

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
VÄHIBIOLOOGIA UURIMISRÜHM

Markko Salumäe

**Nukleoliini ja tenastiin C FnIII-C domeeniga seonduvate
peptiidimotiivide identifitseerimine**

Magistritöö

Juhendajad: Tambet Teesalu, *Ph.D.*

Margus Pooga, *Ph.D.*

Prakash Lingasamy, *M. Sc.*

Tartu 2015

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
1 Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Kasvajad.....	6
1.2 Suunatud kasvajaravi	8
1.3 Kasvajate markervalgud	9
1.3.1 Nukleoliin	9
1.3.2 Tenastiin C.....	11
1.4 Faagidisplei	12
2 Eesmärgid	14
3 Materjalid ja meetodika	15
3.1 Kloneerimine	15
3.1.1 Kloneeritav DNA.....	15
3.1.2 Kloneerimisvektori ja peremeesorganismi valimine.....	15
3.1.3 pET28a(+)-NCL(274-709) konstrukti valmistamine ja paljundamine	15
3.2 Valgu puhastamine	17
3.2.1 Valgu tootmine.....	17
3.2.2 Valkude eraldamine rakumaterjalist	17
3.2.3 Valgu puhastamine.....	18
3.3 In vitro faagidisplei	18
3.3.1 Märklaudvalgu immobiliseerimine	18
3.3.2 Faagiraamatukogu paljundamine	19
3.3.3 Faagiraamatukogu tiitrimine	19
3.3.4 Faagiraamatukogu seondumine, pesemine ja elueerimine	20

3.4	Spetsiifiliselt seonduvate faagide esitletud peptiidjärjestuste määramine ja joondamine	20
4	Tulemused ja arutelu	21
4.1	Nukleoliini fragmendi 274-709 kloneerimine ja ekspressioon.....	21
4.2	Nukleoliini fragmendi 274-709 puhastamine	22
4.3	<i>In vitro</i> faagidisplei	24
4.3.1	Histidiini sisaldavaid peptiidide esitlevate faagide eemaldamine faagiraamatukogudest	24
4.3.2	Faagidisplei nukleoliini fragmendil 274-709 ja tenastiin C domeenil FnIII-C.	24
5	Kokkuvõte	30
6	Summary in English	31
7	Tänuavaldus	32
8	Viited	33
Lisad	37
	Lisa 1. Lihtlitsents	37

Kasutatud lühendid

BCA – bitsinkoonhape - *bicinchoninic acid*

BSA – veise seerumalbumiin - *bovine serum albumin*

CX7C – tsüklilistest 7 aminohappe pikkustest peptiididest koosnev faagiraamatukogu

EIA – ensüüm-immuunanalüüs - *enzyme immunoassay*

FnIII – fibronektiin tüüp-III domeen

g – relatiivne tsentrifugaaljõud

G7 – Seitsmest glütsiinist koosnevat peptiidi esitlev faag

IGEPAL CA-630 – oktüülfenoolpolüetoksüetanool - *octylphenoxy poly(ethyleneoxy)ethanol*

IPTG – isopropüül-1-tio- β -D-galaktopüranosiid - *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

KM – kolonni maht

LB – LB sööde - *lysogeny broth*

Mw – molekulmass - *molecular weight*

NCL – nukleoliin

NTA – nitrilotriatsetaat - *nitrilotriacetic acid*

PAGE – polüakrüülamiid-geelelektroforees - *polyacrylamide gel electrophoresis*

PBS – fosfaat-puhverdatud soolalahus - *phosphate-buffered saline*

Pfu – lüüsilaiiku moodustav ühik - *plaque forming unit*

RIA – radioimmuunanalüüs - *radioimmunoassay*

RPM – pööret minutis - *rounds per minute*

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat - *sodium dodecyl sulfate*

TNC – tenastiin C

X7 – lineaarsetest 7 aminohappe pikkustest peptiididest koosnev faagiraamatukogu

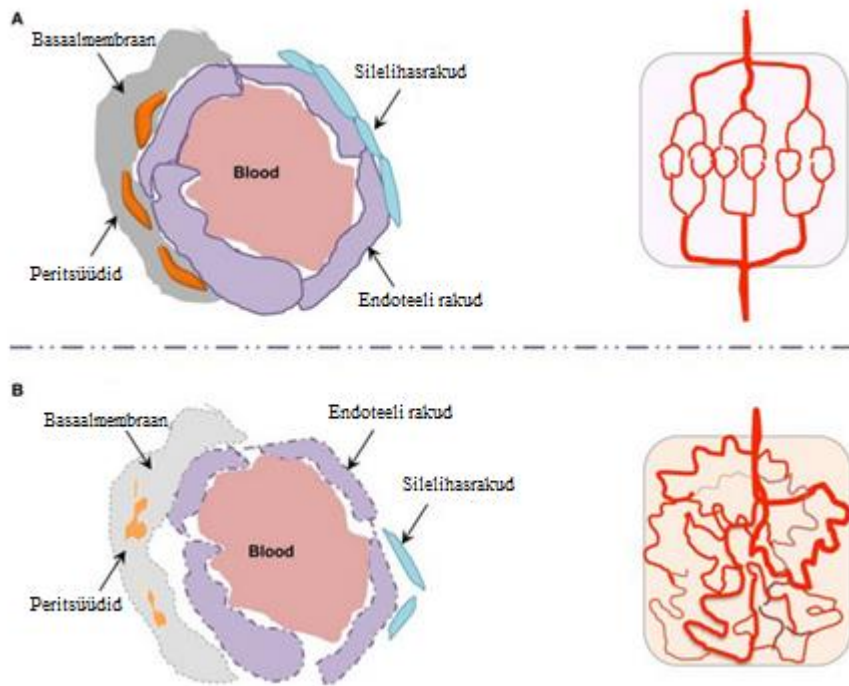
Sissejuhatus

Vähiuuringute käigus arendatakse nii ravimeid kui ka ravimite kasvajakoesse transportimise viise. Kuna paljud kasvaja keemiaravis kasutatavad ravimid on mürgised ka keha teistele rakkudele, siis oleks vaja suunata ravimit selektiivselt just kasvajakoesse. Kasvaja rakkude pinnal, stroomas ja angiogeensete veresoonte endoteeli rakkude pinnal on kasvajat markeerivad valgud, mida ei esine teistel normaalsetel keha rakkudel või esineb vähesel hulgal. Kui siduda vähimarkeriga spetsiifiliselt seonduv ligand vähiravimiga või nanoosakestega, mis sisaldavad vähiravimit, on võimalik suurendada kasvajaravimi kontsentratsiooni kasvajas, ilma ravimiannuseid tõstmata. Antud magistritöös on uuringu all kaks kasvajat markeerivat valku: nukleoliin ja FnIII-C domeeni sisaldav tenastiin C. Töö eesmärgiks oli leida peptiide ja peptiidimotiive, mis seonduks spetsiifiliselt ainult mainitud kasvajamarkeritega. Spetsiifiliselt seonduvate peptiidide leidmiseks kasutati faagidisplei meetodit.

1 Kirjanduse ülevaade

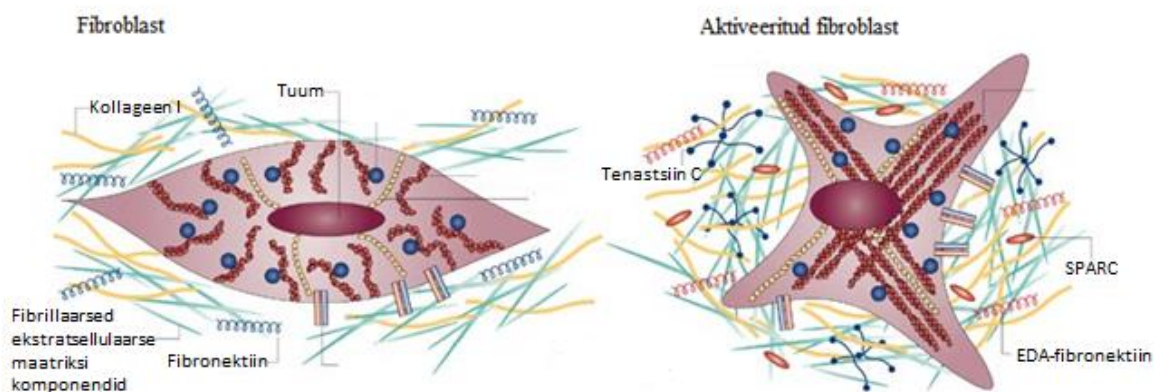
1.1 Kasvajad

Ilma hapniku ja teiste vajalike toitaineteta ei saa kasvaja kasvada suuremaks kui 2 mm^3 (McDougall *et al.*, 2006). Hapniku difusiooni piir kudedes on ainult 1 mm ning seetõttu on suurema kui 2 mm^3 kasvaja keskel olevad rakud hapnikuvaeguses. Hapnikuvaegus ja happeline keskkond on faktoriteks, mis indutseerivad uute veresoonte moodustumiseks vajalike geenide ekspressiooni (Shang *et al.*, 2012). Veresoonte kasv kasvajas on halvasti reguleeritud, mistõttu on veresoonekonna organisatsioon korrapäratu. Kasvaja endoteeli rakud on omavahel ja basaalmembraaniga lõdvalt seotud, lõdvalt seotud rakkude vahel on avaused, veresoonte endoteeli rakkude kattuvus peritsüütidega on vähenenud ning basaalmembraan on heterogeenne (Hashizume *et al.*, 2000; Albrechtsen *et al.*, 1981) (Joonis 1). Avauste diameeter kasvaja veresoonte endoteeli rakkude vahel võib ulatuda kuni 2 mikromeetrini (Hobbs *et al.*, 1998). Kasvaja veresooni iseloomustab vereplasma lekkivus kasvajakoesse. Samas aga vähendab vereplasma liikumist kasvajakoesse kasvaja sisene kõrge hüdrostaatiline rõhk, mis tuleneb funktsionaalse lümfisoonkonna puudusest (McDonald ja Baluk, 2002). Kasvaja koosneb kasvajarakkudest ja strooma rakkudest, milleks on fibroblastid, makrofaagid, neutrofiilid ja mesenhümaalsed tüvirakud. Kasvaja rakkude vahel on ekstratsellulaarne maatriks. Kasvaja strooma on tüüpiliselt tihedam kui normaalse koe strooma (Lu *et al.*, 2012), sisaldades rohkem kollageeni, glükoosaminoglükaane ja proteoglükaane, mis võivad olla struktuurselt muutunud (Miller 2005). Kasvaja ekstratsellulaarse maatriksi komponentide üheks peamiseks allikaks on fibroblastid (Joonis 2).



Joonis 1. Veresoonte organisatsioon ja ehitus normaalses koes ja kasvajas.

(**A**) Normaalse koe veresoonekond on korrapäraselt organiseeritud ning veresoonte ehitus ja funktsioon ei ole häiritud. (**B**) Kasvaja koe veresoonekonna organisatsioon on korrapäratu. Veresoonte endoteeli rakud on omavahel lõdvalt seotud, peritsüüdid on ebanormaalse kujuga, endoteeli rakkude kattuvus peritsüütidega on vähenenud ning basaalmembraan on heterogeenne (Skeem muudatustega artiklist Azzi *et al.*, 2013).



Joonis 2. Ekstratsellulaarse maatriksi (ETM) komponentide allikaks on peamiselt fibroblastid.

Kasvaja koe fibroplastidest paljud on aktiveerunud. Aktiveeritud fibroblastid jagunevad kiiremini ning sünteesivad suuremal hulgal tüüp-I kollageeni. Lisaks sünteesitakse valke nagu tenastiin C ja ekstra domeen A-d (EDA) sisaldav fibronektiin, mida teistes normaalsetes täiskasvanud kudedes ei sünteesita või sünteesitakse vähesel hulgal (Joonis muudatustega artiklist Kalluri ja Zeisberg, 2006).

1.2 Suunatud kasvajaravi

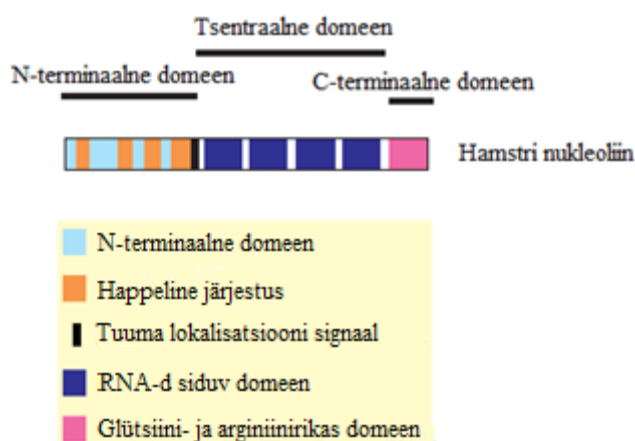
Kasvaja keemiaravis kasutatavad ravimid on süsteemsel manustamisel kahjulikud ka keha teistele rakkudele, mis seab piiri, kui palju ravimit võib manustada. Madalad annused pole efektiivsed eemaldamaks kogu kasvajat ning mida kauem on kasvajal aega ravi surve all olla, seda suurem on tõenäosus ravimresistentsete kasvajarakkude tekkeks ja paljunemiseks (Barlett ja Davis, 2007). Ravimi viimisel kasvajasse on takistusteks kasvaja halvasti organiseeritud veresoonekond, suurenenud verevoolutakistus, vähenenud transvaskulaarne rõhugradient ning kasvaja ekstratsellulaarne maatriks (Marcucci *et al.*, 2014). On leitud, et kasvaja rakkude pinnal, stroomas ja angiogeensete veresoonte endoteeli rakkude pinnal esinevad valgud, mida ei esine teistes keha tervetes kudedes või esineb vähesel hulgal. Seda ära kasutades on võimalik välja töötada peptiidid, mis seonduvad spetsiifiliselt vähimarkeriga. Kui siduda sellised peptiidid vähiravimiga või nanoosakestega, mis sisaldavad vähiravimit, on võimalik suurendada ravimi tõhusust ja vähendada kõrvalmõjusid ilma ravimiannuseid tõstmata. Üheks enim uuritud peptiidimotiiviks, mis seonduv kasvajat ja angiogeneesi markerivate integriinidega $\alpha_v\beta_3$ ja $\alpha_v\beta_5$ on *Arg-Gly-Asp* (RGD) motiiv. On näidatud, et seotuna kasvajaravimiga doksorubitsiin suurendab RGD motiivi omav CDCRGDCFC peptiid

ravi tõhusust võrreldes vaba doksorubitsiiniga inimese rinnavähi ksenograafia hiiremudelil (Arap *et al.*, 1998)

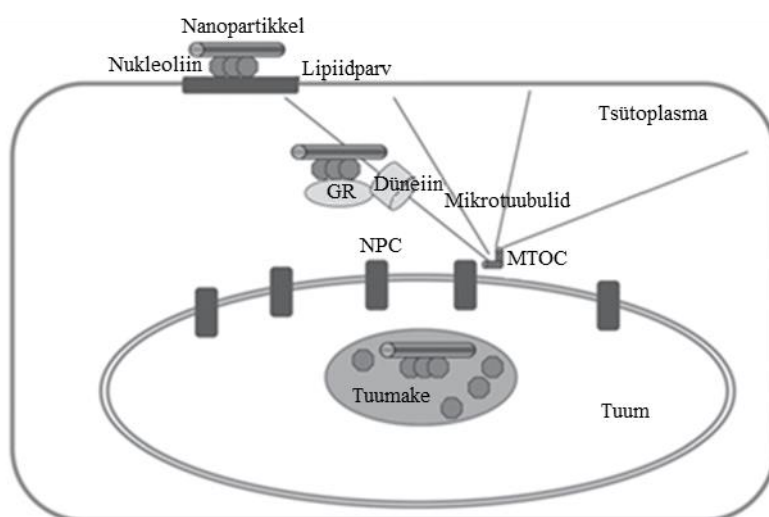
1.3 Kasvajate markervalgud

1.3.1 Nukleoliin

Nukleoliin on multifunktsionaalne valk, mis moodustab umbes 10 % tuumakese kogu valgu massist (Bicknella *et al.*, 2005). Nukleoliin osaleb ribosoomide biogeneesi mitmetes ülesannetes nagu näiteks rDNA transkriptsioon, pre-mRNA modifitseerimine ja protsessimine ning ribosomaalsete subühikute kokku panemine. Nukleoliini teoreetiline molekulmass on 77 kDa. SDS-polüakrüülamiidgeelil on nukleoliini nähtavaks molekulmassiks 105 kDa, mis tuleneb N-terminaalse domeeni kõrgest negatiivsest laengust (Srivastava ja Pollard, 1999). On leitud, et angiogeensete veresoonte endoteeli rakud ja kasvaja rakud esitlevad oma pinnal nukleoliini, kuid keha teiste normaalsete rakkude pinnal nukleoliini ei esitleta (Shi *et al.*, 2007; Christian *et al.*, 2003). Nukleoliini struktuurseteks elementideks on N-terminaalne happeline domeen, neli RNAd-seondavat domeeni ning glütsiini- ja arginiinirikas domeen (Joonis 3). Rakupinna nukleoliini üheks oletatavaks funktsiooniks on transportida ekstratsellulaarseid ligande tuuma (Hovanessian *et al.*, 2010). On näidatud, et nukleoliin-vahendatud DNA-nanopartiklite transport tuuma on sõltuv lipiidparvedest ja mikrotoubulitest (joonis 4) (Chen *et al.*, 2011)



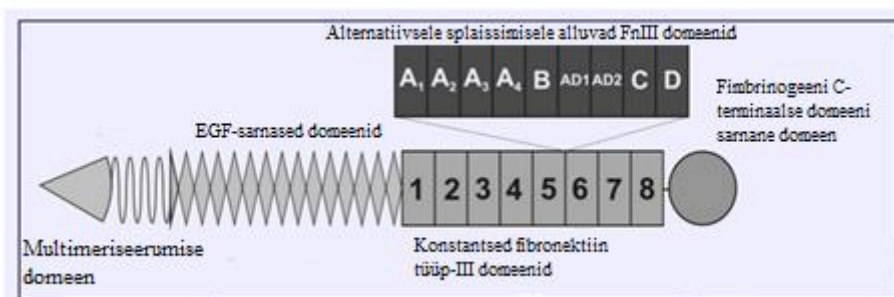
Joonis 3. Skemaatiline ülevaade nukleoliini struktuurist (joonis muudatustega artiklist Ginisty *et al.*, 1999).



Joonis 4. Nukleoliin-vahendatud endotsütoos. Skeemil on näha DNA-nanopartiklite (DNP) liikumine rakumembraanilt tuumakesse. DNP seondub lipiidparves asuva nukleoliiniga ning siseneb raku lipiidparvest sõltuva endotsütoosi teel. Nanopartiklid liiguvad läbi tsütoplasma kompleksis glükokortikoidretseptori ja düneiiniga mööda mikrotuubuleid, sisenevad tuuma tuumapoori kaudu ja akumulereeruvad tuumakesse koos nukleoliiniga. NPC – tuuma poori kompleks (*nuclear pore complex*), GR – glükokortikoidi retseptor (*glycocorticoid receptor*), MTOC - mikrotuubuleid organiseeriv keskus (*microtubule organizing center*) (Joonis muudatustega artiklist Chen *et al.*, 2011).

1.3.2 Tenastiin C

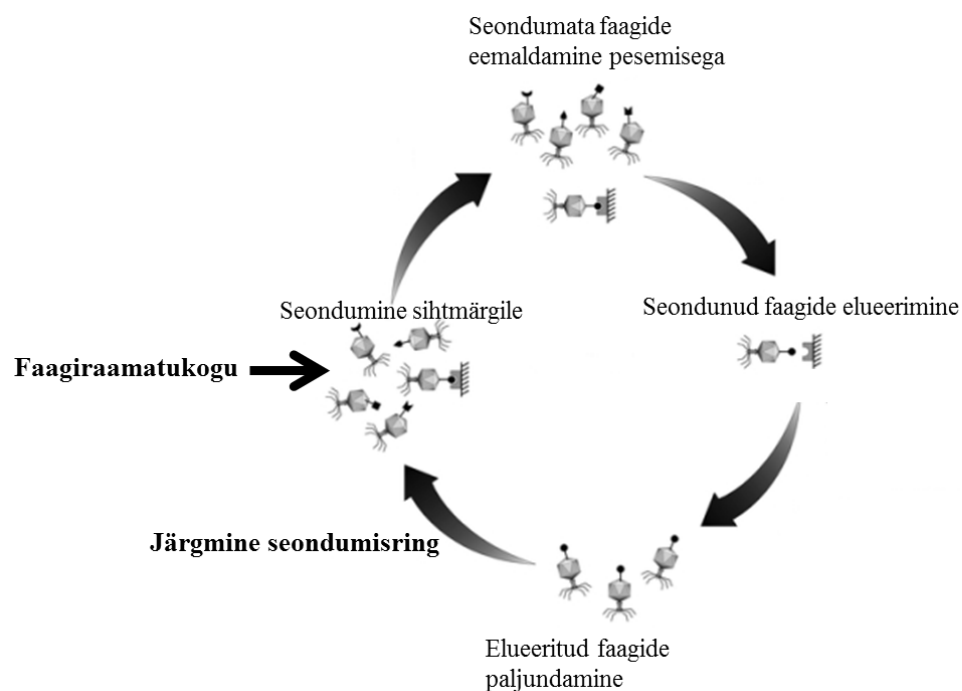
Tenastiin C (TNC) on rakkude adhesiooni moduleeriv ekstratsellulaarse maatriksi valk, mida ekspresseeritakse lootelise arengu käigus, kuid ei ekspresseerita või ekspresseeritakse vähe täiskasvanud normaalses koes (Chiquet-Ehrismann ja Chiquet, 2003). Tenastiin C ekspressioon on üles reguleeritud koevigastuse parandamise ajal (Midwood ja Orend, 2009; Midwood *et al.*, 2011). Tenastiin C monomeeri molekulmass on 250-300 kDa - monomeerid moodustavad heksameeri. Kasvajas võimendab TNC kasvajarakkude migratsiooni ja invasiivsust ning stimuleerib proliferatsiooni (Orend ja Chiquet-Ehrismann, 2006). TNC interaktsioonipartneritena on välja toodud epidermaalse kasvufaktori retseptor (EGFR), retseptor-valk türosiinfosfaataas β (RPTP β), integriinid, anneksiin 2, fibronektiin, Toll-sarnane retseptor 4 (TLR4), hepariin, kontaktiin (Midwood *et al.*, 2011). TNC on ekspresseeritud enamikes kasvajates (Orend ja Chiquet-Ehrismann, 2006). Valgul tenastiin C esineb palju isovorme, mis erinevad üksteisest alternatiivsele splaissimisele alluvate üheksa FnIII domeeni kombinatsioonide poolest (Joonis 5). Isovormid, mille koostises on FnIII-C domeen, on kõrgelt ekspresseeritud III ja IV astme astrotsütoomide ning enamike kopsuvähkide stroomas ja angiogeensete veresoonte ümber (Silacci *et al.*, 2006; Behrem *et al.*, 2005).



Joonis 5. Skemaatiline ülevaade tenastiin C struktuurist. Tenastiin C isovormid erinevad üksteisest 5. ja 6. konstantse FnIII domeeni vahel oleva 9 FnIII domeeni kombinatsioonide poolest (Joonis muudatustega artiklist Huret *et al.*, 2003).

1.4 Faagidisplei

Faagidisplei meetodit saab kasutada *in vitro* seadistuses, et leida peptiide/valke, mis seonduvad tugevalt märklaudmolekuliga või märklaudrakkudega, *ex vivo* seadistuses, et leida peptiide/valke, mis seonduvad eraldatud koe rakkudele ja *in vivo* seadistuses, et leida peptiide/valke, mis seonduvad spetsiifilisele organile loomudelil. Faagidispleis kasutatava peptiidide/valkude raamatukogu (faagiraamatukogu) koostamise teeb võimalikuks asjaolu, et peptiidi-/valgujärjestust kodeeriva DNA saab liita bakteriofaagi kapsiidi-valgu geeniga, tänu millele esitleb bakteriofaag liidetud peptiidi-/valgujärjestust oma pinnal. Raamatukogude koostamiseks on kasutatud filamentseid faage M13, F1 ja Fd ning lüütilisi faage T7, T4 ja λ (Krumpe ja Mori, 2006). Näiteks T7 bakteriofaagil põhinevad X7 ja CX7C faagiraamatukogudes (Rajotte *et al.*, 1998) on esitletud 21 aminohappe kombinatsioonidest tulenevad 7 aminohappe pikkused peptiidid. X7 raamatukogu peptiidid on lineaarsed, CX7C raamatukogu peptiididel on mõlemas otsas tsüsteiin, mis muudab peptiidi tsükliliseks. Faagidisplei seondumisringide käigus suureneb spetsiifiliselt seonduvate faagide osakaal faagiraamatukogus (Joonis 6). Bakteriofaagi poolt esitletav peptiidijärjestus määratakse faagi DNA peptiidi kodeeriva piirkonna sekveneerimise teel (Krumpe ja Mori, 2006). Näited faagidisplei abil leitud peptiididest ja nende sihtmärkidest on välja toodud tabelis 1.



Joonis 6. Faagidispleis kasutatav afiinsus-selektsiooni protsess. Algset faagiraamatukogu inkubeeritakse sihtmärgil. Seondumata faagid eemaldatakse pestes ning seondunud faagid elueeritakse ja tiitritakse. Elueeritud faagid paljundatakse sobivas bakterikultuuris, tiitritakse ning saadud kogum on algmaterjaliks uuele seondumisringile (Skeem muudatustega artiklist Krumpel ja Mori, 2006).

Tabel 1. Näiteid faagidispleiga leitud peptiididest ja nende sihtmärkidest.

	Peptiidi järjestus	Sihtmärk	Viide
1.	CNGRC	Angiogeensed veresooneid	Arap <i>et al.</i> (1998)
2.	CDCRGDCFC	Angiogeensed veresooneid	Pasqualini <i>et al.</i> , (1997)
3.	CGNKRTRGC	Kasvaja lümfisooned, kasvaja makrofaagid, kasvaja rakud hüpoksilistes piirkondades	Laakkonen <i>et al.</i> (2002)
4.	CGKRK	SCC – lamerakk-kartsinoom	Hoffman <i>et al.</i> (2003)
5.	CARSKNKDC	Naha ja kõõluse vigastused	Järvinen ja Ruoslahti (2007)
6.	CRKDKC	Naha ja kõõluse vigastused	Järvinen ja Ruoslahti (2007)
7.	CRPPR	Südame veresooneid	Zhang <i>et al.</i> (2005)

2 Eesmärgid

Antud magistritöö eesmärkideks oli:

- Leida peptiide, mis spetsiifiliselt seonduks nukleoliini fragmendiga 274-709 ja FnIII-C domeeniga valgus tenastiin C.
- Analüüsida leitud peptiide ühiste motiivide olemasolu seisukohast.

3 Materjalid ja meetodika

3.1 Kloneerimine

3.1.1 Kloneeritav DNA

Antud magistritöö raames kasutati kloneeritava DNA-na nukleoliini aminohappeid 274-709 kodeerivat DNA järjestust. Nukleoliini geeni sisaldav pRSET-NCL plasmiid saadi AddGene plasmiiidi varamust ja kontrolliti üle sekveneerimise abil. pRSET-NCL konstrukti kasutati matriitsina pET28a(+)-NCL(274-709) konstrukti valmistamisel.

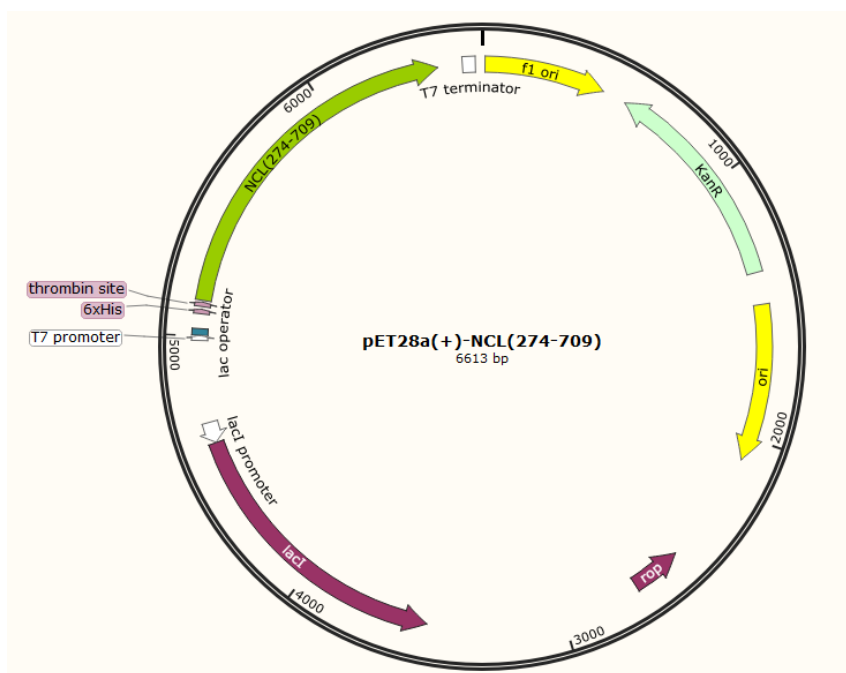
3.1.2 Kloneerimisvektori ja peremeesorganismi valimine

Kloneerimisvektoriks valiti pET28a(+). Nukleoliini geeni fragment sisestati kloneerimispiirkonda. Soovitud valgu tootmine oli bakteriofaag T7 promootori kontrolli all. pET28a(+) sisaldab lac operaatorjärjestust kohe allavoolu pärast T7 promootorit ning *lac* repressorgeeni (*lacI*). pET28a(+) vektoril on kanamütsiini resistentsusgeen. Konstrukti paljundamiseks kasutati peremeesorganismina Novageni kompetentseid rakke *E. coli* NovaXG.

3.1.3 pET28a(+)-NCL(274-709) konstrukti valmistamine ja paljundamine

Nukleoliini fragment paljundati PCR meetodil pRSET-NCL plasmiidilt. Praimeritena kasutati praimerite paari 5'CTCCTTCATATGAAAGAAGCACCTGGA3' ja 5'CAGACACTCGAGTTATCATTCAAACCTTCGT3'. Praimerid konstrueeriti kasutades programmi ApE („A plasmid Editor“). PCR meetodil paljundatud nukleoliini fragmentide puhastamiseks eraldati nukleoliini fragmendid elektroforeetiliselt 1 % agarosgeelis ning puhastati kasutades Favorgen reagentide komplekti „FavorPrep™ GEL/PCR purification kit“. Puhastatud nukleoliini fragmenti töödeldi XhoI ja NdeI restriктаasidega, eraldati uuesti

elektroforeetilisel 1 % agarosgeelis ning puhastati kasutades Favorgen reagentide komplekti „FavorPrep™ GEL/PCR purification kit“. Samade restriктаasidega töödeldi ka pET28a(+) vektorit ning puhastati 1 % agarosgeelist. Restriктаasidega töödeldud nukleoliini fragment ning pET28a(+) vektor liideti ligaasi abil. Ligatsiooniseguga transformeeriti E. coli NovaXG rakke, mis külvati kanamütsiini sisaldavale LB tardsöötmele. Tardsöötmetelt valiti 10 bakterikolooniat ning paljundati LB-s, millesse oli lisatud kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml. Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati Favorgen reagentide komplekti „FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit“. Nukleoliini fragmendi olemasolu plasmiidides kontrolliti, paljundades piirkonda T7 promootori ja T7 terminaatori vahel PCR meetodiga ning kontrollides paljundatud DNA fragmendi suurust 1 % agarosgeelil. Üks plasmiidiproov sekveneeriti kontrollimaks, et järjestuses ei esineks vigu. Sekveneeritud plasmiidiproovile vastav koloonia paljundati LB söötmes, millesse oli lisatud kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml ning plasmiid (Joonis 7) puhastati Thermo Scientific plasmiidse DNA puhastamise komplektiga „GeneJET Plasmid Maxiprep Kit“.



Joonis 7. pET28a(+)-NCL(274-709) konstrukti skeem. Nukleoliini fragment on sisestatud pET28a(+) vektorisse lõikesaitide NdeI ja XhoI vahele ning transkriptsioon on T7 promootori kontrolli all. Sihtmärkgeeni basaalsel ekspressiooni aitab ära hoida lac repressor. Ekspresseeritava valguga N-terminuses on 6 x His saba. Konstrukti sisaldab kanamütsiini resistentsusgeeni.

3.2 Valgu puhastamine

3.2.1 Valgu tootmine

Peremeesorganismina kasutati *E. coli* BL21(DE3) Rosetta PlysS bakteritüve. Eukarüootsete valkude efektiivsemaks tootmiseks sisaldab BL21(DE3) Rosetta PlysS bakteritüvi klooramfenikooli resistentsusplasmidi, millelt toodetakse tRNA-sid koodonitele, mida *E. coli* rakud harva kasutavad ning väikeses koguses bakteriofaag T7 lüsotsüümi (T7 RNA polümeraasi inhibiitor), et hoida aktiivse T7 ploümeraasi tase enne induktsiooni võimalikult madalal. pET28a(+)-NCL(274-709) konstruktidega transformeeriti BL21(DE3) Rosetta PlysS rakke. Transformeeritud rakud kasvatati üles kanamütsiini ja klooramfenikooli sisaldaval LB tardsöötmele. Kolooniaid LB tardsöötmele kasutati üleökultuuri tegemiseks. Üleökultuurist tehti lahjendus kanamütsiini kontsentratsiooniga 50 µg/ml ja klooramfenikooli kontsentratsiooniga 25 µg/ml sisaldavasse LB söötmesse optilise tiheduseni $OD_{600}=0,1$. Lahjendatud kultuuri kasvatati loksutil 37 °C ja 200 pööret/min kuni optilise tiheduseni $OD_{600}=0,7-1$. Seejärel indutseeriti valgu tootmine 0,5 mM IPTG-ga. Kultuuri kasvatati loksutil edasi 4 tundi tingimustel 37 °C ja 200 pööret/min. Rakud tsentrifugeeriti Sorval SLA-1500 rootoriga 7500 x g, koguti kokku ning säilitati temperatuuril -20 °C. Valgu ekspressiooni kontrolliti SDS-PAGE meetodil ja *coomassie* sinise värvinguga.

3.2.2 Valkude eraldamine rakumaterjalist

5,6 grammile *E. coli* rakusademele lisati 35 ml lüüsipuhvrit (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 400 mM NaCl, 25 mM imidasool) ning 50 µl proteaaside inhibiitorite kokteili (Promega "50 X *Protease inhibitor cocktail*"). Külmunud rakusademe lahustamiseks inkubeeriti proovi 30 minutit toatemperatuuril vaikselt kiikumisel. Rakud lüüsi 15 minuti jooksul jääle kasutades sonikaatorit „Bandelin Sonopuls HD 2070“ amplituudil 55 % ning pulsiga 0,5 sekundit sees/0,5 sekundit väljas. Lüüsitud proovi tsentrifugeeriti 18 000 g juures (Sorval SS34) 15 minutit. Supernatant filtreeriti läbi 0,2 µm poori suurusega filtri ja hoiti jääle kuni edasise kasutamiseni.

3.2.3 Valgu puhastamine

Puhastatav nukleoliini fragment sisaldab N-terminaalset 6 x His saba, mis võimaldab valku eraldada teistest 6 x His saba mitteomavatest valkudest. Puhastamiseks kasutati ÄKTA valgupuhastussüsteemi ja 2 x 1 ml HisTrap kolonne (GE Healthcare Life Sciences). ÄKTA valgupuhastussüsteemi pesti destilleeritud veega ja tasakaalustamis-pesemisepuhvriga (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 400 mM NaCl, 25 mM imidasool). Kaks 1 ml HisTrap kolonni ühendati puhastussüsteemiga ja tasakaalustati 10 KM (kolonni maht) tasakaalustamispuhvriga. Kolonnidest voolutati läbi bakterirakkudest eraldatud lahus mahuga 20 KM. Läbivool koguti eraldi tuubi. Kolonne pesti 10 KV tasakaalustamis-pesemisepuhvriga, et eemaldada kinnitumata valgud. Kinnitunud valkude elueerimiseks kasutati gradienteluatsiooni imidasooli kontsentratsiooni tõusuga 25 mM – 500 mM mahus 15 KM. Fraktsioonid koguti 2 ml kaupa jääl olevatesse katsutitesse. SDS-PAGE ja *coomassie* sinise värving tehti fraktsioonidele, mis 280 nm kromatogrammi järgi sisaldasid elueerunud valku. Pärast SDS-PAGE analüüsi kombineeriti kõige puhtamad nukleoliini fragmenti 274-709 sisaldavad fraktsioonid ning dialüüsiti 4 L 1 x PBS puhvris üleöö 4 °C juures kasutades Thermo Scientific dialüüsikassette "Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassette 3,5 kDa". Dialüüsitud valgulahus jaotati 0,5 ml suurusteks portsjoniteks ja säilitati -80 °C juures. Valgu kontsentratsioon määrati BCA (*bicinchoninic acid*) meetodil, kasutades Life Technologies reagentide komplekti „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“.

3.3 In vitro faagidisplei

3.3.1 Märklaudivalgu immobiliseerimine

Märklaudivalkudena kasutati nukleoliini fragmenti 274-709 ning tenastiin C domeeni FnIII-C (puhastatud Prakash Lingasamy poolt). Mõlemad valgud ekspresseeriti koos N-terminaalse 6 x His sabaga. Statsionaarseks faasiks oli Ni-NTA magnetilised agaroskerakesed (QIAGEN) või kõrge sidumisvõimega 96 lamedapõhjalise kannuga EIA/RIA (ensüümimmuunanalüüs/radioimmuunanalüüs) plaat (Costar™). Ni-NTA magnetiliste agaroskerakeste seondumusmahtuvus on 30 µg dihüdrofolaadi reduktaasi (24 kDa) 100 µl 5 % (v/v) kerakeste suspensiooni kohta. EIA/RIA plaadi seondumusmahtuvus on 500 ng hiire IgG/cm².

Seondumine teostati 400 µl seondumispuhvril (1 x PBS, 0,1 % IGEPAL CA-630, pH 7,4) roteerudes 1 tunni jooksul ruumi temperatuuril. Märklaudivalku lisati Ni-NTA magnetiliste agaroskerakestele ~20 x ülehulgas (20 x magnetiliste agaroskerakeste seonduvusmahtuvus). Seondumata valgud eemaldati pestes pesemispuhvriga (1 x PBS, 0,1 % IGEPAL CA-630, 0,1 % BSA, pH 7,4) magnetihoidjal. EIA/RIA plaadil toimus märklaudivalgu seondumine 2 h toatemperatuuril. Seondumiseks kasutati 5 µg valku kannu kohta. Järgnevalt valgulahus eemaldati ning kanne inkubeeriti üleöö blokeerimislahusega (1 x PBS, 2 % BSA) temperatuuril 4°C.

3.3.2 Faagiraamatukogu paljundamine

Faagiraamatukogu lisati eelnevalt sobiva optilisele tiheduseni ($OD_{600} = 0,5$) paljundatud BLT5403 bakterite suspensioonile LB-s ning inkubeeriti tingimustel 200 pööret/min ja 37°C kuni bakterite lüüsumiseni (~90 min). Algse T7 faagiraamatukogu paljundamisel on sobivaks vahekorras 100-1000 bakterirakku faagi kohta. Faagid eraldati lüüsunud bakteri jääkidest tsentrifuugides 6 min 4°C juures kiirusega 8000 pööret/min (Sorvall ss-34). Supernatant säilitati 4°C juures.

3.3.3 Faagiraamatukogu tiitrimine

Tiitritavast faagiproovist tehti lahjenduste rida LB söötmesse vastavalt eeldatavale tiitrimistulemusele. 120 µl lahjendatud faagiproovi kanti 600 µl-sse BLT5615 bakterite kultuuri ($OD_{600}=0,5$). 600 µl faagide ja bakterite segu kanti 15 ml Falcon katsutisse. Faagide ja bakterite segule lisati 4 ml top-agarit (0,7 % agari lahus LB-s), millele oli lisatud isopropüül-1-tio-β-D-galaktopüranosiidi (IPTG) lõppkontsentratsiooniga 2 mM. Segu valati ampitsilliini sisaldavale LB-tardsöötme tassidele ning inkubeeriti üleöö toatemperatuuril. Faagilaigud loendati järgmisel päeval.

3.3.4 Faagiraamatukogu seondumine, pesemine ja elueerimine

Seondumine magnetkerakestel:

Magnetkerakestele seondatud valkudel tehtaval *in vitro* faagidispleil kasutati igas seondumisringis faagiraamatukogu koguses 10^8 pfu-d. Faagiraamatukogu lisati reaktsioonituubi, milles oli sihtmärkvalguga kaetud magnetkerakesed 400 μ l seondumise-
pesemisepuhvril (1 x PBS, 0,1 % IGEPAL CA-630, pH 7,4). Seondumine toimus rotaatoril 1 h toatemperatuuril. Pärast seondumist pesti kerakesi 4 x 1 minut seondumise-pesemisepuhvriga magnethoidjal ja elueeriti elueerimispuhvril (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 500 mM imidasool, 0,05% IGEPAL CA-630, pH 7,5) rotaatoril 15 minuti jooksul. Eluaat koguti eraldi reaktsioonituubi magnethoidjal, tiitriti ja paljundati BLT5403 bakterites. Saadud paljundatud faagikogum oli algmaterjaliks uuele seondumisringile.

Seondumine plaadil:

EIA/RIA plaadilt eemaldati blokeerimislahus ja kanne pesti 3 x PBS-ga. Faagiraamatukogu kogusega 2 x 10^9 pfu-d PBS + 2 % BSA lahuses kanti kannudesse ning inkubeeriti 68 h 4°C juures. Faagilahus eemaldati ning kanne pesti 6 x PBS + 0,1 % Tween-20 lahuses. Plaadil oleva valguga seondunud faage ei elueeritud, vaid paljundati esmalt otse mikrotiiterplaadil, lisades värskelt paljundatud 250 μ l $OD_{600}=0,5$ BLT5403 bakterikultuuri ning inkubeeriti 1 tund 37°C juures. Eelpaljundatud proov paljundati omakorda 3 ml värskelt paljundatud $OD_{600}=0,5$ BLT5403 bakterikultuuris, et saada faage suuremal hulgal.

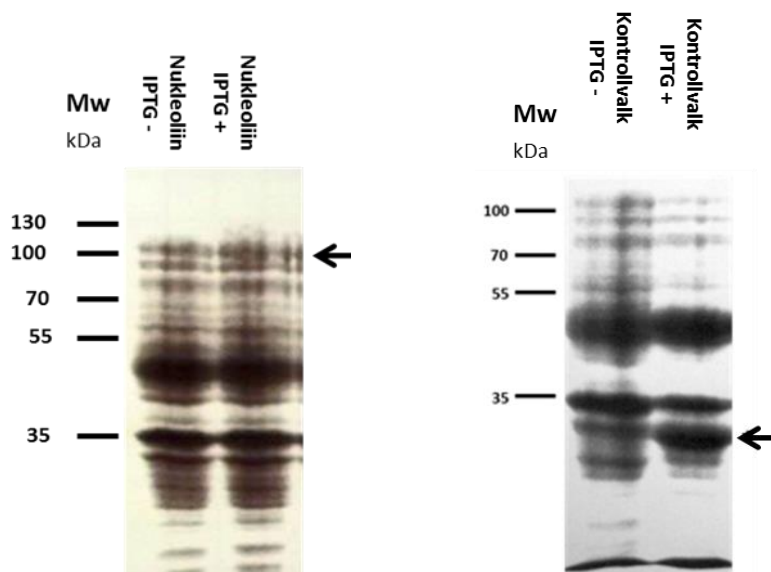
3.4 Spetsiifiliselt seonduvate faagide esitletud peptiidijärjestuste määramine ja joondamine

Rikastunud faagipopulatsiooni tiitrimistasside faagilaikudest võetud materjal viidi 30 μ L PBS-i. 1 μ L faagiproovi kanti 14 μ L-sse PCR reaktsioonisegusse: Solis Biodyne 5x HOT FIREPol® Blend Master Mix + 0,25 μ M T7SelectUP ja 0,25 μ M T7SelectDOWN praimerid. Proovid sekveneeriti Eesti Biokeskuse tuumiklaboris. Sekveneeritud DNA järjestuse abil määrati faagi poolt esitletava peptiidi järjestus. Peptiidid joondati, kasutades programmi „CLC Sequence Viewer“.

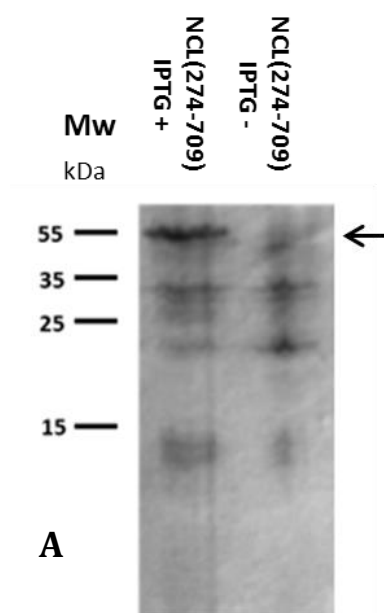
4 Tulemused ja arutelu

4.1 Nukleoliini fragmendi 274-709 kloneerimine ja ekspressioon

Et teostada T7 faagiraamatukogu *in vitro* seondumine nukleoliinile, ekspresseeriti ja puhastati nukleoliini valk *E. coli* bakterist BL21(DE3) Rosetta PlyS. Algne pRSET-NCL konstruktsioon saadi AddGene plasmiidide varamust ning sellega transformeeriti BL21(DE3) rakke. Kuid nukleoliini ekspressioon bakteris ei õnnestunud (Joonis 8). Kirjanduse põhjal võib oletada, et nukleoliini N-terminaalne happeline regioon takistab nukleoliini tootmist detekteeritavas koguses (Hanakahi *et al.*, 2000). Selle probleemi ületamiseks otsustati eemaldada nukleoliini N-terminaalne osa, jättes alles aminohapped 274-709. pRSET-NCL konstrukti kasutati matriitsina pET28a(+)-NCL(274-709) konstrukti valmistamiseks. pET28a(+)-NCL(274-709) konstruktiga transformeeriti BL21(DE3) Rosetta PlyS rakke. pET28a(+)-NCL(274-709) konstrukti oli võimeline lühendatud nukleoliini tootma (Joonis 9).



Joonis 8. Nukleoliini ekspressiooni kontroll. Nukleoliini (pRSET plasmiidilt) ja kontrollvalgu (*E. coli* vabastav faktor 2, plasmiidilt pET24a (+)) ekspressiooniks kasutati BL21(DE3) rakke. IPTG-ga indutseeritud ja indutseerimata rakkude lüsaate analüüsiti SDS-polüakrüülamiidgeelil. Valkude detekteerimiseks värviti geelid *coomassie* sinisega. Ekspresseeritud valgu eeldatav asukoht geelil on tähistatud noolega. Geelipildidelt on näha, et nukleoliini ekspressioon ei õnnestunud.

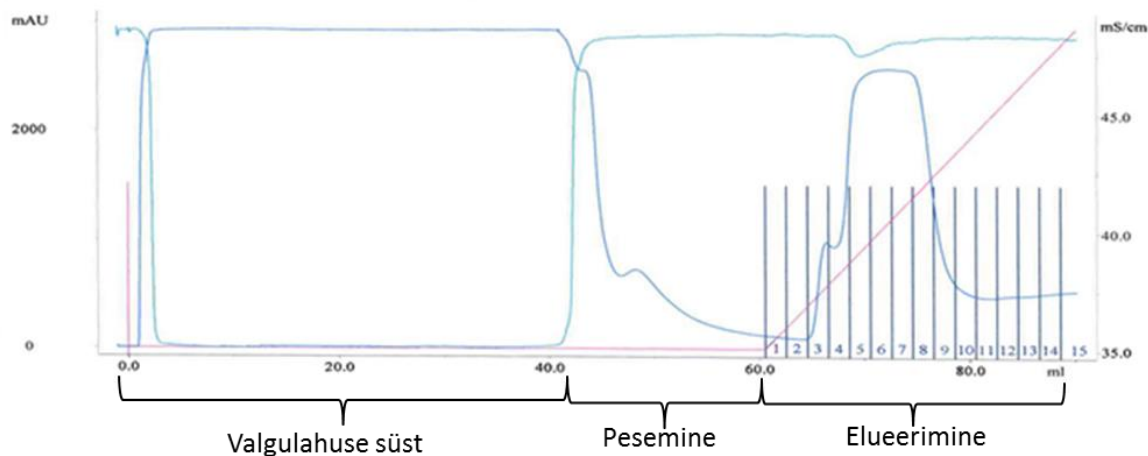


Joonis 9. Nukleoliini fragmendi 274-709 ekspressiooni ja lahustuvuse kontroll.

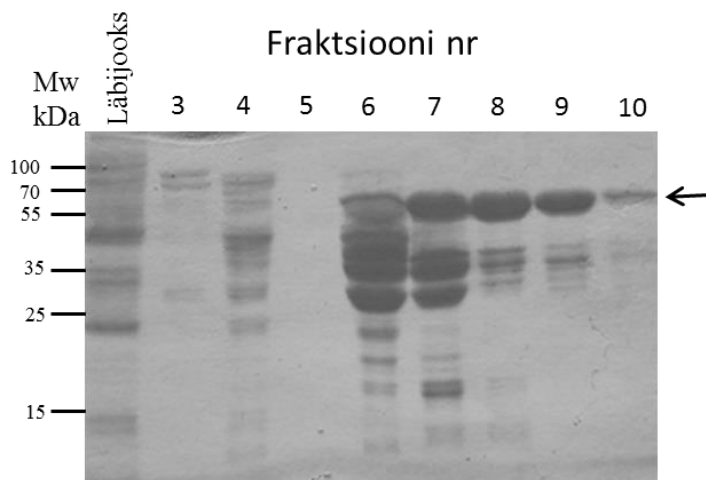
A. pET28a(+)-NCL(274-709) konstruktiga transformeeriti BL21 (DE3) Rosetta PlysS rakke. IPTG-ga indutseeritud ja indutseerimata rakkude lüsaadid analüüsiti SDS-polüakrüülamiidgeelil ning värviti *coomassie* sinisega. Nukleoliini fragmendi 274-709 eeldatav asukoht geelil on tähistatud noolega. Geelipildilt on näha, et IPTG-induktsiooniga nukleoliini fragmendi 274-709 tootmine õnnestus.

4.2 Nukleoliini fragmendi 274-709 puhastamine

Nukleoliini fragmendi 274-709 ekspressiooniks kasutati BL21(DE3) Rosetta PlysS rakke. Ekspresseerunud valgu puhastamiseks kasutati 2 x 1 ml HisTrap kolonne (GE Healthcare Life Sciences) ja ÄKTA valgupuhastussüsteemi. HisTrap kolonn võimaldab 6 x His sabaga valke eraldada teistest 6 x His saba mitte omavatest valkudest. Elueerimine viidi läbi gradientmeetodil. Eluaat koguti 2 ml fraktsioonidena. ÄKTA valgupuhastussüsteem mõõtis elueeruva valgulahuse neelduvust lainepikkusel 280 nm ning koostas selle põhjal kromatogrammi (Joonis 10). Kromatogrammi järgi elueerunud valku sisaldavatele fraktsioonidele tehti SDS-polüakrüülamiid-geelelektroforees ning värviti *coomassie* sinisega (Joonis 11). Kõige puhtamateks eluatsioonifraktsioonideks olid 8.-10. fraktsioon, mis kombineeriti ning dialüüsiti. Puhastatud valku saadi 9 mg.



Joonis 10. Nukleoliini fragmendi 274-709 puhastamise kromatogramm. Neelduvust mõõdeti 280 nm juures. Punase joonega on tähistatud imidasooli kontsentratsiooni tõus. Sinine joon tähistab neelduvuse muutust. Sinakasroheline joon tähistab lahuse elektrijuhtivuse muutust. Eluatsioonifraktsioonid koguti 2 ml kaupa. Fraktsioonid on tähistatud vertikaalsete joontega ning numbritega.



Joonis 11. Nukleoliini fragmendi 274-709 eluatsiooni fraktsioonide analüüs. Valgu puhastamisel elueeritud valku sisaldavad fraktsioonid analüüsiti SDS-PAGE meetodil ning geel värviti *coomassie* sinisega. Noolega on tähistatud nukleoliini fragmendi eeldatav asukoht geelipildil.

4.3 *In vitro* faagidisplei

4.3.1 Histidiini sisaldavaid peptiidide esitlevate faagide eemaldamine faagiraamatukogudest

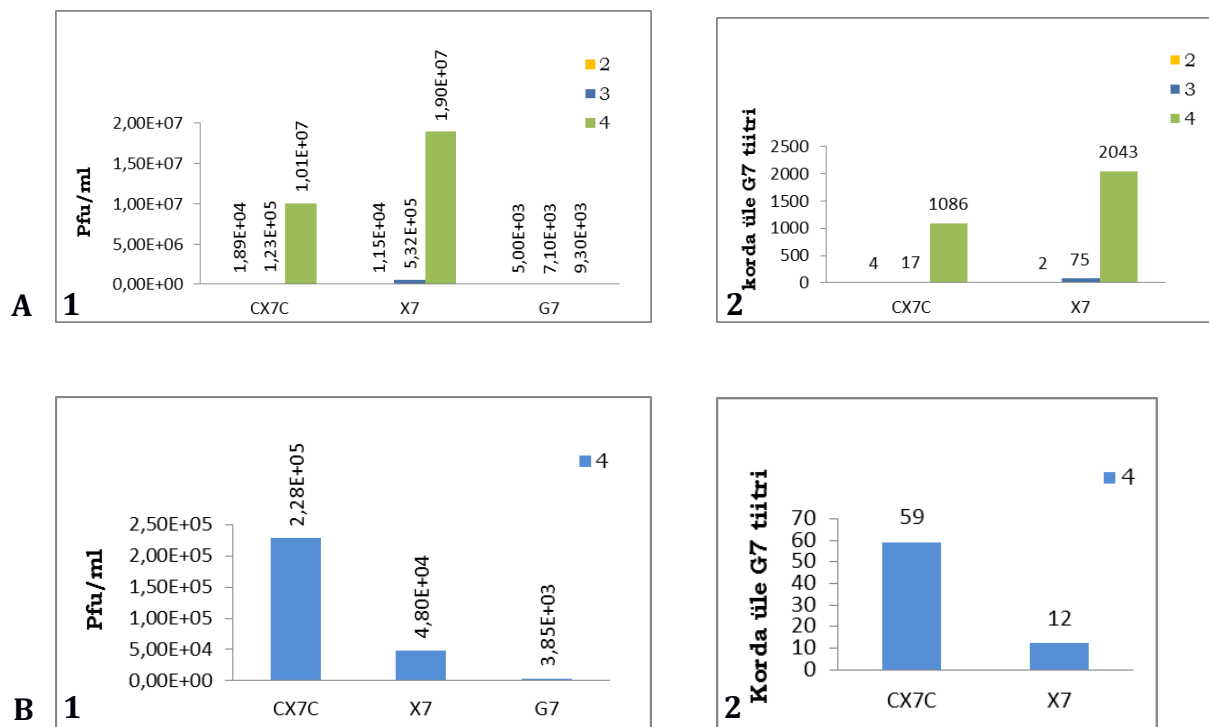
Kasutatud faagiraamatukogudeks olid X7 ja CX7C raamatukogud. CX7C faagiraamatukogu eeliseks on peptiidide tsüklilisus, mis muudab nad vastupidavamaks *in vivo* proteaase degradatsiooni suhtes. Faagidisplei teostati nukleoliini fragmendil 274-709 ja tenastiin C domeenil FnIII-C (puhastatud Prakash Lingasamy poolt). Pärast esimesi faagidisplei seondumisringe märklaudvalguga kaetud magnetkerakestel oli näha CX7C ja X7 faagiraamatukogude tiitri tõusu üle taustseondumist näitava G7 faagi tiitri, mis näitas, et faagiraamatukogudes oli toimunud spetsiifiliselt seonduvate faagide osakaalu tõus (faagiraamatukogu rikastumine). Kuid pärast sekveneerimist selgus, et ülekaalus olid histidiini sisaldavate peptiididega faagid. Seetõttu ei olnud võimalik leida motiive, mis seonduvad meid huvitavate valkudega. Põhjuseks oli histidiini sisaldavaid peptiide kandvate faagide seondumine magnetkerakeste vabade Ni^{2+} -NTA-rühmadega. Selle vältimiseks prooviti mitmeid meetmeid: imidasooli kõrgem kontsentratsioon (5-75 mM) seondumispesemisepuhvril, histidiini sisaldavate peptiididega faagide viimine miinimumini, sidudes neid algsest raamatukogust Ag^{2+} -NTA nanokerakestega, vabade Ni^{2+} -NTA-de blokeerimine 7 x His peptiidi presenteerivate UV-kiirgusega inaktiveeritud T7 bakteriofaagidega. Ükski neist meetmetest ei töötanud piisavalt efektiivselt, et histidiini sisaldavate peptiididega faagide eelistatud selekteerumisest vabaneda. Probleemi lahendas esimese seondumisringi teostamine kõrge valgusiduvusega 96-kannuga EIA/RIA mikrotiiterplaadil, kuna seal ei toimu histidiini sisaldavate peptiididega faagide spetsiifilist seondumist statsionaarse faasiga.

4.3.2 Faagidisplei nukleoliini fragmendil 274-709 ja tenastiin C domeenil FnIII-C

Faagidisplei esimene seondumisring nii nukleoliini fragmendil 274-709 kui ka TNC domeenil FnIII-C tehti kõrge valgusiduvusega EIA/RIA mikrotiiterplaadil. Esimeses seondumisringis seondunud faage ei elueeritud vaid paljundati otse mikrotiiterplaadil. Järgnevad seondumisringid tehti Ni^{2+} -NTA magnetilistel agaroskerakestel. Tenastiin C domeenil

FnIII-C toimus faagiraamatukogude X7 ja CX7C rikastumine kontrollfaagi suhtes pärast nelja seondumisringi. Neljandas seondumisringis tehti kontrolliks faagiraamatukogude seondamine katmata magnetilistele agaroskerakestele. Faagiraamatukogud seondusid katmata magnetilistele agaroskerakestele oluliselt vähem kui tenastiin C domeenile FnIII-C, millest võis eeldada, et faagiraamatukogude rikastumine oli toimunud TNC domeeniga FnIII-C spetsiifiliselt seonduvate faagide arvelt (Joonis 12). Nukleoliini fragmendil 274-709 rikastumist ei toimunud. Põhjuseks võib olla see, et raamatukogudes ei leidunud peptiide, mis seonduks nukleoliini fragmendiga piisavalt tugevalt. TNC domeenil FnIII-C rikastunud faagiraamatukogudest sekveneeriti 48 faagi pinnavalgu poolt presenteeritud peptiidi DNA järjestus (Tabel 2) ning need peptiidid joondati (Joonis 13). Joondamistulemusest oli näha, et kõige sagedasemaks motiiviks rikastunud CX7C ja X7 faagiraamatukogudes oli RGRL motiiv. Paljudele tenastiin C domeeniga FnIII-C spetsiifiliselt seonduvatele peptiidide järjestustele oli lisandunud KLAALE järjestus, mis tulenes raaminihkemutatsioonist peptiidi kodeeriva DNA järjestuses. Mutatsioonide tõttu olid rikastunud CX7C faagiraamatukogu peptiidid kaotanud tsüklilisuse. Sekveneeritud peptiidide hulgast valiti välja huvipakkuvad peptiidid nii, et oleks esindatud RGRL motiiviga ja RGRL motiivita ning KLAALE lõpujärjestusega ja KLAALE lõpujärjestuseta peptiidid. Spetsiifilisuse ja seonduvustugevuse määramiseks seondati valitud peptiide kandvaid faage tenastiin C domeenile FnIII-C, nukleoliini fragmendile 274-709 ja katmata magnetilistele agaroskerakestele. Seondumiskatsete tulemustest oli näha, et TNC domeeniga FnIII-C tugevalt seonduvate peptiidijärjestustega faagid seondusid nukleoliini fragmendile 274-709 ja katmata magnetilistele agaroskerakestele taustseondumise tasemel (Joonis 14). Tenastiin C domeeniga FnIII-C seondus kõige tugevamalt AVRGRRLVAKLAALE peptiidi esitlev faag. AVRGRRLVAKLAALE järjestuses tõusevad esile RGRL motiiv, mis oli rikastunud faagiraamatukogudes enim esindatud ning KLAALE lõpujärjestus. Vähibioloogia laboris, kus antud magistritöö valmis on näidatud, et SSVDKLAALE peptiidi esitlevad faagid seonduvad TNC domeenile FnIII-C taustseondumise tasemel (avaldamata andmed). Millised aminohapped on vajalikud seondumiseks TNC domeenile FnIII-C on veel selgitamisel. Varasemate teadusuuringute käigus on faagidisplei meetodi abil leitud TNC-ga seonduvaid peptiide Ph.D.-12 faagiraamatukogust (12 aminohappeliste peptiidide faagiraamatukogu) järjestuslogoga FHKH/PXXPXXSP/AX (Kim *et al.*, 2012). On leitud ka nukleoliiniga seonduv peptiid järjestusega AKVKDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK (F3 peptiid) (Christian *et al.*, 2003; Porkka *et al.*, 2002).

Järgmiseks etapiks oleks vaja tõestada tenastiin C domeeniga FnIII-C seonduvate peptiidide seondumist tenastiin C domeenile FnIII-C vähi rakuliinis ning uurida *in vivo* akumulereeruvust vähikoes ja normaalsetest organites.



Joonis 12. T7 faagiraamatukogude rikastumine tenastiin C domeenil FnIII-C *in vitro* faagidispleis.

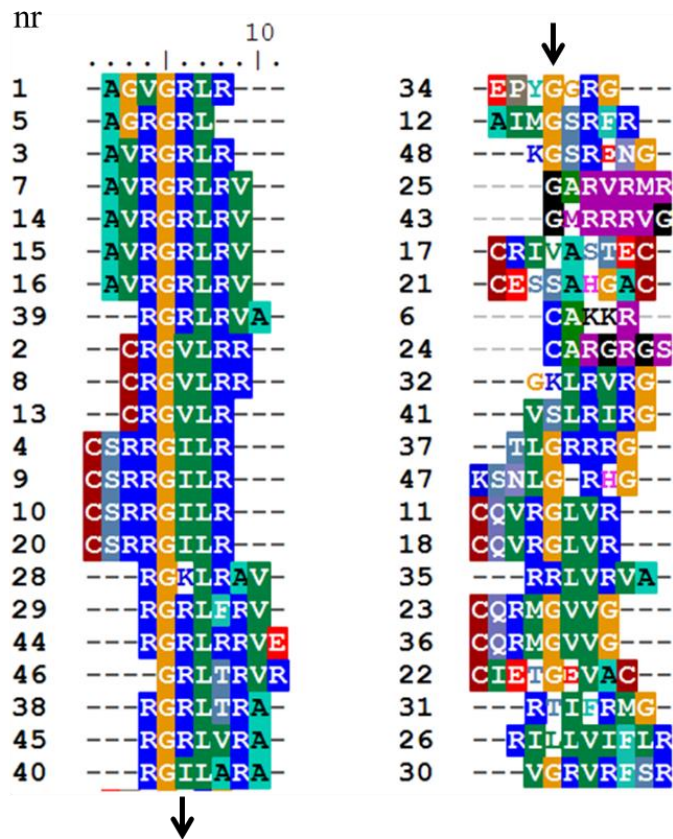
A1 - faagidisplei seondumisringides 2-4 elueerunud faagiraamatukogude tiitrid. **A2** - seondumisringides 2-4 elueerunud faagiraamatukogude tiitri suhe kontrollfaagi G7 tiitriga. Seondumisringides oli faagiraamatukogude sisendhulgaks 10^8 pfu-d.

B. Seondumisringis 4 teostatud faagiraamatukogude seondumine katmata magnetilistele agaroskerakestele. **B1** – Elueerunud faagiraamatukogu tiiter. **B2** – elueerunud faagiraamatukogu tiitri suhe kontrollfaagi G7 tiitriga. Faagiraamatukogu sisendhulgaks oli 10^8 pfu-d.

Tabel 2. Neljandas seondumisringis tenastsiin C domeenil FnIII-C rikastunud CX7C ja X7 faagiraamatukogudest sekveneeritud 48 faagi peptiidide järjestused.

Nr.	Raamatukogu	Valk	Peptiid	Nr.	Raamatukogu	Valk	Peptiid
1	CX7C	TNC FnIII-C	AGVGRLRRAKLAAALE	25	X7	TNC FnIII-C	GARVRMRKLAALAALE
2	CX7C	TNC FnIII-C	CRGVLRRRAKLAAALE	26	X7	TNC FnIII-C	MGYGMRGKLTPTYQAKKKNSTGDLFAE
3	CX7C	TNC FnIII-C	AVRGRLRVAKLAAALE	27	X7	TNC FnIII-C	E
4	CX7C	TNC FnIII-C	CSRRGILRAKPAAALE	28	X7	TNC FnIII-C	RGKLRAV
5	CX7C	TNC FnIII-C	AGRGLRVRAKLAAALE	29	X7	TNC FnIII-C	RGRLFRV
6	CX7C	TNC FnIII-C	CAKKR	30	X7	TNC FnIII-C	VGRVRFSRKLAALAALE
7	CX7C	TNC FnIII-C	AVRGRLRVAKLAAALE	31	X7	TNC FnIII-C	RTIFRMGKLAALAALE
8	CX7C	TNC FnIII-C	CRGVLRRRAKLAAALE	32	X7	TNC FnIII-C	GKLRVRGKLAALAALE
9	CX7C	TNC FnIII-C	CRGVLRRRAKLAAALE	33	X7	TNC FnIII-C	IKRKVVGKLTTPSAENSENSLQRFHRN
10	CX7C	TNC FnIII-C	CSRRGILRAKPAAALE	34	X7	TNC FnIII-C	EPYGGRGKLAALAALE
11	CX7C	TNC FnIII-C	CQVRGLVRRRAKLAAALE	35	X7	TNC FnIII-C	RRLVVA
12	CX7C	TNC FnIII-C	AIMGSRFRAKLAAALE	36	X7	TNC FnIII-C	CQRMGVVGAKLAALAALE
13	CX7C	TNC FnIII-C	CRGVLRRRAKLAAALE	37	X7	TNC FnIII-C	TLGRRRGKLAALAALE
14	CX7C	TNC FnIII-C	AVRGRLRVAKLAAALE	38	X7	TNC FnIII-C	RGRLTRA
15	CX7C	TNC FnIII-C	AVRGRLRVAKLAAALE	39	X7	TNC FnIII-C	RGRLVA
16	CX7C	TNC FnIII-C	AVRGRLRVAKLAAALE	40	X7	TNC FnIII-C	RGILARA
17	CX7C	TNC FnIII-C	-	41	X7	TNC FnIII-C	VSLRIRGKLAALAALE
18	CX7C	TNC FnIII-C	CQVRGLVRRRAKLAAALE	42	X7	TNC FnIII-C	MRLWPKGKLAALAALE
19	CX7C	TNC FnIII-C	-	43	X7	TNC FnIII-C	GMRRRVGKLAALAALE
20	CX7C	TNC FnIII-C	CSRRGILRAKPAAALE	44	X7	TNC FnIII-C	RGRLRRVE
21	CX7C	TNC FnIII-C	CESSAHGAC	45	X7	TNC FnIII-C	RGRLVRA
22	CX7C	TNC FnIII-C	CIETGEVAC	46	X7	TNC FnIII-C	GRLTRVR
23	CX7C	TNC FnIII-C	CQRMGVVGAKLAALAALE	47	X7	TNC FnIII-C	KSNLGRHG
24	CX7C	TNC FnIII-C	CARGRGS AKLAALAALE	48	X7	TNC FnIII-C	KGSRENG

Peptiidi



Joonis 13. Tenastiin C domeenil FnIII-C rikastunud faagiraamatukogust sekveneeritud peptiidide joondatud järjestused. Eemaldatud on KLAALE järjestused, mis olid lisandunud raaminihke mutatsiooni tõttu peptiidi kodeeriva DNA järjestuses. Joondamistulemusest on näha, et kõige sagedasemaks motiiviks on RGRL motiiv. Noolega on tähistatud joondustulba järg.

5 Kokkuvõte

Kasvajate keemiaravis kasutatavad ravimid surmavad küll kasvaja rakke, kuid on mürgised ka keha teistele rakkudele. Seetõttu toimub pidev uurimus- ja arendustöö kasvajaravis kasutatavate ravimite tõhususe tõstmiseks. Üheks võimaluseks on suunata ravim spetsiifiliselt kasvaja rakkudeni. Kasvaja rakkudel, vähi stroomas ja angiogeensete veresoonte endoteeli rakkudel kasvajas on markervalgud, mida ei esine teistes normaalsetes keha kudedes või esineb vähesel hulgal. Neid valke ära kasutades on võimalik välja töötada ligandid, mille abil on võimalik suunata ravim selektiivselt kasvaja rakkudeni. Nii saaks suurendada ravimi kontsentratsiooni kasvajas ilma ravimi annuseid tõstmata. Sellisteks valgudeks on näiteks nukleoliin ja tenastiin C, mis olid ka antud magistritöös uurimise all. Eesmärgiks oli leida peptiidimotiive, mis seonduks spetsiifiliselt nukleoliini fragmendiga 274-709 ja domeeniga FnIII-C valgus tenastiin C. Skriinimismeetodina kasutati faagidisplei meetodit. Nukleoliini fragmendil 274-709 tehtud skriiningute käigus ei toimunud faagiraamatukogude rikastumist, kuid tenastiin C domeenil FnIII-C see õnnestus. Tenastiin C domeeniga FnIII-C seonduvates peptiidides oli kõige levinumaks tugevalt seonduvaks motiiviks RGRL motiiv. Töö järgmiseks etapiks tuleks valideerida tenastiin C domeeniga FnIII-C seonduvate peptiidide seondumist vähi rakuliinidel ning *in vivo* loomudelitel.

6 Summary in English

Drugs used in tumor chemotherapy kill tumor cells but are also toxic to other cells in the body. This is why there is continuous research and development being done to improve tumor drugs. One way of increasing tumor drugs efficacy is to selectively target tumor cells. Tumor cells, tumor stroma and endothelial cells in angiogenic blood vessels near tumor have marker proteins that are not present in other normal tissues or are present at low amount. Using these proteins we can develop ligands that selectively target tumor cells. This is the way we could increase drug concentration in the tumor without increasing drug doses. In this thesis Nucleolin and Tenascin-C were under research as tumormarkers. The goal was to find peptide motives that specifically bind to nucleolin fragment 274-709 and FnIII-C domain of tenascin-C. Phage display was used to screen CX7C and X7 phage libraries on nucleolin(274-709) and on FnIII-C domain of tenascin-C. As a result we found peptides that bound to FnIII-C domain of tenascin-C ~4000 times over background binding. With nucleolin fragment 274-709 we could not find peptides that would bind significantly over background binding. The reason may be that there were no peptides in the libraries that would bind truncated nucleolin strongly enough to be selected out. The most common strongly binding peptide motif in peptides binding to FnIII-C domain of tenascin-C was RGRL motif. Next step would be to validate binding and specificity in tumor cellculture and in animal model.

7 Tänuavaldus

Antud magistritöö valmis Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi Vähibioloogia uurimisgrupis. Suured tänud minu juhendajatele professor Tambet Teesalule, professor Margus Poogale, Prakash Lingasamyle ning Pille Säälikule, kes juhendasid mind uurimistööl ajal ning kes tegid võimalikuks antud magistritöö kirjutamise. Samuti tänan Vähibioloogia uurimisgrupi liikmeid sõbralikkuse ja motivatsiooni eest.

8 Viited

Albrechtsen R., Nielsen M., Wewer U., Engvall E. ja Ruoslahti E. (1981). Basement Membrane Changes in Breast Cancer Detected by Immunohistochemical Staining for Laminin. *CANCER RESEARCH* 41, lk 5076-5081.

Arap W., Pasqualini R. ja Ruoslahti E. (1998). Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. *Science* 279, lk 377-380.

Azzi S., Hebda J. K. ja Gavard J. (2013). Vascular permeability and drug delivery in cancers. *Frontiers in Oncology* 3:211.

Behrem S., Žarkovic K., Eškinja N ja Jonjic N. (2005). Distribution Pattern of Tenascin-C in Glioblastoma: Correlation with Angiogenesis and Tumor Cell Proliferation. *PATHOLOGY ONCOLOGY RESEARCH* 11 (4), lk 229-235.

Bicknella K., Brooksa G., Kaiserb P., Chenc H., Doved B. K. ja Hiscox J. A. (2005). Nucleolin is regulated both at the level of transcription and translation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332 (3), lk 817-822.

Chen X., Shank S., Davis P. B. ja Ziady A. G. (2011). Nucleolin-Mediated Cellular Trafficking of DNA Nanoparticle Is Lipid Raft and Microtubule Dependent and Can Be Modulated by Glucocorticoid. *Molecular Therapy* 19 (1), lk 93-102.

Chiquet-Ehrismann R. ja Chiquet M. (2003). Tenascins: regulations and putative functions during pathological stress. *Journal of Pathology* 200, lk 488-499.

Christian S., Pilch J., Akerman M. E., Porkka K., Laakkonen P. ja Ruoslahti E. (2003). Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *The Journal of Cell Biology* 163 (4), lk 871-878.

Ginisty H., Sicard H., Roger B., Bouvet P. (1999). Structure and function of nucleolin. *Journal of cell science* 112, lk 761-772.

Hanakahi, L.A., Bu Z., and Maizels N. (2000). The C-Terminal Domain of Nucleolin Accelerates Nucleic Acid Annealing. *Journal of Cell Science* 112, lk 761-772.

Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean J. W., Thurston G., Roberge S., Jain R. K. ja McDonald D. M. (2000). Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness. *The American Journal of Pathology* 156 (4), lk 1363-1380.

Hobbs S. K., Monsky W. L., Yuan F., Roberts W. G., Griffith L., Torchilin V. P. ja Jain R. K. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (8), lk 4607–4612.

Hoffman J. A., Giraudo E., Singh M., Zhang L., Inoue M., Porkka K., Hanahan D. ja Ruoslahti E. (2003). Progressive vascular changes in a transgenic mouse model of squamous cell carcinoma. *Cancer Cell* 4, lk 383–391.

Hovanessian A. G., Soundaramourty C., Khoury D. E., Nondier I., Svab J. ja Krust B. (2010). Surface Expressed Nucleolin Is Constantly Induced in Tumor Cells to Mediate Calcium-Dependent Ligand Internalization. *PLoS One*, 5(12).

Huret J-L., Dessen P. ja Bernheim A. (2003). An internet database on genetics in oncology. *Oncogene* 22, lk 1907. Veebiaadress: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_TNC.html, külastatud 07.03.2015.

Järvinen T. A. ja Ruoslahti E. (2007). Molecular changes in the vasculature of injured tissues. *The American Journal of Pathology* 171, lk 702–711.

Kalluri R. ja Zeisberg M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6, lk 392-401.

Kim M. Y., Kim O. R., Choi Y. S., Lee H., Park K., Lee C.-T., Kang K. W. ja Jeong S. (2012). Selection and Characterization of Tenascin C Targeting Peptide. *Journal of Molecules and Cells* 33, lk 71-77.

Krumpe L. R. H. ja Mori T. (2006). The Use of Phage-Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 12 (1), lk 79-91.

Laakkonen P., Porkka K., Hoffman J. A. ja Ruoslahti E. (2002). A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nature Medicine* 8, lk 751–755.

Lu P., Weaver V. M. ja Werb Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology* 196 (4), lk 395-406.

Marcucci F., Elena R., Corti A., Raffaele S., ja Berenson R. (2014). WAYS TO IMPROVE TUMOR UPTAKE AND PENETRATION OF DRUGS INTO SOLID TUMORS. *Frontiers in Oncology*, lk 2. Frontiers Media SA.

McDonald D. M. ja Baluk P. (2002). Significance of Blood Vessel Leakiness in Cancer. *CANCER RESEARCH* 62, lk 5381-5385.

Midwood K. S., Hussenet T., Langlois B. ja Orend G. (2011). Advances in tenascin-C biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68 (19), lk 3175-3199.

Midwood K. S. ja Orend G. (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling* 3 (3-4), lk 287-310.

Miller F. R. (2005). Modelling Tumour Tissue Interactions. *The Cancer Handbook*, peatükk 66.

McDougall S.R., Anderson A.R.A., Chaplain M.A.J. (2006). Mathematical modelling of dynamic adaptive tumour-induced angiogenesis: Clinical implications and therapeutic targeting strategies. *Journal of Theoretical Biology* 241(3), lk 564-589.

Orend G. ja Chiquet-Ehrismann (2006). Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Letters* 244 (2), lk 143-163.

Pasqualini R., Koivunen E. ja Ruoslahti E. (1997). Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotechnology* 15 (6), lk 542-546.

Porkka K., Laakkonen P., Hoffman J. A., Bernasconi M. ja Ruoslahti E. (2002). A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells *in vivo*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (11), lk 7444-7449.

Rajotte D., Arap W., Hagedorn M., Koivunen E., Pasqualini R. ja Ruoslahti E. (1998). Molecular Heterogeneity of the Vascular Endothelium Revealed by In Vivo Phage Display. *The Journal of Clinical Investigation* 102 (2), lk 430-437.

Shang B., Cao Z. and Zhou Q. (2012). Progress in tumor vascular normalization for anticancer therapy: challenges and perspectives. *Frontiers of Medicine* 6(1), lk 67-78.

Shi H., Huang Y., Zhou H., Song X., Yuan S., Fu Y. ja Luo Y. (2007). Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. *Blood* 110 (8), lk 2899-2906.

Silacci M., Brack S. S., Späth N., Buck A., Hillinger S., Arni S., Weder W., Zardi L. ja Neri D. (2006). Human monoclonal antibodies to domain C of tenascin-C selectively target solid tumors *in vivo*. *Protein Engineering, Design & Selection* 19(10), lk 471-478.

Srivastava M. ja Pollard H. B. (1999). Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *The FASEB Journal* 13 (14), lk 1911-1922.

Zhang L., Hoffman J. A. ja Ruoslahti E. (2005). Molecular profiling of heart endothelial cells. *Circulation* 112, lk 1601–1611.

Lisad

Lisa 1. Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Markko Salumäe (sünnikuupäev: 25.06.1989)

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

„Nukleoliini ja tenastiin C FnIII-C domeeniga seonduvate peptiidimotiivide identifitseerimine,“

mille juhendajad on professor Tambet Teesalu ja professor Margus Pooga.

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 26.05.2015.