



LUNDS
UNIVERSITET

Proteoglycan dependence of lipid nanoparticle mediated RNA delivery

Proteoglykanberoende lipid nanopartikelmedierad RNA-leverans

Projektarbete Läkarpogrammet termin 5

Authors:

Sigrid Roos, tel: 0727127100

Mina Westesson, tel: 0721571759

Supervisors: Anders Wittrup; Handledare, Läkare, Biträdande universitetslektor

Anders.wittrup@med.lu.se

Affiliations: RNA Therapeutics in Cancer Laboratory, Lund University

Lund, 2025

Innehållsförteckning

Abstract	3
Populärvetenskaplig sammanfattning	5
Introduktion.....	7
Bakgrund.....	7
Syfte	9
Frågeställning.....	10
Metod	10
Cellkultur	10
Genomförande.....	10
Sätta celler i brunnar.....	10
Seriespädning av LNP i medium.....	12
Tillsättning av LNP till celler	13
Inför flödescytometri.....	14
Flödescytometri.....	15
Bearbetning av data.....	16
Etiska reflektioner	16
Resultat.....	16
Internalisering och mRNA-aktivitet är beroende av LNP-koncentrationer för båda cellinjer.....	17
Jämförelse av cellinjernas mRNA-internalisering samt aktivitet vid olika LNP koncentrationer.....	18
Sammanställning av experiment 1 och 2	18
Diskussion.....	19
Sammanfattning av fynd	19
Koppling till tidigare studier	20
Styrkor, svagheter och begränsningar	21
Felkällor	21
Förslag på framtida forskning	22
Svar på syfte och frågeställning	23
Deklaration av arbetsfördelning.....	23
Ett avslutande tack	24
Referenslista.....	24
Bilagor.....	26

Abbreviations

RNA - Ribonukleinsyra

mRNA – budbärare Ribonukleinsyra

miRNA – mikro Ribonukleinsyra

siRNA – litet interfererande ribonukleinsyra

DNA - deoxiribonukleinsyra

HSPG - heparansulufatproteoglykan

LNP - lipidbaserade nanopartiklar

LDL - Betalipoprotein

WT - wild type

PEG - polyetylenglykol-lipider

ApoE - Apolipoprotein E

Cy5 - Cyanin 5

GFP – Grönt fluorescerande protein

Abstract

Introduction

The use of RNA therapies had major breakthroughs during the Covid-19 pandemic, where several mRNA vaccines were developed. Multiple studies have concluded that mRNA therapies have plenty of potential benefits. Packaging mRNA into lipid-nano particles (LNPs) allows mRNA to enter the cell through endocytosis, but there are still questions about what regulates this process and how to modulate it. Heparan sulphate proteoglycan (HSPG), found on the cell membrane, acts as a co-receptor for the LDL-receptor in the process of lipid nanoparticles endocytosis. The aim of this study is to investigate whether HSPG has a significant function in the internalization of mRNA packaged LNPs and mRNA activity in the cytosol.

Methods

To investigate the function of HSPG on LNP-mediated mRNA delivery and cytosolic release we compared wild type Chinese Hamster Ovarian cells (CHO-K1) with mutants that are deficient in heparan sulphate proteoglycan (PGSA-745). Cells were incubated with four different concentrations of LNPs, containing mRNA labelled with a Cy5 fluorescent fluorophore to measure internalization, and encoding green fluorescent protein (GFP) to measure mRNA activity in the cytosol. Flowcytometric analyses were used to measure LNP internalization and mRNA activity.

Results

Our result shows that internalization and cytosolic mRNA activity increases as the concentration of LNPs increases in WT and mutant CHO-K1 cells. Furthermore, we observed that internalization and activity decrease in mutant cells compared to WT cells, for every concentration of LNP.

Discussion

The results from these experiments indicates that the negatively charged carbohydrates on the heparan sulphate has an impact on both internalization of LNP, and mRNA activity. However, we saw some uptake of LNPs in the mutant cells, suggesting that uptake is not completely dependent on the negative charged carbohydrates. Further research on this topic is needed to understand how to maximize the uptake of mRNA therapies into cells.

Populärvetenskaplig sammanfattning

För att cellerna i vår kropp ska fungera behöver de producera komponenter kallade proteiner. För att skapa protein används mRNA, en form av kod för alla proteiner som byggs. Vanligtvis skrivs vårt DNA om till mRNA, men man kan också tillföra mRNA till kroppen utifrån. Det kan man till exempel göra med hjälp av en form av nanopartikel som består av lipider, och kallas för LNP. Syntetiskt mRNA kan i labb tillsättas till LNP, och på så sätt transporteras i kroppens cirkulationssystem. När LNP ska ta sig från cirkulationen in i cellen behövs specifika receptorer som sitter på cellens yta och fångar upp LNP. En av dessa receptorer får hjälp av en makromolekyl som är sammansatt av protein och kolhydratskedjor, kallad heparansulfatproteoglykan (HSPG). På HSPG sitter negativa laddningar. Vårt experiment går ut på att ta reda på hur dessa negativa laddningar påverkar hur mycket mRNA från LNP som tar sig in i cellen och släpps ut i cytosolen.

Vi undersökte två olika cellinjer från kinesiska hamstrars äggstockar. Den ena, CHO-K1 är så kallade vildtypceller med de flesta cellulära funktioner intakta. Den andra typen, PGSA-745, är muterad så att den saknar de negativa laddningarna på HSPG. Båda celltyperna odlades, och sedan tillsattes LNP i olika koncentrationer. I LNP fanns mRNA som kodade för GFP, som fluorescerar i grönt när man lyser på cellerna med en laser. Dessutom var mRNA färgat med Cy5 som fluorescerar i rött. Det röda ljuset symboliserar upptag av mRNA in till cellen, och det gröna ljuset visar på det mRNA som har släppts ut i cytosolen och bildat proteinet GFP.

Efter ett dygn i inkubationsskåp använde vi en flödescytometer för att mäta just fluorescensen genom att belysa cellerna med en laser som gör att de exciterar, och därmed avger ljus. Experimentet upprepades en gång till med samma förutsättningar. Datan analyserades och resultatet presenterades i tabeller och diagram för att visa hur fluorescensen beror på de olika cellinjerna.

För alla koncentrationer av LNP hade celltypen CHO-K1 en högre fluorescens Cy5 och GFP, jämfört med PGSA-745. Det indikerar att celltypen som har de negativa laddningarna är bättre på att både ta upp mRNA, och att släppa ut det i cytosolen. Det verkar alltså vara en fördel för cellens upptag av LNP att ha de negativa laddningarna som sitter på HSPG till hjälp.

Nyligen har man börjat experimentera med mRNA-terapi, det vill säga läkemedel som administreras i form av mRNA till kroppen. Att veta hur mycket mRNA som tas upp i cellen är avgörande för att kunna genomföra den här administreringen på ett bra sätt. Då kan resultatet i vår studie, det vill säga betydelsen av de negativa laddningarna på cellytan, vara av stor betydelse. Förhoppningsvis kan denna kunskap vara en del i utvecklingen av framtidens mRNA-terapi.

Introduktion

Bakgrund

I cellen transkriberas DNA till mRNA som i det endoplasmatiska retiklet syntetiseras till olika aminosyrasekvenser; proteiner som har olika funktioner i cellen (1). Att kunna framställa läkemedel i form av mRNA har länge varit ett mål och fick sitt genombrott under Covid-19-pandemin när det framställdes två olika mRNA-vaccin mot viruset. Detta fick stor betydelse eftersom det tidigare endast haft fas 1- och fas 2-studier på mRNA-vaccin mot olika virus (2). Det finns flera typer av RNA med olika funktioner; mRNA, miRNA, siRNA och i respektive fall kan det vara inhiberande eller imiterande. Forskning kring detta har bland annat lett till att lovande resultat med miRNA-terapi i form av tumörsuppressorer och onkogener vid lungcancer och melanom (3).

Utmaningen med RNA -terapi är transporten fram till, och in i cellen. Olika lipid-formuleringar har testats varvid ett exempel är Covid-19-vaccinen som användes lipidbaserade nanopartiklar (LNP) med god effekt för lokal transport (4). LNP har även visats kunna undvika immunförsvaret (5).

LNP är homogena vesiklar med en lipid kärna, och är vanligtvis ca 60–150 nm stora. Nanopartiklarna används bland annat vid leverans av läkemedel till det inre av cellen (cytosolen). Att kapsla in mRNA i sådana LNP förhindrar nedbrytning av extracellulära nukleaser, som RNase, och motverkar även hydrolysering (6). RNA-LNP skapas genom att lipider och komponenter av RNA blandas under mixning med hög flödes hastighet vid ett lågt pH-värde (7).

För en optimal mRNA-leverans vid mRNA-terapi används ofta joniserbara lipider i LNP. Dessa är neutralt laddade vid extracellulärt pH-värde, men protoniseras vid lägre pH-värden. I endosomen får de joniserbara lipiderna därför en positiv laddning (8). Utöver de joniserbara lipiderna är LNP också uppbyggda av bland annat fosfolipider, kolesterol och polyetylenglykol-lipider (PEG-lipider). De två förstnämnda bidrar till stabilitet och struktur (9). PEG-lipider är viktiga för LNP när partikeln ska avlägsnas från endosomen inuti cellen med hjälp av dess dialkylkedjor med 14 kolatomer (10).

LNP interagerar med apolipoproteiner i plasman under cirkulationen. Dessa tillsammans bildar en biomolekylär corona i vilken ApoE är en av huvudkomponenterna (6). Lipidkomplexet binder in till LDL-receptorn som sitter på cellens yta, vilket i sin tur triggar receptormedierad endocytos (2, 5). På så sätt internaliseras LNP från cirkulationen till cellens insida.

På cellytan sitter, utöver LDL-receptorerna, heparansulfatproteoglykaner (HSPG). Dessa utgörs av proteoglykaner med kovalent bundna heparansulfatkedjor (11). Proteoglykaner har en eller flera glukosaminoglykaner (kolhydrater) bundna till aminosyran serin i proteinets aminosyrakedja. Det finns flera undergrupper av proteoglykaner, varav den största gruppen hittas i extracellulära matrix. De som är bundna till heparansulfat innehåller specifikt perlekan, arginin och kollagen typ XVIII (12, 13). Två exempel på HSPG som sitter på cellytan är syndecans och glypicans. De båda kan endocyteras tillsammans med sin ligand.

Funktionen för HSPG som sitter på cellytan är främst att fånga in signalmolekyler som interagerar med heparansulfatbindning in till området kring cellen (14). Heparansulfat har också en aktiv roll i signalering kopplat till vissa receptorer (15, 16). Nyligen genomförda studier visar på att HSPG dessutom spelar roll i internaliseringen av mRNA till cellen (11). För att internalisera mRNA behövs det ta sig förbi cellens yttre barriär; cellmembranet.

Cellmembranet är ett lipidlager med en specifik komposition. Det är impermeabelt för de flesta hydrofila molekyler och makromolekyler, då dessa kräver transportproteiner. mRNA är ett exempel på en sådan makromolekyl, och har därför svårt att ta sig igenom cellmembranet på egen hand (17). Transport över cellmembranet av makromolekyler sker via endocytos till det endolysosomal systemet, som är avgörande för internaliseringen av mRNA trots den starka barriären i form av cellmembranet.

Systemet består av två loopar; en "återanvändande" och en "degraderande". Looparna medieras av *late endosomes* (LE), som bildas från *early endosomes* (EE) när de mognar (18). För att LE ska bildas och fusionera med trans-golgi-nätverket behövs acidering av endosomen, vilket innebär sänkning av pH-värdet. Detta sker genom att V-ATPas pumpar in H⁺ i cellen. Denna acidering utgör mognaden av EE till LE. EE har ett pH-värde på 6.1-6.8 och LE har ett pH-värde på 4.8-6.0 (19). När endosomen får en tillräckligt sur intralumenal

miljö blir LNP positivt laddat, vilket trigger ruptur och därmed mRNA-internalisering till cytosolen (11).

Det är sedan tidigare känt att endast en liten del av allt internaliserat innehåll från LNP når cytoplasman. Detta kan till exempel bero på att endosomen inte är sur nog för att jonisera de joniserbara lipiderna, som då inte rupterar endosomen. Man vet också att perioden för utträde ur endosomen (så kallad *endosomal escape*) är kort (20). Flera olika faktorer spelar in i mekanismen för utträde ur endosomen kopplat till LNP. Sådana faktorer är till exempel pKa-värdet och andelen av de joniserbara lipiderna (21), de lipida svansarna (22), och fördelningen av de lipida komponenterna (23). En del av mRNA:t fortsätter binda till membranet på LNP då det bildar ett saltkomplex med de joniserande lipiderna, och släpps därför inte heller ut i cytoplasman (24).

I enighet med ovanstående finns det många olika faktorer som påverkar hur mycket av LNPs innehåll som slutligen når cytosolen. En sådan faktor är HSPG på cellytan. Dessa verkar utifrån tidigare forskning ha en central roll i processen där LNP används för administrering av mRNA in till cellen. En nyligen publicerad studie visar på att HSPG påverkar mängden mRNA som slutligen når cytosolen. Heparansulfaten är starkt negativt laddade och har mer specifikt visat sig involverade i det LDL-receptorberoende upptaget (25).

De LNP som används i studien innehåller mRNA som kodar för grönt fluorescerande protein (GFP). Under flödescytometri bestrålas cellerna med en laser, vilket gör att de exciteras. Då avges ljus som sedan mäts utifrån intensiteten på fluorescensen. GFP ger ett grönt fluorescerande ljus, medan mRNA:t är färgat med Cy5 fluorofor som rött ljus. Att mäta både Cy5 och GFP motsvarar dels hur mycket mRNA som tagits upp i cellen (Cy5), dels uttrycket av GFP.

Syfte

Syftet är att jämföra två olika celltyper sett till deras förmåga att ta upp nanopartikel-formulerat mRNA i cellen samt frisätta det i cytosolen där det utövar sin biologiska aktivitet.

Frågeställning

Har den lipidbaserade nanopartikeln innehållandes mRNA lättare att göra sönder endosomens membran utan starka negativa laddningar som kan konkurrera för inbindning av membransdestabiliserande nanopartikelkomponenter?

Metod

Cellkultur

De två celltyperna som används i studien är en *wild type* kallad CHO-K1, samt en mutant kallad PGSA-745. De båda härstammar från etablerade cellinjer från kinesiska hamstrar, mer specifikt ovarieceller. Skillnaden på de båda cellerna är att PGSA-745 saknar det enzym som i cellen syntetiserar heparansulfatet som vanligtvis sitter bundet till proteoglykanen på cellytan. Tillsammans utgör heparansulfat och proteoglykan en ko-receptor (HSPG) till LDL-receptorn, för vilken LNP binder in till varpå den internaliseras. På så sätt utgör HSPG en central del i leveransen av mRNA i LNP in till cytosolen. Eftersom PGSA-745 är muterad saknar den heparansulfatet, och har därför inte heller dess starkt negativa laddningar, som eventuellt kan påverka mRNA-leveransen från LNP.

Genomförande

Sätta celler i brunnar

Materialet som behövdes desinficerades lades under dragskåp. De båda cellodlingsflaskorna (CHO-K1 och PGSA-745) togs ut ur inkubationsskåpet och sattes även de under dragskåp. Mediet (F12K, 1% streptomycin, 1% glutamat, 10% FBS) sögs ut med hjälp av en slang först ur ena cellodlingen, och sedan med ett nytt munstycke ur den andra. PBS hälldes ner i de båda flaskorna så att det precis täckte hela botten. Därefter sögs all vätska bort med en slang, där olika munstycken användes för de olika flaskorna. Samma tvättning med PBS upprepades en gång för båda cellodlingarna.

Med hjälp av en pipett tillsattes 1 ml trypsin till vardera flaska. Sedan lades de båda flaskorna i inkubationsskåp. Efter 5 min togs de ut och 2 ml medium pipetterades ner i de båda flaskorna. Med hjälp av uppsugning och utsläpp ur pipetten blandades vätskan i flaskorna.

Mellan de båda flaskorna byttes pipettspetsen. Vätskan hölls sedan ner i mindre rör, som märks efter celltyp likt flaskorna.

Ur vardera rör pipetteras 10 µl i två omgångar, som sätts i en cellräknare. Det gjordes alltså två prov per celltyp. Antalet celler per milliliter antecknades, och användes sedan för att räkna ut hur mycket av vätskan i röret som skulle tillföras till varje brunn i ett senare steg (se beräkning 1 nedan).

Resterande innehåll centrifugerades på 1000xg i 5 minuter. Därefter sögs median ut ur de båda rören, med byte av munstycke mellan. 1 ml media resuspenderades i de båda rören, med byte av munstycke mellan.

Två nya rör namngavs enligt de olika celltyperna. 6 milliliter media pipetterades ner i de båda, och sedan även 56,7 µl ur det ursprungliga röret märkt CHO-K1, respektive 60,0 µl ur det märkt PGSA-745. Volymerna av celllösningarna beräknades utifrån att varje brunn senare skulle innehålla 35 000 celler (se beräkning 1 nedan). Med hjälp av respektive pipettspetsar blandades innehållet i rören. Därefter namngavs locket till en 48-brunnars cellodlingsplatta med en spritpenna enligt följande: bokstäverna A-J där varje bokstav får varsin brunn - en tom rads mellanrum – bokstäverna K-T där varje bokstav får varsin brunn. I brunnarna märkta A-J pipetterades 500 µl i varje, ur det nya röret märkt CHO-K1. Pipettspetsen byttes. I brunnarna märkta K-T pipetterades sedan 500 µl i varje, ur det nya röret märkt PGSA-745. Slutligen ställdes 48-brunnars cellodlingsplattan in i inkubationsskåp i 20 timmar.

CHO-K1:

$$2.4 \times 10^6 \times 3 = 7.2 \times 10^6$$

$$\frac{35000}{7.2 \times 10^6} = 4.8 \mu l$$

$$4.8 \times 12 = \mathbf{57.6 \mu l}$$

PGSA-745:

$$2.35 \times 10^6 \times 3 = 7.05 \times 10^6$$

$$\frac{35000}{7.05 \times 10^6} = 5.0 \mu l$$

$$5.0 \times 12 = \mathbf{60 \mu l}$$

Beräkning 1 använder data från cellräknaren för CHO-K1, och tar i första steget reda på hur många celler som finns i 3 ml vätska, utifrån att cellräknaren ger antalet celler i 1 ml vätska. I andra steget beräknas hur stor volym som ska tillsättas till varje brunn utifrån att varje brunn ska innehålla 35 000 celler. I det sista steget ges hur mycket av cellblandningen som totalt behövs för att fylla 12 st brunnar. Samma beräkningar görs även för PGSA-745.

Seriespädning av LNP i medium

Ett rör med medium placerades i vattenbad med temperaturen 37° Celsius. Materialet som behövde desinficerades och placerades i dragskåpet. När mediet upplevdes ha samma temperatur som vattenbadet placerades även det i dragskåpet. 7 ml medium pipetterades ner i ett rör. Pipettspetsen byttes. Sedan tillsattes 42 µl ApoE3 med hjälp av en pipett, för att få en koncentration på 3 µg/ml.

$$V_{\{1\}} \times C_{\{1\}} = V_{\{2\}} \times C_{\{2\}}$$

$$V_{\{1\}} \times 0.5 \left(\frac{mg}{ml} \right) = 7(ml) \times 3 \left(\frac{\mu g}{ml} \right)$$

$$V_{\{1\}} = \mathbf{42 \mu l}$$

Beräkning 2 tar reda på hur mycket av ApoE3 som måste tillsättas till mediet (7 ml) för att få koncentrationen 3 µg/ml. Spädningsformeln användes och volymen ApoE3 löstes ut.

4 eppendorfrör namngavs med siffrorna 1-4 med en spritpenna. Därefter pipetterades 1600 µl av mediet med ApoE3 till rör 1. Även 6 µl LNP med koncentrationen 0,4 µg/ml tillsattes.

Vätskan i rör 1 döptes till lösning 1, som utgjorde grundlösningen i den kommande spädningsserien (se tabell 1 nedan). Vidare pipetterades 1200 µl av mediet med ApoE3 ner till rör 2, 3 respektive 4.

Sedan gjordes en seriespädning i storleksordningen 1:4 enligt följande tillvägagångssätt:

400 µl från rör 1 flyttades över till rör 2 med hjälp av en pipett, där vätskan i rör 2 utgjorde lösning 2. Vidare byttes pipettspetsen varpå 400 µl flyttades från rör 2 till rör 3 med hjälp av en pipett. Efter att pipettspetsen byttes flyttades slutligen 400 µl från rör 3 till rör 4, och där vätskan då utgjorde lösning 4. Koncentrationen LNP för respektive lösning blev då följande: lösning 1 = 1,5 µg/ml, lösning 2 = 0,375 µg/ml, lösning 3 = 0,09375 och lösning 4 = 0,0234375 µg/ml.

A:Kontroll CHO-K1	B:Kontroll CHO-K1	C:Lösning 1 (1,5 µg/ml) CHO-K1	D:Lösning 1 (1,5 µg/ml) CHO-K1	E:Lösning 2 (0,375 µg/ml) CHO-K1	F: Lösning 2 (0,375 µg/ml) CHO-K1	G:Lösning 3 (0,09375 µg/ml) CHO-K1	H:Lösning 3 (0,095 µg/ml) CHO-K1
I: Lösning 4 (0,0234375 µg/ml) CHO-K1	J: Lösning 4 (0,0234375 µg/ml) CHO-K1						
K:Kontroll PGSA-745	L: Kontroll PGSA-745	M:Lösning 1 (1,5 µg/ml) PGSA-745	N:Lösning 1 (1,5 µg/ml) PGSA-745	O:Lösning 2 (0,375 µg/ml) PGSA-745	P: Lösning 2 (0,375 µg/ml) PGSA-745	Q:Lösning 3 (0,09375 µg/ml) PGSA-745	R:Lösning 3 (0,09375 µg/ml) PGSA-745
S: Lösning 4 (0,0234375 µg/ml) PGSA-745	T: Lösning 4 (0,0234375 µg/ml) PGSA-745						

Tabell 1 visar en översikt över 48-brunnars cellodlingsplattan som användes för inkubation av celler i närvaro av LNP. De olika brunnarna är namngivna med bokstäver, och innehåller celler som behandlas med olika koncentrationer av LNP. Två olika celltyper har satts i brunnarna; hälften har en wild type kallad CHO-K1, och hälften en muterad kallad PGSA-745. Färgerna symboliserar spädningsgrad, där mörk färg innebär högre koncentration LNP än ljus färg. De gråa rutorna i tabellen innebär kontroller för de båda celltyperna, som då inte har någon LNP alls.

Tillsättning av LNP till celler

48-brunnars cellodlingsplattan med cellerna togs ut från inkubationsskåpet och placerades i dragskåpet. Även PBS och relevanta pipetter placerades i dragskåpet. Mediet i brunn A-J sögs

försiktigt bort med hjälp av en slang. Därefter pipetterades långsamt 3 µl PBS ner i respektive brunn. Vidare byttes munstycket på sugen och PBS sögs upp från ovan nämnda brunnar.

Sedan skulle brunnarna fyllas med rätt koncentration LNP (se tabell 1 ovan). Detta gjordes på följande sätt:

250 µl av medium med ApoE3 pipetterades ner i brunn A och B. 250 µl av lösning 1 pipetterades ner i brunn C och D. 250 µl av lösning 2 pipetterades ner i brunn E och F. 250 µl av lösning 3 pipetterades ner i brunn G och H. 250 µl av lösning 4 pipetterades ner i brunn I och J. Vid varje ny lösning byttes pipettspetsen.

Samma procedur för tillsättning av LNP upprepades för brunnarna K-T; uppsugning av medium, tillsättning och borttagning av PBS, pipettering av medium och lösningar till brunnarna enligt stigande ordning (K och L med medium, M och N med lösning 1, O och P med lösning 2, Q och R med lösning 3, S och T med lösning 4). Slutligen sattes 48-brunnars cellodlingsplattan in i inkubationsskåp i 24 timmar.

Inför flödescytometri

Under följande del av experimentet var belysningen i dragskåpet avstängd. 48-brunnars cellodlingsplattan togs ut ur inkubationsskåpet och sattes under dragskåp tillsammans med övrigt relevant material som först spritats av. Med hjälp av en sug tillhörande munstycke sögs mediet ur samtliga brunnar. Därefter pipetterades PBS ner i alla brunnar så att det precis täckte botten. Efter 2 minuter sögs även PBS bort från samtliga brunnar med sugen. Med en pipett tillsattes sedan 60 µl trypsin till varje brunn, varpå hela cellodlingsplattan sattes in i värmeskåp i 2 minuter. Efter 2 minuter pipetterades 300 µl tillväxtmedium i samtliga brunnar, och med en ny pipettspets för varje brunn blandades innehållet genom att suga upp och släppa ut vätskan upprepade gånger.

20 stycken FACS-tuber sattes i en provhållare, som sedan placerades i en balja med is. Tuberna namngavs med bokstäverna A-T. Därefter överfördes brunnarnas innehåll till respektive tub med en pipett; brunn A till tub A osv. Pipettspetsen byttes mellan varje brunn. Samtliga rör sattes in i centrifugen och centrifugerades sedan i 5 minuter på 400xg. Efter det togs supernatanten försiktigt bort från alla tuber genom att luta tuben och försiktigt suga upp vätskan. Samtliga tuber drogs över en metallhållare, varpå 500 µl FACS-buffert (0,5% BSA/PBS) tillsattes i alla tuber med hjälp av en pipett.

Återigen centrifugerades tuberna i 5 minuter på 400xg, varpå supernatanten togs bort enligt ovanstående tillvägagångssätt. Därefter drogs tuberna över metallhållaren igen, för att slutligen få ytterligare 200 µl av FACS-bufferten pipetterat vardera. Innehållet i tuberna resuspenderades en sista gång med en pipett, och ny pipettspets mellan varje. Därefter kördes de i flödescytometern enligt nedanstående.

Flödescytometri

FACS-tuberna hölls kylda med is. Tuberna i form av kontroller (A och B) för CHO-K1 cellinjen placerades i vortexmixer i 2 sekunder vardera. Sedan gjordes en analys med flödescytometern (BD Accuri C6 Plus flow cytometer) av tub A. Med hjälp av analysens data valdes en gate ut, med utgångspunkt i var granulationen var högst (SSC-A, *side scatter area*). Denna kallades P1. För resterande prov placerades de två dubbletterna (C tillsammans med D, E tillsammans med F osv) i vortexmixern i 2 sekunder för att sedan analyseras i flödescytometern efter varandra med följande inställningar: 5000 celler, volymbegränsning 150 µl, gate P1. Den datan som samlades in var linje 1 = GFP, samt linje 4 = Cy5 från mRNA. Detta upprepades för samtliga dubbletter i båda cellinjerna.

Duplicering

Hela experimentet genomfördes en gång till på samma sätt som ovanstående metoddelar, med undantag för ”sätta celler i brunnar” där uträkningarna baserades på nya mätvärden (se beräkning 3 nedan). De båda utförandena sammanställs i resultatet.

CHO-K1:

$$1.35 \times 10^6 \times 3 = 4.05 \times 10^6$$

$$\frac{35000}{4.05 \times 10^6} = 8.6 \mu l$$

$$8.6 \times 12 = \mathbf{104 \mu l}$$

PGSA-745:

$$4.45 \times 10^6 \times 3 = 7.2 \times 10^6$$

$$\frac{35000}{7.2 \times 10^6} = 4.8 \mu l$$

$$3,5 \times 12 = 41,6 \mu l$$

Beräkning 3 använder data från cellräknaren för CHO-K1, och tar i första steget reda på hur många celler som finns i 3 ml vätska, utifrån att cellräknaren ger antalet celler i 1 ml vätska. I andra steget beräknas hur stor volym som ska tillsättas till varje brunn utifrån att varje brunn ska innehålla 35 000 celler. I det sista steget ges hur mycket av cellblandningen som totalt behövs för att fylla 12 st brunnar. Samma beräkningar görs även för PGSA-745.

Bearbetning av data

Analysen från samtliga experiment kopierades över från flödescytometern till en Excel-fil. Värdena som sparades ner var medelvärde på den fluorescerande intensiteten för samtliga 20 prover; 4 olika koncentrationer med dubletter för de båda cellinjerna, samt 2 kontroller för varje. Utifrån kontrollernas medelvärden räknades bakgrundsfluorescensen ut, och subtraherades från övriga värden. Därefter beräknades medelvärdet för de båda dubbletterna. För varje koncentration LNP gavs då en intensitet på fluorescensen för både Cy5 och GFP. Även standardavvikelse räknades ut för dessa värden. Sedan analyserades resultatet i både stapeldiagram och linjediagram.

Etiska reflektioner

I projektet används redan etablerade cellinjer som härstammar från ovarieceller från kinesiska hamstrar. Enligt etikprövningsmyndigheten behövs inget tillstånd såvida cellerna inte kommer från levande identifierbara djur, och så är inte fallet. Därför behövs inget etiskt tillstånd. Utifrån resultaten i vår studie så väl som andra inom samma forskningsområde, kan etiska tillstånd och säkerhetsåtgärder bli aktuella när man applicerar fynden mer kliniskt kopplat till upptag av mRNA-läkemedel hos människor.

Resultat

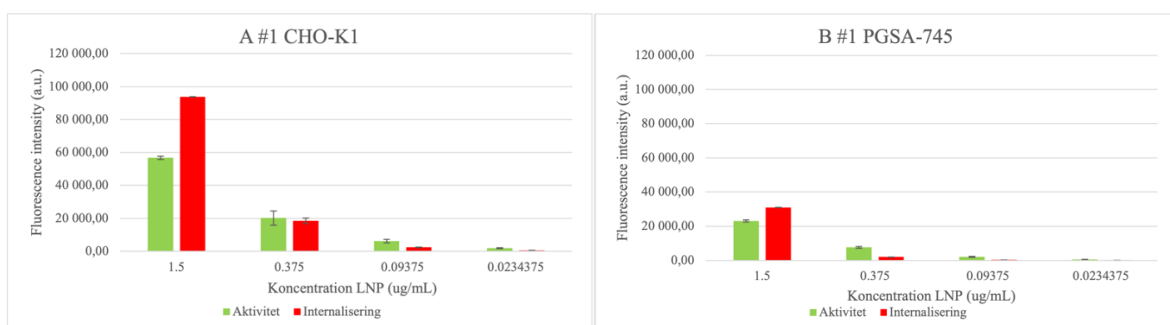
Syftet med studien var att undersöka hur HSPGs negativa laddningar påverkar upptaget av mRNA från LNP in i cellen, samt utsläppet till cytosolen. Detta gjordes genom att jämföra två olika celltyper, där CHO-K1 är en *wild type* och PGSA-745 en mutant som saknar HSPG och därmed dess negativa laddningar. De båda cellinjerna blev behandlade med olika koncentrationer av LNP som innehöll mRNA kodandes för GFP, och sedan analyserades

samtliga prover i flödescytometer. Då fluorescerar mRNA:t i rött ljus genom färgning med Cy5 fluorofor, och GFP som grönt ljus. Det Cy5 symboliserar är därför mängden mRNA som tagit sig in i cellen genom LNP; internaliseringen, och GFP hur mycket av mRNA:t som släppts ut från endosomen och därmed uttryckts som proteinet GFP; aktiviteten.

Två identiska experiment utfördes för att ta reda på i vilken utsträckning HSPG faktiskt påverkar LNP-upptaget. Figur 1 och 2 redovisar resultatet från experiment 1, och figur 3 visar en sammanställning för resultaten i både experiment 1 och 2. Övriga figurer och tabeller för endast experiment 2 samt ytterligare jämförelser av resultatet mellan de båda experimenten finns i bilagor (se bilagor).

Internalisering och mRNA-aktivitet är beroende av LNP-koncentrationer för båda cellinjer

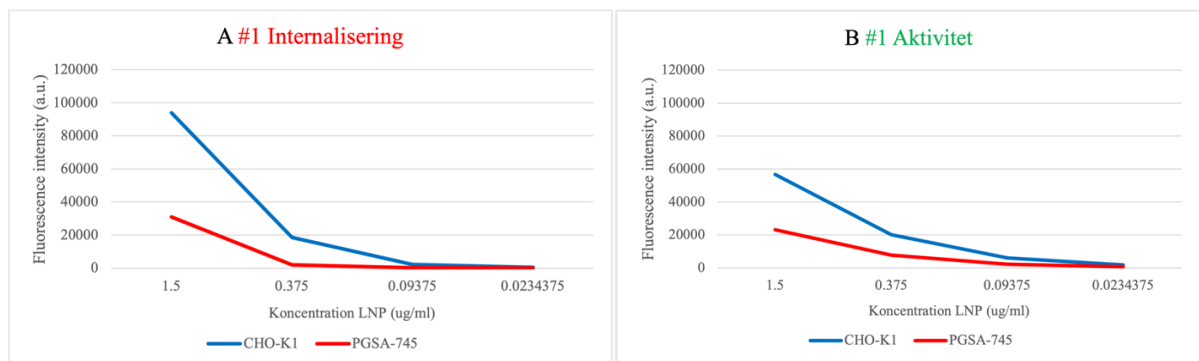
I figur 1 visas hur mycket fluorescens som kan mätas vid en viss koncentration LNP (se figur 1). Målet var att undersöka hur de två olika cellinjernas internalisering av mRNA och aktivitet i cellen påverkas av olika koncentrationer av LNP. Vi observerar då att samtliga staplar sjunker med minskad koncentration LNP, det vill säga blir lägre ju längre åt höger i varje delfigur man tittar. Det indikerar att mängden internalisering samt aktivitet är beroende av koncentrationen av LNP som fanns i lösningen för respektive prov. Alltså minskar både internalisering och aktivitet i cellen med en minskad koncentration av LNP.



Figur 1A illustrerar hur olika koncentrationer av LNP ($\mu\text{g/ml}$) påverkar CHO-K1-cellernas upptag av mRNA (internalisering) samt uttryck av GFP (aktivitet) vid flödescytometri. 1B illustrerar hur olika koncentrationer av LNP ($\mu\text{g/ml}$) påverkar PGSA-745-cellernas upptag av mRNA (internalisering) samt uttryck av GFP (aktivitet) vid flödescytometri. I A och B är Y-axeln fluorescence intensity (u.a) och X-axeln visar koncentrationen av LNP som tillsatts till cellerna. De svarta sträcken symboliserar standardavvikelsen för varje enskilt prov.

Jämförelse av cellinjernas mRNA-internalisering samt aktivitet vid olika LNP koncentrationer

Vidare kan vi se en direkt jämförelse av de båda celltypernas fluorescens både vad gäller internalisering av mRNA (se figur 2A) och aktiviteten (se figur 2B). De blåa linjerna, vilka representerar *wild type*, tenderar att ha ett högre värde på y-axeln än de **röda** linjerna, vilka representerar mutanten, för samma x-värde. För en viss koncentration LNP ges både en högre internalisering och en högre aktivitet hos *wild type* jämfört med mutanten. Det visar på att de muterade cellerna som saknar HSPGs negativa laddningar har en sämre internalisering och aktivitet i cellen, än *wild type* som har de negativa laddningarna på cellytan, för en given koncentration av LNP.



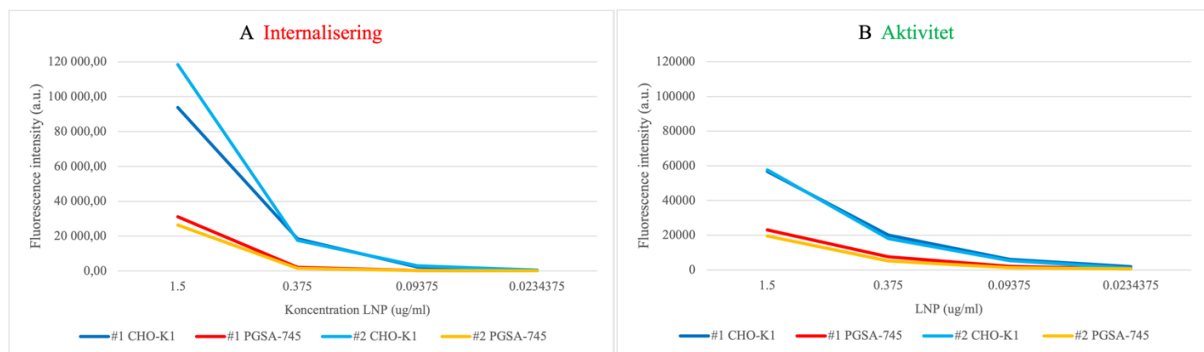
Figur 2A jämför de olika celltyperna CHO-K1 och PGSA-745 sett till deras förmåga att ta upp mRNA (internalisering) vilken mäts som Cy5, och 2B jämför aktiviteten i cellen vilken mäts som GFP (aktiviteten), beroende på koncentrationen av LNP ($\mu\text{g/ml}$) som tillsatts till cellerna. Detta mäts i fluorescence intensity (a.u.) som visas på y-axeln.

Sammanställning av experiment 1 och 2

I figur 3A jämförs upptaget av mRNA för de båda celltyperna, det vill säga internaliseringen, i de båda experimenten som genomförts (se figur 3). De båda blåa linjerna, som symboliserar cellinjen CHO-K1, följer varandra mer eller mindre i både lutning och form, och detsamma gäller för den röda och gula linjen som visar upptaget hos PGSA-745. De båda experimenten ger alltså samma förändring i upptag av mRNA, där det gemensamma är att mRNA-upptaget sjunker med lägre koncentration LNP. Vid jämförelse dem emellan ser vi också en stor skillnad mellan de båda celltyperna, där CHO-K1 verkar ha högre upptag av mRNA för samtliga koncentrationer.

I figur 3B ser vi en sammanställning av de båda experimenten sett till aktiviteten, det vill säga uttrycket av GFP, beroende på celltyp och koncentration LNP. Vid jämförelse av hur mycket aktivitet som fanns vid olika koncentrationer för CHO-K1 vid de båda experimenten, det vill

såga de båda blåa linjerna, ser resultatet i princip likadant ut. Detsamma gäller för PGSA-745 i de båda experimenten, det vill säga den gula och den röda linjen. Att linjerna för experiment 1 och 2 ligger så nära varandra och dessutom har liknande lutningar, visar på att vi fått likvärdiga resultat i båda experimenten. Vid jämförelse mellan de båda celltyperna ser vi, likt internaliseringen, att även aktiviteten verkar vara högre för *wild type* än för mutanten, för samtliga koncentrationer av LNP.



Figur 3A jämför de olika celltyperna CHO-K1 och PGSA-745 från både experiment 1 och 2 sett till deras förmåga att ta upp mRNA (internalisering), samt i 3B dess uttryck av GFP (aktivitet), beroende på koncentrationen av LNP ($\mu\text{g/ml}$) som tillsatts till cellerna. Detta mäts i fluorescence intensity (a.u.) som visas på y-axeln. Siffran som står efter # symboliserar vilket av experimenten datan är hämtad ur, både för CHO-K1 och för PGSA-745.

Diskussion

Sammanfattning av fynd

Vårt resultat visar på att högre koncentrationer av LNP innebär större internalisering och aktivitet i cellen, oberoende av celltyp. Vi ser dessutom att de negativa laddningarna i HSPG verkar främja upptaget av LNP, eftersom *wild type* har högre fluorescens än mutanten som helt saknar de negativa laddningarna. Mutanten har lägre aktivitet än *wild type*, vilket antingen kan bero på det lägre upptaget av LNP, eller att även utsläppet till cytosolen påverkas av HSPGs negativa laddningar. Så väl Cy5 som GFP är högre i CHO-K1, vilket indikerar att både upptaget av LNP in till cellen och utsläppet av mRNA till cytosolen skulle kunna gynnas av de negativa laddningarna. Det verkar alltså som både internaliseringen och aktiviteten påverkas av de negativa laddningarna, som saknas hos mutanten.

Vårt resultat tyder alltså på att HSPG och dess negativa laddningar underlättar för LDL-receptorn vid upptaget av LNP, men även för förstöringen av endosomen. Däremot ser vi att de negativa laddningarna inte är en förutsättning för att kunna internalisera LNP, eftersom vi får fluorescens av både Cy5 och GFP även hos mutanterna vid hög koncentration av LNP. Detta innebär att de negativa laddningarna verkar öka effektiviteten vid internalisering av

LNP, men att de inte är en förutsättning för att processen ska kunna genomföras. Det skulle också kunna innebära att det finns andra mekanismer för internaliseringen av LNP som inte är kopplade till LDL-receptorn över huvud taget. Sådana mekanismer hade kunnat vara upptag genom makropinocytos eller upptag genom endocytos med hjälp av scavenger-receptorer (2, 5).

En egen teori kring varför vi har fått det resultat vi har fått, det vill säga att framför allt upptaget till cellen gynnas av de negativa laddningarna, baseras på olika elektrostatiske laddningar och dess attraherande krafter till varandra. HSPG sitter på cellytan och agerar som ko-receptor till LDL-receptorn. HSPGs starka negativa laddningar attraherar LNP som är positivt laddade på grund av de joniserbara lipiderna. Detta gör att det kan tas upp en större mängd LNP, eftersom de attraherande krafterna gör att de når cellytan och på så sätt kan fångas in av LDL-receptorerna. HSPG effektiviserar alltså inbindningen av LNP till LDL-receptorn på cellytan. Därför kan de negativa laddningarna leda till en ökad internalisering.

När LNP har bundit in till LDL-receptorn endocyteras hela detta komplex och bildar, genom det endolysosomal systemet, en endosom. I endosomen pumpar V-ATPaset in protoner (H^+) och skapar därför en sur miljö, vilket i sin tur gör att de joniserbara lipiderna i LNP får en starkare positiv laddning. Eftersom HSPG, som sitter på endosomens intralumenala membran, har starkt negativa laddningar innebär detta att LNP som är positivt laddat, kan binda till HSPGs negativa laddningar. Den här starka bindningen leder till ruptur av endosomens membran genom att membranets lipidbindningar destabiliseras, och på så sätt sker ett utsläpp av mRNA. Därmed skulle HSPGs negativa laddningar kunna gynna även aktiviteten i cellen, vilket vi ser tendenser till i vårt resultat.

Koppling till tidigare studier

En nyligen publicerad studie kring regleringen av mRNAs upptag till celler i terapeutiskt syfte har konstaterat att HSPG är en mediator. Denna studie gjordes med hjälp av *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) för att kartlägga de proteiner som hade en påverkan vid upptaget samt frisättningen av LNP från endosomen ut till cytosolen. I enlighet med vårt resultat har även det i den tidigare studien visat att HSPG som ko-receptor ökar upptaget av LNP till cellen. De kunde även identifiera vikten av ett ubiquitinligas, TRIM25, som kunde aktiveras vid ett lågt pH och då minska mRNAs effekt i cellen. Vidare kunde detta undvikas om mRNA modifierades på specifika sätt. Samtliga fynd från denna studie ökar förståelsen kring hur framtidens mRNA terapi skall utformas (11).

Styrkor, svagheter och begränsningar

En styrka med vår studie är att den genomfördes två gånger, och då med identisk metod båda gångerna. Detta gör att risken för felkällor minskar kraftigt jämfört med att endast genomföra det laborativa en gång. Att få två på varandra följande resultat där samma slutsats kan dras är en styrka ur ett tillförlitlighetsperspektiv.

Att studien genomfördes endast två gånger kan också ses som en begränsning. Det hade krävts ett tredje experiment för att statistiskt kunna analysera datan med t-test, och därmed få ut signifikans. Detta är avgörande för att kunna avgöra reproducerbarhet och även med hjälp av p-värdet kunna bestämma signifikansen för resultatet. Det optimala hade därför varit att genomföra allting en tredje, och kanske även en fjärde gång. Vi hade tyvärr inte möjlighet att upprepa metoden mer än en gång, på grund av den begränsade tiden för projektet. Om vi hade genomfört allting igen och med mer tid hade vi gärna sett att experimentet utfördes en tredje gång just för att kunna göra ett t-test.

Att det gjordes dubletter för samtliga prov inför flödescytopmetrin, för varje LNP-koncentration och för kontrollerna, är ytterligare en styrka med studien. Att testa två prover som behandlats på exakt samma sätt för varje mätning, och sedan ta ett medelvärde på dessa, ökar också trovärdigheten i resultatet. Det ökar sannolikheten för att ett tredje prov, om ett sådant skulle tas, också skulle ge ett liknande värde, eftersom vi nu har anpassat efter två olika värden istället för bara ett. Risken för felkällor så som kontamination och liknande minskar vid dubbel mätning av varje enskild del.

Studien blir däremot begränsad i hur långt man kan dra kliniska slutsatser utifrån resultatet. Detta eftersom studien endast behandlade cellinjer med ursprung i kinesiska hamstrar, och då specifikt ovarieceller. Mer kunskap kring hur dessa celler skiljer sig från övriga celler i hamstern, och också från mänskliga celler behövs för att studien ska kunna få ett brett användningsområde kopplat till terapeutiskt bruk.

Felkällor

En viktig faktor som skulle kunna ha en negativ påverkan på resultatet, eller till och med ge en något felaktig bild av hur verkligheten ser ut, är att det i några av proverna fanns för få celler. Vi valde att ställa in flödescytopmetern på att mäta fluorescensen på 5000 celler för varje prov, men i några av proven kom antalet mätta celler endast upp till ca 1000 st. Det påverkar i sin tur mängden fluorescens som mättes ur provet. Det skulle till exempel kunna bero på att

det fanns för få celler vid starten i just det provet, och att en stor del av dem då tvättades bort i samband med PBS som skulle tvätta cellerna. Även tillsatsen av trypsin, ett enzym som förstör cellförbindelserna och därmed får cellerna att lossna från ytan på brunnen inför flödescytometern, skulle eventuellt kunna skada cellerna. Enzymet är ett proteas som dessutom skulle kunna förstöra andra komponenter av cellerna än de initialt avsedda. Ytterligare en faktor som kan påverka om cellerna är känsliga är att någon vätska, så som medium eller spädningen, pipetterades ner för hårt och snabbt mot cellerna som då skulle kunna förstöras. Alla dessa faktorer skulle kunna ha en inverkan i de prover som i slutändan hade för få celler att mäta.

För att undvika denna felkälla hade vi kunnat ställa in flödescytometern på ett lägre antal celler, som då täcks samtliga prover. Samtidigt ger ett lägre antal celler en mindre bred undersökning och därmed ett resultat som är svårare att dra en generell slutsats från.

En annan felkälla är att ett av kontrollproverna i andra experimentet på något sätt blev mätt på fel sätt i flödescytometern. Det kan handla om att inställningarna inte var korrekt inställda, eller att provet inte mixades ordentligt på vortexmixern innan mätningen. Resultatet blev siffror för fluorescensen som inte alls stämde överens med varken det första experimentet, den andra kontrollen i samma experiment som behandlats på samma sätt under odling och tillväxt, eller det förväntade resultatet. Därför valde vi att utesluta detta värde i sammanställningen av samtliga resultat från det andra experimentet, och endast utgå från det andra kontrollprovet som fungerade som det skulle. Det fanns alltså ingen dubblett för denna kontroll, vilket är en svaghet och något som påverkar trovärdigheten i resultatet.

Det bästa vi hade kunnat göra i det här läget för att inte basera kontrollens värde på endast en av proverna i dubbletten hade varit att göra om hela experimentet en gång till. Då hade vi förhoppningsvis lyckats få ett rimligt värde på båda kontrollerna, och sedan kunnat ta ett medelvärde precis som tanken var. Däremot hade vi inte den tiden under projektarbetet, utan fick lösa det så bra som möjligt utifrån våra förutsättningar.

Förslag på framtida forskning

För att lyfta vårt resultat vidare hade man kunnat göra en bredare studie där mänskliga celler undersöktes utifrån samma frågeställning. Att veta hur de starka negativa laddningarna på HSPG påverkar upptaget av nanopartikelns innehåll i människor är avgörande för att kunna administrera läkemedel på ett så effektivt sätt som möjligt. Att veta exakt hur de negativa

laddningarna påverkar upptaget in till cellen är avgörande för att kunna administrera rätt doser för framtidens mRNA-läkemedel, och därmed undvika toxicitet.

Ett rimligt första steg i den vidare forskningen är därför samma typ av studie för människans celler, som då ger en bredare och mer användbar slutsats. Därefter skulle forskning kunna göras med specifika mRNA-läkemedel i nanopartikeln, för att se om läkemedlen i sig också påverkar upptaget till cytosolen. Det skulle kunna leda till en stor utveckling inom läkemedelsadministrering och därmed långsiktigt den globala hälsan.

Svar på syfte och frågeställning

Syftet med studien var att undersöka hur HSPGs negativa laddningar påverkar upptaget av mRNA från LNP in i cellen, samt utsläppet till cytosolen. I resultatet ser vi att *wild type* som har de negativa laddningarna uppmäter en högre nivå av både Cy5 och GFP, det vill säga tar upp LNP och frigör dess mRNA, i mycket högre utsträckning än vad mutanten som saknar laddningarna gör, för varje given koncentration av LNP.

Frågeställningen kopplad till studien ifrågasätter huruvida LNP har lättare att göra sönder endosomens membran utan de starka negativa laddningarna i HSPG som eventuellt skulle kunna påverka utsläppet. Samtliga resultat tyder på att internaliseringen av mRNA så väl som utsläppet i cytosolen som kommer till uttryck som GFP, är högre för *wild type* än för mutanten. Eftersom skillnaden mellan mutanten och PGSA-745 är just de negativa laddningarna, besvaras frågeställningen med ett nej; resultatet tyder på att LNP tas upp och frigör sitt mRNA i större utsträckning i närvaro av HSPGs negativa laddningar.

Deklaration av arbetsfördelning

Sigrid och Mina har under hela processen fördelat arbetet jämnt, i så väl det laborativa som skrivandet. Båda författarna känner sig delaktiga i projektarbetet, och har bidragit lika mycket till den slutgiltiga produkten.

När vi startade vårt laborativa arbete var LNP redan fuserat med mRNA kodandes för GFP, som därmed direkt kunde tillsättas till mediet och sedan cellerna. Detsamma gäller för ApoE3-lösningen, som redan var förberedd.

Ett avslutande tack

Vi vill rikta ett stort tack till Wesley Sturgess som har varit till stor hjälp under den laborativa delen så väl som ett fint stöd i skrivandet. Det är vi mycket tacksamma för.

Vi vill även tacka vår handledare Anders Wittrup för ett bra samarbete längs hela processen.

Referenslista

1. Rang HP DM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang and Dale's Pharmacology. Edinburgh: Churchill Livingstone/ Elsevier; 2012.
2. Akinc A, Querbes W, De S, Qin J, Frank-Kamenetsky M, Jayaprakash KN, et al. Targeted Delivery of RNAi Therapeutics With Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms. *Molecular Therapy*. 2010;18(7):1357-64.
3. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(3):203-22.
4. Alameh MG, Tombácz I, Bettini E, Lederer K, Sittplangkoon C, Wilmore JR, et al. Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses. *Immunity*. 2021;54(12):2877-92.e7.
5. Hou X, Zaks T, Langer R, Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials*. 2021;6(12):1078-94.
6. Eygeris Y, Gupta M, Kim J, Sahay G. Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery. *Acc Chem Res*. 2022;55(1):2-12.
7. Hassett KJ, Higgins J, Woods A, Levy B, Xia Y, Hsiao CJ, et al. Impact of lipid nanoparticle size on mRNA vaccine immunogenicity. *Journal of Controlled Release*. 2021;335:237-46.
8. Goula D, Benoist C, Mantero S, Merlo G, Levi G, Demeneix BA. Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther*. 1998;5(9):1291-5.
9. Kim J, Eygeris Y, Gupta M, Sahay G. Self-assembled mRNA vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;170:83-112.
10. Suzuki Y, Ishihara H. Difference in the lipid nanoparticle technology employed in three approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 vaccine) drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2021;41:100424.

11. Kim M, Pyo Y, Hyun S-I, Jeong M, Choi Y, Kim VN. Exogenous RNA surveillance by proton-sensing TRIM25. *Science*. 2025;388(6742):eads4539.
12. Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:729-77.
13. Esko JD, Zhang L. Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. *Curr Opin Struct Biol*. 1996;6(5):663-70.
14. Lander AD. Proteoglycans: Master regulators of molecular encounter? *Matrix Biology*. 1998;17(7):465-72.
15. Esko JD, Selleck SB. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:435-71.
16. Gallagher JT. Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. *J Clin Invest*. 2001;108(3):357-61.
17. Alberts B JA, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K et al. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science; 2002.
18. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *Embo j*. 2011;30(17):3481-500.
19. Maxfield FR, Yamashiro DJ. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol*. 1987;225:189-98.
20. Wittrup A, Ai A, Liu X, Hamar P, Trifonova R, Charisse K, et al. Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nat Biotechnol*. 2015;33(8):870-6.
21. Jayaraman M, Ansell SM, Mui BL, Tam YK, Chen J, Du X, et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012;51(34):8529-33.
22. Kauffman KJ, Dorkin JR, Yang JH, Heartlein MW, DeRosa F, Mir FF, et al. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett*. 2015;15(11):7300-6.
23. Patel S, Ashwanikumar N, Robinson E, Xia Y, Mihai C, Griffith JP, 3rd, et al. Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA. *Nat Commun*. 2020;11(1):983.
24. Aliakbarinodehi N, Niederkofler S, Emilsson G, Parkkila P, Olsén E, Jing Y, et al. Time-Resolved Inspection of Ionizable Lipid-Facilitated Lipid Nanoparticle Disintegration and Cargo Release at an Early Endosomal Membrane Mimic. *ACS Nano*. 2024;18(34):22989-3000.

25. Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: A progress report on siRNA therapeutics. Nature Reviews Genetics. 2015;16(9):543-52.

Bilagor

	CHO-K1							
	FL1-A				FL4-A			
	Värden från flödescytometern	Värden minus bakgrundsfluorescens	Medelvärde	Standardavvikelse	Värden från flödescytometern	Värden minus bakgrundsfluorescens	Medelvärde	Standardavvikelse
Konc LNP								
0 (kontroll)	1 795,64				282,17			
0 (kontroll)	1 724,18		1759,91		280,88		281,525	
1,5	59 201,70	57 441,79			94 173,59	93892,065		
1,5	57 768,07	56 008,16	56724,975	1013,729495	94 007,71	93726,185	93809,125	117,2948729
0,375	24 982,16	23222,25			20 001,69	19720,165		
0,375	18 833,39	17073,48	20147,865	4347,836963	17 636,95	17355,425	18537,795	1672,12369
0,09375	7 089,58	5329,67			2 719,11	2437,585		
0,09375	8 599,55	6839,64	6084,655	1067,710026	2 537,67	2256,145	2346,865	128,2974544
0,0023475	3 776,98	2017,07			787,03	505,505		
0,00234375	3 394,58	1634,67	1825,87	270,3976331	850,88	569,355	537,43	45,14876798

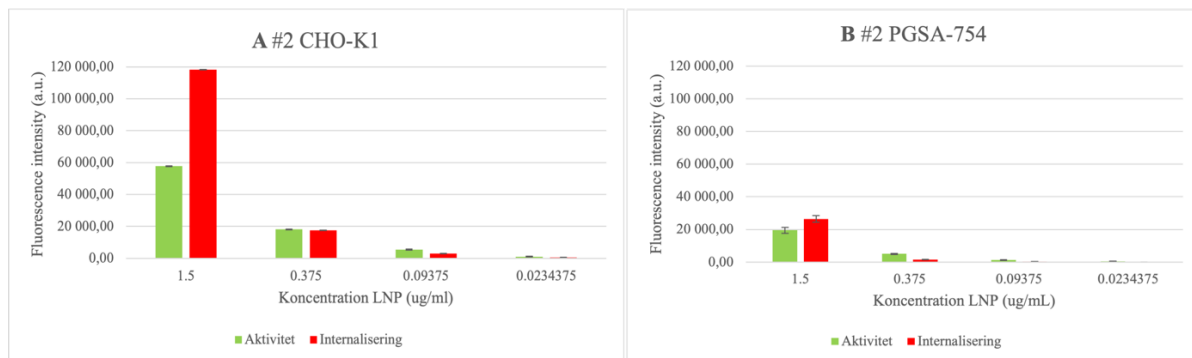
	PGSA-745							
	FL1-A				FL4-A			
	Värden från flödescytometern	Värden minus bakgrundsfluorescens	Medelvärde	Standardavvikelse	Värden från flödescytometern	Värden minus bakgrundsfluorescens	Medelvärde	Standardavvikelse
Konc LNP								
0 (kontroll)	1 541,84				260,07			
0 (kontroll)	1 591,75		1566,8		264,29		262,18	
1,5	24 210,71	22643,915			35 778,54	35516,36		
1,5	25 074,08	23507,285	23075,6	610,4947817	26 806,24	26544,06	31030,21	6344,374173
0,375	8 764,39	7197,595			2 305,92	2043,74		
0,375	9 615,20	8048,405	7623	601,6135205	2 351,09	2088,91	2066,325	31,94001331
0,09375	3 811,74	2244,945			559,49	297,31		
0,09375	3 458,05	1891,255	2068,1	250,0965974	562,94	300,76	299,035	2,439518395
0,0023475	2 170,29	603,495			352,09	89,91		
0,00234375	2 217,13	650,335	626,915	33,12088163	341,8	79,62	84,765	7,276128778

Tabell 2 sammanställer flödescytometri-analysen för celltyperna CHO-K1 och PGSA-745, från experiment 1. Datan avser medelvärde av fluorescence intensity (a.u.), samma värden fast där man tagit hänsyn till bakgrunds-fluorescensen som finns oberoende av LNP, medelvärde för de två dubletterna vid varje koncentration LNP, samt standardavvikelse för varje prov. Datan används i samtliga figurer för experiment 1.

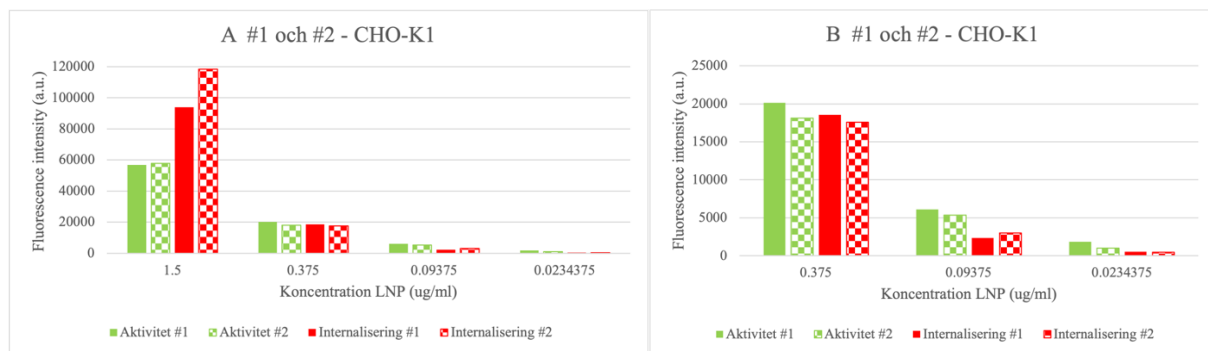
	CHO-K1							
	FL1-A				FL4-A			
	Värden från flödescytometern	Värden minus bakgrundsfluorescens	Medelvärde	Standardavvikelse	Värden från flödescytometern	Värden minus bakgrundsfluorescens	Medelvärde	Standardavvikelse
Konc LNP								
0 (kontroll)	2 179,68				335,96			
0 (kontroll)	2 619,13		2179,68		240,92		335,96	
1,5	55 715,49	53 535,81			86 304,43	85968,47		
1,5	64 147,28	61 967,60	57 751,71	5962,175887	151 080,53	150744,57	118356,52	45803,61957
0,375	18 535,36	16 355,68			14 336,99	14001,03		
0,375	22 059,41	19 879,73	18117,705	2491,879652	21 528,54	21192,58	17596,805	5085,193772
0,09375	6 453,44	4 273,76			3 180,19	2844,23		
0,09375	8 645,81	6 466,13	5369,945	1550,239694	3 460,51	3124,55	2984,39	198,2161729
0,0023475	3 355,64	1 175,96			811,56	475,6		
0,00234375	3 054,50	874,82	1025,39	212,9381361	758,25	422,29	448,945	37,69586251

	PGSA-745							
	FL1-A				FL4-A			
	Värden från flödescytometern	Värden minus bakgrundsfluorescens	Medelvärde	Standardavvikelse	Värden från flödescytometern	Värden minus bakgrundsfluorescens	Medelvärde	Standardavvikelse
Konc LNP								
0 (kontroll)	1 499,59				259,18			
0 (kontroll)	1 638,40		1568,995		269,91		264,545	
1,5	22 317,13	20 748,14			28 066,31	27801,765		
1,5	19 816,41	18 247,42	19497,775	1768,27607	25 294,14	25029,595	26415,68	1960,220206
0,375	6 424,52	4 855,53			1 704,77	1440,225		
0,375	6 857,39	5 288,40	5071,96	306,0853124	1 965,74	1701,195	1570,71	184,5336567
0,09375	2 996,40	1 427,41			619,4	354,855		
0,09375	2 693,19	1 124,20	1275,8	214,4018471	563,9	299,355	327,105	39,24442636
0,0023475	2 095,94	526,95			333,62	69,075		
0,00234375	2 021,64	452,65	489,795	52,53803384	325,82	61,275	65,175	5,515432893

Tabell 3 sammanställer flödescytometri-analysen för celltyperna CHO-K1 och PGSA-745, från experiment 2. Datan avser medelvärde av fluorescence intensity (a.u.), samma värden fast där man tagit hänsyn till bakgrunds-fluorescensen som finns oberoende av LNP, medelvärde för de två dubletterna vid varje koncentration LNP, samt standardavvikelse för varje prov. Datan används i samtliga figurer för experiment 2.



Figur 4A illustrerar hur olika koncentrationer av LNP ($\mu\text{g/ml}$) påverkar CHO-K1-cellernas upptag av mRNA (internalisering) samt uttryck av GFP (aktivitet) vid flödescytometri under experiment 2. Figur B visar samma förhållanden för PGSA-745-cellerna. Y-axeln visar fluorescence intensity (a.u.) och X-axeln visar koncentrationen av LNP som tillsatts till cellerna. De svarta sträcken symboliserar standardavvikelsen för varje enskilt prov.



Figur 5A jämför de båda experimenten för CHO-K1 sett till dess förmåga att ta upp mRNA (internalisering), samt att uttrycka GFP (aktivitet), beroende på koncentrationen av LNP ($\mu\text{g/ml}$) som tillsatts till cellerna. Figur B visar samma förhållanden för PGSA-745-cellerna. Detta mäts i fluorescence intensity (a.u.) som visas på y-axeln. Den högsta koncentrationen som användes; 1,5 $\mu\text{g/ml}$, är i figur 5B borttagen för att tydliggöra skillnaden i upptag och uttryck vid sjunkande koncentration av LNP. Siffran som står efter # symboliserar vilket av experimenten datan är hämtad ur.