

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOGIA INSTITUUT

Riin Subi

Tuumori sfääride dissotseerimise protokollide optimeerimine läbivoolutsütomeetria jaoks ning transfektsiooni edukuse hindamine 3D mudelis nii kvalitatiivselt kui ka kvantitatiivselt

Bakalaureusetöö

Juhendajad:

MSc Kristina Kiisholts

PhD Kaido Kurrikoff

TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Sfäärid kasvajamudelina.....	6
1.2. Geeniteraapia	7
1.3. Transportvektorid	8
1.4. Rakku sisenevad peptiidid.....	9
1.4.1. PepFectid	9
1.4.2. NickFectid	10
1.5. Plasmiidse DNA kasutamine geeniteraapias	11
1.6. Reportersüsteemid	12
1.6.1. Lutsiferaasil põhinevad reportersüsteemid.....	12
1.6.2. Fluorestsentsil põhinevad	13
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	14
2.1. Töö eesmärgid	14
2.2. Materjalid ja meetodika.....	14
2.2.1. Eksperimendis kasutatud rakuliinid	14
2.2.2. Sfääride moodustumine	14
2.2.3. Komplekside moodustamine ja transfektsioon 3D kultuuris.....	15
2.2.4. Lutsiferaasi induktsiooni hindamine sfäärides	15

2.2.5. Sfääride dissotseerimise protokollu optimeerimine	16
2.2.6. Transfekteeritud sfäärude analüüs läbivoolutsütomeetriaga	18
2.2.7. Konfokaalmikroskoopia	19
2.3. Tulemused ja arutelu	20
2.3.1. PepFectide ja NickFectide transfektsiooni efektiivsus sfäärides.....	20
2.3.2. Sfäärude dissotseerimise protokollu optimeerimise tulemused	21
2.3.3. Tranfekteeritud sfäärude analüüs läbivoolutsütomeetriaga.....	24
2.3.4. Transfektsiooni efektiivsuse hindamine kvalitatiivselt	25
KOKKUVÕTE	29
SUMMARY	30
KIRJANDUSE LOETELU.....	31
TÄNUSÕNAD	34
LIHTLITSENTS.....	35

KASUTATUD LÜHENDID

2D	2-dimensionaalne
3D	3-dimensionaalne
CDB	(<i>Cell Dissociation Buffer</i>) rakkude dissotseerimise puhver
CPP	(<i>cell-penetrating peptide</i>) rakku sisenev peptiid
CR	(<i>charge ratio</i>) laengute suhe
DMEM	(<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>), laialdaselt kasutatav rakukultuuri sööde
EGFP	(<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>) võimendatud roheliselt fluorestseeruv valk
DsRed	(<i>Discosoma Red Fluorescent Protein</i>) <i>Discosoma</i> punaselt fluorestseeruv valk
FBS	(<i>fetal bovine serum</i>) veise looteseerum
GFP	(<i>Green Fluorescent Protein</i>) roheliselt fluorestseeruv valk
MCTS	(<i>multicellular tumour spheroids</i>) mitmerakulised tuumori sfäärid
MQ	deioniseeritud vesi
NF	NickFect tehnoloogia, klass transportaan 10-1 põhinevad CPPsid
NF51	NickFect51
NF55	NickFect55
pDNA	plasmiidne DNA
PF	PepFect tehnoloogia, klass transportaan 10-1 põhinevaid CPPsid
PF14	PepFect14
PF6	PepFect6
QN	(<i>chloroquine</i>) klorokviin
siRNA	(<i>small interfering RNA</i>) väike interfereeruv RNA
TP10	transportaan 10
UT	(<i>untreated</i>) töötlemata rakud

SISSEJUHATUS

Kasvajate rakendamisel uurimistöös ning ravimite testimisel on oluline relevantsete mudelite olemasolu. Pikka aega kasutuses olnud kahedimensionaalne (2D) mudel kasvab harilikus koekultuuris ühekihiliselt, kuid organismis on kasvajate puhul olukord hoopis teistsugune. Nimelt toimub organismis kasvajarakkude paljunedes rakkude kogumike moodustumine. Rakkude omavaheline tihe kontakt muudab transfektsiooni abil ravimimolekulide transportimise kasvajatesse keerulisemaks. Tuumoriravis on äärmiselt oluline efektiivne transfektsioon näiteks kasvajarakkude jagunemise pidurdamiseks ja apoptoosi indutseerimiseks.

Selleks, et huvipakkuvad ravimikandidaadid jõuaksid sihtkohta (antud juhul kasvajatesse), on oluline madalat toksilist efekti ja suurt transfektsiooni efektiivsust põhjustavate transportvektorite kasutamine ravimolekulide transpordil. Antud töös on kasutamiseks valitud juba eelnevalt kõrget efektiivsust näidanud rakku sisenevad peptiidid.

Järjest enam on kasutust leidnud *in vitro* kolmedimensionaalsed (3D) mudelid, näiteks mitmerakulised tuumori sfäärid, mis sarnanevad nii oma morfoloogialt kui talituslikelt iseärasustelt elusorganismis paiknevate kasvajatega. Sfääride puhul on esindatud kasvajatele omane ruumilisus kui ka keemiliste gradientide teke sfääri erinevate piirkondade vahel.

Antud töö eesmärgiks on mitmerakuliste tuumori sfääride dissotseerimise protokollide optimeerimine edasiseks efektiivseks uurimistööks, et hinnata transfekteeritud rakkude hulka sfäärides. Lisaks transfektsiooni efektiivsuse hindamisele sooviti ka visualiseerida piirkondi/rakke, kuhu lastmolekulid sisenesid.

Antud uurimistöö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.

Märksõnad: rakku sisenevad peptiidid, transfektsioon, 3D rakukultuurid, mitmerakulised tuumori sfäärid (MCTS).

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Sfäärid kasvajakudena

Teadmised rakkude funktsioneerimisest, nagu migreerumine ja diferentseerumine, pärinevad kahedimensionaalse (2D) rakukultuuriga tehtud uurimustest, kus rakud kinnituvad koekultuuriplaatidele (Baker ja Chen, 2012). Kunstlikud süsteemid, kus rakkudele võimaldati optimaalsed kasvutingimused, võeti kasutusele juba 20. sajandi alguses (Carlos Omar Rodríguez-Hernández, 2014).¹

Meie peamised teadmised füsioloogiast, biokeemiast, rakubioloogiast ja geneetikast on samuti kirjeldatud, kasutades ühekihilisi ehk kahedimensionaalseid (2D) rakukultuure. Organismidele on ruumiline struktuur funktsioneerimise jaoks hädavajalik, mistõttu ei ole piisav toetuda ainult ühekihilisest rakukultuurist saadud teadmistele. Erinevused kahe- (2D) ja kolmedimensionaalsete (3D) kultuuride vahel ilmnevad rakkude omavahelises suhtlemises ja kontaktide loomises. 3D mudelid sarnanevad rohkem koega kui ühekihiline rakukultuur. (Page *et al.*, 2013)²

Mitmerakulised tuumori sfäärid (MCTS- *multicellular tumour spheroids*) on 3D mudel, mis omadustelt sarnaneb rohkem *in vivo* katseloomamudelitega kui 2D mudel ning see võimaldab *in vitro* katseid läbi viia ruumilistel agregaatidel (Friedrich *et al.*, 2009). Sfäärilaadsete mudelite ühiseks jooneks võib pidada nende kõigi ümarat kuju ja võimalust neid säilitada mittekinnituvate kultuuridena (Weiswald *et al.*, 2015). Viimane võimaldab tänu rakkude tihedale agregeerumisele taastada algupärasele koele omast funktsiooni ja füsioloogiat (Baker ja Chen, 2012). Sfäärilise laialdasem kasutamine võimaldaks vähendada loomkatsete hulka, elimineerides väheefektiivsed ravimikandidaadid juba *in vitro* tasemel ja teostada laiaulatuslikke ravimi-skriinimisi (Friedrich *et al.*, 2009).

Piiratud difusioon, mis kasvajates takistab hapniku, toitainete, metaboliitide ning signaliseerivate molekulide levikut, ei ole tavalises 2D kultuuris esindatud. Keemilised gradiendid tekivad, kuna rakkudevahelised ning rakkude- ja maatriksivahelised interaktsioonid

¹ Kui punkt on lisatud peale sulgudes olevat viidet kehtib see vaid antud lause kohta. Nt: (Viide).

² Kui punkt on lisatud enne sulgudes olevat viidet, siis kehtib see kogu eesoleva lõigu kohta. Nt: (Viide)

mõjutavad nii rakkude struktuuri, adhesiooni, geneetilise materjali ülekandumist kui ka signaliseerimise vastuseid lahustuvatele faktoritele. Kõik nimetatud aspektid reguleerivad ka raku funktsioneerimist üldiselt, mis on 2D süsteemides erinevad kui 3D süsteemides. Ruumilisus võimaldab *in vivo* mudelitele omaste heterogeensete omaduste jäljendamist. (Weiswald *et al.*, 2015)

Kui hapniku jõudmine kudedesse on pärsitud, tekib keemilistest gradientidest põhjustatuna tsonaalsus. Kasvajatel on fenotüübilistes tsoonides esindatud erinevad rakutüübid. Tsonaalsus on oluline ravivastusel, kuna enamikke ravimeid viiakse sihtkohta veresoonte vahendusel. (Thoma *et al.*, 2014)

Eelnevast johtudes on vähirakkude uurimisel asjakohasemaks mudeliks 3D kultuurid, mis omavad vahepealset keerukust võrreldes 2D rakukultuuri ja loomamudeliga. Samuti sarnanevad rakkudevahelised interaktsioonid ja diferentseerumise mustrid 3D mudelites oluliselt rohkem kasvajakoes toimuvaga. (Friedrich *et al.*, 2009)

1.2. Geeniteraapia

1970. aastatel tekkis geeniteraapia mõiste ja antud metoodika eesmärk oli jõuda eluohtlike päritavate geneetiliste haiguste ravini, nagu tsüstiline fibroos, autoimmuunhaigused ja erinevat tüüpi vähid (Kane *et al.*, 2015). Geeniteraapia rakendustega on võimalik vigase geeni parandamine, puuduva geeni indutseerimine või üleekspresseeritud geeni vaigistamine. Eesmärgiks on ravida või leevendada päritavaid haigusi, modifitseerides geneetiliselt patsiendi rakke ja muutes geeniekspressiooni tasemeid (Amer, 2014). Geeniteraapia meetoditega uuritakse näiteks vähkkasvajate regulaatormehhanisme ja püütakse kasvajaid ka ravida, pidurdades vähirakkude kasvu ja suunates neid apoptoosi (Goverdhana *et al.*, 2005).

Vähkmudeli puhul on oluline transportida funktsionaalne geen neoplaasidesse ehk piirkondadesse, kus rakud on ebanormaalses kasvuprotsessis, et taastada rakkude algne funktsioon ja pidurdada kasvajatele omast kontrollimatut kasvu. Nukleiinhapete sisestamiseks vähivastases geeniteraapias kasutatakse sageli transfektsiooni (Kane *et al.*, 2015). Transfektisoon on protsess, mille käigus transporditakse nukleiinhapped rakku, et saada geneetiliselt modifitseeritud rakud, mida on võimalik kasutada geenide funktsiooni, regulatsiooni või valgu tootmise uurimiseks (Kim ja Eberwine, 2010).

Geenide modifitseerimine kasvajates võib parandada nende vastust teraapiale ning reguleerida tekkivat immuunvastust. Sõltuvalt geeniekspressiooni intensiivsusest kasvajarakkudes võib see viia kasvajarakkude surmani ja tuumorite nekroosini. Siiski on näidatud, et madalate kõrvalefektidega on õnnestunud vaid tagasihoidlike tulemusi saavutada, (Amer, 2014) mistõttu on oluline, et geeniteraapia alased uuringud jätkuksid, leidmaks madala toksilisusega efektiivseid võimalusi.

Erinevate vähivastaste teraapiate (kemoterapia ja kiiritus) omavaheline kombineerimine geeniteraapiaga suurendab vähivastast efektiivsust, kuid normaalne kude jääb teraapia eest kaitstuks (Amer, 2014). Eeldatavasti on tulevikus vähivastasel võitlusel kasutatud kombineeritud ravi, mis sisaldab nii kirurgilist sekkumist, kemoterapiat, kiiritust kui ka geeniteraapiat (Amer, 2014). Selleks, et transportida geneetiline materjal patoloogilisse piirkonda organismis, kasutatakse transportvektoreid (Kane *et al.*, 2015).

1.3. Transportvektorid

Oma negatiivse laengu tõttu ei suuda geeniteraapia molekulid, DNA ja RNA, iseseisvalt rakkudesse siseneda, mistõttu on vajalik efektiivsete transportvektorite kasutamine ning nende puudumine on peamiseks takistuseks geeniteraapia jõudmisel kliinilistesse rakendustesse (Trabulo *et al.*, 2010). Geeniteraapia rakendamiseks kasutatakse geneetilise materjali sisestamiseks peremeesrakku viiruslike ja mitteviiruslike transportvektoreid (Amer, 2014).

Geneetilise materjali sisestamiseks on efektiivsed viiruslikud vektorid, mis seonduvad sihtmärkrakkude külge ja sisestavad geneetilise materjali ja seejärel toodetakse vajalikud geeniproduktid kasutades raku transkriptsiooni- ja translatsioonimehhanisme. Samuti on viiruslike transportvektorite puhul näidatud pikaajalist geeniekspressiooni. (Amer, 2014)

Kõigi viiruslike vektorite genome on enne kasutamist modifitseeritud, et muuta neid ohutumaks. Sellest hoolimata on viiruslike vektorite puuduseks potentsiaalselt immuunvastuse esilekutsumine ja toksiinide tootmine peremeesorganismides, samuti on piiratud lastmolekuli suurus, mida on antud meetodiga võimalik transportida. (Nayerossadat *et al.*, 2012)

Mitteviiruslikud vektorid on viiruslikele sobivaks alternatiiviks, lastmolekulide transportimiseks moodustatakse nendega nanosuuruses partiklid, mida on võimalik kergesti modifitseerida (Amer, 2014). On näidatud, et mitteviiruslikud vektorid ei põhjusta infektsioone

ja ei ole immunogeensed (Jovčevska *et al.*, 2013). Mitteviiruslike vektorite puudus on madalam transfektsiooni efektiivsus, võrreldes viiruslike vektoritega (Amer, 2014).

Olemasolevate vektorite efektiivsemaks muutmiseks on vaja (Nayerossadat *et al.*, 2012):

1. parandada märklaud-raku äratundmist ja rakuvälist transporti
2. parandada rakusisest transporti ja pikendada ekspresseerumise aega
3. vähendada toksilisust ja kõrvaltoimeid organismis

1.4. Rakku sisenevad peptiidid

Rakku sisenevad peptiidid (CPP - *cell penetrating peptide*) on võimelised siduma enda külge erinevaid lastmolekule, nagu DNA ja RNA, kas kovalentselt või mittekovalentselt. Moodustunud kompleksid suudavad rakumembraane läbida neid kahjustamata. Valdavalt on tegemist umbes 20 aminohappeliste järjestustega, mis omavad positiivset laengut (põhjustatud lüsiinist ja arginiinist). Enamuse CPPde puuduseks on mitteselektiivne sisenemine, kuid kuna peptiidid on keemiliselt lihtsalt ja mitmekesiselt modifitseeritavad (erinevalt näiteks katioonsetest polümeeridest), rakendatakse sageli selektiivselt sihtmärgile seondumist võimaldavate molekulide kinnitamist CPPdele. (Copolovici *et al.*, 2014)

Peamiseks CPP ja nukleiinhappe komplekside rakku sisenemise viisiks peetakse endosomaalset sisenemist, millele peab bioloogilise efekti avaldamiseks järgnema ka endosomaalne vabanemine. Lastmolekuli tsütosooli vabanemiseks peavad partikli komponendid esmalt üksteisest eralduma. (Copolovici *et al.*, 2014) PepFectid ja NickFectid on sagedasti kasutatavad ja suurt efektiivsust näidanud rakku sisenevad peptiidid.

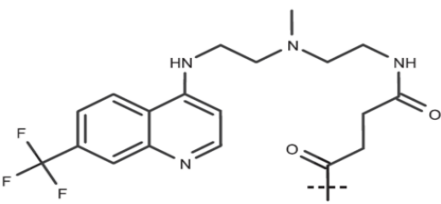
1.4.1. PepFectid

PepFectide (PF) perekonna puhul on tegemist transportaan 10 (TP10) analoogidega. TP10 (järjestus toodud tabelis 1) on kaheosaline peptiid, mille N-terminaalne osa pärineb galaniinist ja C-terminaalne osa mastoparaanist (Fanghänel *et al.*, 2014). PepFectide perekonna disainimise eesmärk oli parandada CPPde võimet transportida mittekovalentselt seotud nukleiinhappeid läbi raku plasmamembraani (Andaloussi *et al.*, 2011). N-terminaalsesse osasse lisati stearhappe jääk (steraüül), mis suurendas nukleiinhapete rakkudesse transportimise efektiivsust, parandades molekulide võimet läbida lipiidset kaksikkihti (Andaloussi *et al.*, 2011).

PF6 (järjestus toodud tabelis 1) arendamise eesmärgiks oli luua vektor siRNA (*small interfering RNA* ehk väike interfereeruv RNA) transportimiseks. Spetsiifilise lisamodifikatsioonina kasutati seitsmendas positsioonis olevale lüsiinile lüsiinipuu lisamist, mille küljes oli neli klorokviini analoogi, mille eesmärk oli soodustada endosomaalset vabanemist. (Andaloussi *et al.*, 2011)

PF14 (järjestus toodud tabelis 1) nähti olulise vahendina splaissingut korrigeerivate oligonukleotiidide transportimisel. Lisaks stearüüli lisamisele TP10 järjestusele (järjestus toodud tabelis 1) asendati lüsiinid ja isoleutsiinid vastavalt ornitiinide ja leutsiinidega. Asenduseks valiti ornitiinid, kuna need on võrreldes lüsiinidega näidanud 10 korda efektiivsemat transfektsiooni. Ornitiinide efektiivsus on seotud suurema afiinsusega DNA suhtes ja võimega moodustada madalamatel kontsentratsioonidel stabiilsemaid komplekse. Kuna ornitiin ei ole standardne aminohape, võiks ta olla vähem tundlik seerumi proteaaside toimele, säilitades aktiivsuse ka seerumit sisaldavas keskkonnas. (Ezzat *et al.*, 2011)

Tabel 1. PepFect perekonna (PF6 ja PF14) ning nende eellasmolekuli transportaan 10 järjestused.

Transportaan 10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
PepFect6	Stearüül-AGYLLGK(εNHK(2QN)K(2QN)*INLKALAALAKKIL-NH ₂
PepFect14	Stearüül- AGYLLGKLLLOOLAAAALLOOLL-NH ₂
QN – klorokviin	

1.4.2. NickFectid

NickFectide puhul on samuti tegemist TP10 analoogidega. Antud perekonna disainimisel kasutati hargnevat struktuuri, mille puhul on näidatud samuti efektiivset transfektsiooni nukleiinhapete rakkudesse viimisel. (Arukuusk *et al.*, 2013)

NF51 (järjestus toodud tabelis 2) disainimisel püüti suurendada endosmaalset vabanemist, modifitseerides seitsmendas positsioonis olevat lüsiini, mis on TP10-s ühenduslüliks galaniini

ja mastoparaani jääkide vahel. NF51 saamiseks asendati seitsmendas positsioonis olev lüsiin ornitiiniga ja seejärel jätkati sünteesi, sidudes kuuendas positsioonis olev glütsiin ornitiini gamma aminorühmaga. Antud modifikatsioonide tulemusel tekkis hargnemine. (Arukuusk *et al.*, 2013)

NF55 (järjestus toodud tabelis 2) puhul on eemaldatud üks positiivne laeng, asendades lüsiinalaniiniga. Antud modifikatsioon peaks peptiidi muutma amfipaatsemaks ja seeläbi suurendama interaktsioone endosoomide membraanidega, et parandada endosomaalse vabanemise efektiivsust veelgi (avaldamata andmed).

Tabel 2. NickFect perekonna (NF51 ja NF55) ning nende eellasmolekuli transportaan 10 järjestused.

Transportaan 10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
NF51	(Stearüül-AGYLLG)δ-OINLKALAALAKKIL-NH ₂
NF55	(Stearüül-AGYLLG)δ-OINLKALAALAKAIL-NH ₂

1.5. Plasmiidse DNA kasutamine geeniteraapias

Plasmiidne DNA (pDNA) on tsirkulaarne kaheahelaline bakteriaalset päritolu kromosoomiväline DNA molekul (Yin *et al.*, 2014). Biotehnoloogiliselt võib pDNA-d kasutada ka ekspressioonivektorina, mis on disainitud, optimeerimaks geenide avaldumist transkriptsiooni tasemel (Heinaru, 2012). Plasmiidid on kuni 200 kb suurused ja nendes on võimalik kloneerida kuni 10 kb suuruseid DNA fragmente (Heinaru, 2012). Ekspressiooni võib kirjeldada nii transkriptsiooni kui ka translatsiooni tasemel. Plasmiidid, millel on rakuspetsiifilised promootorid, on võimelised avalduma ainult konkreetsetes rakkudes (Dean, 2013). Samuti on plasmiidid ohutud geenide transportimiseks *in vivo* rakendustes (Su *et al.*, 2012), mistõttu võivad antud ekspressioonivektorid sobida kliinilistesse rakendustesse.

Plasmiidid on laialt kasutusel ekspressionivektoritena, kuna nad suudavad replitseeruda, kasutades raku mehhanisme, on stabiilsed ja funktsionaalsed mitmetes liikides. Plasmiidide kasutatakse, et uurida geenide funktsioone, promootoreid, väikesi RNAsid või teisi geneetilisi elemente. (Kaufman, 2000)

Plasmiidse DNA rakendamisel geeniteraapias on potentsiaalseks ohuks geneetilise materjali degradeerumine endonukleasidest poolt rakuvälises ruumis, mistõttu on vajalik pDNA kompleksidesse kondenseerimine. pDNA kasutamise edukus sõltub komplekside sisenemise hulgast, komponentide endosoomidest vabanemisest ja plasmiidse DNA jõudmisest tuuma. (Adijanto ja Naash)

1.6. Reportersüsteemid

Reportegeenideks valitakse geenid, mis suudavad organismides ekspresseeruda ja mille produkte on kerge tuvastada ja mõõta. Reporterite peamiseks rakendusteks on geeniekspressiooni tasemete jälgimine, valkude ja rakkude vaheliste interaktsioonide uurimine, transfektsiooni efektiivsuse hindamine või rakkude normaalse või ebanormaalse arengu jälgimine. (Vandsburger *et al.*, 2013)

Reportersüsteemide rakendamiseks on vaja geneetiline materjal sisestada sihtmärk-rakkudesse, kus geen peab jõudma tuuma, et tagada reportergeeni avaldumine või tsütoplasmasse, et vaigistada reportergeeni transkriptsioon, mis võimaldab hinnata reportervalgu sisaldust valgu aktiivsuse järgi või reportersignaali visualiseerides. (Hyewon ja June-Key, 2013)

Reportersüsteemid on kasutusel nii *in vitro* kui ka *in vivo* rakendustes, et uurida transkriptsioonifaktoreid, mikroRNA protsessimist, mürkide rakusisest paiknemist, translatsiooni kui ka promotoreid. Samuti on reportersüsteemid kasutusel valkude omavaheliste interaktsioonide ja transfektsiooni efektiivsuse hindamiseks. Molekulaarne kuvamine erinevate reportergeenidega võimaldab huvipakkuva protsessi jälgimist (eksogeenselt ja/või endogeenselt) ja mitmete rakusiseste bioloogiliste fenomenide jälgimist. (Lee *et al.*, 2015)

1.6.1. Lutsiferaasil põhinevad reportersüsteemid

Lutsiferaas on sagedasti kasutatav jaanimardikast (*Photinus pyralis*) pärinev ensüüm, mida on võimalik kasutada reportersüsteemina. Ensümaatilise aktiivsuse kaudu luminesentsi mõõtmine on tundlik, kuna piisab väikesest hulgast reporterensüümi hulgast, et tekitada mõõdetav hulk reaktsiooni produkte. (Allard ja Kevin, 2008) Lutsiferaasil baseeruvaid süsteeme kasutatakse näiteks lastmolekulide sihtkoha määramiseks, ekspresiooni kontrollimiseks ja promotorige transkriptsioonilise aktiivsuse mõõtmiseks (Brogan *et al.*, 2012).

Jaanimardikast pärinev lutsiferiin aktiveeritakse ATPd kasutades. Saadud oksülutsiferiini reageerimisel molekulaarse hapnikuga saadakse ergastatud oksülutsiferiin ja CO₂. Kui oksülutsiferiin jõuab tagasi oma energeetilisele baastasemele, siis selle tulemusel eraldub valgus. (Gehrig *et al.*, 2014)

Lutsiferaasil põhinevad süsteemid on väga tundlikud, kuna tekkiv taust süsteemis on väga madal ning isegi väga väikese koguse lutsiferaasi aktiivsuse detekteerimine on võimalik. Suur tundlikkus ei anna aga eelist mikroskoopilisteks analüüsimisteks, kuna tehniliselt ei saa mikroskoopias lutsiferaasi mõõta (tavapärastelt kättesaadavate laboriseadmetega). (Lee *et al.*, 2015)

1.6.2. Fluorestsentsil põhinevad

Fluorestsentsi kuvamisel kasutatakse fluorofore ehk fluorestseeruvaid valke, mida ergastatakse välise valgusallikaga. Kõige sagedamini kasutatav on roheliselt fluorestseeruv valk (GFP - *Green Fluorescent Protein*), mis on isoleeritud millimallikast (*Aequorea Victoriast*). EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) on modifikatsioon, mis kujutab endast võimendatud algupärast GFPd. Fluorestseeruvad reporterid on eriti head kvalitatiivseks mikroskoopiliseks hindamiseks. Nende eeliseks (luminesseeruvate ees) on näiteks histoloogiliste lähenemiste kasutamise võimalus, sest suhteliselt lihtsa aparatuuriga saab nende paiknemist mikroskoopia abil jälgida. Mikroskoopiline kuvamine võimaldab tuvastada signaali olemasolu üksiku raku tasandil või isegi subtsellulaarset paiknemist. Fluorestsentsi mõõtmisel tuleb alati arvesse võtta tugevama tausta olemasolu, mis summaarselt vähendab signaali tugevust ning signaali eristamine taustast ei pruugi iga kord olla selge. (Cinelli *et al.*, 2000)

Esimene punaselt fluorestseeruv valk oli DsRed, mis eraldati *Discosoma sp* (Shaner *et al.*, 2004). mCherry on DsRed derivaat, mis sobib üksikute rakkude kuvamiseks ja samuti *in vivo* rakendusteks (Seefeldt *et al.*, 2008). Punaselt fluorestseeruvate valkude eelis roheliselt fluorestseeruvate valkude ees *in vivo* rakendustes seisneb pikemas lainepikkuses, mille tõttu suudavad punaselt fluorestseeruvad valgud läbi kudede efektiivsemalt penetreeruda (Yamaoka *et al.*, 2010).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

- töötada välja sfääride dissotseerimise protokoll üherakulise suspensiooni saamiseks
- transfektsiooni efektiivsuse hindamine 3D rakukultuurides kvalitatiivselt
- transfektsiooni efektiivsuse hindamine 3D rakukultuurides kvantitatiivselt

2.2. Materjalid ja meetodika

Kõik katsed (peale peptiidisünteesi ja sfääride dissotseerimine 100% trüpsiini osakaaluga) ja andmete analüüs on teostatud töö autori poolt.

2.2.1. Eksperimendis kasutatud rakuliinid

Kõikides eksperimentides kasutati U87 rakuliini, mis on inimese glioblastoomi rakuliin ja HT1080, mis on inimese fibrosarkoomi rakuliin. Rakke kasvatati L-glutamiini ja naatriumpüruvaati sisaldavas DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco™, Life Technologies, UK) söötmes, millele oli lisatud 10% veise looteseerumit FBS (*Fetal Bovine Serum Gold*, PAA Laboratories, Austria), 0,1 mmol/l asendatavaid aminohappeid (*MEM Non-Essential Amino Acids 100x Solution*, Corning, USA) ning 100U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (*Penicillin-Streptomycin 100x*, Sigma-Aldrich, Israel). Rakke kultiveeriti 5% CO₂ sisaldavas veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37°C. Rakkude pesemiseks kasutati 1x PBSi (Gibco by Life Technologies, UK) ja plaadi küljest lahtisaamiseks 0,25% trüpsiin-EDTAd (Gibco by Life Technologies, UK). Rakud külvati ümber 2-3 päeva järel. U87 rakkude külvamisel kaeti plaadid eelnevalt 0,1% želatiiniga (*Gelatin 0,1%*, Naxo OÜ, Eesti).

2.2.2. Sfääride moodustumine

Antud töös kasutati sfääride külvamiseks U-kujulise põhjaga 96-kaevulisi ehk 96W (W – well) plaate (Nunclon™ Sphera™ Microplates, Thermo Scientific™, Japan), mis on tootja poolt eelnevalt spetsiifiliselt töödeldud, et takistada rakkude kinnitumist plaadi põhjale. Sfääride moodustamiseks külvati igasse kaevu 2000 rakku 200 µl täissöötmes (kasutades samu kultiveerimistingimusi ja söödet, mis on välja toodud punktis 2.2.1). Sfääride kasvu jälgiti Nikon Eclipse TS100 valgusmikroskoobiga. Sfääridele kasvuks vajalikke ainete olemasolu tagamiseks vahetati söödet üle päeva. Täielik söötme eemaldamine võib sfääre kahjustada ja mõjutada tulemuste usaldusväärsust, seetõttu vahetati korruga 50% söötmetest (100 µl). Sfääride

optimaalseks kasutamise suuruseks peetakse 400 µm, mis saavutatakse eelkirjeldatud tingimusi täites neljandal päeval peale külvamist (Friedrich *et al.*, 2009).

2.2.3. Komplekside moodustamine ja transfektsioon 3D kultuuris

Negatiivselt laetud pDNA ja positiivselt laetud CPP vahel moodustuvad mittekovalentsed kompleksid tänu elektrostaatilistele ja hüdrofoobsetele interaktsioonidele (Copolovici *et al.*, 2014). Varasemalt on näidatud komplekside moodustumist ja kõrget transfektsiooni efektiivsust 2D mudelitel antud töös kasutatud CPPdega: PF6 (Andaloussi *et al.*, 2011), PF14 (Ezzat *et al.*, 2011), NF51 (Arukuusk *et al.*, 2013) ja NF55 (avaldamata andmed). Kõik töös kasutatud peptiidid on sünteesitud TÜTI molekulaarse biotehnoloogia laboratooriumis.

Komplekside moodustamiseks kasutati peptiide PF6, PF14, NF51 ja NF55 ja vastavalt katsele sobivat plasmidi: pGL3/pmCherry/pEGFP. Kõikide eksperimentide puhul kasutati peptiidi ja nukleiinhappe laengute suhet 4 ehk CR4 (CR – *charge ratio*), mis arvutati, võttes arvesse peptiidide positiivseid laenguid ja pDNA negatiivset laengut. Komplekside moodustamiseks inkubeeriti segu 45 minutit toatemperatuuril. Enne sfääridele kompleksidele pealekandmist asendati pool söödet (100 µl) värske täissöötmega. Komplekse lisati sfääridele 50 µl, saades lõppruumalaks 250 µl. Antud ruumalaks oli lisatud plasmidi lõppkontsentratsioon 0,0021 mg/ml ja peptiidide lõppkontsentratsioonid PF6 4,2 µM, PF14 2,56 µM, NF51 6,4 µM ja NF55 8,4 µM.

2.2.4. Lutsiferaasi induktsiooni hindamine sfäärides

Peptiidide transfektsiooni efektiivsuse hindamiseks kasutati lutsiferaasanalüüsi, mis võimaldab hinnata summaarset transfektsioonimäära kogu sfääris. Sfäärid U87 ja HT1080 rakuliinidest külvati, nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.2. Kompleksid moodustati ja transfektsioon teostati, nagu on kirjeldatud punktis 2.2.3, kasutades pGL3, mis on lutsiferaasi ekspresseeriv plasmiidne DNA. Sfääride lüüsimiseks 24 h pärast pesti neid 1x PBSiga üks kord ja seejärel lisati Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) lahust PBSis, et tekkiva lahuse lõppkontsentratsioon oleks 0,1%. Antud proove inkubeeriti 4°C juures 30 minutit. Sfääride lüüsimiseks oli vajalik ka nende mehaaniline mõjutamine, mis saavutati suspendeerimisega, surudes pipetiotsa vastu kaevu põhja. Saadud lüsaadist määrati lutsiferaasi ja valgu kontsentratsioonid. Lutsiferaasi mõõtmiseks kanti igat proovi valgele 96W plaadile (PerkinElmer, USA) 20µl, millele lisati 80µl lutsiferaasi substraati lutsiferiini (Promega, Rootsi). Lutsiferaasi aktiivsust mõõdeti, kasutades GLOMAX 96 mikroplaat luminomeetrit (Promega, Rootsi). Kogu valgu kontsentratsiooni

mõõtmiseks kasutati Bio-Rad DC™ (USA) reagente vastavalt tootja protokollile. Seejärel normaliseeriti lutsiferaasi mõõtmise tulemused kogu valgu mõõtmise tulemustega, kasutades selleks tabelitöötlusprogrammi Microsoft Office Excel ja Prism GraphPad. Katset teostati nii U87 kui ka HT1080 rakuliiniga kahel korral, kasutades 10-15 sfääri grupis.

2.2.5. Sfääride dissotseerimise protokoll optimeerimine

Transfektsiooni efektiivsuse hindamiseks sfääridest on sobiv meetod läbivoolutsütomeetria, mille rakendamiseks on vajalik üherakulise suspensiooni saamine, kuna rakuklombid võivad kergesti ummistada voolutsütomeetria aparadi (Mahabadi *et al.*, 2015). Kuna eelnevalt on TÜTI molekulaarse biotehnoloogia laboris sfääride dissotseerimisel saadud tervete rakkude osakaaluks vaid 34% (avaldamata andmed), on tõhusama protokoll arendamine edasiseks efektiivseks uurimistööks väga vajalik, et oleks võimalik õigesti hinnata transfekteritud rakkude hulka sfääris. Nimetatud protsent (34%) võeti ka antud töö alguspunktiks ehk töö eesmärgiks on antud protsenti võimalikult palju suurendada.

Sfäärid külvati nagu on kirjeldatud punktis 2.2.2 ja kasutati dissotseerimiseks 5. päeval. Antud katses sfääre ei transfekteritud, vaid mõõdeti ainult tervete rakkude hulka proovis, varieerides erinevaid dissotseerimise parameetreid. Läbivoolutsütomeetria analüüsiks ei piisa vaid ühes sfääris olevatest rakkudest, seega kasutati igas grupis 30-32 sfääri, mis ükshaaval kokku koguti. Kõiki reagente hoiti enne kasutamist 37°C juures. Andmete analüüsiks kasutati Microsoft Office Excel tabelitöötlusprogrammi ja Prism GraphPad.

Dissotseerimise eesmärgiks on saada üherakuline suspensioon, mida on edaspidiselt võimalik kasutada transfekteritud rakkude hulga mõõtmiseks läbivoolutsütomeetriaga. Dissotseerimise protokoll põhiasemad on toodud tabelis 3 ning erinevate töötluste varieerimine ja vastavate gruppide tähised on toodud tabelis 4.

Antud protokoll optimeerimisel varieeriti kolme aspekti:

1. trüpsiini ja CDB (*Cell Dissociation Buffer Enzyme Free PBS-Based*, Gibco by Life Technologies, UK) osakaale
2. trüpsiini ja CDB töötlus toatemperatuuril ja 37°C juures
3. lisaetapina 0,5 mM EDTA (etüleendiamiin tetraatsetaat) (AppliChem, Germany) lahuses inkubeerimist

Optimeerimise lihtsamaks mõistmiseks seletan lahti töötluste erinevused. Erinevate gruppide (toodud tabelis 4) puhul varieeriti töötlusti punktis 4 ja 5 ning nende kordusi. Esmalt koguti sfäärid kokku ja eemaldati sööde täielikult. Sfäärid pesti 5 ml 1x PBSiga, millele järgnes töötlus 1 ml dissotseerimislahusega, mille puhul inkubeeriti 3 minutit kas toatemperatuuril või 37°C juures. Sfääride dissotseerimiseks suspendeeriti pipetiotsa tugevasti vastu põhja surudes, kuni rakuagregaate enam visuaalselt näha ei olnud. Seejärel lisati saadud suspensioon 1x PBSile ja tsentrifuugiti 1000 x g, 10 min. Seejärel eemaldati supernatant peaaegu täielikult, jättes alles 500 µl 1x PBSi, milles võeti üles ka tekkinud sade. Antud suspensiooni analüüsiti, kasutades läbivoolutsütomeetria analüsaatorit BD LSRII (BD Biosciences, USA).

Grupp I on kasutatud 100% trüpsiini (37°C) osakaalu, inkubeerides proove toatemperatuuril (grupp I katse ei ole teostatud töö autori poolt). Saadud tulemus (34%) on võetud protokolliga optimeerimise algpunktiks (avaldamata andmed).

Gruppide II ja III puhul varieeriti trüpsiini ja CDB sisaldust. II grupis kasutati 25% trüpsiini ja 75% CDB osakaalu ning III grupis 75% trüpsiini ja 25% CDB osakaalu. Sfääre inkubeeriti 3 minutit toatemperatuuril, pärast mida suspendeeriti sfääre 10x pipetiotsa tugevalt vastu põhja surudes. Inkubeerimist ja suspendeerimist korrati 3 (x10) korda, et sfäärid täielikult dissotseeruks.

Gruppide IV ja V puhul varieeriti samuti trüpsiini ja CDB sisaldust. IV grupis kasutati 25% trüpsiini ja 75% CDB osakaalu ning V grupis 75% trüpsiini ja 25% CDB osakaalu. Antud gruppidega teostati dissotseerimislahuste inkubeerimist 37°C juures 3 minutit. Samuti suspendeeriti 10x pipetiotsa tugevalt vastu põhja surudes. Inkubeerimist ja suspendeerimist jätkati sfääride täieliku dissotseerumiseni korrates inkubeerimist ja suspendeerimist 2 (x10) korda.

Gruppide VI ja VII puhul inkubeeriti sfääre pärast pesu 1 ml 0,5 mM EDTA lahuses 37°C juures 20 minutit, mille järel EDTA eemaldati ja lisati vastava grupi pesuks mõeldud PBSile. Pärast seda kasutati grupp VI puhul 25% trüpsiini ja 75% CDB osakaalu ja grupp VII puhul 75% trüpsiini ja 25% CDB osakaalu. Antud gruppide puhul suspendeeriti sfääre mõned korrad dissotseerimise lahuses enne kui vastu põhja suspendeeriti. Gruppide VI ja VII puhul piisas kuuest korrast vastu põhja suspendeerimist, et sfäärid dissotseerida. Katset korrati U87 rakuliiniga 4 korda ja HT1080 rakuliiniga 3 korda.

Tabel 3. Dissotseerimise protokoll astmed.

1. Sfäärade kogumine 96W plaadilt
2. Söötme eemaldamine
3. 1x PBSiga pesu
4. Trüpsiin/CDB töötlus
5. Vastu põhja suspendeerimine
6. Üherakulise suspensiooni lisamine 1x PBSile
7. Tsentrifugimine 1000 x g, 10 min
8. Supernatandi eemaldamine
9. Sademe ülesvõtmine 1x PBSis
10. Läbivoolutsütomeetria analüüs

Tabel 4. Dissotseerimise töötluste erinevad grupid. Varieeriti trüpsiini ja CDB osakaale, temperatuuritöötlust ja EDTAs inkubeerimist.

Grupp	Trüpsiini osakaal	CDB osakaal	Temperatuuritöötlus (37°C, 3 min)	EDTA (0,5 mM, 37°C, 20 min)
I	100%	-	-	-
II	25%	75%	-	-
III	75%	25%	-	-
IV	25%	75%	+	-
V	75%	25%	+	-
VI	25%	75%	+	+
VII	75%	25%	+	+

2.2.6. Transfekteritud sfäärade analüüs läbivoolutsütomeetriaga

Sfäärid külvati, nagu on kirjeldatud punktis 2.2.2 ja kompleksid moodustati, kasutades pEGFPd, mis on EGFPd ekspresseeriv pDNA ja erinevaid peptiide (PF6, PF14, NF51, NF55). Nii komplekside moodustamine kui ka transfektsioon toimus, nagu on kirjeldatud punktis 2.2.3. Sfäärid transfekteriti neljandal ja dissotseeriti viiendal päeval, kasutades VII töötlusgruppi

(tabel 4). Kuna läbivoolutsütomeeter ei ole võimeline eristama pinnale seondunud ja rakkudesse sisenenud fluorofore, siis on äärmiselt oluline sfääride pesu vastavalt protokollile (tabelis 3) punktidele kolm ja kuus, et vältida ebakorrektsed tulemused. Transfekteeritud sfäärides ekspresseeritud EGFP ergastamiseks kasutati 488 nm laserit. Katset teostati ühel korral, kasutades igas grupis 30-32 sfääri.

2.2.7. Konfokaalmikroskoopia

Tegemaks kindlaks, millises piirkonnas on toimunud edukas transfektsioon *in vitro* sfääridesse, kasutati konfokaalmikroskoopiat. Eelnevalt olid sfäärid transfekteeritud pmCherry, mis on punast fluorestseerivat valku ekspresseeriv pDNA ja PF6/PF14/NF51/NF55 kompleksidega. Selleks külvati sfäärid nagu peatükis 2.2.2 ja kolmandal päeval transfekteeriti sfäärid vastavalt peatükile 2.2.3. Neljandal päeval pesti sfäärid 1x PBSiga ja värviti tuumad rakumembraani läbiva fluorestseeruva värviga Hoechst 33342 (Invitrogen, UK) lõppkontsentratsiooniga 5 µg/ml. Värvimiseks inkubeeriti sfääre värvi sisaldava PBSiga 37°C juures rakukultuuri inkubaatoris 40 minutit. Pärast seda pesti sfääre veel 2 korda 1x 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% CO₂ juures. Visualiseerimiseks kasutati tavavalgust, ergastamiseks pmCherry puhul 633 nm ja Hoechst värvi puhul 405 nm laserit. Katset korrati U87 rakuliiniga viis korda ja HT1080 rakuliiniga kaks korda.

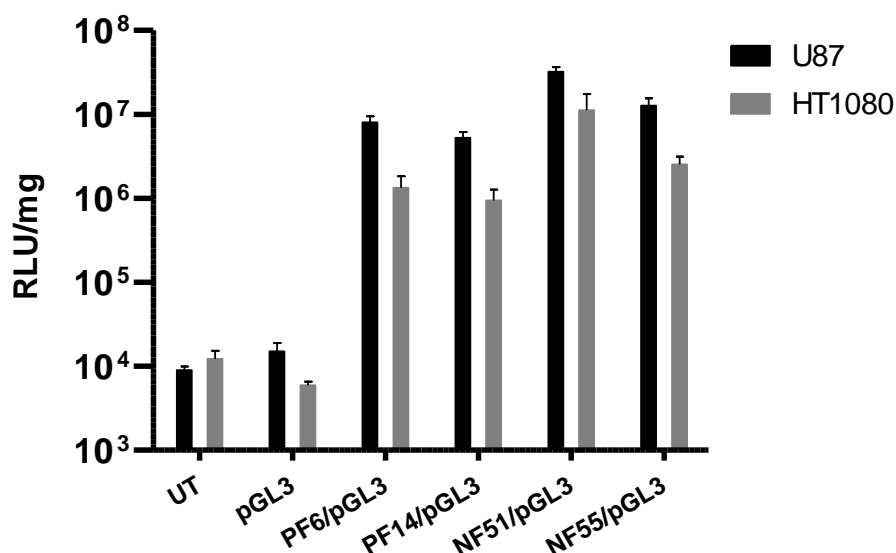
2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. PepFectide ja NickFectide transfektsiooni efektiivsus sfäärides

Transfektsiooni efektiivsuse hindamiseks kasutati lutsiferaasi reportersüsteemi. Katse eesmärk oli võrrelda erinevate peptiidide (PF6, PF14, NF51 ja NF55) transfektsiooni efektiivsust, võttes arvesse kogu sfäär (mõõdeti summaarselt valgussignaali sfääri lüsaadist). Saadud tulemused normaliseeriti kogu valgu sisalduse vastu.

Joonis 1 põhjal saab öelda, et U87 ja HT1080 transfekteeerimise efektiivsus on olnud sarnane, kuigi U87 sfääride puhul veidi edukam.

Tegemist on kvantitatiivse katsega, millega hinnati summaarselt transfektsiooni hulka. Mõlema rakuliini puhul oli transfektsiooni efektiivsus sama peptiidi puhul küllaltki sarnane ning kõige efektiivsema antud tulemuste põhjal on NF51. Veidi vähem efektiivne oli transfektsioon NF55ga mõlema rakuliini puhul. PF6 ja PF14 transfektsiooni tasemed olid peaaegu võrdsed. Sõltuvalt kasutatava reportersüsteemi eripärast ei ole võimalik saadud tulemuste puhul öelda, kas tegemist on mõne üksiku tugevat signaali andva transfekteeeritud rakuga või mitmete transfekteeeritud rakkudega, kus signaal on ühtlasemalt jaotunud. Vastuste leidmiseks sellele küsimusele on vaja läbi viia täiendavaid katseid.



Joonis 1. Lutsiferaasi induktsioon 24 h pärast U87 ja HT1080 sfääride transfekteeerimist PF6/PF14/NF51/NF55 ja pGL3 kompleksidega.

2.3.2. Sfääride dissotseerimise protokoll optimeerimise tulemused

Järgmiseks sooviti transfektsiooni efektiivsust analüüsida läbivoolutsütomeetriaga, mis võimaldab hinnata transfektsioon-positiivsete rakkude osakaalu kogu rakupopulatsioonist, kuid selleks on vajalik üherakulise suspensiooni tekitamine 3D kultuurist. Sõltuvalt rakutüübist ei pruugi aga üherakulise suspensiooni tekitamine olla lihtne protseduur. Kasutades erinevaid töötlusgrupe (tabel 4), püüti dissotseerimisel saada võimalikult kõrge tervete rakkude osakaal. Saadud tulemustest moodustati kahe rakuliini (U87 ja HT1080) võrdluseks joonis 2, mis näitab voolutsütomeetria tulemusi.

U87 rakuliini puhul on teada varasematest tulemustest (ei ole saadud töö autori poolt), et 100% trüpsiini osakaaluga töötlus (grupp I) annab terveid rakke 34%. Grupp II puhul, kus on 25% trüpsiini osakaal ja 75% CDB osakaal, paranes tulemus ligi 20% ja tervete rakkude osakaal moodustas enam kui 50% kõigist loetud sündmustest. Kasutades 75% trüpsiini osakaalu ja 25% CDB osakaalu, suurenes tervete rakkude hulk veel 5%. U87 puhul ei toimunud grupp IV ja V rakendamisel, kus töödeldavaid sfääre inkubeeriti dissotseerimislahustega 37°C juures, tervete rakkude osakaalu suurenemist. Mõlemal juhul on tervete rakkude osakaal veidi üle 60%. U87 puhul langes grupp VI puhul elusate rakkude osakaal huvitaval kombel veidi alla 60%. Töötluste VI ja VII puhul inkubeeriti enne dissotseerimislahustega töötlemist sfääre 20 minutit 0,5 mM EDTA lahusega 37°C juures. Grupp VII töötlusega õnnestus U87 puhul saada elusate rakkude osakaaluks veidi üle 70%, mis on parim saadud tulemus antud rakuliiniga.

HT1080 puhul andis II grupp, kus kasutati 25% trüpsiini ja 75% CDB osakaalu, dissotseerimisel tervete rakkude hulgaks 50%. Suurendades trüpsiini osakaalu ja vähendades CDB osakaalu grupp III puhul, langes elusate rakkude hulk ja tulemuseks oli ligi 40% terveid rakke. Inkubeerides sfääre dissotseerimislahustega 37°C juures (grupis IV ja V), saadi mõlemal juhul tervete rakkude hulgaks 60%. Lisades ka eelnevalt kirjeldatud EDTAs inkubeerimise samm, paranesid HT1080 rakuliini puhul tulemused suurel määral. Nii kõrgema kui madalama trüpsiini sisaldusega töötluste puhul saadi tervete rakkude osakaaluks veidi enam kui 80%.

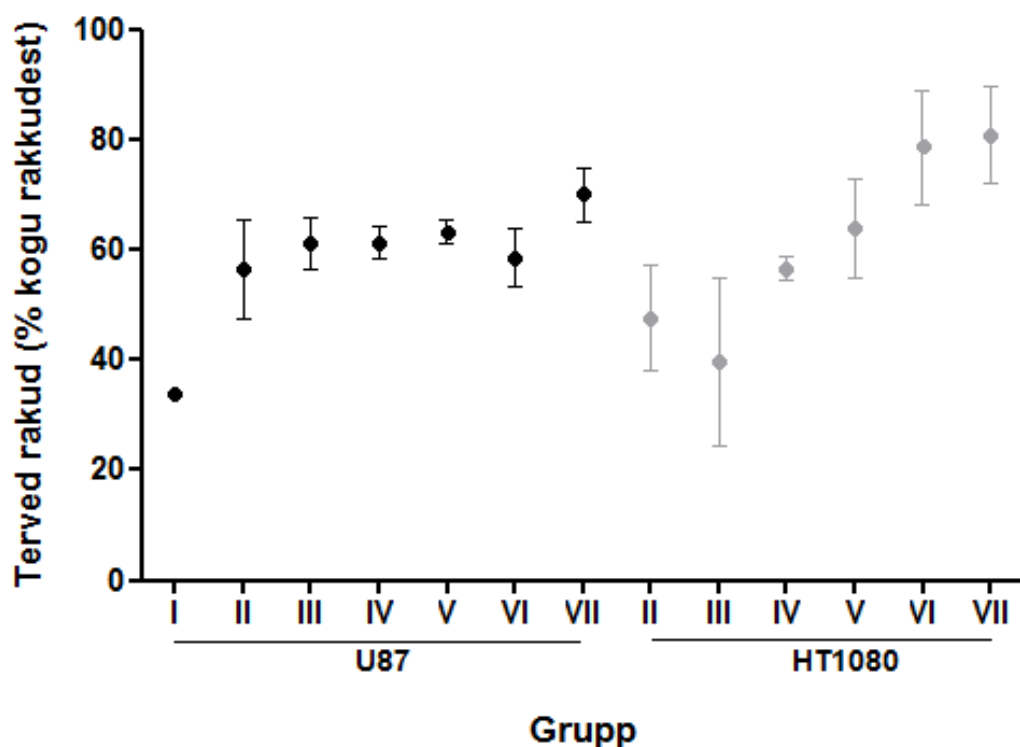
Võrreldes rakuliine omavahel, saadi sarnased tulemused gruppide IV ja V puhul. Samuti oli mõlema rakuliini puhul parimaks töötluseks VII, kus oli sfääre inkubeeritud 20 minutit 0,5 mM EDTA lahuses ja 3 minutit dissotseerimislahuses 37°C juures. Parima tulemuse andnud protokoll on välja toodud tabelis 5.

Antud tulemuste põhjal saab järeldada, et võrreldes esialgse tulemusega on protokoll muudetud tunduvalt efektiivsemaks. 34% terveid rakke, mis algselt saadi U87 rakuliiniga katsetes, on tõusnud peaaegu 70% ja HT1080 rakuliini puhul on tervete rakkude osakaal efektiivse töötuse korral veidi üle 80%.

EDTA on oma olemuselt kelaator, mis tähendab, et ta seob lahusest metalliioone (Chen *et al.*, 2015). Väiksem metalliioonide hulk lahuses takistab omakorda integriinide (rakumembraanil paiknevad retseptorid, mis moodustavad rakkude omavahelisi ja rakkude ning maatriksi vahelisi ühendusi) funktsioneerimist, mis parandas dissotseerimise efektiivsust oluliselt, muutes rakkudevahelised sidemed sfäärides õrnemaks. Kasutades 75% trüpsiini osakaalu dissotseerimislahuses, oli ensümaatiline töötus tugevamalt esindatud. Lisaks, kuna lahusest, milles sfääre inkubeeriti, olid metalliioonid suuresti eemaldatud, sai ka trüpsiin efektiivsemalt töötada.

Tervete rakkude erinevus U87 ja HT1080 rakuliini vahel võib olla põhjustatud rakuliinide erinevatest omadustest. Nimelt U87 rakkudele on iseloomulikud jätked, millega nad naaberrakkudega tihedamini seotud on. Seetõttu võib U87 sfääride dissotseerimiseks vaja olla suuremat mehaanilist mõjutamist ning osad rakud võivad seetõttu ka kahjustuda.

Samuti on tervete rakkude hulga puhul oluline arvestada sfääri iseärasusi. Nimelt on sfääri keskel nekrootiline tuum, milles olevad rakud võivad olla juba enne töötlust katki, kuid voolutsütomeeter loeb rakutükikesi siiski sündmustena. Seetõttu ei ole teada, kui suur on tervete rakkude osakaal sfäärides enne dissotseerimise alustamist. Teisest küljest võivad olla enam vigastunud sfääri välimise kihi rakud, kuna need saavad tõenäolisemalt tugevamalt dissotseerimise protseduuri jooksul mõjutatud.



Joonis 2. Läbivoolutsütomeetria optimeerimise tulemused U87 ja HT1080 rakuliinidega. I – 100% trüpsiini osakaal, inkubeeritud toatemperatuuril; II – 25% trüpsiini ja 75% CDB osakaal, inkubeeritud toatemperatuuril; III – 75% trüpsiini ja 25% CDB osakaal, inkubeeritud toatemperatuuril; IV – 25% trüpsiini ja 75% CDB osakaal, inkubeeritud 37°C juures; V – 75% trüpsiini ja 25% CDB osakaal, inkubeeritud 37°C juures; VI – 25% trüpsiini ja 75% CDB osakaal, inkubeeritud 37°C juures, kasutades eelinkubeerimist 0,5 mM EDTAga; VII – 75% trüpsiini ja 25% CDB osakaal, inkubeeritud 37°C juures, kasutades eelinkubeerimist 0,5 mM EDTAga.

Tabel 5. Edukaim dissotseerimise protokoll

1. Sfääride kogumine 96W plaadilt
2. Söötme aspireerimine
3. 5 ml 1x PBSiga pesu
4. 0,5 mM EDTA inkubeerimine 37°C, 20 minutit
5. 1 ml 75% trüpsiini ja 25% CDB osakaaluga (3 min 37°C)
6. Suspendeerida (4x)
7. Vastu põhja suspendeerimine (6x)
8. Üherakulise suspensiooni lisamine 10 ml 1x PBSile
9. Tsentrifugimine 1000 x g, 10 min
10. Supernatandi eemaldamine
11. Sademe ülesvõtmine 500 µl 1x PBSis
12. Läbivoolutsütomeetria analüüs

2.3.3. Transfekteritud sfääride analüüs läbivoolutsütomeetriaga

Transfekteritud sfääride läbivoolutsütomeetria analüüsi eesmärgiks oli hinnata transfekteritud rakkude hulka kvantitatiivselt. Transfekteritud sfääride puhul kasutati dissotseerimiseks edukaima tulemuse andnud protokoll, mis on toodud tabelis 5 ja saadud tulemused on toodud tabelis 6.

Tulemustest on näha, et transfekteritud sfääride dissotseerimisel vähenes mõlema rakuliini puhul ka tervete rakkude osakaal. Vähenemist ei saa võtta absoluutse väärtusena, kuna tegemist võib olla bioloogilise varieeruvusega, mille tõttu ühe mõõtmiskorra põhjal ei saa teha põhjanevaid järeldusi. Konfokaalmikroskoopia piltidelt (tabelites 7 ja 8) on näha, et transfekteritud rakud asuvad põhiliselt sfääri välimistes kihtides, mis on kõige enam mehhaniliselt mõjutatud ja samuti kokku puutunud dissotseerimislahusega. Transfekteritud rakud sfääride välimistes kihtides on tugevamat töötlust saavad rakud kui sisemistes kihtides ja seetõttu on võimalik, et dissotseerimisel puruneb ka osa transfekteritud rakke. Võimalik, et tervete rakkude hulk on vähenenud, võrreldes punktis 2.3.2. saadud tulemustega, just katkiläinud transfekteritud rakkude arvelt. Viimaseks, antud tulemuste puhul tuleb arvestada võimalusega, et transfekteritud rakud on mehhaaniliste mõjutuste suhtes tundlikumad.

Kui transfekteeerimine muudab rakke tundlikumaks, oleks otstarbekas transfekteeeritud sfääride puhul dissotseerimisel proovida töötlusgruppi VI (toodud tabelis 4), mille puhul kasutati 25% trüpsiini ja 75% CDB osakaalu, mis võiks anda paremaid tulemusi. Antud oletust toetab trüpsiini mõju kahedimensionaalses rakukultuuris, kus pikaajalisem inkubeerimine trüpsiiniga hakkab rakkude elujõulisust vähendama (Brown *et al.*, 2007).

Tabel 6. Transfekteeeritud sfääride läbivoolutsütomeetria tulemused

HT1080	Terved rakud (% kõigist)	Transfekteeeritud (% tervetest)	U87	Terved rakud (% kõigist)	Transfekteeeritud (% tervetest)
UT	70,15	0,05	UT	58,85	0
pEGFP	68,85	0	pEGFP	47,25	0
PF6/pEGFP	50,4	1,3	PF6/pEGFP	39,75	2,1
PF14/pEGFP	43,7	0,9	PF14/pEGFP	42,1	1,15
NF51/pEGFP	58,6	2,05	NF51/pEGFP	48,4	2
NF55/pEGFP	66,75	3	NF55/pEGFP	44,65	2,45

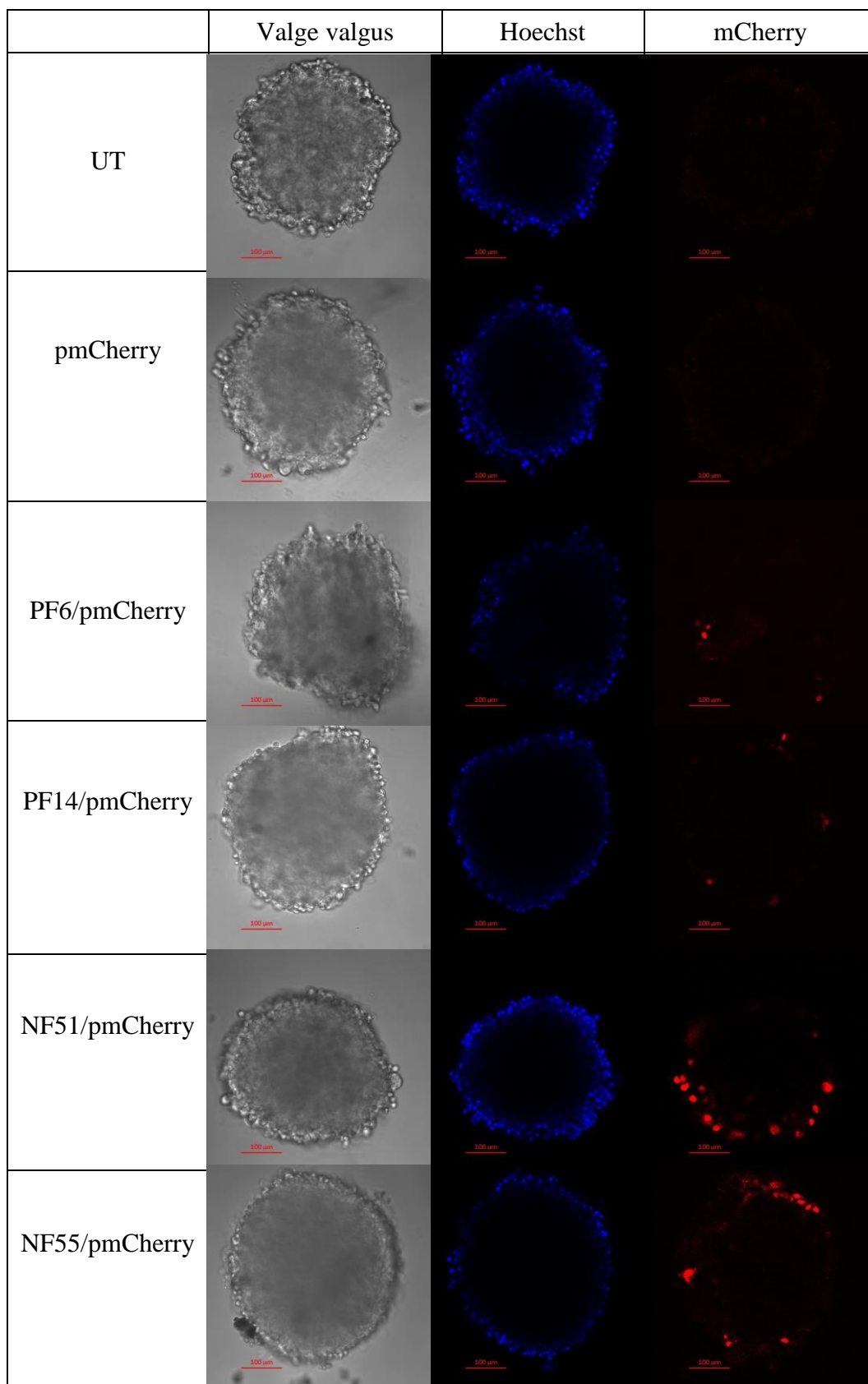
2.3.4. Transfektsiooni efektiivsuse hindamine kvalitatiivselt

Fluorestseeruva plasmidi (pmCherry) ja erinevate peptiidide (PF6, PF14, NF51 ja NF55) kompleksidega transfekteeeritud U87 ja HT1080 sfääride konfokaalmikroskoopia pildid on välja toodud vastavalt tabelites 7 ja 8. Tabeli 7 põhjal saab ka järeldada, et efektiivsemalt on U87 sfääridesse penetreerunud NickFectid. HT1080 rakuliini puhul on tabel 8 samuti näha sarnast tendentsi transfekteeerimise edukuses. Kuid võrreldes U87 rakkudega on fluorestsentsi intensiivsus HT1080 sfäärides siiski nõrgem. Negatiivsete kontrollgruppidega mõõdeti töötlemata sfääre ja ainult pmCherryga töödeldud sfääre. Samuti on (tabelites 7 ja 8) näha, et ka tuumavärv on sisenenud vaid sfääri välimistesse kihtidesse, mille põhjal võib kahelda mikroskoobi võimes kuvada sfääri sisemusse.

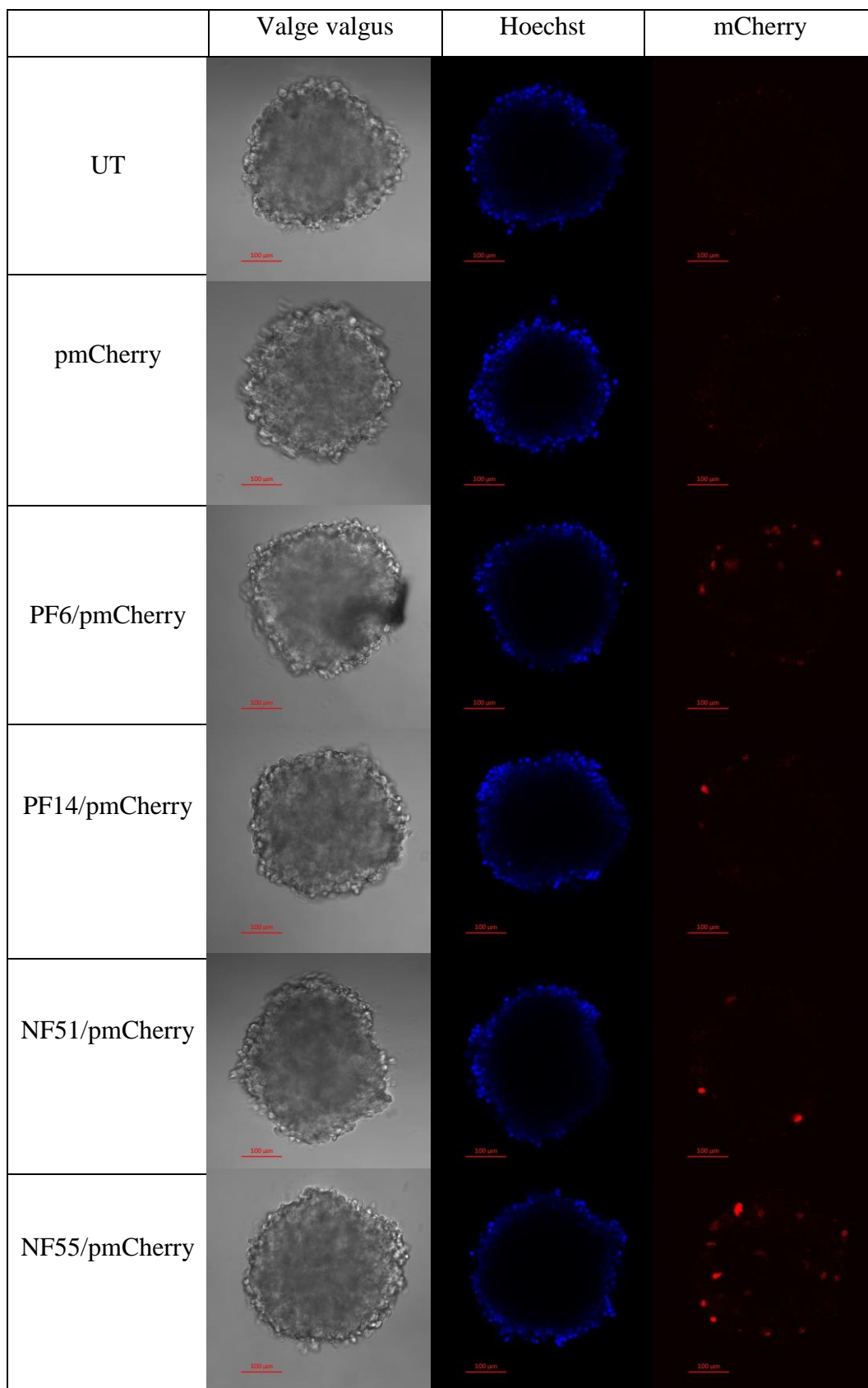
Antud katsest järeldub, et edukalt on transfekteerida õnnestunud vaid sfääride välimisi rakukihte. Võimalik, et konfokaalmikroskoopia laserid ei suuda sfääri sisemust kuvada, mille kontrollimiseks võib sobida külmlõigutamine, millega saaks kontrollida tranfekteeritud rakkude paiknemist sfääri lõigul. Tõenäolisem hüpotees on aga kasutatud transportvektorite suutmatus partikleid sügavamale sfääri sisemusse transportida. Viimast oletust toetab ka madal transfekteeritud rakkude hulk, mida mõõdeti läbivoolutsütomeetriaga (tabelis 6).

Kuna mitmerakulised tuumori sfäärid on omadustelt keerukamad kui 2D rakukultuur ja sarnanevad rohkem kasvajatega, ei ole madalam transfektsiooni hulk üllatuslik. Antud tulemustest võib oletada, et ka *in vivo* olukorras ei saavutata sarnase lähenemisega olulist penetratiooni kudedesse. Selleks, et suurendada antud mudelis transfektsiooni hulka, oleks vajalik veel suurema transfektsiooni efektiivsusega transportvektorite (peptiidide) disainimine ja kasutuselevõtmine.

Tabel 7. U87 sfäärid, mis on transfekteeritud, kasutades erinevaid peptiide (PF6, PF14, NF51 ja NF55) ja pmCherry komplekse ning mille tuumad värviti Hoechst tuumavärviga vahetult enne mõõtmist. Konfokaalmikroskoopia pildid on tehtud 24h pärast transfekteerimist. Mõõtjoon vastab 100 µM pikkusele alale pildil.



Tabel 8. HT1080 sfäärid, mis on transfecteeritud, kasutades erinevaid peptiide (PF6, PF14, NF51 ja NF55) ja pmCherry komplekse ning mille tuumad värviti Hoechst tuumavärviga vahetult enne mõõtmist. Konfokaalmikroskoopia pildid on tehtud 24h pärast transfecteerimist. Ajapunkt 24 h. Mõõtjoon vastab 100 μ M pikkusele alale pildil.



KOKKUVÕTE

Vähkkasvajad on kompleksed moodustised, mille uurimiseks rakukultuuris on oluline kasutada relevantseid mudeleid. Mitmerakulised tuumori sfäärid, mis sarnanevad oma omadustelt kasvajatega, on selleks sobiv platvorm. Selleks, et tagada võimalikult efektiivne ravi, kasutades geeniteraapia rakendusi, on oluline võimalikult suur transfektsiooni määr. Efektiivsete transportvektorite leidmiseks on oluline, et transfektsiooni hulk oleks lihtsalt ja kiirelt kontrollitav.

Antud töö eesmärgiks oli optimeerida protokoll mitmerakulistest tuumori sfääridest üherakulise suspensiooni saamiseks. Saadavat suspensiooni on võimalik kasutada läbivoolutsütomeetria analüüsiks, mis on lihtne ja mugav meetod nii tervete rakkude hulga hindamiseks kui ka transfektsiooni efektiivsuse määramiseks. Käesoleva töö raames suudeti tervete rakkude hulka suurendada enam kui kaks korda, võrreldes töö alguspunktiks võetud 34% tervete rakkudega. Edaspidise rakendusena sobib antud protokoll ka transfektsiooni efektiivsuse määramiseks, olles oluline tööriist praktilistes uurimustes.

Lisaks dissotseerimisprotokollile optimeerimisele sooviti nii kvantitatiivselt kui ka kvalitatiivselt hinnata transfektsiooni hulka, millest järeldus, et praegused transportvektorid, mis on näidanud suurt efektiivsust kahekihilises rakukultuuris, ei ole piisavalt efektiivsed, et siseneda sfäärise sisemistesse kihtidesse, mis võib näidata ka kasutatud vektorite peamist puudujääki *in vivo* olukorras ning suunata, millist transportvektorite aspekti oleks vaja edasi arendada.

SUMMARY

Dissociation protocol for flow cytometry analysis of multicellular tumor spheroids and evaluation of transfection efficiency qualitatively and quantitatively in tumor 3D model

Riin Subi

Cancer has very complex structure, where the cells are proliferating uncontrollably and forming dense clusters. In order to research these structures it is necessary to use as relevant models as possible. Using gene therapy in cancer treatment needs effective transport vectors, which would help to get the drugs into the neoplasms.

The aim of this work was to optimize the protocol of multicellular tumor spheroid dissociation to obtain single cell suspension. Thereafter it is possible to detect the amount of transfected cells by flow cytometry analysis. Easy handling protocol to detect the transfected cell from dissociated spheroids can be widely used as a practical approach to screen and develop new transport vectors.

In this work the quantitative and qualitative analysis of transfection efficacy was carried out. The results implied that the vectors which have shown high efficacy in 2D cell culture do not have as high effect in three dimensional cultures. In order to gain effective transfection in cancer therapy more efficient transport vectors must be validated.

KIRJANDUSE LOETELU

Adijanto, J., and Naash, M.I. (2015). Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*

Allard, K., and Kevin, K. (2008). Luciferase Reporter Assays: Powerful Adaptable Tools for Cell Biology Research. *Cell Notes.*

Amer, M.H. (2014). Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol. Cell. Ther.* 2, 27.

Andaloussi, S.E.L., Lehto, T., Mäger, I., Rosenthal-Aizman, K., Oprea, I.I., Simonson, O.E., Sork, H., Ezzat, K., Copolovici, D.M., Kurrikoff, K., et al. (2011). Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Res.* 39, 3972–3987.

Arukuusk, P., Pärnaste, L., Oskolkov, N., Copolovici, D.-M., Margus, H., Padari, K., Möll, K., Maslovskaja, J., Tegova, R., Kivi, G., et al. (2013). New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 1365–1373.

Baker, B.M., and Chen, C.S. (2012). Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.* 125, 3015–3024.

Brogan, J., Li, F., Li, W., He, Z., Huang, Q., and Li, C.-Y. (2012). Imaging Molecular Pathways: Reporter Genes. *Radiat. Res.* 177, 508–513.

Brown, M.A., Wallace, C.S., Anamelechi, C.C., Clermont, E., Reichert, W.M., and Truskey, G.A. (2007). The Use of Mild Trypsinization Conditions in the Detachment of Endothelial Cells to Promote Subsequent Endothelialization on Synthetic Surfaces. *Biomaterials* 28, 3928–3935.

Carlos Omar Rodríguez-Hernández, S.E.T.-G. (2014). Cell culture: History, Development and Prospects. *Int. J. Curr. Res. Acad. Rev.* 2, 188–200.

Chen, C.-Y., Ke, C.-J., Yen, K.-C., Hsieh, H.-C., Sun, J.-S., and Lin, F.-H. (2015). 3D Porous Calcium-Alginate Scaffolds Cell Culture System Improved Human Osteoblast Cell Clusters for Cell Therapy. *Theranostics* 5, 643–655.

Cinelli, R.A., Ferrari, A., Pellegrini, V., Tyagi, M., Giacca, M., and Beltram, F. (2000). The enhanced green fluorescent protein as a tool for the analysis of protein dynamics and localization: local fluorescence study at the single-molecule level. *Photochem. Photobiol.* 71, 771–776.

Copolovici, D.M., Langel, K., Eriste, E., and Langel, Ü. (2014). Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications. *ACS Nano* 8, 1972–1994.

Dean, D.A. (2013). Cell-specific targeting strategies for electroporation-mediated gene delivery in cells and animals. *J. Membr. Biol.* 246, 737–744.

Ezzat, K., Andaloussi, S.E.L., Zaghloul, E.M., Lehto, T., Lindberg, S., Moreno, P.M.D., Viola, J.R., Magdy, T., Abdo, R., Guterstam, P., et al. (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating

peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res.* 39, 5284–5298.

Fanghänel, S., Wadhvani, P., Strandberg, E., Verdurmen, W.P.R., Bürck, J., Ehni, S., Mykhailiuk, P.K., Afonin, S., Gerthsen, D., Komarov, I.V., et al. (2014). Structure Analysis and Conformational Transitions of the Cell Penetrating Peptide Transportan 10 in the Membrane-Bound State. *PLoS ONE* 9.

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

Gehrig, S., Sami, H., and Ogris, M. (2014). Gene therapy and imaging in preclinical and clinical oncology: recent developments in therapy and theranostics. *Ther. Deliv.* 5, 1275–1296.

Goverdhana, S., Puntel, M., Xiong, W., Zirger, J.M., Barcia, C., Curtin, J.F., Soffer, E.B., Mondkar, S., King, G.D., Hu, J., et al. (2005). Regulatable Gene Expression Systems for Gene Therapy Applications: Progress and Future Challenges. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 12, 189–211.

Heinaru (2012). *Geneetika õpik kõrgkoolile (Tartu Ülikooli Kirjastus)*.

Hyewon, Y., and June-Key, C. (2013). *Reporter Gene Imaging. American Roentgen Ray Society*.

Jovčevska, I., Kočevar, N., and Komel, R. (2013). Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? *Mol. Clin. Oncol.* 1, 935–941.

Kane, J.R., Miska, J., Young, J.S., Kanojia, D., Kim, J.W., and Lesniak, M.S. (2015). Sui generis: gene therapy and delivery systems for the treatment of glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 17 Suppl 2, ii24–ii36.

Kaufman, R.J. (2000). Overview of vector design for mammalian gene expression. *Mol. Biotechnol.* 16, 151–160.

Kim, T.K., and Eberwine, J.H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3173–3178.

Lee, H.W., Yoon, S.Y., Singh, T.D., Choi, Y.J., Lee, H.J., Park, J.Y., Jeong, S.Y., Sang-Woo Lee, Ha, J.-H., Ahn, B.-C., et al. (2015). Tracking of dendritic cell migration into lymph nodes using molecular imaging with sodium iodide symporter and enhanced firefly luciferase genes. *Sci. Rep.* 5.

Mahabadi, S., Labeed, F.H., and Hughes, M.P. (2015). The effects of cell detachment methods on the dielectric properties of adherent and suspension cells. *ELECTROPHORESIS*

Nayerossadat, N., Maedeh, T., and Ali, P.A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv. Biomed. Res.* 1.

Page, H., Flood, P., and Reynaud, E.G. (2013). Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell Tissue Res.* 352, 123–131.

- Seefeldt, B., Kasper, R., Seidel, T., Tinnefeld, P., Dietz, K.-J., Heilemann, M., and Sauer, M. (2008). Fluorescent proteins for single-molecule fluorescence applications. *J. Biophotonics* 1, 74–82.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567–1572.
- Su, C.-H., Wu, Y.-J., Wang, H.-H., and Yeh, H.-I. (2012). Nonviral gene therapy targeting cardiovascular system. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 303, H629–H638.
- Thoma, C.R., Zimmermann, M., Agarkova, I., Kelm, J.M., and Krek, W. (2014). 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69–70, 29–41.
- Trabulo, S., Cardoso, A.L., Mano, M., and De Lima, M.C.P. (2010). Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals* 3, 961–993.
- Vandsburger, M.H., Radoul, M., Cohen, B., and Neeman, M. (2013). MRI Reporter Genes: Application to Imaging of Cell Survival, Proliferation, Migration, and Differentiation. *NMR Biomed.* 26, 872–884.
- Weiswald, L.-B., Bellet, D., and Dangles-Marie, V. (2015). Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia N. Y. N* 17, 1–15.
- Yamaoka, N., Kawasaki, Y., Xu, Y., Yamamoto, H., Terada, N., Okamura, H., and Kubo, S. (2010). Establishment of in vivo fluorescence imaging in mouse models of malignant mesothelioma. *Int. J. Oncol.* 37, 273–279.
- Yin, H., Kanasty, R.L., Eltoukhy, A.A., Vegas, A.J., Dorkin, J.R., and Anderson, D.G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* 15, 541–555.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid Kristina Kiisholtsi ja Kaido Kurrikoffi, nii abi eest katsete planeerimisel, meetodikate tutvustamisel ja arengut suunavate vestluste eest.

Tahan tänada ka kõiki liikmeid meie uurimisgrupist motiveeriva töökeskkonna loomise eest.

Samuti olen tänulik professor Ülo Langelile konstruktiivsete nõuannete eest.

Lisaks soovin tänada Eve Toomsood nõuandmise eest voolutsütomeetria ja konfokaalmikroskoopia läbiviimisel.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Riin Subi

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: 09.06.1993)

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

Tuumori sfääride dissotseerimise protokoll optimeerimine läbivoolutsütomeetria jaoks ning transfektsiooni edukuse hindamine 3D mudelis nii kvalitatiivselt kui ka kvantitatiivselt,

mille juhendajad on Kristina Kiisholts ja Kaido Kurrikoff,

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 **25.05.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 25.05.2015

