP-d) on kuni 30 aminohappejärgist koosnevad järjestused, mis on võimelised läbima bioloogilisi membraane ilma nende barjäärifunktsiooni kahjustamata, mistõttu on RSP-d biotehnoloogilistel ning meditsiinilistel eesmärkidel perspektiivsed transportvektorid. Arvatakse, et RSP-d seonduvad elektrostaatiliste interaktsioonide vahendusel raku pinna glükoosaminoglükaanidega (GAG-idega), millele järgneb RSP-de internalisatsioon raku kas erinevate endotsütoosi radade vahendusel või rakuenergiast sõltumatult läbi membraani penetreerumise ehk translokatsiooni teel. Vaatamata rohketele uuringutele, puudub senini veel ühene arusaam, kas GAG-id võiksid osaleda RSP-de penetreerumismehhanismis.

Käesolevas töös hinnati glükoosaminoglükaanide rolli RSP-de penetreerumisel läbi bioloogiliste membraanide, kasutades mudelsüsteemina plasmamembraani vesiikuleid (PMV-sid). Antud mudel võimaldab uurida GAG-sõltuvaid interaktsioone ilma endotsütoosi osaluseta rakkudele sarnases süsteemis. PMV-de indutseerimiseks kasutati kolme Hiina hamstri munasarja rakuliini (i. k. *Chinese hamster ovary cells*, CHO), millest kaks neist olid spetsiifiliste GAG-ahelate defitsiitsed mutandid. Lisaks analüüsiti RSP-de sisenemist PMV-desse, mille pinnalt eemaldati ensüümtöötuse käigus erinevad glükoosaminoglükaanid.

Gransüümid on rakkudes apoptoosi esilekutsuvad valgud, mis on samuti võimelised interakteeruma teatud proteoglükaanidega ning liikuma läbi membraani penetratsiooni teel. Antud töös kasutatud mudelsüsteem võimaldab samaaegselt hinnata gransüümide interaktsioone glükoosaminoglükaanidega ja seejärel uurida nende penetratsioonivõimet plasmamembraani vesiikulitesse.

Käesoleva töö tulemuste põhjal võib RSP-d jaotada kahte gruppi: amfipaatsed RSP-d (TP ja TP10), mille vesiikulitesse penetreerumine sõltub suuresti raku pinna GAG-idest ning arginiinirikkad RSP-d [pTat(48-60) ja Arg₉], mis membraani läbimisel arvatavasti glükoosaminoglükaane ei vaja. Lisaks näitasid tulemused, et gransüüm B suudab läbida PMV-de membraane, kuid nende penetratsioon ei sõltu GAG-ide olemasolust rakumembraani pinnal.

The role of glycosaminoglycans in the translocation of cell penetrating peptides into plasma membrane vesicles

Laura Liivamägi

SUMMARY

Cell penetrating peptides (CPPs) generally consist of up to 30 amino acids and have the capacity to cross the cell membrane in a non-invasive way. Therefore, CPPs can be used for cellular delivery of various cargoes, that have high biotechnological and biomedical potential. Because of CPPs cationic charge, they are prone to establish electrostatic interactions with anionic membrane components, like glycosaminoglycans (GAGs). Interactions with GAGs could promote the uptake of CPPs via different pathways of endocytosis or direct penetration through the plasma membrane (translocation). Despite the extensive research, it is still not clear whether GAGs participate in CPPs uptake via translocation.

The present study focused on the role of cell surface glycosaminoglycans in the uptake of CPPs via penetration using plasma membrane vesicles (PMVs). PMVs are derived from cell membrane and therefore their membrane composition is very similar to the plasma membrane. Since PMVs don't contain any organelles, there are no energy-driven processes, resulting in a good model system for studying penetration without the interference of endocytosis. To study the role of GAGs, PMVs were derived from three different Chinese hamster ovary cell lines and two of them were deficient in specific GAG(s). Enzymatic treatments of PMVs were also performed to further examine the involvement of specific GAG class in the penetration of CPPs.

In addition to CPPs, we studied the interactions of apoptosis-inducing protein granzyme B with GAGs during penetration across the plasma membrane.

Based on the results, the examined CPPs can be divided into two groups: amphipathic CPPs (TP and TP10), whose penetration is more dependent on the quantity of the cell surface GAGs rather than a specific GAG chain type, and arginine-rich CPPs [pTat(48-60) and Arg₉], which can penetrate across the cell membrane independent of GAGs. Similarly to CPPs, granzyme B was able to translocate through the PMVs membrane, but it did not require interactions with cell surface glycosaminoglycans.

KIRJANDUSE LOETELU

- Alves, I.D., Goasdoue, N., Correia, I., Aubry, S., Galanth, C., Sagan, S., Lavielle, S., Chassaing, G. (2008). Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution. *Biochimica Biophysica Acta*, 1780(7-8), 948-959.
- Alves, I.D., Bechara, C., Walrant, A., Zaltsman, Y., Jiao, C.Y., Sagan, S. (2011). Relationships between membrane binding, affinity and cell internalization efficacy of a cell-penetrating peptide: penetratin as a case study. *PLoS One*, 6(9), 24096-24106.
- Åmand, H.L., Boström, C.L., Lincoln, P., Nordén, B., Esbjörner, E.K. (2011). Binding of cell-penetrating penetratin peptides to plasma membrane vesicles correlates directly with cellular uptake. *Biochim Biophys Acta*, 1808(7), 1860-7.
- Åmand, H.L., Rydberg, H.A., Fornander, L.H., Lincoln, P., Nordén, B., Esbjörner, E.K. (2012). Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans. *Biochimica Biophysica Acta*, 1818(11), 2669-2678.
- Anko, M., Majhenc, J., Kogej, K., Sillard, R., Langel, Ü., Anderluh, G., Zorko, M. (2012). Influence of stearyl and trifluoromethylquinoline modifications of the cell penetrating peptide TP10 on its interaction with lipid membrane. *Biochim Biophysica Acta*, 1818(3), 915-924.
- Bauer, B., Davidson, M. and Orwar, O. (2009). Proteomic analysis of plasma membrane vesicles. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(9), 1656-1659.
- Baumgart, T., Hammond, A.T., Sengupta, P., Hess, S.T., Holowka, D.A., Baird, B.A., Webb, W.W. (2007). Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(9), 3165-3170.
- Bechara, C., Pallerla, M., Zaltsman, Y., Burlina, F., Alves, I.D., Lequin, O., Sagan, S. (2013). Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *FASEB J*, 27(2), 738-749.
- Bechara, C., Pallerla, M., Burlina, F., Illien, F., Cribier, S., Sagan, S. (2014). Massive glycosaminoglycan-dependent entry of Trp-containing cell-penetrating peptides induced by exogenous sphingomyelinase or cholesterol depletion. *Cell Mol Life Sci*, 72(4), 809-20.
- Beresford, P.J., Xia, Z., Greenberg, A.H., Lieberman, J. (1999). Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity*, 10(5), 585-94.
- Bird, C.H., Sun, J., Ung, K., Karambalis, D., Whisstock, J.C., Trapani, J.A., Bird, P.I. (2005). Cationic sites on granzyme B contribute to cytotoxicity by promoting its uptake into target cells. *Mol Cell Biol*, 25(17), 7854-67.
- Bhavanandan, V.P., Katlic, A.W. (1979). The interaction of wheat germ agglutinin with sialoglycoproteins. *J Biol Chem*, 254(10), 4000-4008.
- Bishop, J.R., Schuksz, M., Esko, J.D. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, 446(7139), 1030-1037.
- Chua, H.L., Serov, Y., Brahmi, Z. (2004). Regulation of FasL expression in natural killer cells. *Hum Immunol*, 65(4), 317-27.

- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M.F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*, 3(4), 339-45.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*, 269(14), 10444-10450.
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem*, 271(30), 18188-18193.
- Deshayes, S., Heitz, A., Morris, M.C, Charnet, P., Divita, G., Heitz, F. (2004). Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis. *Biochemistry*, 43(6), 1449-1459.
- Dicker, K.T., Gurski, L.A., Pradhan-Bhatt, S., Witt, R.L., Farach-Carson, M.C., Jia, X. (2014). Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater*, 10(4), 1558-70.
- Doherty, G.J., McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78, 857-902.
- Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R. and Brock, R. (2007) A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic*, 8(7), 848-866.
- El-Andaloussi, S., Johansson, H.J., Magnusdottir, A., Järver, P., Lundberg, P., Langel, Ü. (2005). TP10, a delivery vector for decoy oligonucleotides targeting the Myc protein. *J Control Release*, 110(1), 189-201.
- Esko, J.D., Stewart, T.E., Taylor, W.H. (1985). Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(10), 3197-201.
- Ernst, S., Langer, R., Cooney, C.L., Sasisekharan, R. (1995). Enzymatic degradation of glycosaminoglycans. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30(5), 387-444.
- Faissner, A., Clement, A., Lochter, A., Streit, A., Mandl, C., Schachner, M. (1994). Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J Cell Biol*, 126(3), 783-99.
- Ferrari, A., Pellegrini, V., Arcangeli, C., Fittipaldi, A., Giacca, M., Beltram, F. (2003). Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Mol Ther*, 8(2), 284-294.
- Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppé, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F., Giacca, M. (2003). Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem*, 278(36), 34141-9.
- Frankel, A.D., Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6), 1189-1193.
- Fridriksson, E.K., Shipkova, P.A., Sheets, E.D., Holowka, D., Baird, B., McLafferty, F.W. (1999). Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains

from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. *Biochemistry*, 38(25), 8056-8063.

Froelich, C.J., Orth, K., Turbov, J., Seth, P., Gottlieb, R., Babior, B., Shah, G.M., Bleackley, R.C., Dixit, V.M., Hanna, W. (1996). New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem*, 271(46), 29073-9.

Fuchs, S.M., Raines, R.T. (2004). Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry*, 43(9), 2438-2444.

Fullwood, N.J., Davies, Y., Nieduszynski, I.A., Marcyniuk, B., Ridgway, A.E., Quantock, A.J. (1996). Cell surface-associated keratan sulfate on normal and migrating corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(7), 1256-70.

Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Suqiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem*, 276(8), 5836-5840.

Garcia-Sanz, J.A., Velotti, F., MacDonald, H.R., Masson, D., Tschopp, J., Nabholz, M. (1988). Appearance of granule-associated molecules during activation of cytolytic T-lymphocyte precursors by defined stimuli. *Immunology*, 64(1), 129-134.

Glebov, O.O., Bright, N.A., Nichols, B.J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 8(1), 46-54.

Goncalves, E., Kitas, E., and Seelig, J. (2005). Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide. *Biochemistry*, 44(7), 2692-2702.

Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*, 174(4), 1783-6.

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

Grossman, W.J., Revell, P.A., Lu, Z.H., Johnson, H., Bredemeyer, A.J., Ley, T.J. (2003). The orphan granzymes of humans and mice. *Curr Opin Immunol*, 15(5), 544-52.

Gump, J.M., June, R.K., Dowdy, S.F. (2010). Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction. *J Biol Chem*, 285(2), 1500-1507.

Herce, H.D., Garcia, A.E, Litt, J., Kane, R.S., Martin, P., Enrique, N., Rebolledo, A., Milesi, V. (2009). Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophys J*, 97(7), 1917-25.

Herce, H.D., Garcia, A.E., Cardoso, M.C. (2014). Fundamental Molecular Mechanism for the Cellular Uptake of Guanidinium-Rich Molecules. *J Am Chem Soc*, 136(50), 17459–17467.

Hickson, G.R., Echard, A., O'Farrell, P.H. (2006). Rho-kinase controls cell shape changes during cytokinesis. *Curr Biol*, 16(4), 359-70.

- Hitchcock, A.M., Yates, K.E., Costello, C.E., Zaia, J. (2008). Comparative glycomics of connective tissue glycosaminoglycans. *Proteomics*, 8(7), 1384-97.
- Holowka, D., Baird, B. (1983). Structural studies on the membrane-bound immunoglobulin E-receptor complex. 1. Characterization of large plasma membrane vesicles from rat basophilic leukemia cells and insertion of amphipathic fluorescent probes. *Biochemistry*, 22(2), 3466-3474.
- Jiao, C.Y., Delaroche, D., Burlina, F., Alves, I.D., Chassaing, G., Sagan, S. (2009). Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J Biol Chem*, 284(49), 33957-33965.
- Jobin, M.L., Alves, I.D. (2014). On the importance of electrostatic interactions between cell penetrating peptides and membranes: a pathway toward tumor cell selectivity? *Biochimie*, 107(A),154-9.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(5), 1864-1868.
- Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., Lieberman, J. (2005). Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*, 23(3), 249-62.
- Keller, H., Lorizate, M., Schwille, P. (2009). PI(4,5)P₂ degradation promotes the formation of cytoskeleton-free model membrane systems. *Chemphyschem*, 10(16), 2805-2812.
- King, P.T., Ngui, J., Farmer, M.W., Hutchinson, P., Holmes, P.W., Holdsworth, S.R. (2008). Cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell responses to non-typeable Haemophilus influenzae. *Clin Exp Immunol*, 152(3), 542-51.
- Kolset, S.O., Pejler, G. (2011). Serglycin: a structural and functional chameleon with wide impact on immune cells. *J Immunol*, 187(10), 4927-33.
- Krusius, T., Finne, J., Margolis, R.K., Margolis, R.U. (1986). Identification of an O-glycosidic mannose-linked sialylated tetrasaccharide and keratan sulfate oligosaccharides in the chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J Biol Chem*, 261(18), 8237-42.
- Laurent, T.C, Fraser, J.R. (1992). Hyaluronan. *FASEB J*, 6(7), 2397-2404.
- Letoha, T., Keller-Pintér, A., Kusz, E., Kolozsi, C., Bozsó, Z., Tóth, G., Vizler, C., Oláh, Z., Szilák, L. (2010). Cell-penetrating peptide exploited syndecans. *Biochim Biophys Acta*, 1798(12), 2258-65.
- Li, X.J., Ong, C.K., Cao, Y., Xiang, Y.Q., Shao, J.Y., Ooi, A., Peng, L.X., Lu, W.H., Zhang, Z., Petillo, D., Qin, L., Bao, Y.N., Zheng, F.J., Chia, C.S., Iyer, N.G., Kang, T.B., Zeng, Y.X., Soo, K.C., Trent, J.M., Teh, B.T., Qian, C.N. (2011). Serglycin is a theranostic target in nasopharyngeal carcinoma that promotes metastasis. *Cancer Res*, 71(8), 3162-72.
- Lidholt, K., Weinke, J. L., Kiser, C.S, Lugenwa, F.N, Bame, K.J., Cheifetz, S., Massagué, J., Lindahl, U. and Esko, J.D. (1992). A single mutation affects both N-acetylglucosaminyltransferase and glucuronosyltransferase activities in a Chinese hamster ovary cell mutant defective in heparan sulfate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(6), 2267-2271.

- Lindgren, M., Rosenthal-Aizman, K., Saar, K., Eiríksdóttir, E., Jiang, Y., Sassian, M., Ostlund, P., Hällbrink, M., Langel Ü. (2006). Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochem Pharmacol*, 71(4), 416-25.
- Masson, D., Peters, P.J., Geuze, H.J., Borst, J., Tschopp, J. (1990). Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH. *Biochemistry*, 29(51), 11229-35.
- Matsuda, K., Maruyama, H., Guo, F., Kleeff, J., Itakura, J., Matsumoto, Y., Lander, A.D., Korc, M. (2001). Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. *Cancer Res*, 61(14), 5562-9.
- Mayor, S., Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(8), 603-612.
- Meen, A.J., Øynebråten, I., Reine, T.M., Duelli, A., Svennevig, K., Pejler, G., Jenssen, T., Kolset, S.O. (2011). Serglycin is a major proteoglycan in polarized human endothelial cells and is implicated in the secretion of the chemokine GROalpha/CXCL1. *J Biol Chem*, 286(4), 2636-47.
- Metkar, S.S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S.M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J.A., Froelich, C.J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity*, 16(3), 417-28.
- Metkar, S.S., Wang, B., Catalan, E., Anderluh, G., Gilbert, R.J., Pardo, J., Froelich, C.J. (2011). Perforin rapidly induces plasma membrane phospholipid flip-flop. *PLoS One*, 6(9), 283-290.
- Metkar, S.S., Marchioretto, M., Antonini, V., Lunelli, L., Wang, B., Gilbert, R.J., Anderluh, G., Roth, R., Pooga, M., Pardo, J., Heuser, J.E., Serra, M.D., Froelich, C.J. (2015). Perforin oligomers form arcs in cellular membranes: a locus for intracellular delivery of granzymes. *Cell Death Differ*, 22(1), 74-85.
- Mikami, T., Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim Biophys Acta*, 1830(10), 4719-33.
- Milletti, F. (2012). Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today*, 17(16), 850-60.
- Mitchell, D.J., Kim, D.T., Steinman, I., Fathman, C.G., Rothbard, J.B. (2000). Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res*, 56(5), 318-325.
- Mäe, M., El-Andaloussi, S., Lundin, P., Oskolkov, N., Johansson, H.J., Guterstam, P., Langel, Ü. (2009). A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release* 134(3), 221-7.
- Mäger, I., Langel, K., Lehto, T., Eiríksdóttir, E., Langel U. (2012). The role of endocytosis on the uptake kinetics of luciferin-conjugated cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1818(3), 502-11.

- Nagata, Y., Burger, M.M. (1974). Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem*, 249(10), 3116-3121.
- Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J.C., Jones, A.T., Sugiura, Y., Futaki, S. (2004). Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol Ther*, 10(6), 1011-1022.
- Nakase, I., Osaki, K., Tanaka, G., Utani, A., Futaki, S. (2014). Molecular interplays involved in the cellular uptake of octaarginine on cell surfaces and the importance of syndecan-4 cytoplasmic V domain for the activation of protein kinase Ca. *Biochem Biophys Res Commun*, 446(4), 857-62.
- Nekhotiaeva, N., Elmquist, A., Rajarao, K. G., Hällbrink, M., Langel, Ü., Good, L. (2004). Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides. *FASEB J*, 18(2), 394-396.
- Nikolovska, K., Renke, J.K., Jungmann, O., Grobe, K., Iozzo, R.V., Zamfir, A.D., Seidler, D.G. (2014). A decorin-deficient matrix affects skin chondroitin/dermatan sulfate levels and keratinocyte function. *Matrix Biol*, 35(3), 91-102.
- Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., Melzig, M., and Bienert, M. (1998). Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non- endocytically. *Biochim Biophys Acta*, 1414(1-2), 127-139.
- Oskolkov, N., Arukuusk, P., Copolovici, D-H., Lindberg, S., Margus, H., Padari, K., Pooga, M., Langel, Ü. (2011). NickFects, Phosphorylated Derivates of Transportan 10 for Cellular Delivery of Oligonucleotides. *Int J Pept Ther*, 17(2), 147-157.
- Pae, J., Säälük, P., Liivamägi, L., Lubenets, D., Arukuusk, P., Langel, Ü., Pooga, M. (2014). Translocation of cell-penetrating peptides across the plasma membrane is controlled by cholesterol and microenvironment created by membranous proteins. *J Control Release*, 192, 103-13.
- Padari, K., Säälük, P., Hansen, M., Koppel, K., Raid, R., Langel, Ü., Pooga, M. (2005). Cell transduction pathways of transportans. *Bioconjug Chem*, 16(6), 1399-410.
- Penc, S.F., Pomahac, B., Winkler, T., Dorschner, R.A., Eriksson, E., Herndon, M., Gallo, R.L. (1998). Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J Biol Chem*, 273(43), 28116-21.
- Pinkoski, M.J., Hobman, M., Heibein, J.A., Tomaselli, K., Li, F., Seth, P., Froelich, C.J., Bleackley, R.C. (1998). Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood*, 92(3), 1044-54.
- Pisa, Di M., Chassaing, G., Swiecicki, J.M. (2014). Translocation mechanism(s) of cell-penetrating peptides: biophysical studies using artificial membrane bilayers. *Biochemistry*, 54(2), 194-207.
- Poe, M., Blake, J.T., Boulton, D.A., Gammon, M., Sigal, N.H., Wu, J.K., Zweerink, H.J. (1991). Human cytotoxic lymphocyte granzyme B. Its purification from granules and the characterization of substrate and inhibitor specificity. *J Biol Chem*, 266(1), 98-103.

- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., Langel, Ü. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J*, 12(1), 67-77.
- Pooga, M., Kut, C., Kihlmark, M., Hällbrink, M., Fernaeus, S., Raid, R., Land, T., Hallberg, E., Bartfai, T., Langel, Ü. (2001). Cellular translocation of proteins by transportan. *FASEB J*, 15(8), 1451-1453.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. and Shai, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 31(49), 12416-12423.
- Raja, S.M., Wang, B., Dantuluri, M., Desai, U.R., Demeler, B., Spiegel, K., Metkar, S.S., Froelich, C.J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. *J Biol Chem*, 277(51), 49523-30.
- Raja, S.M., Metkar, S.S., Höning, S., Wang, B., Russin, W.A., Pipalia, N.H., Mena, C., Belting, M., Cao, X., Dressel, R., Froelich, C.J. (2005). A novel mechanism for protein delivery: granzyme B undergoes electrostatic exchange from serglycin to target cells. *J Biol Chem*, 280(21), 20752-61.
- Reefman, E., Kay, J.G., Wood, S.M., Offenhäuser, C., Brown, D.L., Roy, S., Stanley, A.C., Low, P.C., Manderson, A.P., Stow, J.L. (2010). Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells. *J Immunol*, 184(9), 4852-62.
- Richard, J.P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., Chernomordik, L.V. (2005). Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem*, 280(5), 15300-15306.
- Ripellino, J.A., Bailo, M., Margolis, R.U., Margolis, R.K. (1988). Light and electron microscopic studies on the localization of hyaluronic acid in developing rat cerebellum. *J Cell Biol*, 106(3), 845-55.
- Saini, R.V., Wilson, C., Finn, M.W., Wang, T., Krensky, A.M., Clayberger, C. (2011). Granulysin delivered by cytotoxic cells damages endoplasmic reticulum and activates caspase-7 in target cells. *J Immunol*, 186(6), 3497-504.
- Sarabipour, S., Hristova, K. (2013). Glycophorin A transmembrane domain dimerization in plasma membrane vesicles derived from CHO, HEK 293T, and A431 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1828(8), 1829-33.
- Scott, R.E. (1976). Plasma membrane vesiculation: a new technique for isolation of plasma membranes. *Science*, 194(4266), 743-745.
- Sezgin, E., Kaiser, H.J., Baumgart, T., Schwille, P., Simons, K., Levental, I. Elucidating membrane structure and protein behavior using giant plasma membrane vesicles. (2012). *Nat Protoc*, 7(6), 1042-51.
- Silhol, M., Tyagi, M., Giacca, M., Lebleu, B., Vives, E. (2002). Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat. *Eur J Biochem*, 269(2), 494-501.
- Sommarin, Y., Wendel, M., Shen, Z., Hellman, U., Heinegård, D. (1998). Osteoadherin, a cell-binding keratan sulfate proteoglycan in bone, belongs to the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 273(27), 16723-9.

- Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R., Langel, Ü. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta*, 1467(1), 165-175.
- Suzuki, T., Futaki, S., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y. (2002). Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J Biol Chem*, 277(4), 2437-2443.
- Säälik, P., Padari, K., Niinep, A., Lorents, A., Hansen, M., Jokitalo, E., Langel, Ü., Pooga, M. (2009). Protein delivery with transportans is mediated by caveolae rather than flotillin-dependent pathways. *Bioconjug Chem*, 20(5), 877-87.
- Säälik, P., Niinep, A., Pae, J., Hansen, M., Lubenets, D., Langel, Ü., Pooga, M. (2011). Penetration without cells: membrane translocation of cell-penetrating peptides in the giant plasma membrane vesicles. *J Control Release*, 153(2), 117-125.
- Thelin, M.A., Svensson, K.J., Shi, X., Bagher, M., Axelsson, J., Isinger-Ekstrand, A., van Kuppevelt, T.H., Johansson, J., Nilbert, M., Zaia, J., Belting, M., Maccarana, M., Malmström, A. (2012). Dermatan sulfate is involved in the tumorigenic properties of esophagus squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 72(8), 1943-52.
- Theocharis, A.D., Seidel, C., Borset, M., Dobra, K., Baykov, V., Labropoulou, V., Kanakis, I., Dalas, E., Karamanos, N.K., Sundan, A., Hjerpe, A. (2006). Serglycin constitutively secreted by myeloma plasma cells is a potent inhibitor of bone mineralization in vitro. *J Biol Chem*, 281(46), 35116-28.
- Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., Goping, I.S., Bleackley, R.C., Kirchhausen, T., Lieberman, J. (2011). Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol*, 12(8), 770-7.
- Tünnemann, G., Martin, R.M., Haupt, S., Patsch, C., Edenhofer, F., Cardoso, M.C. (2006). Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB J*, 20(11), 1775-1784.
- Tünnemann, G., Ter-Avetisyan, G., Martin, R.M., Stöckl, M., Herrmann, A., Cardoso, M.C. (2008). Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J Pept Sci*, 14(4), 469-476.
- Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., Giacca, M. (2001). Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, 276(5), 3254-3261.
- Verdurmen, W.P., Thanos, M., Ruttekolk, I.R., Gulbins, E., Brock, R. (2010). Cationic cell-penetrating peptides induce ceramide formation via acid sphingomyelinase: implications for uptake. *J Control Release*, 147(2), 171-9.
- Verdurmen, W.P., Wallbrecher, R., Schmidt, S., Eilander, J., Bovee-Geurts, P., Fanghänel, S., Bürck, J., Wadhvani, P., Ulrich, A.S., Brock, R. (2013). Cell surface clustering of heparan sulfate proteoglycans by amphipathic cell-penetrating peptides does not contribute to uptake. *J Control Release*, 170(1), 83-91.
- Vives, E., Brodin P., Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 272(25), 16010-16017.

- Wadia, J.S., Stan, R.V., Dowdy, S.F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med*, 10(3), 310-315.
- Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., Rothbard, J.B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(24), 13003-13008.
- Xu, X., Jha, A.K., Harrington, D.A., Farach-Carson, M.C., Jia, X. (2012). Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: from a Natural Polysaccharide to Complex Networks. *Soft Matter*, 8(12), 3280-3294.
- Yandek, L.E., Pokorny, A., Florén, A., Knoelke, K., Langel, Ü. and Almeida, P.F. (2007). Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophys J*, 92(7), 2434-2444.
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., Huang, H.W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J*, 81(3), 1475-85.
- Zeller, S., Choi, C.S., Uchil, P.D., Ban, H.S., Siefert, A., Fahmy, T.M., Mothes, W., Lee, S.K., Kumar, P. (2015). Attachment of cell-binding ligands to arginine-rich cell-penetrating peptides enables cytosolic translocation of complexed siRNA. *Chem Biol*, 22(1), 50-62.
- Zhou, B., Weigel, J.A., Fauss, L., Weigel, P.H. (2000). Identification of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). *J Biol Chem*, 275(48), 37733-41.
- Ziegler, A. (2008). Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(4-5), 580-597.
- Ziegler, A., Seelig, J. (2008). Binding and Clustering of Glycosaminoglycans: A Common Property of Mono- and Multivalent Cell-Penetrating Compounds. *Biophys J*, 94(6), 2142-2149.
- Zorko, M., Langel, Ü. (2005). Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(4), 529-545.

TÄNUSÕNAD

Täna südamest oma juhendajat Janelyt meeldiva koostöö ja kasulike nõuannete eest ning kelle abi oli antud töö valmimisel asendamatu. Suur tänu ka prof. Margus Poogale mõistva suhtumise ja professionaalse suunamise eest. Täna laborikaaslaste toreda seltskonna ja abivalmiduse eest. Lisaks täna ka Dmitri Lubenetsi läbivoolutsütomeetria katsete teostamisel ja analüüsimisel.

Suur aitäh ka perele, kes olid kõige paremad motiveerijad ja toetajad!

LIHTLITSENTS

Mina, Laura Liivamägi

(sünnikuupäev: 31.01.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose:
„Glükoosaminoglükaanide osalus rakku sisenevate peptiidide
penetratsioonis plasmamembraani vesiikulitesse“,
mille juhendajad on Janely Pae ja Margus Pooga,

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

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 26.05.2015