

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kairit Kukk

**Vähkipenetreerivate peptiidide *in vitro* interaktsioonid kasside ja koerte spontaansete kasvajatega**

Magistritöö

Juhendajad:

Professor Tambet Teesalu

Professor Margus Pooga

TARTU 2014

## SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. T7 faagidisplei .....	7
1.2. Vähipenetreerivad peptiidid .....	8
1.3. Vähipenetreerivate peptiidide retseptorid.....	12
1.4. Kassidel ja koertel esinevad vähkkasvajad.....	13
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	16
2.1. Töö eesmärgid .....	16
2.2. Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1. Faagide amplifitseerimine, puhastamine ja tiitrimine .....	18
2.2.2. Faagide <i>in vitro</i> seundumiskatsed .....	19
2.2.3. Faagide <i>ex vivo</i> sisenemiskatsed .....	20
2.2.3.1. Faagide <i>ex vivo</i> sisenemiskatsed koos happesuga .....	20
2.2.4. Faagide tuvastamine koes immunofluorestsentsmeetodil .....	21
2.2.5. Kasvajast pärinevate rakkude kultiveerimine <i>in vitro</i> .....	21
2.2.5.1. Tuumorirakkude kasvatamine sferoididena.....	22
2.2.5.2. Sferoidide dissotsieerimine .....	22
2.2.5.3. FACS analüüs kasvajarakkude intra- ja ekstratsellulaarsete molekulide tuvastamiseks.....	23
2.2.6. Loomkatsed .....	24
2.3. Tulemused .....	24
2.4. Arutelu ja järeldused.....	33
KOKKUVÕTE .....	36
SUMMARY .....	38
TÄNUAVALDUSED.....	40
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU .....	41
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	51
LISAD .....	52
Lisa 1. Loomkatse läbiviimise luba.....	52

Lisa 2. <i>In vitro</i> seandumiskatsete tulemused.....	54
Lisa 3. FACS analüüsi tulemused.....	58
Lisa 4. Lihtlitsents .....	60

## KASUTATUD LÜHENDID

bFGF	aluseline fibroblasti kasvufaktor (ingl <i>basic fibroblast growth factor</i> )
CendR	C-lõpu reegel (ingl <i>C-end rule</i> )
C1qbp	komplement 1q-d siduv valk (ingl <i>complement 1q-binding protein</i> )
ECM	ekstratsellulaarne maatriks (ingl <i>extracellular matrix</i> )
EGF	epidermaalne kasvufaktor (ingl <i>epidermal growth factor</i> )
FSC-A	otsehajuvus (ingl <i>forward light scatter</i> )
gC1qR	globulaarse pea domäänide komplement 1q retseptor (ingl <i>receptor for globular head domains complement 1q</i> )
HABP1	hüaluroonhapet siduv valk 1 (ingl <i>hyaluronan-binding protein 1</i> )
NRP-1	neuropiliin-1 (ingl <i>neuropilin-1</i> )
OCT	külmutussegu (ingl <i>optimal cutting temperature compound</i> )
PFU	faagilaiku moodustav ühik (ingl <i>plaque-forming unit</i> )
PPC-1	primaarne eesnäärme kartsinoomi rakuliin 1 (ingl <i>primary prostatic carcinoma cell line-1</i> )
SSC-A	külghajuvus (ingl <i>side light scatter</i> )
VEGF	vaskulaarne endoteliaalne kasvufaktor (ingl <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VPP	vähkipenetreeriv peptiid (ingl <i>tumor penetrating peptide</i> )

## SISSEJUHATUS

Pahaloomulised kasvaja on kardiovaskulaarsete haiguste järel nii Eestis kui ka mujal Euroopa riikides sageduselt teiseks suremuse põhjuseks (Eigo *et al.*, 2013). Kasvajate puhul on oluline kasvaja avastamine võimalikult varajases staadiumis ning efektiivne ravi (Smith *et al.*, 2010, Marberger *et al.*, 2012). Vaid väikene osa manustatud vähiravimist jõuab vähikoosse ja -rakkudeni (Heldin *et al.*, 2004, Sugahara *et al.*, 2010, Alberici *et al.*, 2012). Enamikul juhtudel levivad vähivastased ravimid veresoontest vaid 3–5 raku diameetri kaugusele, mis vähendab ravimi tõhusust ning võib kaasa aidata ravimresistentsuse kujunemisele (Sugahara *et al.*, 2010). Ravimi jõudmine ajukasvajatesse on piiratud veel lisaks hematoentsefaalbarjääriga (Béduneau *et al.*, 2007, Liu ja Lu 2012). Vähiravimite kahjustav toime normaalsetele rakkudele seab piirangu ohutult manustatava ravimi doosile (Sugahara *et al.*, 2010).

Üks võimalus vähiravimite efektiivsemaks muutmiseks on kasutada kullermolekule, mis seonduvad kasvajakoes üle-ekspresseeritud sihtmärkidega (Wang *et al.*, 2011). Ravimite viimiseks kasvajakoe parenhüümi kasutatakse vähkipenetreerivaid peptiide (ingl *tumor-penetrating peptides*, VPP), mis põhjustavad vähiveresoonte permeaabluse ajutist suurenemist. VPP manustamisel koos ravimi või ravimite kombinatsioonidega levivad nii peptiid kui ravimid kasvaja veresoontest välja. Tulemuseks on ravimi akumulatsioon vähikoes, suurenenud vähivastane toime ning väiksemad kõrvaltoimed (Teesalu *et al.*, 2009, Sugahara *et al.*, 2010).

Käesoleva töö eesmärgid olid:

1. Selgitada, kas laborihiirte vähimudelites väljatöötatud VPP-d omavad vähiselektiivsust ka kasside ja koerte spontaansetel kasvajatel;
2. Võrrelda, kas VPP-d oma pinnal eksponeerivate faagide seostumine ja penetratsioon toimuvad sarnaselt koeralt pärit ja koekultuuri viidud piimanäärme vähirakkudel ja sama kasvajakoe homogeniseerimisel saadud rakususpensioonil;
3. Uurida, kas koeralt pärit ja koekultuuri viidud piimanäärme vähirakud on võimelised indutseerima hiire vähkkasvajat, moodustama kolmedimensionaalselt kasvavaid sferoide, ekspresseerivad neuropiliin-1 valku ning on kas epiteliaalset või mesenhümaalset päritolu.

Käesolevas lõputöös kasutati uurimismeetoditena faagidispleid, kahe- ja kolmedimensionaalset kasvajakude kultiveerimist, voolutsütomeetrilist analüüsi ning immunofluorestsentsi. Uurimistöö tulemused aitavad kaasa VPP-de prekliinilisele validatsioonile ning võivad aidata kaasa vähiravi täiustumisele. Kasutades antud lõputöö eksperimentide tulemusi, on eetikakomiteesse esitatud avaldus katsetada uuritavaid faage vähihaigetel terminaalsetel koertel.

Uurimistöö viidi läbi Tartu Ülikooli vähibioloogia laboris.

Märksõnad: faagidisplei, vähkipenetreerivad peptiidid (VPP), neuropiliin-1, vähi angiogenees, kasside ja koerte spontaansed vähkkasvajad.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

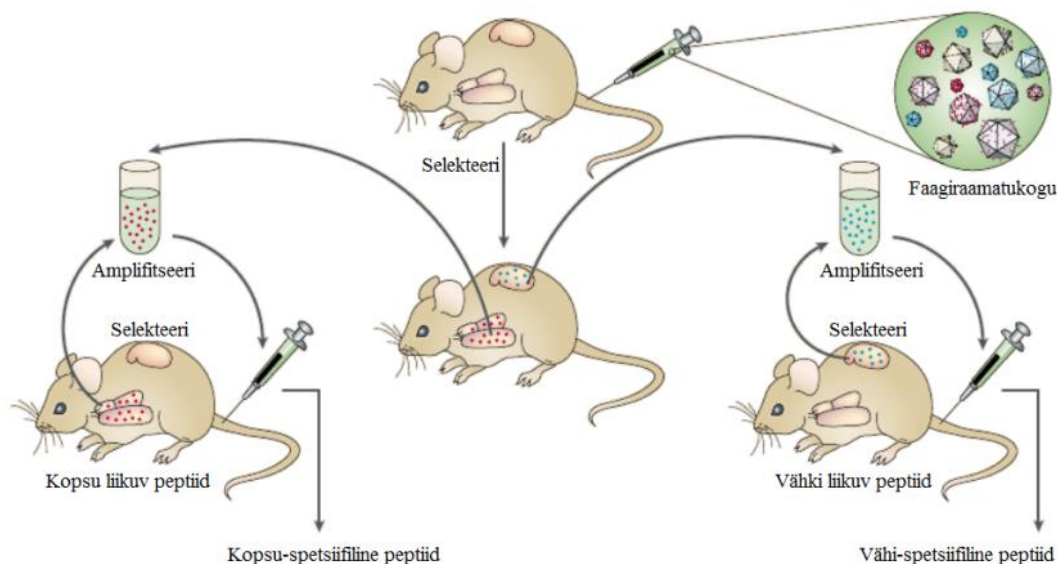
## 1.1. T7 faagidisplei

Bakteriofaagid (faagid) on bakteriviirused, mis paljunevad bakterirakkudes (Mc Grath ja van Sinderen, 2007). Nad on äärmiselt heterogeensed, varieerudes peremeesorganismide, geneetika, reguleerivate mehhanismide ja füsioloogia poolest (Brown *et al.*, 1971, Hatfull ja Sarkis, 1993, Miller *et al.*, 2003, Feiss ja Catalano 2005, Mc Grath ja van Sinderen, 2007). Faagid jagunevad vastavalt oma paljunemisstrateegiale kahte rühma – virulentsed ja mõõdukad faagid. Virulentsed faagid põhjustavad nakatunud bakteriraku lüüsumist (lüütiline elutsükkel), kuid mõõdukad faagid võivad kas integreeruda peremehe genoomi profaagina ilma virione moodustamata ning replitseeruda koos bakterirakkudega (lüsogeenne elutsükkel) või lüütiliste geenide aktivatsioonil paljunedes lüütilise tsükli teel (Bradley, 1967, Mc Grath ja van Sinderen, 2007). Morfoloogia alusel võib jaotada faagid neljaks põhitüübiks – sabaga (nt T-faagid ja faag lambda), ikosaeedrilised (nt  $\Phi$ X174), filamentsed (nt f1 ja fd) või pleomorfsed faagid (nt L2; Ackermann, 2012). Faagidisplei kontseptsioon pakuti välja esmakordselt 1985. aastal, kui George Smith näitas, et filamentsete faagide kapsiidivalke kodeerivaid gene on võimalik muuta nii, et tulemuseks on faagipartikli pinnal võõraste aminohappeliste järjestuste eksponeerimine (Smith, 1985).

Faagidisplei raamatukogu on segu erinevatest faagi kloonidest, kus iga faag ekspresseerib cDNA poolt kodeeritud valgu fragmenti või erinevat peptiidset järjestust (Smith ja Petrenko, 1997, Ruoslahti, 2004). Raamatukogus on tagatud otsene seos fenotüübi, milleks on faagipartiklite pinnal eksponeeritavad peptiidid, ja genotüübi, milleks on kodeeritud DNA, vahel (Smith ja Petrenko, 1997). Faagiraamatukogud võivad sisaldada miljardeid erinevaid kloone. Ruoslahti uurimisgrupp hakkas kasutama *in vivo* faagiraamatukogu skriiningut, et uurida elus katseloomadel kudede ja vähispetsiifilise veresoonkonna omadusi ning tuvastada vähiveresoontega selektiivselt seostuvaid peptiide (Arap *et al.*, 1998, Ruoslahti, 2004; joonis 1). Need ja paljud järgnevad uuringud näitasid, et *in vivo* faagidispleiga leitud peptiide saab kasutada koespetsiifilises diagnostikas ja ravis (Rajotte *et al.*, 1998, Ruoslahti, 2002).

*In vivo* faagidisplei vektorina rakendatakse suuremas osas faag T7, mis on lüütiline faag ja millel on võrreldes filamentse faagiga vähem piiranguid seoses eksponeeritavate peptiidide

järjestustega. Lisaks sellele eelistatakse faag T7 tänu tema suhteliselt lihtsalt teostatavatele manipulatsioonidele ning seetõttu, et T7 partiklid on füüsiliselt sarnased kliiniliselt kasutatavate nanoosakestega. Võõrpeptiide ekspresseeritakse faag T7 kapsiidivalgu 10A C-terminaalse liitvalguna (Teesalu *et al.*, 2012). Faag T7 replitseerub kiiremini kui filamentne faag, nakatatud bakterikultuur lüüsub 1–2 tundi pärast infektsiooni algust ning faagilaigud moodustuvad 37 °C juures kolme tunni jooksul (Rosenberg *et al.*, 1996).



**Joonis 1. *In vivo* faagidisplei kasutamine vähiselektiivsete peptiidide leidmiseks.** Esmalt süstitakse faagiraamatukogu hiire sabaveeni. Kapsiidi pinnal unikaalset peptiidi eksponeeriv faag seondub spetsiifiliselt kopsu veresoontel ekspresseeritava retseptoriga. Seejärel sihtmärkkude eemaldatakse, faagid amplifitseeritakse ning korratakse katset saadud faagidega. Koespetsiifilise faagi DNA sekveneerimise teel tehakse kindlaks peptiide kodeerivad järjestused (Ruoslahti, 2002 järgi).

## 1.2. Vähipenetreerivad peptiidid

Endoteelirakud katavad vere- ja lümfisoonte sisepindu. Endoteelil on keskne roll kudede homöostaasis, fibrinolüüsis, koagulatsioonis, vere- ja kudede vahelises ainevahetuses, uute veresoonte moodustumisel ning immuunrakkude aktivatsioonil ja migratsioonil (Brown *et al.*, 2000). Lümfisoontes paiknevad endoteelirakud ekspresseerivad lümfotsüütide adhesioonimolekule (Zhu ja Pauli 1991, Ruoslahti, 2004). Samamoodi ekspresseerivad mittelümfoidsete kudede veresoones spetsiifilisi markereid ja unikaalset molekulaarset ekspressioonimustrit, mis sõltub endoteeli ümbritseva koe tüübist ja seisundist (Zhu ja Pauli 1991, Ruoslahti, 2002, Ruoslahti, 2004).

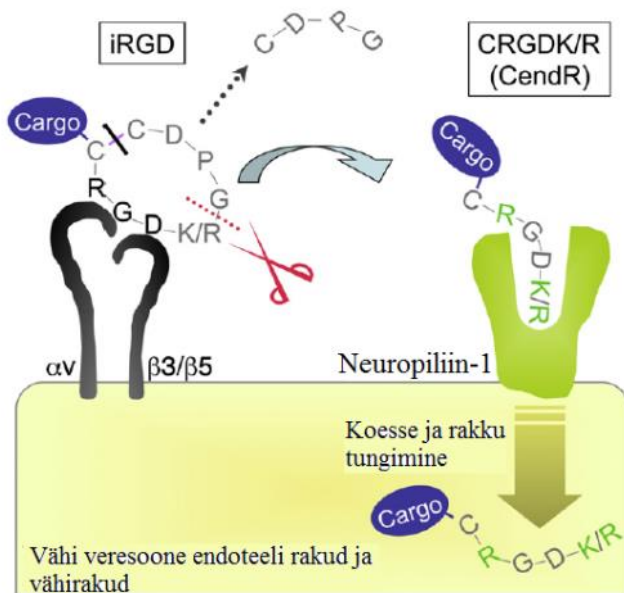
Tuumor vajab kasvamiseks ja metastaseerumiseks verevarustust, mille kaudu liiguvad hapnik, toit- ja jääkained ning erinevad keemilised molekulid. Uute veresoonte moodustumist nimetatakse angiogeneesiks (Folkman, 1971) ning vähiveresooned erinevad normaalsetest veresoontest nii morfoloogilisel kui molekulaarsel tasemel (Ruoslahti, 2002, Ruoslahti, 2004, Yasuda, 2008). Tahkete kasvajate veresooned on ebaregulaarse kujuga, läbilaskvad, väänlevad, omavad arterio-venoosseid šunte, mittetäielikku basaalmembraani ja on ümbritsetud ebanormaalsete endoteelirakkudega (Yasuda, 2008). Aktiveeritud endoteelirakud ja peritsüüdid ekspresseerivad angiogeneesi käigus molekule, mida tavaliselt ei ekspresseerita üldse või ekspresseeritakse palju madalamal tasemel. Vähi lümfisoonte endoteelirakud ekspresseerivad vähispetsiifilisi markerimolekule (Ruoslahti, 2002, Ruoslahti, 2004). *In vivo* faagidisplei abil on võimalik neid molekulaarseid erinevusi kaardistada (Arap *et al.*, 1998). Angiogeneesi käigus on üle-ekspresseeritud näiteks vaskulaarsed endoteliaalsed kasvufaktorid (ingl *vascular endothelial growth factor*, VEGF; Senger *et al.*, 1997) ja integriinid (Brooks *et al.*, 1994, Senger *et al.*, 1997, Erdreich-Epstein *et al.*, 2000).

Teesalu ja kolleegide poolt avastatud VPP-d kutsuvad esile veresoonte leket ning penetratsiooni koesse. Penetratsiooni põhjustavaks lülitiks on polüpeptiidiahela C-terminaalses otsas paiknev R/KXXR/K motiiv, millest tuleneb ka termin C-lõpu reegel (ingl *C-end rule*, CendR).

CendR põhiomadusteks on:

1. R/KXXR/K äratundmismotiiv;
2. Motiivi aktiivsuseks vajalik asumine peptiidi C-terminaalses otsas;
3. Krüptiliste CendR motiivide proteolüütiline aktivatsioon;
4. Neuropiliin-1 (NRP-1) retseptorist sõltuv peptiidi äratundmine ja penetratsioonivõime (joonis 2; Teesalu *et al.*, 2009).

Süsteemselt manustatud vähiselektiivne CendR peptiid iRGD põhjustab vähiveresoonte läbilaskvuse ajutist (15 minutit kuni 2 tundi) suurenemist, kuid ei mõjuta normaalsete kudede veresoonte omadusi. iRGD manustamisel koos ravimi(te)ga levivad mõlemad veresoonest välja ning tulemuseks on ravimi akumulatsioon vähikoes (Teesalu *et al.* 2009, Sugahara *et al.*, 2010). iRGD peptiidi testitakse I kliinilise faasi ravimiuuringus kasvajakasvatuse ravimi toime võimendajana (Dynamic Contrast Enhanced...2014).



**Joonis 2. iRGD peptiidi rakule seondumine ning koesse ja rakku sisenemine.** iRGD peptiidid akumulatsioon kasvavas  $\alpha_v$  integrini ekspresseerivate endoteelirakkude pinnale. Integriinidele seondumist vahendab RGD motiiv. Peptiid lõigatakse raku pinnaga seotud proteaasi(de) poolt ning sellega paljastub C-terminaalses otsas krüptiline CendR element, RXXK/R (punane punktiirjoon). Seejärel vahendab CendR element seondumise NRP-1 retseptorile, millele järgneb rakkudesse ja koesse sisenemine. Peptiid võib vähirakkudesse ja kudedesse siseneda ka koos keemiliselt konjugeeritud ravimi, kontrastaine või nanoosakega, kuid eeldusel, et see on kinnitatud iRGD peptiidi N-terminaalsesse otsa (must joon) (Sugahara *et al.*, 2009 järgi).

*In vivo* faagi skriiningutega on leitud palju erinevaid vähkipenetreerivaid peptiide (tabel 1) ning olenevalt vähitüübist on võimalik neid spetsiifiliselt vähikoldesse suunata. Näiteks F3 peptiid liigub erinevat tüüpi vähirakkude tuumadesse (Porkka *et al.* 2002), mis võib kaasa aidata tuumades toimivate vähiravimite sihtkohta jõudmisele (Hurley 2002, Porkka *et al.*, 2002). tLyP-1 peptiid võimaldab diagnostiliste või terapeutiliste ainete, näiteks fluorestsini ja erinevate naosakeste, tungimist vähi parenhüümi (Roth *et al.*, 2012). iNGR peptiidi koosmanustamisel vähiravis kasutatava *Doxorubicin*-ga suurendab peptiid märkimisväärselt ravimi efektiivsust võrreldes ainult ravimi manustamisega (Alberici *et al.*, 2013).

**Tabel 1. Vähiselektiivsed kullerpeptiidid ja kasutatavad kontrollid**

Faag/peptiidi nimetus	AH järjestus	<i>In vivo</i> selektiivsus	Retseptor	Viide
RPARPAR	RPARPAR	Vähkkasvaja endoteeli ja vähikoe rakud	$\alpha\beta3/5$ integriinid ja NRP-1	Teesalu <i>et al.</i> , 2009
TT1	CKRGARSTC	Erinevat tüüpi kartsinoomide lümfisooned, vähirakud ja -makrofaagid	p32	Teesalu <i>et al.</i> , avaldamata andmed
CTK	CTKGKASPC	Eesnäärme kasvaja	Teadmata	Sugahara <i>et al.</i> , avaldamata andmed
iRGD	CRGDKGPDC (CRGDK/RGPD/EC)	Erinevate kasvajatüüpide endoteeli ja vähikoe rakud	$\alpha\beta3/5$ integriinid ja NRP-1	Assa-Munt <i>et al.</i> , 2001 Sugahara <i>et al.</i> , 2009
LyP-1	CGNKRTRGC	Osteosarkoomi, spontaanse eesnäärmevähi ja piimanäärme kartsinoomi lümfisooned, vähirakud ja -makrofaagid	p32 ja NRP-1	Laakkonen <i>et al.</i> , 2002 Fogal <i>et al.</i> , 2008 Roth <i>et al.</i> , 2012
tLyP-1	CGNKRTR	Erinevat tüüpi rinnavähid	NRP-1 NRP-2	Roth <i>et al.</i> , 2012
iNGR	CRNGRGPDC	Vähiveresooned ja vähikude	Endoteeli CD13	Alberici <i>et al.</i> , 2013
G7	GGGGGGG	Kontroll	Puudub	Teesalu <i>et al.</i> , 2009
CX <sub>7</sub> C	Tsükliline heptameerne peptiidiraamatukogu	Kontroll		Rajotte <i>et al.</i> , 1998
X <sub>7</sub>	Lineaarne heptameerne peptiidiraamatukogu	Kontroll		Rajotte <i>et al.</i> , 1998

AH, aminohape.

### 1.3. Vähkipenetreerivate peptiidide retseptorid

NRP-1 on paljude füsioloogiliste ligandide rakupinna (ko)retseptor. Vähibioloogia seisukohast on olulisteks NRP-1 ligandideks klass 3 semaforiinid ning VEGF (Ellis 2006). NRP-1 osaleb kardiovaskulaar- ja närvisüsteemi arengus ning angiogeneesis (Gu *et al.*, 2003). VEGF indutseerib endoteeli rakkude jagunemist, soodustab rakkude migratsiooni ning inhibeerib endoteelirakkude apoptoosi (Soker *et al.*, 1998). NRP-1 on VEGF isovormi VEGF<sub>165</sub> retseptoriks ning seda ekspresseerivad nii endoteeli- kui vähirakud (Soker *et al.*, 1998). Semaforiinid mängivad olulist rolli arenevas ja küpses närvisüsteemis (He *et al.*, 2002).

Integriinid on rakupinna transmebraansed  $\alpha\beta$  heterodimeersed retseptorid, mis seostuvad erinevate ekstratsellulaarse maatriksi (ingl *extracellular matrix*, ECM) ja rakupinna ligandidega. On teada vähemalt 18 integriinide  $\alpha$  subühikut ja kaheksa  $\beta$  subühikut (Takada *et al.*, 2007). Funktsionaalselt jagatakse integriinid nelja suurde gruppi: laminiiniga seonduvad, kollageeniga seonduvad, leukotsüütide integriinid või RGD motiivi äratundvad integriinid ( $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha V\beta 6$ ,  $\alpha V\beta 8$  ja  $\alpha IIb\beta 3$ ; Takada *et al.*, 2007). Integriinid moodustavad transmebraanseid ühendusi tsütoskeletiga, aktiveerivad signaaliradu ja osalevad paljudes olulistest protsessides nagu rakkude jagunemine, apoptoos, polaarsuse säilitamine, migratsioon, geenide ekspressioon ja diferentseerumine (Giancotti ja Ruoslahti, 1999, Hynes, 2002). Angiogeensete endoteelirakkude poolt ekspresseeritavad integriinid erinevad mitteprolifereeruvate rakkude poolt ekspresseeritavatest (Giancotti ja Ruoslahti, 1999). Näiteks  $\alpha v\beta 3$  ja  $\alpha v\beta 5$  integriinid on angiogeneesil indutseeritud ning nende ekspressioon vähiveresoontes korreleerub paljude tuumorite maliigsusega (Brooks *et al.*, 1994, Erdreich-Epstein *et al.*, 2000, Buerkle *et al.*, 2002).

p32/gC1qR (globulaarse pea domäänide komplement 1q retseptor, ingl *receptor for globular head domains complement 1q*)/C1qbp (komplement 1q-d siduv valk, ingl *complement 1q-binding protein*)/HABP1 (hüaluroonhapet siduv valk 1, ingl *hyaluronan-binding protein 1*) paikneb peamiselt raku tsütoplasmas, tuumas ja mitokondris (Xu *et al.*, 2009). Rakupinna valk p32 ekspresseerub vähirakkudes, aktiveeritud makrofaagides ning endoteelirakkudes (Fogal *et al.*, 2008). p32 mängib normaalsetes rakulistes tingimustes olulist rolli mitokondrite

ja tsütoplasma võrgustiku toimimisel ning osaleb raku metabolismis ja erinevates stressivastustes (Hu *et al.*, 2013).

#### **1.4. Kassidel ja koertel esinevad vähkkasvajad**

Koerte DNA ja valkude aminohappeline järjestus on inimesele sarnasem kui hiirtel (Lindblad-Toh, *et al.*, 2005). Neil esineb ligikaudu 400 spontaanselt tekkivat pärilikku haigust, mis on sarnased inimeste komplekshaigustega nagu näiteks vähkkasvaja (Sargan, 2004, Parker *et al.*, 2010). Kassidel esineb ligikaudu 200 pärilikku haigust, mis on sarnased inimeste haigustele (O'Brien *et al.*, 2002, Online Mendelian Inheritance...2014). Vähkkasvajad on koerte seas väga sagedaseks surma põhjuseks (Bonnett ja Egenvall, 2010). Kõige enam esineb emastel koertel piimanäärme kartsinoomi (Pang *et al.*, 2011) moodustades üle 40% kõikidest diagnoositud kasvajatest (Beck *et al.*, 2013). Enamik koerte piimanäärme kasvajatest on epiteelset päritolu (Król *et al.*, 2012). Kassidel esineb kasvajaid ligi poole vähem kui koertel (MacVean *et al.*, 1978) ning emaste kasside hulgas on piimanäärme vähkkasvaja sageduselt kolmandal kohal (Hayes ja Mooney, 1985).

Rakkude epiteelset diferentseerumisest võtab osa E-kadheriin, mis on oluline valk rakk-rakk adhesioonis (Bex ja Van Roy, 2001). Eelnevalt teostatud uuringud viitavad sellele, et E-kadheriin osaleb rinnavähi levimisel organismis (Bex ja Van Roy, 2001) ning valgu ekspressiooni langus viitab metastaseerumisele (Perl *et al.*, 1998, Bex ja Van Roy, 2001, Pang *et al.*, 2011), sest kartsinoomi rakud hakkavad rohkem mesenhümaalseid markereid ekspresseerima (Thiery, 2002, Yoshida *et al.*, 2013). Vimentiin on intermediaarsete filamentide valk, mida normaalselt ekspresseeritakse mesenhümaalse päritoluga rakkude poolt (Bernal ja Stahel, 1985) ja mille ülesandeks on rakkude ja kudede terviklikkuse säilitamine (Satelli ja Li, 2011). On leitud, et vimentiini ekspressioon on kõrgem hormoon-sõltumatute piimanäärme kasvajatel korral (Sommers *et al.*, 1989, Domagala *et al.*, 1990), kuid tavaline on ka vimentiini ja epiteelset päritoluga markeri, näiteks keratiini või E-kadheriini, koekspressioon (Domagala *et al.*, 1990, Pang *et al.*, 2011).

Võrdlevat onkoloogiat kasutatakse indutseeritud eksperimentaalsetel tuumoritel saadud katsetulemuste võrdlemiseks koduloomadel spontaanselt tekkinud kasvajatega (Rowell *et al.*, 2011, Paoloni *et al.*, 2014). Spontaanselt tekkinud kasside ja koerte vähkkasvajad sarnanevad

oma heterogeensuse ja progressiooni kiiruse poolest inimese kliinilistele kasvajatele (MacEwen, 1990, Vali ja McEwn, 2000, Dernell *et al.*, 2013). Näiteks koemorfoloogia, vähigeneetika, molekulaarsed sihtmärgid, bioloogilised omadused ning reageering ja tundlikkus ravile (Starkey *et al.*, 2005, Paoloni ja Khanna 2008, Parker *et al.*, 2010, Pang *et al.*, 2011, Rowell *et al.*, 2011). Seetõttu kasutatakse koertelt eemaldatud vähiproove ka erinevate vähitüüpide kasvajarakkude värvimiseks (*Tumor Paint*<sup>TM</sup> tehnoloogia; Dernell *et al.*, 2013), vähivastaste ravimite katsetamiseks kliinilistes uuringutes (Henry *et al.*, 2005, Thamm *et al.*, 2005, Wittenburg *et al.*, 2010) ning vähibioloogilisteks uuringuteks (MacEwen, 1990).

Vähivastaste ravimite arenduses ja uuringutes kasutatakse ka sferoide (Lin ja Chang, 2008, Friedrich *et al.*, 2009, Mehta *et al.*, 2012). Multitsellulaarsed sferoidid koosnevad vähirakkudest, mis moodustavad kolmedimensionaalselt kasvavaid struktuure. Vähirakkude kasvamine 3D kultuurina võimaldab imiteerida vähkkasvaja kasvu ja mikrokeskkonda *in vivo*, sest 3D koekultuuris kasvavates vähirakkudes on ekstratsellulaarse maatriksi koostis ja ruumiline paigutus sarnasem kui kahedimensionaalselt kasvavates rakkudes (Abbot 2003, Alvarez-Pérez *et al.*, 2005, Friedrich *et al.*, 2009, Mehta *et al.*, 2012).

Kõik vähirakud ja rakuliinid pole võimelised sferoide moodustama. Mõned vähirakud on võimelised spontaanselt sferoide moodustama, ilma, et nad vajaksid spetsiaalset söödet, kultiveerimiseks eritingimusi või kinnitumiseks lisasubstraate (nt ECM komponente). Teised jälle suudavad küll sferoide moodustada, kuid kasv peatub teatud suuruse saavutamisel (Friedrich *et al.*, 2009). Koera primaarse osteosarkoomi rakud vajasisid sferoidide moodustamiseks seerumivaba ja kasvufaktoritega rikastatud söödet (Pang *et al.*, 2014), koera piimanäärme kartsinoomi rakud vajasisid lisaks progesterooni, putrestsiini, naatriumseleniiti, insuliini, inimese rekombinantset fibroblasti (ingl *basic fibroblast growth factor*, bFGF) ja epidermaalset kasvufaktorit (ingl *epidermal growth factor*, EGF). Viie kuni seitsme päeva möödudes oli näha ~ 50 µm suuruseid sferoide (Pang *et al.*, 2011), kuid sferoide on võimalik kasvatada nelja päevaga ka 400 µm diameetrini (Friedrich *et al.*, 2009). Näidatud on, et sferoide suudavad moodustada ka koera spontaanselt tekkinud melanoomi kasvajarakud (Gil-Cardesa *et al.*, 2010), kassidel esinevad pea- ja kaela lamerakulise kartsinoomi (Pang *et al.*, 2012) ja piimanäärme kartsinoomi rakud (Pang *et al.*, 2013).

Sferoidide suuruse kasvades (150–200  $\mu\text{m}$ ) akumulatsioonid sferoidide keskele ainevahetuse jäägid, difusiooni vähenemise tõttu tekivad hapniku ja toitainete gradiendid, mis mõjutavad geenide ekspressiooni (Alvarez-Pérez *et al.*, 2005, Curcio *et al.*, 2007, Lin ja Chang, 2008, Friedrich *et al.*, 2009, Mehta *et al.*, 2012). Alates ~ 600  $\mu\text{m}$  läbimõõduga sferoididest võib näha nende kihulist struktuuri, mis koosneb nekrootilisest tumedamast sisemusest, selle ümber olevast soikeseisundis rakkudest ning perifeerias paiknevatest elujõulisest rakkudest, mis paistavad kõige heledamana (Alvarez-Pérez *et al.*, 2005).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

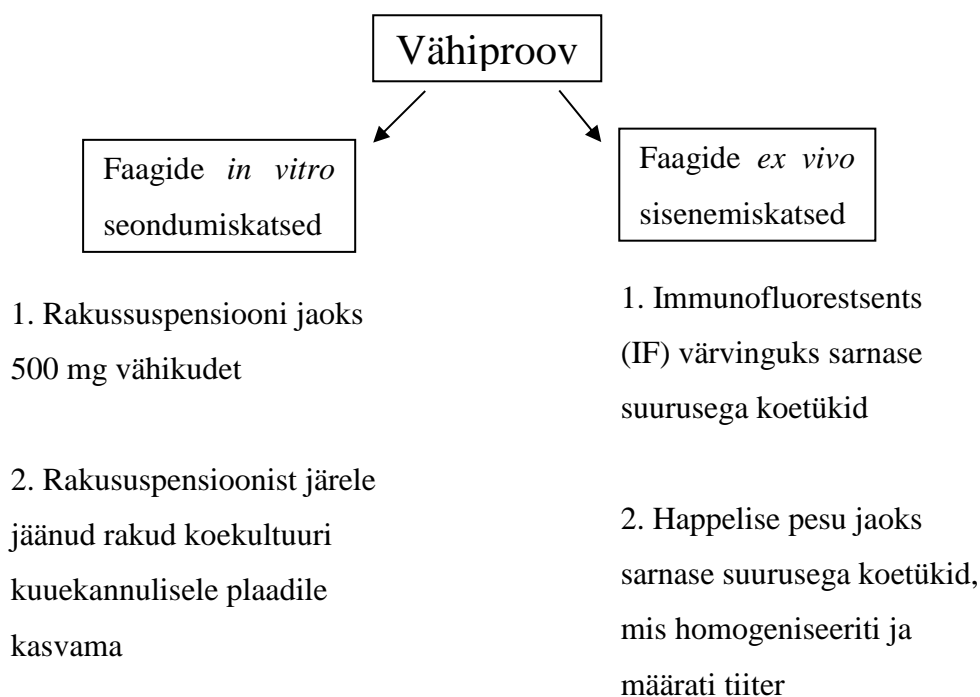
### 2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgid olid:

1. Selgitada, kas laborihiirte vähimudelites väljatöötatud VPP-d omavad vähiselektiivsust ka kasside ja koerte spontaansetel kasvajatel;
2. Võrrelda, kas VPP-d oma pinnal eksponeerivate faagide seostumine ja penetratsioon toimuvad sarnaselt koeralt pärit ja koekultuuri viidud piimanäärme vähirakkudel ja sama kasvajakoe homogeniseerimisel saadud rakususpensioonil;
3. Uurida, kas koeralt pärit ja koekultuuri viidud piimanäärme vähirakud on võimelised indutseerima hiires vähkkasvajat, moodustama kolmedimensionaalselt kasvavaid sferoide, ekspresseerivad neuropiliin-1 valku ning on kas epiteliaalset või mesenhümaalset päritolu.

### 2.2. Materjal ja metoodika

Käesoleva lõputöö jaoks vajalikud vähiproovid pärinevad Eesti Maaülikooli (EMÜ) veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituudist ning EMÜ Väikeloomakliinikust. Operatsioonil eemaldatud vähikude säilitati Dulbecco modifitseeritud Eagle'i söötmes (sisaldas 4,5 g/L glükoosi ja L-glutamiini, ingl *Dulbecco's modified eagle's medium*, DMEM, Lonza BioWhittaker™) 4 °C juures. Olenevalt vähiproovi suurusest teostati faagide *in vitro* rakkudele seondumise katse, faagide *ex vivo* rakkudesse sisenemise ehk internalisatsiooni katse või mõlemad (joonis 3). Testiti järgmisi faage: G7, RPARPAR, TT1, CTK, iRGD, LyP-1, 40 PS/KT, Glim1, Glim2 ning raamatukogud CX<sub>7</sub>C ja X<sub>7</sub>.



### Joonis 3. EMÜ Väikeloomakliinikust saadud vähiproovidega teostatud katsete skeem

2013. a veebruarist kuni 2014. a märtsini analüüsiiti kokku kolmeteistkümnelt kassilt ja koeralt eemaldatud vähikudet (tabel 2). Operatsioone viisid läbi EMÜ Väikeloomakliiniku loomaarstid. Vähitüüp määrati EMÜ veterinaarpatoloogi poolt kas peennõelaga aspireeritud tsütoloogilise proovi (ingl *fine needle aspiration*, FNA) või hilisema histoloogilise analüüsi alusel. Katsete tulemused esitati programmidega Excel 2010 ja GraphPad Prism5 versioon 5.02.

**Tabel 2. EMÜ Väikeloomakliinikust saadud vähiproovid ning teostatud katsed**

Jrk number	Loomaliik	Vähitüüp	Teostatud katsed
V1	Kass	Fibrosarkoom (tagumine jäse)	Seondumiskatse Sisenemiskatse (+IF)
V2	Koer	Fibroom (eesmine jäse)	Seondumiskatse
V3	Koer	Piimanäärme kasvaja	Seondumiskatse Sisenemiskatse (+IF) Koekultuuri katsed Hiirtesse süstimine
V4	Koer	Lamerakuline kartsinoom/fibroadenoom	Seondumiskatse
V5	Kass	Piimanäärme kasvaja	Seondumiskatse Sisenemiskatse (+IF)
V6	Kass	Fibrosarkoom	Seondumiskatse
V7	Koer	Lümfoom	Seondumiskatse Sisenemiskatse (+IF)
(järgneb)			Sisenemiskatse koos

V8	Koer	Koerlaste hemangioperitsüstoom	happepesuga Seondumiskatse Sisenemiskatse (+IF) Sisenemiskatse koos happepesuga
V9	Koer	Piimanäärme adenokartsioom	Seondumiskatse Sisenemiskatse (+IF) Sisenemiskatse koos happepesuga
V10	Koer	Sarkoom	Seondumiskatse Sisenemiskatse Sisenemiskatse koos happepesuga
V11	Koer	Koerte apokriinne tsüstoom	Seondumiskatse
V12	Koer	Lipoom	Seondumiskatse
V13	Koer	Kilpnäärme kartsinoom	Seondumiskatse

Jrk, järjekord

### 2.2.1. Faagide amplifitseerimine, puhastamine ja tiitrimine

*E.coli* bakteritüvi BLT5403 (Novagen) külvati LB söötmega kaetud tardsöötme tassile ning kasvatati üleöö 37 °C inkubaatoris. 25 ml LB söödet, millele oli lisatud karbenitsilliin (50 µg/ml), inokuleeriti ühe BLT5403 kolooniaga ning kasvatati üleöö bakterilokstusis 37 °C juures. BLT5403 üleöö kultuur lahjendati 1:100 steriilse LB söötmega ning kasvatati tiheduseni OD<sub>600</sub> ~ 0,5. Faagide amplifitseerimiseks mõõdeti 250 ml Erlenmeyeri kolbi 30 ml OD<sub>600</sub> = 0,5 BLT5403 bakterikultuuri ning lisati 30 µl amplifitseeritavat faagi. Bakteri ja faagi segu inkubeeriti kuni lüüsiniitide tekkimiseni, ca 90–120 minutit Gallenkamp Orbi-safe TS NetWise lokstusis 37 °C juures kiirusel 210 pööret minutis (rpm).

Amplifitseeritud faage puhastati polüetüleenglükooliga (PEG) sadestamisega. Kogu faagide puhastamisprotsessi teostati jääl ning jääkülmade lahustega. 26 ml bakteri ja faagi lüsaadile lisati 3 ml 5M NaCl ning tsentrifugeeriti 10 minutit 4 °C juures kiirusega 8000 rpm (tsentrifuug Eppendorf 5810R, nurkrootor ss34). Supernatant valati uude katsutisse, segati 8,4 ml 50% PEG8000-ga ning inkubeeriti minimaalselt 30 minutit 4 °C juures. Inkubatsiooniaja lõppedes tsentrifugeeriti katsuteid 10 minutit 4 °C juures kiirusel 8000 rpm. Sade suspendeeriti 2 ml fosfaat-puhverdatud soolalahuses (PBS, Lonza), filtreeriti läbi 0,22 µm filtri (Millex®GV, EMD Millipore Corporation) ning määrati faagide tiiter. Värskete faagide kasutamiseks amplifitseeriti ja puhastati paneelis olevaid faage keskmiselt ühe korra kuus.

Faagide *in vivo* hürde süstimiseks järgnes faagide puhastamine lisaks PEG sadestamisele ka tseesiumkloriidi (CsCl) gradiendis. Selleks pipeteeriti ultratsentrifuugi katsutisse (Beckman) neli kihti CsCl (62,5% tüvilahus) ja PBS lahust alustades kõige kontsentreeritumast (esimene kiht suhtes 1:0, teine kiht 1:1, kolmas kiht 2:1 ja neljas kiht 1:2). Seejärel lisati 1,5 ml faagilahust ning tsentrifugiti 2,5 tundi 40 000 rpm juures (ultratsentrifuug Beckman L7-65, Beckman Coulter Inc, USA; rootor sw50.1). Eelviimase CsCl/PBS gradiendi nivoo kohal asuv faagifraktsioon koguti katsuti seinla läbistamisel 3 ml süstla ja 22G nõela abil. Dialüüsiks süstiti faag märjatud dialüüsikassetti (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) ning inkubeeriti kaks korda 1 h 2 L PBS-is. Järgnes faagide tiitri määramine.

Amplifitseeritud faagisegu tiitrimiseks valmistati ette lahjenduste rida LB söötmes, mis võimaldas määrata faagisegu tiitri vahemikus  $10^3$  kuni  $10^{12}$  faagilaiku moodustavat ühikut (ingl *plaque-forming unit*, pfu)/ml. Tiitri määramiseks kasutati *E.coli* bakteritüve BLT5615 (Novagen). 600 µl BLT5615 bakterikultuurile, mida oli kasvatatud tiheduseni  $OD_{600} = 0,5$ , lisati 120 µl lahjendatud faagisegu. Faagi ja bakteri segust pipeteeriti 600 µl 15 ml Falcon katsutisse ning lisati 6 ml top-agarit (0,7% agari lahus LB-s), millele lisati eelnevalt 1M isopropüül-β-tiogalaktosiidi (IPTG, lõppkontsentratsioon 2mM). Segu valati LB tardsöötmega Petri tassile ning inkubeeriti üleöö toatemperatuuril või 3 tundi 37 °C juures. Inkubatsiooniaja lõppedes loeti kokku läbipaistvad faagi lüüsilaidud ning arvutati faagisegu tiiter.

### **2.2.2. Faagide *in vitro* seondumiskatsed**

Faagide seondumiskatsed teostati jääl ning eelnevalt jahutatud lahustega. Tuumori suspensiooni saamiseks tükeldati 500 mg koetükk steriilse skalpelliga ning homogeniseeriti 3 ml-s DMEM söötmes, mis sisaldas 1% BSA-d, kasutades OMNI-TH homogenisaatorit. Seejärel täideti *Snap cap* Falcon katsuti kuni 14 ml-ni DMEM/BSA söötmega. Seondumiskatseks lisati 15 ml katsutisse 8,95 ml DMEM/BSA söödet, 1 ml rakususpensiooni ning  $5 \times 10^8$  pfu faagi. Rakususpensiooni ja faagi segu inkubeeriti 4 °C juures 1 h. Rakud koguti tsentrifugides 5 min 4 °C juures kiirusel 1500 rpm (tsentrifuug Eppendorf 5810R, kiik-rootor A-4-62) . Supernatant aspireeriti ning rakusade suspendeeriti 15 ml-s DMEM/BSA söötmes. Rakke pesti DMEM/BSA söötmega kokku neli korda. Rakupinna retseptoritele seondunud faagide tiitri määramiseks lüüsi rakud LB söötmes, mis sisaldas 1% detergentsi NP-40 (IGEPAL CA-630, Sigma Aldrich).

### 2.2.3. Faagide *ex vivo* sisenemiskatsed

Faagide *in vitro* rakkudele seondumise katsest allesjäänud vähikude jagati faagide internalisatsiooni katseteks erinevate faagide vahel võimalikult võrdse suurusega tükikesteks. 15 ml katsutis olevale  $\sim 0,5\text{--}1\text{ cm}^3$  suurusele vähikoetükile lisati 5 ml 37 °C soojendatud DMEM/BSA söödēt ning uuritav faag ( $1 \times 10^{10}$  pfu). Katsutid asetati 120 minutiks 37 °C juurde CO<sub>2</sub> inkubaatorisse loksuma kiirusega 120 rpm. Järgevalt pesti kude kolm korda 10 minutit külma DMEM/BSA söötmega 4 °C juures, et peatada faagide rakkudesse sisenemine. Proovid tähistusega V1–V6 fikseeriti 4% PFA-d sisaldavas PBS-is üleöö 4 °C juures. Seejärel pesti koetükke kolm korda kaks tundi külma PBS-ga 4 °C juures. Külmakahjustuste vältimiseks hoiti vähikude üks kuni kaks päeva 30% sahharoosilahuses kuni tuumori vajumiseni katsuti põhja. Kuni koeproovi edasise töötluseni säilitati seda spetsiaalses kudede külmutamiseks ja külmlõikude valmistamiseks mõeldud OCT-lahuses (ingl *Optimal Cutting Temperature compound*, Leica Microsystems). Proovid tähistusega V7–V13 kiirkülmutati vedellämmastikus ning säilitati (samuti ka OCT-s olevaid koetükke) -80 °C juures kuni immunohistokeemilise analüüsini.

#### 2.3.3.1. Faagide *ex vivo* sisenemiskatsed koos happepesuga

Koeproovi inkubeerimine madala pH-ga lahuses võimaldab eristada raku pinnale kinnitunud faage rakku või koe sisemusse internaliseerunud faagidest. Happeline keskkond inaktiveerib rakkude pinnale seondunud faagid ning seetõttu saadakse tiitrimise abil ainult madala pH eest varjatud ning seega rakkudesse sisenenud faagide arv. Happeline puhver koosnes 0,5 M NaCl-st, 0,1 M glütsiinist, 1% BSA-st ja HCl-st, millega reguleeriti puhvri pH 2,5-ni.

Faagide *in vitro* rakkudele seondumise katsest allesjäänud vähikude (V8–V10) jagati erinevate faagide vahel võimalikult võrdse suurusega tükikesteks vastavalt koe kaalule (mg). 15 ml katsutis olevale vähikoetükile lisati 5 ml 37 °C soojendatud DMEM/BSA söödēt ning uuritav faag ( $1 \times 10^{10}$  pfu). Katsutid asetati 120 minutiks 37 °C juurde CO<sub>2</sub> inkubaatorisse loksuma kiirusega 120 rpm. Koeproovi pesti kolm korda 10 minuti jääkülma DMEM/BSA söötmega 4 °C juures, happelise puhvriga 10 minutit 4 °C juures ning kolm korda viis minutit PBS/BSA lahusega 4 °C juures. Rakkudesse sisenenud faagide tiitri määramiseks homogeniseeriti tuumor 1 ml lüüsipuhvris (1% NP-40/LB).

#### **2.2.4. Faagide tuvastamine koes immunofluorestsentsmeetodil**

Immunofluorestsentsvärving teostati koetükkidele pärast faagide *ex vivo* sisenemiskatseid. Selleks valmistati külmlõigud proovidest V1, V3, V5 ja V7 (fikseeritud 4% PFA/PBS lahuses) ning proovidest V8 ja V9 (külmutatud vedellämmastikus). Alusklaasidele paigutatud 10 µm paksustel külmlõikudel lasti õhu käes kuivada (30 minutit kuni 2 tundi), misjärel säilitati neid kuni immunohistokeemia värvinguteni -20 °C juures. Koelõikude immunovärvinguks kasutati Sequenza™ katteplaatide™ süsteemi (Ted Pella, Inc.). 4% PFA-s fikseeritud ja OCT-s olevaid koelõike permeabiliseeriti PBST-s (sisaldas PBS-i ning 0,05% Tween 20; 2 korda 5 minutit). Vedellämmastikus külmutatud koelõigud (V8 ja V9) fikseeriti metanoolis (-20 °C, 1 minut). Preparaate inkubeeriti blokeerimislahuses (PBST, mis sisaldas 1% BSA-d) 30 minutit toatemperatuuril. Slaidile lisati 300 µl primaarset antikeha anti-T7-415 (1:100, toodetud küülikus, San Diego, USA), inkubeeriti üks tund toatemperatuuril, misjärel pesti slaide kolm korda viis minuti PBST-s. Seejärel lisati slaidile 300 µl sekundaarset antikeha (1:2000) Alexa Fluor® 546 (toodetud kitses, küülikuvastased antikehad, Invitrogen Molecular Probes), inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril ja pimedas. Preparaate pesti kolm korda viis minutit PBST-ga ning üks kord DAPI-t (4',6-diamidino-2-fenüülindool; 1µg/ml) sisaldava PBST lahusega. Sulundamiseks kasutati Fluoromount G lahust (Electron Microscopy Sciences, USA) ning 45 minuti pärast või järgmisel päeval tihendati pealisklaasi ääred küünelakiga. Preparaatide mikroskopeerimiseks kasutati konfokaalmikroskoopi Zeiss LSM710 ja programmi ZEN 2012 (Zeiss).

#### **2.2.5. Kasvajast pärinevate rakkude kultiveerimine *in vitro***

Koera piimanäärme tuumorist (proov V3) pärit kasvajakke kasvatati kõrge glükoosisaldusega DMEM söötmes, millele lisati 10% veise loote seerumit (ingl *fetal bovine serum*, FBS) ning antibiootikume penitsilliin (100 ühikut/mL) ja streptomütsiin (100 µg/mL). Koera piimanäärme pärit vähirakkudega teostati faagide rakkudele seondumise ja rakkudesse sisenemise katsed ning lisaks süstiti vähirakke nii 2D kui ka 3D kultuuris kasvatatuna karvututesse immuunpuudulikesse (ingl *nude*) hiirtesse.

Seondumiskatse kõik etapid teostati jääl ning eelnevalt jahutatud lahustega. 15 ml katsutisse lisati 8,95 ml DMEM/BSA söödet, 1 ml vähirakkude tüvilahust (ühe reaktsiooni kohta kasutati  $3 \times 10^5$  rakku/ml),  $5 \times 10^8$  pfu-d faagilahust ning inkubeeriti 1 h 4 °C juures. Rakke pesti

neli korda 15 ml DMEM/BSA söötmega ning lüüsi 1 ml 1% NP-40/LB-s. Rakkudele seondunud faagide hulk määrati tiitrimise teel.

Sisenemiskatseks lisati 15 ml katsutisse 5 ml eelnevalt 37 °C-ni soojendatud DMEM/BSA söödelt, 1 ml vähirakkude tüvilahust (ühe reaktsiooni kohta kasutati  $3 \times 10^5$  rakku/ml),  $1 \times 10^{10}$  pfu-d faagi ning inkubeeriti kaks tundi 37 °C juures CO<sub>2</sub> inkubaatoris. Rakke pesti 4 °C juures kolm korda viis minuti külma DMEM/BSA söötmega, üks kord kümme minutit happelise puhvriga ning kolm korda viis minutit DMEM/BSA söötmega. Peale viimast pesu suspendeeriti rakud üles 1 ml 1% NP-40/LB-s ning määrati tiitrimise abil rakkudesse sisenenud faagide hulk.

### **2.2.5.1. Tuumorirakkude kasvatamine sferoididena**

Vähirakkude kolmedimensionaalseks kasvatamiseks kaeti 75 cm<sup>2</sup> koekultuuri plaat (BD Biosciences™) agarit sisaldava DMEM söötmega, millel oli lisatud 10% FBS. T75 koekultuuri plaadile lisati 17 ml DMEM söödelt ning  $2 \times 10^6$  vähirakku. Rakke kasvatati niiske keskkonnaga 37 °C ja 5% CO<sub>2</sub> sisaldusega inkubaatoris ja söödelt vahetati nädalas korra või vastavalt vajadusele. Sferoide pildistati Axiovert 40 CFL mikroskoobiga (Zeiss, Saksamaa) ja AxioVision Rel 4.8 (Zeiss) programmi abil. Katset korrati kolm korda.

### **2.2.5.2. Sferoidide dissotsieerimine**

Hiirtesse süstimiseks dissotsieeriti sferoidid trüpsiiniga. Selleks pipeteeriti sferoidid 15 ml Falcon katsutisse ja lisati trüpsiini ja rakkude dissotsiatsiooni puhvri segu (suhtes 1:4). 3 ml lahust hoiti sferoididel 10 minutit ning selle aja jooksul suspendeeriti pipeteerides iga 3–4 minuti järel. Viimase 3 minuti jooksul lasti mittedissotsieerunud sferoididel katsuti põhja vajuda. Need rakud, mis jäid lahusesse ning ei settinud, pipeteeriti jääl paikevasse 50 ml katsutisse, mis omakorda sisaldas 20 ml DMEM söödelt koos penitsilliini, streptomütsiini ja 10% FBS-ga. Põhja settinud sferoididele lisati uuesti 3 ml trüpsiini ja rakkude dissotsiatsiooni lahust ning korrati kogu protseduuri, kuni kõik sferoidid dissotsieeriti ning ükski sferoid ei vajunud enam põhja. Seejärel loeti rakud Bio-Rad TC™ automaatse rakuloenduriga, tsentrifuugiti 5 min 4 °C juures 250 rcf (ingl *relative centrifugal force*) ja resuspendeeriti vajaliku kogusega DMEM söötmes, et saada süstimiseks sobiv rakkude kontsentratsioon. Rakke hoiti jääl ning süstimiseks implanteeriti  $3 \times 10^5$  rakku mahus 2,5 µl.

### 2.2.5.3. FACS analüüs kasvajakarakkude intra- ja ekstratsellulaarsete molekulide tuvastamiseks

#### a) NRP-1 ekspressioon V3 ja PPC-1 rakkudel

Kõik etapid teostati jääl ning jääkülmade lahustega. Üheks reaktsiooniks kasutati koekultuuri plaadilt võetud  $5 \times 10^5$  rakku, mis suspendeeriti 1 ml DMEM söötmes, pesti üks kord PBS-is, tsentrifuugiti 5 minutit 4 °C juures 350 rcf ning suspendeeriti 200 µl värvimispuhvril [sisaldas Dulbecco PBS-i, 5% soojusega inaktiveeritud (56 °C 30 minutit) vasika loote seerumit (ingl *fetal calf serum*, FCS; Sigma-Aldrich), 0.1% NaN<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich)]. Seejärel lisati 1 µl primaarset anti-NRP-1 antikeha (1 mg/ml), inkubeeriti raputades 30 minutit jääl, lisati sekundaarse antikehana (1:1000) Alexa Fluor® 488 (toodetud kitses, küülikuvastased IgG antikehad, Invitrogen Molecular Probes) ning inkubeeriti tuubi aeg-ajalt kergelt raputades 30 minutit jääl. Järgnes kaks pesu 1 ml värvimispuhvril, sade suspendeeriti 200 µl värvimispuhvril ning analüüsiti voolutsütomeetrilisel (FACS BD Accuri® C6). Negatiivseks kontrolliks kasutati antikehadega töötlemata rakke ning rakke, mida värviti ainult sekundaarse antikehaga. Positiivseks kontrolliks valiti PPC-1 (ingl *primary prostatic carcinoma cell line*-1) rakud, sest eelnevalt on katsetega näidatud, et PPC-1 rakud ekspresseerivad kõrgel tasemel NRP-1 (Wang *et al.*, 2011).

#### b) E-kadheriini ja vimentiini ekspressioon V3 rakkudes

Üheks reaktsiooniks kasutati koekultuuri plaadilt võetud  $5 \times 10^5$  rakku, mis suspendeeriti 1 ml DMEM söötmes, pesti 1x PBS-is, tsentrifuugiti 5 minutit 350 rcf ning fikseeriti 10 minutit toatemperatuuril 200 µl 4% paraformaldehüüdil (PFA)/PBS. Sellele järgnes kaks pesu PBS-ga tsentrifuugilides 300 rcf 5 minutit, permeabiliseerimine 200 µl PBST-ga (1x PBS, mis sisaldas 0,05% Tween 20) 10 minutit toatemperatuuril ning inkubatsioon 10 minutit blokeerimislahuses (PBST, mis sisaldas 1% BSA-d). Peale tsentrifuugimist lisati Alexa Fluor® 647-ga konjugeeritud anti-E-kadheriin (1:500, Nordic BioSite) ja FITC-ga konjugeeritud anti-vimentiin antikeha (1:1000, Abcam®) PBST-s ning inkubeeriti 1 tund. Järgnes rakkude pesu kaks korda PBST-s, peale tsentrifuugimist suspendeeriti rakud 200 µl PBST-s ning teostati voolutsütomeetriline analüüs. Negatiivseks kontrolliks kasutati antikehadega töötlemata rakke ja positiivseks kontrolliks PPC-1 rakke.

### 2.2.6. Loomkatsed

Lõputöö projekt omab loomkatsete läbiviimise luba nr 90, 22.11.2011 (lisa 1) ning loomkatseid viis läbi Tarmo Mölder. Lõputöös kasutati kuut emast karvutut immuunpuudulikku hiirt, kellele süstiti ortotroopselt piimanäärme rasvapadjandisse koeralt pärit ja koekultuuri viidud V3 rakke ( $1 \times 10^6$  rakku/50  $\mu$ l). Pärast kolmekuulist jälgimist süstiti viit hiirt kasvajarakkudega uuesti – kolme hiirt kõhuõõnde ja kaht hiirt naha alla. Kolme kuu möödudes süstiti kaht hiirt kolmandat korda kõhuõõnde koekultuuris kasvanud dissotsieeritud sferoididega ( $1 \times 10^6$  rakku/100  $\mu$ l).

*In vivo* faagidisplei katseks soojendati hiire saba soojas vees ( $\sim 40$  °C) 5 minutit, sabaveeni süstiti CsCl gradiendis puhastatud iRGD faagi ( $5 \times 10^9$  pfu/100  $\mu$ l) ning lasti faagil tsirkuleerida 15 minutit. Seejärel teostati anesteesia 1,25% avertiini süstimisega hiire kõhuõõnde ( $\sim 400$   $\mu$ l), anesteseeritud hiir fikseeriti vahtpolüstüreenalusele ning avati kõhuõõs. Pärast diafragma avamist lõigati roided kahelt poolt rinnakut ning fikseeriti see nõelaga pea kõrvale, et tekitada vaba juurdepääs südamele. Vere võtmiseks südamest töödeldi süstalt enne EDTA-ga, kääridega tehti südame paremasse kambrisse sisselõige, et võimaldada vere ning perfusioonivedeliku vaba äravool ning sisestati südame vasaku vatsakesse perfusiooninõel. Perfusioon teostati sooja ( $\sim 37$  °C) DMEM/BSA söötmega, kuni maks muutus heledaks. Hiirelt eemaldati organid (süda, tükike maksast ja vasakust kopsust, neer, põrn, aju) ja tuumor, need pesti, kaaluti ning asetati 3 ml DMEM söötmesse. Tiitrimise jaoks võeti enne perfusiooni südamest 20  $\mu$ l verd, millele lisati 180  $\mu$ l 1% NP40/LB ning organid ja tuumor homogeniseeriti.

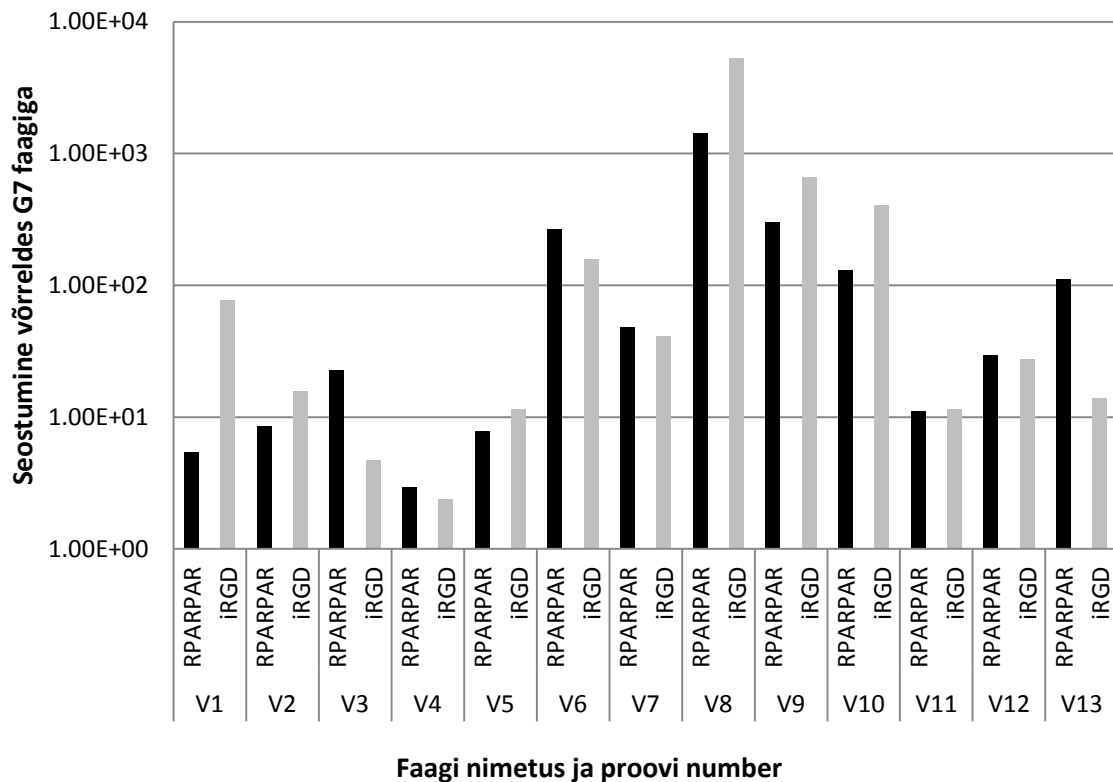
### 2.3. Tulemused

Hiiremudeleid kasutades on *in vivo* faagiraamatukogu skriiningutega leitud hulgaliselt peptiidide motiive, mis seonduvad süsteemselt ligipääsetavatele rakupinna molekulidele (Arap *et al.*, 1998, Sugahara *et al.*, 2009, Teesalu *et al.*, 2009, Alberici *et al.*, 2012). Sellisteks molekulideks võivad olla näiteks integriinid ja NRP-1, millega seonduvad kõik CendR omavad peptiidid järjestused (nt faagid iRGD ja RPARPAR; Sugahara *et al.*, 2009, Teesalu *et al.*, 2009), p32, millega seonduvad faagid LyP-1 (Fogal *et al.*, 2008) ja TT1. Rakupinnal paiknevateks molekulideks võivad olla ka mõned veel tuvastamata retseptorid, millele seonduvad faagid CTK, 40 PS/KT, Glim1 ja/või Glim2. Faagide *in vitro* rakkudele

seondumise ja rakkudesse sisenemise katseid teostati, et uurida, kas hiiremudeleid kasutades leitud VPP-d seonduvad ka kassidelt ja koertelt pärit vähirakkudega.

### **Faagide *in vitro* seondumiskatsed**

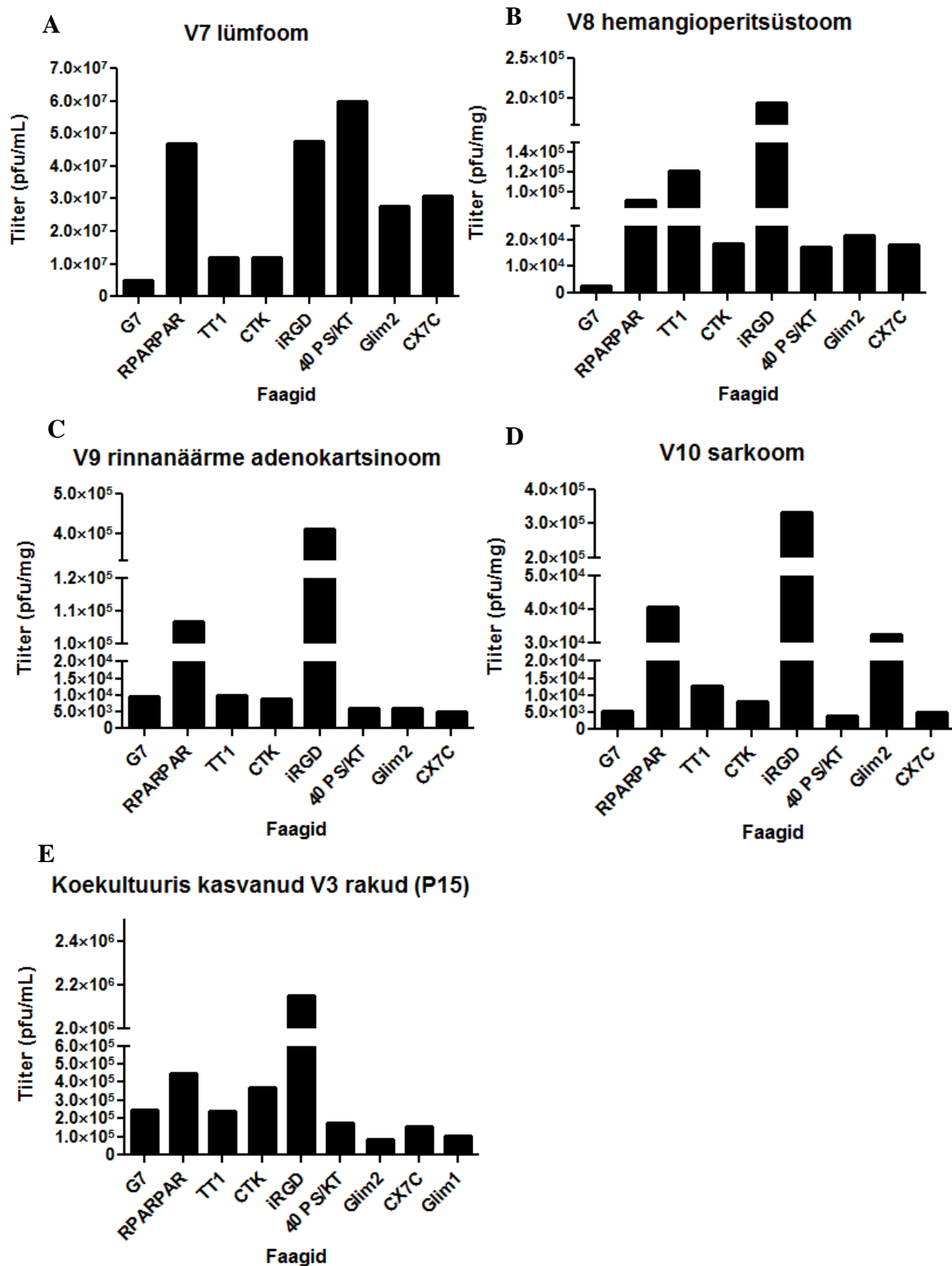
Faagide *in vitro* seondumiskatsed näitasid, et kõik testitud VPP-d oma pinnal eksponeerivad faagid akumuleeruvad kasside ja koerte vähirakkudele (lisa 2, joonis 1 ja joonis 2). Fibrosarkoomi või fibroomi proovimaterjalidest järjekorranumbriga V1, V2 ja V6 võis täheldada iRGD ja 40 PS/KT faagide sarnast rakkudele seondumist (lisa 2, joonis 1A ja 1C ning joonis 2A). V3, V5 ja V9 piimanäärme kasvajate hulgas oli näha sarnaseid RPARPAR ja iRGD faagide tiitreid (lisa 2, joonis 1B ning joonis 2B, 2H). V3 koera piimanäärme kasvaja rakususpensioonis (lisa 2, joonis 2B) ja koekultuuris kasvanud V3 rakkudes (15 korda kultuuris jagatud; lisa 2, joonis 2D) oli katsetatud faagidest RPARPAR kõige enam seondunud faag, kuid koekultuuris kasvanud V3 rakkudel, mida oli koekultuuris jagatud viis korda, andsid RPARPAR ja iRGD faagid sarnase tiitri (lisa 2, joonis 2C). 13 analüüsitud proovist oli näha, et kõige enam seonduvad erinevat tüüpi kasvajarakkudele RPARPAR ja iRGD faagid (keskmiselt 350 korda enam kui kontrollfaag, joonis 4). Kassidelt eemaldatud vähiproovidele seonduvad RPARPAR ja iRGD faagid keskmiselt 87,5 korda (lisa 2, joonis 3) ning koertelt eemaldatud vähiproovidele keskmiselt 428,1 korda enam kui negatiivne kontrollfaag G7 (lisa 2, joonis 4).



**Joonis 4. RPARPAR ja iRGD peptiidi ekspresseerivate faagide seostumine vähiproovidega normaliseerituna G7 kontrollfaagi suhtes.** Numbrita V1–V13 on tähistatud nii kasside kui koerte vähiproovid, millele teostati faagide *in vitro* rakkudele seondumise katsed, kus vähikude homogeniseeriti ja raku suspensiooni inkubeeriti faagiga ( $5 \times 10^8$  pfu) 1 tund 4 °C juures. RPARPAR ja iRGD tiitrimisel saadud tulemused jagati läbi G7 kontrollfaagi tiitri tulemustega.

#### Faagide *ex vivo* sisenemiskatsed koos happesuga

Faagide *ex vivo* sisenemiskatsete tulemused näitasid, et pärast vähikude töötlemist happelise puhvriga pääses rakkudesse kõige enam iRGD faag (joonis 5). Seda näitasid katsed nii erinevate vähitüüpide homogeniseeritud kudede kui ka koekultuuris kasvanud V3 piimanäärme vähirakkudega.

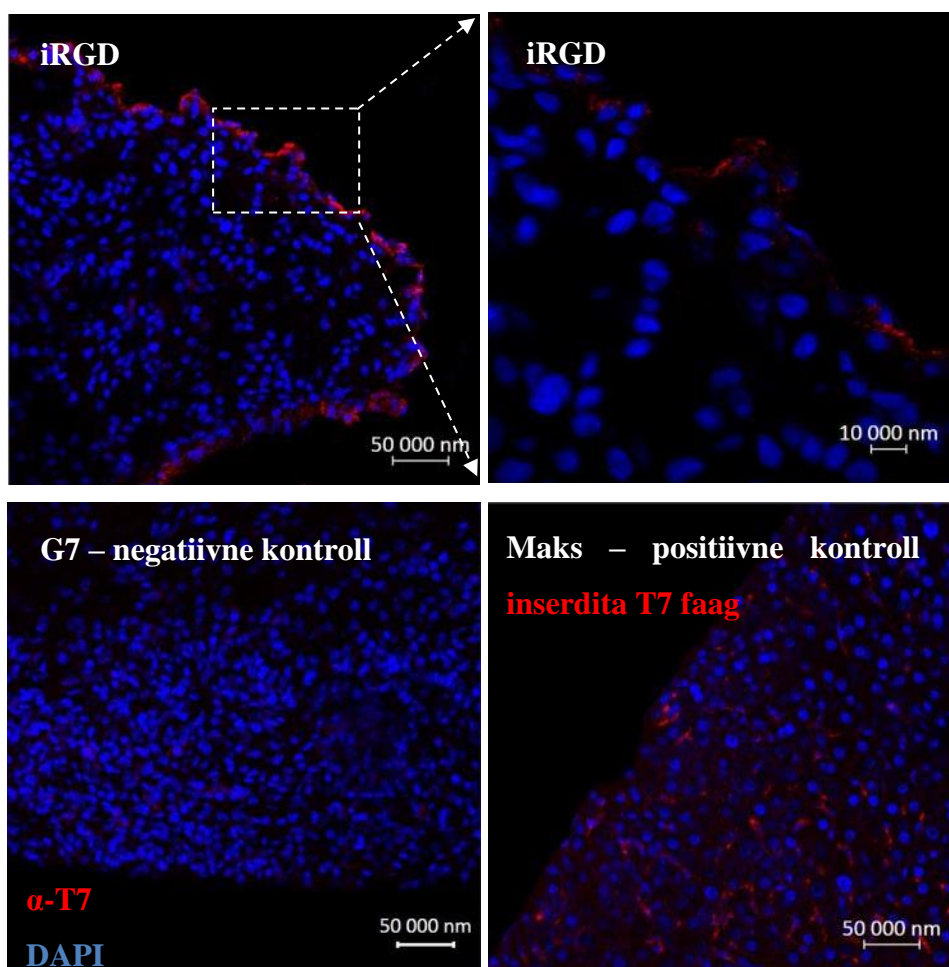


**Joonis 5. VPP-sid esitlevate faagide *ex vivo* koerte kasvajarakkudesse sisenemine.** Joonisel on erinevate vähiproovidega teostatud sisenemiskatsed, millele teostati ka happepesu. Vähikoetükile lisati faagi ( $1 \times 10^{10}$  pfu), inkubeeriti 2 tundi 37 °C juures ning töödeldi happelise puhvriga. Seejärel kude homogeniseeriti ning määrati rakkudesse sisenenud faagide tiiter. Joonisel B–D on tiitrimisel saadud tulemused normaliseeritud vastavalt koe kaalule

(mg). Joonisel E on katse teostatud koekultuuris kasvanud V3 piimanäärme vähirakkudega (15 kultuuris jagamist).

### Faagide tuvastamine koes immunofluorestsentsmeetodil

Immunohistoloogiline kudede värvimine teostati pärast faagide rakkudesse sisenemise katset, et lisaks tiitrimisel saadud andmetele visualiseerida faagide rakkudesse sisenemine. Värvitud preparaate mikroskopeerimisel ilmnes, et katsetatud faagidest õnnestus ainult iRGD faagil EMÜ Väikeloomakliinikust pärit vähirakkudesse mõningal määral siseneda. Positiivse kontrollina kasutati maksakude hiirelt, kellele oli manustatud süsteemselt kontrollfaagi (joonis 6).

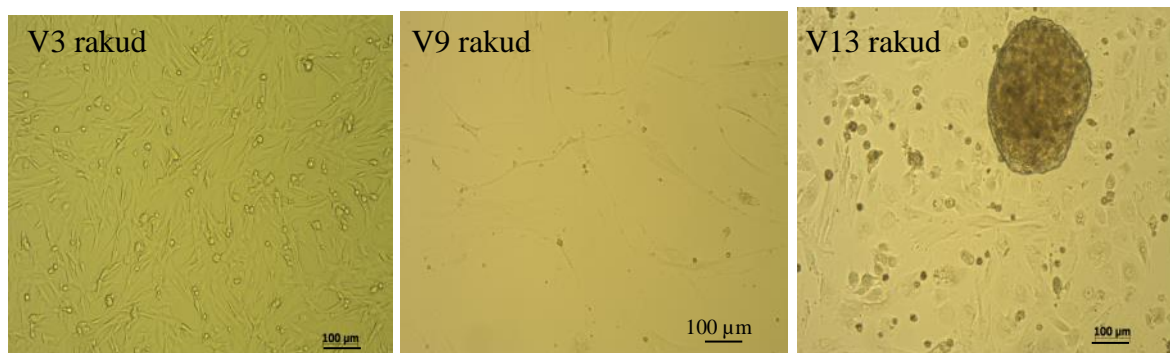


**Joonis 6. iRGD faagi distributsioon tuumoris *ex vivo*.** Vähikoetükile lisati faagi ( $1 \times 10^{10}$  pfu) ning inkubeeriti 2 tundi 37 °C juures. Negatiivse kontrollina kasutati heptaglütsiini faagiga inkubeeritud vähikoelõike. Positiivse kontrollina kasutati maksakoe lõike hiirelt, keda süstiti süsteemselt mitterekombinantse faagiga. Faag (punane) tuvastati anti-T7-415 primaarse ja Alexa Fluor® 546 sekundaarse antikehaga. Sinisega on joonisel DAPI-ga värvitud rakutuumad. Mikroskopeerimiseks kasutati konfokaalmikroskoopi.

## Kasvajast pärinevate rakkude kultiveerimine *in vitro*

Kassidelt ja koertelt pärit vähikoe dissotsieerimisel saadud rakud paigutati koekultuuri plaadile kasvama. Meid huvitasid primaarse rakukultuuri rakuline koosseis, füsioloogilised omadused (näiteks nende võime koekultuuri plaadil *in vitro* kasvada, moodustada kolmedimensionaalselt kasvavaid sferoide, indutseerida kasvajaid hiirtes) ning peptiidide interaktsioon kultuuris kasvavate vähirakkudega *in vitro*.

EMÜ Väikeloomakliinikust saadud seitsmest proovist õnnestus kultiveerida kolmest proovist pärit rakke (V3 ja V9, mõlemad koera piimanäärme kasvajak; V13, koera kilpnäärme kartsinoom) (joonis 7). Koekultuuris kultiveeritud rakkudest teostati katseid kõige kiirema kasvuga V3 rakkudega. Paralleelselt kultiveeriti V3 rakke ka seerumivabas söötmes, kuid kuna katseteks vajalik rakkude arv polnud kahe kuu möödudes saavutatud, loobuti V3 rakkude seerumivabas söötmes kasvatamisest. Koekultuuris kasvanud V3 vähirakke süstiti kuuetele karvutule immuundefitsiitsele hiirele kas naha alla või kõhuõõnde. Neist ühel tekkis ühe kuu ning teisel kolme kuu möödudes kõhuõõnde metastaasidega vähkkasvaja. Ühe hiirega teostati *in vivo* katse, kuid andmeid ei näidata.

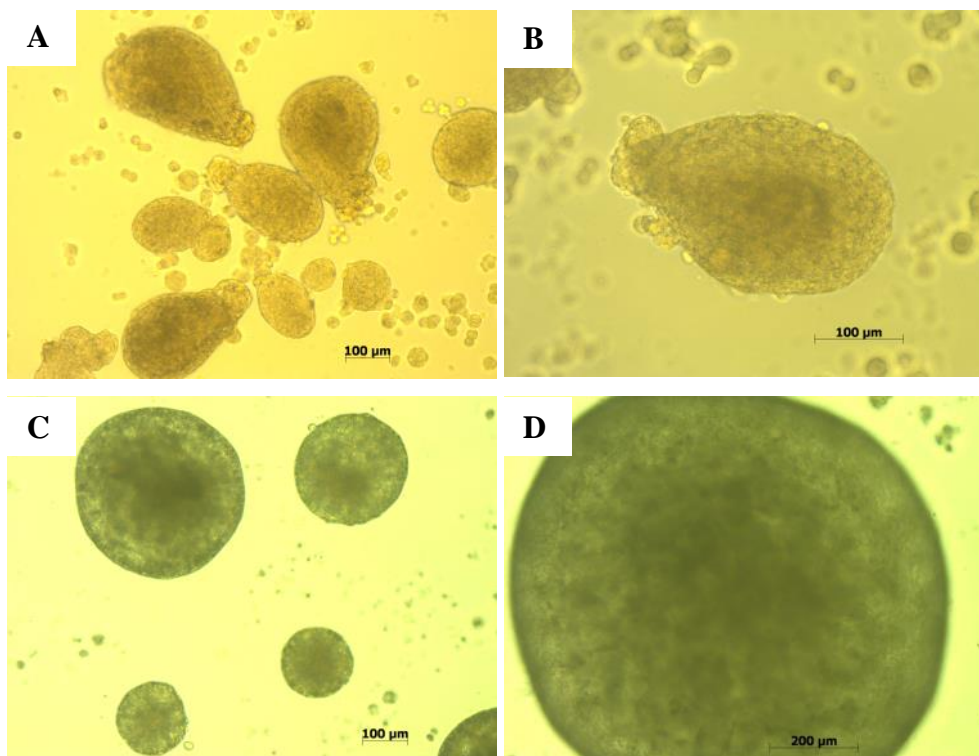


**Joonis 7. Koerte kasvajatest pärit *in vitro* kultiveeritud V3, V9 ja V13 rakud.** V3 ja V9 olid piimanäärme kasvajak ning V13 kilpnäärme kartsinoom. Mikroskopeerimiseks kasutati Axiovert 40 CFL mikroskoopi.

## Tuumorirakkude kasvatamine sferoididena

*In vitro* koekultuuris kultiveeritud V3 piimanäärme vähirakkudest moodustunud sferoidid olid väga erineva suuruse ja kujuga (joonis 8). Üldine tähelepanek oli, et sferoidide vanuse ja suuruse kasvades muutusid nad korrapärasemaks. V3 rakud moodustasid sferoide ning

kasvasid suhteliselt aeglaselt, kuid olid väga vastupidavad, sest neid õnnestus kasvatada neli kuud, ilma et mikroskooperides oleks ilmnenud sferoidide lagunemise märke. Dissotsieeritud sferoide süstiti ka kahele karvutule immuundefitsiitsele hiirele kõhuõõnde, kuid kolme kuu möödudes ei õnnestunud sferoididel hiires vähkkasvaja teket indutseerida.

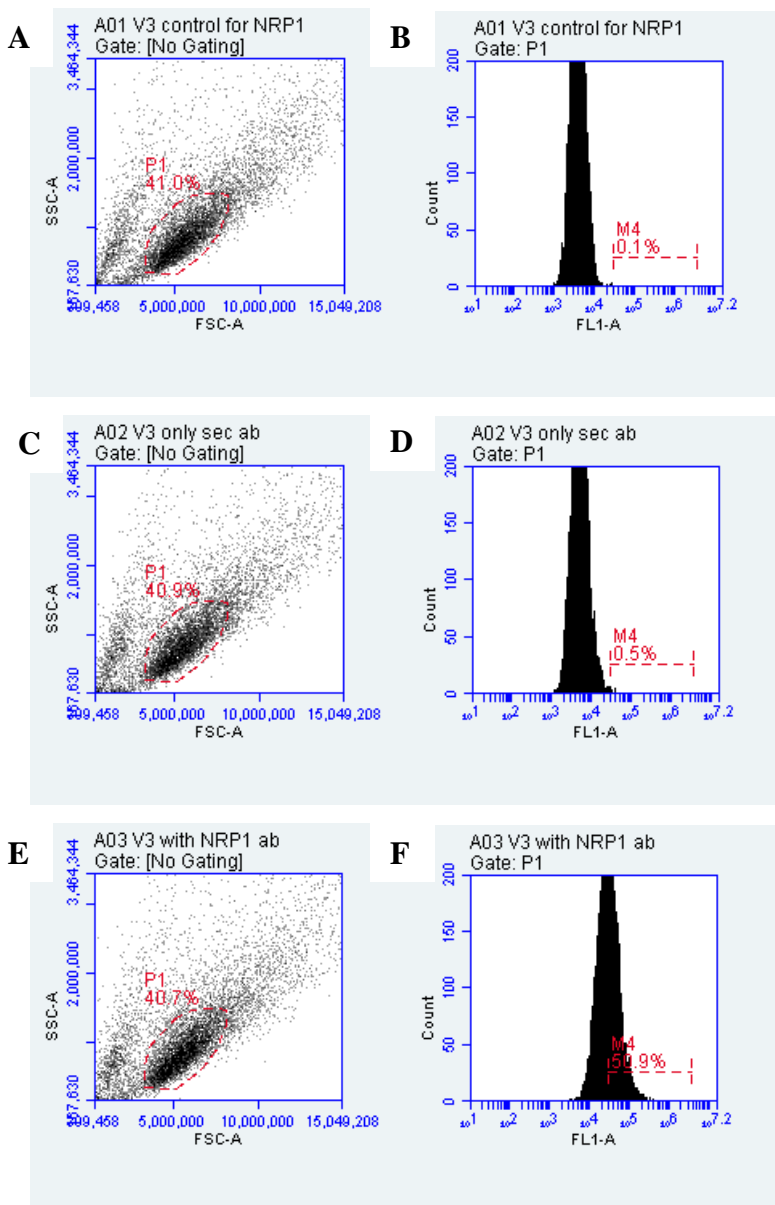


**Joonis 8. Koera piimanäärme vähirakud (V3) moodustasid kolmedimensionaalselt kasvavaid sferoide.** Joonistel A ja B on sferoidid ühe kuu vanused ning joonistel C ja D kahe kuu vanused. Mikroskopeerimiseks kasutati AxioVert 40 CFL mikroskoopi.

#### **FACS analüüs kasvajarakkude intra- ja ekstratsellulaarsete molekulide tuvastamiseks**

##### a) NRP-1 ekspressioon V3 rakkudel

Analüüs teostati eesmärgiga uurida rakkudesse sisenemise mehhanismil olulise komponendi, NRP-1 retseptori ekspressiooni (Sugahara et al., 2009, Teesalu et al., 2009) *in vitro* koekultuuris kasvanud piimanäärme vähirakkudel. Koekultuuris kasvanud V3 rakkudest ekspresseeris NRP-1 valku 50,9% rakkudest (joonis 9). Positiivse kontrollina kasutatud PPC-1 rakkudest ekspresseeris NRP-1 95,5% rakkudest (lisa 3a).

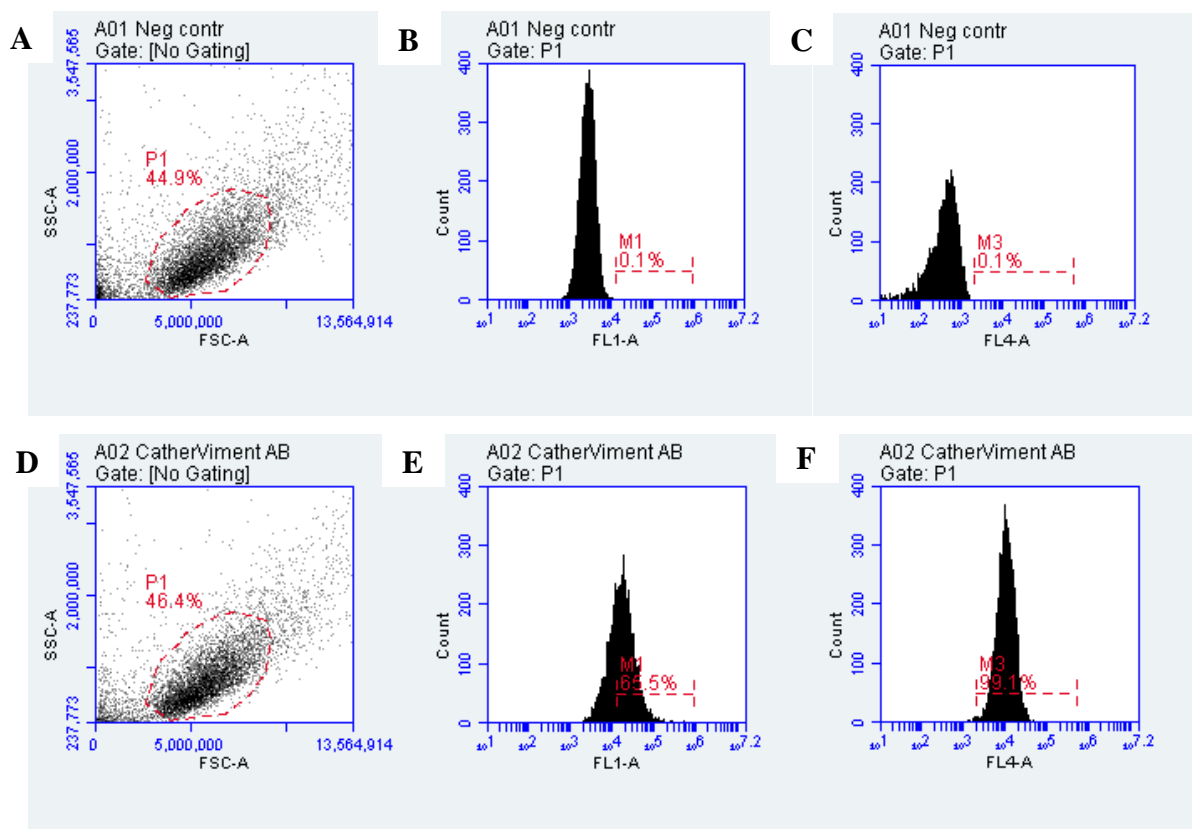


**Joonis 9. NRP-1 ekspressioon V3 rakkudel.** A, C, E: Y-telgedel on külghajuvus (ingl *side light scatter*, SSC-A) ja x-telgedel otsehajuvus (ingl *forward light scatter*, FSC-A), mille abil eristati V3 rakke. Punase punktiirjoonega märgistati ära V3 rakkude populatsioonid. B, D, F: Väravdatud (ingl *gated*) V3 rakud. Y-telgedel on rakkude arv, x-telgedel on kanalid (FL1-A) NRP-1 tuvastamiseks. B: negatiivne kontroll – antikehadega töötlemata V3 rakud. Positiivsete ehk fluorestseeruvate rakkude arv negatiivse kontrolli puhul jäi alla 0,1%. D: negatiivne kontroll – V3 rakud, mida värviti ainult sekundaarse antikehaga. Fluorestseeruvate rakkude arv negatiivse kontrolli puhul jäi alla 0,5%. F: proov, mida töödeldi Anti-NRP-1 ja sekundaarse küülikuvastase antikehaga, mis oli märgistatud Alexa-488-ga (FL1-A). 50,9% V3 rakkudest olid positiivsed ning ekspresseerisid NRP-1 valku.

b) E-kadheriini ja vimentiini ekspressioon V3 rakkudes

Analüüs teostati eesmärgiga uurida, kas koekultuuris kasvanud piimanäärme vähirakud pärinevad epiteeliaalsetest või fibroblasti rakkudest. Selleks uuriti epiteeliaalse markeri (E-

kadheriin) ja mesenhümaalse markeri (vimentiin) ekspressiooni (Lee *et al.*, 2006). V3 rakkudest 65,5% ekspresseeris vimentiini ning 99,1% E-kadheriini, mis viitab sellele, et *in vitro* koekultuuris kasvanud piimanäärme kasvaja pärit rakud on peamiselt epiteelset päritolu (joonis 10). Ootuspäraselt ekspresseeris epiteelsetest PPC-1 rakkudest 99,1% E-kadheriini ja vaid 3,8% vimentiini (lisa 3b).



**Joonis 10. E-kadheriini ja vimentini ekspressioon V3 rakkudes.** A, D: Y-telgedel on külghajuvus ja x-telgedel otsehajuvus, mille abil eristati V3 rakke. Punase punktiirjoonega märgistati V3 rakkude populatsioonid. B, C, E, F: Väravdatud V3 rakud. Y-telgedel on rakkude arv, x-telgedel on kanalid vimentiini (FL1-A) ja E-kadheriini (FL4-A) tuvastamiseks. B: negatiivne kontroll vimentini ekspressiooni tuvastamiseks – anti-kehadega töötlemata V3 rakud. Fluorestseerivate rakkude arv negatiivse kontrolli puhul jäi alla 0,1%. C: negatiivne kontroll E-kadheriini ekspressiooni tuvastamiseks – anti-kehadega töötlemata rakud. Fluorestseerivate rakkude arv negatiivse kontrolli puhul jäi alla 0,1%. E: proov, mida töödeldi FITC-ga konjugeeritud anti-vimentin anti-kehadega (FL1-A). 65,5% V3 rakkudest olid positiivsed ning ekspresseerisid vimentiini. F: proov, mida töödeldi Alexa Fluor® 647-ga konjugeeritud anti-E-kadherin anti-kehadega (FL4-A). 99,1% V3 rakkudest olid positiivsed ning ekspresseerisid E-kadheriini.

## 2.4. Arutelu ja järeldused

Käesolev töö uuris vähkipenetreerivate peptiidide *in vitro* interaktsioone koduloomadel esinevate spontaansete vähkkasvajatega. Varem on tehtud katseid vaid hiirtega, kellel on eksperimentaalselt tekitatud kasvajakud. Käesolevas uuringus kasutati EMÜ Väikeloomakliinikus operatsioonil eemaldatud kasside ja koerte spontaanseid kasvajakud, mis on anatoomia ja füsioloogia poolest inimese kliinilistele tuumoritele sarnasemad kui eksperimentaaltuumorid närilistes (Paoloni ja Khanna 2008).

Angiogenees on vähi arengus ja metastaaside tekkel üks olulisemaid aspekte (Folkman 1971), mille käigus on üle-ekspresseritud paljud molekulid, näiteks  $\alpha\beta3$  ja  $\alpha\beta5$  integriinid (Brooks *et al.*, 1994, Erdreich-Epstein *et al.*, 2000, Buerkle *et al.*, 2002), NRP-1 (Gu *et al.*, 2003), p32 (Fogal *et al.*, 2008) ja nukleoliin (Porkka *et al.*, 2002, Hu *et al.*, 2013). *In vivo* faagiraamatukogu skriininguga on hiiremudeleid kasutades avastatud mitmeid vähiveresoontega selektiivselt seostuvaid peptiide (Arap *et al.*, 1998, Ruoslahti, 2004) ning meie töö tulemused (faagide *in vitro* kasvajakudele seondumise ja internalisatsiooni katsed koos happesuga) näitavad, et VPP-d on selektiivsed ka kasside ja koerte spontaansetel soliidtuumoritel.

EMÜ Väikeloomakliinikust saadud proovide katsete andmeid tuleb hinnata ka mõningase ettevaatlikkusega, sest pole täpselt teada, kuidas proove võeti ning säilitati, st kui pikalt olid proovid realselt toatemperatuuril või +4 °C juures enne vähibioloogia laborisse saabumist. Kui kahjustunud kude pandi veel lisaks katse tarbeks teatud ajaks 37 °C juurde, võis toimuda täiendav rakkude lüüsumine, mis võis tulemusi mõjutada. Lisaks sellele olenesid katsete tulemused ka esinduslikust koetüki valikust, mis kasvajakoe faagide rakkudele seondumis- ja sisenemiskatseteks lõigati. Näiteks mõne konkreetse faagi jaoks võidi valida ekslikult näiteks rohkem nekrootilist rakumassi või mäda sisaldav koetükk, mis võis anda madalama tiitri võrreldes sellega, kui oleks kasutatud mõnda teist kasvajakoe tükki. Et sellest põhjustatud katsete tulemuste varieeruvust edaspidi vähendada, soovitab töö autor operatsiooni teostanud arstiga konsulteerida, et vähiproovist välja valida laborikatseteks sobivaimad piirkonnad.

Arvatavasti omavad kõik katsetes kasutatud koduloomade vähirakud võrreldes hiirte vähirakkudega sarnast rakupinna retseptorite ekspresiooni, kuna nad ekspresseerivad

integriine ja NRP-1, millele seonduvad RPARPAR ja iRGD (Assa-Munt *et al.*, 2001, Sugahara *et al.*, 2009, Teesalu *et al.*, 2009), p32, millega seondub Lyp1 (Fogal *et al.*, 2008) ja TT1 (Teesalu *et al.*, avaldamata andmed) ning katsetega veel kindlaks tegemata raku retseptoreid, millele ülejäänud faagid spetsiifiliselt seonduvad (Säälik *et al.*, Toome *et al.*, avaldamata andmed). Kuna LyP-1 sisaldab krüptilist R/KXXR/K motiivi, siis võib ka seda peptiidi ekspresseeriv faag rakkudesse siseneda ka NRP-1 kaudu (Roth *et al.*, 2012).

Koerast pärit V3 piimanäärme vähirakke kultiveeriti *in vitro* koekultuuris ning nad ekspresseerisid kõrgel tasemel NRP-1, mida võis eeldada, sest nende vähirakkudega teostatud faagide sisenemise katsed andsid kõrge tiitri faagidega, mis vajavad internalisatsiooniks NRP-1 retseptori olemasolu (Sugahara *et al.*, 2009, Teesalu *et al.*, 2009). Kuna piimanäärme kasvaja on väga heterogeensed, siis uuriti ka vähirakkude päritolu. Koekultuuris kasvanud V3 rakud ekspresseerisid 99,1% E-kadheriini, mis viitab nende epiteliaalsele päritolule (Bex ja Van Roy, 2001). Saadud tulemus ühtib ka väitega, et enamik koerte piimanäärme kasvajatest on epiteliaalsed (Król *et al.*, 2012), mis ei pruugi tähendada, et kasvajakud ei ekspresseeri ka mesenhümaalsele päritolule viitavat markerit nagu vimentiin (Domagala *et al.*, 1990). Antud töös ekspresseerisid koekultuuris kasvanud V3 rakud 65,5% vimentini.

Kui võrrelda faagide *ex vivo* internalisatsioonikatseid, kus kasutati ka happepesu töötlust, siis on näha, et kahedimensionaalse koekultuurina kasvanud rakud olid faagidele ligipääsetavamad kui vähikoe tükikeste homogeniseerimisel saadud rakud, sest iRGD tiiter oli 2D kultuuri rakkudel ligikaudu kümme korda kõrgem. V3 koera piimanäärme vähirakke kultiveeriti ka 3D sferoididena. V3 rakud moodustavad sferoide suhteliselt aeglaselt võrreldes sellega, et sferoide on võimalik kasvatada nelja päevaga 400 µm diameetri suuruseks (Friedrich *et al.*, 2009). Ilmselt on põhjus kasutatavas söötmes, kuhu meie ei lisanud teistes uuringutes kasutatavaid kasvufaktoreid (Pang *et al.*, 2011, Pang *et al.*, 2012). Vaatamata sellele olid sferoidid väga vastupidavad. Alates ~ 200 µm läbimõõduga sferoididest oli näha sferoidi keskel tumedamat nekrootilist sisemust, mis tekkis tänu hapniku ja toitainete limiteeritud kättesaadavusele võrreldes perifeerias olevate rakkudega (Alvarez-Pérez *et al.*, 2005). Nekrootilise sisemuse tekkimist sferoidi keskel on võib-olla võimalik edasi lükata sagedasema söötme vahetamisega.

Sferoidid dissotsieeriti ning süstiti kahele karvutule immuundefitsiitsele hiirele kõhuõõnde, kuid kolme kuu möödudes ei indutseerinud see hiirtes vähkkasvaja teket. Seda võis tingida sferoidide töötlus dissotsiatsiooni käigus või vähirakkude vähene tumorigeensus liikidevahelise erinevuse tõttu. Põhjuseks võis olla ka sferoidide vanus ja muutunud geenide ekspressioon (Friedrich *et al.*, 2009) võrreldes värskelt 2D koekultuuris kasvanud V3 rakkudega, sest pärast nende esmakordset süstimist tekkis ühel hiirel kuu aja möödudes kõhuõõnde metastaasidega vähkkasvaja. Pärast teist kõhuõõnde süstimist tekkis ka teisel hiirel kolme kuu möödudes metastaasidega soolekasvaja.

Lähtuvalt töö eesmärkidest võib teha järgnevad järeldused:

1. Laborihiirte vähimudelites väljatöötatud VPP-d omavad vähiselektiivsust kasside ja koerte spontaansetel kasvajatel. Ilmselt omavad kõik katsetatud koduloomade vähirakud võrreldes hiirtega sarnast rakupinna retseptorite ekspressiooni;
2. Koeralt pärit ja koekultuuri viidud piimanäärme vähirakkudel (V3) toimub faagide *in vitro* rakkudele seondumine ja sisenemine sarnaselt sama kasvajakoe homogeniseerimisel saadud rakususpensioonile;
3. Koeralt pärit ja koekultuuri viidud piimanäärme vähirakud (V3) on võimelised indutseerima hiires vähkkasvajad, moodustama kolmedimensionaalselt kasvavaid sferoide, ekspresseerivad NRP-1 ning võivad olla epiteliaalset päritolu.

## KOKKUVÕTE

Pahaloomulised kasvaja on kardiovaskulaarsete haiguste järel nii Eestis kui ka mujal Euroopa riikides sageduselt teiseks suremuse põhjuseks (Eigo *et al.*, 2013). Vaid väikene osa manustatud vähiravimist jõuab vähikoosse ja vähirakkudeni (Heldin *et al.*, 2004, Sugahara *et al.*, 2010, Alberici *et al.*, 2012). Üks võimalus vähiravimite efektiivsemaks muutmiseks on kasutada kullermolekule, mis seonduvad kasvajakoes üle-ekspresseeritud sihtmärkidega (Wang *et al.*, 2011). Ravimite kasvajakoe parenhüümi viimiseks kasutatakse vähkipenetreerivaid peptiide (ingl *tumor-penetrating peptides*, VPP), mis põhjustavad vähiveresoonte permeaabluse ajutist suurenemist. VPP manustamisel koos ravimiga levivad nii peptiid kui ravim kasvaja veresoontest välja (Teesalu *et al.*, 2009, Sugahara *et al.*, 2010). Käesoleva töö eesmärgiks oli selgitada, kas laborihiirtes väljatöötatud VPP-d omavad vähiselektiivsust ka kasside ja koerte spontaansetel kasvajatel.

2013. a veebruarist kuni 2014. a märtsini analüüsiti kokku 13-lt kassilt ja koeralt operatsiooni käigus eemaldatud vähikude. Olenevalt vähiproovi suurusest teostati faagide *in vitro* rakkudele seondumise katse, faagide *ex vivo* rakkudesse sisenemise katse või mõlemad. Testiti järgmisi faage: G7, RPARPAR, TT1, CTK, iRGD, LyP-1, 40 PS/KT, Glim1, Glim2 ning raamatukogud CX<sub>7</sub>C ja X<sub>7</sub>. Lisaks sellele kultiveeriti koera piimanäärme kasvajakarakke kahe- ja kolmedimensionaalselt, teostati voolutsütomeetriline analüüs, et määrata koera kasvajakarakudel erinevate valkude ekspressioon ning immunofluorestsentsanalüüs faagide tuvastamiseks kasside ja koerte kasvajakudedes.

Faagide *in vitro* seondumiskatsed näitasid, et kõik testitud VPP-d oma pinnal eksponeerivad faagid akumuleeruvad kasside ja koerte vähirakkudele. 13-st analüüsitud kasvaja koeproovist oli näha, et kõige enam seonduvad erinevat tüüpi kasvajakarakkudele RPARPAR ja iRGD faagid (keskmiselt 350 korda enam kui kontrollfaag). Faagide *ex vivo* sisenemiskatsete tulemused näitasid, et pärast vähikudede töötlemist happelise puhvriga sisenes rakkudesse kõige enam iRGD faag. EMÜ Väikeloomakliinikust saadud seitsmest proovist õnnestus kultiveerida kolme koeproovi (kaks neist olid koera piimanäärme kasvaja ning üks koera kilpnäärme kartsinoom) rakke. Koera piimanäärme kasvajakarakud (V3), mida kultiveeriti kahedimensionaalses koekultuuris, moodustasid kolmedimensionaalselt kasvavaid

sferoide. Koekultuuris kasvanud V3 rakkudest ekspresseeris 99,1% E-kadheriini, 50,9% rakkudest NRP-1 ning 65,5% rakkudest vimentini.

Lähtuvalt töö eesmärkidest võib teha järgnevad järeldused: laborihiirte vähimudelites väljatöötatud VPP-d omavad vähiselektiivsust kasside ja koerte spontaansetel kasvajatel. Ilmselt omavad kõik katsetatud koduloomade vähirakud võrreldes hiirtega sarnast rakupinna retseptorite ekspressiooni; koeralt pärit ja koekultuuri viidud piimanäärme vähirakkudel toimub faagide *in vitro* rakkudele seondumine ja sisenemine sarnaselt kasvajakoe homogeniseerimisel saadud rakususpensioonile; koeralt pärit ja koekultuuri viidud piimanäärme vähirakud indutseerivad hiires vähkkasvajat, on võimelised moodustama kolmedimensionaalselt kasvavaid sferoide, ekspresseerivad NRP-1 valku ning võivad olla epiteliaalset päritolu.

# **In vitro interactions of tumor-penetrating peptides with spontaneous tumours of dogs and cats**

Kairit Kukk

## **SUMMARY**

Malignant tumours are the second most frequent cause of mortality, after cardiovascular diseases, in Estonia and in other European countries (Eigo *et al.*, 2013). Insufficient amount of the administered anticancer drug reaches the cancer tissue and tumour cells (Heldin *et al.*, 2004, Sugahara *et al.*, 2010, Alberici *et al.*, 2012). One possibility to enhance the efficacy of anticancer drugs is to use peptide-based affinity reagents that specifically bind to over-expressed target sites in the tumour (Wang *et al.*, 2011). Tumor-penetrating peptides (TPP) target cancer parenchyma and cause temporary increase in the permeability of cancer blood vessels. Co-administration of a tumour-penetrating peptide with anti-cancer drugs or cargo coupled to a TPP, both facilitate escape from the vasculature and spread beyond blood vessels (Teesalu *et al.*, 2009, Sugahara *et al.*, 2010). The aim of this study was to investigate if VPP-s developed in mouse xenograft tumour models are selective to spontaneous tumours in cats and dogs.

From February 2013 until March 2014, a total of 13 cancer tissue samples, removed from dogs and cats during surgery, were analysed. Phage *in vitro* binding, *ex vivo* penetration assay or both were performed depending on the size of the tissue. The following phages were tested: G7, RPARPAR, TT1, CTK, iRGD, LyP-1, 40 PS/KT, Glim1, Glim2 and libraries CX<sub>7</sub>C and X<sub>7</sub>. In addition, the canine mammary gland tumour cells were cultured in a monolayer and three-dimensional (3D) cell culture, flow cytometric analysis was used to detect protein expression on dog cancer cells and immunofluorescence assay was performed to detect phage tissue distribution in cat and dog cancer tissues.

Phage *in vitro* binding assay results suggested that all tested phages expressing VPP-s on their coat protein accumulated to cats and dogs cancer cells. Phages carrying RPARPAR or iRGD peptide bound to different type of cancer cells in all 13 samples around 350-fold over the control phage. Phage *ex vivo* penetration assay with low-pH wash showed that iRGD phage

internalized the most. We managed to cultivate cancer cells from 3 out of 7 tissue samples from EMÜ Small-animal Clinic (two of them were canine mammary gland tumours and one of them was canine thyroid cancer). Canine mammary gland tumour cells (V3) that grew in 2D cell culture were also able to grow as 3D spheroids. 99.1% of the V3 cells cultivated in 2D cell culture expressed E-cadherin, 50.9% of the cells expressed neuropilin-1 (NRP-1) and 65.5% of the cells expressed vimentin.

The study indicated that VPP-s developed in mouse xenograft tumour models are tumour selective to spontaneous tumours in cats and dogs. The results suggest that all tested tumour cell samples have similar cell surface receptor expression to mice xenograft models. Phage display assays showed no marked difference in cell binding or internalisation with dog mammary gland cancer cells in suspension derived from the tumour tissue compared with the 2D cell culture. We showed that dog mammary gland cancer cells cultured in 2D cell culture were able to induce cancer in mice, expressed NRP-1, could be of epithelial origin and grow as 3D spheroids.

## **TÄNUAVALDUSED**

Täna väga professor Tambet Teesalu, kes andis mulle võimaluse teha oma magistritöö Tartu Ülikooli vähibioloogia laboris ning juhendas nii praktilises töös kui kirjalikus osas. Samuti tänan kogu labori meeldivat kollektiivi meetodite õpetamise ja sellega seonduva abi eest. Eraldi soovin välja tuua oma laboripoolse otsese juhendaja Tarmo Mölder-i ning Pille Sääliku ja Kadri Toome. Lisaks sellele tänan oma kaasjuhendajat Margus Poogat heade nõuannete eest töö kirjaliku vormistamise osas.

## KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Abbott, A. (2003). Cell culture: biology's new dimension. *Nature*, 424(6951), 870–872.

Ackermann, H. W. (2012). Bacteriophage electron microscopy, chapter 1. Lobočka, M., Szybalski, W. T. (Eds). *Advances in virus research. Bacteriophages, part A*. Elsevier, UK.

Alberici, L., Roth, L., Sugahara, K. N., Agemy, L., Kotamraju, V. R., Teesalu, T., ... & Ruoslahti, E. (2013). De novo design of a tumor-penetrating peptide. *Cancer research*, 73(2), 804–812.

Alvarez-Pérez, J., Ballesteros, P., & Cerdán, S. (2005). Microscopic images of intraspheroidal pH by <sup>1</sup>H magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 18(6), 293–301.

Arap, W., Pasqualini, R., & Ruoslahti, E. (1998). Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*, 279(5349), 377–380.

Assa-Munt, N., Jia, X., Laakkonen, P., & Ruoslahti, E. (2001). Solution structures and integrin binding activities of an RGD peptide with two isomers. *Biochemistry*, 40(8), 2373–2378.

Beck, J., Hennecke, S., Bornemann-Kolatzki, K., Urnovitz, H. B., Neumann, S., Ströbel, P., ... & Schütz, E. (2013). Genome Aberrations in Canine Mammary Carcinomas and Their Detection in Cell-Free Plasma DNA. *PloS one*, 8(9), e75485.

Béduneau, A., Saulnier, P., & Benoit, J. P. (2007). Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials*, 28(33), 4947–4967.

Bernal, S. D., Stahel, R. A. (1985). Cytoskeleton-associated proteins: their role as cellular integrators in the neoplastic process. *Critical reviews in oncology/hematology*, 3(3), 191–204.

- Berx, G., & Van Roy, F. (2001). The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Research*, 3(5), 289–293.
- Bonnett, B. N., & Egenvall, A. (2010). Age patterns of disease and death in insured Swedish dogs, cats and horses. *Journal of comparative pathology*, 142, 33–38.
- Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological reviews*, 31(4), 230.
- Brooks, P. C., Clark, R. A., & Chersesh, D. A. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, 264(5158), 569–571.
- Brown, C. K., Modzelewski, R. A., Johnson, C. S., & Wong, M. K. (2000). A novel approach for the identification of unique tumor vasculature binding peptides using an E. coli peptide display library. *Annals of Surgical oncology*, 7(10), 743–749.
- Brown, D. T., MacKenzie, J. M., & Bayer, M. E. (1971). Mode of host cell penetration by bacteriophage  $\phi$ X174. *Journal of virology*, 7(6), 836–846.
- Buerkle, M. A., Pahernik, S. A., Sutter, A., Jonczyk, A., Messmer, K., Dellian, M. (2002) Inhibition of the alpha-v integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. *British Journal of Cancer*, 86, 788–795.
- Curcio, E., Salerno, S., Barbieri, G., De Bartolo, L., Drioli, E., & Bader, A. (2007). Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials*, 28(36), 5487–5497.
- Domagala, W., Lasota, J., Bartkowiak, J., Weber, K., & Osborn, M. (1990). Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction. *The American journal of pathology*, 136(1), 219.

Eigo, N., Karelson, K., Poolakese, A., Tilk, R., Valdmaa, I. (toim.) (2013). Tervisestatistika Eestis ja Euroopas 2007, 2009 ja 2011. Atlex AS, Tartu.

Ellis, L. M. (2006). The role of neuropilins in cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 5(5), 1099–1107.

Erdreich-Epstein, A., Shimada, H., Groshen, S., Liu, M., Metelitsa, L. S., Kim, K. S., ... & Durden, D. L. (2000). Integrins alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 are expressed by endothelium of high-risk neuroblastoma and their inhibition is associated with increased endogenous ceramide. *Cancer Research*, 60(3), 712–721.

Feiss, M., & Catalano, C. E. (2005). Bacteriophage lambda terminase and the mechanism of viral DNA packaging. In *Viral Genome Packaging Machines: Genetics, Structure, and Mechanism* (pp. 5–39). Springer US.

Fogal, V., Zhang, L., Krajewski, S., & Ruoslahti, E. (2008). Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma. *Cancer research*, 68(17), 7210–7218.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285, 1182–1186.

Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., & Kunz-Schughart, L. A. (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature protocols*, 4(3), 309–324.

Giancotti, F. G., & Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science*, 285(5430), 1028–1033.

Gil-Cardesa, M. L., Villaverde, M. S., Fiszman, G. L., Altamirano, N. A., Cwirenbaum, R. A., Glikin, G. C., & Finocchiaro, L. M. E. (2010). Suicide gene therapy on spontaneous canine melanoma: correlations between in vivo tumors and their derived multicell spheroids in vitro. *Gene therapy*, 17(1), 26–36.

- Gu, C., Rodriguez, E. R., Reimert, D. V., Shu, T., Fritzsche, B., Richards, L. J., ... & Ginty, D. D. (2003). Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Developmental cell*, 5(1), 45–57.
- Hatfull, G. F., & Sarkis, G. J. (1993). DNA sequence, structure and gene expression of mycobacteriophage L5: a phage system for mycobacterial genetics. *Molecular microbiology*, 7(3), 395–405.
- Hayes, A. A., & Mooney, S. (1985). Feline mammary tumors. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 15(3), 513–520.
- He, Z., Wang, K. C., Koprivica, V., Ming, G., & Song, H. J. (2002). Knowing how to navigate: mechanisms of semaphorin signaling in the nervous system. *Science Signaling*, 2002(119), 1–10.
- Heldin, C. H., Rubin, K., Pietras, K., & Östman, A. (2004). High interstitial fluid pressure — an obstacle in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 806–813.
- Henry, C. J., Buss, M. S., Hellström, I., Hellström, K. E., Brewer, W. G., Bryan, J. N., & Siegall, C. B. (2005). Clinical evaluation of BR96 sFv-PE40 immunotoxin therapy in canine models of spontaneously occurring invasive carcinoma. *Clinical cancer research*, 11(2), 751–755.
- Hu, Q., Gu, G., Liu, Z., Jiang, M., Kang, T., Miao, D., ... & Chen, J. (2013). F3 peptide-functionalized PEG-PLA nanoparticles co-administrated with tLyp-1 peptide for anti-glioma drug delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1135–1145.
- Hurley, L. H. (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 188–200.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673–687.

- Jiang, X., Sha, X., Xin, H., Chen, L., Gao, X., Wang, X., ... & Fang, X. (2011). Self-aggregated pegylated poly (trimethylene carbonate) nanoparticles decorated with c (RGDyK) peptide for targeted paclitaxel delivery to integrin-rich tumors. *Biomaterials*, 32(35), 9457–9469.
- Król, M., Pawłowski, K. M., Szyszko, K., Maciejewski, H., Dolka, I., Manuali, E., ... & Motyl, T. (2012). The gene expression profiles of canine mammary cancer cells grown with carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) as a co-culture in vitro. *BMC veterinary research*, 8(1), 35.
- Laakkonen, P., Porkka, K., Hoffman, J. A., & Ruoslahti, E. (2002). A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nature medicine*, 8(7), 751–755.
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., & Thompson, E. W. (2006). The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of cell biology*, 172(7), 973–981.
- Lin, R. Z., & Chang, H. Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, 3(9-10), 1172–1184.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., ... & Aldredge, T. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438(7069), 803–819.
- Liu, Y., & Lu, W. (2012). Recent advances in brain tumor-targeted nano-drug delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*, 9(6), 671–686.
- MacEwen, E. G. (1990). Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer and Metastasis Reviews*, 9(2), 125–136.
- MacVean, D. W., Monlux, A. W., Anderson, P. S., Silberg, S. L., & Roszel, J. F. (1978). Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Veterinary Pathology Online*, 15(6), 700–715.

Mc Grath, S & van Sinderen, D. (ed.) (2007). *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology* (1st ed.). Caister Academic Press.

Marberger, M., Barentsz, J., Emberton, M., Hugosson, J., Loeb, S., Klotz, L., ... & Vickers, A. (2012). Novel approaches to improve prostate cancer diagnosis and management in early-stage disease. *BJU international*, *109*(s2), 1–7.

Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, *164*(2), 192–204.

Miller, E. S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T., & Rüger, W. (2003). Bacteriophage T4 genome. *Microbiology and molecular biology reviews*, *67*(1), 86–156.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*, *13*(1), 9–22.

O'Brien, S. J., Menotti-Raymond, M., Murphy, W. J., & Yuhki, N. (2002). The Feline Genome Project 1. *Annual review of genetics*, *36*(1), 657–686.

Pang, L. Y., Cervantes-Arias, A., Else, R. W., & Argyle, D. J. (2011). Canine mammary cancer stem cells are radio- and chemo-resistant and exhibit an epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Cancers*, *3*(2), 1744–1762.

Pang, L. Y., Bergkvist, G. T., Cervantes-Arias, A., Yool, D. A., Muirhead, R., & Argyle, D. J. (2012). Identification of tumour initiating cells in feline head and neck squamous cell carcinoma and evidence for gefitinib induced epithelial to mesenchymal transition. *The Veterinary Journal*, *193*(1), 46–52.

Pang, L. Y., Blacking, T. M., Else, R. W., Sherman, A., Sang, H. M., Whitelaw, B. A., ... & Argyle, D. J. (2013). Feline mammary carcinoma stem cells are tumorigenic, radioresistant, chemoresistant and defective in activation of the ATM/p53 DNA damage pathway. *The Veterinary Journal*, *196*(3), 414–423.

- Pang, L. Y., Gatenby, E. L., Kamida, A., Whitelaw, B. A., Hupp, T. R., & Argyle, D. J. (2014). Global Gene Expression Analysis of Canine Osteosarcoma Stem Cells Reveals a Novel Role for COX-2 in Tumour Initiation. *PloS one*, 9(1), e83144.
- Paoloni, M., & Khanna, C. (2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews Cancer*, 8(2), 147–156.
- Paoloni, M., Webb, C., Mazcko, C., Cherba, D., Hendricks, W., Lana, S., ... & Trent, J. (2014). Prospective Molecular Profiling of Canine Cancers Provides a Clinically Relevant Comparative Model for Evaluating Personalized Medicine (PMed) Trials. *PloS one*, 9(3), e90028.
- Parker, H. G., Shearin, A. L., & Ostrander, E. A. (2010). Man's best friend becomes biology's best in show: genome analyses in the domestic dog. *Annual review of genetics*, 44, 309.
- Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., & Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 392(6672), 190–193.
- Porkka, K., Laakkonen, P., Hoffman, J. A., Bernasconi, M., & Ruoslahti, E. (2002). A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7444–7449.
- Rajotte, D., Arap, W., Hagedorn, M., Koivunen, E., Pasqualini, R., & Ruoslahti, E. (1998). Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *Journal of Clinical Investigation*, 102(2), 430.
- Rosenberg, A., Griffin, K., Studier, F. W., McCormick, M., Berg, J., Novy, R., & Mierendorf, R. (1996). T7Select® Phage Display System: A powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *Newsletter of Novagen, Inc*, 6, 1–6.
- Roth, L., Agemy, L., Kotamraju, V. R., Braun, G., Teesalu, T., Sugahara, K. N., ... & Ruoslahti, E. (2012). Transtumoral targeting enabled by a novel neuropilin-binding peptide. *Oncogene*, 31(33), 3754–3763.

- Rowell, J. L., McCarthy, D. O., & Alvarez, C. E. (2011). Dog models of naturally occurring cancer. *Trends in molecular medicine*, 17(7), 380–388.
- Ruoslahti, E. (2002). Specialization of tumour vasculature. *Nature Reviews Cancer*, 2(2), 83–90.
- Ruoslahti, E. (2004). Vascular zip codes in angiogenesis and metastasis. *Biochemical Society Transactions*, 32(3), 397–402.
- Sargan, D. R. (2004). IDID: inherited diseases in dogs: web-based information for canine inherited disease genetics. *Mammalian Genome*, 15(6), 503–506.
- Satelli, A., & Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(18), 3033–3046.
- Senger, D. R., Claffey, K. P., Benes, J. E., Perruzzi, C. A., Sergiou, A. P., & Detmar, M. (1997). Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13612–13617.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705), 1315–1317.
- Smith, G. P., & Petrenko, V. A. (1997). Phage display. *Chemical reviews*, 97(2), 391–410.
- Smith, R. A., Duffy, S. W., Brawley, O. W. (2010). Cancer screening and early detection, chapter 34. In Hong, W. K., Bast, R. C., Hait, W. N., Kufe, D. W., Polloc, R. E., Weichselbaum, R. R., Holland, J. F., & Frei, E III. (Eds.). *Holland-Frei Cancer Medicine* 8<sup>th</sup> ed., (Vol. 8). PMPH, USA.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., & Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92(6), 735–745.

Sommers, C. L., Walker-Jones, D., Heckford, S. E., Worland, P., Valverius, E., Clark, R., ... & Gelmann, E. P. (1989). Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells. *Cancer research*, *49*(15), 4258–4263.

Starkey, M. P., Scase, T. J., Mellersh, C. S., & Murphy, S. (2005). Dogs really are man's best friend—Canine genomics has applications in veterinary and human medicine!. *Briefings in functional genomics & proteomics*, *4*(2), 112–128.

Sugahara, K. N., Teesalu, T., Karmali, P. P., Kotamraju, V. R., Agemy, L., Girard, O. M., ... & Ruoslahti, E. (2009). Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer cell*, *16*(6), 510–520.

Sugahara, K. N., Teesalu, T., Karmali, P. P., Kotamraju, V. R., Agemy, L., Greenwald, D. R., & Ruoslahti, E. (2010). Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science*, *328*(5981), 1031–1035.

Takada, Y., Ye, X., & Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol*, *8*(5), 215.

Teesalu, T., Sugahara, K. N., Kotamraju, V. R., & Ruoslahti, E. (2009). C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(38), 16157–16162.

Teesalu, T., Sugahara, K. N., & Ruoslahti, E. (2012). 2 Mapping of Vascular ZIP Codes by Phage Display. *Methods in enzymology*, *503*, 35.

Thamm, D. H., Kurzman, I. D., King, I., Li, Z., Sznol, M., Dubielzig, R. R., ... & MacEwen, E. G. (2005). Systemic administration of an attenuated, tumor-targeting *Salmonella typhimurium* to dogs with spontaneous neoplasia: phase I evaluation. *Clinical cancer research*, *11*(13), 4827–4834.

- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442–454.
- Vail, D. M., & Macewen, E. G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer investigation*, 18(8), 781–792.
- Wang, J., Liu, Y., Teesalu, T., Sugahara, K. N., Kotamrajua, V. R., Adams, J. D., ... & Soh, H. T. (2011). Selection of phage-displayed peptides on live adherent cells in microfluidic channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17), 6909–6914.
- Wittenburg, L. A., Gustafson, D. L., & Thamm, D. H. (2010). Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of combined valproic acid/doxorubicin treatment in dogs with spontaneous cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(19), 4832–4842.
- Yasuda, H. (2008). Solid tumor physiology and hypoxia-induced chemo/radio-resistance: novel strategy for cancer therapy: nitric oxide donor as a therapeutic enhancer. *Nitric Oxide*, 19(2), 205–216.
- Yoshida, K., Saito, T., Kamida, A., Matsumoto, K., Saeki, K., Mochizuki, M., ... & Nakagawa, T. (2013). Transforming growth factor- $\beta$  transiently induces vimentin expression and invasive capacity in a canine mammary gland tumor cell line. *Research in veterinary science*, 94(3), 539–541.
- Zhu, D. Z., & Pauli, B. U. (1991). Generation of monoclonal antibodies directed against organ-specific endothelial cell surface determinants. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39(8), 1137–1142.

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Dernell, W. S., Fidel, J., Kennedy, K., Hansen, S., Wiss, V., Stroud, M., Parrish-Novak, J. (2013). Tumor Paint™ technology detects naturally occurring solid tumors in dogs.

<http://www.wmis.org/abstracts/2013/data/notes.htm?papers/P578.htm?%27Tumor%20Paint%20technology%20detects%20naturally%20occurring%20solid%20tumors%20in%20dogs%27>

(1.05.2014)

Dynamic Contrast Enhanced MRI in Patients With Advanced Breast or Pancreatic Cancer With Metastases to the Liver or Lung (2014).

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01741597?term=iRGD&rank=1> (20.12.2013)

Online Mendelian Inheritance in Animals (2014). <http://omia.angis.org.au/home/>

(12.05.2014)

LISAD

**Lisa 1. Loomkatse läbiviimise luba**



ASUTUSESISESEKS KASUTAMISEKS  
PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM

Märge tehtud "22". november 2011 . a .  
Juurdepääsupiirang kehtib kuni „21.11.2016“  
või

.....  
**Alus:** Avaliku teabe seadus § 35 lg 1 p17,

**PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM**

**LOOMKATSE LÄBIVIIMISE  
LOAKOMISJON**

**OTSUS**  
Tallinn

22. november 2011 nr 90

Loomkatse läbiviimise luba

“Loomakaitseseaduse” § 45 lõike 3 ja § 47 lõike 6 a lusel ning loomkatse läbiviimise loakomisjoni 21. novembri 2011. a istungi protokollis nr 48 kohaselt **otsustati:**

1. Anda luba **Tambet Teesalu**’le (sünd. 24.01.1969, aadress Ravila 19, 50411 Tartu) loomkatse, kokkuvõtva nimetusega “Glioblastoomi penetreerivate peptiidide identifitseerimine ja prekliiniline valideerimine”, läbiviimiseks järgmistel tingimustel:

1) loomkatse läbiviimise aeg ja koht: 01.01.2012 - 31.12.2018, Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna vivaarium (ettevõtte tunnustamise otsus 16.11.2004 nr KL1201, aadress Ravila 19, 51014 Tartu);  
Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi vivaarium (ettevõtte tunnustamise otsus 30.04.2004 nr KL1202, aadress Riia 23, 51010 Tartu);

2) katseloomade liik ja arv: 3560 hiirt;

3) loomkatses rakendatavad menetlused: a) nahaaluste tuumorite tekitamiseks dissotsieeritud tuumorirakkude nahaalun injektsioon.

b) ortotroopsete eesnäärme- ja pankreasevähi mudel – üldnarkoosi all (avertiin i.p, segu ketamiinist (100mg/kg ja xyloasine'st (10 mg/kg) i.p .) süstitakse prostata vähirakud eesnäärme eessagarasse või pankrease põrnasagarasse . Kõhuõõne sein suletakse õmblustega, haav desinfitseeritakse.

c) glioomide implanteerimine ajukoesse – üldnarkoos is katselooma koljusse puuritakse 1 mm diameetriga avaus ja vähirakud süstitakse 3,5 mm sügavusele. Ava koljus suletakse luuvahaga, naha haav suletakse õmblustega ning desinfitseeritakse.

d) peale vähirakkude implantatsiooni jälgitakse reg ulaarselt tuumorite suurust, hiirte kaalu ja käitumist. Nahaaluse vähiga hiirte puhul j älgitakse, et kasvaja diameeter ei ületaks 1 cm. Kurtumuse ilmnemisel rakendatakse eutanaasiat.

Eutanaasia toimub üldnarkoosis hiirte ekssanguinats ioni teel, kasutades süsteemset perfusiooni PBSiga ( või 4% paraformaldehüüdiga). Alternatiivina kasutatakse CO<sub>2</sub>.

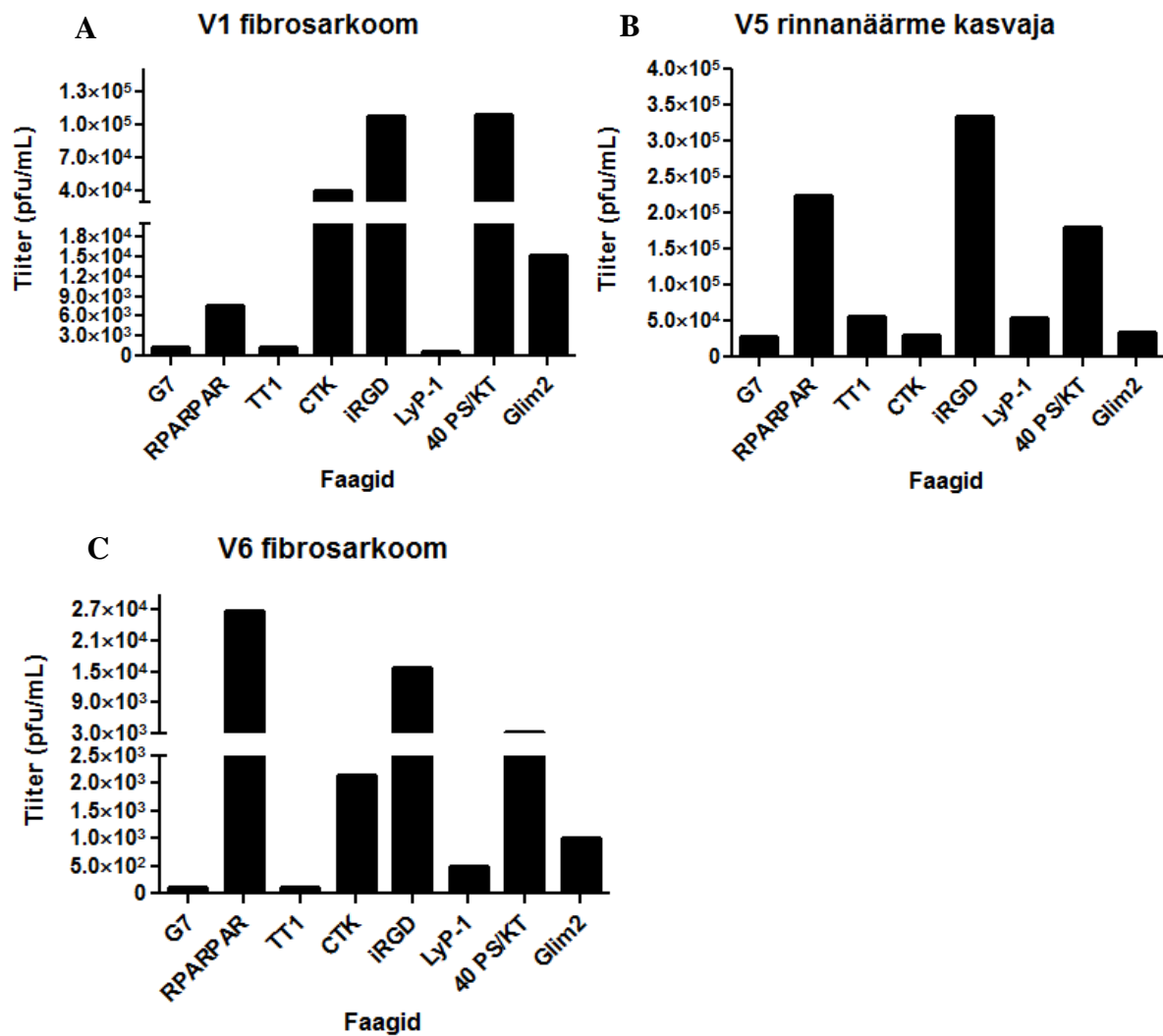
2. Otsust on õigus vaidlustada “Haldusmenetluse seadus” või “Halduskohtumenetluse seadustikus” ettenähtud korra s ja tähtaja jooksul.

Sulev Kõks

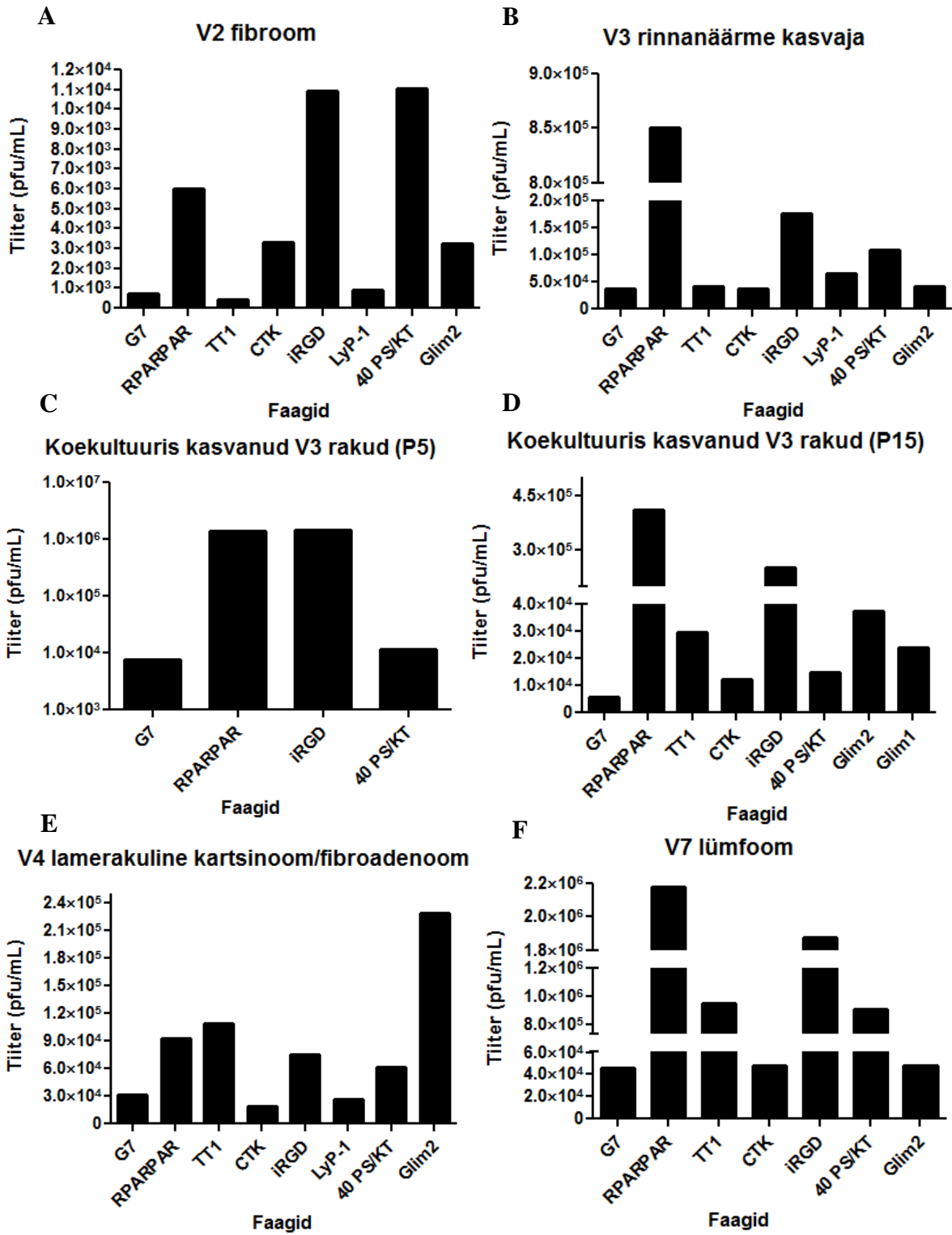
*/allkirjastatud digitaalselt/*

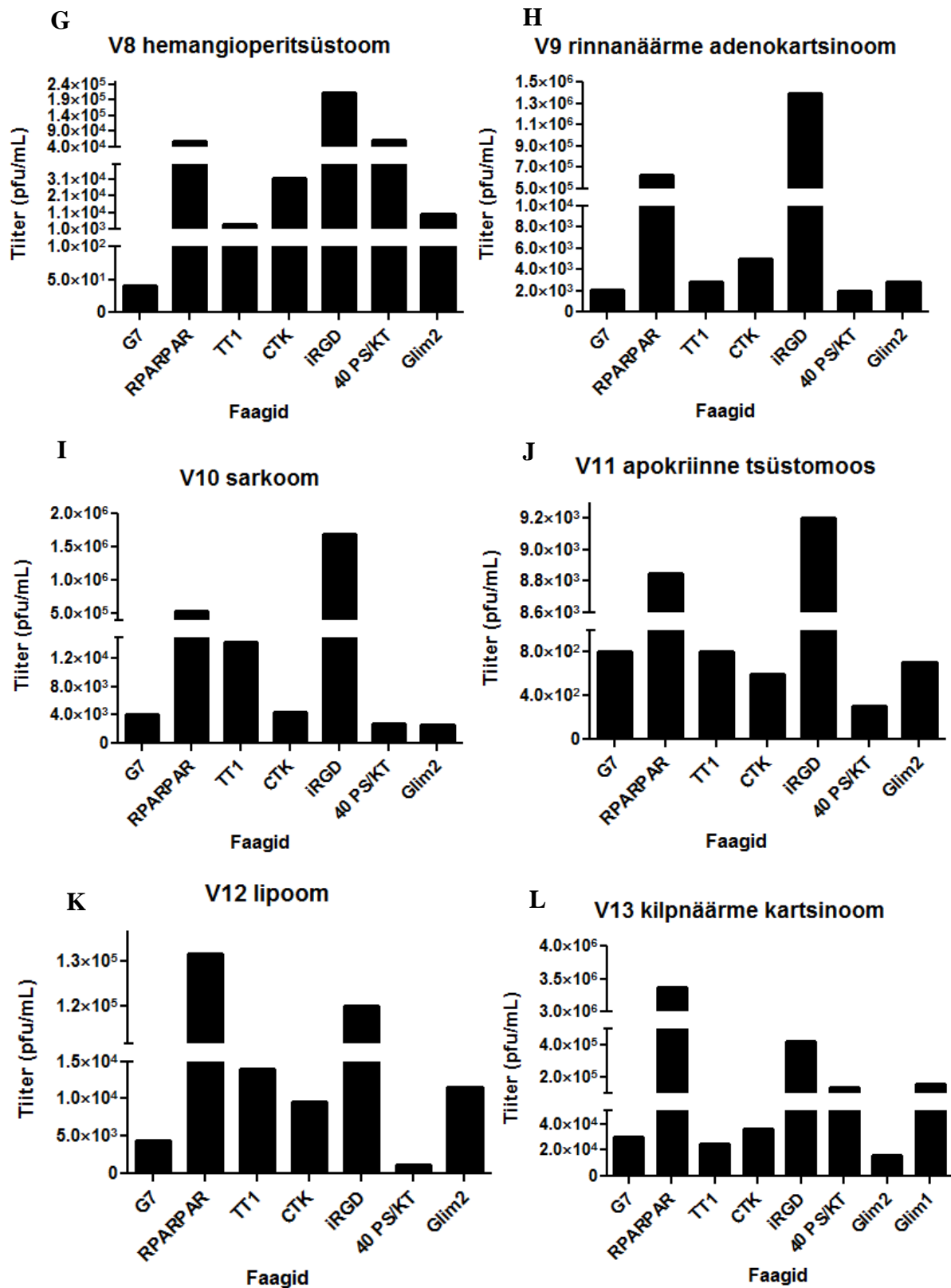
Komisjoni esimees

Lisa 2. *In vitro* seandumiskatsete tulemused

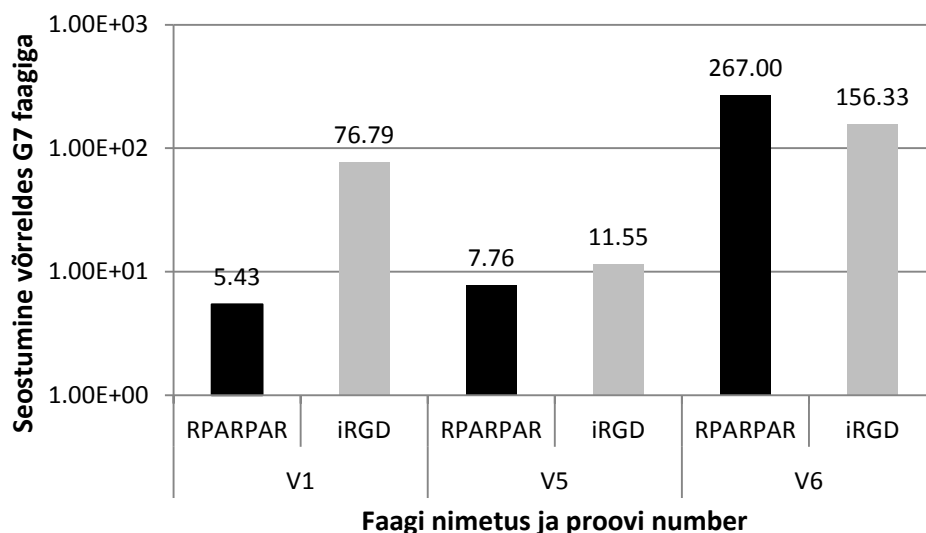


Joonis 1. VPP-sid esitlevate faagide seandumine kasside kasvujate rakkudele

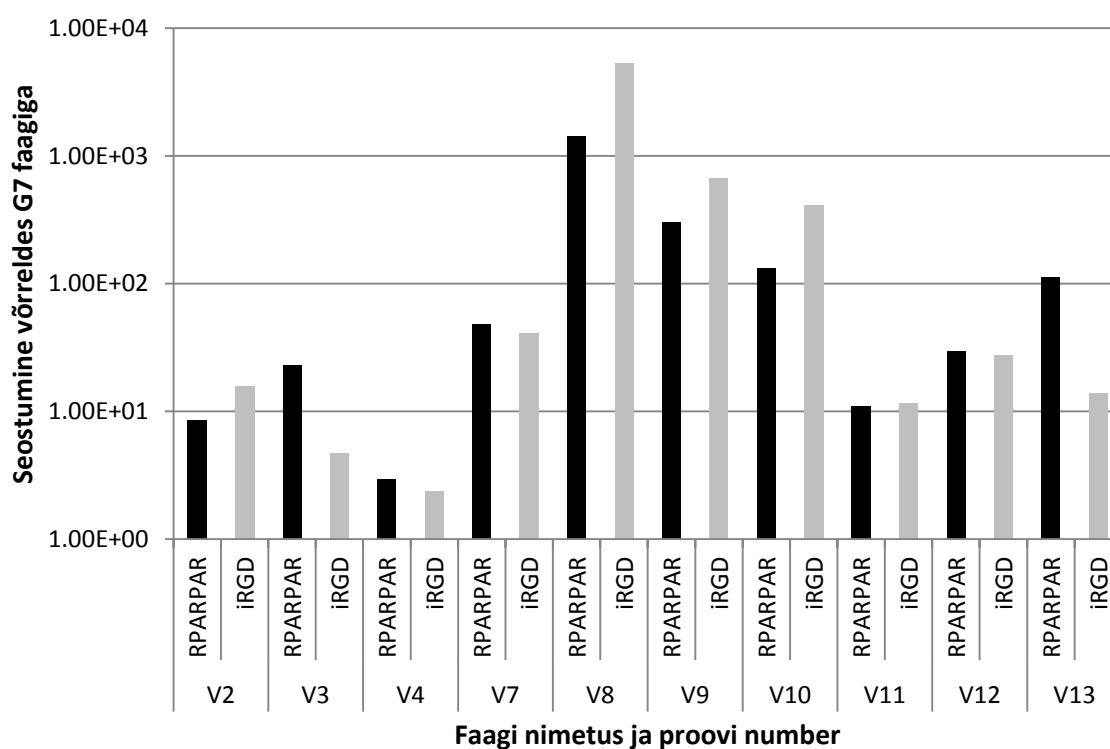




Joonis 2. VPP-sid esitlevate faagide seondumine koerte kasvaja rakkudele



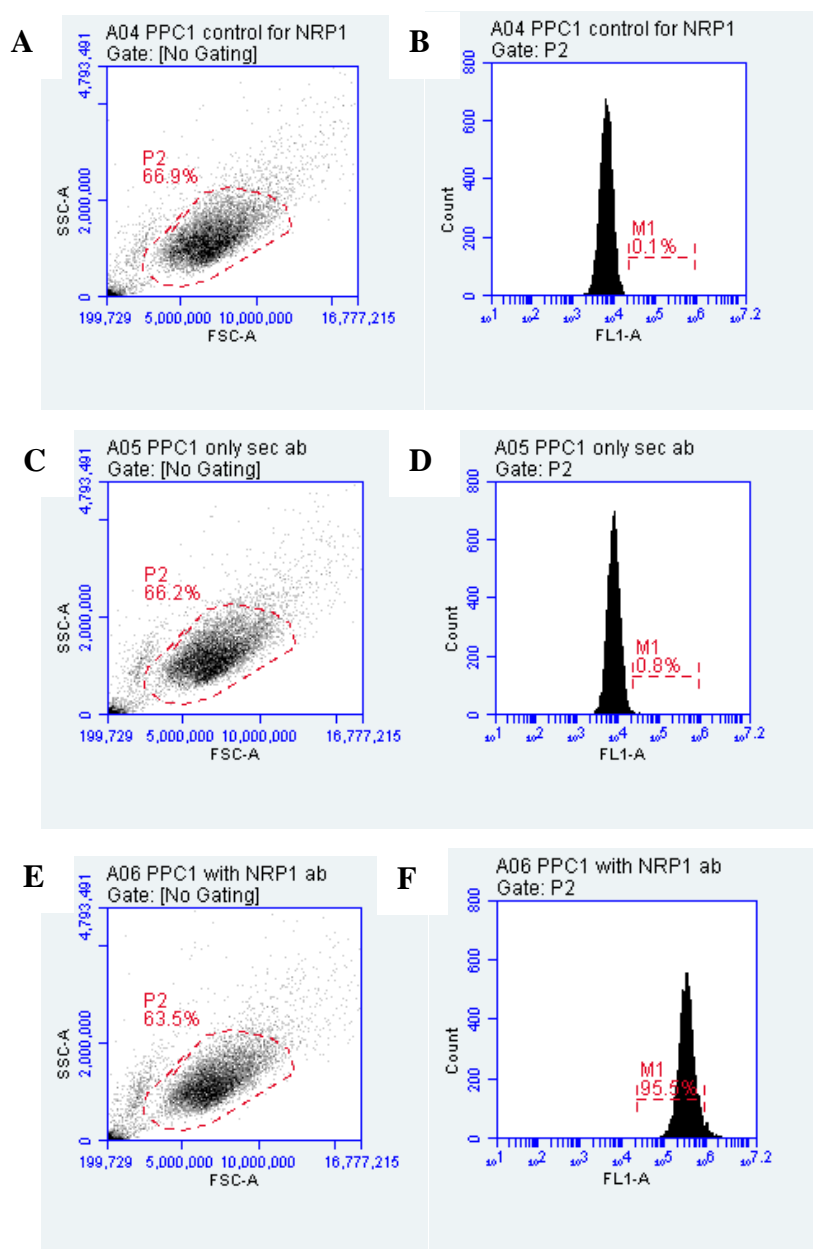
**Joonis 3. Kassidelt pärinevate vähiproovide ning RPARPAR ja iRGD tiitri tulemused normaliseerituna G7 kontrollfaagi suhtes**



**Joonis 4. Koertelt pärinevate vähiproovide ning RPARPAR ja iRGD tiitri tulemused normaliseerituna G7 kontrollfaagi suhtes**

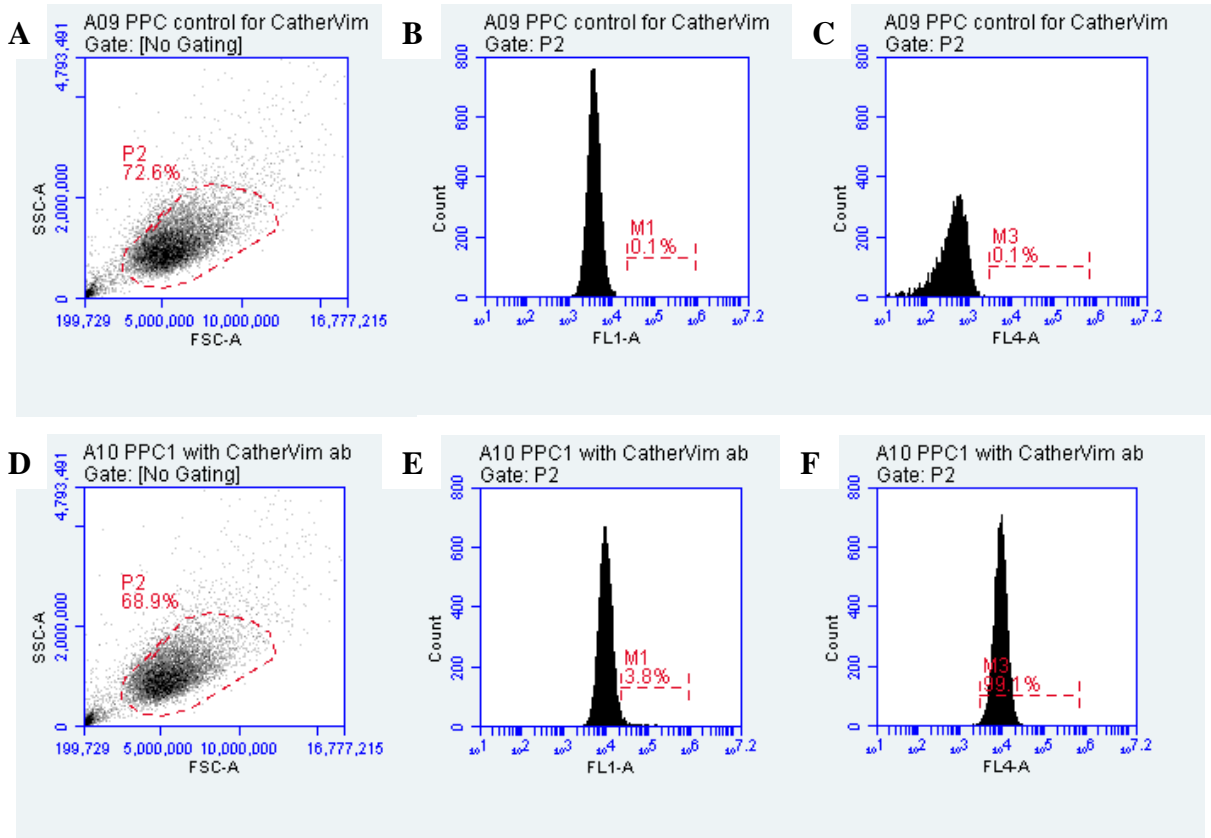
### Lisa 3. FACS analüüsi tulemused

#### a) NRP-1 ekspressioon PPC-1 rakkudel



**Joonis 5. NRP-1 ekspressioon PPC-1 rakkudel.** A, C, E: Y-teljel on külghajuvus ja x-teljel otsehajuvus, mille abil eristati PPC-1 rakke. Punase punktiirjoonega määratleti PPC-1 rakkude populatsioon. B, D, F: Värvatud PPC-1 rakud. Y-teljel on rakkude arv, x-teljel on NRP-1 tuvastamiseks kasutatud antikehad (FL1-A). B: negatiivne kontroll – antikehadega töötlemata PPC-1 rakud. Positiivsete ehk fluorestseerivate rakkude arv negatiivse kontrolli puhul jäi alla 0,1%. D: negatiivne kontroll – PPC-1 rakud, mida värviti ainult sekundaarse antikehaga. Fluorestseerivate rakkude arv negatiivse kontrolli puhul jäi alla 0,8%. F: proov, mida töödeldi Anti-NRP-1 ja sekundaarse küülikuvastase antikehaga, mis oli märgistatud Alexa-488-ga (FL1-A). 95,5% PPC-1 rakkudest olid positiivsed ning ekspresseerisid NRP-1.

b) E-kadheriini ja vimentiini ekspressioon PPC-1 rakkudes



**Joonis 6. E-kadheriini ja vimentiini ekspressioon PPC-1 rakkudes.** A, D: Y-teljel on külghajuvus ja x-teljel otsehajuvus, mille abil eristati PPC-1 rakke. Punase punktiirjoonega märgistati PPC-1 rakkude populatsiooni. B, C, E, F: Väravdatud PPC-1 rakud. Y-teljel on rakkude arv, x-telgedel on kanalid vimentiini (FL1-A) ja E-kadheriini (FL4-A) tuvastamiseks. B: negatiivne kontroll vimentiini ekspressiooni tuvastamiseks – antikehadega töötlemata PPC-1 rakud. Fluorestseerivate rakkude arv negatiivse kontrolli puhul jäi alla 0,1%. C: negatiivne kontroll E-kadheriini ekspressiooni tuvastamiseks – antikehadega töötlemata rakud. Fluorestseerivate rakkude arv negatiivse kontrolli puhul jäi alla 0,1%. E: proov, mida töödeldi FITC-ga konjugeeritud anti-vimentiin antikehaga (FL1-A). 3,8% PPC-1 rakkudest olid positiivsed ning ekspresseerisid vimentiini. F: proov, mida töödeldi Alexa Fluor® 647-ga konjugeeritud anti-E-kadheriin antikehaga (FL4-A). 99,1% PPC-1 rakkudest olid positiivsed ning ekspresseerisid E-kadheriini.

## Lisa 4. Lihtlitsents

### Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kairit Kukk (sünnikuupäev: 13.12.1988),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Vähkipenetreerivate peptiidide *in vitro* interaktsioonid kassidel ja koertel esinevate spontaansete vähkkasvajatega,

mille juhendajad on professor Tambet Teesalu ja professor 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 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, 26.05.2014.