

**TARTU ÜLIKOOL**  
**LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND**  
**MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT**

Vidrik Teder

**Vähidiagnostiliste peptiidide skriinimine *in vivo* faagidisplei meetodiga**

Magistritöö

Juhendajad Kuldar Kõiv, MSc

Ott Scheler, PhD

TARTU 2014

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Kasvajate üldiseloomustus .....	6
1.2. Vähistatistika ja -diagnostika .....	8
1.2.1. Enamlevinud vähitüübid meestel ja naistel .....	8
1.2.2. Rinnavähi diagnostika.....	9
1.2.3. Eesnäärmevähi diagnostika.....	10
1.3. Faagidisplei .....	11
1.3.1. Üldmehhanism .....	11
1.3.2. Bakteriofaagi T7 eelised .....	12
1.3.3. Faagiraamatukogu <i>in vivo</i> selekteerimine.....	13
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	16
2.1. Töö eesmärgid .....	16
2.2. Materjal ja meetodika.....	17
2.2.1. CX <sub>7</sub> C T7 415-1 raamatukogu .....	17
2.2.2. Faagi amplifitseerimise, puhastamise ja tiitrimise protokollid.....	17
2.2.3. Peptiidi kodeeriva järjestuse klonimine faagi T7 vektorisse .....	17
2.2.4. <i>In vivo</i> faagidisplei.....	18
2.2.5. <i>Ion Torrent</i> sekveneerimine ja andmeanalüüs .....	19
2.2.6. <i>qPCR</i> protokoll .....	20
2.3. Tulemused .....	21
2.3.1. Biomarkerispetsiifiliste peptiidide <i>in vivo</i> selekteerimine 4T1 rinnavähi mudelis.....	21
2.3.2. T7 CX <sub>7</sub> C-faagiraamatukogu <i>in vivo</i> selekteerimine PC-3 eesnäärmevähi mudelis.....	24

1.4. Arutelu.....	27
Järeldused .....	31
KOKKUVÕTE .....	32
Summary.....	33
TÄNUAVALDUSED.....	35
KIRJANDUSE LOETELU.....	36
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	40
LISAD .....	41
Lihtlitsents .....	53

## KASUTATUD LÜHENDID

---

<i>BRCA 1</i>	<i>human breast cancer type 1</i>	inimese rinnavähialge tüüp 1
<i>BRCA 2</i>	<i>human breast cancer type 1</i>	inimese rinnavähialge tüüp 2
DRE	<i>digital rectal examination</i>	digitaalne transrektaalne soolepalpatsioon
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>	inimese epidermaalse kasvufaktori retseptor-tüüp 2
MRT	<i>MRI, magnetic resonance tomography</i>	magnetresonantstomograafia
<i>PC-3</i>	<i>human prostate cancer cell-line</i>	inimese eesnäärmevähi rakuliin
pfu	<i>plaque forming unit</i>	faagilaikude arv
PSA	<i>prostate-specific antigen</i>	eesnäarmespetsiifiline antigeen
TRUS	<i>transrectal ultrasound</i>	transrektaalne ultraheli
<i>4T1</i>	<i>mammary carcinoma cell-line</i>	hiire piimanäärmevähi rakuliin

---

## SISSEJUHATUS

Igal aastal diagnoositakse maailmas üle 14 miljoni uue vähijuhu ning sureb üle 8 miljoni inimese. Hinnanguliselt 30% surmadest on välditavad tervisilike eluviiside ja vähki põhjustavate viiruste vastasel vaktsineerimisel<sup>1</sup>, kuid lisaks sellele saab vähki suuremust märkimisväärselt langetada haiguse varajase diagnoosimise ja õigeaegse raviga (Barton ja Harris, 1999; Moyer, 2012).

Üldjoontes koosneb varajane diagnoosimine kahest peamisest komponendist: üldine teadlikkus varajaste sümptomite osas (nt emakakaela- ja rinnavähi korral) ning rutiinsete sõeluuringute läbiviimine (ebaselgete sümptomite korral). Nii on sageliesinevate vähiliikide, meestel eesnäärmevähi ja naistel rinnavähi (Siegel jt., 2014) varajaseks avastamiseks välja töötatud mitmeid meetodeid, mille kasutamine laiaulatuslikes sõeluuringutes on küsitav kalli hinna, keerukuse, madala usaldusväärsuse või tehnoloogiast tuleneva ohu tõttu (Berg jt., 2014; Harvey, 2006; Miller jt., 2003; Moyer, 2012; Orel, 1998; Žarkovski ja Ausmees, 2009; Velonas jt., 2013).

Vähiteraapia on juba aastakümneid panustanud täppisravimite arendusse, et vähendada tugevalt tsütotoksiliste vähiravimite kõrvalmõjusid (Browder jt., 2000; Samoylova jt., 2006). Kasutades faagidisplei (*phage display*) meetodit on edukalt identifitseeritud mitmeid vähirakkude pinnal olevaid retseptoreid ja nendega seonduvaid lingande (Sugahara jt., 2010). Sellest tulenevalt eeldasime antud magistritöös, et vähispetsiifilised peptiidid annavad erinevaid kvantitatiivseid tulemusi pärast ringlemist terves ja kasvajaga hiire veres. Need, nn vähidiagnostilised peptiidid omavad kasvajaspetsiifilisi motiive, mis võimaldavad seonduda eelkõige vähiraku pinnal olevate retseptoritega (Ruoslahti, 2002b).

Selleks, et kontrollida, kas vähispetsiifiliste peptiidide hulk terves ja kasvajaga hiire veres erineb pärast kindlaksmääratud ajaperioodi, viis käesoleva magistritöö autor läbi mitmeid järjestikke *in vivo* faagidisplei katseid, millest saadud tulemuste põhjal valideeriti *Ion Torrent* ja *qPCR* meetodil välja kõige suuremaid kvantitatiivseid erinevusi näidanud peptiide.

Antud magistritöö tehti TÜ Bio-ja siirdemeditsiini instituudi Vähibioloogia uurimisgrupis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

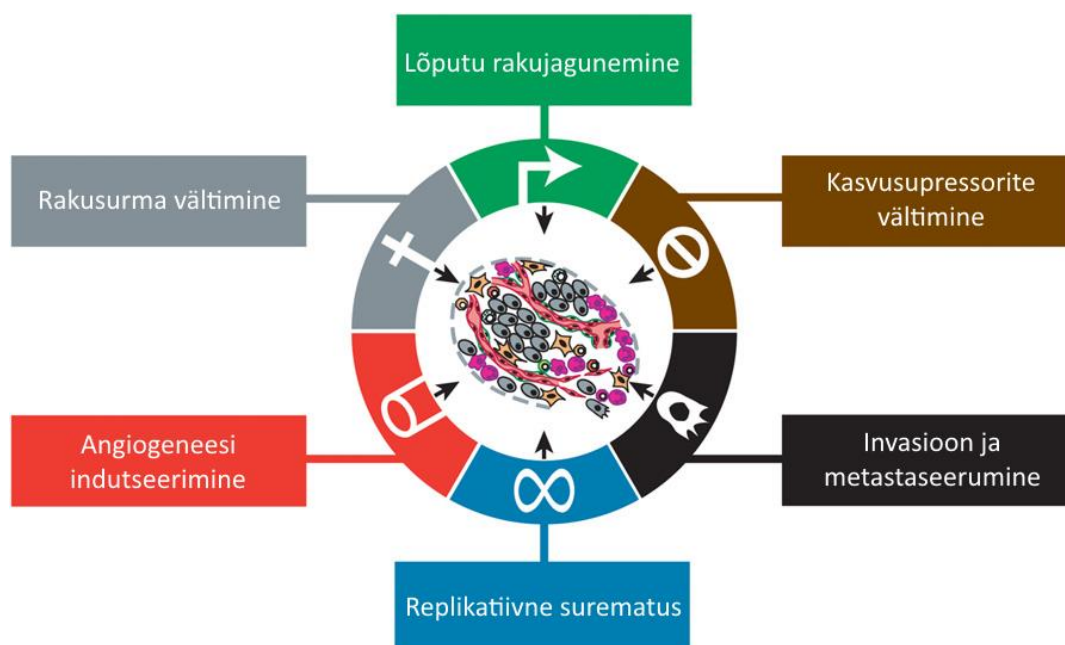
## 1.1. Kasvajate üldisloomustus

Kasvaja ehk tuumor on geneetilise materjali mutatsioonidest tingitud proliferatsiooni- ja diferentseerumishäire, mille tulemuseks on kontrollimatu rakkude kasv, küpsemine ja paljunemine. Selle tagajärjel tekib ebanormaalne rakulis-koeline moodustis ehk tuumor. Tähtis on rõhutada, et protsess on kontrollimatu, sest erinevaid koevohandeid tekib ka mitmete teistsuguste patoloogiliste protsesside korral nagu põletikud, regeneratsioon, hüpertoofia, hüperplaasia jne. Kuid sellistel juhtudel on vohangud organismi kontrolli all ja omavad kaitsekohastuslikke ülesandeid (Mesila jt., 2012).

Nii vähiravis kui ka diagnostikas on oluline teha vahet paha- ja healoomulistel kasvajatel. Esimesed neist on ilma meditsiinilise sekkumiseta letaalsed, kuna annavad siirdeid ehk metastaase teistesse kudedesse, mille tõttu tekivad mitmed uued haiguskolded. Healoomulised kasvaja põhjustavad sõltuvalt oma paiknemiskohast kas lihtsalt kosmeetilisi või talitluslikke probleeme. Seda välja arvatud juhul, kui healoomuline kasvaja paikneb endokriin- või kesknärvisüsteemis, kus lokaalse mõju tõttu võib kasvaja olla eluohtlik vaatamata oma teistele tunnustele, mis pahaloomalise kasvaja arengu ja välimusega ei ühti. Pahaloomalise kasvaja põhiliseks erinevuseks healoomulisest on invasiivne kasv ehk võime tungida naaberkudedesse ja eelnimetatud uute kasvajakollete ehk siirete andmine algkoest kaugemale. Selleks kasutavad vähirakud ära organismi vere- või lümfiringet, mis võimaldab metastaseeruda üle kogu keha (Liotta ja Stetler-Stevenson, 1991). Pahaloomalised tuumorid on harilikult ka kiirema kasvuga ning sealsetes rakkudes esineb sageli nekroosi ehk koekärbumist (Mesila jt., 2012; Proskuryakov ja Gabai, 2010). Kuid kõik vähitüübid ei moodusta alati kasvajaid – erandiks on näiteks leukeemia<sup>ii</sup>.

Järgnevalt on kirjeldatud, mis juhtub, kui terve rakk muutub vähirakuks (Joonis 1). Inimese keha koosneb mitmetest eri tüüpi rakkudest, mis kasvavad ja jagunevad väga täpselt kontrollitud viisil, et tagada organismi terviklikkus ja töövõime. Kui aga rakud jäävad vanaks või saavad kahjustada, siis nad surevad ning asendatakse mitootilisel teel uute rakkudega. Mitoosis olevad rakud sisenevad rakutsükklisse, kus nende geneetiline materjal duplitseerub ja selle tagajärjel tekivad kaks uut sama funktsiooniga tütarrakku. Selleks, et keha kasvamine ja areng toimuksid veatult, on organismil mitmeid meetmeid, mis kontrollivad, et uued duplitseerunud tütarrakud oleksid terved, funktsioneeriks normaalselt ja replitseeruksid

kontrollitud kiirusega. Lisaks signaalidele, mis indutseerivad rakke mitoosi minema, on ka signaale, mis käsivad neil kasvamine lõpetada (Hanahan ja Weinberg, 2011; Weinberg, 1995). Täiendavalt on jagunevatel rakkudel kindel replikatsioonilimiit, mis on tuntud ka kui *Hayflick*-i nähtus. *Hayflick*-i nähtus varieerub olenevalt rakutüübist, kuid normaalne inimese rakk on võimeline jagunema 40-60 korda (Hayflick, 1965). Kõik rakud, mis ei talitle vastavalt või milles esinevad parandamatud vead, suunatakse apoptoosi. Selline pidev rakkude uuenemine, väljavahetamine ning erinevad pärilikud ja mittepärilikud tegurid võivad aja jooksul endaga kaasa tuua mutatsioonide kuhjumise raku DNA-s. Kui muudatused põhjustavad vigu eelnevalt mainitud rakke reguleerivates jagunemisprotsessides, siis ei pruugi defektsed rakud minna õigeaegselt apoptoosi või moodustatakse juurde rakke, mida keha ei vaja. Selle tulemusena võivad tekkida nn kasvajakarakud (Burkhardt ja Sage, 2008; Hanahan ja Weinberg, 2011). Vaatamata sellele, et immuunsüsteem on pidevalt valmis hävitama keha jaoks võõraid muteerunud rakke, võivad mõned vähirakud olla välimuselt väga sarnased tervetele rakkudele. Just see omapära võimaldab vähirakkudel mööda hiilida ka immuunsüsteemist<sup>iii</sup>.



**Joonis 1. Vähiraku tunnused.** Illustreeriv joonis. Välja on toodud kuus põhilist tunnust, mille poolest vähirakk erineb tervest rakust. Pahaloomulise kasvaja arenguks piisab juba ainult kahe tunnuse olemasolust (Hanahan ja Weinberg, 2011). Tõlgitud eesti keelde.

## 1.2. Vähistatistika ja -diagnostika

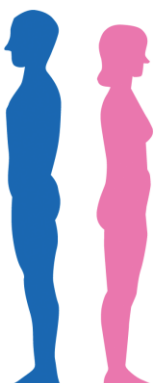
### 1.2.1. Enamlevinud vähitüübid meestel ja naistel

Hinnanguliselt on iga neljas surm Ameerika Ühendriikides seotud vähi või viimase ravi tüsistuste tagajärjel. Kuigi üldise teadlikkuse tõusu ja ennetustöö tulemusena on viimastel aastatel vähisurmade arv langenud 1-2% võrra, prognoositakse ainuüksi Ameerika Ühendriikides 2014. aastaks üle 585 000 surmaga lõppevat juhtumit (Siegel jt., 2014). Teadaolevalt on kõigest 5-10% vähijuhtumitest otseselt pärilikud ning ülejäänud 90-95% tulenevad elustiilist ja erinevatest keskkonnafaktoritest. Suurimaks haigust soodustavaks faktoriks on ülekaalulisus (30-35%), suitsetamine (25-30%) ja nakkused (15-20%) (Anand jt., 2008).

*American Cancer Society* prognoosib, et 2014. aastal esineb meeste seas kõikidest pahaloomulistest kasvajatest kõige enam eesnäärmevähi (27%) ja naiste seas rinnavähki (29%), v.a erinevad nahavähi tüübid. Eesti Vähiregistri kõige uuemate andmete (2009. a) kohaselt oli Eestis nende vähitüüpide osakaal vastavalt 26% ja 18%. Eesti uuema statistika puudumise tõttu on tabelis 1 välja toodud kümme sagedasemat vähitüüpi Ameerika Ühendriikides. Ülekaalukalt on meeste seas suurimaks probleemiks eesnäärmevähk. Sarnast tendetsi võib näha ka naistel rinnavähi korral (Siegel jt., 2014).

**Tabel 1. Kümne sagedaseima vähitüübi prognoositavad esmasjuhtumid 2014. aastaks Ameerika Ühendriikides.** Arvestamata on jäetud basaal- ja skvamoosrakuline nahavähk ning *in situ* kartsinoom (v.a kusepõievähk) (Siegel jt., 2014). Tõlgitud eesti keelde.

#### Hinnangulised uued juhud

			Mehed	Naised			
Eesnääre	233,000	27%			Rind	232,670	29%
Kops ja bronhid	116,000	14%		Kopsud ja bronhid	108,210	13%	
Sool	71,830	8%		Sool	65,000	8%	
Kusepõis	56,390	7%		Kusepõis	52,630	6%	
Melanoom	43,890	5%		Kilpnääre	47,790	6%	
Neerud ja neeruvaagen	39,140	5%		Mitte-Hodgkini lümfoom	32,530	4%	
Mitte-Hodgkini lümfoom	38,270	4%		Melanoom	32,210	4%	
Suuõõs ja neel	30,220	4%		Neerud ja neeruvaagen	24,780	3%	
Leukeemia	30,100	4%		Pankreas	22,890	3%	
Maks ja sapijuha	24,600	3%		Leukeemia	22,280	3%	
<b>Kõik paikmed</b>	<b>855,220</b>	<b>100%</b>			<b>Kõik paikmed</b>	<b>810,320</b>	<b>100%</b>

### 1.2.2. Rinnavähi diagnostika

Rinnavähk ehk rinnanäärme pahaloomuline kasvaja on üks kõige sagedamini esinevaid vähivorme naistel ning väga harvaesinev meestel (Brinton jt., 2008). Rinnanääre koosneb rasv-, side- ja näärmekoest, mis on jagatud sagarikeks. Naiste näärmesagarikest suunduvad nibusse piimajuhad ja suurem osa vähikolletest (75%) saabki alguse piimajuhade limaskestast, harvem näärmesagarikest (5-10%)<sup>iv</sup>. Igal aastal diagnoositakse Eestis üle 600 rinnavähi esmase juhu, neist üle 30% on haigus avastamise hetkel kaugelarenenud (Aareleid jt., 2005). Rinnavähk ei pruugi varajases staadiumis anda selgeid sümptomeid. Enamikel juhtudel esineb turse, valulikkus, nahamuutus või tihend rinnas, vahel ka kaenlaaluses piirkonnas. Hilisemas faasis võib märgata rinna või nibu asendi, kuju või värvi muutust. Lisaks võib esineda rinnanibu sissetõmmet ning ohumärgiks on ka nibukaudne eritis või veritsus (Padrik ja Everaus, 2013).

Rinnavähi varajasel diagnoosimisel on oluline roll rinnavähi sõeluuringutel. Valdavalt on põhilisteks meetoditeks pindmine läbikatsumine ehk palpatsioon ja rindade röntgenuuring ehk mammograafia. Kui vähirakud ei ole tunginud ümbritsevasse kudedesse, on ravi efektiivsus 98-100%<sup>v</sup>. Kuna kasvajatüki ja mitteohtliku tsüsti erinevus pole mammograafia abil tihti eristatav, siis on andmete kinnitamiseks vaja läbi viia lisauuringud, näiteks biopsia. Umbes 20%-l haigusjuhtudest ei suuda mammograaf olemasolevat vähkkasvajad leida ning pidevate kontrollimiste ohuks on tehnoloogiast tulenev kõrge kiirgusdoos (Barton ja Harris, 1999). Seetõttu viiakse alla 30-aastaste ja rasedate korral läbi ultraheliuuringuid, vahel ka mammograafilise leiu täpsustamiseks. Kuna ultraheli meetod ei ole nii tundlik haiguskollete suhtes, siis ei kasutata seda rutiinsetes sõeluuringutes. Kui on kahtlus aga mitme vähikolde olemasolule ühes rinnas, siis kasutatakse lisauuringutena magnetresonantstomograafiat (MRT), mille kõrge tundlikkus aitab paremini planeerida operatsiooni. MRT miinuseks on kõrge hind ja madal spetsiifika, mis ei võimalda vahet teha hea- ja pahaloomulisel kasvajal (Berg jt., 2014; Harvey, 2006; Orel, 1998).

Lisaks on täheldatud, et umbes 20-30%-l haigetel patsientidel on kasvajas inimese epidermaalse kasvufaktori retseptor-tüüp 2 (*HER2, human epidermal growth factor receptor-type 2*) üleproduktsoon. See retseptor reguleerib rinnanäärme epiteelrakkude arengut ja kasvu. Viga *HER2* geenis põhjustab retseptorite rohkust, mis omakorda kiirendab agressiivset tüüpi rinnavähkide progresseerumist (De Abreu jt., 2014; Mitri jt., 2012). Täiendavalt tehakse ka geneetilisi sõeluuringuid, mis on kasutusel kõrgema riskifaktoriga naiste puhul, kelle lähisuguvõsas on esinenud rinnavähijuhtumeid. Geenitestide abil on võimalik leida muutusi

näiteks inimese rinnavähialge tüüp 1 ja 2 geenides (*BRCA1* ja *BRCA2*, *human breast cancer type 1* ja *2*), mis on seotud 90% päritavate rinnavähijuhtudega. Kuigi geenitest annab täpse ülevaate vähi soodumusest, on siiski tegu veel üsnagi kalli ja mitte nii laialtlevinud meetodiga. Naistel, kellel on vigane *BRCA* geen, on viis korda kõrgem risk haigestuda rinnavähki. Hinnanguliselt on kõigest 5-10% rinnavähi juhtudest pärilikud (Easton, 1999; Gage jt., 2012).

### 1.2.3. Eesnäärmevähi diagnostika

Eesnäärmevähk on selgelt kõige levinum vähitüüp meestel. Varajases arengustaadiumis olev eesnäärmevähk on üldiselt edukalt ravitav, kuid õigeaegse diagnoosimise teeb keeruliseks selgete sümptomide puudumine. Sagedamini võivad tekkida urineerimishäired, mis on põhilisteks vaegusteks ka eesnäärme healoomulise kasvaja ehk prostatiidi puhul. Harvem võib esineda verd spermas või uriinis (Miller jt., 2003). Kõige kindlam ja usaldusväärsem diagnostiline meetod on eesnäärme biopsia ehk koetüki võtmine pärasoole kaudu. Enamasti viiakse seda läbi ainult eelnevate uuringute põhjal tekkinud reaalse kahtluse korral, kuna protseduuriga kaasneb tõsine infektsioonioht ning kõrvalnähtudena võib esineda pärakukaudset veritsust ja valulikkust. Alternatiivsete võimalustena on kasutusel mitmed väheminvasiivsed meetodid nagu digitaalne transrektaalne soolepalpatsioon (*DRE*, *digital rectal examination*) või transrektaalne ultraheli (*TRUS*, *transrectal ultrasound*). Samuti aitavad täiendavalt kudede anomaaliaid tuvastada MRT või kompuutertomograafiaga. Siiski on meetoditel omad puudused nagu kõrge hind, protseduuri keerukus, kõrvalnähtud ja madal spetsiifilisus (Miller jt., 2003; Žarkovski ja Ausmees, 2009; Velonas jt., 2013).

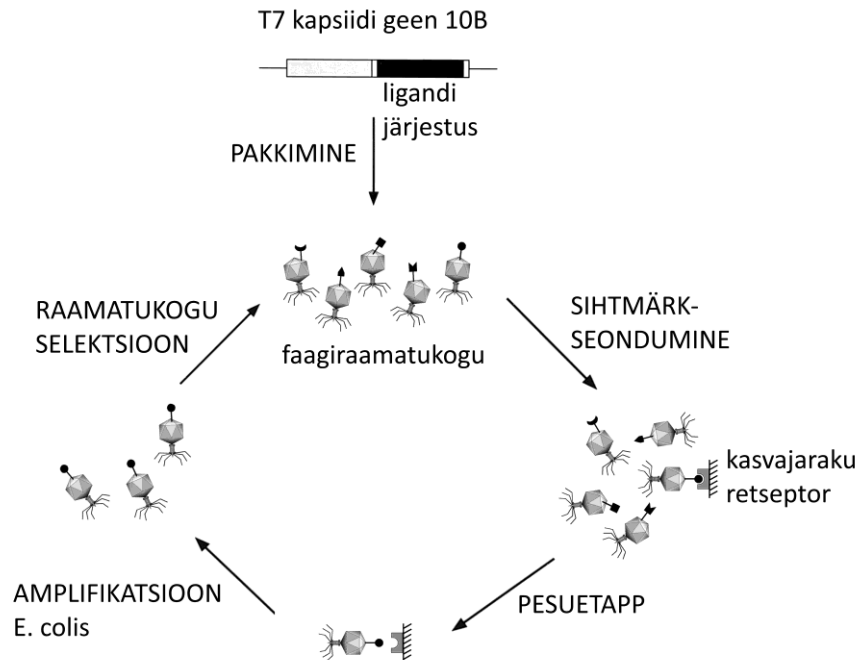
Rutiinse molekulaardiagnostilise meetodina on 1986. aastast eesnäärme laiaulatusliku sõeluuringuna kasutatud *PSA*-teste (*prostate-specific antigen*, eesnäärmespetsiifiline antigeen), mis on siiani täpsem ja levinuim veremarker, mida kasutatakse erinevate eesnäärmehaiguste diagnostikas (Žarkovski ja Ausmees, 2009). *PSA* on spermat vedeldav ejakulaat, mida esineb väikestes kogustes meeste vereseerumis. On täheldatud, et erinevate eesnäärme probleemide puhul *PSA* näitaja veres tõuseb (Lilja, 2003; Velonas jt., 2013). Ühe uuringu kohaselt on tegu siiski ebausaldusväärse testiga ning potentsiaalne kasu ei kaalu üles valepositiivsete diagnooside ja sellest tulenevate ravi kõrvalmõjude kahjulikkust. Statistiliselt suudab *PSA*-test ära hoida kõigest 0-1 surma 1000-st uuringu läbinud mehest (Moyer, 2012).

### 1.3. Faagidisplei

#### 1.3.1. Üldmehhanism

Faagidisplei on meetod, mis uurib valk-valk, valk-peptiid ja valk-nukleiinhappe vahelisi interaktsioone, kasutades baktereid nakatavaid viiruseid ehk bakteriofaage. Rakupinnal olevate peptiidide uurimine ja nende äratundmine on oluline, et arendada täppisravimeid ning tõhusamaid diagnostilisi meetodeid erinevate haiguste, sh vähkkasvajate vastu (Sergeeva jt., 2006). Nii nagu vähk, on heterogeensed ka vähiga seotud biomarkerid, mis on iseloomulikud erinevatele kasvajatüvedele. Need vähispetsiifilised peptiidid raku pinnal või vereringes võimaldavad anda olulist informatsiooni vähi diagnoosimisel – pahaloomulisus, kasvukiirus, staadium jne (Ruoslahti, 2002a; Samoylova jt., 2006). Veel üsnagi hiljuti tugines võitlus vähiga ainult empiirilistele koekultuuri- ja loomudelitele. Kuid sealt saadud andmed ei võimaldanud usaldusväärselt prognoosida, kui kiirekasvulise kasvaja fenotüübiga oli tegu ning kui potentsiaalne on metastaaside teke. Paljudel juhtudel alustati koheselt väga agressiivsete ravimeetoditega. Sellistel puhkudel olid sagedased erinevad tüsistused, mida põhjustasid suured ravimidoosid (Browder jt., 2000; Ruoslahti, 2002a).

Faagidisplei üldine kontseptsioon näeb välja selline, et faagi katevalku kodeerivasse geeni lisatakse huvipakkuvat peptiidi kodeeriv DNA järjestus. Kuna genotüüp on seotud fenotüübiga, siis ekspresseeritakse peptiid faagi partikli pinnale (Smith, 1985). See võimaldab luua suuri faagiraamatukogusid, kus faagide pinnal saab kuvada piiramatul hulgal erinevaid peptiidseid järjestusi. Raamatukogudest omakorda selekteeritakse *in vitro* või *in vivo* katse abil välja huvipakkuvad peptiidid, mis seonduvad uuritava sihtmärgiga. Seejärel pestakse ära mittespetsiifiliselt seondunud faagid ning pärast seda on võimalik allesjäänud sihtmärkspetsiifiliste ligandidega faage paljundada *E. coli*-s. Nii võib läbi viia mitmeid seleksiooniringe, et afiinsuse alusel välja sõeluda kõige tugevamalt seonduvaid pinnaligande (Joonis 2). Selekteeritud ligande saab üksikasjalikumalt uurida ja identifitseerida sekveneerimise teel (Pande jt., 2010; Sergeeva jt., 2006).



**Joonis 2. Bakteriofaag T7 faagidisplei selektsioon.** T7 kapsiidivalgu kodeerivasse geeni *10B* sisestatakse peptiidi kodeeriv DNA järjestus, mis ekspresseeritakse faagi pinnale. Järgnevalt viiakse läbi sihtmärkseondumine, mille abil sõelutakse välja uuritava sihtmärgiga seonduvad peptiidid ning mittespetsiifilised faagid pestakse ära. Kõrgema afiinsusega seondujate leidmiseks viiakse läbi mitmeid selektsiooniringe. Joonis tehtud (Krumpe ja Mori, 2006) põhjal.

### 1.3.2. Bakteriofaagi T7 eelised

Faagidispleis kasutatakse mitmeid bakteriviiruseid. Esimesed viirused olid filamentsed bakteriofaagid M13 ja fd. Tegu on paljuski sarnaste lüsogeensete ssDNA genoomiga viirustega, mis kasutavad paljunemiseks peremeesorganismina *E. coli*. Kuna lüsogeensed viirused bakterirakku ei lüüsi, siis peab faagi pinnale lisatud (polü)peptiidi modifitseerima. See on vajalik viiruse väljumiseks nakatunud *E. coli*-st ilma viimase rakumembraani lõhkumata. Selline töötlemine aga ei sobi kõikidele valkudele, mistõttu seab see piirangud uuritavate peptiidide osas (Russel, 1991).

Eelkirjeldatud probleemide vältimiseks on alternatiivse lahendusena edukalt kasutusele võetud faag T7<sup>vi</sup>. T7 on lüütilise paljunemistsükliga dsDNA genoomiga bakteriviirus, mis sarnaselt eelnevatega paljuneb nakatades *E. coli* rakke. Lisaks sellele on T7 faagi lihtne kasvatada ja see replitseerub kiiremini kui filamentsed faagid M13 ning fd. Kõigest kolme tunni möödudes tekivad 37 °C juures faagilaigud ja kaks tundi pärast T7-ga nakatamist lüüsub *E. coli* vedelsöötmes. Selline tempo aitab märgatavalt kokku hoida aega, mis kuluks mitmete

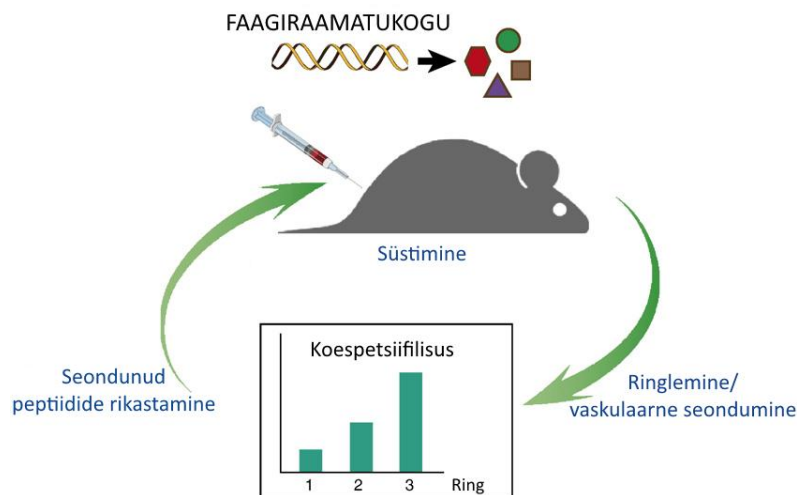
selektiivsete kasvatamisseeriade läbiviimiseks<sup>vii</sup>. M13 eeliseks on seevastu suuremate valkude kuvamise võimalus. Pikemate insertioonide puhul kasvatab faag M13 lihtsalt pikema kattevalkude kihi kui T7, et mahutada suuremat genoomi (Russel, 1991).

### 1.3.3. Faagiraamatukogu *in vivo* selekteerimine

Faagidispleid on rutiinselt kasutatud, et selekteerida peptiidsetest faagiraamatukogudest potentsiaalseid kandidaate, mis seonduvad uuritavate biomolekulidega. *In vitro* katsed on aidanud identifitseerida ja uurida mehhanisme, mis on seotud erinevate retseptor-ligand interaktsioonidega. Kuid *in vitro* selekteerimine ei arvesta mitmete oluliste nüanssidega nagu immuunsüsteem ja arvukad rakutüübid, mis omavad tähtsat rolli täppisravimite arenduses ja diagnostikas. Nii on viimaste aastakümnete jooksul jõudsalt arenenud faagiraamatukogude selekteerimine koekultuurides, mis võimaldab kiiret ja efektiivset spetsiifiliste omadustega ligandide isoleerimist väiksest hulgast rakkudest (Hong ja Clayman, 2000). Kasutades koekultuuri rakke, on edukalt isoleeritud mitmeid kasvajaspetsiifilisi peptiide. On leitud, et kasvaja veresoontes esineb mitmeid vähispetsiifilisi biomarkereid, mida seostatakse angiogeneesi ehk veresoonekonna kasvu ja arenguga, mis on vajalik vähi kiiretempolise kasvu jaoks (Ruoslahti, 2002). Seejuures peptiidid, mis seonduvad integriinidega (transmembraansed retseptorid), on võimelised tungima raku sisemusse (Gao jt., 2003; Sugahara jt., 2010; Teesalu jt., 2009).

Elusorganismide keerukuse tõttu on mitmed koekultuurist selekteeritud vähidiagnostilised peptiidid *in vivo* katsetes põrunud. Seetõttu on hakatud peptiide *in vivo* selekteerima erinevates elusorganismides, mis ei vaja otseselt mingisuguseid eelteadmisi sihtmärkreceptorite osas. Üldine *in vivo* selekteerimise kontseptsioon näeb välja selline, et katselooma vereringesse süstitakse kõrge peptiidse mitmekesisusega faagiraamatukogu. Seejärel lastakse kindlaksmääratud ajaperioodil bakteriofaagide kloonidel organismi vereringes ringelda. Järgnevalt teostatakse perfusioon ehk pesuetapp, et eemaldada katselooma kehast mittespetsiifiliselt kinnitunud faagid. Allesjäänud kinnitunud faagid on edaspidi hõlpsasti uuritavad, määrates nende kontsentratsiooni erinevates tervetes või kasvajakudedes. Usaldusväarsuse mõttes tehakse enamasti mitmeid selektsiooniringe, mis võimaldavad välja tuua kõige kõrgema afiinsusega faagi pinnal kuvatavaid peptiide (Joonis 3). Faagide kapsiidil oleva peptiidse järjestuse hilisem sekveneerimine võimaldab välja tuua motiive, mis on seotud näiteks mõne kindla haigusmarkeriga. Sarnast metoodikat kasutades

on leitud peptiide, mis kinnituvad kopsu (Rajotte ja Ruoslahti, 1999), rinna (Essler ja Ruoslahti, 2002) ja teiste organitega (Kolonin jt., 2006). Lisaks on mitmete loomudelite põhjal leitud kasvaja veresoonekonna spetsiifilisi markereid (D'Onofrio jt., 2014; Liang jt., 2006).



**Joonis 3. Skemaatiline *in vivo* faagidisplei raamatukogu seleksioon.** Kõrge mitmekesisusega peptiidse raamatukogu süstimine katselooma. Järgneb tsirkulatsioonietapp, kus juhusliku järjestusega peptiidid kinnituvad rakkude pinnal ekspresseeritud retseptoritega homoloogia alusel. Pärast seda viiakse läbi vereringe perfusioon, millega eemaldatakse mittespetsiifiliselt kinnitunud faagid. Järelejäänud sihtmärkspetsiifilised faagid elueeritakse uuritavast koest, amplifitseeritakse ning kasutatakse uues selekteerimisringis. Mitmete seleksiooniringide läbiviimine aitab esile tuua kõrgema afiinsusega peptiidid (Sergeeva jt., 2006). Tõlgitud eesti keelde.

Kõige põhjalikumalt on kirjeldatud *CendR*-motiivi (*C-end rule*) omavaid vähispetsiifilisi peptiide. Tegu on peptiidi C-terminaalses otsas neljast aminohapest koosneva järjestusega, mis algab ja lõpeb arginiini (R) või lüsiiniga (K) – R/KXXR/K (X tähistab mistahes aminohapet). *CendR*-järjestus seondub rakupinnaretseptoriga neuropiliin-1 (*NRP-1*), mis on üleekspresseeritud kasvaja veresoonte rakkudes, soodustades angiogeneesi ning mõjutades vaskulaarse läbitavuse regulatsiooni ja närvisüsteemi arengut. Üldiselt on normaalsete veresoonte seinad läbimatu, kuid kasvaja veresoonte on iseloomulik suurem läbilaskevõime. Vähemalt osaliselt on see põhjustatud ka vaskulaarse endoteeli kasvufaktori (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) mõjust. Pärast *NRP-1*-ga seondumist transporditakse *CendR*-motiiviga peptiidid rakku (Teesalu jt., 2009).

Enimuuritud *CendR*-järjestusega peptiidid on RPAR ja RGDR/K ehk iRGD (*internalizing, sisenev-RGD*). Mõlemad järjestused on võimelised tungima vähirakku, kinnitudes raku pinnal olevate retseptoritega. Erinevalt RPAR-ist ei seondu iRGD koheselt *NRP-1*-ga. Algselt seondub iRGD  $\alpha v$ -integriinidega. Seejärel viiakse rakupinnal olevate proteaaside poolt läbi

proteolüütiline lõikamine, mille tõttu kaotab iRGD suure osa oma esialgsest seondumisaktiivsusest integriinidele. Alles lõigatud peptiid on võimeline seonduma *NRP-1*-ga, mis transpordib lühenenud peptiidi läbi veresoone seina kasvajasse (Sugahara jt. 2010).

Suur osa *in vivo* faagidisplei eksperimentidest viiakse läbi erinevate hiireliinide peal. Süstides neisse inimesest eraldatud kasvajakuliine, on loodud mitmeid vähkkasvajate mudeleid. Nii on tehtud kõhunäärmevähi mudel, et faagidisplei abil uurida healoomulise kasvaja muutumist pahaloomuliseks (Joyce jt., 2003). Lisaks hiirtele on alternatiivselt kasutusele võetud nii rotte, putukaid kui ka kalu (Mullen jt., 2006; White jt., 2013; Work jt., 2006). Loomudelite abiga saadud sihtmärkmotiivid ei ole siiski alati üheselt ülekantavad loomadelt inimestele. Näiteks võib esineda liikidevahelisi lahknevusi sihtmärkide mustrites, kuna inimese ja hiire vaskulaarsed retseptorid võivad erineda. Kuid on ka näiteid, kus loomudelite kasutamine peptiidide valideerimisel on ennast homoloogia olemasolu korral õigustanud (Arap jt., 2002).

2002. aastal jõuti esimest korda nii kaugele, et sobivate peptiidide valideerimine viidi läbi patsiendis. Teadlaste sihtmärkideks olid arvukad inimese veresoones olevad retseptorid. Lõppkokkuvõttes uuriti pea 50 000 peptiidset motiivi, mis kinnitasid erinevates organites. Järgnenud suuremahuline analüüs kinnitas, et peptiidide jaotus kudedes ei olnud juhuslik ja valideeriti mitmeid vaskulaarseid ligande (Arap jt., 2002).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö praktilise osa eesmärgiks oli faagidisplei abil leida vähidiagnostilisi peptiide, mille esindatus pärast veres ringlemist oleks erinev tervetes ja tuumoritega hiirtes.

1. Diagnoosida vereseerumist võetud proovi põhjal *4T1* tüüpi piimanäärmevähi olemasolu *BALB/c* hiirtes, kasutades varasemalt kirjeldatud biomolekulidega seonduvaid peptiide.
2. Leida *de novo* bakteriofaagil T7 kuvatavaid peptiide, mis võimaldavad diagnoosida vereseerumist võetud proovi põhjal inimese eesnäärmevähi *PC-3* olemasolu *nude-Fox1nu* hiirtes.

## **2.2. Materjal ja metoodika**

### **2.2.1. CX<sub>7</sub>C T7 415-1 raamatukogu**

Peptiidiraamatukogu oligonukleotiidne järjestus pandi kokku seitsme trinukleotiidse NNK-bloki põhjal, mille alusel kodeeritakse järgemööda seitse juhuslikku aminohapet. Võimalikult suure mitmekesisuse saamiseks on igas NNK-blokis olev N (1. ja 2. positsioonis) juhuslikult üks neljast nukleotiidist - adeniin (A), tümidiin (T), tsütosiin (C) või guaniin (G). Stoppkoodonite vähendamiseks on K (3. positsioonis) kas tsütosiin (T) või guaniin (G). Nii genereeritakse 10<sup>9</sup> erinevat peptiidset järjestust, mille otstes on tsüsteiinid. Tsüsteiinide vahel moodustuvad disulfiidsillad, mille tõttu muutub viiruse kapsiidil kuvatav peptiidne järjestus tsükliliseks.

Informatsioon NNK CX<sub>7</sub>C T7 415-1 raamatukogu koostamise kohta on kättesaadav (Teesalu jt., 2012) artikli metoodikas.

### **2.2.2. Faagi amplifitseerimise, puhastamise ja tiitrimise protokollid**

*E. coli* bakterikultuuride (Novagen, USA) kasvatamine ja nendes bakteriofaagi T7 amplifitseerimine, puhastamine ja tiitrimine toimus vastavalt TÜ vähibioloogia labori protokollidele (vt Lisa 1-3).

### **2.2.3. Peptiidi kodeeriva järjestuse kloneerimine faagi T7 vektorisse**

Oligonukleotiidid kloneeriti T7 multiklonerimissaiti, mis vastutab viiruse pinnale kuvatava peptiidi ekspressiooni eest. Multiklonerimissait asub kapsiidivalgu kodeeriva geen *10B EcoR I* ja *Hind III* lõikamissaitide vahel<sup>viii</sup>. Kloneeritavate oligonukleotiidide paardumiseks segati kokku komplementaarsed *sense* ja *antisense* oligonukleotiidid (Metabion, Saksamaa) (Tabel 5 ja 6; vt Lisa 4-5) lõppkontsentratsioonis 80 nM. Järgnevalt inkubeeriti segu 10 min kuivtermoblokis (Biosan, Läti) 80 °C juures ning seejärel lülitati termoblokk välja ja jätkati inkubatsiooni kuni toatemperatuurini jahtumiseni (~2 h). Siis lisati 1 µl paardunud oligonukleotiide ligeerimissegusse lõppmahus 5 µl, kus oli järgmisi reagente vastavates lõppkontsentratsioonides: lõigatud vektor (*vector arms*, 10 ng/µl; Novagen, USA), 1x T4 DNA ligaasi puhver ja T4 DNA ligaas (1 Weiss U/µl; Thermo Fisher Scientific Inc, USA). Seejärel lasti reaktsioonil seista üleöö toatemperatuuril, mille järel lisati 5 µl T7 pakkimiseekstrakti (*Packaging Kit Extracts*, Novagen, USA) ning inkubeeriti uuesti 2 h ruumitemperatuuril.

Kloneerimise õnnestumise kontrollimiseks sekveeriti kolooniad. Selleks lisati eelnevale reaktsioonisegule 120 µl LB-d (*Sigma-Aldrich Co, USA*) ning tiitriti. Kolooniate tekkimisel kaabiti pipetiotsikuga Petritassil olevast faagikolooniast materjali ja otsik asetati 10 minutiks 30 µl-sse 1x PBS-i (*PAA, Austria*) orbitaalloksutile (*Biosan, Läti*). Seejärel valmistati sekveerimiseks ette reaktsioonisegu lõppmahus 15 µl, mis sisaldas 1 µl faagi DNA-d PBS-is (*PAA, Austria*) ja järgmisi reagente vastavates lõppkontsentratsioonides: 1x *HOT FIREPOL Blend Master mix* (*Solis BioDyne, Eesti*), praimerid (0,2 µM; *Metabion, Saksamaa*; Tabel 7; vt Lisa 6). *PCR*-reaktsiooni läbiviimiseks kasutati *Eppendorf Master Cycler Nexus* (*Eppendorf AG, USA*) termotsüklerit ja programm oli järgnev:

95 °C	12 min	} 35x
95 °C	30 sek	
50 °C	30 sek	
72 °C	20 sek	
72 °C	10 min	
4 °C	STOPP	

Proovid sekveeriti Sangeri meetodiga Eesti Biokeskuse tuumiklaboris.

#### 2.2.4. *In vivo* faagidisplei

Kõik loomkatsed teostati loomakaitseeaduse kohaselt loomkatse loa nr 90 alusel (vt Lisa 10). Kõik loomkatsed viidi läbi litsentsi omava TÜ vähibioloogia uurimisgrupi teaduri Tarmo Mölderit juhendamisel ja järelvaatamisel.

Loomkatsed tehti emastes *BALB/c* või isastes immuunpuudulikes karvututes *nude-Fox1nu* hiirtes (*Harlan Laboratories Inc, USA*), kelle vanus (~2-6 kuud) ning kaal (~25-30 g *BALB/c*; ~28-34 g *nude*) katsetes varieerusid. Katsete käigus kasutati 16 looma. Katsed teostati TÜ arstiteaduskonna vähibioloogia laboris, katseloomi hoiustati TÜ arstiteaduskonna Biomeedikumi vivaariumis 12 tunni valguse/pimeduse tsükli tingimustel, vaba juurdepääsuga veele ja toidule.

Olenevalt katsest indutseeriti hiirtes nahaaluseid kasvajaid inimese eesnäärmevähi *PC-3* või hiire rinnavähi *4T1* rakuliinidega<sup>1</sup>. Nahaaluse vähi indutseerimiseks süstiti ~10<sup>6</sup> vähirakku 5-50 µl PBS-is (*PAA, Austria*) nahaaluselt looma alaseljale. Kõigi implanteeritud

---

<sup>1</sup> Kasvaja indutseeris litsentsi omava TÜ vähibioloogia uurimisgrupi teadur Tarmo Mölder

vähkkasvajatega hiirte heaolu hinnati igapäevaselt: seiresüsteem hõlmas kehahoiaku, kõnnaku ja kasvaja suuruse ning seisundi hoolikat jälgimist ning loomi kaaluti ja palpeeriti iga kahe päeva järel. *In vivo* katse viidi läbi, kui kasvaja oli arenenud diameetrini 1,2 cm või kaalulangus ületas 10% kehamassist. *PC-3* mudeli puhul oli ajaperioodiks ~3 nädalat ja *4T1* mudelil ~10 päeva pärast süstimist.

Katsete käigus süstiti (*Becton, Dickinson and Company, USA* süstal 0,5 ml ja nõel 0,3 x 0,8 mm) katseloomade sabaveeni ~100 µl faagisuspensiooni PBS-is (*PAA, Austria*). Süstitav faagisuspensioon ning veres ringlemise aeg sõltusid konkreetsest katsest ning on täpsemalt kirjeldatud iga katse juures eraldi. Pärast faagisuspensiooni veres ringlemist kindla ajaperioodi järel süstiti (*Becton, Dickinson and Company, USA* süstal 0,5 ml ja nõel 0,3 x 0,8 mm) katselooma kõhuõõnde üldanesteetikumi *Avertin* (tribromoetanool) (*Sigma-Aldrich Co, USA*). Ühe grammi katselooma kaalu kohta süstiti 10 µl 2,5%-st tribromoetanooli lahust<sup>2</sup>. Anesteesia all oleva katselooma rindkere avamise järgselt koguti südamest 200 µl verd eelnevalt 0,5 M EDTA-s (*Sigma-Aldrich Co, USA*) pestud süstlaga (*Becton, Dickinson and Company, USA* süstal 0,5 ml ja nõel 0,3 x 0,8 mm), et vältida vere hüübimist süstla nõelas. Vere võtmise järel katseloom hukati veretustamise teel. Veres ringelnud faagi tiitri määramiseks lisati 200 µl verele 1 ml eelnevalt valmistatud LB söötme ja IGEPAL<sup>®</sup> CA-630 lahust (100:1) (*Sigma-Aldrich Co, USA*).

Lähtuvalt katse eesmärkidest eraldati 200 µl-st puhtast verest DNA. DNA (sh bakteriofaagi DNA) eraldamiseks katselooma verest kasutati kommertsiaalset *High Pure PCR Template Preparation Kit*’i (*Roche Holding AG, Šveits*). DNA puhastamine viidi läbi vastavalt kaasasolevale protokollile.

### **2.2.5. Ion Torrent sekveneerimine ja andmeanalüüs**

Bakteriofaagil kuvatavate peptiidide kvantifitseerimiseks ja sekveneerimiseks kasutati teise põlvkonna kõrge läbilaskevõimega *Ion Torrent* sekveneerimisplatvormi (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*). *Ion Torrent* edastab saadud andmed FASTAQ failiformaadis, mille analüüsimisel kasutatakse laborisisest *pdparser* programmi<sup>3</sup>. *Pdparser* transleerib iga DNA järjestust kuues lugemisraamis ja otsib MLGDPNS motiivi, millele järgnevad peptiidid

---

<sup>2</sup> Valmistanud TÜ vähibioloogia laborispetsialist Kaarel Kurm

<sup>3</sup> Loonud TÜ vähibioloogia bioinformaatik Aleksandr Sudakov

salvestatakse kuni stoppkoodonini. Seejärel loendatakse ja sorteeritakse salvestatud peptiidid. Väljundiks on tekstifail, mis sisaldab peptiidide järjestusi ja nende arvu sisendandmetest.

*Ion Torrent* analüüside ettevalmistamiseks läbiviidav *PCR*-i reaktsioonisegu segati kokku lõppmahus 25 µl, kus oli 5 µl faagisuspensiooni (DNA) ja järgmisi reagente vastavates lõppkontsentratsioonides: 1x *HOT FIREPOL Blend Master mix* (*Solis BioDyne, Eesti*), praimerid (0,2 µM; *TAG Copenhagen AS, Taani*; Tabel 8; vt Lisa 6). *PCR*-i läbiviimiseks kasutati *Eppendorf Master Cycler Nexus* (*Eppendorf AG, USA*) termotsüklerit ja programm oli järgnev<sup>4</sup>:

95 °C	12 min	
95 °C	20 sek	} 20x
62 °C	20 sek	
72 °C	10 sek	
72 °C	10 min	
4 °C	STOPP	

#### 2.2.6. *qPCR* protokoll

*qPCR*-i katses kasutati dsDNA-ga seonduvat *EvaGreen* värvi, mis on *HOT FIREPOL Blend Master mix* koostises (*Solis BioDyne, Eesti*). Reaktsioon viidi läbi 10 µl lõppmahus ja lisaks 1 µl-le faagi DNA-le sisaldas reaktsioonisegu lõppkontsentratsioonid järgnevaid komponente: 1x *HOT FIREPOL Blend Master mix* (*Solis BioDyne, Eesti*) ja praimerid (0,2 µM; *Metabion, Saksamaa*; Tabel 9; vt Lisa 7). *qPCR*-i läbiviimiseks kasutati *PikoREAL96 qPCR*-i reaallaja termotsüklerit ja absoluutne kvantitatiivsus määrati *PikoReal Software 2.2* tarkvaraga (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*). *qPCR*-i programm oli järgnev:

95 °C	10 min	
92 °C	15 sek	} 5x
58 °C	1 min	
92 °C	15 sek	} 40x
60 °C	1 min	
4 °C	STOPP	

---

<sup>4</sup> *Ion Torrent*-i analüüsid viisid läbi TÜ vähibioloogia laborispetsialist Kaarel Kurm ja teadur Tarmo Mölder

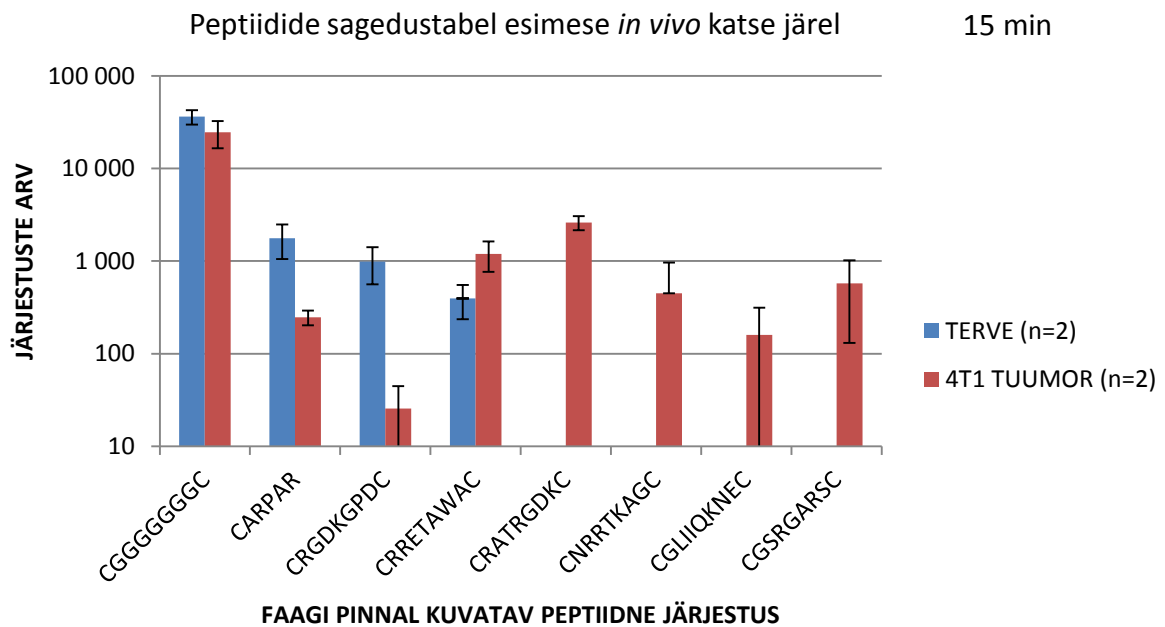
## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Biomarkerispetsiifiliste peptiidide *in vivo* selekteerimine 4T1 rinnanäärmevähi mudelis

Katse eesmärk oli võrrelda varasemalt kirjeldatud biomolekulidega seonduvate bakteriofaagi T7 pinnal ekspresseeritud peptiidide veres ringlemise erinevusi terves ja kasvajaga hiirte vereseerumis, mille põhjal oleks võimalik diagnoosida 4T1 rinnanäärmevähi olemasolu *BALB/c* hiire mudelis.

Esimesel faagide *in vivo* selektsiooniringil süstiti 100 µl ( $10^{10}$  pfu/ml) teadaolevalt biomolekulidega seonduvat faagisuspensiooni (Tabel 11; vt Lisa 8) kahe terve ja kahe kasvajaga hiire sabaveeni. Suspensioonil lasti katseloomade vereringes ringelda 15 minutit. Sellele järgnevalt viidi hiired üldanesteesiasse ja koguti südamest 200 µl verd, millest eraldati DNA. Eraldatud DNA-st paljundati kapsiidi pinnale peptiidi kodeeriv järjestus, milleks kasutati *PCR*-praimereid (Tabel 8; Lisa 6). Saadud *PCR*-produktid sekveneeriti ja kvantifitseeriti *Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific Inc, USA)* platvormil.

Seitse peptiidi näitasid suuremat kvantitatiivset erinevust tervetes ja kasvajatega hiirtes, kusjuures neli peptiidi (CRATRGDKC, CNRRTKAGC, CQLIIQKNEC ja CGSRGARSC) esinesid ainult kasvajaga hiirte vereproovides (Joonis 4). CG<sub>7</sub>C on kontrollpeptiid, mis teadaolevalt ei oma *in vivo* mingisugust efekti biomolekulidega seondumisel (Teesalu jt., 2012). Erinevatest hiirtest saadud andmeid normaliseeriti peptiidide koguhulga vastu.



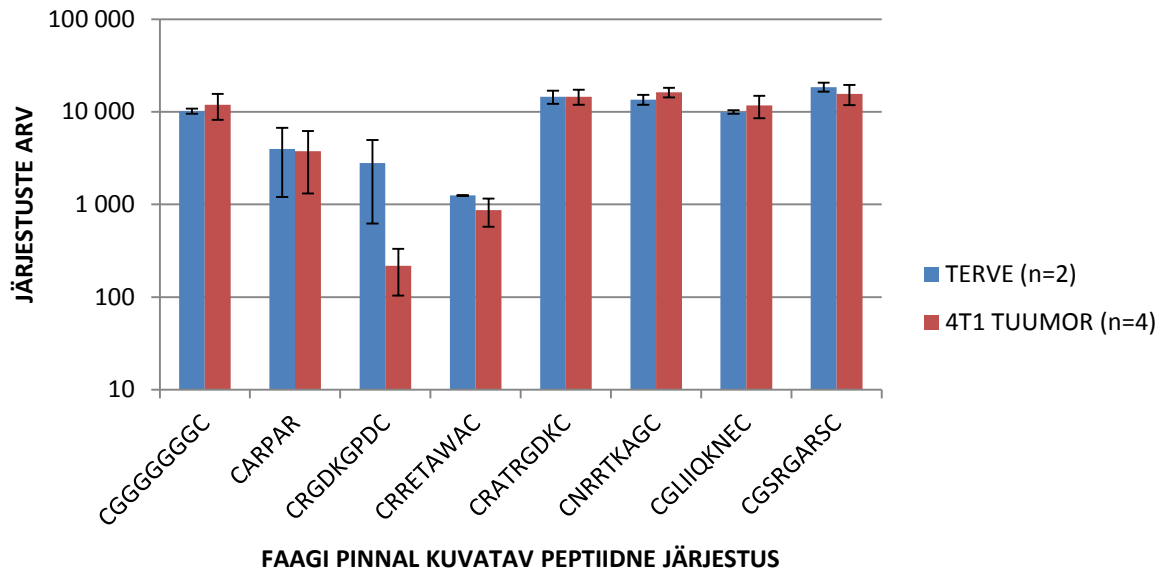
**Joonis 4. Biomarkerispetsiifiliste peptiidide *in vivo* esimesel selektsioonilringil suurimaid erinevusi andvad peptiidid tervetes ja tuumoriga hiirtes.** Katses võrreldi faagidisplei meetodil varasemalt kirjeldatud biomolekulidega seonduvate peptiidide veres ringlemise erinevusi tervetes ja tuumoriga hiirtes. *Ion Torrent*-i andmetest. Veapiirid on arvatatud standardhävete põhjal.

Järgnevalt kloneeriti seitse selekteeritud peptiidset järjestust T7 415-1b vektorisse ja ekspresseeriti faagi pinnale. Kloneeritud järjestused sisaldasid endas ka *qPCR*-i praimeritega komplementaarseid järjestusi hilisemaks absoluutse kvantitatiivuse määramiseks (Tabel 5; vt Lisa 4). Teisel *in vivo* valideerimisel süstiti suspensioonina kaheksa võrdse tiitriga faagi kahe terve ja nelja 4T1 kasvajaga emase hiire sabaveeni ning 15 minuti järel võeti verd, millest eraldati DNA. Teistkordne *in vivo* faagidisplei tulemuste valideerimine viidi esmalt läbi *Ion Torrent* (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*) platvormiga. Statistiliselt usaldusväärne erinevus esines CRGDKGPDC peptiidi puhul ( $p \leq 0,05$ ) (Joonis 5A). CRGDKGPDC oli terves hiires keskmiselt 12 korda enam esindatud kui 4T1 tuumoriga hiires (Joonis 5B). Täpsed arvulised väärtused on leitavad tabelis 10 (vt Lisa 7).

A

Peptiidide sagedustabel teise *in vivo* katse järel

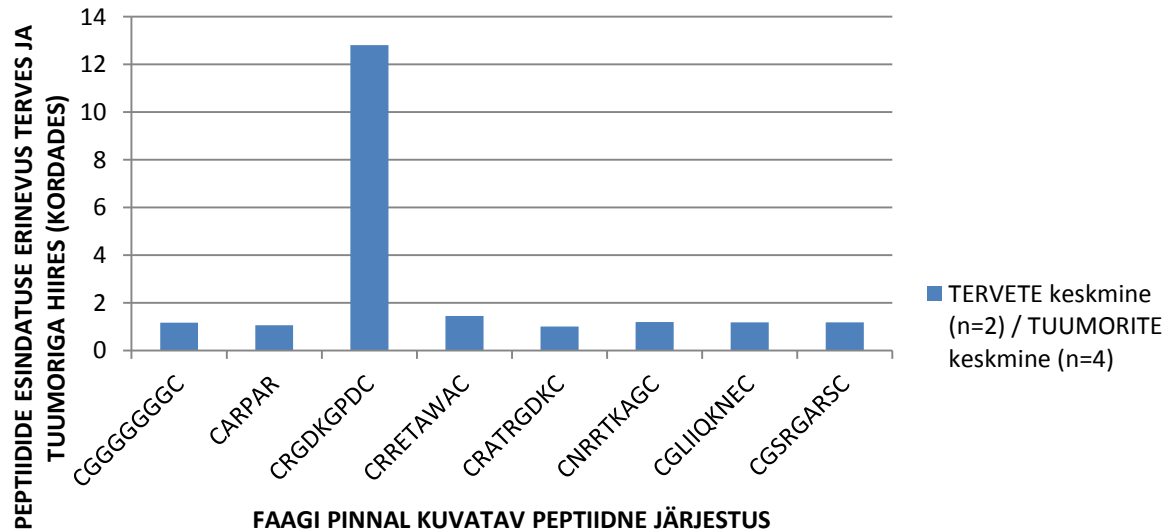
15 min



B

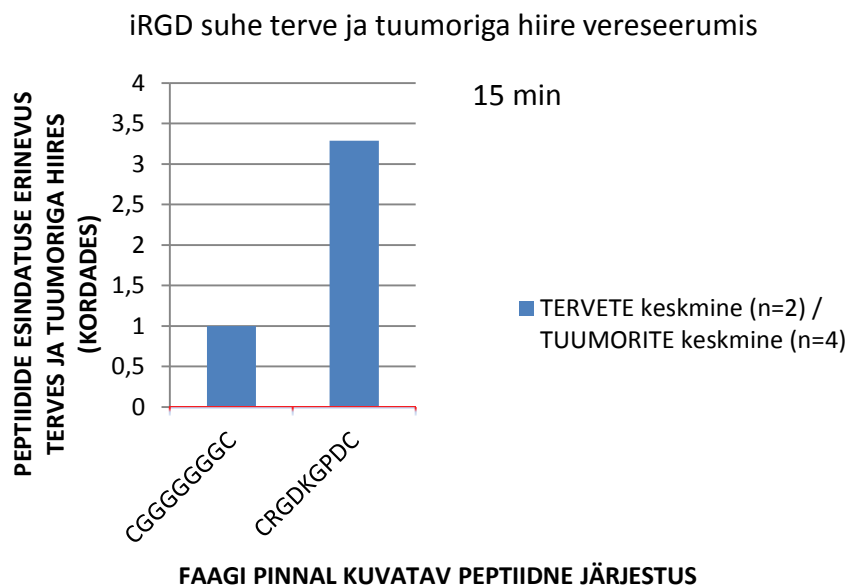
Peptiidide suhe terves ja tuumoriga hiire vereseerumis

15 min



**Joonis 5A ja 5B. Biomarkerispetsiifiliste peptiidide *in vivo* teisel selektsioonilringil suurimaid erinevusi andvad peptiidid tervetes ja tuumoriga hiirtes.** Katses võrreldi faagidisplei meetodil varasemalt kirjeldatud biomolekulidega seonduvate peptiidide veres ringlemise erinevusi tervetes ja tuumoriga hiirtes. *Ion Torrent*-i andmetest. Veapiirid on arvatatud standardhävete põhjal.

Saadud *Ion Torrent*-i andmeid kinnitati *qPCR*-iga kasutades absoluutset kvantifitseerimist. Joonisel 6 on toodud andmed, milles *qPCR*-iga kvantifitseeriti kõige enam erinenud peptiidi (CRGDKGPDC) esinatust teistkordse *in vivo* selekteerimisringi proovidest.



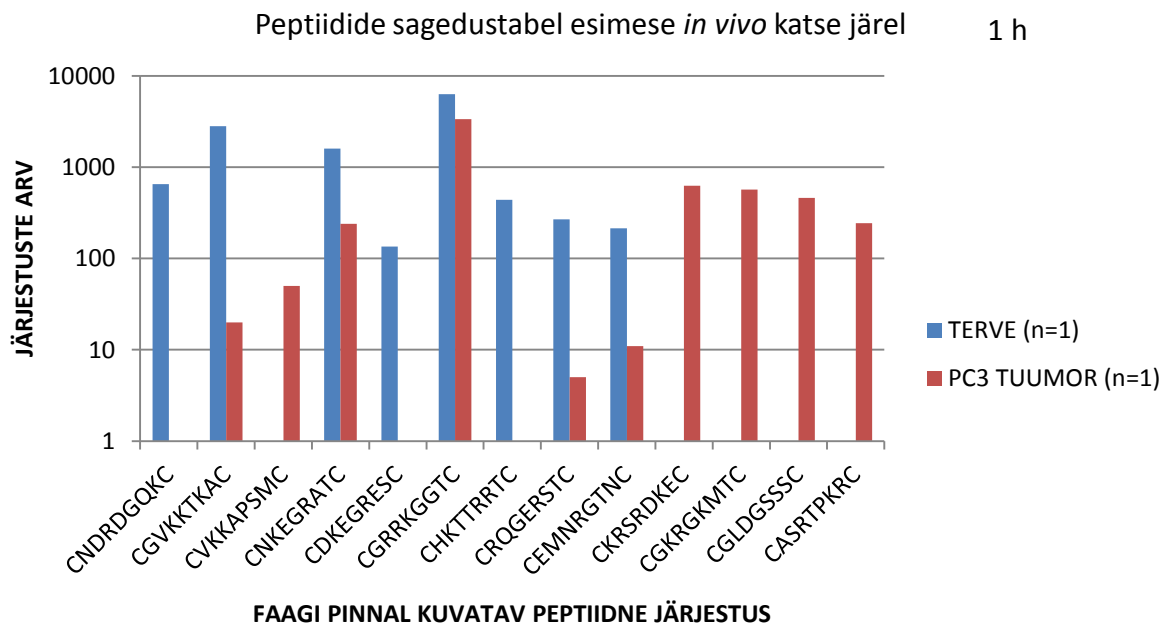
**Joonis 6.** *In vivo* teisel seleksioonilringil suurimat erinevust andva CRGDKGPDC peptiidi erinevus tervetes ja tuumoritega hiirtes. Katses võrreldi faagidisplei meetodil selekteeritud CRGDKGPDC peptiidi veres ringlemise erinevust tervetes ja tuumoriga hiirtes. *qPCR*-i andmetest.

### 2.3.2. T7 CX<sub>7</sub>C-faagiraamatukogu *in vivo* selekteerimine PC-3 eesnäärmevähi mudelis

Katse eesmärgiks oli leida *de novo* bakteriofaagi T7 pinnal ekspresseeritud peptiidide veres ringlemise erinevusi terves ja kasvajaga immuunpuudulike hiirte vereseerumis, mille põhjal oleks võimalik diagnoosida PC-3 eesnäärmevähi olemasolu *nude-Fox1nu* hiire mudelis.

Esimeses *in vivo* seleksiooniringis süstiti 100 µl (10<sup>10</sup> pfu/ml) vähendatud mitmekesisusega (~10<sup>5</sup>) CX<sub>7</sub>C-raamatukogu ühte tervesse ja ühte PC-3 tuumoriga *nude-Fox1nu* hiirde ning seejärel lasti ringleda 1 tund. Järgnevalt viidi katseloomad üldanesteessiasse ning võeti südamest 200 µl verd. Verest eraldatud DNA-st paljundati kapsiidi pinnal olevat peptiidi kodeeriv järjestus, selleks kasutati *PCR*-primereid (Tabel 8; vt Lisa 6). Saadud tulemused sekveneeriti ja kvantifitseeriti *Ion Torrent* (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*) platvormi abil.

Esimese valideerimise põhjal valiti *pdparser* programmiga 13 järjestust, mis andsid tervetes ja PC-3 tuumoriga *nude* hiirtes suurimaid erinevusi (Joonis 7).

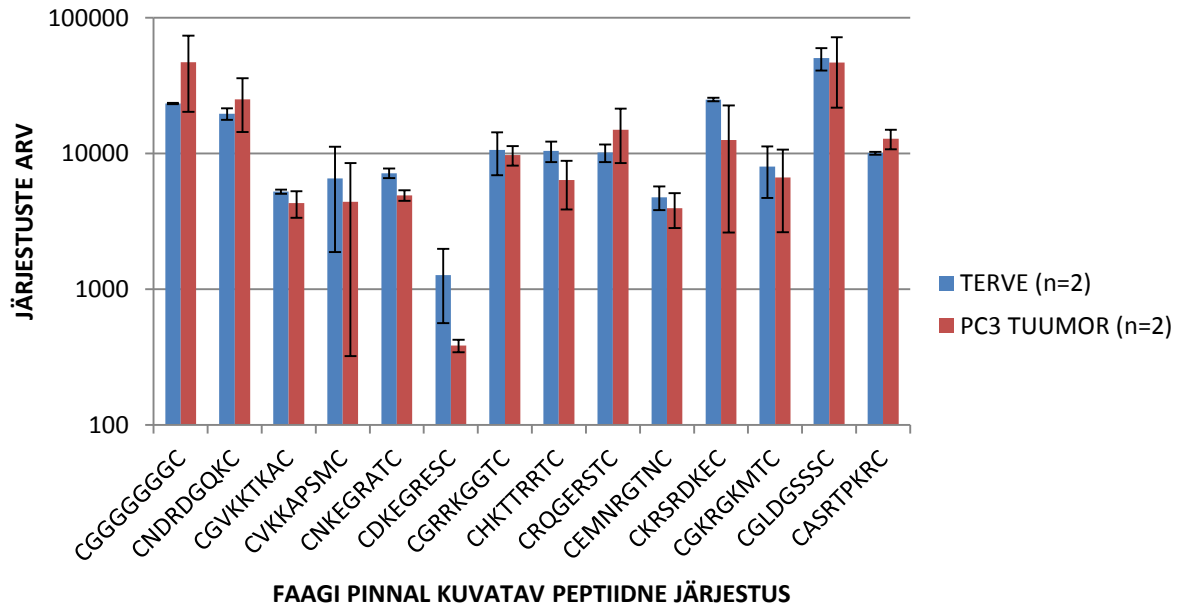


**Joonis 7.** CX<sub>7</sub>C-raamatukogu *in vivo* esimesel selektsiooniringil suurimaid erinevusi andnud faagid terves ja tuumoriga hiires. Katses võrreldi faagidisplei meetodil madaldatud mitmekesisusega (10<sup>5</sup>) CX<sub>7</sub>C-raamatukogu peptiidide veres ringlemise erinevusi terves ja tuumoriga hiires. *Ion Torrent*-i andmetest.

Järgmises etapis ekspresseeriti 13 väljavalitud peptiidset järjestust T7 faagi pinnal ja viidi läbi teine *in vivo* valideerimine kahes terves ja kahes tuumoriga *PC-3 nude* hiires. 1 tund pärast süstimist võeti hiirtelt 200 µl verd, millest eraldati kapsiidil oleva peptiidi kodeeriva järjestuse DNA, kasutades primereid (Tabel 8; vt Lisa 6). Järgneva *Ion Torrent* analüüsi põhjal oli esmasel vaatlusel märgatav erinevus kahel faagil kuvatava peptiidi puhul – CNKEGRATC ja CDKEGRESC (Joonis 8). Kuna p-väärtused olid vastavalt 0,06 ja 0,33, ei ole nende peptiidide erinevus terves ja tuumoriga hiires statistiliselt usaldusväärne. Täpsed arvulised väärtused on leitavad tabelis 12 (vt Lisa 9).

Peptiidide sagedustabel teise *in vivo* katse järel

1 h



**Joonis 8. CX<sub>7</sub>C-raamatukogu *in vivo* teisel selektsiooniringil suurimaid erinevusi andnud faagid tervetes ja tuumoriga hiirtes.** Katses võrreldi faagidisplei meetodil madaldatud mitmekesisusega (10<sup>5</sup>) CX<sub>7</sub>C-raamatukogu peptiidide veres ringlemise erinevusi tervetes ja tuumoriga hiirtes. *Ion Torrent*-i andmetest. Veapiirid on arvatatud standardhävete põhjal.

#### 1.4. Arutelu

Võitluses vähiga on oluline teha vahet tervel ja kasvajakul ning diagnoosida haigust võimalikult varajases staadiumis. Õigeaegsel diagnoosimisel on vähkkasvajad üldiselt edukalt ravitavad, kuid sellises järgus kasvajateni jõutakse enamasti juhuslike või rutiinsete kontrollide käigus. Selgete ja märgatavate sümptomite esinemisel on haigus enamasti juba kaugele arenenud. Hetkel on kliinilises praktikas kahe sageliesineva pahaloomulise kasvaja (eesnäärmevähk meestel ja rinnanäärmevähk naistel) diagnoosimisel kasutusel mitmed erinevad meetodid. Paraku ei sobi mitmed neist laiaulatuslikeks sõeluuringuteks protseduuride keerukuse tõttu ja/või ei ole piisavalt usaldusväärsed (Harvey, 2006; Moyer, 2012; Orel, 1998).

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas tuumorispetsiifiliste peptiidide süstimisel hiirtesse ja hilisemal vereproovi võtmisel on võimalik diagnoosida inimese rinna- ja eesnäärmevähki *in vivo* loomudelil. Selleks koostati kaks paralleelset katseskeemi: (1) rinnavähimudeli korral üritati leida faagide kvantitatiivne erinevus kindla ajapunkti järel *4T1* tuumoriga ja terves emases *BALB/c* hiire vereproovis, olles hiirtesse süstinud teadaolevalt biomolekulidega seonduvate faagide suspensiooni; (2) eesnäärmevähi mudeli puhul püüti analoogselt identifitseerida *de novo* peptiide, mille ringlemise erinevus terves ja *PC-3* tuumoriga isases *nude-FoxInu* hiire veres võimaldab diagnoosida eesnäärmevähi olemasolu.

Mõlema katseskeemi ülesehitus põhineb *in vivo* faagidisplei meetodil. Antud tehnoloogia võimaldab identifitseerida peptiide, mis seovad ennast kasvajakude või nende poolt ekspresseeritavate biomolekulidega. Teadaolevalt omab iga organ või patoloogiline kasvaja unikaalset vaskulaarset eripära, mille äratundmine on määrava tähtsusega sihtmärgispetsiifiliste ligandide leidmisel (Teesalu jt., 2012). Vaskulaarsed endoteelirakud, mis katavad veresoonte sisepindu, annavad informatsiooni kasvajate arengu kohta. Tuumorite suurenedes ja edasise kasvu tagamiseks vajaminevate veresoonte areng ja ehitus on mitmeti erinev normaalsest angiogeneesist (Ruoslahti, 2002b). Keskendudes nendele erinevustele üritati antud töös näidata, et kasutades vähispetsiifilisi peptiide, on võimalik kindlaks teha pahaloomuliste kasvajate olemasolu vereproovi põhjal loomudelites.

Tuginedes varasemalt identifitseeritud vähispetsiifilistele biomarkeritele ja nendega seonduvatele peptiididele koostati katseskeem (1), kus püüti näha erinevust terve ja kasvajaga hiire vereproovis pärast faagisuspensiooni süstimist ja veres ringlemist. Sellest tulenevalt uuriti antud *in vivo* katses, kas on võimalik leida kvantitatiivset erinevust kontrollfaag CG<sub>7</sub>C

ja varasemalt kirjeldatud biomarkeritega seonduvate faagide vahel. Kahekordsel *in vivo* faagidisplei selekteerimisetapil andis ainsana statistiliselt usaldusväärse tulemuse peptiid CRGDKGPDC, mille vereseerumis püsimine 15 minutilise ringlemise järel on kordades suurem terves hiires. Tulemus oli igati ootuspärane, kuna varasemalt on kirjeldatud, et CRGDKGPDC peptiidis olev RGD järjestus on kasvajaspetsiifiline, seondudes  $\alpha$ -integriinidega (Sugahara jt., 2010). Tundub tõenäoline, et võime tungida kasvajarakkudesse soodustab *CendR*-motiiviga CRGDKGPDC peptiidil kogunemist kasvajakoosse, mistõttu viimase vabalt veres ringlemise hulk väheneb märgatavalt. Julgustavaks faktiks on ka kontrollpeptiidi CGGGGGGGC ühtlane tase terves ja tuumoriga hiires. Teadaolevalt ei kinnitu kontrollpeptiid ühelegi biomolekulile, seega on selle tase veres usaldusväärseks negatiivseks kontrolliks (Teesalu jt., 2012).

Kuigi esimesel selektsiooniringil andsid *Ion Torrent* analüüsi põhjal paljulubavaid tulemusi mitmed teisedki peptiidid, siis teistkordsel seitsme peptiidisegu võrdlemisel selged erinevused kadusid (v.a CRGDKGPDC). Mõlemas selektsiooniringis täitis kriteeriumi ainult CRGDKGPDC peptiid, mis näitas kõigis kümnes katseloomas selgeid erinevusi. Teiste peptiidide varieeruvuse taga võib olla mitmeid põhjuseid. Näiteks suurema mitmekesisusega raamatukogude süstimisel võib esineda peptiidide vahel konkureerivat või inhibeerivat toimet üksteise suhtes, mis võib omakorda anda valepositiivseid või –negatiivseid tulemusi. Teisalt ei pruugi algses selekteerimata raamatukogu algsuspensioonis olla kõiki peptiidide võrdsel määral. Nii võivad detekteerimata jääda väheesindatud tuumorispetsiifilised peptiidid. Selle vältimiseks mõõtsime alglahuses olevate peptiidide hulka. Kuigi *qPCR* täpsus on kõrge, ei ole mõeldav sellega suurte raamatukogude valideerimine: kõigi peptiidide jaoks oleks vaja läbi viia eraldi analüüsid. Seetõttu on *Ion Torrent* sobilik just suurte raamatukogude valideerimiseks. Peale selle võimaldab *Ion Torrent* platvorm määrata ka sekveneeritud DNA molekulide hulka. *Ion Torrent*-iga saab küll mõõta proportsionaalseid suhteid, aga kui eesmärgiks on võrrelda absoluutseid erinevusi, siis on *qPCR*-i andmed täpsemad ja usaldusväärsemad. Sellepärast viidi ka antud katses lõplik valideerimine paralleelselt läbi nii *Ion Torrent* kui ka *qPCR* meetodil: omavahel võrreldi kontrollpeptiidi (CG<sub>7</sub>C) ja sellest suurimat erinevust näidanud CRGDKGPDC peptiidi hulka. Tulemuste põhjal näitas *Ion Torrent* CRGDKGPDC peptiidi puhul keskmiselt ligikaudu 12-kordset ja *qPCR* kolmekordset erinevust terves ja tuumoriga hiires. Siiski, keskendudes esialgsetele tulemustele, on näha mõlemal juhul mitmekordset erinevust tuumoriga ja terve hiire vereproovis. Süstitavas suspensioonis oli veel teisigi teadaolevalt kasvajatega seonduvaid järjestusi - CARPAR ja CRETTAWAC (Koivunen jt, 1994; Teesalu jt., 2009). Seetõttu oleks oodanud sarnast

tendentsi ka nende proovidest. CARPAR ja GRETTAWAC järjestuste puhul oli küll näha sarnast seost, kuid mõlemal juhul puudus arvestatav erinevus ühes neljast tuumoriga katseloomas. Edasiste katsete käigus on plaanis suurendada statistilist usaldusväärsust tõstes katseloomade arvu ja uurida täpsemalt kolme (CRGDKGPDC, CARPAR, GRETTAWAC) peptiidse järjestuse veres püsimist.

Katseskeem (2) oli erinevalt eelnevast kavandatud leidmaks *de novo* peptiidseid ligande. Kuna mõlema katse eesmärgid on diagnostilises mõttes täiesti uutmoodi lähenemised, siis juhusliku peptiidse raamatukogu süstimisel kasutasime immuunpuudulikke hiiri. Seda tehti eeldusel, et see kergendab juhuslikust raamatukogust vähispetsiifiliste ligandide selekteerimist, kuna olulist rolli *in vivo* katsetel mängib elusorganismi bioloogiline keerukus. Tuleb arvestada mitmete bioloogiliste barjääride ja iseärasustega, nagu vereseerumi stabiilsus, immuunsüsteem ja vere puhastamine kehale võõratest komponentidest ning otsene juurdepääs rakkudele (Brown, 2010). Antud katses süstiti PC-3 kasvaja *nude-Fox1nu* hiirde NNK CX<sub>7</sub>C-raamatukogu, kus esineb 10<sup>5</sup> erinevat kuni 7 aminohappe pikkust järjestust. Esimeses *in vivo* selekteerimisringis saadi kahes katseloomas 21 peptiidi, mis oluliselt erinesid terve ja tuumoriga hiire vereseerumis. Need omakorda jagunesid 12 erineva motiiviga peptiidiperekondadesse, mille põhjal valiti igast perekonnast üks-kaks kõige paremat tulemust andnud peptiidi – kokku 13. Järgnevalt viidi läbi *in vivo* faagidisplei teistkordne selekteerimine, kuhu negatiivse kontrollina oli lisatud CG<sub>7</sub>C. Lõplike tulemuste põhjal statistiliselt erinevaid *de novo* peptiide ei esinenud. Tulemuste esialgsel vaatlusel eristusid kaks sarnase motiiviga peptiidi (CNKEGRATC ja CDKEGRESC), kuid statistiline usaldusväärne erinevus puudus. Kontrollil t-testiga oli CNKEGRATC-i p-väärtus 0,054 (lubatud <0,05). Tegu on järjekordse uue *CendR*-järjestusega, mis viitab peptiidi vähispetsiifikale seondudes ilmselt *NRP-1* retseptorile (Teesalu jt., 2009).

Teise seleksiooniringi järel oli näha ka kontrollpeptiidi CG<sub>7</sub>C tavapärasest suuremat varieeruvust terves ja tuumoriga hiires, mis võiks kontrollpeptiidi puhul olla minimaalne. Siinkohal võib pakkuda ühe võimaliku põhjusena taas kord bioloogilisi iseärasusi. Määravaks võib saada hiire vanus, kaal või indutseeritud tuumori suurus ning ka asukoht, sest olles lähemal suurematele veresoontele, võib kasvaja verevahetus olla oluliselt efektiivsem ja areng mõnevõrra kiirem. Kuigi usaldusväärset erinevust ei leitud ühegi peptiidi puhul, siis võib arvata, et suurem katseloomade arv aitaks kinnitada seose olemasolu või puudumist.

Mõlema katseskeemi puhul annaks veelgi usaldusväärsemaid tulemusi faagid või nende mutandid, mille elulemus hiire veres oleks pikem. Pikem ringlemine suurendab tõenäosust, et vähispetsiifilised peptiidid jõuavad oma sihtmärgini. Hetkel on optimaalseks veres ringlemise ajaks *nude-FoxInu* hiirtes 1 tund ja *BALB/c* hiirte puhul 15 minutit, mille järel on faagi tiiter vereproovis veel võrreldav ja leitav. Sokoloff kolleegidega on kirjeldanud kauaringlevaid faagi T7 sabafiibrimutante, mille kasutamine võiks oluliselt vähendada taustmüra skriiningutel ning anda vähem varieeruvaid tulemusi (Sokoloff jt., 2003).

Kokkuvõtvalt omab faagipõhine vähidiagnostiline tehnoloogia endas suurt potentsiaali laiaulatuslikeks sõeluuringuteks. Esimese katseskeemi juures oli näha, et CRGDKGPDC peptiid näitas kõigi 10 katselooma puhul madalamat taset ainult kasvajaga hiirte veres. Ka teine, *de novo* peptiidide selekteerimiskatse identifitseeris uudseid *CendR*-järjestusi, kuid usaldusväärsemate andmete saamiseks tuleks katseloomade arvu suurendada. Mõlema kontseptsiooniga tegeletakse edasi ning hetkel on katsejärgus alternatiiv *qPCR* meetodile, mis võimaldaks määrata mitme erineva biomarkeriga seonduva peptiidi hulka ühes reaktsioonis. Nii saaks kasutada diagnoosimisel korraka mitut vähispetsiifilist või erinevate kasvajatüvedega seonduvaid peptiide.

Kui järgnevad katsed kinnitavad meetodi tulemusi, siis kaugemaks eesmärgiks võiks olla analoogne peptiidipõhine diagnostiline sõeluuring nanopartiklidel, kuna vähispetsiifiliste ligandide kinnitamist rutiinselt kasutatavatele nanopartiklitele on praktiseeritud varemgi (Brigger jt., 2012; Davis jt., 2008). Lisaks oleks huvitav näha, kas analoogne meetod on rakendatav ka teist tüüpi tuumoritüvede puhul. Kuna tehnoloogia põhineb tuumorispetsiifiliste peptiidide kvantitatiivsuse määramisel, on võimalus, et lisaks vähi avastamisele on detekteeritav kasvaja arengustaadium või leviku suurus. See jääb siiski väljapoole selle magistritöö eesmärke.

## Järeldused

1. Varasemalt kirjeldatud biomolekulidega seonduvate peptiidide raamatukogu süstimisel *4T1 BALB/c* hiire vereringesse identifitseeriti CRGDKGPDC peptiid. CRGDKGPDC veresringlemise erinevus tervetes ja tuumoriga hiirtes võimaldab praeguste tulemuste põhjal diagnoosida rinnanäärmevähi olemasolu *4T1 BALB/c* hiirtes.
2. *De novo* peptiidse faagiraamatukogu süstimisel immuunpuudulikkesse *PC-3 nude-FoxInu* hiirtesse ei identifitseerinud ühtegi statistiliselt usaldusväärset peptiidset järjestust, mille veres ringlemine oleks selgelt erinev tervetes ja *PC-3* tuumoriga hiirtes.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö kirjanduse osas anti ülevaade *in vivo* faagidisplei meetodist ja selle rakendusvõimalusest vähiteraapias ning -diagnostikas. Faagidisplei võime identifitseerida raku pinnal olevaid retseptoreid ja nendega seonduvaid ligande on andnud olulist informatsiooni vähispetsiifiliste biomarkerite uurimisel. Lisaks on kirjanduse osas lühidalt kirjeldatud *CendR*-motiivil põhinevaid kasvajaspetsiifilist järjestusi, millel on võime tungida vähirakku. Kuna praktilise osas olevate loomudelitena kasutati *PC-3* eesnäärme- ja *4T1* rinnanäärmevähi tuumoriga hiiri, siis käsitleti kirjanduse ülevaates ka kahte enamesinevat pahaloomulist kasvajat – eesnäärmevähk meestel ja rinnanäärmevähk naistel. Lisaks toodi välja nende kahe vähkkasvaja põhilised meditsiinis kasutatavad diagnostilised meetodid.

Töö praktilise osa esimese katseskeemi eesmärgiks oli leida varasemalt kirjeldatud biomolekulidega seonduvaid peptiide, mille veres ringlemise erinevus terves ja kasvajaga hiires võimaldaks diagnoosida *4T1* piimanäärmevähi olemasolu *BALB/c* hiire vereseerumi põhjal. Uuringute käigus leiti, et vähispetsiifilise peptiidi CRGDKGPDC veres püsimine on 15 minuti järel vähemalt kolm korda kõrgem tervetes hiirtes. Teise katseskeemi eesmärgiks oli leida uusi peptiidseid ligande, mille veres ringlemise erinevus terves ja kasvajaga hiires võimaldaks diagnoosida *PC-3* inimese eesnäärmevähi olemasolu *nude-FoxInu* hiire vereseerumi põhjal. Olenemata mitmetest identifitseeritud *CendR*-motiividega peptiididest, ei selekteerunud *in vivo* faagidisplei tulemusena ühtegi statistiliselt usaldusväärset vähispetsiifilist järjestust.

Käesoleva töö põhjal võib väita, et kasutades *in vivo* faagidisplei meetodit on võimalik CRGDKGPDC ja kontrollpeptiidi *CG<sub>7</sub>C* võrdlemisel tuvastada kasvaja olemasolu *4T1* piimanäärmevähiga *BALB/c* hiirtes. Usaldusväärsemate tulemuste saamiseks tuleks kasutada mitmeid erinevaid vähispetsiifilisi peptiide samaaegselt, mistõttu tuleks jätkata *de novo* vähidiagnostiliste peptiidide identifitseerimisega. Täiendavalt tuleks selekteerimine läbi viia faagi T7 kauaringlevate sabafiibrimutantidega, mis vähendaks mittespetsiifilist paardumist ja katsete taustmüra.

## Serum ratiometric diagnostic peptide *in vivo* phage display screening

Vidrik Teder

### Summary

Over 14 million new cancer cases are diagnosed in the world each year and over 8 million people die from it yearly. It is estimated that 30% of the deaths could be prevented with healthy lifestyle choices and with available vaccines against viruses that are associated with cancer. However, the death rate could be remarkably decreased if the cancer is diagnosed early which allows for timely treatment.

At the moment there are several different methods to diagnose the most common types of cancers, like prostate cancer in men and breast cancer in women. The suitability of these methods is questionable due to their high price, difficulty, low credibility or risks associated with the technology.

The aim of this master's thesis was to find an alternative screening method that would allow diagnosing tumors in mouse models. It is expected that cancer-specific peptides bind to cancer cells and therefore their ratio in the blood circulation decreases substantially. In order to confirm whether the ratio of cancer-specific peptides in the blood of a healthy mouse and a mouse with a tumor is different after a set time period, several consequential experiments were carried out on the basis of which the peptides that showed the highest quantitative differences were validated by using *Ion Torrent* and *qPCR* methods.

In the practical part of this thesis, two tests were constructed: first an *in vivo* phage display selection in *4T1* mammary carcinoma *BALB/c* mice by injecting them with the previously described biomarker-specific peptide phage library; in the second test the aim was to find new, *de novo* ratiometric peptides which would allow diagnosing the existence of *PC-3* prostate cancer in the *nude-FoxInu* mice with a tumor by injecting the mice with the peptides and allowing it to circulate in their blood.

The results were as follows:

- The cancer-specific peptide CRGDKGPDC concentration in the blood of healthy mice was three times higher than in the mice with *4T1* tumor after 15 minutes.
- By using a random CX<sub>7</sub>C library no statistically credible ratiometric peptides were identified by *in vivo* phage display selection.

In conclusion, it can be stated that screening that is based on *in vivo* phage display has potential to diagnose the existence of cancer on a basis of a blood test, because the results showed that the level of ratiometric peptides in the blood circulation of a mouse with a tumor is several times lower. However, this alternative approach requires additional tests of confirmation.

## TÄNUAVALDUSED

Kõige rohkem tahaksin tänada oma juhendajat Kuldar Kõivu, kelle heade ideede ja juhendamisel antud lõputöö valmis. Suured tänusõnad ka TÜ vähibioloogia kollektiivile ja muidugi ka labori juhataja Tambet Teesalule, tänu kellele sain ma antud magistritöö läbi viia probleemideta toredas ja heas õhkkonnas. Lisaks tahan tänada oma kaasjuhendajat Ott Schelerit, teadurit Pille Säälikut ja oma õde Maria Tederit, kellest oli suur abi lõputööle viimase lihvi andmisega.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Aareleid, T., Härmaorg, P., ja Vähiregister, M. M. (2005). Vähihaigete elulemus Eestis ja teistes Euroopa riikides (EUROCARE-3 projekt). *Eesti Arst*, 84(3), 151–6.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a Preventable Disease That Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9), 2097–116.
- Arap, W., Haedicke, W., Bernasconi, M., Kain, R., Rajotte, D., Krajewski, S., Ruoslahti, E. (2002). Targeting the Prostate for Destruction Through A Vascular Address. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1527–31.
- Arap, W., Kolonin, M. G., Trepel, M., Lahdenranta, J., Cardó-Vila, M., Giordano, R. J., Pasqualini, R. (2002). Steps Toward Mapping the Human Vasculature by Phage Display. *Nature Medicine*, 8(2), 121–7.
- Barton, M. B., ja Harris, R. (1999). Does This Patient Have Breast Cancer? The Screening Clinical Breast Examination: Should It Be Done? How? *The Journal of the American Medical Association*, 282(13), 1270–1280.
- Berg, W. A., Zhang, Z., Lehrer, D., Jong, R. A., Pisano, E. D., Barr, R. G., Gabrielli, G. (2014). Detection of Breast Cancer With Addition of Annual Screening Ultrasound or a Single Screening MRI, 307(13).
- Brigger, I., Dubernet, C., ja Couvreur, P. (2012). Nanoparticles In Cancer Therapy And Diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 24–36. doi:10.1016/j.addr.2012.09.006
- Brinton, L. a, Richesson, D. a, Gierach, G. L., Lacey, J. V, Park, Y., Hollenbeck, A. R., ja Schatzkin, A. (2008). Prospective Evaluation of Risk Factors for Male Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(20), 1477–81.
- Browder, T., Butterfield, C. E., Kräling, B. M., Kra, B. M., Shi, B., Marshall, B., Folkman, J. (2000). Antiangiogenic Scheduling of Chemotherapy Improves Efficacy against Experimental Drug-resistant Cancer. *Cancer Research*, 60, 1878–1886.
- Brown, K. C. (2010). Peptidic Tumor Targeting Agents: The Road from Phage Display Peptide Selections to Clinical Applications. In *Current Pharmaceutical Design* (pp. 1040–54).
- Burkhart, D. L., ja Sage, J. (2008). Cellular Mechanisms of Tumour Suppression by The Retinoblastoma Gene. *Nature Reviews. Cancer*, 8(9), 671–82.
- D’Onofrio, N., Caraglia, M., Grimaldi, A., Marfella, R., Servillo, L., Paolisso, G., ja Balestrieri, M. L. (2014). Vascular-homing Peptides for Targeted Drug Delivery and Molecular Imaging: Meeting the Clinical Challenges. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*.
- Davis, M. E., Chen, Z. G., ja Shin, D. M. (2008). Nanoparticle Therapeutics: An Emerging Treatment Modality For Cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(9), 771–82.

- De Abreu, F. B., Schwartz, G. N., Wells, W. a, ja Tsongalis, G. J. (2014). Personalized Therapy for Breast Cancer. *Clinical Genetics*, 1–6.
- Easton, D. F. (1999). How Many More Breast Cancer Predisposition Genes are There? *Breast Cancer Research : BCR*, 1(1), 14–7.
- Essler, M., ja Ruoslahti, E. (2002). Molecular Specialization of Breast Vasculature: A Breast-Homing Phage-displayed Peptide Binds to Aminopeptidase P In Breast Vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2252–7.
- Gage, M., Wattendorf, D., ja Henry, L. R. (2012). Translational Advances Regarding Hereditary Breast Cancer Syndromes. *Journal of Surgical Oncology*, 105(5), 444–51.
- Gao, C., Mao, S., Ronca, F., Zhuang, S., Quaranta, V., Wirsching, P., ja Janda, K. D. (2003). De novo Identification of Tumor-Specific Internalizing Human Antibody–receptor Pairs by Phage-display Methods. *Journal of Immunological Methods*, 274(1-2), 185–197.
- Hanahan, D., ja Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–74.
- Harvey, J. A. (2006). Sonography of Palpable Breast Masses. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 27(4), 284–297.
- Hayflick, L. (1965). The Limited in vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614–36.
- Hong, F. D., ja Clayman, G. L. (2000). Isolation of a Peptide for Targeted Drug Delivery into Human Head and Neck Solid Tumors Advances. *Cancer Research*, 60, 6551–6.
- Joyce, J. a, Laakkonen, P., Bernasconi, M., Bergers, G., Ruoslahti, E., ja Hanahan, D. (2003). Stage-specific Vascular Markers Revealed by Phage Display In A Mouse Model of Pancreatic Islet Tumorigenesis. *Cancer Cell*, 4(5), 393–403.
- Koivunen, E., Wang, B., ja Ruoslahti, E. (1994). Isolation of A Highly Specific Ligand For The Alpha 5 Beta 1 Integrin From A Phage Display Library. *The Journal of Cell Biology*, 124(3), 373–80.
- Kolonin, M. G., Sun, J., Do, K., Vidal, C. I., Ji, Y., Baggerly, K. A., Arap, W. (2006). Synchronous Selection of Homing Peptides for Multiple Tissues by in vivo Phage Display. *The FASEB Journal*, 20, 979–81.
- Krumpe, L. R. H., ja Mori, T. (2006). The Use of Phage-Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs. *International Journal of Peptide Research And Therapeutics*, 12, 79–91.
- Liang, S., Lin, T., Ding, J., Pan, Y., Dang, D., Guo, C., Fan, D. (2006). Screening and Identification of Vascular-Endothelial-Cell-Specific Binding Peptide in Gastric Cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 84(9), 764–73.
- Lilja, H. (2003). Biology of Prostate-specific Antigen. *Urology*, 62(5), 27–33.

- Lim, E., Metzger-Filho, O., ja Winer, E. P. (2012). The Natural History of Hormone Receptor-positive Breast Cancer. *Oncology (Williston Park)*, 26(8), 688–94, 696.
- Liotta, L. A., ja Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Tumor Invasion and Metastasis: An Imbalance of Positive And Negative Regulation. *Cancer Research*, 51, 5054–59.
- Mesila, I., Jõeste, E., Reintam, M.-A., Tamm, H., Riisipere, Ž., Murde, M., ja Roosipuu, R. (2012). *Patoanatomia õpik kõrgkoolile* (pp. 198–221). Tartu Ülikooli Kirjastus OÜ.
- Miller, D. C., Hafez, K. S., Stewart, A., Montie, J. E., ja Wei, J. T. (2003). Prostate Carcinoma Presentation, Diagnosis, and Staging: An Update From The National Cancer Data Base. *Cancer*, 98(6), 1169–78.
- Mitri, Z., Constantine, T., ja O'Regan, R. (2012). The HER2 Receptor In Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, And New Advances In Therapy. *Chemotherapy Research and Practice*, 2012, 1–7.
- Moyer, V. A. (2012). *Screening for Prostate Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement*. *The U.S. Preventive Services Task Force*, 157, 120–35.
- Mullen, L. M., Nair, S. P., Ward, J. M., Rycroft, A. N., ja Henderson, B. (2006). Phage Display In the Study of Infectious Diseases. *Trends In Microbiology*, 14(3), 141–7.
- Orel, G. (1998). High-Resolution Diagnosis, and MR Imaging For The Detection, Staging of Breast, 18(4), 903–12.
- Padrik, P., ja Everaus, H. (2013). *Onkoloogia õpik Arstiteaduskonna 4. kursusele*, 7–18, 51. Tartu Ülikooli Kirjastus OÜ.
- Pande, J., Szewczyk, M. M., ja Grover, A. K. (2010). Phage Display: Concept, Innovations, Applications And Future. *Biotechnology Advances*, 28(6), 849–58.
- Proskuryakov, S. Y., ja Gabai, V. L. (2010). Mechanisms of Tumor Cell Necrosis. *Current Pharmaceutical Design/harmaceutical Design*, 16(1), 56–68.
- Rajotte, ja Ruoslahti, E. (1999). Membrane Dipeptidase Is The Receptor for A Lung-Targeting Peptide Identified by In Vivo Phage Display. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11593–8.
- Ruoslahti, E. (2002a). Drug Targeting to Specific Vascular Sites. *Drug Discovery Today*, 7(22), 1138–43.
- Ruoslahti, E. (2002b). Specialization of Tumour Vasculature. *Nature Reviews. Cancer*, 2(2), 83–90.
- Russel, M. (1991). Filamentous Phage Assembly. *Molecular Microbiology*, 5(7), 1607–13.
- Samoylova, T. I., Morrison, N. E., Globa, L. P., ja Cox, N. R. (2006). Peptide Phage Display: Opportunities for Development of Personalized Anti-Cancer Strategies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 6(1), 9–17.

- Sergeeva, A., Kolonin, M. G., Molldrem, J. J., Pasqualini, R., ja Arap, W. (2006). Display Technologies: Application For The Discovery of Drug And Gene Delivery Agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1622–54.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., ja Jemal, A. (2014). Cancer Statistics, 2014. *CA - A Cancer Journal for Clinicians*, 64(1), 9–29.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens On The Virion Surface. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4705), 1315–7.
- Sokoloff, A. V., Wong, S. C., Ludke, J. J., Subbotin, V. M., Zhang, G., Budker, T., Wolff, J. A. (2003). A New Peptide Ligand That Targets Particles And Heterologous Proteins To Hepatocytes In Vivo. *Molecular Therapy*, 8(6), 867–72.
- Sugahara, K. N., Teesalu, T., Karmali, P. P., ja Ramana, V. (2010). Co-administration of A Tumor-penetrating Peptide Enhances The Efficacy of Cancer Drugs. *Science*, 328(5981), 1031–5.
- Žarkovski, M., ja Ausmees, K. (2009). PSA – Eesnäärmevähi Diagnostika, Skriiningu ja Jälgimise Marker. *Eesti Arst*, 88(4), 676–681.
- Teesalu, T., Sugahara, K. N., Kotamraju, V. R., ja Ruoslahti, E. (2009). C-end Rule Peptides Mediate Neuropilin-1-Dependent Cell, Vascular, And Tissue Penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16157–62.
- Teesalu, T., Sugahara, K. N., ja Ruoslahti, E. (2012). Mapping of Vascular ZIP Codes By Phage Display. *Methods in Enzymology*, 503, 35–56.
- Weinberg, R. A. (1995). The Retinoblastoma Protein And Cell Cycle Control. *Cell*, 81(3), 323–30.
- Velonas, V. M., Woo, H. H., Remedios, C. G. Dos, ja Assinder, S. J. (2013). Current Status of Biomarkers for Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11034–60.
- White, R., Rose, K., ja Zon, L. (2013). Zebrafish Cancer: The State of The Art And The Path Forward. *Nature Reviews. Cancer*, 13(9), 624–36.
- Work, L. M., Bu, H., Hunt, E., Nicklin, S. A., Denby, L., Britton, N., Baker, A. H. (2006). Vascular Bed-Targeted In Vivo Gene Delivery Using Tropism-Modified Adeno-associated Viruses. *Molecular Therapy*, 13(4), 683–93.

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<sup>i</sup> *World Health Organization*; kasutatud

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (20.05.2014)

<sup>ii</sup> *American Cancer Society*; kasutatud

<http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acute/myeloid/aml/detailedguide/index> (19.04.2014)

<sup>iii</sup> *American Cancer Society*; kasutatud

<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy/immunotherapy-immune-system> (17.04.2014)

<sup>iv-v</sup> Eesti Vähiliit; kasutatud <http://cancer.ee/> (18.04.2014)

<sup>vi-viii</sup> *Novagen Catalog 2009/2010*; kasutatud

<http://www.merckmillipore.com/> (varasemalt prinditud kujul)

<sup>ix</sup> Praimerite disainimistöööriist *Primer3*; kasutatud <http://primer3.ut.ee/> (06.12.2013)

<sup>x</sup> *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*; kasutatud

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> (06.12.2013)

# LISAD

## Lisa 1

### Faagi amplifitseerimise protokoll

#### 1. Üleöökultuuri kasvatamine *E. coli* (amplifikatsiooniks) ja *BLT5615* (tiitrimiseks) algkultuuridest

- Valmista vedelsööde bakteri üleöö (*ON, over night*) kultuuri kasvatamiseks, lisades 600 ml LB-söötmele (*Sigma-Aldrich Co, USA*) 600 µl karbenitsiliini (50 mg/ml; *Carbosynth Limited, UK*)
- Mõõda 25 ml eelnevalt valmistatud söödet kahte 250 ml-sse klaaskolbi
- Inokuleeri ühte 250 ml-sse klaaskolbi *E. coli BLT5403* ja teise *E. coli BLT5615* (*Novagen, USA*)
- Kasvata mõlemat kultuuri loksutis (*Eppendorf AG, USA*) 200 rpm 37 °C juures üleöö
- Mõõda võimaliku kontaminatsiooni tuvastamiseks 500 µl *ON*-kultuuri 15 ml plastikuubi (*Becton, Dickinson and Company, USA*) ja lisa 4 ml 60 °C juures hoitud topagarit (*Lab M Ltd, UK*) + 1 M IPTG (*Carbosynth Ltd, UK*) lahus suhtega 500:1-le, seejärel vala eelnevalt valmistatud 1x LB Milleri söötmega (*Sigma-Aldrich Co, USA*) Petritassidele<sup>5</sup> ja hoiu 37 °C juures vähemalt 3 h
- Puhta *E. coli BLT5403* ja *BLT5615* (*Novagen, USA*) *ON* kultuur villi varasemalt autoklaavitud klaaspurkidesse ja hoiusta kuni nädal 4 °C juures

#### 2. *E. coli BLT5403* ja *BLT5615 ON* kultuuridest 0,5 optilise tihedusega ( $OD_{600}$ ) kultuuride saamine

- Puhta *E. coli BLT5615* ja *BLT5403* (*Novagen, USA*)  $OD_{600}=0,5$  kultuur saamiseks mõõda paralleelselt kahte 2 l-sse klaasanumasse 250 ml esimesel päeval valmistatud LB (*Sigma-Aldrich Co, USA*) ja karbenitsiliini (50 mg/ml; *Carbosynth Limited, UK*) vedelsöödet ja ühte anumasse 2,5 ml *E. coli BLT5615 ON* kultuuri, teise *E. coli BLT5403* (*Novagen, USA*) *ON* kultuuri
- Kasvata mõlemad kultuurid loksutil (*Eppendorf AG, USA*) 200 rpm-i 37 °C juures ligikaudu ~2,5 h kuni  $OD_{600}=0,5$

---

<sup>5</sup> Valmistanud TÜ vähibioloogia laborispetsialist Kaarel Kurm

- Puhtad *E. coli* BLT5615 ja BLT5403 (Novagen, USA) OD<sub>600</sub>=0,5 kultuurid villiti varasemalt autoklaavitud klaasipurkidesse ja hoiusta kuni nädal 4 °C juures

### 3. Faagi amplifikatsioon

#### a. Preamplifikatsiooniga (vajalik ainult madala faagi kontsentratsiooni korral)

- Valmista faagi preamplifikatsioonilahus: pipeteeri 10 µl uuritavat faagi 1 ml-sse lahusesse, kus on LB-sööde (*Sigma-Aldrich Co, USA*) + karbenitsilliin (50 mg/ml; *Carbosynth Limited, UK*) + *E. coli* BLT5403 (Novagen, USA) ON kultuur vastavalt 1000:10:100 suhtega. Kasuta 15 ml-st plastiktuubi (*Becton, Dickinson and Company, USA*)
- Inkubeeri loksutil (*Eppendorf AG, USA*) 200 rpm 37 °C juures ~2 h
- Valmista lüüsilahus: kalla kokku 25 ml *E. coli* BLT5403 (Novagen, USA) OD<sub>600</sub>=0,5 kultuur ja ~1 ml faagi preamplifikatsioonilahus
- Inkubeeri loksutil (*Eppendorf AG, USA*) 200 rpm 37 °C juures ~1,5 h, kuni lüüsilahus selgineb ehk bakteri lüüsumiseni

#### b. Preamplifikatsioonita

- Valmista lüüsilahus – kalla kokku 25 ml *E. coli* BLT5403 (Novagen, USA) OD<sub>600</sub>=0,5 kultuur ja kuni 2 ml kõrge kontsentratsiooniga faagisuspensioon
- Inkubeeri loksutil (*Eppendorf AG, USA*) 200 rpm 37 °C juures ~1,5 h, kuni lüüsilahus selgineb ehk bakteri lüüsumiseni

## Lisa 2

### Faagi puhastamise protokoll

#### 1. Faagi PEG-puhastamine (polüetüleenglükool) (etapid vii läbi jääl)

- Vala lüsaat 50 ml-sse plastiktubi. Lisa lüsaadile 3 ml 5 M-st NaCl (*Sigma-Aldrich Co, USA*), sega korralikult, seejärel tsentrifuugi 10 min 8000 rpm 4 °C juures (rootor ss34)
- Saadud supernatandile lisa 8,4 ml 50%-st PEG8000<sup>6</sup>, sega korralikult, seejärel inkubeeri ~30 min jääl 4 °C külmikus
- Tsentrifuugi 8000 rpm (rootor ss34) 10 min 4 °C juures, eemalda supernatant ning lase sademel 1-2 min kuivada
- Resuspendeeri sade 2 ml-s 1x PBS-s (*PAA, Austria*)

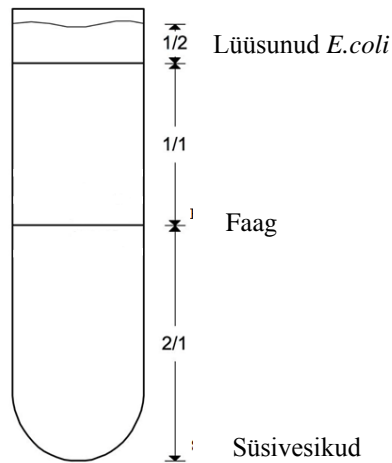
#### 2. Faagi CsCl<sub>2</sub>-puhastamine

- Valmista 62,5%-ne CsCl<sub>2</sub> alglahus: 25 g CsCl<sub>2</sub> (*Sigma-Aldrich Co, USA*) + 15 ml 1x PBS (*PAA, Austria*). Filtreeri lahus läbi d=0,22 µm filtri (*Merck Millipore Ltd, IRL*)
- Pipeteeri kindlas järjekorras kolm kihti erineva kontsentratsiooniga lahust ultratsentrifuugi tuubi (*Beckman Coulter Inc, USA*) ja märgista iga kihi tase tuubile (Tabel 2)
- Lisa kõige peale 2 ml PEG-puhastatud faagi, ultratsentrifuugi 2 h 30 min 40 000 rpm (rootor sw50.1)
- Pärast ultratsentrifuugimist jaotuvad PEG-puhastatud faagisuspensiooni komponendid vastavalt joonisele 9
- Torka 3 ml-ne süstal plastiktubi seinast läbi ja kogu 2 ml faagisuspensiooni süstlasse (*Becton, Dickinson and Company, USA*)

**Tabel 2. CsCl<sub>2</sub> puhastamine.** CsCl<sub>2</sub> alglahuse (*Sigma-Aldrich Co, USA*) ja 1x PBS-i (*PAA, Austria*) lahuste suhted, pipeteerimisjärjekord ja maht.

Jrk	CsCl <sub>2</sub> /1x PBS suhe	Maht (ml)
1.	2:1	4,375
2.	1:1	3,750
3.	1:2	0,625

<sup>6</sup> Valmistanud TÜ vähibioloogia laborant Kaarel Kurm



**Joonis 9.** CsCl<sub>2</sub>-puhastamise ultratsentrifuugimisetapi järgne tulemus. 1/2-kihi pinnale jäävad lüüsitud *E. coli* tükid, 2/1 kihi pinnale jäävad faagid, põhja vajuvad süsivesikud.

### 3. Dialüüs

- Süsti ~2 ml CsCl<sub>2</sub>-puhastatud faagi dialüüsikassetti (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*) läbilaskevõimega 3500 Da
- Dialüüsi kassetis olevat faagisuspensiooni 1 h 2 l-s 1x PBS-s (*PAA, Austria*) pidevalt magnetsegajal segades (*Biosan, Läti*), seejärel vaheta dialüüsipuhver ning dialüüsi veelkord 1 h
- Tõmba 3 ml süstlaga (*Becton, Dickinson and Company, USA*) dialüüsikassetist puhastatud faagisuspensiooni ja määra selle tiiter
- Puhastatud faagi säilitada 4 °C juures

## Lisa 3

### Tiitrimine

- Tee faagi lahjendusteseeria LB-söötmes (*Sigma-Aldrich Co, USA*) järgmiselt:
  - kui eeldatav faagi tiiter on  $10^2$ - $10^8$  pfu/ml (*plaque forming units/ml*) (Tabel 3)
  - kui eeldatav faagi tiiter on  $>10^8$  pfu/ml (Tabel 4)
- Võta 100 µl lahjendust ja 500 µl *E. coli BLT5615* (*Novagen, USA*)  $OD_{600}=0,5$  kultuuri ning pitpeteeri need 15 ml plastiktuubi (*Becton, Dickinson and Company, USA*). Lisa 4 ml 60 °C juures hoitud topagari (*Lab M Ltd, UK*) + 1 M IPTG (*Carbosynth Ltd, UK*) segu suhtega 500:1-le ja sega hoolikalt ning vala eelnevalt valmistatud 1x LB Milleri söötmega (*Sigma-Aldrich Co, USA*) Petritassidele<sup>7</sup> ja hoiu 37 °C juures vähemalt 3 h

**Tabel 3. Faagi lahjendusteseeria LB-söötmes.** Kui eeldatav faagi tiiter on  $10^2$ - $10^8$  pfu/ml (*Sigma-Aldrich Co, USA*). \*algne faagisuspensioon.

Lahjenduse nr	Eelnev lahjendus (µl)	LB (µl)	Kordaja pfu/ml arvutamiseks
1.	100*	900	$\times 10^2$
2.	100	900	$\times 10^3$
3.	100	900	$\times 10^4$
4.	100	900	$\times 10^5$
5.	100	900	$\times 10^6$
6.	100	900	$\times 10^7$

**Tabel 4. Faagi lahjendusteseeria LB-söötmes.** Kui eeldatav faagi tiiter on  $>10^8$  pfu/ml (*Sigma-Aldrich Co, USA*). \*algne faagisuspensioon.

Lahjenduse nr	Eelnev lahjendus (µl)	LB (µl)	Kordaja pfu/ml arvutamiseks
1.	10*	990	$\times 10^3$
2.	10	990	$\times 10^5$
3.	10	990	$\times 10^7$
4.	100	900	$\times 10^8$
5.	100	900	$\times 10^9$
6.	100	900	$\times 10^{10}$

<sup>7</sup> Valmistanud TÜ vähibioloogia laborant Kaarel Kurm

#### Lisa 4

**Tabel 5. Bakteriofaagi T7 multikloneerimissaiti kloneeritavad oligonukleotiidid.** Kõikide *sense* ja *antisense* ahelate 5'-otsad on fosforüleeritud. Kloneerimispraimerid on disainitud Kuldar Kõiv.

Jrk	Tähis	<i>Sense</i> <i>Antisense</i>	5'-3' järjestus
1	CARPAR	S AS	AAT TCT TGC GCG CGT CCG GCG CGT TAA CAT AAT CAA TTT CAA CTT TCT ACT TA AGC TTA AGT AGA AAG TTG AAA TTG ATT ATG TTA ACG CGC CGG ACG CGC GCA AG
2	CRGDKGPDC	S AS	AAT TCT TGC CGT GGT GAT AAG GGG CCG GAT TGC TAA CAA ATA CAT AAT CTT ACA TTC ACT TA AGC TTA AGT GAA TGT AAG ATT ATG TAT TTG TTA GCA ATC CGG CCC CTT ATC ACC ACG GCA AG
3	CRRETAWAC	S AS	AAT TCT TGC CGT CGT GAA ACC GCG TGG GCG TGC TAA AAT TTC TTC TCT TTC TTT CAC AAT TA AGC TTA ATT GTG AAA GAA AGA GAA GAA ATT TTA GCA CGC CCA CGC GGT TTC ACG ACG GCA AG
4	CNRRTKAGC	S AS	AAT TCT TGC AAC CGT CGT ACC AAA GCG GGC TGC TAA TAC TTC TTT ACT ACA ATT TAC AAC TA AGC TTA GTT GTA AAT TGT AGT AAA GAA GTA TTA GCA GCC CGC TTT GGT ACG ACG GTT GCA AG
5	CGSRGARSC	S AS	AAT TCT TGC GGT AGT CGG GGG GCT CGG TCT TGC TAA ACA CTT ATC TTT CAA TTC AAT TAC TA AGC TTA GTA ATT GAA TTG AAA GAT AAG TGT TTA GCA AGA CCG AGC CCC CCG ACT ACC GCA AG
6	CRATRGDKC	S AS	AAT TCT TGC CGC GCG ACC CGC GGC GAT AAA TGC TAA ATA CTT TAC AAA CAA ATA ACA CAC TA AGC TTA GTG TGT TAT TTG TTT GTA AAG TAT TTA GCA TTT ATC GCC GCG GGT CGC GCG GCA AG
7	CGLIIQKNEC	S AS	AAT TCT TGC GGG CTG ATT ATT CAG AAG AAT GAG TGC TAA CTT TCT CAT ACT TTC AAC TAA TTT TA AGC TTA AAA TTA GTT GAA AGT ATG AGA AAG TTA GCA CTC ATT CTT CTG AAT AAT CAG CCC GCA AG
8	CG <sub>7</sub> C	S AS	AAT TCT TGC GGT GGC GGA GGT GGT GGA GGT TGC TAA TCA AAC TCT CAA TTC TTA CTT AAT TA AGC TTA ATT AAG TAA GAA TTG AGA GTT TGA TTA GCA ACC TCC ACC ACC TCC GCC ACC GCA AG

## Lisa 5

**Tabel 6. Bakteriofaagi T7 multikloneerimissaiti kloneeritavad oligonukleotiidid.** Kõikide *sense* ja *antisense* ahelate 5'-otsad on fosforüleeritud. Kloneerimispraimerid on disainitud laborispetsialist Kuldar Kõiv.

Jrk	Tähis	<i>Sense</i> <i>Antisense</i>	5'-3' järjestus
1	CNDRDGQKC	S AS	AAT TCT TGC AAC GAT CGC GAT GGC CAG AAA TGC TA AGC TTA GCA TTT CTG GCC ATC GCG ATC GTT GCA AG
2	CGVKKTKAC	S AS	AAT TCT TGC GGC GTG AAA AAA ACC AAA GCG TGC TA AGC TTA GCA CGC TTT GGT TTT TTT CAC GCC GCA AG
3	CVKKAPSMC	S AS	AAT TCT TGC GTG AAA AAA GCG CCG AGC ATG TGC TA AGCTTAGCACATGCTCGGCGCTTTTTTCACGCAAG
4	CNKEGRATC	S AS	AAT TCT TGC AAC AAA GAA GGC CGC GCG ACC TGC TA AGC TTA GCA GGT CGC GCG GCC TTC TTT GTT GCA AG
5	CDKEGRESC	S AS	AAT TCT TGC GAT AAA GAA GGC CGC GAA AGC TGC TA AGC TTA GCA GCT TTC GCG GCC TTC TTT ATC GCA AG
6	CGRRKGGTC	S AS	AAT TCT TGC GGC CGC CGC AAA GGC GGC ACC TGC TA AGC TTA GCA GGT GCC GCC TTT GCG GCG GCC GCA AG
7	CHKTRRTC	S AS	AAT TCT TGC CAT AAA ACC ACC CGC CGC ACC TGC TA AGC TTAG CAG GTG CGG CGG GTG GTT TTA TGG CAA G
8	CRQGERSTC	S AS	AAT TCT TGC CGC CAG GGC GAA CGC AGC ACC TGC TA AGC TTA GCA GGT GCT GCG TTC GCC CTG GCG GCA AG
9	CEMNRGTNC	S AS	AAT TCT TGC GAA ATG AAC CGC GGC ACC AAC TGC TA AGC TTA GCA GTT GGT GCC GCG GTT CAT TTC GCA AG
10	CKRSRDKEC	S AS	AAT TCT TGC AAA CGC AGC CGC GAT AAA GAA TGC TA AGC TTA GCA TTC TTT ATC GCG GCT GCG TTT GCA AG
11	CGKRGKMTc	S AS	AAT TCT TGC GGC AAA CGC GGC AAA ATG ACC TGC TA AGC TTA GCA GGT CAT TTT GCC GCG TTT GCC GCA AG
12	CGLDGSSSC	S AS	AAT TCT TGC GGC CTG GAT GGC AGC AGC AGC TGC TA AGC TTA GCA GCT GCT GCT GCC ATC CAG GCC GCA AG
13	CASRTPKRC	S AS	AAT TCT TGC GCG AGC CGC ACC CCG AAA CGC TGC TA AGC TTA GCA GCG TTT CGG GGT GCG GCT CGC GCA AG

## Lisa 6

Tabel 7. PCR protokollid praimerid Sangeri sekveneerimise ettevalmistamiseks.

Jrk	Tähis	5'-3' järjestus
1.	T7UP	AGC GGA CCA GAT TAT CGC TA
2.	T/DOWN	AAC CCC TCA AGA CCC GTT TA

Tabel 8. PCR protokollid praimerid *Ion Torrenti* analüüsi ettevalmistamiseks.

Jrk	Tähis	5'-3' järjestus
1.	T7F1P1NGS	CCT CTC TAT GGG CAG TCG GTG ATA CCA GAT TAT CGC TAA GTA CGC
2.	TR2ANGSBC1	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG CTA AGG TAA CTT ACT CGA GTG CGG CCG
3.	TR2ANGSBC6	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG CTA AGG TAA CTT ACT CGA GTG CGG CCG
4.	TR2ANGSBC7	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG TTC GTG ATT CTT ACT CGA GTG CGG CCG
5.	TR2ANGSBC8	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG TTC CGA TAA CTT ACT CGA GTG CGG CCG
6.	TR2ANGSBC10	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG CTG ACC GAA CTT ACT CGA GTG CGG CCG

## Lisa 7

**Tabel 9. qPCR protokollid praimerid.** Praimerid on disainitud kasutades programme *Primer3web versioon 4.0.0<sup>x</sup>* ja *OligoCalc<sup>x</sup>*.

Jrk	Tähis	5'-3' järjestus
1.	iRGD_3	GGT GAT AAG GGG CCG GAT TG
2.	G7_3	GGA GGT GGT GGA GGT TGC TA
3.	T7_r2	TTA CTC GAG TGC GGC CG

**Tabel 10. Biomarkerispetsiifiliste peptiidide *in vivo* teisel selektsiooniringil suurimaid erinevusi andvad peptiidid tervetes ja tuumoriga hiirtes.** Katses võrreldi faagidisplei meetodil varasemalt kirjeldatud biomolekulidega seonduvate peptiidide veres ringlemise erinevusi terves ja tuumoriga hiires. *Ion Torrent*-i andmetest.

Jrk	Peptiidne järjestus	Terve <i>BALB/c</i> (DNA molekulide arv reaktsioonis)	<i>4T1</i> tuumoriga <i>BALB/c</i> (DNA molekulide arv reaktsioonis)
1.	CGGGGGGC	10 183	11 890
2.	CARPAR	3 968	3 759
3.	CRGDKGPDC	2 795	218
4.	CRRETAWAC	1 250	868
5.	CRATRGDKC	14 569	14 565
6.	CNRRTKAGC	13 576	16 189
7.	CGLIIQKNEC	9 954	11 696
8.	CGSRGARSC	18 513	15 622

## Lisa 8

**Tabel 11. Varem kirjeldatud biomarkerispetsiifiliste peptiidide faagiraamatukogu.** Koostatud TÜ vähibioloogia laboris (Teesalu jt., 2012) põhjal.

Jrk	Peptiidne järjestus	<i>In vivo</i> seandumiskoht	Jrk	Peptiidne järjestus	Seandumiskoht
1.	gSMIARL	Eesnääre	15.	CGNKRTRGC	Tuumori lümfid, tuumori makrofaagid ja tuumori hüpoksilise piirkonna (Lyp-1) rakud
2.	gVSFLEYR	Eesnääre	16.	CREKA	Arenevad veresooned (CREKA)
3.	CNGRC	Arenevad veresooned, mitmed kohad	17.	CTTHWGFTLC	Ensüüm gelatinaas arenevas veresoones
4.	CREAGRKAC	Tuumori lümfid	18.	CSRPRRSEC	Atüüpiline sünnimärk
5.	CAGRRSAYC	Pre-maliigsed tuumori lümfid	19.	CGKRK	Lamerakk-kartsinoom
6.	CRAKSKVAC	Atüüpiline sünnimärk	20.	CLSDGKRKC	C8161 melanoomi lümfid
7.	CRRETAWAC	$\alpha 5\beta 1$ integriin	21.	CNRRTKAGC	Lyp2/K14HPV16 atüüpse sünnimärgi kahjustused
8.	CRPPR	Süda	22.	RPARPAR	Proteolüütiline <i>CendR</i> peptiid
9.	CPKTRRVPC	Süda	23.	CRGDKGPDC	Erinevad kasvavad (iRGD)
10.	CGLIIQKNEC	Vereklomp (CLT1)	24.	CAGALCY	Aju
11.	CNAGESKNC	Vereklomp (CLT2)	25.	GGGGGGG	Puudub (negatiivne kontroll)
12.	CARSKNKDC	Haav (CAR)	26.	CGGGGGGGC	Puudub (negatiivne kontroll)
13.	CRKDKC	Haav (CRK)	27.	SSVDKLAAL	Inserdita faag
14.	GLNGLSSADPSSD WNAPAEWGNW VDEDRASLLKSQE PISNDQKVSDDDK EKGEGALPTGKSK	Kops	28.-59.	Erinevad avaldamata biomarkerispetsiifilised järjestused	

## Lisa 9

**Tabel 12. CX<sub>7</sub>C-raamatukogu *in vivo* teisel selektsiooniringil suurimaid erinevusi andvad faagid tervetes ja tuumoritega hiirtes.** Katses võrreldi faagidisplei meetodil madaldatud mitmekesisusega (10<sup>5</sup>) CX<sub>7</sub>C-raamatukogu peptiidide veres ringlemise erinevusi terves ja tuumoriga hiires. *Ion Torrent*-i andmetest.

<b>Jrk</b>	<b>Peptiidne järjestus</b>	<b>Terve <i>nude-Fox1nu</i> (DNA molekulide arv reaktsioonis)</b>	<b>PC-3 tuumoriga <i>nude-Fox1nu</i> (DNA molekulide arv reaktsioonis)</b>
1.	CGGGGGGGC	23 357	47 155
2.	CNDRDGQKC	19 610	25 131
3.	CGVKKTKAC	5 240	4 323
4.	CVKKAPSMC	6 561	4 411
5.	CNKEGRATC	7 171	4 925
6.	CDKEGRESC	1 275	384
7.	CGRRKGGTC	10 657	9 748
8.	CHKTRRTC	10 459	6 375
9.	CRQGERSTC	10 162	14 938
10.	CEMNRGTNC	4 774	3 967
11.	CKRSRDKEC	24 988	12 594
12.	CGKRGKMTc	8 006	6 651
13.	CGLDGSSSC	50 470	46 763
14.	CASRTPKRC	10 053	12 869



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

“Loomakaitseaduse” § 45 lõike 3 ja § 47 lõike 6 alusel ning loomkatse läbiviimise loakomisjoni 21. novembri 2011. a istungi protokoll 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 xylasine´st (10 mg/kg) i.p.) süstitakse prostata vähirakud eesnäärme eessagarasse või pankrease põrnasagarasse. Kõhuõõne sein suletakse õmblustega, haav desinfitseeritakse.

c) glioomide implanteerimine ajukoosse – üldnarkoosis katselooma koljusse puuritakse 1 mm diameetriga avaus ja vähirakud süstitakse 3,5 mm sügavusele. Ava koljus suletakse luuvahaga, nahahaav suletakse õmblustega ning desinfitseeritakse.

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

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

2. Otsust on õigus vaidlustada “Haldusmenetluse seaduses” või “Halduskohtumenetluse seadustikus” ettenähtud korras ja tähtaja jooksul.

Sulev Kõks

*lalkirjastatud digitaalselt/*

Komisjoni esimees

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Vidrik Teder (sünnikuupäev: 19.01.1989),

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

**„Vähidiagnostiliste peptiidide skriinimine *in vivo* faagidisplei meetodiga“**,

mille juhendajad on Kuldar Kõiv, MSc ja Ott Scheler, PhD

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

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **26.05.2014** 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.