

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kristina Kiisholts

**PepFect6 poolt vahendatud RNA interferents *in vitro* ja *in vivo* mudelites**  
Magistritöö

Juhendaja PhD Kaido Kurrikoff

TARTU 2014

# SISUKORD

SISUKORD .....	2
SISSEJUHATUS .....	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Ajukasvajad .....	7
1.2 Kasvajate modelleerimine .....	10
1.2.1 <i>In vitro</i> ühekihiline rakukultuur .....	10
1.2.2 <i>In vivo</i> hiiremudelid.....	10
1.2.3 <i>In vitro</i> sfäärid .....	11
1.3 Geeniteraapia.....	12
1.4 RNA interferents .....	12
1.4 Rakutsükli seosed ribonukleotiidi reduktaasiga .....	14
1.5 Transportvektorid .....	15
1.6 Rakku sisenevad peptiidid.....	16
1.6.1 PepFect tehnoloogia .....	17
1.6.2 PepFect6 .....	18
2 EKSPERIMENTAALNE OSA .....	19
2.1 Töö eesmärgid .....	19
2.2 Materjalid ja meetodika.....	19
2.2.1 Eksperimendis kasutatud rakuliinid .....	19
2.2.2 siRRM2 disainimine.....	19
2.2.3 Nanopartiklite moodustamine ja transfektsioon rakukultuuris .....	19
2.2.4 Kvantitatiivne RT-PCR.....	20
2.2.5 Rakutsükli analüüs läbivoolutsütomeetria abil.....	22
2.2.6 RNA interferentsi uurimine <i>in vivo</i> .....	22
2.2.7 Sfääride moodustamine ja transfektsioon.....	24
2.2.8 Konfokaalmikroskoopia .....	25
2.3 Tulemused .....	26
2.3.1 Geeniekspressiooni muutused <i>in vitro</i> ühekihilises rakukultuuris.....	26
2.3.2 Rakutsükli analüüs 2D rakukultuuris .....	27
2.3.3 Tuumori kasvu mõjutamine <i>in vivo</i> hiiremudelis.....	28
2.3.4 <i>In vivo</i> geeniekspressioon.....	29

2.3.5 Sfääride moodustumine.....	30
2.3.6 Geeniekspressiooni muutused 3D rakukultuuris.....	31
2.3.7 Konfokaalmikroskoopia .....	32
2.3.8 Rakutsükli analüüs tuumori sfäärides.....	34
ARUTELU .....	35
KOKKUVÕTE .....	39
SUMMARY .....	40
KIRJANDUSE LOETELU.....	41
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	44
LISAD .....	45
Lisa 1 .....	45
Lisa 2 .....	46
Lisa 3 .....	47
Lisa 4 .....	48
TÄNUSÕNAD .....	50
LIHTLITSENTS.....	51

## KASUTATUD LÜHENDID

2D	2-dimensionaalne
3D	3-dimensionaalne
AGO	Argonaudi valk (osa RISC kompleksist)
cDNA	( <i>complementary DNA</i> ) komplementaarne DNA
CPP	( <i>cell penetrating peptide</i> ) rakku sisenev peptiid
CQ	( <i>chloroquine</i> ) klorokviin, endosomolüütiline reagent
DMEM	( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
dsRNA	( <i>double-stranded RNA</i> ) kaheahelaline RNA
FBS	( <i>fetal bovine serum</i> ) veise looteserum
GAPDH	glütseeraldehüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas
GBM	( <i>glioblastoma multiforme</i> ) glioblastoom, pahaloomuline ajukasvaja
LF	( <i>Lipofectamine™ 2000</i> ) lipofektamiin, <i>in vitro</i> kasutatav kaubanduslik transfektsioonireagent
MQ	deioniseeritud vesi
MR	<i>molar ratio</i> , molaarne suhe
MRT	magnetresonantstomograafia
ON	oligonukleotiid
PET	positronemissioontomograaf
PF	PepFect tehnoloogia, klass transportaan 10-l põhinevaid CPPsid
PF3	PepFect3
PF6	PepFect6
pre-RISC kompleks	( <i>precursor RNA-induced silencing complex</i> ) prekursor RNA-indutseeritud vaigistuskompleks
pre-miRNA	prekursor mikroRNA
pri-miRNA	primaarne mikroRNA
PI	( <i>propidium iodide</i> ) propiidiumjodiid
qRT-PCR	( <i>quantitative real-time PCR</i> ) kvantitatiivne reaalaaja PCR
RISC	( <i>RNA-induced silencing complex</i> ) RNA-indutseeritud vaigistuskompleks
RNAi	RNA interferents
RR	ribonukleotiidi reduktaas
RRM1	ribonukleotiidi reduktaasi subühik 1
RRM2	ribonukleotiidi reduktaasi subühik 2
siRNA	( <i>small interfering RNA</i> ) väike interfereeruv RNA

TP10 transportaan10  
UT (*untreated*) töötlemata rakud  
WHO (*World Health Organization*) Maailma Terviseorganisatsioon

## SISSEJUHATUS

Ajukasvaja üheks kõige levinumaks ja ohtlikumaks vormiks on glioblastoom, kuna see on väga invasiivne vähivorm ning diagnoositakse tihti liiga hilises staadiumis. Kasvajate modelleerimiseks uurimistöö ja ravimite testimise eesmärgil on välja töötatud mitmeid erinevaid mudeleid, millest kõige laialdasemalt kasutatavad on tuumorirakkude kasvatamine koekultuuris ning kasvajate indutseerimine laborihiirtes.

Üheks kõige suuremat potentsiaali omavaks geeniteraapia teostamise vahendiks on siRNA ja selle abil RNA interferentsiga spetsiifiliste geenide post-transkriptsiooniline vaigistamine. Geeniteraapia suurimaks väljakutseks on aga erinevate bioaktiivsete nukleiinhapete rakkudesse viimiseks sobivate transportvektorite arendamine. Sellisteks vektoriteks võivad olla rakku sisenevad peptiidid, mis on tänu erinevatele modifikatsioonidele võimelised transportima erinevaid molekule läbi raku plasmamembraani ning kohale toimetama vajalikku asukohta rakus.

Antud töö eesmärgiks oli vähispetsiifilise ribonukleotiidi reduktaasi M2 subühiku geeni vastase siRRM2 valideerimine, kasutades rakku sisenevat peptiidi PepFect6. Lisaks sooviti uurida PepFect6 potentsiaali RNA interferentsi vahendamisel *in vivo* hiiremudelites. Viimaseks eesmärgiks püstitati 3D rakukultuuride kasutamise meetodika väljatöötamine rakendamiseks rakku sisenevate peptiidide uurimisel.

Antud uurimistöö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.

Märksõnad: rakku sisenevad peptiidid, RNA interferents, ribonukleotiidi reduktaas, *in vivo* tuumorimudelid, 3D rakukultuurid

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Ajukasvajad

Kõige levinumateks primaarseteks ajukasvajateks on pahaloomulised glioomid. Nende heterogeensus, hõlmates kliinilist esinemist, patoloogilisust ja ravimivastust, muudab seda tüüpi kasvajakid keeruliseks uurimisobjektiks. Lisaks on haiguse varajane diagnoosimine raskendatud, sest kliinilised sümptomid on tihti ebaspetsiifilised (Jovčevska et al., 2013). Hiljutised kuvamismeetodite ja -tulemuste kvantitatiivse analüüsi edasiarendused on siiski viinud kasvaja diagnoosimise ja ravi alustamise varasemaks. See annab onkoloogidele rohkem aega, et kindlaks määrata kõige sobivam ravikäik. Lisaks on paranenud arusaamad kasvajate bioloogilistest, geneetilistest ja vastupanu-mehhanismidest, mis on omakorda täiustanud kirurgilisi, kemoterapia- ja kiirituse meetodeid (Ahmed et al., 2014).

Maaailma Terviseorganisatsioon (WHO – *World Health Organization*) on klassifitseerinud glioomid histoloogilise tüübi järgi, võttes aluseks kasvaja kõige pahaloomulisema osa. Kasvaja pahaloomulisuse aste sõltub tuumade atüüpismi tasemest, mitootilisest aktiivsusest, mikrovaskulaarsest vohamisest ja nekroosist, kusjuures mida suuremad on haiguslikud muutused rakkudes, seda kõrgema astmega kasvaja on. Astmed jagunevad järgmiselt:

- I aste – pilotsütaarne astrotsütoom
- II aste – difuusne astrotsütoom
- III aste – anaplastne astrotsütoom
- IV aste – glioblastoom (GBM – *glioblastoma multiforme*)

I ja II on madalad astmed ning III ja IV on kõrged astmed. Viimaseid kahte peetakse pahaloomulisteks glioomideks. Keskmine diagnoosimise vanus on glioblastoomide puhul 64 aastat ja anaplastsete glioomide puhul 45 aastat. Pahaloomulised glioomid on sagedased ning põhjustavad patsientide suurt suremust. Isegi optimaalse ravi puhul on keskmine ellujäämise aeg pärast haiguse avastamist glioblastoomide puhul ainult 12-15 kuud ja anaplastiliste glioomide puhul 2-5 aastat (Ahmed et al., 2014).

Glioblastoom võib olla primaarne (tekkides *de novo*) või sekundaarne (arenedes madalama astme kasvajast). Primaarsed glioblastoomid on sagedasemad ja tekivad enamasti üle 50-aastastel patsientidel, sekundaarsed aga sagedamini noorematel patsientidel. Viimased tekivad algselt madalama astme kasvajana ning progresseeruvad mitmete aastate jooksul glioblastoomiks (Jovčevska et al., 2013). Lisaks primaarsetele ja sekundaarsetele

ajukasvajatele võivad ajus esineda ka teiste vähitüüpide metastaasid, mis on kõige sagedamini pärit melanoomist, kopsu- või rinnavähist (Ahmed et al., 2014).

Igal aastal diagnoositakse üle 11 miljonil indiviidil vähk ning on ennustatud, et aastaks 2020 tõuseb see arv 16 miljonini. Pahaloomulised glioomid on kõige levinum primaarsete ajukasvajate vorm, mille iga-aastane sagedus on 5 indiviidi 100 000 inimese kohta (Jovčevska et al., 2013). Pahaloomulistest glioomidest on aga kõige sagedasemad glioblastoomid, moodustades neist 82% (Omuro and DeAngelis, 2013).

GBM omab histoloogiliselt suurenenud rakulist tihedust ja mitootilist aktiivsust, selles toimub vaskulaarne vohamine ja esineb nekroos. Nende tuumorite rakud on pleomorfseid ehk nende suurus ja kuju varieerub suuresti. GBM ja teised pahaloomulised glioomid on väga invasiivsed, infiltreerudes ümbritsevasse aju parenhüümi, kuid samas esinevad nad tüüpiliselt kesknärvisüsteemis ning ei metastaseeru (Omuro and DeAngelis, 2013).

Gliome on väga keeruline varakult diagnoosida, sest patsientidel esinevad sümptomid nagu peavalud, segadus ja mäluhäired ei pruugi olla alguses kuigi tõsised ega spetsiifilised vaid ajukasvajale (Jovčevska et al., 2013). Samuti võidakse ajukasvaja sümptomeid nagu kognitiivseid raskuseid ja isiksusemuutuseid ekslikult pidada psühhiaatriliseks häireteks või dementsuseks, eriti kui tegu on vanemate indiviididega (Omuro and DeAngelis, 2013).

Patsiendi aju kuvamine mängib kõige olulisemat rolli diagnostikas ja tuumori asukoha, ulatuse ja bioloogilise aktiivsuse hindamisel nii enne, pärast kui ka ravi kestel. Ajukasvaja olemasolu tehakse enamasti kindlaks kahe laialtlevinud kuvamismeetodi, kompuutertomograafia (KT) või magnetresonantstomograafia (MRT) abil, kus kasvaja ilmneb massina ajus, mis on ümbritsetud ajutursetega (Jovčevska et al., 2013). Lisaks on viimastel aastakümnetel diagnostikas ja klassifitseerimisel kasutatud molekulaarne patoloogia muutnud pahaloomuliste glioomide käitlemist. Molekulaarsed biomarkerid on aidanud eristada ja tuvastada erinevaid glioomide klasse (Ahmed et al., 2014).

Enamasti on glioomide esmaseks kuvamise meetodiks kompuutertomograafia. Kontrastainega KT visualiseerib hematoentsefaalse ehk vere-aju barjääri muutused, kuid KT sensitiivsus on palju madalam kui MRT oma (Ahmed et al., 2014). MRT on põhiliseks meetodiks kasvaja ravile allumise jälgimiseks, kuigi infot edasiste prognooside jaoks ei ole võimalik hankida enne paari nädala möödumist ravi alustamisest. Ei KT ega MRT abil ei ole võimalik täpselt määrata, kas tegu on kasvaja taasilmumisega või ravimefektiga. MRT joonistab küll suurepäraselt välja anatoomilised detailid, kuid ei suuda usaldusväärset eristada kiiritusest tekkinud nekroosi ja ravijärgset kasvaja taasilmumist. Selleks on võimeline funktsionaalne

kuvamine, mis eristab nekroosi eluvõimelisest ajukasvajast ja suudab määrata elujõulisuse taset. Näiteks positronemissontograaf (PET) on võimeline jälgima ajukasvaja terapeutilist vastust palju suurema spetsiifilisusega kui KT või MRT (Ahmed et al., 2014).

Diagnostikas kasutatakse lisaks ka koeproove, mis on eraldatud kasvaja kirurgilise eemaldamise ajal või kasutades stereotaktilist biopsiat. Proovi võtmiseks kasutatakse vaid biopsiat, kui haiguskollet ei ole võimalik opereerida (Ahmed et al., 2014).

Äsja diagnoositud kasvaja puhul eemaldatakse glioblastoomiga patsientidel kirurgiliselt võimalikult suur osa kude, sest on näidatud, et selline lähenemine parandab patsientide ellujäämist. Maksimaalne kirurgiline väljaopereerimine leevendab kasvaja suurusest tingitud sümptomeid, võimaldab kiirituse ja kemoteeraapia dooside vähendamist ning selle käigus eraldatakse kude, mida edasi uurida (Ahmed et al., 2014).

Kuna MRT ja teised visualiseerimise tehnikaid on edasi arendatud selleks, et kasutada neid operatsiooniaegselt, on saanud võimalikuks ka selliste kasvajate eemaldamine, mis asuvad kortikaalsete struktuuride (töötlevad meeelunditelt saadud signaale) vahetus läheduses, ilma neid kahjustamata (Ahmed et al., 2014).

Kliinilised katsetused on näidanud, et III ja IV astme ajukasvajate puhul pikendab kiirituse kasutamine koos kirurgilise sekkumisega märgatavalt patsientide ellujäämist, kui võrrelda ravimist ainult kasvaja väljaopereerimisega. Erineva histoloogia ja astmega pahaloomuliste glioomide ravimiseks on väljatöötatud erinevad optimaalsed kiirituse doosid ja manustamise ajavahemikud (Ahmed et al., 2014).

Hetkel kasutatakse esmaselt diagnoositud glioblastoomi standardravina kasvaja kirurgilist väljalõikamist, kiiritusravi ja lisaks abistavat temosolomiidi (tuntud kemoterapeutikum) manustamist. See on suurendanud patsientide keskmist ravijärgset ellujäämise aega umbes 14,6 kuuni (Ahmed et al., 2014).

Pärast esmast ravi kogevad peaaegu kõik glioblastoomiga patsiendid haiguse taasilumumist keskmiselt pärast 7-10 kuulist progressioonivaba perioodi. Sellel juhul ei ole aga kahjuks ükski päästvatest ravivõimalustest selgelt näidanud ellujäämise suurenemist, vaid on pigem mõjunud kasulikult ainult osadele patsientidele. Üldiselt peaks taasilumumise puhul kasutama individuaalset lähenemist ravivalikutest ja tõsiselt kaaluma kliinilistes katsetustes osalemist. Ka korduvat kirurgilist kasvaja eemaldamist võidakse kaaluda kasvaja massist tingitud sümptomite leevendamiseks ja tuumori histoloogilise ja molekulaarse pildi uuendamiseks, kuid kirurgilise sekkumise ellujäämist parandavad kasutegurid on sel puhul siiski ebaselged. Enamus patsiente korduvalt ei opereerita, põhjuseks võib olla kasvaja asukoht, selle aju

mööda laialilevimine või patsiendi kehv füsioloogiline seisund (Omuro and DeAngelis, 2013). Taasilmuva GBMiga patsientide ravivastused on kehvad, keskmine aeg kasvaja uuesti progresseerumiseni on 9 nädalat ja keskmine eluspüsिमise aeg vaid 25 nädalat (Ahmed et al., 2014).

## **1.2 Kasvajate modelleerimine**

### **1.2.1 *In vitro* ühekihiline rakukultuur**

Esimene inimese rakuliin, HeLa emakakaelavähi rakuliin, töötati välja 1951. aastal (Hsu et al., 1976). Alates sellest hetkest on erinevate rakuliinide arv plahvatuslikult kasvanud.

Rakukultuuris kasvavate rakkude keskkonda on erinevalt organismis kasvavast tuumorist võimalik muuta ning reageerimist erinevatele muutujatele hästi jälgida. Samuti on võimalik nende efektiivne geneetiline muutmine ning erinevate *in vitro* rakenduste jaoks välja töötatud meetoditega analüüsimine.

Seetõttu ongi põhiliseks mudeliks uute vähivastast potentsiaali omavate ravimikandidaatide esmasel testimisel ühekihiliste ehk 2D rakukultuuride kasutamine. Laialdane inimese kasvaja rakuliinide kasutamine on parandanud arusaamasid molekulaarsetest mehhanismidest, mis põhjustavad rakkude pahaloomuliseks muutumist ning on kaasa aidanud ravistrateegiate väljatöötamisel.

### **1.2.2 *In vivo* hiiremudelid**

*In vitro* katsetest on küll võimalik hankida esialgsed ravimivastuse tulemused, kuid see ei taga nende tulemuste kordumist elusorganismis. Uuritavate ainete kasvajakasvatuse potentsiaali hindamiseks *in vivo* kasutatakse mudelorganismina kõige laialdasemalt laborihiiri.

Inimese kasvajate modelleerimiseks kasutatakse immuunpuudulikke hiiri, sest hiirte normaalne immuunsüsteem on piisavalt tugev, et inimese kasvajakasvatusest välja tõrjuda. Aja jooksul on välja töötatud mitmeid geneetiliselt muundatud immuunpuudulikke hiiri, kellest mõnedes on võimalik indutseerida ka algsest patsiendi proovist pärit kasvajakasvatusest tuumoreid ning seeläbi teostada patsient-spetsiifilist kasvajakasvatust (Shultz et al., 2013).

Enamasti indutseeritakse kasvaja, süstides koekultuuris kasvatatud tuumorirakud immuunpuudulikule hiirele subkutaanselt ehk naha alla. Niimoodi moodustub mõne aja pärast, olenevalt rakuliinist, silmaga nähtav tuumor. Kuna sel viisil kasvaja indutseerimine on

võrdlemisi lihtne protseduur ja kuna subkutaanse tuumori kasvu on hea jälgida, on kirjeldatud meetod vähibioloogia valdkonnas laialdaselt kasutatav. Kuigi subkutaansed tuumorid on heaks mudeliks uute ravimolekulide kindlakstegemisel ja algsel testimisel, ei pruugi mõnedel juhtudel ravimivastuse ennustamine õnnestuda. Põhjuseks võib olla see, et kasvaja ei integreeru piisavalt hästi ümbritseva koega ning seal ei ole ka tuumori algse kasvukoha mikrokeskkonda.

Kasvaja indutseerimine talle omases päritolu keskkonnas võimaldab tal paremini kommunikeeruda anatoomiliselt sobiva koe naaber-rakkudega. Selline päritolu keskkonnas modelleerimine võimaldab reaalsele patsiendi kasvajale lähedasema bioloogiaga mudeli tekkimist kui subkutaanse indutseerimise puhul. Teisalt raskendab tuumorimudeli kehasisene paiknemine oluliselt selle kasvu jälgimist ning nõuab kasvaja progresseerumise ja metastaseerumise mitteinvasiivseks jälgimiseks keeruliste kuvamisvõimaluste olemasolu (Zong et al, 2013).

### **1.2.3 *In vitro* sfäärid**

Kasvaja mikrokeskkonna taasloomine, hõlmates tuumori ja ümbritseva koe vastastikmõjusid, rakk-rakk interaktsioone ja rakkudevahelist signalisatsiooni, on vähiuuringutes esmatähtis. Neid tingimusi 2D rakukultuurid tagada ei suuda, küll aga on selleks võimelised 3D rakukultuurid ehk tuumori sfäärid. Need mimikeerivad *in vivo* tuumorites kirjeldatud kasvajasiseseid struktuure ja võimaldavad rakk-rakk interaktsioonide tekkimist (Wang et al., 2014).

Sfääride suuremaks kasvades tekivad nende keskele alad, kus on vähenenud hapniku ja toitainete sisaldus nagu halvasti vaskulariseeritud tuumori aladeski. Need omadused aga mõjutavad RNA ja valgusünteesimist ning ravimikandidaatide koesse penetreerimis- ja seondumisvõimet ning bioaktiivsust (Friedrich et al., 2009).

Bioloogilised uuringud on näidanud, et kasvajakarakud võivad 3D mudelites omada 2D kultuuridest erinevat rakkude funktsiooni, diferentseerumist, ravimi metaboliseerimist, geenide ekspressiooni, valgusünteesi, morfoloogiat ja eluvõimelisust. Samuti on näidatud sfäärirakkude suuremat vastupanuvõimet ravimitele (Wang et al., 2014).

Uute ravimikandidaatide testimisel võib pidada 3D rakukultuuri sobivaks etapiks traditsiooniliste 2D kultuuride ja *in vivo* mudelite vahel. Kuna mitmed ühekihilises rakukultuuris lubavaid tulemusi näidanud ravimid ei tööta juba teise etapi, sfääride, puhul, on võimalik ravimiarenduses kasutatavate katseloomade arvu vähendada.

### 1.3 Geeniteraapia

Raskeid haigusi põhjustavate geenimutatsioonide avastamine inimesel on suurendanud nõudlust efektiivsete ja turvaliste transportvektorite järele, mis võimaldaksid terapeutilise efektiga nukleinhappeid rakkudesse transportida. Üldiselt toimub geeniteraapia puhul huvipakkuvate rakkude geneetiline modifitseerimine või geeniekspressiooni mõjutamine, et ravida või leevendada haigusi nagu pärilikud tervisehäired või vähk. Geeniteraapiat võib vastavalt saavutatavale efektile jagada kaheks erinevaks alagrupiks (Mäe et al., 2009):

1. doonor-DNA abil vigaste geenide asendamine korrektselt funktsioneeriva geeniga;
2. *antisense* oligonukleotiidide abil sihtmärgiks oleva geeni ekspressiooni inhibeerimine või geneetilise defekti parandamine.

Kliinilistes uuringutes on geeniteraapiat põhiliselt rakendatud vähivastase teraapia väljatöötamiseks ning vastavaid meetodeid võib jagada kolmeks: (Rochlitz, 2001):

1. kasvajakasvatuse immuunvastuse tugevdamine;
2. tuumori supressorgeenide ekspressiooni, mille vaigistamisest on tekkinud rakutsükli häired või onkogeenide aktivatsioon, taastamine;
3. kasvajakasvatuse apoptoosi indutseerimine.

### 1.4 RNA interferents

Avastus, et geeniekspressiooni saab reguleerida väikeste RNAde ja neile komplementaarsete mRNAde kaudu – protsess, mida teatakse RNA interferentsina (RNAi) - on tähelepanuväärselt parandanud arusaamist eukarüootsest geeniregulatsioonist ja -funktsioonist.

Enne 1980. aastaid peeti RNAd üldiselt passiivseks informatsioonikandjaks DNAlt valgusünteesini. 1980. aastate alguses avastati katalüütiline RNA (Latham and Cech, 1989) ning 1986. aastal võeti kasutusele termin „RNA maailm“ (Castanotto and Rossi, 2009), millest on tänaseks saanud tavaline väljend, kuna RNA omab rakubioloogias väga olulist kohta.

Veidi rohkem kui kümme aastat tagasi laienesid teadmised RNA funktsionaalsusest veelgi, kui nematoodis *Caenorhabditis elegans* avastati, et kaheaheelaline RNA (dsRNA - *double-stranded RNA*) võib käivitada komplementaarsete mRNA järjestuste vaigistamise (Fire et al., 1998). Varsti pärast seda hakati kunstlikult tootma lühikesi dsRNAsid ehk väikeseid

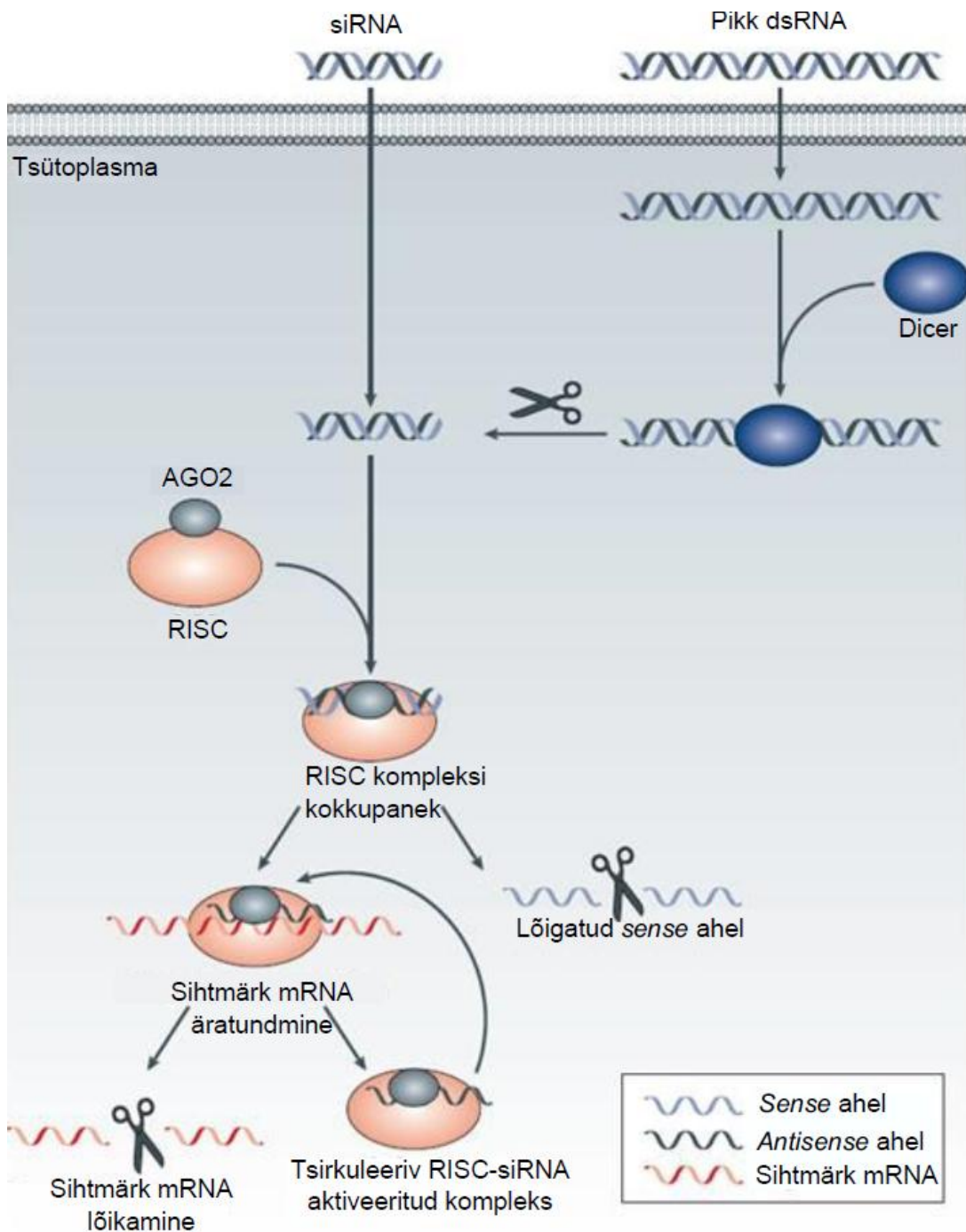
interfereeruvaid RNAsid (siRNAsid) (Zamore, 2006) ning näidati, et RNAi ilmneb tihti ka imetaja rakkudes, kuid mitte alati ilma immuunsüsteemi käivitamiseta (Judge et al., 2005).

Teadmisel, et väikesed RNAd võivad mõjutada geeniekspressiooni, on olnud tohutu mõju teaduse arendamisele ning RNAi on hetkel üks kõige paljulubavamatest meetoditest erinevate haiguste raviks (Castanotto and Rossi, 2009). RNA interferentsi arendamiseks ravieesmärkidel on vaja mõista väikeste RNAd biogeneesi radasid (joonis 2).

Geenivaigistamises osalevad väikesed RNAd on miRNAd ja siRNAd. Primaarsed mikroRNAd (pri-miRNAd) transkribeeritakse RNA polümeraasi poolt ja töödeldakse mikroprotsessori kompleksi poolt umbes 70 nukleotiidi pikkusteks prekursoriteks, mida kutsutakse pre-miRNAdeks. Need seonduvad eksportiin 5ga ja eksporditakse tuumast tsütoplasmasse, kus spetsiaalne kompleks (mis sisaldab ka endoribonukleaaset ensüümi Dicer) protsessib pre-miRNAd miRNA-miRNA dupleksideks. Viimane seondub prekursor RNA-indutseeritud vaigistuskompleksis e pre-RISC kompleksis (*precursor RNA-induced silencing complex*) oleva Argonaudi (AGO) proteiiniga. Üks duplexi ahelatest (*passenger-ahel*) eemaldatakse ning küps RISC sisaldab juhtivat ahelat, mis juhatab kompleksi sihtmärk-mRNA juurde, et saaks toimuda post-transkriptsiooniline geenivaigistamine.

Pikad dsRNAd protsessitakse väikesteks interfereeruvateks RNAdeks (siRNAdeks). Need on 20-24 nukleotiidi pikkused RNAd, mis kannavad 3' OH- ja 5' fosfaatgruppe (3' üleulatuvate otstega). pre-RISC kompleksis eemaldab AGO valk siRNA *passenger-ahela*. Seejärel seondub küps RISC, mis sisaldab AGO valgu ja siRNA juhtivat ahelat, sihtmärk-mRNAGA ning toimub selle lõikamine. siRNAd on enamasti täielikult komplementaarsed oma sihtmärk-mRNAGA ning viimase ahela lõikamine toimub 10-12 aluspaari kaugusel siRNA juhtiva ahela seondumiskoha 5' otsast.

Ratsionaalsel siRNA disainil on oluline arvestada siRNA järjestust, vaigistamise osa keemilist iseloomu (nt RNA modifitseeritud aluste ja suhkrutega või ilma nendeta), RNA pikkust ning 5' ja 3' otste iseloomu. Kõige tavalisem meetod RNA interferentsi kasutamisel suunatud geenivaigistamiseks on viia 21-22 aluspaari pikkuseid siRNAsid rakkudesse. Teine variant on kasutada pikemaid, 25-27 nukleotiidi pikkuseid duplekse, mida saab intratsellulaarselt protsessida ensüümi Dicer abil siRNAdeks. Mõnedel juhtudel võib niisuguste raku produtseeritud siRNAd vaigistav potentsiaal olla kõrgem (Davidson and McCray, 2011).



**Joonis 2.** siRNA poolt indutseeritud RNA interferentsi rada imetajates (Whitehead et al., 2009).

#### 1.4 Rakutsükli seosed ribonukleotiidi reduktaasiga

Rakutsükkel koosneb mitoosi faasist ja interfaasist ning viimane jaguneb omakorda G1-, S- ja G2-faasideks. G1-faasis toimub raku kasvamine ja S-faasiks valmistumine, S-faasis DNA süntees ning G2-faasis toimub taas raku kasvamine ning mitoosiks vajalike valkude sünteesimine (Vermeulen et al., 2003).

Ribonukleotiidi reduktaas (RR) on limiteeriv ensüüm ribonukleotiidide muutmisel desoksüribonukleotiidideks, mis on hädavajalikud DNA sünteesiks ja replikatsiooniks. Inimese RRI abil nimetatud nukleotiidide vahetumiseks on vajalik mõlema RRI subühiku, RRM1 ja RRM2, ekspressioon (Rahman et al., 2012).

Rakutsükli jooksul ekspresseeritakse neid subühikuid erinevalt. RRM1 ekspressiooni tase püsib rakutsükli vältel konstantsena ning selle valgu poolväärtusaeg on umbes 20h. RRM2 subühikut ekspresseeritakse ainult hilises G1-faasis või varajases S-faasis ja RRM2 valgu poolväärtusaeg on vaid 3h (Chabes and Thelander, 2000).

RRM2 üleekspresseerimine mängib olulist rolli kasvajate progresseerumisel ja rakulises vastuses DNA kahjustustele (Zhang et al., 2009). Suurenenud ribonukleotiidi reduktaasi aktiivsus ja RRM2 üleekspresseerimine tõstab märgatavalt inimese vähirakkude angiogeenset ja invasiivset potentsiaali ning ravimiresistentseid omadusi.

siRRM2 omab potentsiaalset tsütostaatilist efekti, pidurdades tuumorirakkude paljunemist läbi rakutsükli blokeerimise G1/S-faasis (Zuckerman et al., 2011). Eeldatakse, et kasutades RRM2-spetsiifilise siRNAGA seotud nanopartikleid, võib saada võimalikuks mõnede ebaspetsiifiliste efektide ületamine, kuna kasvajakarakud on RRI inhibitsiooni tsütotoksilise efekti suhtes tundlikumad kui normaalsed rakud. Põhjuseks on see, et kasvajakarakudel on jagunemiseks vaja suuremat dNTPde hulka, nende kohanemisvõime on vähenenud ja regulaatorsignaalidele vastamise võime on madal. Seetõttu on ribonukleotiidi reduktaasi peetud pikalt heaks kemoteraapia sihtmärgiks vähi puhul (Shao et al., 2006).

## **1.5 Transportvektorid**

Geeniteraapia rakendamise suurimaks tagasilöögiks on nukleiinhapetel põhinevate terapeutiliste molekulide efektiivne viimine rakkudes asuvasse spetsiifilistesse sihtmärkkohtadesse. Nukleiinhapped on kõrge negatiivse laenguga hüdrofiilsed molekulid ning seetõttu ei ole nad võimelised spontaanselt rakumembraane läbima. Sellest tulenevalt on vaja tõhusaid transportvektoreid, mis võimaldaksid vahendada terapeutilist efekti.

Viiruslik geeniteraapia kasutab viraalseid vektoreid, mis arvesse võttes nende struktuuri ja toimimise mehhanisme, on head kandidaadid efektiivseks ravigeenide kandmiseks, tuues kaasa pikaajalise geeniekspressiooni (Marsh and Helenius, 2006). Viiruslikel vektoritel on loomulik võime rakkudesse siseneda ning ekspresseerida seal enda valke. Tänapäeval on enimkasutatavad vektorid retro-, herpes-, adeno- ja lentiviirused. Siiski võivad viraalsed

vektorid põhjustada patsientidel tõsiseid probleeme nagu näiteks toksilisust, onkogeenseid efekte ning immuun- ja põletikureaktsioone (Hollon, 2000). Nende põhjuste tõttu on viiruslike vektorite kasutusvaldkond piiratud spetsiifiliste rakendustega ja teadlaste tähelepanu viimasel ajal suunatud rohkem mitteviraalsetele vektoritele.

Mitteviirusliku geeniteraapia vektoritena on laialdaselt kasutatud sünteetilisi ja looduslikke katioonseid polümeere, et kondenseerida DNAd ja RNAd väikesteks (nanoskaalas) partikliteks ning neid rakku transportida. Mitteviraalsed vektorid arvatakse olevat viraalsetele turvalisemad alternatiivid, sest need kutsuvad esile minimaalse immuunvastuse peremehes (Jreyssaty et al., 2012).

## 1.6 Rakku sisenevad peptiidid

Rakku sisenevad peptiidid (CPP - *cell penetrating peptide*) on lühikesed amfipaatsed ja/või positiivse laenguga peptiidid, mis on võimelised vähetoksiliselt imetajate rakkudesse (nii *in vitro* kui *in vivo*) transportima erinevaid bioloogiliselt aktiivseid molekule (Langel, 2011). Alates esimeste CPPde avastamisest (Derossi et al., 1994) on ilmnenud sadu uusi rakku sisenevaid peptiide ning need on hakanud teadusele üha rohkem huvi pakkuma. CPPd on võimelised transportima erinevaid molekule läbi plasmamembraani ning eriti huvitav on see, et enamikul CPPdel ei tundu olevat mitte mingit transporditava aine suuruse piirangut.

Kuigi CPPde rakku sisenemise mehhanism pole siiani üheselt selge, on teada, et lastmolekulidega seotuna kasutavad nad rakkudesse sisenemiseks enamasti endotsütootlisi teid. Nende mehhanismide mõistmine on oluline selleks, et ratsionaalselt disainida uusi CPPsid või muuta olemasolevaid nii, et paraneks transporditavate ainete rakku viimise efektiivsus. Uuringutele tuginedes oletatakse CPPde rakku sisenemisel nelja põhilist etappi (Mäe et al., 2009):

1. interaktsioonid raku pinnaga;
2. läbi rakumembraani liikumine (põhiliselt erinevat tüüpi endotsütoosi teel, kuid on ka täheldatud (Henriques et al., 2007) otsest liikumist läbi rakumembraani);
3. endosoomidest vabanemine (endosomaalse transpordi puhul);
4. erinevatesse rakusisestesse organellidesse kohalejõudmine.

Viimase kümne aasta jooksul läbiviidud uuringud on näidanud CPPde kasulikkust nukleiinhapete rakkudesse viimisel nii *in vitro* kui ka *in vivo* (El-Andaloussi et al., 2005). Nende peptiidide kasutusvõimalused on väga paindlikud, näiteks on CPPsid kasutatud

erinevatest klassidest oligonukleotiidide prekliinilistes uuringutes, mis puudutasid vähi-, südamehaiguste ja viiruslike infektsioonide mudeleid (Mäe et al., 2009). Need katsed saavutasid ka suurt edu. CPPde mittetoksiline iseloom, eriti võrreldes liposoomidel põhinevate transportvektoritega (Andaloussi et al., 2011), ning nende üsna kõrge kohaletoimetamise efektiivsus teevad neist tulevase ravimiarenduse huviobjektid. Sarnaselt ülejäänud mitteviraalsete vektoritega jääb oligonukleotiidide transportivate modifitseerimata CPPde puuduseks siiski nende kuhjumine ligipääsmatutesse endosomaalsetesse üksustesse ning edaspidine lagundamine lüsoosoomides (Mäe et al., 2009).

Üks võimalus endosoomidesse kinnijäämise probleemi lahendamiseks on keemiliste modifikatsioonide sisseviimine CPPdes, mis võib tunduvalt parandada endosoomidest CPP/ON komplekside vabanemist (Andaloussi et al., 2011). See annab võimaluse kasutada väiksemaid komplekside koguseid ja suurendada transfektsiooni efektiivsust (Mäe et al., 2009).

Üheks hiljutiseks näiteks edukast CPP modifitseerimisest on El Andaloussi jt poolt kirjeldatud peptiidne oligonukleotiidide kandja PF6, mis on näidanud siRNA transfektsiooni puhul muljetavaldavaid tulemusi:

- sõltumatult rakutüübist ja konfluentsusest tervete rakupopulatsioonide transfektsioonide;
- aktiivsuse säilitamine seerumivalgude juuresolekul;
- minimaalse toksilisuse omamine;
- süsteemselt *in vivo* töötamine.

Mitmeid meetodeid oligonukleotiidide efektiivsemaks transportimiseks CPPdega on juba testitud nii *in vitro* kui ka *in vivo*. Kuigi katsetatud süsteemid on efektiivselt töötanud, on väga töömahukas selliseid keerulisi vektoreid konstrueerida ning on tarvis veel erinevaid meetodeid täiendada (Mäe et al., 2009).

### **1.6.1 PepFect tehnoloogia**

Rakku sisenevad peptiidid PepFect-id (PF) põhinevad transportaan 10 (TP10) modifitseeritud analoogidel. TP10 on 21 aminohappe pikkune, amfipaatne ja positiivselt laetud CPP (järjestusega AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH<sub>2</sub>) (Soomets et al., 2000). Kõige olulisem TP10 modifikatsioon PepFectide strateegia puhul on stearüülrühma lisamine (Mäe et al., 2009). On näidatud, et TP10 stearüüliseerimisega tõuseb oligonukleotiidide transfektsiooni efektiivsus, soodustades endosoomidest vabanemist. Stearüül-TP10 (ehk PepFect3) moodustab plasmiididega stabiilseid mittekovalentseid nanopartikleid, mis on efektiivselt

võimelised sisenema erinevatesse rakutüüpidesse (kaasaarvatud primaarsetesse rakkudesse). Selle tulemusena tõusevad geeniekspressiooni tasemed märgatavalt võrreldes modifitseerimata CPPde kasutamisega. On näidatud, et stearyül-TP10/plasmiidi kompleksid ei ole immunogeensed ega toksilised *in vivo* (hiirtes) (Lehto et al., 2011).

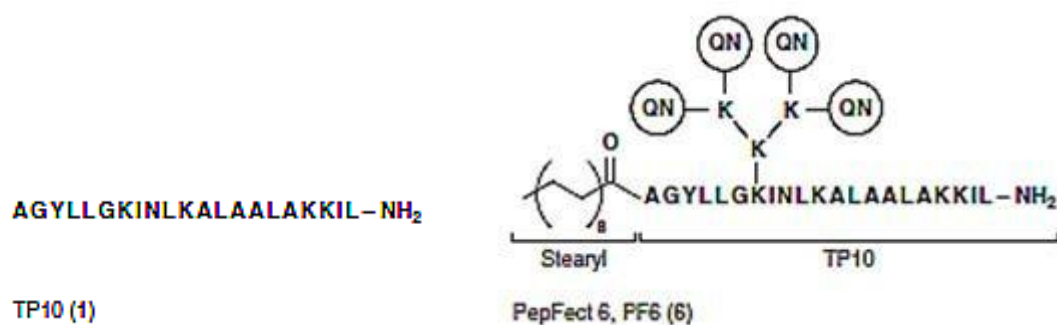
### 1.6.2 PepFect6

PF6 on PF3 edasine modifikatsioon, mille eesmärgiks oli välja töötada peptiidil põhinev kandja spetsiifiliselt siRNA transportimiseks. Tõhusa kandja arendamisel on vaja üle saada kahest tihti ilmnevast probleemist:

- kuna RNA interferents toimub raku tsütoplasmas, on vaja kindlustada, et peptiid/siRNA kompleksid, mis liiguvad raku endotsütoosi teel, vabaneksid võimalikult kiiresti tsütoplasmasse;
- peptiid/siRNA komplekse on vaja kaitsta seerumi poolt lagundamise eest.

Nende tingimuste täitmiseks viidi TP10ga läbi järgmised modifikatsioonid (joonis 1) (Andaloussi et al., 2011):

- lüsiinipuu (3 lüsiinjääki) seondamine Lys<sub>7</sub> (7. positsioonis lüsiin) aminohappejäägi külge;
- lüsiinipuu suktsinüleerimine ning klorokviini (CQ, *chloroquine*) analoogide kovalentselt sidumine;
- N-terminuse stearyliseerimine.



**Joonis 1.** Algne TP10 ning kõigi modifikatsioonidega PepFect 6 (Andaloussi et al., 2011).

## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

- valideerida vähispetsiifilise ribonukleotiidi reduktaasi M2 subühiku geeni vastane siRRM2
- teha kindlaks PepFect6 potentsiaal vahendada RNA interferentsi *in vivo* mudelites
- töötada välja *in vitro* 3D rakukultuuride kasutamise meetoodika CPP rakenduste jaoks

### 2.2 Materjalid ja meetoodika

Kõik meetodid (peale peptiidisünteesi ja siRNA disainimise) viis läbi ja tulemuste analüüsi teostas töö autor.

#### 2.2.1 Eksperimendis kasutatud rakuliinid

Katsetes kasutati U87 ja stabiilselt EGFPd ekspresseerivat U87 rakuliini, mis on inimese glioblastoomi rakuliin. Rakke kasvatati L-glutamiini sisaldavas DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) söötmes, millele oli lisatud 10% veise looteserumit FBS (*Fetal Bovine Serum*, PAA Laboratories, Austria), 0,1 mmol/l asendatavaid aminohappeid (*MEM Non-Essential amino acids* 100x, PAA Laboratories, Austria), 1,0 mmol/l naatriumpüruvaati (100mM, PAA Laboratories, Austria) ning 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (*Penicillin/Streptomycin* 100x, PAA Laboratories, Austria). Rakke kultiveeriti 5% CO<sub>2</sub> sisaldavas veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37°C ja neid külvati ümber vahetult enne 0,1% želatiiniga kaetud plaatidele 2-3 päeva järel.

#### 2.2.2 siRRM2 disainimine

siRRM2 (tabel 1) disainiti (TÜTI molekulaarse biotehnoloogia laboratooriumis) IDT RNAi Design ([http://cdn.idtdna.com/Scitools/Documents/Dicer\\_Substrate\\_RNAi.pdf](http://cdn.idtdna.com/Scitools/Documents/Dicer_Substrate_RNAi.pdf)) rakendust kasutades, eesmärgiga disainida Dicer substraadiks olev siRNA.

#### 2.2.3 Nanopartiklite moodustamine ja transfektsioon rakukultuuris

Peptiidi ja siRNA vahelised nanopartiklid moodustuvad mittekovalentselt tänu positiivselt laetud peptiidi võimele siduda negatiivselt laetud siRNAd ning seetõttu piisab vaid kahe segu kokkusegamisest ja inkubeerimisest. PepFect6 ja siRNA vaheline komplekside

moodustumine on eelnevalt kontrollitud ja kirjeldatud autori bakalaureusetöös (Kiisholts, 2012).

Komplekside moodustamiseks kasutati 10 µM siRNA (erinevates katsetes kasutatud siRNAde järjestused on välja toodud tabelis 1) ja 100 µM PepFect6 (sünteesitud TÜTI molekulaarse biotehnoloogia laboratooriumis) alglahuseid, millele lisati vajalikul hulgal MQ vett ja segati omavahel kokku nii, et siRNA lõppkontsentratsioon lahuses oleks 1 µM ja peptiidi oma 40 µM, et saada siRNA/peptiid molaarne suhe MR40 (MR – *molar ratio*). Pärast lahuste kokkusegamist inkubeeriti segusid nanopartiklite moodustamiseks 45 min toatemperatuuril.

Positiivse kontrolli vajadusel kasutati siRNA komplekseerimiseks LF2000 (*Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent*, Invitrogen, Rootsi) transfektsioonireagenti. 1 µM siRNA lõppkontsentratsiooniga segu saamiseks lisati 5,25 µl siRNAle 47,25 µl Opti-MEMi ning 3,6 µl LFle 48,9 µl Opti-MEMi. Kahte segu inkubeeriti toatemperatuuril 15 min ning seejärel segati omavahel kokku ja inkubeeriti veel 30 min.

24h enne katse alustamist külvati vahetult enne 0,1% želatiiniga kaetud 24-kaevulisele plaadile U87 rakud, 50000 rakku kaevu kohta. Rakkude lugemiseks kasutati automatiseeritud rakkude lugejat Countess® (Invitrogen).

Enne rakkudele komplekside pealekandmist asendati vana sööde 450 µl (LF/siRNA komplekside puhul 400 µl) värske täissöötmega. Komplekse lisati rakkudele 50 µl (LF/siRNA puhul 100 µl). Rakke inkubeeriti 4h neile sobivates kasvutingimustes ja seejärel lisati 1 ml täissöödet, et tagada vajalikud toitained rakkude edasiseks kasvamiseks.

**Tabel 1.** siRRM2 (NCBI *Reference Sequence*: NM\_001034.3) ning siLuc2\_Cy5 järjestused. Väikesed tähed märgivad desoksünukleotiide.

siRRM2	<i>Sense</i>	5'- GAU UUA GCC AAG AAG UUC AGA UUA c -3'
	<i>Antisense</i>	5'- GUA AUC UGA ACU UCU UGG CUA AAU CUU -3'
siLuc2_Cy5	<i>Sense</i>	5'- Cy5-GGA CGA GGA CGA GCA CUU Ctt -3'
	<i>Antisense</i>	5'- GAA GUG CUC GUC CUC GUC Ctt -3'

#### 2.2.4 Kvantitatiivne RT-PCR

Geeniekspressiooni hindamiseks U87 rakkudes külvati esmalt rakud ja transfekteeeriti, nagu on kirjeldatud punktis 2.2.3, kasutades siRRM2 siRNA-d. Iga katsegrupi jaoks valmistati ette 4 bioloogilist replikaati.

Geeniekspressioon mõõdeti 48h pärast rakkude transfekkeerimist. Selleks lüüsi rakud ja eraldati RNA Invitrogen Trizol<sup>®</sup> reagentiga, tuginedes tootja protokollile. Seejärel sünteesiti 400 nanogrammist RNAst komplementaarne DNA ehk cDNA (*complementary DNA*).

PCR läbiviimiseks kasutati EvaGreen reagenti (Solis BioDyne, Eesti), vastavalt tootja protokollile. 10 µl reaktsiooni lõppmaht sisaldas (välja toodud komponentide lõppkontsentratsioonid reaktsioonis): 1x EvaGreen reagenti, 0,3 µM *forward* ja *reverse* praimerit (vastavalt RRM2 ja GAPDH, tabel 2), 4 ng/µl cDNAd ning ülejäänud mahus MQ vett.

qRT-PCRi reaktsioon viidi läbi, kasutades 7900 HT (Applied biosystems) masinat.

PCRi programm:

- |                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| 1. 15 min - 95°C | } | 40 tsükli |
| 2. 15 sek - 95°C |   |           |
| 3. 30 sek - 60°C |   |           |
| 4. 1 min - 72°C  |   |           |

Lõppu lisati dissotsiatsiooni analüüs, millega kontrolliti, et moodustus vaid üks produkt.

Andmete analüüsimiseks kasutati Microsoft Excelit ning statistiline analüüs teostati programmis STATISTICA 7 (Statsoft). Geeniekspressiooni tulemused analüüsiti  $2^{-\Delta\Delta CT}$  meetodil, mille matemaatilise algoritmi lühidalt ja lihtsalt lahti seletada järgmiselt: esmalt võrreldi kõikide proovide puhul uuritava RRM2 geeni ekspresiooni määra *housekeeper* geeni GAPDH ekspresiooni määraga, et normaliseerida RRM2 ekspresioon. Seejärel võrreldi viimast negatiivse kontrolliga, et teada saada uuritava grupi geenivaigistamise määr. Iga proovi RRM2 ja GAPDH amplifikatsioonid teostati 4 tehnilise replikaadina ning  $2^{-\Delta\Delta CT}$  analüüsiks kasutati vaid korrektselt amplifitseerunud proovide aritmeetilist CT väärtuste keskmist.

**Tabel 2.** Käesolevas töös kasutatud RRM2 ja GAPDH praimerid.

Praimer	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
RRM2	5'-TGC TCT CCC TCC GTG TCC CG-3'	5'-CCG GCG GCG TGT TCT CCT TG-3'
GAPDH	5'-ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC A-3'	5'-CGT CAA AGG TGG AGG AGT GG-3'

## 2.2.5 Rakutsükli analüüs läbivoolutsütomeetria abil

U87 rakud külvati ja transfekteriti, nagu on kirjeldatud punktis 2.2.3, kasutades siRRM2 siRNAd. 48h möödudes koguti rakud plaadilt 0,25% trüpsiin-EDTAgaga, pesti PBSiga, tsentrifuugiti (750 g, 5 min) põhja, sade võeti üles 100 µl PBSis ning fikseeriti 900 µl 80% etanooliga. Seejärel tsentrifuugiti (750 g, 5 min) proove uuesti ja sade võeti üles 500 µl PBSis. Sellele lisati 10 µl RNaseA lahust lõppkontsentratsiooniga 4 µg/ml ja 25 µl propiidiumjodiidi (PI – *propidium iodide*) lõppkontsentratsiooniga 2,5 µg/ml ning seejärel inkubeeriti toatemperatuuril (pimedas) 30 min. PI on DNA aluspaaride vahele seonduv fluorestseeruv molekul, mida saab kasutada, et detekteerida DNA kogust rakus. Kuna PI on võimeline seonduma ka RNAgaga, on vaja segule lisada ka RNaseA lahust.

DNA hulga mõõtmiseks rakkudes kasutati voolutsütomeetrit BD LSR-II (BD Biosciences, USA). Propiidiumjodiidi ergastamiseks kasutati sinist laserit lainepikkusega 488 nm. DNA koguse mõõtmise parameetrid pandi alguses paika negatiivse kontrolli, puhta siRRM2ga töödeldud proovi, järgi ning võrreldi teisi proove sellega. Tulemused analüüsiti BD FACSDiVa<sup>TM</sup> tarkvara abil. Katset korrati 3 korda.

## 2.2.6 RNA interferentsi uurimine *in vivo*

### 2.2.6.1 Katseloomade liik, pidamistingimused ja arv

Töö autor on läbinud katselooma kursuse ning omab õigust hiire ja rotiga töötamisel. Käesolevas uurimistöös läbiviidud loomkatsed teostati töö autori poolt ning tema tööd loomadega juhendas ja jälgis vanemteadur Kaido Kurrikoff (lisatud mõlema pädevustunnistuste koopiad, vt Lisa 1 ja 2). Loomkatsete läbiviimiseks on saadud load 2011. aastal (vt Lisa 3 ja 4).

Katseloomadena kasutati liiki *Mus Musculus* ehk hiiri, täpsemalt kasutati emaseid ja isaseid *AthymicNude-FoxnInu* immuunpuudulikke hiiri (Harlan Laboratories, Holland) vanusega 7-12 nädalat. Katseloomi hoiti kogu katseperioodi vältel TÜRMI vivaariumis kontrollitud tingimustes. Loomad tõsteti igal nädalal puhastesse puuridesse ning nendele võimaldati pidev ligipääs joogiveele ja toidule.

Katses kasutati 10 hiirt, 5 neist kontrollgrupis ja 5 ravigrupis. Katset korrati 3 korda, ehk kokku kasutati 30 looma.

#### 2.2.6.2 Kasvaja indutseerimine ja jälgimine

Immuunpuudulikel hiirtel indutseeriti inimese glioblastoomi rakkudega subkutaansed ehk nahaalused tuumorid. Selleks valmistati U87 rakud süstimiseks ette: koguti need konfluentsetelt koekultuuri plaatidelt, pesti PBSiga, tsentrifuugiti (500 g, 10 min) põhja ning sade võeti üles ilma lisanditeta jääkülmas DMEM söötmes, arvestades 100 µl söötme kohta 1 miljon rakku. Seejärel süstiti hiire vasaku reie naha alla 100 µl kirjeldatud rakususpensiooni. Loomad nummerdati, märgistades sabad spetsiaalse markeriga. Sellest hetkest alates kuni katse lõpuni jälgiti hiiri vähemalt 3 korda nädalas, lisaks hoolitses igapäevaselt nende heaolu eest vivaariumi töötaja.

Kui tuumorid muutusid silmaga eristatavaks (umbes 2 nädalat pärast süstimist), hakati neid 3 korda nädalas kuni katse lõpuni nihiku abil mõõtma ning dokumenteeriti saadud andmed. Mõõta on võimalik vaid tuumori kahte suurst, pikkust ja laiust, kuid tegelikult on see 3-mõõtmeline. Reaalse kasvaja suuruse väljaarvutamiseks kuupmillimeetrites kasutati järgmist valemit:  $V = \text{laius (mm)} * \text{laius (mm)} * \text{pikkus (mm)} / 2$ .

Mõõtmistulemuste analüüsimiseks kasutati Microsoft Excelit ning statistiline analüüs teostati programmis STATISTICA 7.

#### 2.2.6.3 Komplekside moodustamine *in vivo* kasutamiseks ja raviskeem

Kui kõikide katses osalevate loomade puhul oli selge, et indutseeritud tuumorid kasvavad ehk suurused järjest suurenevad, alustati ravimi annustamisega. Hiired jaotati kahte erinevasse gruppi selliselt, et tuumorite algsuurused oleksid mõlemas grupis võimalikult võrdsed ning ühele grupile hakati manustama puhast siRRM2 ja teisele PF6/siRRM2 komplekse.

Nanopartiklid *in vivo* katsete jaoks valmistati punktis 2.2.3 kirjeldatud protokoll järgi molaarse suhtega 1:30 ning lahuse koguruumala oli 100 µl. siRRM2 doos ühe looma kohta oli 1 mg/kg. Enne süstimist inkubeeriti komplekse samuti 45 min toatemperatuuril ning lisati neile kompleksi seguga võrdses ruumalas ehk 100 µl 10% glükoosi. Seejärel süstiti saadud segu (200 µl, 5% glükoosis) hiirele intravenoosselt sabaveeni. Pärast süstimist jälgiti loomade enesetunnet ja käitumist, et välistada toksilisi efekte. Samale grupile süstiti sama ainet kokku 3 korda, nädalase vahega.

#### 2.2.6.4 Katse lõpetamine ning kudede analüüsimine

48h pärast viimast korda ravimi manustamist hukati loomad tservikaalse dislokatsiooni ehk kaelalülide eraldamise abil ning eraldati koed: maks, kops, põrn, neer ja tuumor.

Edasiseks analüüsiks homogeniseeriti kõikide loomade kogu tuumor, kasutades Precellys®24-Dual (Bertin Technologies, Prantsusmaa) homogenisaatorit. Saadud homogeenest tuumorikoest kaaluti välja 80-100 mg materjali ning eraldati totaalne RNA Trizol® reagentiga, vastavalt tootja protokollile. Seejärel sünteesiti cDNA ning teostati geeniekspressiooni hindamiseks qRT-PCR täpselt sama protokoll järgi, nagu on väljatoodud punktis 2.2.4.

Kogutud andmete, nii geeniekspressiooni kui ka tuumori suuruste, analüüsimiseks kasutati Microsoft Excelit ning statistiline analüüs teostati programmis STATISTICA 7.

### **2.2.7 Sfäärade moodustamine ja transfektsioon**

Sfäärade moodustamiseks külvati U87 rakud U-kujulise põhjaga 96W plaadile, mis on töödeldud spetsiaalselt, et rakud ei oleks võimelised plaadi põhjale kinnituma (Nunc™ Low Cell Binding Microplates, Thermo Scientific™, USA). Samal ajalpunktil külvati 200 µl täissöötmes (kasutades sama koostisega söödet ja kultiveerimistingimusi, nagu on väljatoodud punktis 2.2.1) erinev kogus rakke: 1000, 2000, 5000 ja 10000, et jälgida erineva suurusega sfäärade kasvu ajas. Iga kahe päeva tagant tehti Nikon Eclipse TS100 valgusmikroskoobiga kasvavatest sfäärdest pildid ning samuti vahetati sööde. Kuna on oluline säilitada sfäärade terviklikkus ning takistada rakkude eraldumist sfääri ääre küljest, ei tohi söötme vahetamisel kõike söödet ära aspireerida (Friedrich et al., 2009), vaid igal korral eemaldada 50% vanast ja asendada sama koguse värske söötme. Katse korratavust kontrolliti sama aja jooksul sama suurusega terviklike sfäärade moodustumise kaudu, jälgides samal hetkel külvatud kaheksat bioloogilist replikaati.

Nii geeniekspressiooni hindamiseks kui ka rakutsükli analüüsimiseks kasvatati sfääre enne transfekteerimist 4 päeva ning vahetult enne katse alustamist vahetati sööde. Kompleksid moodustati, nagu kirjeldatud punktis 2.2.3 RRM2 vastase siRNAga ning neid lisati sfääridele sama kogus kaevu kohta (50 µl) nagu 24W plaadil kasvanud rakkudele. qRT-PCR jaoks valmistati ette iga katsegrupi jaoks 4 bioloogilist replikaati ning katse viidi läbi punktis 2.2.4 kirjeldatud protokoll järgi. Läbivoolutsütomeetria teostamiseks kasutati punktis 2.2.5 väljatoodud protokoll. Viimase puhul kasutati igas uuritavas grupis piisava rakkude hulga tagamiseks 50 sfääri, mis koguti kokku ning dissotseeriti 0,25% trüpsiin-EDTA abil ning kogu katset korrati kolmel korral

### 2.2.8 Konfokaalmikroskoopia

*In vitro* sfääri sisemusse penetreerumise hindamiseks vaadeldi fluorestseeruva märkega kompleksidega transfekteeritud sfääre konfokaalmikroskoobis. Selleks külvati rakud (kirjeldatud punktis 2.2.7) 2 päeva enne transfekteerimist ning nii puhta siRNA kui PF6/siRNA (MR40) puhul kasutati Cy5-märgisega siRNAd. Lisaks külvati samal ajal ka EGFPd stabiilselt ekspresseerivad U87 sfäärid, et kontrollida, kas konfokaalmikroskoop suudab visualiseerida ka sfääride keskosa.

Kolmandal päeval pesti sfäärid PBSiga ja värviti rakkude tuumad rakumembraani läbiva fluorestseeruva värviga Hoechst 33342 (Invitrogen), lõppkontsentratsiooniga 5 µg/ml. Värvu sisaldava PBSiga kaetud sfääridel lasti inkubeerida rakukultuuri inkubaatoris 37°C juures 30 min ning seejärel pesti veel kord PBSiga ja tõsteti ümber konfokaalmikroskoopia jaoks mõeldud Nunc™ Lab-Tek™ (Thermo Scientific™, USA) 8-kambrilistele alusklaasidele, iga sfäär eraldi kambrisse. Edasi vaadeldi neid konfokaalmikroskoobiga Zeiss LSM710, kasutades ZEN tarkvara. Sfääre hoiti stabiilselt konfokaalmikroskoobi inkubatsioonikambris 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> juures ja nende visualiseerimiseks kasutati tavavalgust ning ergastamist Cy5 märgise puhul 633 nm, Hoechst värvu puhul 405 nm ja EGFP puhul 488 nm laseriga, kus Hoechst ja EGFP visualiseeriti erinevaks kanaliks. Kogu katset korrati kolm korda.

## 2.3 Tulemused

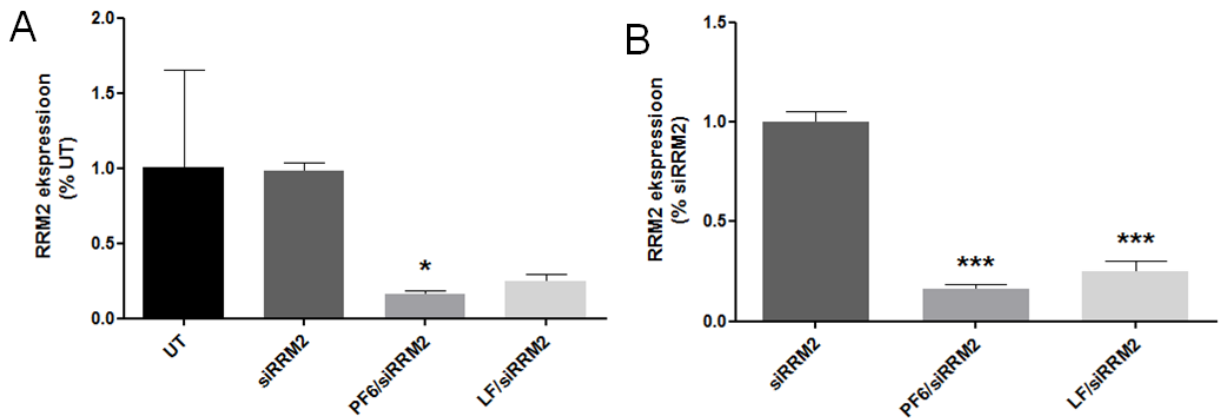
### 2.3.1 Geeniekspressiooni muutused *in vitro* ühekihilises rakukultuuris

qRT-PCR ning seejärel teostatud geeniekspressiooni analüüs pärast siRRM2-komplekside transfektsiooni U87 rakkudes näitas selget RRM2 geeni mahasuruvat toimet (joonis 3). Geeniekspressiooni väärtuseid analüüsiti ühesuunalise (*One-way*) Anovaga.

Joonisel 3 on graafikul A ja B näidatud U87 2D rakukultuuri geeniekspressiooni muutused võrrelduna negatiivse kontrolliga, vastavalt kas töötamata (UT – *untreated*) rakkudega või grupiga, millele manustati puhast siRNAd. Mõlema negatiivse kontrolliga on saadud tulemusi võrreldud selleks, et esiteks veenduda, et puhas siRNA tõesti ei oma võrreldes UT rakkudega mingit efekti ning teiseks on uuritavat gruppi ainult siRNAGA võrreldud, sest edasistes (*in vivo*) katseteks on põhjendatud kontrollgrupina just puhta siRNA kasutamine. Y-telje väärtused graafikutel näitavad uuritava grupi suhtelist erinevust negatiivse kontrolliga võrreldes.

Graafikul A kujutatud tulemuste statistiline analüüs ühesuunalise Anovaga näitas peaefektiks (*main effect*):  $F(3,10)=7,9$ ,  $p<,01$ . Graafikult on näha, et puhas siRNA ei mõjuta RRM2 geeniekspressiooni. Samas PF6/siRRM2 kompleksid on nimetatud geeni vaigistanud umbes 85% ulatuses, mis lubab Tukey *post-hoc* testi põhjal (võrreldes UT rakkudega) väita erinevust eksimisriskiga  $p<0,05$ . Positiivne kontroll, LF/siRRM2 omab samuti geeni vaigistavat toimet umbes 75% ulatuses, kuid antud analüüsis statistilist olulisust ei oma.

Graafiku B tulemuste peaefekt oli:  $F(2,9)=105,6$ ,  $p<,0001$ . Nii PepFect6 kui ka Lipofektamiini geenivaigistamise määrad jäävad samasse suurusjärku nagu võrrelduna UT rakkudega, kuid nende tulemuste korral omavad mõlemad grupid statistilist olulisust  $p<0,001$  (Tukey *post-hoc*).



**Joonis 3.** RRM2 geeni vaigistamine inimese glioblastoomi rakkudes PF6/siRRM2 kompleksidega. qRT-PCRi tulemuste graafikul A on uuritavaid gruppe võrreldud töötlemata (UT) rakkudega ja graafikul B puhta siRRM2ga töödeldud rakkudega. Graafikutelt on näha, et PF6/siRRM2 nanopartiklid on võimelised RRM2 geeni vaigistama umbes 85% ulatuses. Positiivse kontrollina kasutati Lipofektamiini, mille efektiivsus oli võrreldav PF6 omaga.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , Tukey *post-hoc*.

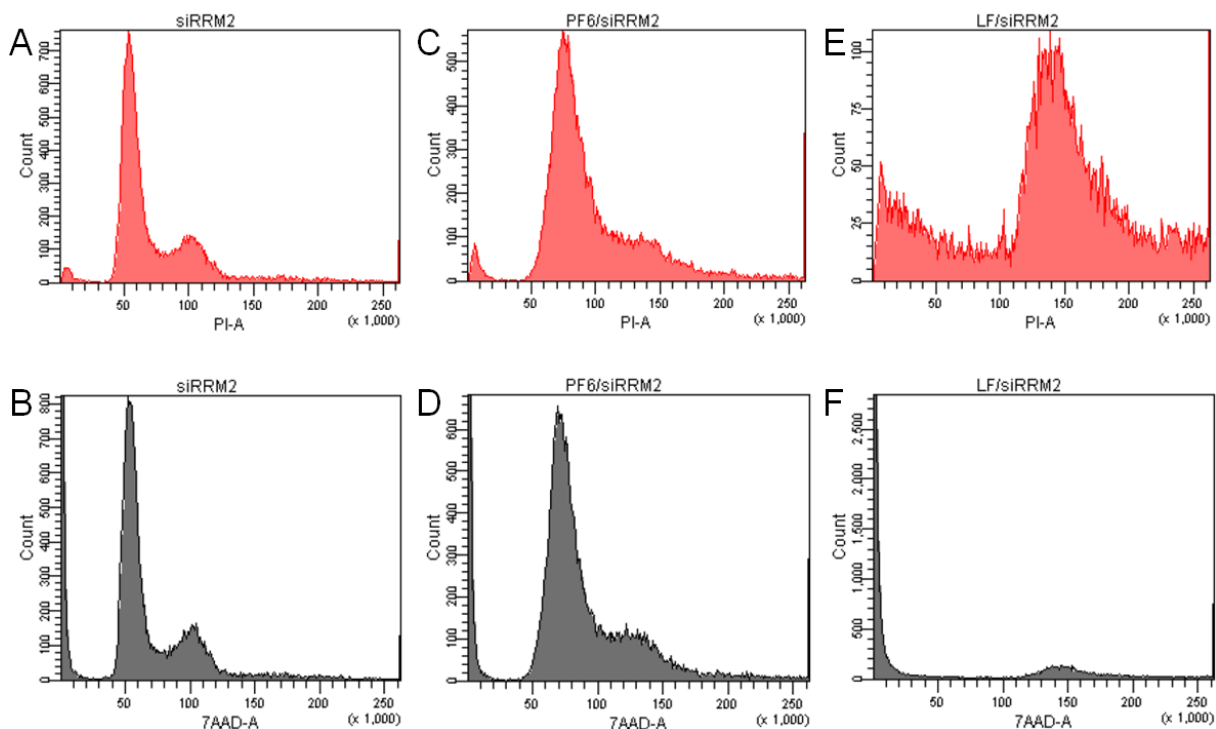
### 2.3.2 Rakutsükli analüüs 2D rakukultuuris

PF6 abil RRM2 geeni vaigistamisest tingitud rakkude funktsionaalse muutuse hindamiseks teostati rakutsükli analüüs läbivoolutsütomeetria abil, tulemuste histogrammid on näidatud joonisel 4. Alumised pildid näitavad kogu mõõdetud proovi rakkude DNA koguste hulka ning ülemised pildid suuruse ja granulaarsuse järgi välja selekteeritud elusate rakkude DNA koguste hulka.

F graafikult võib järeldada, et Lipofektamiin on U87 rakkudele väga toksiline, sest võrreldes kontrollprooviga (graafik B) on näha, et enamus proovist on surnud rakud ning elusad rakud peaaegu puuduvad. Lisaks ei joonistu ellujäänud rakkudel üldse rakutsükli välja, vaid enamuses rakkudes on rohkem kui kahekordne kogus DNAd, mis viitab polüploidisusele (graafik E).

PF6/siRRM2 kompleksidega töödeldud rakkudest on elus puhta siRNAga samaväärne kogus rakke (graafik D). Rakutsükli profiil (graafik C) on aga muutunud. Rakkude hulk protsentides oli järgmine: puhta siRRM2 proovis oli G1-faasis 56,7%, S-faasis 12,6% ja G2/M-faasis 19,7% elusatest rakkudest, mis iseloomustab tüüpilist rakutsükli profiili; PF6/siRRM2 proovis oli aga G1-faasis 11,5%, S-faasis 47,1% ja G2/M-faasis 20,9% elusatest rakkudest. See tähendab, et G1-faasis on rakkude arv oluliselt vähenenud ning rakud on liikunud S-faasi ja sinna kinni jäänud ehk seal on rakutsükkel blokeeritud. See omakorda näitab seda, et

PF6/siRRM2 suudab RRM2 geeni piisava vaigistamise kaudu mõjutada ka U87 rakkude paljunemisfunktsiooni.

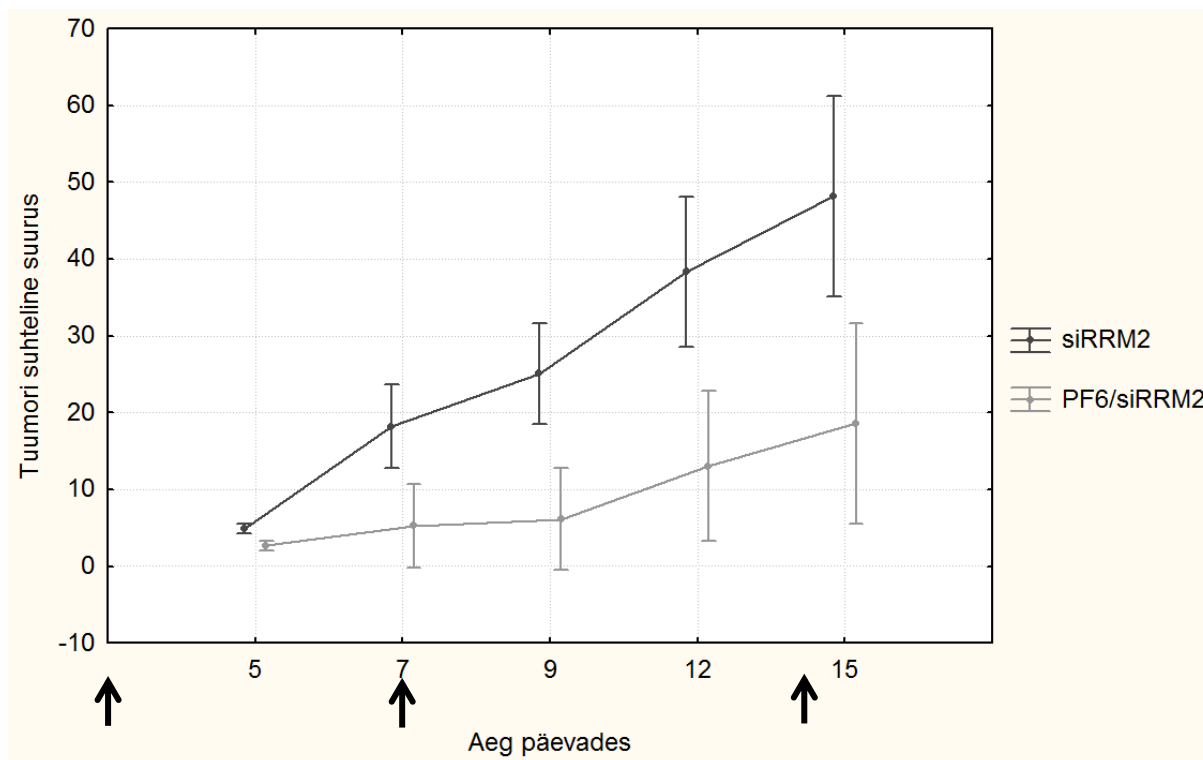


**Joonis 4.** Rakutsükli muutused pärast nanopartiklitega transfekteerimist U87 ühekihilises rakukultuuris. Voolutsütomeetria tulemuste graafikutel A, C ja E on näidatud elusate rakkude rakutsükli pildid ning B, D ja E puhul vastavalt kogu analüüsitud rakkude pildid. Nendelt võib järeldada, et Lipofektamiin omab suurt toksilisust U87 rakkudele ning PF6/siRRM2 kompleksidega töödeldud rakkude rakutsükkel on S-faasis blokeeritud.

### 2.3.3 Tuumori kasvu mõjutamine *in vivo* hiiremudelil

*In vivo* kasvaja ravimefekti uurimiseks võrreldi omavahel kahe grupi, puhta siRRM2 ja PF6/siRRM2 nanopartiklite, mõju tuumori kasvule. Joonisel 5 on välja toodud mõlema grupi keskmised tuumori suurused. X-teljel on näidatud esimesest komplekside manustamisest möödunud aeg päevades ja y-teljel kasvaja suurus kuupmillimeetrites. Kõik suuruste punktid on normaliseeritud tuumori suurustega ravi alustamise algushetkel, et viia mõlema uuritava grupi väärtused 0-punktis ühele tasemele. Graafikult on näha, et PF6/siRRM2 komplekse saanud loomade tuumorid on keskmiselt väiksemad kui kontrollgrupis.

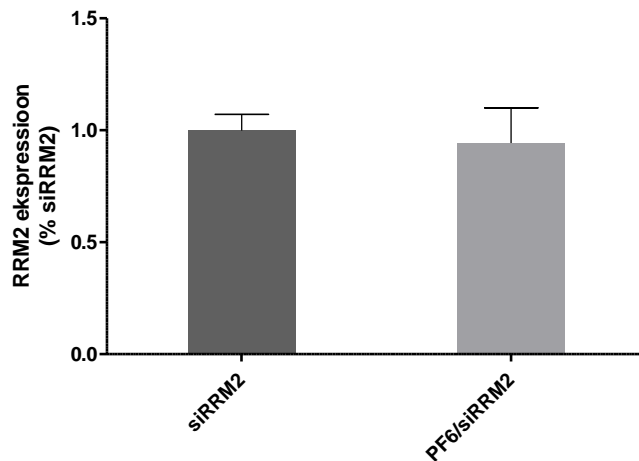
Mõõdetud kasvaja suuruste statistilise erinevuse uurimiseks teostati korduvmõõtmiste (*repeated measures*) Anova, mille peaefekt oli:  $F(4,16)=2,3$ ,  $p>,05$ . Tukey alusel ei erinenud katsegruppide tuumorite suurused ühelgi päeval teineteisest statistiliselt olulisel määral.



**Joonis 5.** Subkutaansete U87 glioblastoomi tuumorite kasv immuunpuudulikes hiirtes. PF6/siRRM2 nanopartikleid saanud loomadel on küll keskmiselt väiksemad tuumorid, kuid kahe grupi vaheline erinevus ei ole statistiliselt oluline. Nooled graafikul näitavad komplekside manustamise ajapunkte.

### 2.3.4 *In vivo* geeniekspressioon

Tuumorikudedest eraldatud geneetilise materjali qRT-PCR ning seejärel teostatud geeniekspressiooni analüüs näitas, et võrreldes kontrollgrupiga ei ole uuritavas grupis RRM2 geeni vaigistatud. Nimetatud analüüs on esitatud joonisel 6, kus on välja toodud kahe katses osalenud loomade grupi indiviidide keskmised tulemused. RRM2 geeni ekspressioon normaliseeriti GAPDH ekspressiooniga ning PF6/siRRM2 grupi tulemusi võrreldi puhta siRRM2 grupi tulemustega, kuid mingit märgatavat erinevust gruppide vahel ei esinenud.

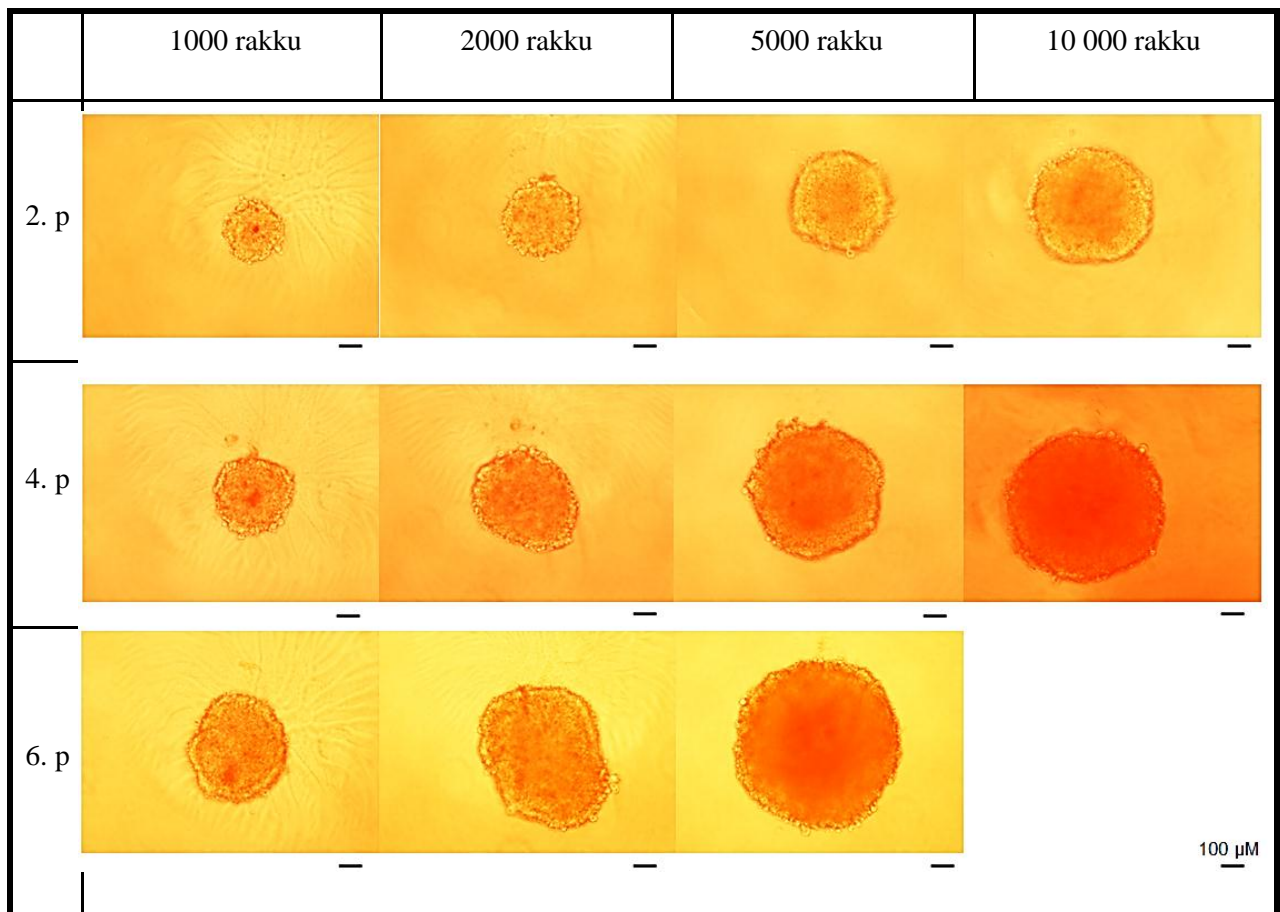


**Joonis 6.** *In vivo* U87 subkutaansetest tuumoritest eraldatud materjali geeniekspressiooni võrdlus ei näidanud vahet loomade gruppidel, kellele manustati puhast siRRM2 või PF6/siRRM2 nanopartikleid.

### 2.3.5 Sfääride moodustumine

Valgusmikroskoopia piltidelt on näha U87 rakkudest sfääride diameetri suurenemist sõltuvalt ajast ja rakkude arvust (joonis 7). Mida rohkem rakke alguses külvati, seda suuremad on sfäärid samal ajapunktil. Lisaks on ühte konkreetset sfääri iga raku hulga juures pildistatud iga kahe päeva tagant ning on näha selle sfääri kasvamist aja kulgedes.

Tuginedes kirjandusele (Friedrich et al., 2009) on ravimi toime uurimiseks kõige optimaalsem kasutada sfääre, mis on neljandal päeval pärast külvamist umbes 400  $\mu$ M suurused. Selleks külvatavate rakkude hulgaks U87 rakuliini puhul osutus 2000 rakku, mida kasutati edasi järgnevatel katsetel.



**Joonis 7.** Valgusmikroskoopia pildid U87 rakkude sfääridest erinevatel ajapunktidel. Vasakult paremale on näidatud rakkude arv külvamise hetkel ning ülevalt alla möödunud päevade arv alates külvamise hetkest. Selgelt on näha sfääride suuruse kasvamist sõltuvalt rakkude arvust ning möödunud ajast. Mõõtjoon vastab 100 μM pikkusele alale piltidel.

### 2.3.6 Geeniekspressiooni muutused 3D rakukultuuris

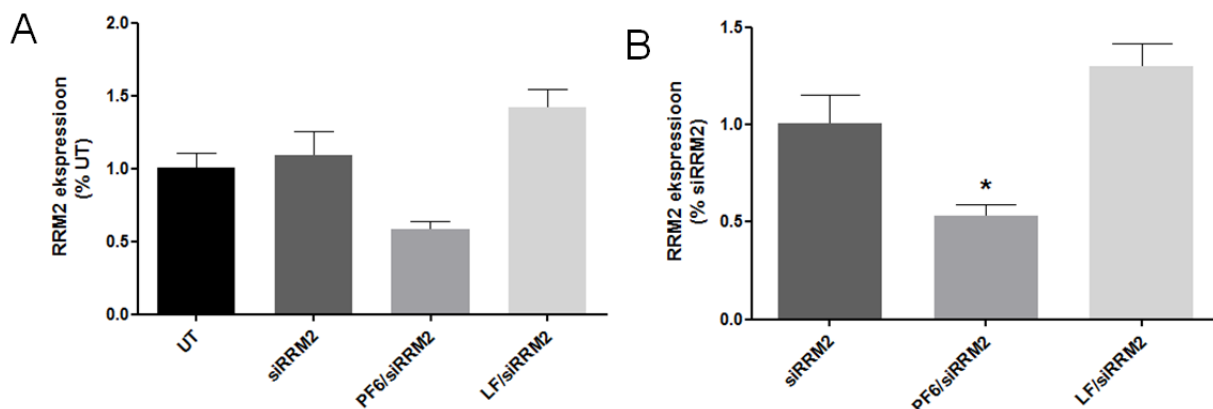
qRT-PCR tulemused U87 sfäärides näitasid RRM2 geeni vaigistavat toimet (joonis 8). Geeniekspressiooni väärtuseid analüüsiti ühesuunalise (*One-way*) Anovaga.

Joonisel 8 kujutatud graafikutel on esitatud U87 3D rakukultuuri geeniekspressiooni muutused võrrelduna negatiivse kontrolliga, vastavalt kas UT või siRRM2ga töödeldud sfääridega. Y-teljel on toodud ekspressiooni suhtelised väärtused, võrreldes negatiivse kontrollgrupiga.

Graafikul C olevate 3D geeniekspressiooni tulemuste peaefekt oli:  $F(3,12)=8,0$ ,  $p<,01$ . Sarnaselt kahedimensionaalselt kasvanud rakkudele ei omanud ka sfääride puhul siRRM2 võrrelduna töötlemata rakkudega mingit geeniekspressiooni mõjutavat toimet. PF6/siRRM2 vaigistas RRM2 ekspressiooni umbes 45% ulatuses, kuid võrrelduna UT grupiga statistilist

olulisust ei omanud. On selgelt näha, et Lipofektamiin sfääre transfekteerima ei ole võimeline, üllatuslikul kombel on RRM2 geeni ekspressiooni määr isegi tõusnud.

Graafiku D tulemuste peaeft oli:  $F(2, 9)=11,4$ ,  $p<,01$ . Võrrelduna puhta siRNAga omas PF6/siRRM2 umbes 50% suurust vaigistavat toimet ning Tukey *post-hoc* test näitas statistilist olulisust  $p<0,05$ .



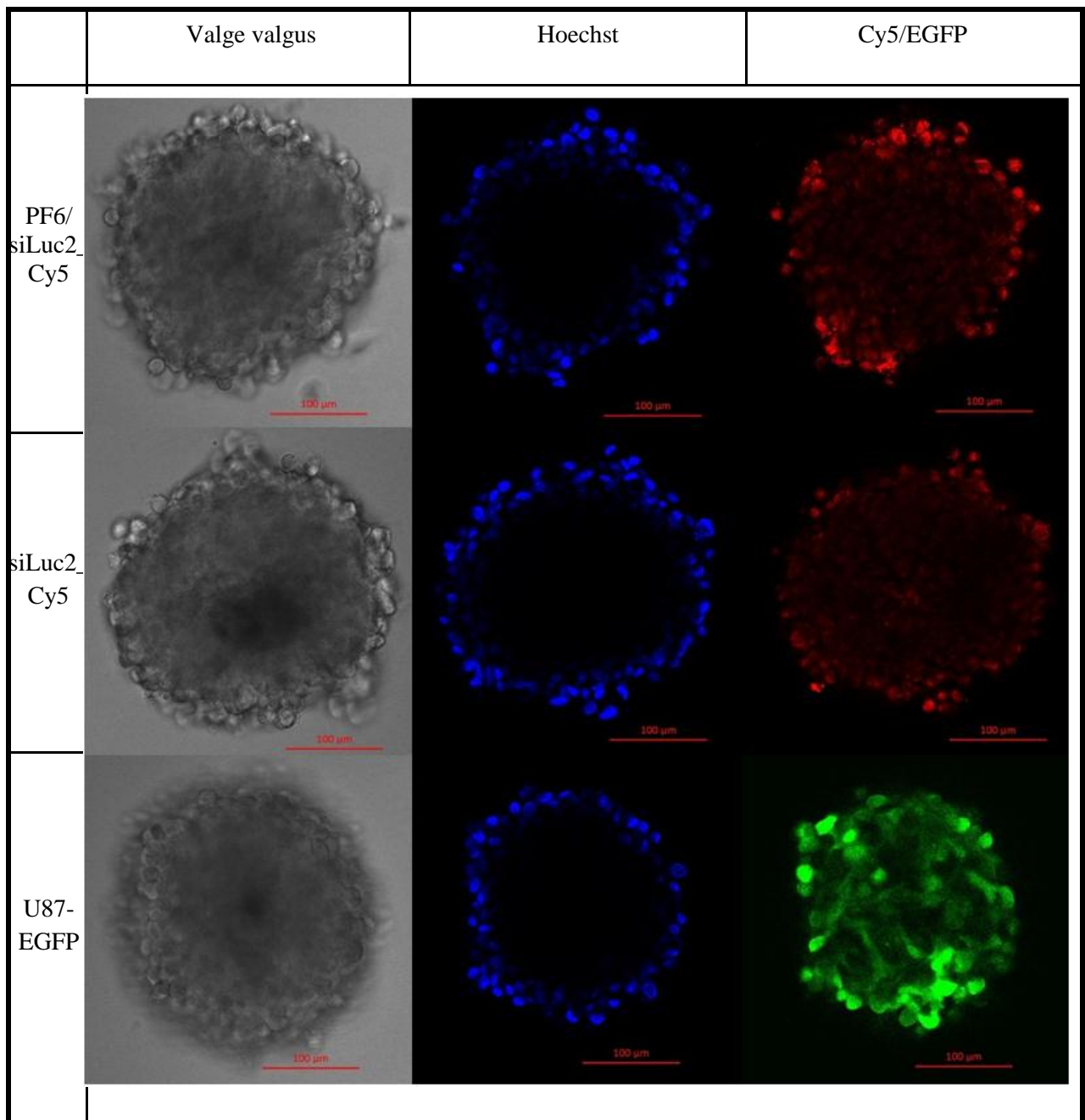
**Joonis 8.** Tuumorite tekkel olulise RRM2 geeni vaigistamine inimese glioblastoomi rakkudest moodustatud sfäärides PF6/siRRM2 kompleksidega. Graafikutelt on näha, et PF6/siRRM2 nanopartiklid on võimelised RRM2 geeni vaigistama umbes 45-50% ulatuses. Positiivse kontrollina kasutati Lipofektamiini, mis osutus 3D rakukultuuris ebaefektiivseks.

\*  $p<,05$ , Tukey *post-hoc*.

### 2.3.7 Konfokaalmikroskoopia

Fluorestseeruva Cy5 mäkega puhta siRNA ja PF6ga moodustatud sama siRNA kompleksidega töödeldud U87 sfääride konfokaalmikroskoopia pildid on esitatud joonisel 9 (kaks ülemist piltide rida). Alumised pildid on tehtud EGFPd stabiilselt ekspresseerivatest U87 rakkudest moodustatud sfäärdest (pole transfekteeritud) ning kõik sfäärid on töödeldud rakku penetreeruva tuumavärviga Hoechst.

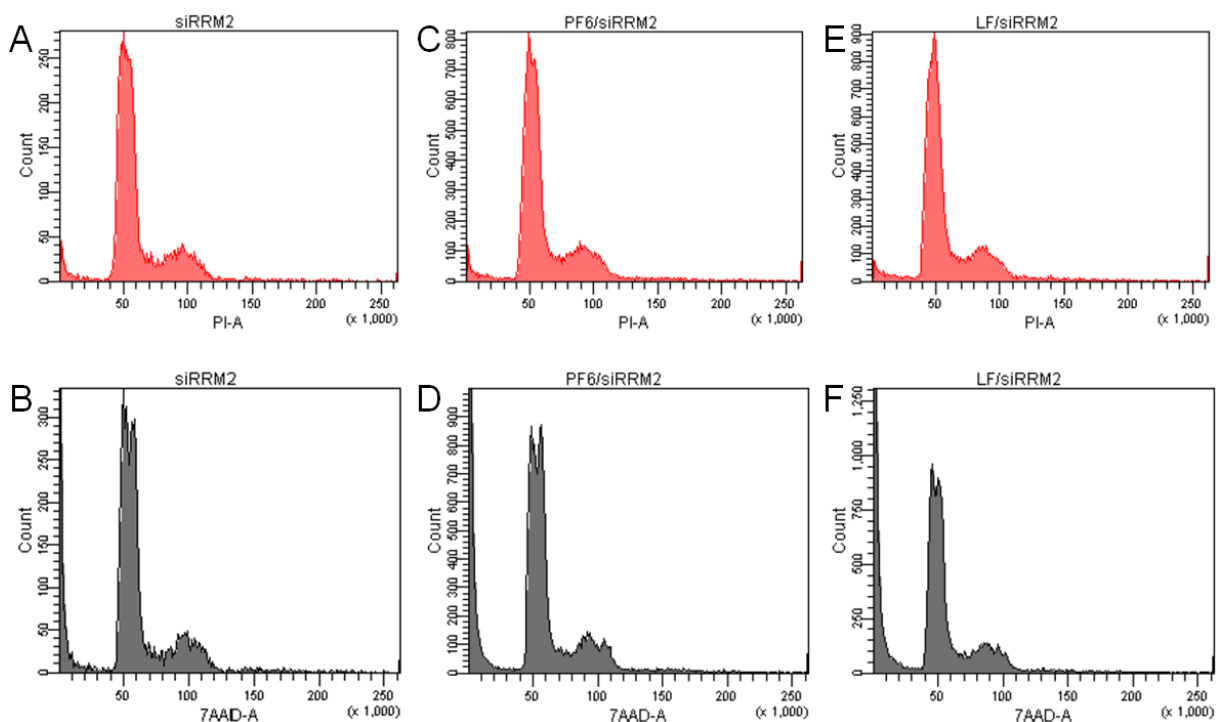
Kui võrrelda töödeldud sfääre, võib vaadates Cy5 kanali pilte järeldada, et puhta siLuc2\_Cy5 ja PF6/siLuc2\_Cy5 komplekside töötluste vahel ei ilmne mingit erinevust. Samuti on näha, et Hoechsti värv suudab värvida vaid sfääri välimisi kihte. Seda võib järeldada, sest EGFP-positiivse sfääri kuvamisel on näha, et põhjus, miks sfääri keskosa ei fluorestseeru, ei saa olla rakukihi paksusest tingitud, kuna EGFP signaal on olemas ka sfääri keskosas.



**Joonis 9.** Konfokaalmikroskoopia pildid Cy5 märgisega siRNA ja PF6/siRNA kompleksidega transfekteeritud U87 sfääridest ning EGFPd stabiilselt ekspresseerivatest U87 sfääridest. siLuc2\_Cy5 puhta siRNA ja PF6/siRNA piltidelt ei ole näha kahe grupi vahelist erinevust. Erinevalt Hoechst 33342 tuumavärvist on EGFP fluorestsents jälgitav terves sfääris. Mõõtjoon vastab 100 μM pikkusele alale pildidl.

### 2.3.8 Rakutsükli analüüs tuumori sfäärides

PF6 abil RRM2 geeni vaigistamisest tingitud rakkude rakutsükli muutuse hindamiseks teostati ka sfääride puhul läbivoolutsütomeetria (joonis 10). Erinevalt mitmetest muutustest 2D kultuuri rakutsükli ei mõjuta sfääride rakutsükli ei PF6/siRRM2 ega LF/siRRM2 transfektsioon, vaid rakutsükli pildid on samaväärsed siRRM2 negatiivse kontrolliga.



**Joonis 10.** Rakutsükli analüüsi tulemused pärast U87 sfääride nanopartiklitega transfektsiooni. Voolutsütomeetria tulemuste graafikutel A, C ja E on näidatud elusate rakkude rakutsükli pildid ning B, D ja E puhul vastavalt kogu analüüsitud rakkude pildid. Nendelt võib järeldada, et ei PF6 ega Lipofektamiiniga moodustatud siRRM2 kompleksidega transfektsioon sfäärides rakutsükli ei mõjuta.

## ARUTELU

Geeniteraapia põhiliseks eesmärgiks on erinevate oligonukleotiidide sihtmärgiks olevatesse rakkudesse toimetamine ning sealse geeniekspressiooni mõjutamine. Selle eesmärgi saavutamiseks on väga oluline efektiivsete, kuid madala toksilisusega ja minimaalselt immuunvastust esilekutsuvate transportvektorite kasutamine. Neile kriteeriumitele vastavateks vektoriteks võiksid olla rakku sisenevad peptiidid, mis on võimelised nii *in vitro* kui ka *in vivo* imetaja rakkudesse erinevaid bioloogilisi molekule mittetoksiliselt transportima (Langel, 2011).

Antud töös kasutamiseks valiti rakku sisenev peptiid PepFect6, sest varasemalt on kirjeldatud selle võimet väga efektiivse transfektsioonivektorina rakkudesse just siRNAd transportida (Andaloussi et al., 2011). Nimelt sooviti antud töös valideerida vähispetsiifilise RRM2 geeni vastane siRRM2, mis on disainitud TÜTI molekulaarse biotehnoloogia laboris. Lisaks sooviti optimeerida siRRM2 kasutamise protokoll PF6ga *in vitro* ja *in vivo*. Uuritavaks haigusmudeliks valiti ajukasvaja üks kõige levinum ja ohtlikum vorm, glioblastoom. Üheks põhjuseks oli selle haiguse problemaatilisus meditsiinis: suur ja kiire suremus isegi uusimate ravivõtete rakendamisel. Teise põhjusena võib välja tuua glioblastoomi agressiivse iseloomu ja kõrge mitootilise aktiivsuse. Viimane omadus on just sobivaks sihtmärgiks siRRM2le, sest mida tihedamini rakud paljunevad, seda rohkem on RRM2 üleekspressioonid.

RRM2 sihtmärgina valideerimiseks teostati esmalt geeniekspressiooni analüüs qRT-PCRi meetodiga. Selle tulemustest on näha, et PF6/siRRM2 kompleksidega on RRM2 geen 85% ulatuses ning LF/siRRM2 kasutades 75% ulatuses vaigistatud. See langes kokku oodatud tulemustega, sest töö autor on ka varasemalt näidanud PF6 suurt efektiivsust geenivaigistamisel (Kiisholts, 2012).

RRM2 geeni vaigistamisest tingitud funktsionaalse muutuse hindamiseks rakkudes teostati järgmisena rakutsükli analüüs. Tulemustest võib järeldada, et positiivse kontrollina kasutatud Lipofektamiin on U87 rakkudele raskelt toksiline. Samas PF6/siRRM2 kompleksidega transfekteeritud rakud toksilisi efekte ei ilmuta, kuid näitavad ilmekalt rakutsükli blokeerumist S-faasis. Selline tulemus korreleerub hästi kirjanduse andmetega, kus on kirjeldatud RRM2 inhibeerimisel rakutsükli kinnijäämist G1/S faasi (Zuckerman et al., 2011) ning sama efekti oodati ka PF6/siRRM2ga transfekteerimisel.

Kirjeldatud geenivaigistamise ja rakutsükli tulemuste põhjal võib järeldada, et ainuüksi geeniekspressiooni mahasurumine mRNA tasemel ei tähenda alati oodatud efekti saavutamist. Näiteks võib tuua siinkohal LF/siRRM2 komplekside mõju. Need näitasid efektiivset

geenivaigistamist, kuid esimesest katsest ei selgunud nende toksilisuse ulatus, see ilmnis alles hinnates rakutsükli tulemusi. Samas PF6/siRRM2 nanopartiklid omasid efekti nii geenivaigistamises kui ka rakutsükli blokeerimises, mis tähendab, et RRM2 on sobivaks vähivastaseks sihtmärgiks ning PepFect6 efektiivseks ja vähese toksilisusega vektoriks. Need tulemused andsid märku, et on õigustatud edasiliikumine nimetatud partiklite testimisega *in vivo*.

Järgmiseks eesmärgiks püstitatigi PF6 poolt vahendatud RNAi indutseerimise potentsiaali kindlakstegemine *in vivo* mudelites. Selleks kasutatud immuunpuudulikel hiirtel indutseeritud U87 subkutaansete kasvaja mõõtmistulemused näitasid küll tuumori kasvu vähenemist PF6/siRRM2 manustamisel võrreldes puhta siRRM2 grupiga, kuid nimetatud erinevus ei olnud statistiliselt oluline. Lisaks mõõdeti katse lõppedes samade loomade tuumorikudedest RRM2 geeni ekspressiooni, mille väärtused ei erinenud uuritava ja kontrollgrupi vahel üldse.

Kirjeldatud negatiivne *in vivo* tulemus oli teatavaks üllatuseks. See võis olla põhjustatud kudede eraldamise käigus ilmnenu faktist, et indutseeritud subkutaansed tuumorid olid väga vähesel määral teiste kudedega integreerunud ning halvasti vaskulariseeritud. See erineb suuresti tegelikust olukorrast glioblastoomiga patsientidel ning tähendab, et manustatud nanopartiklid ei pruukinud vähese verevarustuse tõttu tuumoris sinna piisaval määral kohale jõuda. Selle probleemi lahendamiseks oleks üheks variandiks tuumorite indutseerimine intrakraniaalselt ehk ajusiseselt, kus võib loota kasvaja paremat integreerumist ja verevarustuse tekkimist. Lisaks on võimalik nanopartiklite poolväärtusaja pikendamiseks vereringes kasutada peptiidile kovalentse konjugeerimise teel polüetüleenglükooli kinnitamist (Essa et al., 2010) või nanopartiklite spetsiifilisuse suurendamiseks peptiidile mõne *homing*-järjestuse külge sünteesimine, mis tunneks ära konkreetselt tuumorirakke (Teesalu et al., 2013).

Kuna *in vivo* andmed ei näidanud PF6/siRRM2 kasutades positiivset tulemust, otsustati, et tuleb oma tööga liikuda tagasi *in vitro* katsete juurde. Kuid kuna 2D rakukultuuris oli PF6/siRRM2 juba näidatud suurt efekti, otsustati nimetatud nanopartikleid testida hoopis 3D kultuuris, sest see võiks olla 2D kultuuri ja loomkatsete vahepealne etapp.

Kolmanda eesmärgina toodigi välja *in vitro* 3D rakukultuuride kasutamise meetodika väljatöötamine CPP rakenduste jaoks. Selleks uuriti põhjalikult erinevaid sfäärade kasvatamise võimalusi ning otsustati madala siduvusega koekultuuri plaatide kasuks. Esmalt kontrolliti sfäärade kasvamist ajas ning diameetri suurenemist sõltuvalt külvatud rakkude hulgast. Transfekteerimiseks optimaalse suurusega (400 µm) sfäärideks osutusid need, mis

olid moodustunud 2000 külvatud rakust ning edaspidi kasutati kõikide katsete jaoks just seda kogust rakke sfääride külvamisel.

Järgmisena uuriti qRT-PCRi abil siRRM2ga moodustatud nanopartiklite geenivaigistamise toimet sfäärides. Sellest selgus, et Lipofektamiin ei ole erinevalt PF6/siRRM2 kompleksidest üldse võimeline sfäärides RNA interferentsi indutseerima. Kuigi RRM2 geeni vaigistamise määr oli PF6/siRRM2 kasutades 45-50%, oli see siiski umbes 35% võrra madalam kui ühekihilise rakukultuuri puhul. Kahtlustati, et võib-olla ei suuda PF6ga moodustatud kompleksid sfääris kõikidesse rakkudesse tungida ja et see võib olla geenivaigistamise vähenenud efektiivsuse põhjuseks.

Selle mõtte kontrollimiseks töödeldi sfääre fluorestseeruva Cy5 märgega siRNAGA moodustatud PF6 kompleksidega ning vaadeldi konfokaalmikroskoobiga siRNA paiknemist sfäärides. Üllataval kombel ei olnud puhta siLuc2\_Cy5 ja PF6/siLuc2\_Cy5 sfääride vahel näha mingit erinevust. Selle seletus võib olla, et oluline osa puhast Cy5 siRNAd jääb rakkudevahelisse ruumi kinni ning sealt tulev fluorestsentsi signaal ei ole eristatav PF6/siLuc2\_Cy5 eeldatavast rakkude sisemuses tekkinud fluorestsentsist. Lisaks värviti sfääride rakkude tuumad raku penetreeruva Hoechst tuumavärviga, kuid visualiseeritud olid vaid sfääride välimise kihi rakud. See püstitas omakorda küsimuse, kas sfääride sisemus ei ole nähtav, kuna mikroskoop ei ole võimeline visualiseerima nii paksu rakkude kihti või ei ole Hoechst värv võimeline seda läbima. Vastuse sellele küsimusele andis EGFPd stabiilselt ekspresseerivatest U87 rakkudest moodustatud sfääri kuvamine. Kuna EGFP signaal oli nähtav ka sfääri keskel, tähendab see seda, et Hoechst tuumavärv ei ole siiski võimeline läbi mitme rakukihi minema ning kahjuks ei saa seda kasutada kogu sfääri rakutuumade visualiseerimiseks.

Viimasena teostati ka sfäärirakkude rakutsükli analüüs, mille tulemus oli üheselt mõistetav – PF6/siRRM2 partiklid suudavad küll RRM2 geeni umbes 50% ulatuses vaigistada, kuid see ei ole piisav funktsionaalse efekti tekkimiseks ja rakutsükli mõjutamiseks, sest rakutsükli profiil nägi välja samalaadne puhta siRRM2ga töödeldud rakkude pildiga. Ka Lipofektamiin ei mõjutanud rakutsükli, lisaks ei ilmnunud sfääride puhul ka mingisuguseid toksilisi ilminguid, kui tugineda rakutsükli analüüsile.

PF6/siRRM2 kompleksidega töödeldud sfääride rakutsükli analüüs kinnitab veel kord kahtlust, et nimetatud kompleksid ei ole võimelised üksi koesse penetreerima, mis võib olla ka negatiivsete *in vivo* katsete tulemuste põhjuseks. Kuigi loomas kasvavat tuumorit varustavad veresooned ning iseloomustab EPR (*enhanced permeability and retention*) efekt,

ei pruugi nanopartiklid siiski olla võimelised veresoont ümbritsevatest esimestest rakukihtidest kaugemale liikuma.

Kui esitatud tulemustele mõelda, tuleb ilmsiks see, et ka CPP rakenduste puhul on võimalik edaspidine 3D sfääride edukas kasutamine tavalise ühekihilise *in vitro* kultuuri ja loomkatsete vahe-etapina. See võimaldab 2D kultuuris positiivseid tulemusi näidanud peptiide skriinida järgmisena 3D rakukultuuris ning edasi loomkatseteni liikuda vaid mõlemas kultuuris positiivseid tulemusi näidanud rakku sisenevate peptiididega. Nagu eelnevalt mainitud, ei tohiks ka piisava positiivse tulemusena võtta ainult geeniekspressiooni tasemete muutusi.

Kokkuvõtteks valideeriti antud töö raames siRRM2 vähivastase sihtmärgi efektiivse vaigistamise kaudu. Samuti kirjeldati, et hoolimata oma suurest efektiivsusest *in vitro* transfektsioonireagendina, ei ole PF6 kasutamine ainukese transportmolekulina siRNA efekti saavutamiseks piisav *in vivo* glioblastoomi mudelis, kuna antud tulemused viitavad, et ta ei suuda paksemaid rakukihte iseseisvalt läbida. Lisaks on edaspidi võimalik vähendada kasutatavate katseloomade arvu rakku sisenevate peptiidide algsel testimisel, kasutades pärast 2D rakukultuuri järgmise test-süsteemina välja töötatud 3D rakukultuuri meetodeid.

## KOKKUVÕTE

Pahaloomulisi ajukasvajaid on väga raske varakult diagnoosida ning nende heterogeensuse tõttu on raske neile ühtset ravimeetodit välja töötada. Kõige levinumateks ajukasvajateks on glioblastoomid, mis valiti ka antud uurimistöö haigusmudeliks. Kõiki glioblastoome ühendab suur invasiivsus ja nende rakud omavad kõrget mitootilist aktiivsust. See omadus on sobivaks sihtmärgiks RRM2 geeni vastasele siRNAle, mis omab suurt efektiivsust RNA interferentsi indutseerimises just kiirelt paljunevates rakkudes.

siRNA transportimiseks rakkudesse on aga vajalik efektiivse ja vähese toksilisusega transportvektori kasutamine. Tuginedes varasemalt näidatud tulemustele sobib selliseks vektoriks hästi rakku sisenev peptiid PepFect6, mis on võimeline väga efektiivse transfektsioonivektorina rakkudesse just siRNAd transportima.

Antud uurimistöö tulemustele tuginedes võib järeldada, et vähispetsiifilise RRM2 geeni vastane siRRM2 valideeriti kasutamiseks kasvajamudelites. Lisaks korrati varasemalt näidatud PepFect6 edukust rakkude transfektsioonilisel *in vitro*, kuid sellest olenemata ei suutnud PF6 glioblastoomi subkutaansetes tuumorites siRRM2ga komplekseeritult RNA interferentsi indutseerida. Lisaks töötati uurimistöö käigus välja *in vitro* 3D rakukultuuride kasutamise meetodika CPP rakenduste jaoks.

## **PF6-mediated RNA interference *in vitro* and *in vivo***

Kristina Kiisholts

### **SUMMARY**

Malignant brain tumors are often very difficult to diagnose and due to their heterogeneity it is very difficult to develop therapeutic applications for curing this disease. The most common malignant brain tumors are glioblastomas, which are also the disease model of interest in given thesis.

All glioblastomas are very invasive and have high mitotic activity. This property makes them suitable for silencing RRM2 gene using siRNA mediated RNAi.

However, siRNAs are not able to enter cells due to their high molecular weight and negative net charge and therefore efficient and non-toxic transport vectors are needed. One class of such vectors is CPPs and it has been shown earlier that cell-penetrating peptide, PepFect6 is very efficient in delivering siRNA to cells.

In this work the use of siRRM2 in glioblastoma model has been validated. Also it is shown that PepFect6 mediates efficient gene silencing *in vitro*, however it is not able to silence RRM2 gene expression in subcutaneous glioblastoma model. In addition, 3D cell-cultures for screening CPP-mediated applications were developed.

In conclusion, PepFect6 is very efficient in delivering siRNA in *in vitro* conditions, but further improvements are needed for utilizing them for RNAi therapeutics in glioblastomas.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Ahmed, R., M. J. Oborski, M. Hwang, F. S. Lieberman, and J. M. Mountz, 2014, Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods: *Cancer Manag Res*, v. 6, p. 149-170.
- Andaloussi, S. E., T. Lehto, I. Mäger, K. Rosenthal-Aizman, I. I. Oprea, O. E. Simonson, H. Sork, K. Ezzat, D. M. Copolovici, K. Kurrikoff, J. R. Viola, E. M. Zaghoul, R. Sillard, H. J. Johansson, F. Said Hassane, P. Guterstam, J. Suhorutšenko, P. M. Moreno, N. Oskolkov, J. Hälldin, U. Tedebark, A. Metspalu, B. Lebleu, J. Lehtiö, C. I. Smith, and U. Langel, 2011, Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo: *Nucleic Acids Res*, v. 39, p. 3972-87.
- Castanotto, D., and J. J. Rossi, 2009, The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics: *Nature*, v. 457, p. 426-33.
- Chabes, A., and L. Thelander, 2000, Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks: *J Biol Chem*, v. 275, p. 17747-53.
- Davidson, B. L., and P. B. McCray, 2011, Current prospects for RNA interference-based therapies: *Nat Rev Genet*, v. 12, p. 329-40.
- Derossi, D., A. H. Joliot, G. Chassaing, and A. Prochiantz, 1994, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes: *J Biol Chem*, v. 269, p. 10444-50.
- El-Andaloussi, S., T. Holm, and U. Langel, 2005, Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications: *Curr Pharm Des*, v. 11, p. 3597-611.
- Essa, S., J. M. Rabanel, and P. Hildgen, 2010, Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles: *Eur J Pharm Biopharm*, v. 75, p. 96-106.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello, 1998, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*: *Nature*, v. 391, p. 806-11.
- Friedrich, J., C. Seidel, L. A. Kunz-Schughart, and R. Ebner, 2009, Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach: *Nature Protocols*, v. 4, p. 309-324.
- Henriques, S. T., A. Quintas, L. A. Bagatolli, F. Homblé, and M. A. Castanho, 2007, Energy-independent translocation of cell-penetrating peptides occurs without formation of pores. A biophysical study with pep-1: *Mol Membr Biol*, v. 24, p. 282-93.
- Hollon, T., 2000, Researchers and regulators reflect on first gene therapy death: *Nat Med*, v. 6, p. 6.

- Hsu, S. H., B. Z. Schacter, N. L. Delaney, T. B. Miller, V. A. McKusick, R. H. Kennett, J. G. Bodmer, D. Young, and W. F. Bodmer, 1976, Genetic characteristics of the HeLa cell: *Science*, v. 191, p. 392-4.
- Jovčevska, I., N. Kočevar, and R. Komel, 2013, Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know?: *Mol Clin Oncol*, v. 1, p. 935-941.
- Jreyssaty, C., Q. Shi, H. Wang, X. Qiu, F. M. Winnik, X. Zhang, K. Dai, M. Benderdour, and J. C. Fernandes, 2012, Efficient Nonviral Gene Therapy Using Folate-Targeted Chitosan-DNA Nanoparticles In Vitro: *ISRN Pharm*, v. 2012, p. 369270.
- Judge, A. D., V. Sood, J. R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, and I. MacLachlan, 2005, Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA: *Nat Biotechnol*, v. 23, p. 457-62.
- Kiisholts, K., 2012, Inimese kasvajakude transfektsioon PepFect6 ja siRNA kompleksidega ning kasvajate progresseerumisel olulise geeni mahasurumine, bakalaureusetöö.
- Langel, Ü. E., 2011, Cell-Penetrating Peptides: *Methods in Molecular Biology*, v. 683, Humana Press.
- Latham, J. A., and T. R. Cech, 1989, Defining the inside and outside of a catalytic RNA molecule: *Science*, v. 245, p. 276-82.
- Lehto, T., O. E. Simonson, I. Mäger, K. Ezzat, H. Sork, D. M. Copolovici, J. R. Viola, E. M. Zaghoul, P. Lundin, P. M. Moreno, M. Mäe, N. Oskolkov, J. Suhorutšenko, C. I. Smith, and S. E. Andaloussi, 2011, A peptide-based vector for efficient gene transfer in vitro and in vivo: *Mol Ther*, v. 19, p. 1457-67.
- Marsh, M., and A. Helenius, 2006, Virus entry: open sesame: *Cell*, v. 124, p. 729-40.
- Mäe, M., S. E. Andaloussi, T. Lehto, and U. Langel, 2009, Chemically modified cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids: *Expert Opin Drug Deliv*, v. 6, p. 1195-205.
- Omuro, A., and L. M. DeAngelis, 2013, Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review: *JAMA*, v. 310, p. 1842-50.
- Rahman, M. A., A. R. Amin, X. Wang, J. E. Zuckerman, C. H. Choi, B. Zhou, D. Wang, S. Nannapaneni, L. Koenig, Z. Chen, Z. G. Chen, Y. Yen, M. E. Davis, and D. M. Shin, 2012, Systemic delivery of siRNA nanoparticles targeting RRM2 suppresses head and neck tumor growth: *J Control Release*, v. 159, p. 384-92.
- Rochlitz, C. F., 2001, Gene therapy of cancer: *Swiss Med Wkly*, v. 131, p. 4-9.
- Shao, J., B. Zhou, B. Chu, and Y. Yen, 2006, Ribonucleotide reductase inhibitors and future drug design: *Curr Cancer Drug Targets*, v. 6, p. 409-31.

- Shultz L, Goodwin N, Ishikawa F, et al. Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models, 2013. *Mouse models of cancer: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 253-271.
- Soomets, U., M. Lindgren, X. Gallet, M. Hällbrink, A. Elmquist, L. Balaspiri, M. Zorko, M. Pooga, R. Brasseur, and U. Langel, 2000, Deletion analogues of transportan: *Biochim Biophys Acta*, v. 1467, p. 165-76.
- Teesalu, T., K. N. Sugahara, and E. Ruoslahti, 2013, Tumor-penetrating peptides: *Front Oncol*, v. 3, p. 216.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman, 2003, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer: *Cell Prolif*, v. 36, p. 131-49.
- Wang, C., Z. Tang, Y. Zhao, R. Yao, L. Li, and W. Sun, 2014, Three-dimensional in vitro cancer models: a short review: *Biofabrication*, v. 6, p. 022001.
- Whitehead, K. A., R. Langer, and D. G. Anderson, 2009, Knocking down barriers: advances in siRNA delivery: *Nat Rev Drug Discov*, v. 8, p. 129-38.
- Zamore, P. D., 2006, RNA interference: big applause for silencing in Stockholm: *Cell*, v. 127, p. 1083-6.
- Zhang, Y. W., T. L. Jones, S. E. Martin, N. J. Caplen, and Y. Pommier, 2009, Implication of checkpoint kinase-dependent up-regulation of ribonucleotide reductase R2 in DNA damage response: *J Biol Chem*, v. 284, p. 18085-95.
- Zong, Y., Goldstein, A.S., Witte, O. N. Tissue recombination models for the study of epithelial cancer, 2013. *Mouse models of cancer: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 227-251
- Zuckerman, J. E., T. Hsueh, R. C. Koya, M. E. Davis, and A. Ribas, 2011, siRNA knockdown of ribonucleotide reductase inhibits melanoma cell line proliferation alone or synergistically with temozolomide: *J Invest Dermatol*, v. 131, p. 453-60.

## **KASUTATUD VEEBIAADDRESSID**

[http://cdn.idtdna.com/Scitools/Documents/Dicer\\_Substrate\\_RNAi.pdf](http://cdn.idtdna.com/Scitools/Documents/Dicer_Substrate_RNAi.pdf)



TARTU ÜLIKOOL

ARSTITEADUSKOND

## CERTIFICATE

**Kaido Kurrikoff**

has participated in the scientist competence course on

**LABORATORY ANIMAL SCIENCE:  
C-category competence course**

University of Tartu, Estonia

22 January – 8 February, 2007

This course fulfils the European requirements to achieve scientist competence to carry out animal experiments.

The course followed FELASA curriculum and included 50 hours of lectures on basic and applied laboratory animal science, 10 hours of practical work and demonstrations, 10 hours of interactive group work and group presentations and 10 hours of self-guided studying and a written examination.

The course was designed according to European guidelines under the auspices of University of Tartu and the Estonian University of Life Sciences. The course is registered at University of Tartu by code ARFS.01.067.

Aavo Lang, MD, PhD  
course organiser

University of Tartu  
FACULTY OF MEDICINE  
Ravila 19, 50411 Tartu  
ESTONIA

tel +372 737 5326  
+372 737 5328  
faks +372 737 5320  
e-post arst@ut.ee  
www.med.ut.ee  
reg kood 74001073

TARTU ÜLIKOOL



ARSTITEADUSKOND

## TUNNISTUS

nr 05

*Kristina Kiisholts*

on Tartu Ülikooli arstiteaduskonnas läbinud koolituse

*Katseloomateadus I*

ARBS.00.001

(5 EAP)

ajavahemikul 27.01.2014 – 07.02.2014

Koolituse läbiviimist on toetanud Euroopa Liit Euroopa Sotsiaalfondist

Koolituse eesmärgiks oli anda väljaõpe vastalt EL direktiivi 2010/63/EL, artikkel 23, punkt 2 toodud ülesannete läbiviimiseks vastavalt a) katsete tegemine loomadega; c) loomade hooldamine; d) loomade surmamine ning põhineb Põllumajandusministri määrusel nr 22; RT I, 12.03.13;6.

**Kai Okva**

vastutav õppejõud

Lisa: sisukirjeldus ja omandatud protseduuride loetelu loomaliigiti

Tartu, 07.02.2014



PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM

LOOMKATSE LÄBIVIIMISE  
LOAKOMISJON

OTSUS  
Tallinn

9. veebruar 2011 nr 69

Loomkatse läbiviimise luba

“Loomakaitseseaduse” § 45 lõike 3 ja § 47 lõike 6 alusel ning loomkatse läbiviimise loakomisjoni 9. veebruari 2011. a istungi protokoll nr 43 kohaselt otsustati:

1. Anda luba **Kaido Kurrikoff**’ile (sünd. 10.09.1977, aadress Tartu Ülikool, Nooruse 1, 50411 Tartu) loomkatse, kokkuvõtva nimetusega “Peptiidsete ravimikandjate kasutamine geeniekspressiooni modifitseerimiseks”, läbiviimiseks järgmistel tingimustel:

1) loomkatse läbiviimise aeg ja koht: 01.03.2011 – 31.12.2015, Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia instituudi vivaarium (ettevõtte tunnustamise otsus 10.01.2005 nr KL 1202, aadress Ravila 19, 50411 Tartu);

Tartu Ülikooli arstiteaduskonna vivaarium (ettevõtte tunnustamise otsus 16.11.2004 nr KL 1201, aadress Ravila 19, 50411 Tartu);

2) katseloomade liik ja arv: 108 Balb/c liini hiirt;

3) loomkatses rakendatavad menetlused: katseloomadele süstitakse testitavaid aineid i.v. (sabaveeni) või i.p. Loomi jälgitakse manustamise järgselt ja kontrollitakse toksiliste efektide ilmumise suhtes.

Loomad surmatakse üldanesteesia erinevatel ajahetkedel pärast kandja manustamist ning hinnatakse kandja efektiivsust.

Samaaegselt kogutakse koeproovid toksikoloogilise hindamise jaoks. Selleks on maksa, neerude, kopsu ja põrna histoloogiline analüüs (H&E värving, patoloogi hinnang), põrna kaal, interleukiinide (IL1b, TNFa) tase verest, vere keemilised näitajad (leukotsüüdid, CRP, ALT/AST, kreatiniin). Üldtoksikoloogilised näitajad määratakse

„General clinical state“ skooriga (hinnatakse selliseid üldiseid parameetreid nagu kaal, liikumine/letargia, kõhulahtisus, karvkatte välimus ja silmade suletus).

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

/allkirjastatud digitaalselt/  
Sulev Kõks  
Komisjoni esimees



PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM

LOOMKATSE LÄBIVIIMISE  
LOAKOMISJON

OTSUS  
Tallinn

9. veebruar 2011 nr 70

Loomkatse läbiviimise luba

“Loomakaitseaduse” § 45 lõike 3 ja § 47 lõike 6 alusel ning loomkatse läbiviimise loakomisjoni 9. veebruari 2011. a istungi protokoll nr 43 kohaselt otsustati:

1. Anda luba **Kaido Kurrikoff**’ile (sünd. 10.09.1977, aadress Tartu Ülikool, Nooruse 1, 50411 Tartu) loomkatse, kokkuvõtva nimetusega “Peptiidsete ravimkandjate kasutamine tuumoriravi mudelis”, läbiviimiseks järgmistel tingimustel:

1) loomkatse läbiviimise aeg ja koht: 01.03.2011 – 31.12.2015, Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia instituudi vivaarium (ettevõtte tunnustamise otsus 10.01.2005 nr KL 1202, aadress Ravila 19, 50411 Tartu);

Tartu Ülikooli arstiteaduskonna vivaarium (ettevõtte tunnustamise otsus 16.11.2004 nr KL 1201, aadress Ravila 19, 50411 Tartu);

2) katseloomade liik ja arv: 394 Balb/c nu/nu liini hiirt;

3) loomkatses rakendatavad menetlused: katseloomadel indutseeritakse tuumor kas intrakraniaalselt (stereotaktiline implantatsioon üldanesteesias) või nahaaluselt (implantatsioon s.c. süsti teel). Loomi kaalutakse tuumori tekitamise järgselt iga 2-3 päeva järel ning hinnatakse loomade seisukorda ning s.c. tuumorite puhul mõõdetakse nihikuga tuumori suurus.

Katseloomadele süstitakse testitavaid aineid i.v. (sabaveeni) või i.p.; vastavalt raviskeemile.

Loomad surmatakse üldanesteesias (i) märkega kandja kasutamisel erinevatel ajahetkedel (1 tund kuni 2 ööpäeva) pärast kandja manustamist tuumoriga loomadele, (ii) tuumoriga loomadel ravielemendiga kandja kasutamisel toksikoloogilise *cut-off* läve ületamisel (kaalukadu või neuroloogiliste sümptomite teke), (iii) tuumoriga nullravi

kontroll-loomadel toksikoloogilise *cut-off* läve ületamisel (kaalukadu või neuroloogiliste sümptomite teke).

Märgistatud testainete manustamise järel määratakse ainete lokalisatsioon looma erinevates kudedes erinevatel ajapunktidel pärast manustamist ja erinevatel manustamisviisidel. Ravimiga seotud kandja puhul määratakse ravimi (tuumorivastane) efektiivsus võrrelduna mitteseotud ravimi ekvivalentannusega.

Samaaegselt kogutakse koeproovid toksikoloogilise hindamise jaoks. Selleks on maksa, neerude, kopsu ja põrna histoloogiline analüüs (H&E värving, patoloogi hinnang), põrna kaal, interleukiinide (IL1b, TNFa) tase verest, vere keemilised näitajad (leukotsüüdid, CRP, ALT/AST, kreatiniin). Üldtoksikoloogilised näitajad määratakse „*General clinical state*“ skooriga (hinnatakse selliseid üldiseid parameetreid nagu kaal, liikumine/letargia, kõhulahtisus, karvkatte välimus ja silmade suletus).

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

/allkirjastatud digitaalselt/  
Sulev Kõks  
Komisjoni esimees

## TÄNUSÕNAD

Eelkõige soovin tänada oma juhendajat Kaido Kurrikoffi kannatlikkuse, abivalmiduse, alati toetava suhtumise ning väga professionaalse juhendamise eest.

Samuti olen tänulik professor Ülo Langelile konstruktiivsete nõuannete ja toetava suhtumise eest.

Täna kogu meie uurimisgruppi abivalmiduse ja väga meeldiva töökeskkonna loomise eest, eriti Kadi-Liis Veimani, kelle igakülgne toetus ja asjakohased nõuanded aitasid palju kaasa antud magistritöö valmimisele.

Lisaks soovin tänada Reet Kurge ja Eve Toomsood nõuandmise eest voolutsütomeetria läbiviimisel.

## LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kristina Kiisholts

*(autori nimi)*

(sünnikuupäev:19.10 1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
PepFect6 poolt vahendatud RNA interferents *in vitro* ja *in vivo* mudelites,

*(lõputöö pealkiri)*

mille juhendaja on Kaido Kurrikoff,

*(juhendaja nimi)*

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05 2014 *(kuupäev)*