

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Annika Jürimäe

**Immuunsüsteemi vältivate peptiidide tuvastamine
faagidisplei meetodil *in vivo* tingimustes**

Magistritöö

Juhendajad: Kuldar Kõiv, MSc

Sulev Ingerpuu, PhD

Tartu

2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 Nanotehnoloogia, nanopartiklid ja nanomeditsiin	5
1.1.1 Nanotehnoloogia ja meditsiin.....	5
1.1.2 Nanopartiklite immunogeensus ja immuunsüsteemi vältivad nanopartiklid.....	8
1.2 Eksogeensete (polü)peptiidide kuvamine faagide pinnal	11
1.2.1 Lüütiline bakteriofaag T7	12
1.2.2 Faagi kuvamise meetod ja nanopartikli pinna omaduste muutmine	13
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	15
2.1 Töö eesmärgid.....	15
2.2 Materjal ja meetodika	16
2.2.1 T7 bakteriofaagil põhinevad peptiidsed CX7C raamatukogud 415-1 ja 10-3b..	17
2.2.2 Faagi paljundamine, puhastamine ja tiitrimine	17
2.2.3 Peptiide kodeerivate oligonukleotiidide klonereimine bakteriofaag T7 multiklonereimisregiooni	18
2.2.4 Faagi DNA sekveneerimine Sanger meetodil	19
2.2.5 <i>In vivo</i> faagi kuvamine	19
2.2.6 Verest DNA eraldamine	21
2.2.7 Kõrge läbilaskevõimega Ion Torrent platvormil baseeruv DNA sekveneerimine, kvantifitseerimine ja saadud andmete analüüs	21
2.3 Tulemused ja arutelu.....	22
2.3.1 CD47 peptiid ja T7 sabafiibrivalgu mutatsioon Gp17-E ₂₁₁	23
2.3.2 Peptiidsete faagiraamatukogude selektsioonikatsed <i>in vivo</i> tingimustes.....	24
KOKKUVÕTE	39
SUMMARY	40
TÄNUAVALDUSED.....	41
KIRJANDUSE LOETELU.....	42
LISAD	48
LIHTLITSENTS.....	58

KASUTATUD LÜHENDID

10A/10B	Bakteriofaag T7 kapsiivalgud 10A ja 10B (<i>T7 bacteriophage major capsid protein 10A and 10B</i>)
BLT 5403	<i>E. coli</i> ehk kolibakteri tüvi faagi T7 amplifitseerimiseks
BLT 5615	<i>E. coli</i> ehk kolibakteri tüvi faagi T7 tiitrimiseks
CD172a	CD47 valgu ligand (<i>Cluster of Differentiation 172 antigen</i>)
CD47	Transmembraanne retseptorvalk 47 (<i>Cluster of Differentiation 47</i>)
CD95L	CD 95 ligand (<i>Cluster of Differentiation 95 Ligand</i>)
CD95R	CD 95 retseptor (<i>Cluster of Differentiation 95 Receptor</i>)
Gp10	Geeni 10 valk; bakteriofaag T7 kapsiivalk (<i>Gene Product 10</i>)
Gp17	Geeni 17 valk; bakteriofaag T7 sabafiibrivalk (<i>Gene Product 17</i>)
PEG	Polüetüleenglükool (<i>Polyethylen glycol</i>)

SISSEJUHATUS

Haiguse diagnoosimisel ning ravimisel tuleks lähtuda põhimõttest saada maksimaalne toime minimaalse koguse ravimi või diagnostilise vahendiga. Enamasti jaotuvad manustatud ravimpreparaadid ühtlaselt nii haigetes kui ka tervetes kudedes. Et tagada toimeaine efektiivne kontsentratsioon haiguskoldes, peab sageli ravimit manustama üleliias. Tagajärgedeks võivad olla toksilisus ning soovimatud kõrvalmõjud.

Probleemi lahendaksid ravimeid tarnivad nanopartiklid, mis kaitsevad terveid kudesid ravimite aktiivsete komponentide eest ning akumulerevad vaid piirkonnas, kus ravimi toime avaldumine on vajalik. Sellisel otstarbel rakendatavate nanopartiklite juures on võime piisavalt kaua veres ringelda väga oluline eeldus selleks, et ravim jõuaks sihtmärkkohta. Teooria rakendamist takistavad *in vivo* interaktsioonid nanopartiklite ning vere komponentide vahel, mille tulemusena kõrvaldatakse tekkinud kompleksid koos ravimiga vereringest üsna kiiresti (Dobrovolskaia jt., 2008).

Käesoleva töö esimeses peatükis antakse ülevaade nanotehnoloogiast ja nanopartiklite kasutusala meditsiinis. Seejärel käsitletakse töö eesmärgist lähtuvaid probleeme seoses nanopartiklite ning immuunsüsteemiga. Lisaks eelnevale kirjeldatakse ka faagi pinnal eksogeensete (polü)peptiidide kuvamise meetodit (ingl.k. *phage display*; ka faagidisplei, faagi kuvamise meetod). Töö eksperimentaalses osas rakendatakse faagi kuvamise meetodit leidmaks peptiide, mis võimaldaksid neid peptiide ekspresseerivatel faagidel kauem vereringes püsida.

Töö koostati Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudis, vähibioloogia uurimisgrupis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Nanotehnoloogia, nanopartiklid ja nanomeditsiin

Nanotehnoloogia on teadus- ja tehnoloogiaharu, kus rakendatakse materjalide osakesi, mille vähemalt üks mõõde jääb vahemikku ~1-100 nm (Lövestam jt., 2010). Nanoteaduste ning -tehnoloogia idee ja kontseptsioon sai alguse füüsiku Richard Feynman kõnest „*There is Plenty of Room at the Bottom*“ Ameerika Füüsika Seltsi kohtumisel Californias (1959). Feynman kirjeldas protsessi, mille käigus oleksid teadlased võimelised mõjutama materjale üksikute aatomite ning molekulide tasandil (Feynman, 1960). Tähtsat rolli nanotehnoloogia arengus on mänginud kõrge lahutusvõimega mikroskoopide (nt aatomjõu mikroskoop) ja tuumamagnetresonants meetodi väljatöötamine (Sanchez ja Sobolev, 2010). Nanotehnoloogia leiab rakendust näiteks toiduaine- ja keemiatööstuses, ehitustegevuses, materjaliteaduses, ravimiarenduses ning biomeditsiinis. Kahel viimasel juhul võimaldavad nanomõõtmelised osakesed (nanoosakesed, -partiklid) arendada uusi ja tõhusamaks muuta olemasolevaid ravimeid ning diagnostilisi meetodeid (Salata, 2004).

1.1.1 Nanotehnoloogia ja meditsiin

Nanomaterjalide unikaalsed füüsikalised-keemilised omadused (väikesed mõõtmed, suur pindala-massi suhe ja kõrge reaktiivsus) võimaldavad ületada piiranguid, mille seavad traditsioonilised diagnostilised ning terapeutilised vahendid (Zhang jt., 2008). Nanotehnoloogia võimaldab, vastavalt vajadusele, muuta nanoosakeste ja -materjalide lahustuvust, jaotumist organismis, veres ringlemise aega, farmakokineetikat ja immunogeensust (Dobrovolskaia jt., 2008). Ravimipreparaate saab liita nanopartiklite koosseisu kas partiklisse kapseldatuna või pinnale seotuna. Viimase 20 aasta jooksul on tutvustatud mitmeid nanopartiklipõhiseid ravimeid, mida saaks kasutada nt vähkkasvajate, valu või infektsioonide teraapias. Neis ravimeis on ära kasutatud nanomaterjalide võimalusi, et ravimit organismis spetsiifiliselt transportida ning vabastada, tõsta ravimi stabiilsust, lahustumisvõimet, poolestusaega, terapeutilist indeksit ning vähendada ravimi immunogeenust, toksilisust (Petros ja DeSimone, 2010) ja soovimatut ensümaatilist lagundamist (Torchilin, 2005).

Nanopartiklid varieeruvad oma kuju, suuruse, materjali ja kasutusala poolest. Materjalist tulenevalt jaotuvad nanopartiklid kahte suurde rühma – anorgaanilised (1-4) ja orgaanilised

(5-9). Alljärgnevalt on kirjeldatud mõningaid meditsiinis rakendatavaid nanopartikleid. Kirjeldamisel on aluseks võetud Tang jt poolt koostatud tabel (Tang jt., 2007).

- 1) Raudoksiidist magnetnanopartiklite magnetilised omadused välise magnetvälja olemasolu korral võimaldavad kontrollida nende osakeste laialikandumist organismis. Nad on biosobivad, mittetoksilised, keemiliselt stabiilsed, lihtsalt toodetavad ning võimaldavad oma pinna muutmist. Selliste nanopartiklite puuduseks on nende potentsiaalne agregeerumine magnetväljas, mis võib viia tromboosi ja embooliani. Raudoksiidist magnetnanopartiklid on rakendatavad nt vähi diagnoosimisel ja monitooringul ning ravimite ja geenide sihtmärkteraapias (Alexiou jt., 2006).
- 2) Kullast saab sünteesida suure pindalaga väikeseid osakesi, mis võimaldavad kanda suuri ravimikoguseid. Kullast nanopartiklid on ohutud (kuld on meditsiinis juba pikka aega kasutusel) ja võimaldavad enda pinnale siduda sihtmärkligande. Oluliseks puuduseks on see, et pole teada selliste osakeste levik *in vivo* tingimustes. Kullast nanopartiklid võimaldavad soovitud asukohas ja vastusena välisele stiimulile (infrapunavalgus, magnetväli) oma koosseisust vabastada ravimeid, valke ning DNA-d. Lisaks eelnevale on need tuvastatavad *in vivo* tingimustes röntgeni ja fotoakustilise tomograafia abil (Shah jt., 2014).
- 3) Nanokestad (ingl.k. *nanoshells*) on õhukese metallkihiga (tavaliselt kuld) kaetud dielektrilised ränidioksiidist südamikud. Sellised osakesed neelavad valgust lähisinfapunase spektri piirkonnas ja genereerivad valgust/soojust lähtuvalt südamiku ja kesta materjalide tihedustest. Nende peamiseks probleemiks on suhteliselt suured mõõtmed. Nanokestade rakendusala on laialatuslikud tänu sellele, et võimaldavad oma pinnale siduda väga erinevaid ühendeid. Muu hulgas on need osakesed rakendatavad immuunokonjugaatidena immuunoglobuliinide analüüsides, kontrastainetena optilises koherentstomograafias ning kasvajate fototermilises eemaldamises (Ahmadi ja Arami, 2013).
- 4) Keraamilised nanopartiklid on poorsed ning koosnevad biosobivatest materjalidest, (nt ränidioksiid, titaaniumoksiid ja alumiiniumoksiid). Sellised osakesed on lihtsalt valmistatavad, vees lahustuvad ning bioloogiliselt stabiilsed. Keraamilised nanopartiklid võimaldavad organismis oma koosseisus transportida DNA-d, ravimeid jt suurema molekulmassiga molekule (Singh jt., 2013).
- 5) Fullereenid on süsinikust nanoosakesed. Süsiniknanotorud, mis on ühe- või mitmeseinaliseks silindriks rullitud grafiidi lehed, läbivad rakkude membraane ohutult

justkui „nanonõelad“, juhivad soojust ja võimaldavad oma pinna modifitseerimist. Aktiivsete ühendite lülitamine fullereenide koosseisu ning sealt vabastamine on komplitseeritud, veel on puuduseks nende tsütotoksilisus ning halb lahustuvus. Võimalikud fullereenide rakendusvaldkonnad on ravimite, geenide ja vaktsiinide sihtmärktransport, kasvajate termoteraapia ning meditsiiniline kuvamine (Klumpp jt., 2006, Partha ja Conyers, 2009).

- 6) Nanokristallid (ingl.k. *nanocrystal quantum dots*) on pooljuhtivad kristallid kaadmiumist südamiku ja metallist kestaga, mis teatud lainepikkuste juures spetsiifiliselt fluorestseeruvad. Neil on ennustatav kiirgussageduste ulatus, eredamad ja stabiilsemad signaalid, kui orgaanilistel fluorestseeruvatel molekulidel ning neid saab konjugeerida valkudele sihtmärgipäraseks transportimiseks. UV-valguses võivad nanokristallid vabastada toksilisi ioone. Nanokristallid on rakendatavad *in vitro* rakkude märgistamiseks geeniekspressiooni uuringutes, fluoretsentsil põhineval kuvamisel detekteerimaks antikehi rakkude pinnal ning vähi *in vivo* tuvastamisel ja diagnoosimisel (Pisanic II jt., 2014).
- 7) Dendrimeerid on väga harunevad makromolekulid, mis sünteesitakse läbi polümeerisatsioonireaktsiooni. Kontroll suuruse üle tagatakse polümeerisatsiooni-reaktsiooni ulatusega. Dendrimeeride harude terminaalrühmad on modifitseeritavad. Struktuurist tulenevalt on dendrimeerid võimelised kandma suuri ravimikoguseid. Nende puudusteks on võimalik doosist ja pinnalaengust sõltuv hemolüüs ning toksilisus. Dendrimeerid on rakendatavad geenide, ravimite ja suure molekulmassiga molekulide sihtmärgipäraseks transportimiseks (Noriega-Luna jt., 2014).
- 8) Liposoomid on kerakujulised vesiikulid amfiifilsete fosfolipiidide kaksikkihist. Tegemist on terapeutiliste nanopartiklite esimese generatsiooniga. Nad on biolagunevad, mittetoksilised ja –antigeensed ning võimaldavad oma pinna modifitseerimist. Puudusteks on liposoomi lekkimine aja jooksul ning lühike poolestusaeg. Liposoomid võimaldavad enda sisse või lipiidse kaksikkihi vahele viidud ravimi ja geneetilise materjali kontrollile alluvat transporti veekeskkonnas. Liposomaalne toimeainet doksorubitsiin kandev vähiravim Doxil on kliinilises rakenduses (Akbarzadeh jt., 2013, Jones jt., 2013, Petros ja DeSimone, 2010).
- 9) Polümeeridel põhinevad nanopartiklid on biolagunevatest polümeersetest maatriksitest kolloidsed osakesed, mille pind on modifitseeritav. Selliste osakeste puuduseks on võimalik komplemendi aktiveerimisega seotud pseudoallergia tekkimine. Polümeerid võimaldavad plasmiidse DNA, valkude, peptiidide, madalmolekulaarsete

ühendite, vees mittelahustuvate ravimite ja kontrastainete pidevat transporti ning selektiivset vabastamist mitsellide hüdrofoobsetest südamikest (Lu jt., 2011). Polümeersoomid (ingl.k. *polymersomes*) on amfiifilsetest plokk-kopolümeeridest (erinevatest polümeriseeritud monomeeridest plokid), morfoloogiliselt liposoomilaadsed õõnsad kerad. Polümeersoomid on kolloidselt stabiilsed, modifitseeritavate pinnaomadustega ning võimelised integreerima või endasse kapseldama nii hüdrofoobseid kui ka -fiilseid molekule. Polümeersoomid on rakendatavad ravimite transportimisel organismis ning meditsiinilises kuvamises (Lee ja Feijen, 2012).

Võrreldes tavapäraste vahenditega on nanopartiklil põhinevatel diagnostilistel ning terapeutilistel vahenditel teoreetiliselt vähemalt viis olulist rakenduslikku eelist: (1) võimelised kandma suuri ravimikoguseid ja kaitsma neid ebasoovitava lagundamise eest; (2) väikestest mõõtmetest tulenevalt suudavad läbida rakke ja kudesid, jõudes nii sihtmärkrakkude, -kudede ja -organiteni; (3) tänu reguleeritavale materjalide lagundamisele võimaldavad kontrollile alluvat ravimi vabastamist; (4) tõstavad ravimi efektiivsust (sh alandavad vajaminevat ravimidoosi) ja vähendavad kõrvalmõjusid; (5) lahendavad multiravimiresistentsuse probleemi (Liu jt., 2010).

Kuigi nanopartiklite unikaalsed omadused teevad neist paljulubavad aktiivsete ravimikomponentide tarnimise platvormid ning diagnostilised vahendid, on praeguseks nt vähiravis kliinilisse rakendusse aktsepteeritud vaid kaks nanopreparaati - liposomaalne doksorubitsiin *Doxil* ja albumiin-seotud paklitakseel *Abraxane* (Coleman jt., 2006, Gradishar, 2006, Jones jt., 2013, Krown jt., 2004). Silmapaistvate eeliste kõrval on nanopartiklidel ka mitmeid lahendamist vajavaid probleeme, nt toksilisus, immunogeensus ja mittelaguneva nanopartikli saatus pärast eesmärgi täitmist. Järgnevas alapeatükis antakse ülevaade konkreetselt antud töö seisukohalt olulisest probleemist ehk nanopartiklite immunogeensuselt.

1.1.2 Nanopartiklite immunogeensus ja immuunsüsteemi vältivad nanopartiklid

Nanopartikleid on teoreetiliselt võimalik sünteesida selliselt, et need kas stimuleerivad, inhibeerivad või ei mõjuta organismi immuunsüsteemi. Stimuleerivad nanopartiklid on rakendatavad vaktsiinide efektiivsemaks toimimiseks ning kasvajate vastu võitlemisel.

Inhibeerivad nanopartiklid osalevad põletikuliste protsesside ning autoimmuunhaiguste ravimises, allergiliste reaktsioonide ennetamises ja transplantaatide omaks võtmises. Ravimeid transportivate nanopartiklite puhul püütakse saavutada neutraalsust immuunsüsteemi suhtes (Zolnik jt., 2010). Sageli saavad siinkohal takistuseks organismi bioloogilised barjäärid. Immuunrakud vereringes ja fagotsüüdid kudedes kalduvad nanopartikleid elimineerima kui organismile mitteomaseid molekule (Dobrovolskaia jt., 2008). Nanopartikli eksponeerimisel bioloogilisele keskkonnale toimuvad üsna vahetult interaktsioonid komplemendi süsteemi aktiveerivate molekulidega (Dobrovolskaia jt., 2008, Owens ja Peppas, 2006). Selliste komplekside tekkimine mõjutada partiklite verest „ära koristamist“ ning ravimi jõudmist sihtmärkkohta ehk toime efektiivsust. Lisaks on oht hemolüüsi ja tromboosi tekkimisele. Juhul kui interaktsioonid immuunrakkudega ei ole eesmärk omaette, säilitab n-ö ideaalne ravimit kandev nanopartikkel bioloogilises keskkonnas oma terviklikkuse, ei ole vere komponentidele toksiline, pikendab ravimi veres ringlemise aega ning on immuunrakkudele „nähtamatu“ ehk tuntakse ära kui „organismile oma“ (Dobrovolskaia jt., 2008).

Nanopartiklite immunogeensuse põhjusteks peetakse osakeste suurust ja nanopartiklite pinna parameetreid sh materjal, pindala, tihedus, konfiguratsioon, keemiliselt reaktiivsete rühmade eksponeeritus ümbritsevale keskkonnale ning eelkõige pinnalaeng (Dobrovolskaia jt., 2008). Üldiselt kõrvaldatakse suuremate mõõtmetega partiklid organismist tõenäolisemalt, kui samast materjalist ning samade pinnaomadustega väiksemad osakesed (Fang jt., 2006). Ka on kati- või anioonset pinnalaengut omavad osakesed fagotsüütidele atraktiivsemad, kui sama suured neutraalsed osakesed (Zahr jt., 2006).

Üks klassikaline lähenemine immuunsüsteemi vältimiseks kujutab endast suure koguse platseebokandjate rakendamist, et nõrgestada makrofaagide fagotsüütilist võimekust. Seejärel rakendatakse aktiivset materjali kandvad nanoosakesed, mis tänu eelnenud platseebokuurile saavad organismis kauem ringelda ning jõuavad suurema tõenäosusega sihtmärkkohta (Abra jt., 1980). Teine strateegia on maksa ja põrna makrofaagide mööduv apoptootiline hävitamine gadoliiniumkloriidiga ($GdCl_3$) töötlemisel (Hardonk jt., 1992).

Kuigi eelnevalt kirjeldatud strateegiad on efektiivsed eksperimentaalsetes mudelites, ei õigusta need ennast kliinilises rakendamises, kuna suruvad alla organismi hädavajaliku kaitsesüsteemi. Ohutum ning organismi säästvam lahendus oleks nanopartiklite pindade modifitseerimine eesmärgiga saada osakesi, mille immuunsüsteem tunneb ära kui organismile

omased ja sellest tulenevalt saaksid need võimaluse veres pikemalt ringelda. Selline omadus võimaldaks muu hulgas näiteks kunstliku veres hapnikku transportiva süsteemi loomist ning tõhusamat (pidevat ja kontrollitavat) ravimeid tarnivate nanopartiklite transporti sihtmärkkohta (Moghimi jt., 2001). Alljärgnevalt on kirjeldatud mõningaid võimalusi, mida on kasutatud n-ö kauaringlevate nanoosakeste saamiseks:

- 1) Sünteetilise hüdrofiilse polümeerikatte (nt polüetüleenglükool, polüetüleenoksiid, poloksameer, poloksamiin) sidumine nanopartikli pinnale. Polüetüleenglükool (PEG) on FDA (*Food and Drug Administration*) poolt heaks kiidetud ning meditsiinis enim kasutatav polümeer nanopartiklite pinna modifitseerimiseks (Knop jt., 2010). PEG moodustab nanopartikli ümber raku glükokaalüksit mimikeeriva võrestiku, mis neutraliseerib positiivse pinnalaengu ning takistab füüsiliselt vere komponentide seondumist partikli pinnale. Seeläbi viivitatakse PEG-kaetud nanopartiklite elimineerimist fagotsüütide poolt (Bartlett jt., 2007, Klibanov jt., 1991, Photos jt., 2003). Peale selle parandab PEG-kate hüdrofoobsete ravimite lahustumist ning vähendab nanopartiklite agregeerumist. PEG-i puudusteks on tema lühiajaline toime, toksilisus teatud tingimustes ning biolagunematus (Knop jt., 2010). Lisaks võib PEG takistada nanopartiklite omastamist haigestunud rakkude poolt (Hong jt., 1999).
- 2) Patogeensete mikroorganismide makrofaage vältivate pinna kohastumuste (näiteks bakteriaalsed polüsahhariidid - dekstraanid, pullulaan, ja hepariiniilaadsed polüsahhariidid) rakendamine nanopartiklite disainimisel, (Moghimi jt., 2001). Pikaahelalised polüsiaalhapped (nt teatud *E. coli* tüvedest ning *Neisseria meningitidis* B ja C tüvedest) on samuti näidanud veres ringlemist soodustavat toimet (Fernandes ja Gregoriadis, 1997). Raudoksiidist magnetnanopartiklite pindade modifitseerimine lineaarsete dekstraanidega (*Leuconostoc mesenteroides*) on leidnud kliinilist rakendust lümfisõlmede magnetresonantskujutamisel (Moghimi ja Bonnemain, 1999).
- 3) Nanopartiklite *hitchhiking* erütrotsüütidega ehk nanopartiklite adhesioon punastele vererakkudele mittekovalentsete (Anselmo jt., 2013, Chambers ja Mitragotri, 2004), ja biotiin-streptavidiin interaktsioonide (Millan jt., 2004) või pepiidsete ligandide vahendusel (Hall jt., 2007). Erütrotsüütide rohkus ning pikk veres ringlemise aeg (kuni 120 päeva) teeb neist paljulubavad ravimi transportimise vahendid (Millan jt., 2004). Sellise lähenemise puhul eeldatakse, et erütrotsüütidele kinnitunud osakesed on võimelised immuunsüsteemi poolt elimineerimisest pääsema tänu sellele, et erütrotsüüdid seda suudavad. Meetod on tuletatud mõningatest selliselt toimivatest

bakteritest, nt *Mycoplasma haemofelis*, mis erütrotsüütidele kinnitatuna ringlevad veres nädalaid. Samas ei ole mittekovaalentselt seotud ravim-nanopartikkel kompleks kuigi stabiilne, olles mõjutatud verevoolust tulenevatest füüsilistest jõududest (Chambers ja Mitragotri, 2004). Lisaks on sellise nanopartikkel-ravim kompleksi saamise protsess kliiniliseks rakendamiseks liiga kohmakas (Hall jt., 2007).

- 4) Nanopartiklite biomimikeerimine leukotsüütide (Parodi jt., 2013) või erütrotsüütide (Fang jt., 2012) membraanidega ehk bioaktiivsete rakuliste komponentide ülekandmine sünteetiliste nanopartiklite pinnale. Sellised osakesed inhibeerivad opsonisatsiooni, viivitavad omastamist mononukleaarsete fagotsüütide poolt, seonduvad eelistatult põletikulise endoteeliga ja lihtsustavad ravimite transporti üle endoteeli, vältides samal ajal lüsoosomaalset lagundamist (Fang jt., 2012, Parodi jt., 2013). Nende puudusteks on vererakkude *ex vivo* modifitseerimise ja koesobivuse vajadus ning verega levivad haigused (Muzykantov, 2010). Sarnaseks näiteks on ka tuumavabad bakteriaalsed nanorakud (ingl.k. *nanocells*), kuhu sisse on võimalik pakkida erinevaid molekule ning mida on võimalik modifitseerida sihtimaks vähirakke. Bakteriaalsete nanorakkude puuduseks on võimalik immunogeensus (MacDiarmid jt., 2007).
- 5) „*Don't eat me*“ ehk organismile äratuntavate signaalide (peptiidid, glükoproteiinid jms) sidumine nanopartiklite pinnale. Näiteks transmembraanne valk CD47 (ingl.k. *Cluster of Differentiation 47*), mis ekspresseeritakse inimese normaalsetes rakkudes, kus ta on seotud apoptoosi, proliferatsiooni, adhesiooni, migratsiooni ning immuun- ja angiogeneesivastusega. Selle valgu üleekspresseerumine kasvajarakkudes (kasvaja antigeen), võimaldab kasvajarakkudel fagotsütoosi vältida läbi CD47 ekstratsellulaarse osa seondumise makrofaagide pinnal olevate CD172a (ingl.k. *Cluster of Differentiation 172a*) retseptoritega. CD47 valgu blokeerimine antikehadega lülitab välja „*don't eat me*“ signaali ja soodustab raku suunamist apoptoosi (Chao jt., 2012). CD47 immuunsüsteemi eest päästev omadus on avanud veel ühe variandi, kuidas tõhustada värvainete, ravimite jt molekulide tarnimist organismis (Rodriguez jt., 2013).

1.2 Eksogeensete (polü)peptiidide kuvamine faagide pinnal

Meetodi abil, mille töötas välja G.P. Smith 1985. aastal, on võimalik ekspresseerida eksogeenseid (polü)peptiide lüsogeense filamentse bakteriofaagi M13 pinnal (Smith, 1985). Faagi pinnal kuvatavat peptiidi kodeeriv geen ja faagi DNA on pakitud samasse virioni ning

kuvatavad peptiidid sünteesitakse ühendatuna faagi kapsiidivalkudega (Kaplan ja Gershoni, 2012). Selline geno- ja fenotüübi vaheline seos kindlustab samast *E. coli* kloonist identsete faagipartiklite saamise. Faagi kuvamise meetod võimaldab luua faagiraamatukogusid, mis sisaldavad $\sim 10^{10}$ erinevat peptiidi ekspresseerivat faagi (Bazan jt., 2012).

Viis peamist kuvamise tehnoloogiat on (bakterio)faagi-, raku- (bakterirakk, pärmirakk, imetajarakk), ribosoomi-, mRNA- ja DNA-displei (Sergeeva jt., 2006). Faagi kuvamise meetodi eelised võrreldes teiste ekspressioonivektoritega on: (1) genotüüp-fenotüüp seos kuvatava peptiidi ja DNA vahel, millest tulenevalt on peptiide lihtne tuvastada läbi DNA eraldamise, sekveneerimise ja vastava aminohappelise järjestuse määramise; (2) faagipartiklid on võrdlemisi väikesed ning 1ml-s lahuses on kuni 10^{12} osakest, mis võimaldab ühes sõeluurikus analüüsida väga suure hulga peptiidseid järjestusi; (3) faagiklooni afiinsusel põhinev raamatukogu rikastamine võimaldab otsitava peptiidi küllaltki lihtsat tuvastamist (Babickova jt., 2013).

Faagi kuvamise meetod on rakendatav nt epitoopide kaardistamiseks, valk-valk seoste uurimiseks, vaktsiinide väljatöötamiseks jne (Pande jt., 2010). Selle meetodi kasutamine teadustöös on mugav järgmistel põhjustel: (1) tänu raamatukogude kõrgele kvantiteedile ja diversiteedile on meetod rakendatav suureskaalalistes uuringutes; (2) tulenevalt faagide paljundamise lihtsusest ja kiirusest on uuring kiire ja lihtne; (3) meetod on rakendatav samaaegselt mitmetele sihtmärkidele; (4) katset ja sellest saadud tulemusi on võimalik kiiresti optimeerida ning hinnata (Sergeeva jt., 2006).

1.2.1 Lüütiline bakteriofaag T7

Oluline puudus M13 jt filamentsete faagide kasutamisel faagi kuvamise meetodil tuleneb nende mittelüütilisest paljundamismehhanismist. Enne faagipartikli kokkupanemist tuleb kõik komponendid eksportida läbi bakteri sisemise membraani. See aga sõltub lisaks signaalpeptiidi olemasolule ka kuvatava valgu pikkusest, järjestusest ja konformatsioonist. Seetõttu on M13 kapsiidi pinnal kuvatavate valkude varieeruvus mitmeti piiratud. M13 alternatiiviks on lüütiline bakteriofaag T7, mille puhul partikli moodustamine toimub täielikult tsütoplasmas (Danner ja Belasco, 2001). Võrreldes M13 faagi kuvamisega on T7 peptiidsetes raamatukogudes vähem aminohapete kasutamise kallutatust ning kuvatavate peptiidide mitmekesisus on suurem (Krumpe jt., 2006). Samas on T7 pinnal ekspresseeritavad

valgud lühemad, kui M13 puhul, sest suured muutused T7 bakteriofaagi genoomis ei ole füüsiliselt võimalikud (Velappan jt., 2010).

1.2.2 Faagi kuvamise meetod ja nanopartikli pinna omaduste muutmine

In vivo faagi kuvamise meetod on oma kontseptuaalse ja tehnilise lihtsuse tõttu rakendatav nanopartiklipõhiste ravimite kujundamise jaoks peptiidsete ligandide leidmisel (Sergeeva jt., 2006). Faagide mõõtmed ning kuju (nt ~60 nm diameetriga ikosaeedriline bakteriofaag T7) on võrreldavad nanopartiklitega (Sokoloff jt., 2003). Peptiidide selekteerimist alustatakse faagide pinnal juhuslikke peptiide ekspresseeriva raamatukogu süstimisest katselooma vereringesse. Teatud aja järel kogutakse spetsiifiliselt organitele või kudedele seondunud faagid, mis on läbinud immuunsüsteemi „sõela“. Selekteeritud peptiidid tuvastatakse faagi DNA sekveneerimisega (Srivastava jt., 2004). Faagi ringlemist veres soodustavad nt C-reaktiivset valku (põletikumarker veres) siduvad peptiidid roti veres ja mitmed türosiinijääkidega peptiidid inimese seerumis (Sokoloff jt., 2000).

Nii metsik-tüüpi kui ka raamatukogu ekspresseerivate faagide puhul on näidatud, et 5 minutit pärast faagide vereringesse süstimist saadakse tagasi vähem kui 50% ning 60 minuti pärast vähem kui 1% aktiivseid faage. Tõenäoliselt ei ole faagide vereringest kadumine põhjustatud nende kuhjumisest teistesse kudedesse (Srivastava jt., 2004). Võimalik, et selle nähtuse eest vastutavad IgM (immunoglobuliin M) antikehad (Sokoloff jt., 2000, Srivastava jt., 2004), mida toodetakse B-lümfotsüütide poolt ning mis moodustavad suure osa seerumi antikehadest (Avrameas ja Ternynck, 1995). IgM järjestusspetsiifiline seondumine peptiididega (antigeen-antikeha kompleks) aktiveerib komplemendi süsteemi. Faagide pinnal ekspresseeritavate peptiidide otste karboksüülrühmad on signaaliks IgM antikehadele (Sokoloff jt., 2000, Sokoloff jt., 2001).

IgM-sõltuv komplemendi aktiveerimine võib olla seotud ka faagi kapsiidivalgu 10B karboksüülterminuses kuvatavate peptiidide tiheduse ja kõrgel tasemel organiseeritusega. Ainult multivalentset seondunud IgM molekulid on võimelised komplemendi süsteemi aktiveerima (Casali ja Schettino, 1996, Srivastava jt., 2004). T7 415-1 faagi kasvatamisega *E. coli* BLT 5403 tüves kaasneb kuvatavate peptiidide tiheduse vähenemine, sest suur osa selle bakteritüve poolt sünteesitav faagi kapsiidivalk on 10A. IgM kapsiidivalguga 10A valdavalt ei interakteeru. On näidatud, et T7 415-1 vektoriga faagi kasvatamine BLT 5403 tüves vähendab märkimisväärselt faagi inaktiveerimist komplemendi poolt (Sokoloff jt., 2001). Sarnast efekti

võiks näidata T7 10-3b vektoril põhinevad raamatukogud, kus faagi kapsiidi moodustavad enamjaolt 10A valgud ja vaid 5-15 koopiat juhuslikku peptiidi kuvavat 10B valku.¹

Faagide verest kõrvaldamine on ilmselt, lisaks selle poolt ekspresseeritavatele peptiididele, põhjustatud osaliselt ka faagidest endist. Sarnast faagi verest eemaldamise kineetikat on näidatud sõltumata sellest, kas faagiraamatukogu ekspresseerib juhuslikke peptiide või mitte (Srivastava jt., 2004). Mutatsioon(id) faagi T7 sabafiibrit kodeerivas geenis 17 pärsivad faagi akumulereerumist maksarakkudesse, andes seega veres ringlemist soodustava eelise võrreldes faagidega, mis kodeerivad normaalset sabafiibrivalku (Sokoloff jt., 2003).

¹ <http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/novagen/C166-000.pdf>

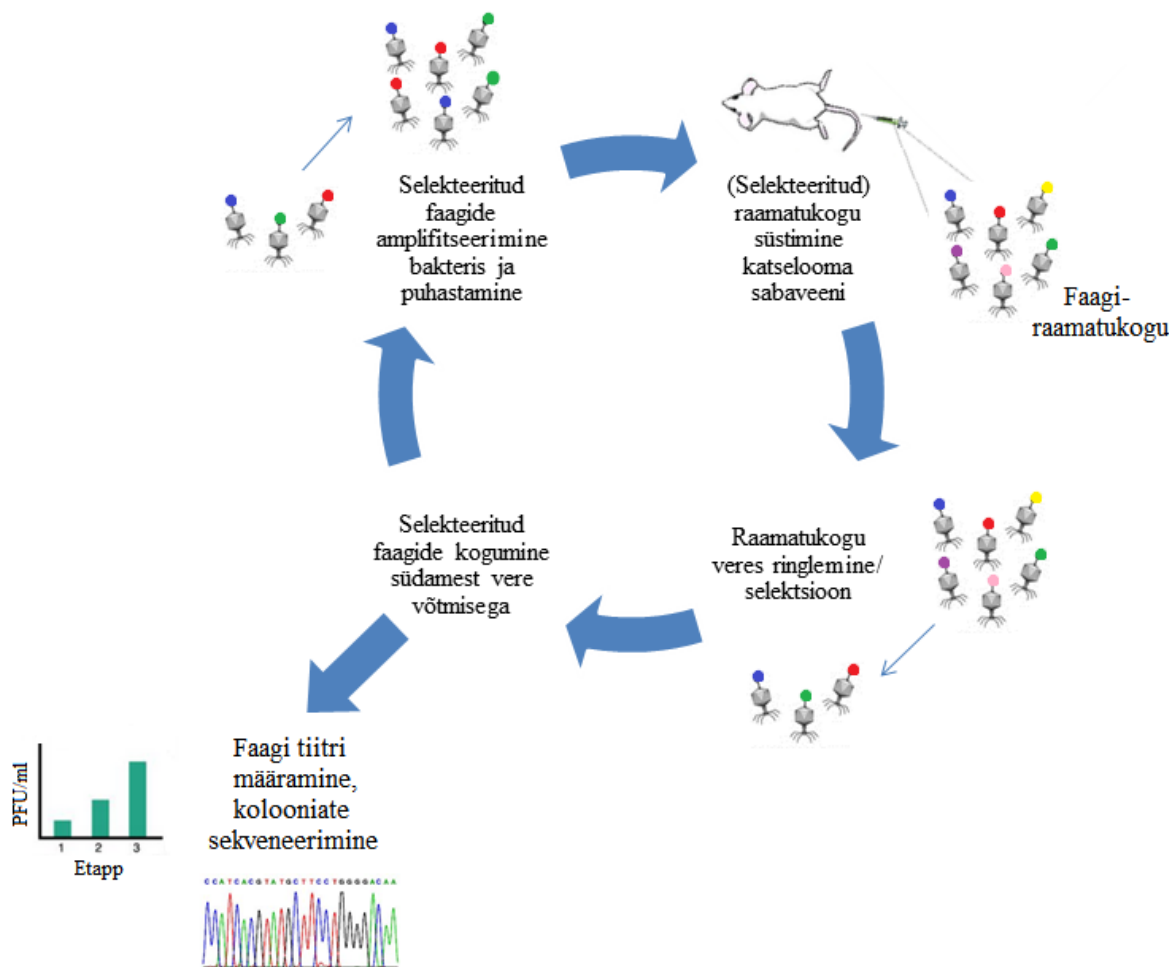
2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

1. Leida T7 faagi kuvamise meetodil *in vivo* tingimustes sellised peptiidid, mis pikendavad neid ekspresseerivate faagide püsimist katselooma (BALB/c) vereringes.
2. Hinnata *in vivo* tingimustes faagi kuvamise meetodi sobivust imuunsüsteemi vältivate peptiide tuvastamiseks.

2.2 Materjal ja meetodika

Joonisel 1 on skemaatilisel kujutatud faagi kuvamise meetodit faagiraamatukogus ekspresseeritavate juhuslike peptiidide *in vivo* tingimustes selekteerimiseks. Joonis on abiks eksperimentaalses osas läbi viidud katseskeemide mõistmisel.



Joonis 1. Immuunsüsteemi vätvate peptiidide selekteerimine faagi kuvamise meetodil *in vivo* tingimustes. Meetod algab juhuslike peptiidide ($\sim 10^9$ erinevat peptiidi) kuvava faagiraamatukogu koostamisega. Antud töö eksperimentaalses osas selekteeriti raamatukogusid kolmes etapis. Konstrueeritud raamatukogu (algne ehk selekteerimata raamatukogu) süstitakse katselooma vereringesse sabaveeni kaudu (I etapi algus). Eeldatakse, et faagi veres ringlemise ajal (aeg sõltub katses seatud tingimustest) toimub seleksioon selliste faagide kasuks, mille pinnal kuvatav peptiid pärssib faagi elimineerimist immuunsüsteemi poolt. Faagide veres ringlemise aja järgselt võetakse katselooma südamest 200 μ l verd ning määratakse selles oleva faagi tiiter. Tiitrimistassidelt võetakse juhuslikud faagikolooniad ning sekveneeritakse nende genoomis juhuslike peptiidide kodeerivad regioonid. Vajadusel analüüsitakse katselooma verest eraldatud DNA-d Ion Torrent platvormil. Verest tagasi saadud ehk selekteerunud faagid paljundatakse *E. coli* BLT5403 tüves ning puhastatakse NaCl-ga, PEG-ga ja CsCl₂-ga. Saadud faagisuspensioon (selekteeritud raamatukogu) süstitakse järgmise katselooma vereringesse (II etapi algus). Teine ja kolmas etapp kulgevad samamoodi nagu esimene. Pärast viimast etappi analüüsitakse raamatukogu kolmeetapilisest selekteerimisest saadud andmeid. Joonise tegemisel võeti aluseks Sergeeva jt. artiklis esitatud skeem (Sergeeva jt., 2006).

2.2.1 T7 bakteriofaagil põhinevad peptiidsed CX7C raamatukogud 415-1 ja 10-3b

Peptiidide selekteerimiseks faagi kuvamise meetodil *in vivo* tingimustes koostati esmalt raamatukogud juhuslikest peptiididest, mida kodeerivad järjestused kloneeriti bakteriofaag T7 vektori multikloneerimisregiooni (kapsiidivalgugeenis 10). Selle tulemusena ekspresseeritakse peptiidid faagi pinnal, kapsiidivalgu 10B karboksüülterminuses. Vektori inserdid on juhuslikkuse alusel moodustatud oligonukleotiidid (*Metabion, Saksamaa*), mis pannakse kokku NNK plokkidest, kus N on üks neljast nukleotiidist (A, G, T või C) ning K on T või G nukleotiid. Kuvatavad peptiidid moodustatakse CX7C skeemi alusel, kus kahe tsüsteiini (C) vahel on seitse juhuslikku (X7) aminohapet. Otsmiste tsüsteiinide vahel tekkiva disulfiidsilla tulemusena moodustub tsükliline peptiid. Eeldatakse, et tsüklilised peptiidid on immuunsüsteemile vähem „atraktiivsed“ kui oleksid näiteks lineaarsed, vaba karboksüülterminusega peptiidid (Sokoloff jt., 2000).

Eksperimentaalses osas selekteeriti CX7C peptiide kuvavaid faagiraamatukogusid, mis põhinevad vektoritel T7Select 415-1 (*Novagen, USA*) või T7Select 10-3b (*Novagen, USA*). Vektorid erinevad faagi pinnal ekspresseeritavate CX7C peptiidide tiheduse poolest. T7Select415-1 vektoriga faagide pinnal kuvatakse ühte peptiidi 415 koopiat (*E. coli* BLT5403 tüves amplifitseerides ~207,5 peptiidi) ja T7Select 10-3b vektoriga faagide pinnal 5-15 koopiat. Eksperimentaalse osa teise ja kolmanda katseskeemi (vastavalt ptk 2.3.2.2 ja 2.3.2.3) raamatukogud moodustasid faagid, mille sabafibriit kodeeriv geen 17 on muteerunud. Mutatsiooni tagajärjel kodeeritakse Gp17 (ingl.k. *Gene Product 17*, geeniprodukt 17) aminohappelises positsioonis 211 lüsiini asemel glutamaati (Gp17-E₂₁₁).

Katsetes kasutatavad peptiidsed faagiraamatukogud koostas TÜ vähibioloogia labori spetsialist Kuldar Kõiv, MSc.

2.2.2 Faagi paljundamine, puhastamine ja tiitrimine

Faagi paljundamine ning puhastamine viiakse läbi enne faagisuspensiooni süstimist katselooma. Faagi tiitrit määrati nii paljundatud, süstimisele kuuluvates faagisuspensioonides (sisend) kui ka *in vivo* katsetest saadud vereproovides (väljund). Faagi paljundamine, puhastamine ja tiitrimine viidi läbi TÜ vähibioloogia labori protokollide põhjal (vastavalt Lisa 1, 2 ja 3).

2.2.3 Peptiide kodeerivate oligonukleotiidide klonimine bakteriofaagi T7 multiklonimisregiooni

Peptiidi kuvamiseks T7 faagi kapsiidi valguga 10B karboksüülterminuses kloneriti peptiidi kodeerivad oligonukleotiidid faagi vektori multiklonimisregiooni (geen 10), restriksiooniensüümide *EcoRI* ja *HindIII* (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*) lõikamisregioonide vahele. Esimese etapina viidi läbi oligonukleotiidide (Lisa 4) paardumisreaktsioon, milleks segati kokku komplementaarsed *sense* ja *antisense* oligonukleotiidid (*Metabion, Saksamaa*) lõppkontsentratsiooniga 80nM. Paardumisreaktsiooni inkubeeriti 10 min kuivtermoblokis (*Biosan, Läti*) 80 °C juures, seejärel jahutatati proov termoblokis toatemperatuurini (~2 h). Teise etapina ligeeriti paardunud oligonukleotiidid T7 vektorisse. Eelmisest etapist saadud paardunud oligonukleotiidid (1 µl) lisati ligeerimisreaktsiooni (lõppmahuga 5µl), mis sisaldas: 10 ng/µl lõigatud vektoreid (ingl.k. *vector arms; Novagen, USA*), 1x T4 DNA ligaasi puhvrit (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*) ja 1 Weiss U/µl T4 DNA ligaasi (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*). Reaktsiooni inkubeeriti üleöö toatemperatuuril. Konstrueeritud vektoreid sisaldavate faagide saamiseks lisati eelnevale reaktsioonisegule *Packaging Kit Extracts (Novagen, USA)* suspensiooni, mis muuhulgas sisaldab tühje faagi T7 kapsiide. Seejärel inkubeeriti reaktsiooni 2 h toatemperatuuril.

Juhul, kui katse eeldas, et järjestus tuleb esialgselt vektorist välja lõigata (vt ptk 2.3.2) ja uude vektorisse klonerida, tuli meid huvitav fragment esmalt PCR reaktsiooni käigus amplifitseerida. PCR reaktsioonisegu (kogumahuga 15 µl) sisaldas 1x *HOT FIREPOL Blend Master mix* puhvrit sh 2 mM MgCl₂ (*Solis BioDyne, Eesti*) ja 0,2 µM PCR praimereid (Lisa 5). Reaktsioonisegusse pipeteeriti 1 µl selliste faagide suspensiooni, mille vektorist järjestust välja lõigata sooviti. PCR reaktsioon viidi läbi vastavalt Lisas 7 toodud programmile. Saadud fragmentide otsad lõigati *EcoRI* ja *HindIII* (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*) restriksiooniensüümidega sobivaks. Selleks pipeteeriti PCR produkt (10 µl) reaktsioonisegusse (lõppmahuga 30 µl), mis sisaldas 1x puhvrit R (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*) ja ensüüme 10 U/µl *EcoRI* ning *HindIII* (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*). Reaktsiooni inkubeeriti kuivtermoblokis (*Biosan, Läti*) 1 h 37 °C juures ning seejärel 20 min 65 °C juures. Sobivad DNA järjestused eraldati 3% agarosgeelilt sh 0,1 mg/ml etiidiumbromiidi (*Sigma-Aldrich Co, USA*) geelilt DNA eraldamise komplekti *The*

FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit (Favorgen Biotech Corporation, Taiwan) protokoll² alusel. Markerina kasutati *100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis BioDyne, Eesti)*. Seejärel viidi läbi eelmises lõigus kirjeldatud T7 vektorisse kloneerimise etapid alates ligeerimisreaktsioonist.

Kloneerimisreaktsiooni õnnestumise kontrollimiseks tiitriti (Lisa 3) saadud faagisuspensioone ning juhuslikud üksikud isoleeritud kolooniad sekveneeriti Sanger meetodiga. Sekveneerimisest saadud järjestused kuvati *BioEdit Sequence Alignment Editor* tarkvaraga ja tõlgiti peptiideks järjestuseks *ExPASy* tööriista³ abil.

2.2.4 Faagi DNA sekveneerimine Sanger meetodil

Sanger meetodil sekveneeriti T7 multikloneerimisregiooni viidud järjestusi ning osaliselt ka sabafiibrit kodeeriva geeni 17 järjestust (nukleotiidid 32177–32677). Meid huvitav regioon vektoris paljundati PCR reaktsiooniga (kogumahuga 15 µl), mis sisaldas *1x HOT FIREPOL Blend Master mix* puhvrit sh 2 mM MgCl₂ (*Solis BioDyne, Eesti*) ja 0,2 µM PCR praimereid (*Metabion, Saksamaa*; vt Lisa 5 ja Lisa 6). Petri tassil olevat faagikolooniat puudutati kergelt pitpetiotsikuga, seejärel asetati otsik 30 µl 1x PBS-i (*PAA, Austria*). PCR reaktsioonisegule lisati 1 µl 1x PBS-s üles võetud faagisuspensiooni. Reaktsioon viidi läbi termotsükleris *Eppendorf Mastercycler Nexus (Eppendorf AG, USA)* vastavalt lisas 7 toodud programmile. Sanger sekveneerimise teenus osteti Eesti Biokeskuse tuumiklaborist (Riia mnt 23b-302, Tartu).

2.2.5 In vivo faagi kuvamine

Kõik loomkatsed teostas käesoleva töö autor loomkatsete läbiviimiseks litsentsi omava vähibioloogia uurimisgrupi teaduri Tarmo Mölder, MSc juhendamisel ja järeelvaatamisel. Luba on antud otsusega nr 90 Põllumajandusministeeriumi Loomkatsete Läbiviimise Komisjoni poolt (Lisa 12).

² http://www.favorgen.com/products/nucleic_dna_fragment_purification/GEL-PCR_kit.html

³ <http://web.expasy.org/translate/>

2.2.5.1 Katseloomad

Kõik *in vivo* loomkatsed viidi läbi emastes BALB/c hiirtes (*Harlan Laboratories Inc, USA*), kelle vanus (~2-6 kuud) ning kehakaal (~25-30 g) katsetes varieerusid. Katsete käigus kasutati 51 looma. Katseloomi peeti 12 tunnise valguse-/ pimedusetsükli tingimustes, vaba juurdepääsuga veele ja toidule. Katsed teostati Tartu Ülikooli vähibioloogia laboris, loomi hoiustati Tartu Ülikooli arstiteaduskonna Biomeedikumi vivaariumis (Ravila 19, Tartu).

2.2.5.2 Katselooma süstimine faagisuspensiooniga

Katseloomade paremasse või vasakusse sabaveeni süstiti (süstal 0,5 ml ja nõel 0,3 x 8 mm) 100 µl faagisuspensiooni. Süstimise lihtsustamiseks soojendati katselooma saba 20 sek ~40 °C vees. Süstitav faagisuspensioon, selle algne tiiter (sisend-tiiter) ja veres ringlemise aeg sõltuvad konkreetsest katsest ning on täpsemalt kirjeldatud iga katse juures eraldi (vt ptk 2.3).

2.2.5.3 Katselooma anesteesia ning vere kogumine südamest

Pärast faagide veres ringlemise aja lõppu süstiti (süstal 0,5 ml ja nõel 0,30 x 8mm) katselooma kõhuõõnde ühe grammi katselooma kaalu kohta 10 µl (2,5 mg/ml) üldanesteetikumi tribromoetanool ehk Avertiin (*Sigma-Aldrich Co, USA*; Avertiini lahus valmistatud TÜ vähibioloogia labori spetsialisti Kaarel Kurm, MSc poolt). Anesteetikumi toime avaldub 5-10 min pärast süstimist. Selles veendumiseks kontrolliti katselooma reflekse sõrmedega tagajäsemele survet avaldades. Anesteesias oleva katselooma rindkere avamise järgselt koguti südamest 200-400 µl verd (süstal 0,5 ml ja nõel 0,3 x 8 mm; *Becton, Dickinson and Company, USA*). Koaguleerimise vältimiseks pesti süstalt eelnevalt 0,5 M EDTA-ga (*Sigma-Aldrich Co, USA*) ja seejärel süstal tühjendati. Vereproovi võtmise järel katseloom hukati veretustamise teel.

Selleks, et määrata verest ringlemisjärgne faagi tiiter ehk väljund-tiiter viidi 200 µl (vahepealsete ajapunktide korral 10 µl) verd 1 ml-sse (50 µl-sse) eelnevalt valmistatud LB-sööde + IGEPAL® CA-630 lahusesse (100:1; *Sigma-Aldrich Co, USA*). Vereproovi säilitati 4 °C juures. Vajadusel eraldati 200 µl verest DNA edasiseks Ion Torrent sekveneerimisplatvormil analüüsimiseks (vt ptk 2.2.7).

2.2.6 Verest DNA eraldamine

Katselooma verest DNA (sh faagi DNA) eraldamiseks kasutati kommertsiaalset *High Pure PCR Template Preparation Kit*'i (Roche Holding AG, Šveits). Kõik etapid viidi läbi vastavalt *kit*'iga kaasas olevale protokollile.⁴ Eraldatud DNA säilitati 4 °C juures.

2.2.7 Kõrge läbilaskevõimega Ion Torrent platvormil baseeruv DNA sekveneerimine, kvantifitseerimine ja saadud andmete analüüs

In vivo tingimustes faagi kuvamise katsetest selekteerunud peptiidide kvantifitseerimiseks ning sekveneerimiseks kasutati (lisaks faagi tiitri põhjal tuletatud andmetele ning Sanger sekveneerimisele) kõrge läbilaskevõimega *Life Technologies Ion Torrent* (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) sekveneerimisplatvormi.

Sekveneerimisest saadud FASTQ formaadis DNA järjestuste analüüsimiseks kasutati laborisisest programmi *Pdparser*. Tegemist on faagi kuvamisest saadud sekveneerimisandmete analüüsimiseks loodud *Python*-keeles programmiga. *Pdparser* transleerib iga DNA järjestust kuues lugemisraamis ja otsib aminohappelist signatuuri MLGDPNS, millele järgneb meid huvitav järjestus. Peptiid signatuurist kuni stopp-koodonini salvestatakse. Salvestatud peptiidid loendatakse ja sorteeritakse. Väljund on tekstifail, mis sisaldab peptiidide ja nende kvantiteeti sisendandmetes.

Ion Torrent analüüsi ettevalmistamiseks segati kokku PCR reaktsioon (kogumahuga 25 µl), mis sisaldas *1x HOT FIREPOL Blend Master mix* puhvrit sh 2 mM MgCl₂ (*Solis BioDyne, Eesti*) ja 0,2 µM praimereid (*TAG Copenhagen AS, Taani*, Lisa 8). Reaktsioonisegule lisati matriits-DNA (5 µl). PCR viidi läbi termotsükleris *Eppendorf Mastercycler Nexus* (*Eppendorf AG, USA*) vastavalt lisas 9 toodud programmile. Edasise proovide ettevalmistuse ja analüüsi Ion Torrent platvormil viis läbi TÜ vähibioloogia labori teadur Tarmo Mölder, MSc või spetsialist Kaarel Kurm, MSc.

⁴ <https://lifescience.roche.com>

2.3 Tulemused ja arutelu

Ravimite (sh ka vähiravimite) madal spetsiifilisus, manustamisega kaasnevad kõrvalmõjud ning uute ravimite väljatöötamise suur aja ja raha kulu on viinud olemasolevate ravimite efektiivsust tõstvate meetodite leidmisele. Paralleelselt personaalse meditsiini juurutamisega arendatakse n-ö tarku nanopartiklipõhiseid ravimeid, mis säästaksid terveid kudesid ravimite aktiivsete komponentide eest ja võimaldaksid ravimite spetsiifilisemat jaotumist organismis (Tiwari jt., 2012). Tulemusena loodetakse vähendada ravimitega kaasnevaid negatiivseid kõrvalmõjusid ning toksilisust ja suurendada mõningate ravimite lahustumisvõimet (Dobrovolskaia jt., 2008).

Ravimite efektiivsusele avaldavad tugevat mõju nanopartiklite seostumine vere komponentidega, mille tagajärjel kõrvaldab immuunsüsteem partiklid vereringest pärast manustamist üsna kiiresti (Aggarwal jt., 2009). Immuunsüsteemi eest varjamiseks on nanopartikli katmine raku glükokaalüksit mimikeeriva PEG-ga hetkel enim kasutatav meetod. Samas on polümeerikatte toime seerumivalkude seondamise tõttu lühiajaline (Moghimi jt., 2001). Alternatiivsed, vererakkudel põhinevad ravimite tarnesüsteemid on küll efektiivseid, kuid kliiniliseks rakendamiseks ebamugavad, kuna nende puhul tuleb arvesse võtta koosobivust ning verrega kanduvaid haigusi (Muzykantov, 2010). Potentsiaalne uudne lahendus oleks lühikesed peptiidsed ligandid nanopartiklite pinnal, mis ei kutsu esile immuunsüsteemi aktiveerimist, vaid tuntakse ära kui organismile omased molekulid. Sellised peptiidid võiksid olla näiteks funktsionaalsed fragmendid rakkude pinnal ekspresseeritavatest valgulistest markeritest ja retseptoritest, mis immuunsüsteemi komponentidega seostudes annavad edasi signaali, mille tulemusena pärsitakse nende rakkude kõrvaldamine. Eeldatavasti kehtiks sama põhimõte ka nendest valkudest tuletatud peptiide kandvate nanopartiklite korral.

Faagi kuvamise meetod võib osutada tõhusaks leidmaks peptiide, mis kaitseksid faage immuunsüsteemi vastureaktsioonide eest. Võimalik, et sellised peptiidid oleksid võimelised, näiteks läbi plasmavalkudele või rakkude retseptoritele seondumise, kaitsma ka nanopartikleid ja biosobivaid pindu soovimatute *in vivo* interaktsioonide eest. Lisaks on peptiidide selliselt selekteerimine paljulubav ka veres valk-valk interaktsioonide kohta uue informatsiooni saamiseks (Sokoloff jt., 2000). *In vivo* tingimustes võimaldab faagi kuvamise meetod küllaltki lähedaselt nanopartiklite kasutamisele analüüsida korraga $\sim 10^9$ erineva peptiidi ja neid peptiide ekspresseerivate faagide saatust organismis. Oma pinnal juhuslikke

peptiide kuvav ja vereringesse süstitud bakteriofaag T7 toimib nii oma nanomõõtmete kui ka ikosaeedrilise kuju poolest nanopartikli mudelina, mille pind on modifitseeritud valguliste ligandidega (Sokoloff jt., 2003). Kindlasti ei vasta mudel üks-ühele reaalsele olukorrale ning faagide kasutamine nanopartikli alternatiivina on kasutatav eelkõige teadustöös, mitte ravimeetodina. Lisaks tuleks faagi kuvamise meetodi abil saadud andmete analüüsimisel arvestada, et erinevalt nanopartiklist on faagil oma genoom, bakterist sõltuv repikatsioonimehhanism ja võime evolutsioneeruda. Sokoloff jt näitasid, et T7 sabafiibrivalgu mutatsioon Gp17-E₂₁₁, võimaldab faagil võrreldes metsik-tüüpi T7 faagiga kauem vereringes püsida (Sokoloff jt., 2003).

2.3.1 CD47 peptiid ja T7 sabafiibrivalgu mutatsioon Gp17-E₂₁₁

Praeguseks on teada vähemalt üks peptiid (osa transmembraansest valgust CD47), mille arvatakse olevat seda peptiidi kandva nanopartikli veres ringlemist soodustav omadus (Rodriguez jt., 2013). Lähtudes pikalt ringlevast CD47 peptiidist ning sabafiibrivalgu mutatsiooni Gp17-E₂₁₁ mõjust faagi veres ringlemise ajale, konstrueeriti esimeses katses kaks erinevat T7 faagi. Üks ekspresseerib oma kapsiivivalgu 10B karboksüülterminuses lühendatud CD47 peptiidi ja teine sabafiibrivalgu peptiidi, mis sisaldab Gp17-E₂₁₁ mutatsiooni. Mõlemaid peptiide kodeerivad järjestused kloneeriti (vt ptk 2.2.3) T7Select 415-1 vektoritesse.

Katse eesmärk oli hinnata CD47 ja Gp17-E₂₁₁ peptiidide mõju faagide veres ringlemisele ning võrrelda saadud tulemusi. Tabelis 1 on välja toodud katses süstitavate faagide poolt kuvatavad peptiidid, süstitud faagisuspensiooni tiiter ehk sisend (PFU/ml) ning faagi tiiter veres ringlemise aja järgselt ehk väljund (PFU/ml). CD47 ja Gp17-E₂₁₁ peptiididega fagisuspensioone süstiti paralleelselt kahte katselooma. Võrdluseks on toodud ühte katselooma süstitud T7 415-1 raamatukogu. Kõikide faagide veres ringlemise aeg oli **240 minutit**.

Tabel 1. CD47 peptiidi ning Gp17-E₂₁₁ mutatsiooni sisaldavat peptiidi ekspresseerivate faagide kuvamine *in vivo* tingimustes.

Jrk nr	Süstitavad faagisuspensioonid	Peptiidi järjestus	Sisend (PFU/ml)	Väljund (PFU/ml)
1.	CD47 peptiidiga faagid	GNYTCEVTELTREGETHIELK	7,6x10 ⁸	1) 4x10 ² 2) 5x10 ²
2.	Gp17-E ₂₁₁ peptiidiga faagid	KQWRDETKGFRDEAERFKNTAG	7,6x10 ⁸	1) 1x10 ² 2) 1x10 ²
3.	T7 415-1 raamatukogu	~10 ⁹ erinevat CX7C peptiidi	1x10 ⁸	<1x10 ²

CD47 peptiide kuvavad faagid püsisid vereringes paremini, kui Gp17-**E**₂₁₁ peptiididega faagid (väljund-tiiter oli keskmiselt 4,5 korda kõrgem, kui Gp17-**E**₂₁₁ faagidel). Tegemist oli eeldatava tulemusega, kuna CD47 peptiidist sõltuvat nanopartikli veres ringlemist soodustavat efekti on ka varasemalt näidatud (Rodriguez jt., 2013). Näib, et Gp17-**E**₂₁₁ peptiid avaldab faagi veres ringlemise ajale soodustavat toimet pigem seal, kus ta looduse poolt kodeeritakse ehk sabafiibris. Kuna Gp17-**E**₂₁₁ peptiidi oma kapsiidivalgu 10B karboksüülterminuses ekspresseeriv faag jäi veres ringlemise edukuselt mitmekordselt alla CD47 peptiidiga faagile, siis eeldasime, et tegemist ei ole peptiidiga, mis vastaks meie töö eesmärgile. Tõenäoliselt ei pikendaks Gp17-**E**₂₁₁ peptiid ka nanopartikli veres ringlemise aega.

Võrdluseks on toodud sarnastel tingimustel (samal suurusjärgus sisend-tiiter ning ajapunkt 240 minutit) vereringesse süstitud T7 415-1 peptiidne raamatukogu, mille väljund-tiiter võrreldes CD47 ja Gp17-**E**₂₁₁ faagidega on madalam. Teoreetiliselt kuvab nii mitmekesine (~10⁹ erinevat kuvatavat peptiidi) raamatukogu muu hulgas kahe äärmuse – faagi veres ringlemise aega soodustavaid ja pärssivaid peptiide. Eelduste kohaselt saadakse raamatukogu „sõelumisest“ tagasi faagid, kellel esineb mingi veres ringlemist soodustav eelis. Kuna ainus erinevus raamatukogu moodustavate faagide vahel on nende kapsiidivalgu 10B terminus, võib oletada, et faagide erinev veres ringlemise edukus tuleneb kuvatavatest peptiididest. Tõenäoliselt on T7 415-1 raamatukogust veres ringlemise aja jooksul suurem osa faage immuunsüsteemi poolt kõrvaldatud ja verest tagasi saadi meid huvitavate peptiididega faagid.

Süstitud faagisuspensioonide väljund-tiitrid erinevad üksteisest, kusjuures kõrgema väljund-tiitri andis ootuspäraselt CD47 peptiidi ekspresseeriv faag. Ühtlasi käitus eeldustele vastavalt ka raamatukogu, kust suurem osa faage kiiresti elimineeriti. Eelnev annab aluse arvata, et faagi kuvamise meetod on sobiv leidmaks peptiide, mis võimaldavad neid peptiide ekspresseerivatel faagidel kauem veres ringelda.

2.3.2 Peptiidsete faagiraamatukogude selekeerimiskatsed *in vivo* tingimustes

Järgnevate katsetega püüti peptiide kuvavatest faagiraamatukogudest tuvastada selliseid peptiide, mis soodustaksid neid kandvate faagide veres ringlemist. Katsed jaotuvad suures plaanis kolmeks, kusjuures ühe katseskeemi jooksul tehtavad järeldused viivad järgmise skeemini. Peptiidsete faagiraamatukogude veres ringlemise ajad katsete käigus varieeruvad. Esialgsed ajapunktid valiti lähtuvalt CD47 ja Gp17-**E**₂₁₁ peptiidi katse tulemustest (Tabel 1)

ning T7 poolestusajast. Nii metsik-tüüpi kui ka peptiidset raamatukogu kuvavate faagide süstimisel katselooma vereringesse on näidatud, et 5 minuti pärast saadakse tagasi vähem kui 50% ning 60 minuti pärast vähem kui 1% aktiivseid faage (Srivastava jt., 2004). Faagi veres ringlemise ajapunkte pikendati eesmärgiga ahendada peptiide selekteerivat „pudelikaela“. Lisaks võeti teise katseskeemi (vt ptk 2.3.2.2) ajapunktide planeerimise osas arvesse sabafiibri mutatsioonist tulenevaid asjaolusid.

2.3.2.1 Peptiidide selekteerimine T7 CX7C 415-1 raamatukogust

Katse eesmärk oli *in vivo* tingimustes faagi kuvamise meetodil selekteerida T7 CX7C 415-1 raamatukogust peptiidid, mis soodustavad neid ekspresseerivate faagide püsimist katselooma vereringes. Raamatukogu selekteerimine on kolmeetapiline katse, mida seletab täpsemalt Joonis 1. Tabelis 2 on esitatud igas etapis süstitud faagisuspensioonid, faagi veres ringlemise aeg (min), faagi tiiter süstitud suspensioonis ehk sisend (PFU/ml) ja faagi tiiter veres pärast ringlemise aja lõppu ehk väljund (PFU/ml). Kõik faagisuspensioonid süstiti eraldi katseloomadesse. Etappides II ja III süstiti lisaks eelnevalt selekteeritud raamatukogudele ka algseid raamatukogud, et näha milline on nende väljund vastavates ajapunktides võrreldes selekteeritud raamatukogudega.

Tabel 2. T7 CX7C 415-1 raamatukogu seleksioonietapid.

Etapp	Süstitav faagisuspensioon	Ajapunkt (min)	Sisend (PFU/ml)	Väljund (PFU/ml)
I	Algne raamatukogu	60	$2,55 \times 10^9$	$2,55 \times 10^5$
II	1) I etapis selekteerunud raamatukogu	240	1×10^8	1) $1,6 \times 10^3$
	2) Algne raamatukogu			2) $< 1 \times 10^2$
III	1) II etapis selekteerunud raamatukogu	300	$6,5 \times 10^8$	1) $6,6 \times 10^6$
	2) Algne raamatukogu			2) $2,2 \times 10^2$

Tulemustest ilmneb, et (1) selekteeritava raamatukogu III etapi väljund-tiiter oli $3,3 \times 10^4$ korda kõrgem samas etapis süstitud algse raamatukogu väljund-tiitrist ja (2) vaatamata ringlemise aja pikenedamisele oli selekteeritava raamatukogu tiiter III etapis $4,125 \times 10^3$ korda kõrgem, kui II etapis. Eelnevaid asjaolusid arvesse võttes eeldati, et on toimunud seleksioon faagide kasuks, mille kapsiidivalgu 10B terminuses ekspresseeritavad peptiidid soodustavad faagi veres ringlemist.

Kolmanda selektsioonietapi tiitrimistassidelt sekveneeriti Sanger meetodiga 48 juhuslikku kolooniat. Esimese ja teise etapi vereproovidest eraldatud DNA-d analüüsiti Ion Torrent sekveneerimisplatvormil, mis erinevalt tiitrimisest võimaldab hinnata ka inaktiveeritud faagide osakaalu proovis. Sanger ja Ion Torrent andmetele tuginedes selekteeriti seitse potentsiaalset veres ringlemist soodustavat peptiidi. Valituks osutusid peptiidid, mis tulid välja nii Sanger kui ka Ion Torrent sekveneerimisel ning olid kvantitatiivselt enim esindatud II etapi vereproovis (Lisa 10; Tabel 3, peptiidid 1-7). Kolmandale etapile Ion Torrent analüüsi ei tehtud, kuna 48-st Sanger meetodil sekveneeritud kolooniast ligikaudu pooled osutusid ühesugusteks CX7C valemile mitte-vastavaks peptiidseteks järjestusteks (PASM). Hilisemad valideerimiskatsed selle peptiidiga (andmeid pole näidatud) ei vastanud käesolevas töös püstitatud eesmärgile.

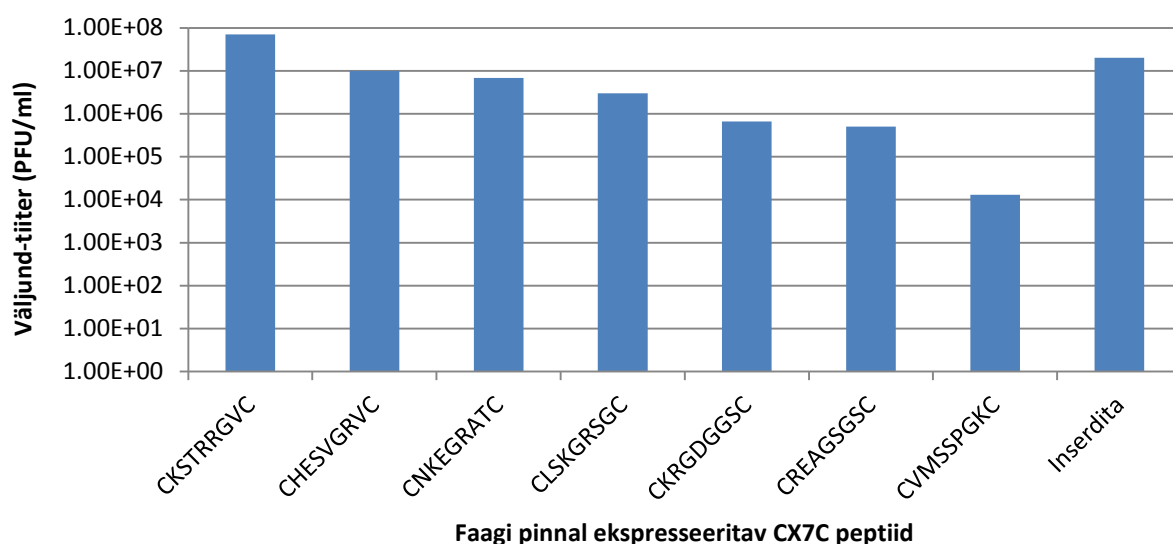
Mutatsioonid T7 sabafiibri valgus on ilmselt faagi veres ringlemise aega pikendavad faktorid (Sokoloff jt., 2003). Et välistada võimalikku sabafiibrit kodeeriva geeni muteerumisest tulenevat mõju faagi veres ringlemise ajale, sekveneeriti selekteeritud peptiide ekspresseerivatel faagidel potentsiaalne mutatsiooniregioon sabafiibrit kodeerivas geenis 17. Selgus, et kõik seitse faagi olid katse käigus omandanud *missense* mutatsiooni, mille tagajärjel toimus aminohappe asendumine positsioonis 200 või 211 (Tabel 3). Seega võisid need peptiidid läbida selekteeriva „sõela“ tänu faagi sabafiibris kodeeritavale mutatsioonile.

Et hinnata kuvatavast peptiidist tulenevat mõju faagi veres ringlemisele, viidi läbi kontrollkatse (Tabel 3 ja Joonis 2), kus selekteeritud peptiide ekspresseerivaid faage võrreldi inserdita faagiga (Tabel 3, peptiid 8). Selle faagi kapsiidi valguga 10B karboksüülterminuses ei kuvata juhuslikku peptiidi. Eeldatakse, et veres ringlemist soodustavat peptiidi kuvav faag annab sama ringlemisaja ja sisend-tiitri korral kõrgema väljund-tiitri kui inserdita faag. Tabelis 3 on välja toodud selekteeritud peptiidid (1-7) ja võrdlusfaag (8), mutatsioon vastavate faagide sabafiibrit kodeerivas geenis 17 ning faagi tiiter veres ringlemise aja järgselt ehk väljund (PFU/ml). Võrdlemiseks on välja toodud varasemalt näidatud mutatsiooniregioonid (9) T7 sabafiibri valgus (Sokoloff jt., 2003) ja vastav järjestus metsik-tüüpi T7 sabafiibris (10).⁵ Kõikidel juhtudel oli süstitud suspensiooni tiiter ehk **sisend 2x10⁹ PFU/ml** ja faagi veres ringlemise aeg **240 minutit**. Kõik suspensioonid süstiti eraldi katseloomadesse.

⁵ <http://www.uniprot.org/uniprot/P03748>

Tabel 3. Selekteeritud peptiide ekspresseerivate faagide võrdlus inserdita faagiga.

Jrk nr	Peptiid	Gp17 mutatsioon	Väljund (PFU/ml)
1.	CKSTRRGVC	Gp17- E ₂₁₁	7×10^7
2.	CHESVGRVC	Gp17- N ₂₁₁	1×10^7
3.	CNKEGRATC	Gp17- H ₂₀₀	6.8×10^6
4.	CLSKGRSGC	Gp17- Q ₂₁₁	3×10^6
5.	CKRGDGGSC	Gp17- Q ₂₁₁	6.6×10^5
6.	CREAGSGSC	Gp17- H ₂₀₀	5×10^5
7.	CVMSSPGKC	Gp17- H ₂₀₀	1.3×10^4
8.	Inserdita	Gp17- E ₂₁₁	2×10^7
9.	Gp17 mutant	KQWC ₂₀₀ DETKGFL ₂₀₇ DEAE ₂₁₁ RFKNTAG	-
10.	Metsik-tüüpi T7	KQWR ₂₀₀ DETKGFR ₂₀₇ DEAK ₂₁₁ RFKNTAG	-



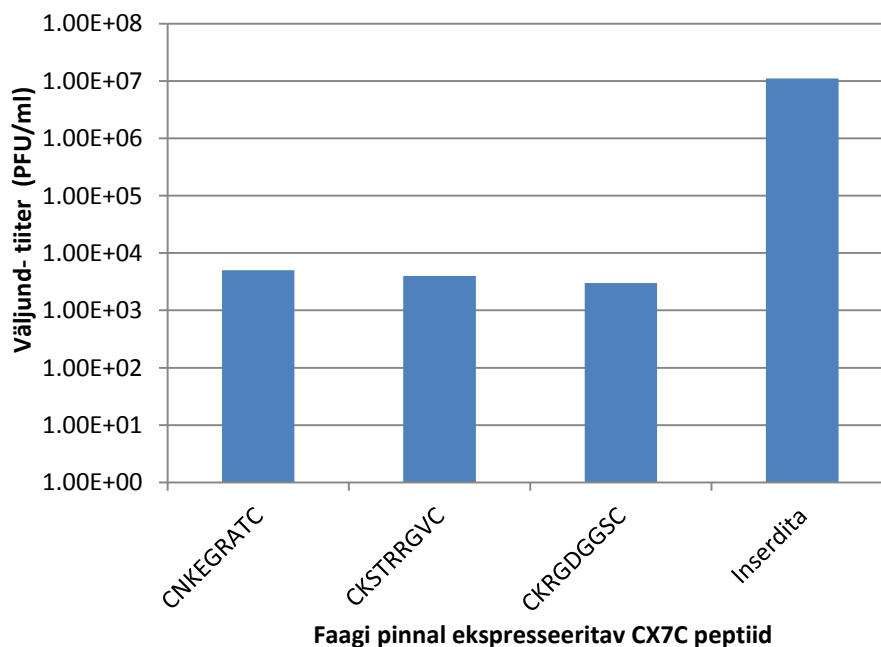
Joonis 2. Selekteeritud peptiide ekspresseerivate faagide võrdlus inserdita faagiga. Joonis on täienduseks Tabelis 3 esitatud tulemustele. Y-telg näitab 200 µl verest määratud faagi tiitrit (PFU/ml) **240 minutit** pärast faagi süstmist (**sisend-tiiter 2×10^9 PFU/ml**) katselooma. X-teljel on katseloomadesse süstitud faagide suspensioonid, mis on tähistatud vastavalt sellele, millist CX7C peptiidi faagid kuvavad. Inserdita faag oma pinnal CX7C peptiidi ei ekspresseeri. Kõikide faagide sabafiibril kodeerivas geenis esineb mutatsioon. Joonis on kujutatud logaritmilises skaalas.

Inserdita faagist (Tabel 3, peptiid 8) kõrgema (3,5 korda) väljund-tiitri andis vaid CKSTRRGVC peptiidi (Tabel 3, peptiid 1) ekspresseeriv faag. Nii inserdita kui ka CKSTRRGVC peptiidiga faagi sabafiibril avalduv mutatsioon oli sama (Gp17-**E**₂₁₁), millest tulenevalt on ainus erinevus faagide vahel nende kapsiidivalkude 10B terminused. Seega on tõenäoline, et CKSTRRGVC faagi kõrgem väljund-tiiter on tingitud kuvatavast peptiidist. Samuti on võimalik, et mutatsioon Gp17-**E**₂₁₁ annab võrreldes teiste tuvastatud sabafiibril mutatsioonidega mõnevõrra suurema eelise veres ringlemiseks.

Seitsmest peptiidist valiti omakorda kolm juhuslikku peptiidi (Tabel 3, peptiidid 1, 3 ja 5). Järgneva katse eesmärk oli näha, kas muteerunud sabafiibriga T7 faagis ekspresseeritavate peptiidide ringlemisajad on sarnased samade peptiidide ekspresseerimisel metsik-tüüpi sabafiibriga T7 faagis. Selleks lõigati järjestused esialgsest, sabamutatsiooni kandvast vektorist välja ning kloneeriti metsik-tüüpi T7 vektorisse. Amplifitseeritud ja puhastatud faagid süstiti paralleelselt kolme katselooma ning võrreldi muteerunud sabafiibriga kodeerivat geeni ekspresseeriva ja CX7C peptiidi mitte-kuvava (insertida) faagiga (Tabel 4 ja Joonis 3). Tabelis 4 on välja toodud selekteeritud peptiidid (1-3) ja võrdlusfaag (4), peptiidile vastava faagi sabafiiber ning faagi tiiter veres ringlemisaja järgselt ehk väljund (PFU/ml). Kõikidel juhtudel oli süstitud suspensiooni tiiter ehk **sisend $1,4 \times 10^9$ PFU/ml** ja faagide veres ringlemise aeg **240 minutit**.

Tabel 4. Selekteeritud peptiide kuvavate metsik-tüüpi Gp17 faagide võrdlus insertida mutantsete Gp17 faagidega.

Jrk nr	Peptiid	Gp17	Väljund (PFU/ml)
1.	CNKEGRATC	metsik-tüüpi	5×10^3
2.	CKSTRRGVC	metsik-tüüpi	4×10^3
3.	CKRGDGGSC	metsik-tüüpi	3×10^3
4.	Insertida	Gp17-E ₂₁₁	$1,1 \times 10^7$



Joonis 3. Metsik-tüüpi Gp17 faagide võrdluskatse insertida mutantse Gp17 faagiga. Joonis on täienduseks Tabelis 4 esitatud tulemustele. Y-telg näitab 200 µl verest määratud faagi tiitrit (PFU/ml) **240 minutit** pärast faagi süstmist (**sisend $1,4 \times 10^9$ PFU/ml**) katselooma. X-teljel on katseloomadesse süstitud faagide suspensioonid, mis on tähistatud vastavalt sellele, millist CX7C peptiidi nad kuvavad. Insertida faag oma pinnal CX7C peptiidi ei ekspresseeri. CX7C peptiide ekspresseerivate faagide sabafiibriga kodeeriv geen on metsik-tüüpi. Insertida faagi sabafiibrivalgus on mutatsioon Gp17-E₂₁₁.

Selekteeritud faagide väljund-tiitrid olid suhteliselt võrdsed ja ühtlasi ei allunud seitsme peptiidi katses saadud tulemustele (Tabel 3 ja Joonis 2), kus samade peptiidide väljund-tiitrid erinesid üksteisest ~10-100 korda. Lisaks olid saadud tiitrid madalad (~10³ PFU/ml) võrreldes inserdita faagiga (~10⁷ PFU/ml) ning eelneva seitsme peptiidi katsega (~10⁵-10⁷ PFU/ml; Tabel 3 ja Joonis 2). Eelnevast tulenevalt võime väita, et antud juhul oli mitte faagi pinnal ekspresseeritav peptiid, vaid mutatsioon sabafiibrit kodeerivas geenis vastutav faagide paremini veres püsimise eest. Võttes arvesse ka Sokoloff jt andmeid (Sokoloff jt., 2003), järeldadme, et mutatsioon sabafiibrit kodeerivas geenis 17 on oluline T7 veres ringlemist pikendav mehhanism.

Esimeset katseskeemist ei tuvastatud peptiide, mis aitaksid seda kandval faagil püsida veres paremini kui püsib faag, mis oma pinnal juhuslikku peptiidi ei ekspresseeri. Faagi sabafiiber katsete käigus muteerus ning mutatsiooni kandvad faagid osutusid veres ringlemise osas edukamaks kui metsik-tüüpi faagid. Järgmises katseskeemis rakendati peptiidset faagiraamatukogu, mis kodeerib sabafiibrivalgus mutatsiooni Gp17-E₂₁₁. Eesmärk sellisel lähenemisel oli hinnata faagi pinnal ekspresseeritava peptiidi teistest teguritest sõltumatut mõju faagi veres ringlemise ajale.

2.3.2.2 Peptiidide selekteerimine Gp17-E₂₁₁ T7 CX7C 415-1 raamatukogust

T7 pinnal kuvatavast peptiidist tuleneva mõju nägemiseks koostati uus raamatukogu, kus kõik juhuslikke peptiide kodeerivad järjestused viidi vektorisse, mille sabafiibrit kodeerivas geenis 17 esineb mutatsioon (vastav valk Gp17-E₂₁₁). Katse eesmärk oli selekteerida *in vivo* faagi kuvamise meetodil Gp17-E₂₁₁ T7 CX7C 415-1 raamatukogust peptiidid, mis soodustavad neid ekspresseerivate faagide püsimist katselooma vereringes. Seda mutatsiooni on varasemalt kirjeldatud kui mehhanismi, mis inhibeerib faagi vereringest elimineerimist ja maksa akumulereerimist (Sokoloff jt., 2003). Lisaks andsid sellise sabamutatsiooniga faagid kõrgeima väljund-tiitri võrreldes teistsugust sabamutatsiooni kodeerivate faagidega (Tabel 3 ja Joonis 2).

Peptiidide tuvastamiseks süstiti raamatukogu kolmes järjestikuses selektsioonietapis, mida selgitab täpsemalt Joonis 1. Tabelis 5 on välja toodud katse kolm etappi, iga etapi puhul süstitud faagisuspensioonid, faagi veres ringlemise aeg (min), verre süstitud suspensiooni tiiter ehk sisend (PFU/ml) ja faagi tiiter veres ringlemise aja järgselt ehk väljund (PFU/ml). Kõik faagisuspensioonid süstiti eraldi katseloomadesse.

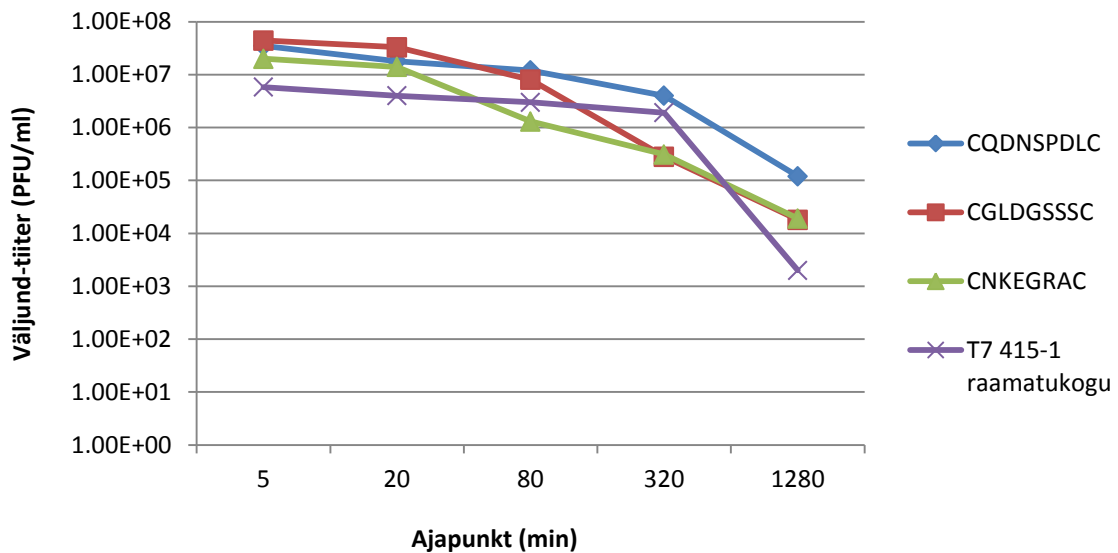
Tabel 5. Gp17-E₂₁₁ T7 CX7C 415-1 raamatukogu selektsioonietapid.

Etapp	Süstitav faagisuspensioon	Ajapunkt (min)	Sisend (PFU/ml)	Väljund (PFU/ml)
I	Algne raamatukogu	300	$2,3 \times 10^8$	1×10^4
II	I etapis selekteerunud raamatukogu	300	$1,1 \times 10^{10}$	$3,19 \times 10^8$
III	II etapis selekteerunud raamatukogu	300	$3,3 \times 10^{10}$	$1,18 \times 10^9$

Süstitud raamatukogude väljund-tiitrid saadi igas järgnevas etapis kõrgemad kui eelmised. Eeldati, et on toimunud valik faagi veres ringlemist soodustavate peptiidide kasuks. Kolmanda etapi tiitrimistassidelt sekveneeriti Sanger meetodiga 48 juhuslikku kolooniat. Katsed jätkusid nende hulgast selekteeritud kuue faagiga (Tabel 6, Väljund I). Kuuest peptiidist kolme tulemuslikumaga viidi läbi viie ajapunkti katse (Tabel 6, Väljund II ja Joonis 4), et näha faagi tiitri muutumist ajas. Tabelis 6 on välja toodud mõlemas katses süstitavate faagide poolt ekspresseeritavad peptiidid, faagi tiiter veres ringlemise aja järgselt ehk väljund (PFU/ml) ning faagide veres ringlemise ajad (min). Katse esimese osa ainsas ajapunktis võeti katselooma südamest 200µl verd. Katse teises osas võeti esimese nelja ajapunkti järel katselooma sabast 10µl verd ja viimase ajapunkti järel 200µl südamest. Mõlemas katses oli süstitavate faagisuspensioonide sisend 7×10^8 PFU/ml. Kõik erinevaid peptiide kuvavad faagid süstiti eraldi katseloomadesse.

Tabel 6. Sabafiibris mutatsiooni ekspresseerivate selekteeritud faagide ja T7 415-1 raamatukogu võrdlus.

Jrk nr	Peptiid/ raamatukogu	Väljund I (PFU/ml)		Väljund II (PFU/ml)			
		60min	5min	20min	80min	320min	1280min
1.	CGLDGSSSC	$2,1 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$	8×10^6	$2,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$
2.	CNKEGRAC	$1,8 \times 10^7$	2×10^7	$1,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$
3.	CQDNSPDL C	$1,1 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	4×10^6	$1,2 \times 10^5$
4.	CMKTISSKAC	$4,8 \times 10^4$					
5.	CNKEGRATC	$2,4 \times 10^6$					
6.	CKRSRDKEC	$1,3 \times 10^6$					
7.	T7 415-1 raamatukogu	$3,9 \times 10^5$	$5,8 \times 10^6$	4×10^6	3×10^6	$1,9 \times 10^6$	2×10^3



Joonis 4. Selekteeritud peptiide kuvavate faagide ja T7 415-1 faagiraamatukogu väljund-tiitrite muutumine ajas. Joonis on täienduseks Tabelis 6 esitatud Väljund II tulemustele. Y-telg näitab katselooma verest määratud faagi tiitrit (PFU/ml) vastavalt X-teljel toodud ajapunktidel. Joonis on esitatud logaritmilises skaalas.

Selekteeritud peptiide kuvavate faagide tiitrid oli pärast vieminutilist veres ringlemist keskmiselt ~20 korda madalamad kui algselt vereringesse süstitud suspensioonidel. Raamatukogu tiiter langes sama aja jooksul ~100-korda. Teine järsk tiitri langus ($\sim 10^3$ PFU/ml) raamatukogu puhul oli ajapunktide 320 ja 1280 minutit vahel. Samal ajal oli selekteeritud peptiide kuvavate faagide väljund-tiitrite langus sujuvam ning viimase ajapunkti tiitrid saadi kõrgemad kui raamatukogul. Raamatukogu süstimise eesmärk oli näha, kuidas reageerivad ringlemisaja suhtes mõlema äärmuse ehk faagi veres ringlemist soodustavaid ning pärssivaid peptiidide kuvavad faagid. Antud juhul toimus suurem seleksioon esimese viie minuti jooksul pärast raamatukogu süstimist ning järgmine pärast 320 minuti ajapunkti. Kuna selekteeritud peptiide kuvavate faagide puhul järske muutusi väljund-tiitrites ei nähtud võib oletada, et need peptiidid omavad stabiliseerivat mõju faagi veres püsimisele.

CQDNSPDLC peptiidi ekspresseeriv faag andis kolmes viimases ajapunktis kõrgeimad väljund-tiitrid. Katsed jätkusid selle peptiidi valideerimisega. Tabelis 7 on välja toodud valideerimiskatses süstitud faagisuspensioonid ja faagi tiiter veres ringlemise aja järgselt ehk väljund (PFU/ml). Vere kogumise ajapunkt oli **1440 minutit** ning süstitavate faagisuspensioonide tiiter ehk **sisend $2,2 \times 10^8$ PFU/ml**. CQDNSPDLC peptiidi ekspresseerivat faagi süstiti paralleelselt kolme katselooma, inserdita faagi kahe katselooma vereringesse.

Tabel 7. Peptiidi CQDNSPDLC valideerimine.

Jrk nr	Peptiid	Väljund (PFU/ml)
1.	CQDNSPDLC	$2,8 \times 10^2$
2.	CQDNSPDLC	1×10^2
3.	CQDNSPDLC	$4,7 \times 10^2$
4.	Inserdita	$1,5 \times 10^2$
5.	Inserdita	$4,9 \times 10^2$

Kui eelmises katses (Tabel 6 ja Joonis 4) oli CQDNSPDLC peptiidi ekspresseeriv faag kõige tulemuslikum, siis valideerimiskatses (Tabel 7) ei olnud see inserdita kontrollfaagidest edukam. Keskmise väljund-tiitri CQDNSPDLC faagidel saadi $2,8 \times 10^2$ ja inserdita faagidel $3,2 \times 10^2$. Kuna töös otsitav peptiid peaks võrreldes inserdita faagiga andma kõrgema väljund-tiitri (oodatav on vähemalt 100 korda suurem tiiter), siis ka teisest katseskeemist ei selekteerunud peptiide, mis aitaksid seda kuvaval faagil püsida veres paremini kui püsib faag, mis oma pinnal juhuslikku peptiidi ei ekspresseeri.

Seniste katsete tulemused ning järgmise katseskeemi konstrueerimine viisid diskussioonini teemal - kui oluline on loomade arvu suurendamine katses. Ühelt poolt on millegi väitmine ühe või kahe katselooma põhjal saadud tulemustele toetudes statistiliselt vähe usutav. Samas jäid ühesuguse 10B karboksüülterminusega faagide väljund-tiitrid samasse suurusjärku (Tabel 7). Sarnast tendentsi oli näha ka CD47 ning Gp17-E₂₁₁ peptiide ekspresseerivate faagide katses (Tabel 1), kus kummatki faagi süstiti paralleelselt kahte katselooma ja saadud väljund-tiitrid olid ligikaudu samad (4×10^2 ja 5×10^2 PFU/ml). Ion Torrent platvormi kvantifitseerimisfunktsiooni rakendamine võimaldab selekteeritud, erinevaid peptiide kuvavate faagide veres ringlemise edukust hinnata vähemate loomade põhjal ning teeb mugavamaks katse läbi viimise mitmes paralleelis. Oluline on ka asjaolu, et mass-sekveneerimisega saame jälgida erinevate peptiidide osakaalu muutust erinevates selektsioonietappides. Samas tuleks sellise lähenemise puhul arvestada ka võimalusega, et faagide vahel võib esineda omavahelisi koosmõjusid, mis soodustavad või pärsivad üksteise veres ringlemist.

Kolmas katseskeem lähtub hüpoteesist, et kõrgelt organiseeritud ning mitmetes koopiates ekspresseeritavad T7 kapsiidivalgud (10B valk ja CX7C peptiide kuvav T7) on märguandeks IgM antikehi tootvatele B-lümfotsüütidele, mis neutraliseerivad sellised faagid kui organismile „võõrad“ antigeenid (Zinkernagel jt., 2001). 10A kapsiidivalgud IgM antikehadega enamasti ei seostu (Sokoloff jt., 2001). Vektoril 10-3b põhineva T7 kapsiidi

moodustavad valdavalt 10A valgud, mille terminuses juhuslikku peptiidi ei kuvata. Seega erineb kolmas katseskeem teisest katseskeemist selle poolest, et süstitava, T7 10-3b vektoril põhineva raamatukogu faagide pinnal ekspresseeritakse juhuslikke peptiide ainult 5-15 koopiat.⁶ Sellega loodetakse pärssida IgM seondumist peptiide kuvavate faagidega ning soodustada nende veres ringlemist.

2.3.2.3 Peptiidide selekteerimine T7 CX7C 10-3b raamatukogust

Katse eesmärk oli selekteerida *in vivo* tingimustes faagi kuvamise meetodil sabafiibrit kodeerivas geenis 17 mutatsiooni Gp17-E₂₁₁ ekspresseerivast T7 CX7C 10-3b peptiidest raamatukogust sellised peptiidid, mis pikendavad neid ekspresseerivate faagide püsimist katselooma vereringes. Eeldati, et sellisel vektoril põhineva raamatukogu faagide seondumine IgM antikehadega on pärsitud, kuna kuvatavate peptiidide tihedus on väiksem. Nii nagu ka eelmises katses, kuvatakse peptiidid sabafiibri valgus mutatsiooni Gp17-E₂₁₁ ekspresseerivates faagides. Peptiidide selekteerimiseks süstiti raamatukogu katselooma vereringesse kolmes järjestikusel etapil. Protsessi kirjeldab täpsemalt Joonis 1. Tabelis 8 on välja toodud katse igas etapis süstitud faagisuspensioonid, faagi veres ringlemise aeg (min), süstitud faagisuspensiooni tiiter ehk sisend (PFU/ml) ja faagi tiiter veres ringlemise aja järgselt ehk väljund (PFU/ml). Katse III etapp viidi läbi paralleelselt kahes katseloomas, I ning II etapp ühes katseloomas.

Tabel 8. T7 Gp7-E₂₁₁ CX7C 10-3b raamatukogu selektsioonietapid.

Etapp	Süstitav faagisuspensioon	Ajapunkt (min)	Sisend (PFU/ml)	Väljund (PFU/ml)
I	Algne raamatukogu	240	1x10 ⁹	1,5x10 ⁷
II	I etapis selekteerunud raamatukogu	900	4,5x10 ⁹	1,8x10 ⁸
III	II etapis selekteerunud raamatukogu	2160	3x10 ⁹	1) 2,2x10 ³ 2) 8x10 ²

Kolmanda etapi tiitrimistassidelt sekveeriti Sanger meetodiga 72 faagilaiku. Saadud järjestustest valiti 28 peptiidi (Lisa 11), mida ekspresseerivad faagid segati kokku üheks raamatukoguks. Sellise lähenemise eelis, koos Ion Torrent sekveerimisplatvormi rakendamisega, on vähema arvu katseloomade kasutamise vajadus ning lühem katsele kuluv aeg. Ion Torrent platvormi kasutades on võimalik 28 peptiidi mõju faagi veres ringlemisele

⁶ <http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/novagen/C166-000.pdf>

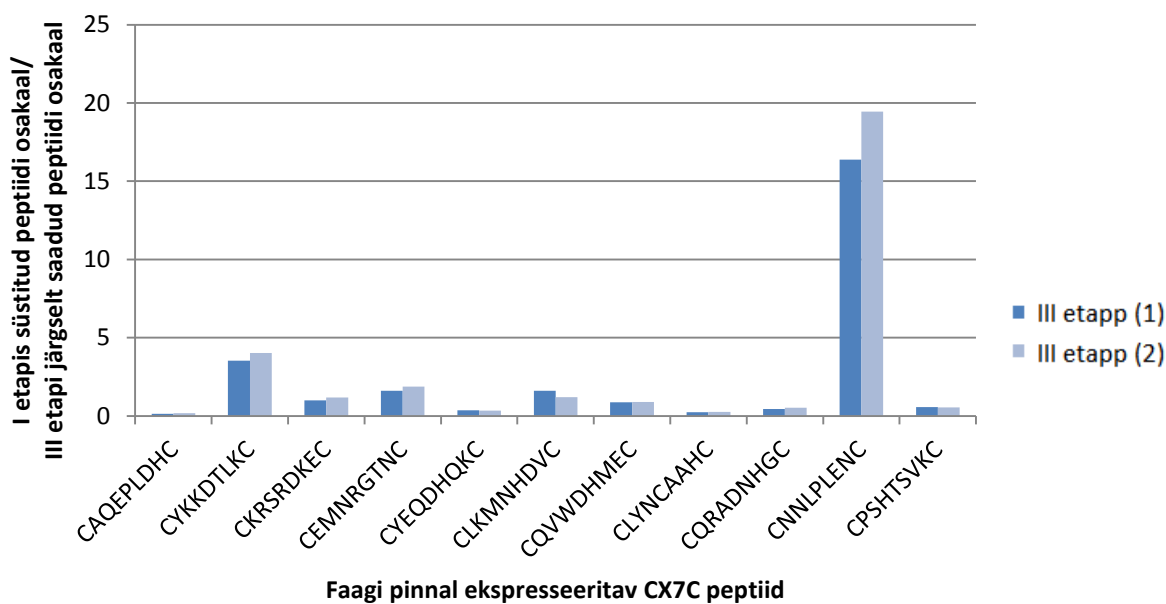
hinnata ühes katseloomas. Sellist katset on oluliselt mugavam viia läbi ka mitmes paralleelis, mis tõstab tulemuste usaldusväärsust. Lisaks võimaldab Ion Torrent sekveneerimine tuvastada inaktiveeritud faagide osakaalu proovis.

Konstrueeritud 28 peptiidi raamatukogu selekteeriti kolme järjestikuse etapina (Joonis 1). Tabelis 9 on välja toodud katse kolm etappi, iga etapi puhul süstitud faagisuspensioonid ja neile vastavad tiitrid ehk sisend (PFU/ml), faagi tiitrid veres ringlemise aja järgselt ehk väljund (PFU/ml) ning rikastumine ehk etapi väljund jagatud I etapi väljundite keskmise. Kõikides etappides oli faagi veres ringlemise aeg ehk **sisend 2160 minutit**. I ja III etapi puhul süstiti sama suspensiooni paralleelselt kahe katselooma vereringesse, II etapi puhul ühte katselooma. Esimese etapi katseloomade veredest saadud faagid segati kokku üheks faagisuspensiooniks ning pärast paljundamis- ja puhastamisetappe süstiti saadud suspensioon teise etapina järgmise katselooma vereringesse.

Tabel 9. 28 peptiidi raamatukogu seleksioonietapid.

Etapp	Süstitav faagisuspensioon	Sisend (PFU/ml)	Väljund (PFU/ml)	Rikastumine
I	Algne raamatukogu	3×10^9	1) 4×10^3 2) 5×10^3	-
II	I etapis selekteerunud raamatukogu	2×10^9	$7,9 \times 10^4$	17,5
III	II etapis selekteerunud raamatukogu	$2,79 \times 10^{10}$	1) $3,52 \times 10^6$ 2) $2,4 \times 10^5$	1) ~782x 2) ~53x

Iga etapi veredest eraldatud DNA-d analüüsiti Ion Torrent sekveneerimisplatvormil. Joonisel 5 on välja toodud Ion Torrent andmete põhjal III etapi veredes enim esindatud faagid. Diagrammi tulbad on Ion Torrent kvantifitseerimisandmete baasil arvutatud nii, et iga peptiidi osakaal algselt süstitavas 28 peptiidi raamatukogus on jagatud selle peptiidi osakaaluga III etapi ringlemise aja järgselt võetud verest. Iga peptiidi tulemused on toodud kahe katselooma põhjal (Tabel 9).



Joonis 5. Ion Torrent analüüsi kvantitatiivsed tulemused. Joonise Y-telg näitab suhtarvu, kus iga peptiidi osakaal I etapis süstitud suspensioonis ehk sisendis on jagatud selle peptiidi osakaaluga III etapi veres ringlemise aja järgselt võetud veres ehk väljundis. X-teljel on kvantifitseeritud peptiidid. III etapi katsed viidi läbi paralleelselt kahes katseloomas (1 ja 2).

Silmapaistvaid tulemusi andis peptiid CNNLPLENC, mille osakaal I etapis süstitud faagisuspensioonis oli üks väiksemaid (1,0%; andmeid pole näidatud), kuid suurenes III etapi lõpuks kahe paralleelse katse keskmise suhtes ~17 korda (17,4%; andmeid pole näidatud). Samas oli mõnede I etapis süstitud suspensioonis suurimat osakaalu omanud peptiidide osakaal III etapi lõpuks hoopis langenud (andmeid pole näidatud).

Kasutades NCBI BLAST⁷ programmi otsiti kattuvusi CNNLPLENC peptiidi ja teadaolevate valgujärjestuse vahel. Leiti, et CNNLPLENC kattub inimesel (*Homo sapiens*) kuue aminohappe (CNNLPL) ulatuses valgulise retseptori CD95 (CD95R) ligandi (CD95L) järjestusega (G₁₉₉QSCNNLPLSHK). Hiirel (*Mus musculus*) on CNNLPL peptiidi kattuvus CD95L järjestusega mõnevõrra madalam, kuna antud järjestuse neljas aminohape leutsiin (L, Leu) on asendunud glutamiiniga (Q, Gln; G₁₉₆QSCNNQPLNHHK). Samas on mõlema organismi puhul ligandile sarnanevas järjestuses säilinud proliin (P, Pro), mis retseptor-ligand seondumisel paikneb retseptori lähedal ning on oluline CD95L-CD95R kompleksi tekkimiseks (Schneider jt., 1997).

⁷<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

CD95R-CD95L interaktsioonil on oluline ülesanne organismi teatud osade immuunprivileegerituse säilitamisel. Immuunprivileegeritud alad suudavad kõrvaldada antigeene põletikulisi reaktsioone esile kutsumata. Üheks selliseks piirkonnaks on silmad, mis taluvad halvasti põletikulisi reaktsioone. Viirusinfektsiooni tagajärjel silma eeskambrisse sisenevad põletikureaktsioonides osalevad immuunrakud suunatakse apoptoosi. Reaktsiooni algatab immuunraku pinnal ekspresseeritava CD95R ja silmaraku pinnal kuvatava CD95L seondumine (Griffith jt., 1995). Sarnast immuunprivileegeritust on kirjeldatud ka testiste (Bellgrau jt., 1995) ning loote ja platsenta (Guller ja LaChapelle, 1999) puhul.

Antud katses oli regioon CD95L valgust ekspresseeritud T7 faagi pinnal. Selline faag osutus Ion Torrent kvantifitseerimisandmetel hästi vereringes püsivas faagiks (Joonis 5). Võimalik põhjendus sellele on, et toimus faagi pinnal ekspresseeritava peptiidi seondumine CD95R valgu ja seda ekspresseeriva imuunsüsteemi rakuga. Interaktsiooni tagajärjel suunati CD95R valku ekspresseeriv rakk apoptoosi ning CNNLPLENC peptiidi ekspresseeriv faag sai seeläbi võimaluse veres edasi ringelda.

CD95L seondumisel tema retseptoriga on lisaks aminohappele Pro₂₀₃/Pro₂₀₆-le (vastavalt *Mus musculus*/ *Homo sapiens*) veel üks oluline aminohape ligandi järjestuses - Tyr₂₁₅/Tyr₂₁₈ (vastavalt *Mus musculus*/ *Homo sapiens*), mis eeldatavasti paikneb, sarnaselt proliiniga, CD95R-CD95L seondumisel retseptorile füüsiliselt lähedal (Schneider jt., 1997).

Eelnevast tulenevalt võiks CNNLPLENC valideerimisel võtta arvesse järgmist:

- 1) teha korduskatsed selekteeritud CNNLPLENC, aga ka CNNQPLENC peptiide ekspresseerivate faagidega ja võrrelda nende faagide veres ringlemise edukust inserdita faagi ning CD47 lühendatud peptiidi ekspresseeriva faagiga. Glutamiini sisaldav peptiid võiks teoreetiliselt anda mõnevõrra parema tulemuse kui CNNLPLENC, kuna kohandub katseloomaga (*Mus musculus*).
- 2) teha katsed peptiididega, mis sisaldavad muuhulgas mõlemat CD95 retseptoriga seondumiseks olulist aminohapet Pro₂₀₃/Pro₂₀₆ ja Tyr₂₁₅/Tyr₂₁₈ (vastavalt *Mus musculus*/ *Homo sapiens*).
- 3) viia läbi katse muteeritud proliiniga (Pro₂₀₃/Pro₂₀₆), mis annaks infot proliini eeldatava olulisuse kohta.

- 4) viia läbi *in vitro* CD95 retseptorile seondumise katsed, et veenduda, kas CNNLPLENC peptiidi potentsiaalne veres ringlemist soodustav eelis on tuletatav CD95R-CD95L seondumisest.
- 5) hinnata CNNLPLENC peptiidi (või mõne sellest tuletatud versiooni) mõju veres ringlemise ajale ka nanopartiklitele seotuna.

Eksperimentaalse osa käigus leiti seega üks potentsiaalne faagi veres ringlemise aega pikendav peptiid (CNNLPLENC), mille edasiseks valideerimiseks tuleb viia läbi rida katseid (mõned näited eelmises lõigus). Lisaks veenduti, et faagi kuvamise meetod on sobiv leidmaks immuunsüsteemi vältivaid peptiide. Ühtlasi optimeeriti katsete käigus meetodi parameetreid (nt raamatukogu ning selle veres ringlemise aeg, andmete analüüsimine).

Käesoleva töö põhjal on sobivaim raamatukogu viimases katses konstrueeritud sabafiibri valgus mutatsiooni Gp17-E₂₁₁ ekspresseeriv T7 CX7C 10-3b raamatukogu. Sokoloff jt poolt avaldatud andmeid (Sokoloff jt., 2003) ning antud töö katsetest saadud tulemusi arvesse võttes võib väita, et mutatsioonid sabafiibrivalgus (eelkõige Gp17-E₂₁₁ mutatsioon) on olulised faagide veres ringlemise aega pikendavad kohastumused. T7 faagi kuvamise meetodi rakendamisel immuunsüsteemi vältivate peptiidide tuvastamiseks tuleks seega arvestada mutatsioonide tekkimisega sabafiibrivalgus. Selle tähelepanuta jätmise võib anda valepositiivseid tulemusi ning osutada segavaks teguriks seatud eesmärgi saavutamisel.

T7 10-3b vektoril põhinevat raamatukogu rakendati lähtudes IgM valentsusest. Eeldati, et faagi pinnal kuvatavate peptiidide väiksem tihedus pärsib IgM antikehade seondumist faagidega. Kuna potentsiaalne kaua ringlev peptiid CNNLPLENC tuvastati just selle raamatukogu selekteerimisel, on põhjust arvata, et eeldus vastab tõele. Ühtlasi võeti T7 Gp17-E₂₁₁ CX7C 10-3b raamatukogu selekteerimisel pikim ajapunkt, 2160 minutit. Sisend-tiitri 3×10^9 PFU/ml, korral saadi katselooma verest tagasi keskmiselt $1,5 \times 10^3$ PFU/ml (Tabel 8). Samas andis T7 Gp17-E₂₁₁ CX7C 415-1 raamatukogu 7×10^8 PFU/ml sisend-tiitri korral 1280 minuti järel tagasi sama väljund-tiitri, kui T7 10-3b 880 minutit pikema ajapunkti korral (Tabel 6). Eeldatavasti oleks T7 415-1 raamatukogu tiiter 2160 ajapunktis olnud oluliselt madalam. Seega võiks oletada, et väiksema kuvatava peptiidide tihedusega T7 10-3b raamatukogu faagid omavad eelist veres ringlemise osas, võrreldes T7 415-1 raamatukogu faagidega. Selles veendumiseks tuleks siiski viia läbi täiendavad katsed.

Käesoleva töö eksperimentaalse osa üheks nõrkuseks võib olla katsetes kasutatud loomade väike arv. Ühelt poolt on see põhjendatav sellega, et sama faagisuspensiooni süstimine kahte või enamasse eraldi looma ei andnud üldjuhul rohkem kui ligikaudu ühe suurusjärgu võrra erinevaid väljund-tiitreid (vt Tabel 1, peptiidid CD47 ja Gp17-**E**₂₁₁; Tabel 3 ja Tabel 4 inserdita faagid, Tabel 4, peptiidid 1-3). Lisaks on võimalik selekteeritud peptiidest moodustatud raamatukogu mugavalt hinnata ka ühes katseloomas, kui rakendada Ion Torrent platvormi. Samas on ühe või kahe katselooma põhjal saadud tulemused kaheldava väärtusega ning selleks, et midagi olulist väita, tuleks katsed läbi viia paralleelselt mitmes katseloomas, mida antud töös peptiidide valideerimisel ka rakendati.

KOKKUVÕTE

Käesolev magistritöö käsitleb organismis ravimite tarnimiseks rakendatavate nanopartiklite immunogeensuse probleemi. Nanopartiklite ja vere komponentide vahel tekkivate seoste tagajärjel aktiveeritakse immuunsüsteemist lähtuvad reaktsioonid, mille tulemusena kõrvaldatakse partiklid vereringest üsna kiiresti (Dobrovolskaia jt., 2008). Sellest tulenevalt ei saa nanopartikkel-ravim kompleks võimalust oma ülesannet täita. Praeguseks on küll leitud mõningaid võimalusi nanopartiklite veres ringlemise aja pikendamiseks (partikli pinna katmine polüetüleenglükooliga, vererakkude membraanidel põhinevad nanopartiklid jne), kuid kõigil neil esinevad teatud puudused (Moghimi jt., 2001).

Magistritöö praktilises osas püütakse lahendada nanopartiklite immunogeensuse probleemi uudest küljest. Faagi kuvamise meetodil *in vivo* tingimustes selekteeritakse peptiidsetest faagiraamatukogudest selliseid peptiide, mis võimaldaksid neid oma pinnal ekspresseerivatel faagidel immuunsüsteemi eest varjuda ning seeläbi kauem veres ringelda. Tõenäoliselt võiksid sellised peptiidid ka nanopartiklite pinnale seotuna pikendada nende ringlemise aega vereringes.

Eesmärgini jõudmiseks katsetati kolme, T7 faagi suhtes erinevat peptiidset raamatukogu. Katsete käigus tuvastati üks potentsiaalne faagi veres ringlemise aega pikendav peptiid CNNLPLENC. Tõenäoliselt on selle peptiidi faagi veres ringlemist pikendava omaduse tagamaadeks ligand-retseptor seosed. Nimelt leiti, et osa CNNLPLENC peptiidist (CNNLPL) kattub valgulise retseptori CD95 (CD95R) ligandi (CD95L) järjestusega. CD95R-CD95L interaktsioonil on organismis oluline ülesanne teatud kehaosade (silmad, testised) immuunprivileegerituse säilitamisel. Võimalik, et faagi poolt kuvatav peptiid seondus CD95 retseptorit ekspresseeriva makrofaagiga, mille tagajärjel retseptorit ekspresseeriv rakk elimineeriti ning peptiidi kuvav faag sai võimaluse veres edasi ringelda.

Lisaks eelnevale jõuti eksperimentaalse osa käigus ka järgmiste järeldusteni:

- *in vivo* faagi kuvamise meetod on rakendatav leidmaks peptiide, mis võimaldavad neid oma pinnal ekspresseerivatel faagidel kauem veres ringelda
- T7 faagid, mis algselt omavad metsik-tüüpi sabafiibrit kodeerivat geeni 17, omandavad selles geenis *in vivo* katsete käigus mutatsioone, mis soodustavad faagide ringlemist veres
- faagi pinnal ekspresseeritavat, mutatsiooni Gp17-E₂₁₁ sisaldavat sabafiibrivalgust tuletatud peptiidi ei saa pidada faagi veres ringlemise aega pikendavaks peptiidiks

Identification of Long-Circulating Peptides Using *In Vivo* Phage Display

Annika Jürimäe

SUMMARY

The main problem with basically any kind of drug is that they lack specificity and distribute evenly both in healthy and diseased tissues. Therefore drugs must be administered in excess in order to ensure their necessary concentration in diseased tissue. This often results in toxicity and unwelcome side effects. In order to overcome this obstacle, scientists are developing “smart“ nanosized drug carriers, which can be modified to target specific cells, tissues and organs (targeted nanoparticles). Unfortunately body’s immune system will clear those particles from bloodstream fairly quickly. This has led to the development of long-circulating targeted nanoparticles.

So far polyethylen glycol (PEG) is the most widely used surface modification in order to make nanoparticles circulate longer. But PEG has its disadvantages e.g. short-term effect and possible hindered uptake by diseased cells. The aim of this thesis was to find alternatives for PEG in the form of long-circulating peptides. *In vivo* phage display method was used to identify short peptides that would help phage expressing the peptide on its surface to avoid clearance by the immune system. It was presumed that those peptides will have the same effect when bound to nanoparticle and thus would allow drug carrying nanoparticles to perform their function. Peptides were selected from three different (regards to the peptide displaying phage, T7) libraries, which display about 10^9 different short peptides in the carboxyterminus of their capsid protein 10B.

One potential circulation time elongating peptide (CNNLPLENC) was found while screening Gp17- E_{211} T7 CX7C 10-3b library. The long-circulating mechanism probably lies in receptor ligand-interactions. CNNLPLENC peptide partially overlaps the aminoacid sequence of CD95 receptors (CD95R) ligand CD95 (CD95L). CD95R-CD95L interactions are responsible for why some parts of the body (eyes, testes) are immunoprivileged. It is possible, that the CNNLPLENC peptide on phage surface interacted with CD95R expressing macrophage which resulted in macrophage elimination. This allowed the phage expressing part of the CD95L perotein to continue its circulation in bloodstream. Further experiments are required in order to validate the peptide as a long-circulating peptide.

TÄNUAVALDUSED

Töö valmimisele kaasaaitamise eest soovin eelkõige tänada oma juhendajat Kuldar Kõivu ning kursuse- ja laborikaaslast Vidrik Tederit. Oli lõbus ja hariv teiega koostööd teha! Lisaks tänan oma kaasjuhendajat Sulev Ingerpuud töö keeleliste korrektuuride eest ning kogu Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi vähibioloogia uurimisgrupi sõbralikku kollektiivi kvaliteetse aja eest. Aitäh!

KIRJANDUSE LOETELU

- Abra, R.M., Bosworth, M.E. ja Hunt, C.A. 1980, "Liposome disposition in vivo: effects of pre-dosing with liposomes", *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, vol. 29, no. 2, pp. 349-360.
- Aggarwal, P., Hall, J.B., McLeland, C.B., Dobrovolskaia, M.A. ja McNeil, S.E. 2009, "Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no. 6, pp. 428-437.
- Ahmadi, A. ja Arami, S. 2013, "Potential applications of nanoshells in biomedical sciences", *Journal of drug targeting*, vol. 22, no. 3, pp. 175-190.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. ja Nejati-Koshki, K. 2013, "Liposome: classification, preparation, and applications", *Nanoscale research letters*, vol. 8, no. 1, pp. 102-276X-8-102.
- Alexiou, C., Jurgons, R., Seliger, C. ja Iro, H. 2006, "Medical applications of magnetic nanoparticles", *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 6, no. 9-10, pp. 2762-2768.
- Anselmo, A.C., Gupta, V., Zern, B.J., Pan, D., Zakrewsky, M., Muzykantov, V. ja Mitragotri, S. 2013, "Delivering nanoparticles to lungs while avoiding liver and spleen through adsorption on red blood cells", *ACS nano*, vol. 7, no. 12, pp. 11129-11137.
- Avrameas, S. ja Ternynck, T. 1995, "Natural autoantibodies: the other side of the immune system", *Research in immunology*, vol. 146, no. 4-5, pp. 235-248.
- Babickova, J., Tothova, L., Boor, P. ja Celec, P. 2013, "In vivo phage display--a discovery tool in molecular biomedicine", *Biotechnology Advances*, vol. 31, no. 8, pp. 1247-1259.
- Bartlett, D.W., Su, H., Hildebrandt, I.J., Weber, W.A. ja Davis, M.E. 2007, "Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 39, pp. 15549-15554.
- Bazan, J., Calkosinski, I. ja Gamian, A. 2012, "Phage display--a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications", *Human vaccines ja immunotherapeutics*, vol. 8, no. 12, pp. 1817-1828.
- Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A. ja Duke, R.C. 1995, "A role for CD95 ligand in preventing graft rejection", *Nature*, vol. 377, no. 6550, pp. 630-632.
- Casali, P. ja Schettino, E.W. 1996, "Structure and function of natural antibodies", *Current topics in microbiology and immunology*, vol. 210, pp. 167-179.

- Chambers, E. ja Mitragotri, S. 2004, "Prolonged circulation of large polymeric nanoparticles by non-covalent adsorption on erythrocytes", *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, vol. 100, no. 1, pp. 111-119.
- Chao, M.P., Weissman, I.L. ja Majeti, R. 2012, "The CD47-SIRPalpha pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications", *Current opinion in immunology*, vol. 24, no. 2, pp. 225-232.
- Coleman, R.E., Biganzoli, L., Canney, P., Dirix, L., Mauriac, L., Chollet, P., Batter, V., Ngalula-Kabanga, E., Dittrich, C. ja Piccart, M. 2006, "A randomised phase II study of two different schedules of pegylated liposomal doxorubicin in metastatic breast cancer (EORTC-10993)", *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 42, no. 7, pp. 882-887.
- Danner, S. ja Belasco, J.G. 2001, "T7 phage display: a novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 23, pp. 12954-12959.
- Dobrovolskaia, M.A., Aggarwal, P., Hall, J.B. ja McNeil, S.E. 2008, "Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution", *Molecular pharmaceutics*, vol. 5, no. 4, pp. 487-495.
- Fang, C., Shi, B., Pei, Y., Hong, M., Wu, J. ja Chen, H. 2006, "In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles: Effect of MePEG molecular weight and particle size", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 27, no. 1, pp. 27-36.
- Fang, R.H., Hu, C.M. ja Zhang, L. 2012, "Nanoparticles disguised as red blood cells to evade the immune system", *Expert opinion on biological therapy*, vol. 12, no. 4, pp. 385-389.
- Fernandes, A.I. ja Gregoriadis, G. 1997, "Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1341, no. 1, pp. 26-34.
- Feynman, R. 1960, "There's Plenty of Room at the Bottom", *Caltech Engineering and Science*, vol. 23, no. 5, pp. 22-36.
- Gradishar, W.J. 2006, "Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane", *Expert opinion on pharmacotherapy*, vol. 7, no. 8, pp. 1041-1053.
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R. ja Ferguson, T.A. 1995, "Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 270, no. 5239, pp. 1189-1192.
- Guller, S. ja LaChapelle, L. 1999, "The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces", *Seminars in reproductive endocrinology*, vol. 17, no. 1, pp. 39-44.
- Hall, S.S., Mitragotri, S. ja Daugherty, P.S. 2007, "Identification of peptide ligands facilitating nanoparticle attachment to erythrocytes", *Biotechnology progress*, vol. 23, no. 3, pp. 749-754.

- Hardonk, M.J., Dijkhuis, F.W., Hulstaert, C.E. ja Koudstaal, J. 1992, "Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation", *Journal of leukocyte biology*, vol. 52, no. 3, pp. 296-302.
- Hong, R.L., Huang, C.J., Tseng, Y.L., Pang, V.F., Chen, S.T., Liu, J.J. ja Chang, F.H. 1999, "Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: is surface coating with polyethylene glycol beneficial?", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 5, no. 11, pp. 3645-3652.
- Jones, S.W., Roberts, R.A., Robbins, G.R., Perry, J.L., Kai, M.P., Chen, K., Bo, T., Napier, M.E., Ting, J.P., Desimone, J.M. ja Bear, J.E. 2013, "Nanoparticle clearance is governed by Th1/Th2 immunity and strain background", *The Journal of clinical investigation*, vol. 123, no. 7, pp. 3061-3073.
- Kaplan, G. ja Gershoni, J.M. 2012, "A general insert label for peptide display on chimeric filamentous bacteriophages", *Analytical Biochemistry*, vol. 420, no. 1, pp. 68-72.
- Klibanov, A.L., Maruyama, K., Beckerleg, A.M., Torchilin, V.P. ja Huang, L. 1991, "Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1062, no. 2, pp. 142-148.
- Klumpp, C., Kostarelos, K., Prato, M. ja Bianco, A. 2006, "Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1758, no. 3, pp. 404-412.
- Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D. ja Schubert, U.S. 2010, "Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives", *Angewandte Chemie (International ed.in English)*, vol. 49, no. 36, pp. 6288-6308.
- Krown, S.E., Northfelt, D.W., Osoba, D. ja Stewart, J.S. 2004, "Use of liposomal anthracyclines in Kaposi's sarcoma", *Seminars in oncology*, vol. 31, Supplement 13, no. 0, pp. 36-52.
- Krumpe, L.R., Atkinson, A.J., Smythers, G.W., Kandel, A., Schumacher, K.M., McMahon, J.B., Makowski, L. ja Mori, T. 2006, "T7 lytic phage-displayed peptide libraries exhibit less sequence bias than M13 filamentous phage-displayed peptide libraries", *Proteomics*, vol. 6, no. 15, pp. 4210-4222.
- Lee, J.S. ja Feijen, J. 2012, "Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization", *Journal of Controlled Release*, vol. 161, no. 2, pp. 473-483.
- Liu, Y., Sun, J., Han, J. ja He, Z. 2010, "Long-circulating Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy", *Current Nanoscience*, vol. 6, pp. 347-354.
- Lövestam, G., Rauscher, H., Roebben, G., Klüttgen, B.S., Gibson, N. ja Putaud, J-P. ja Stamm, H. 2010, *Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes*, Publications Office of the European Union, Luxembourg.

- Lu, X., Wu, D., Li, Z. ja Chen, G. 2011, "Chapter 7 - Polymer Nanoparticles" in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* Academic Press, pp. 299-323.
- MacDiarmid, J.A., Madrid-Weiss, J., Amaro-Mugridge, N.B., Phillips, L. ja Brahmabhatt, H. 2007, "Bacterially-derived nanocells for tumor-targeted delivery of chemotherapeutics and cell cycle inhibitors", *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 6, no. 17, pp. 2099-2105.
- Millan, C.G., Marinero, M.L., Castaneda, A.Z. ja Lanao, J.M. 2004, "Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers", *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, vol. 95, no. 1, pp. 27-49.
- Moghimi, S.M. ja Bonnemain, B. 1999, "Subcutaneous and intravenous delivery of diagnostic agents to the lymphatic system: applications in lymphoscintigraphy and indirect lymphography", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 37, no. 1-3, pp. 295-312.
- Moghimi, S.M., Hunter, A.C. ja Murray, J.C. 2001, "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice", *Pharmacological reviews*, vol. 53, no. 2, pp. 283-318.
- Muzykantov, V.R. 2010, "Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature", *Expert opinion on drug delivery*, vol. 7, no. 4, pp. 403-427.
- Noriega-Luna, B., Godínez, L.A., . Rodríguez, F.J., Rodríguez, A., Zaldívar-Lelo de Larrea, G., Sosa-Ferreyra, C.F., Mercado-Curiel, R.F., Manríquez, J. ja Bustos, E. 2014, "Applications of Dendrimers in Drug Delivery Agents, Diagnosis, Therapy, and Detection", *Journal of Nanomaterials*, vol. 2014, pp. 19 pages.
- Owens, D.E., 3rd ja Peppas, N.A. 2006, "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles", *International journal of pharmaceutics*, vol. 307, no. 1, pp. 93-102.
- Pande, J., Szewczyk, M.M. ja Grover, A.K. 2010, "Phage display: concept, innovations, applications and future", *Biotechnology Advances*, vol. 28, no. 6, pp. 849-858.
- Parodi, A., Quattrocchi, N., van de Ven, A.L., Chiappini, C., Evangelopoulos, M., Martinez, J.O., Brown, B.S., Khaled, S.Z., Yazdi, I.K., Enzo, M.V., Isenhardt, L., Ferrari, M. ja Tasciotti, E. 2013, "Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions", *Nature nanotechnology*, vol. 8, no. 1, pp. 61-68.
- Partha, R. ja Conyers, J.L. 2009, "Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials", *International journal of nanomedicine*, vol. 4, pp. 261-275.
- Peter, M.E. ja Krammer, P.H. 2003, "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond", *Cell death and differentiation*, vol. 10, no. 1, pp. 26-35.
- Petros, R.A. ja DeSimone, J.M. 2010, "Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications", *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 9, no. 8, pp. 615-627.
- Photos, P.J., Bacakova, L., Discher, B., Bates, F.S. ja Discher, D.E. 2003, "Polymer vesicles in vivo: correlations with PEG molecular weight", *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, vol. 90, no. 3, pp. 323-334.

- Pisanic Ii, T.R., Zhang, Y. ja Wang, T.H. 2014, "Quantum dots in diagnostics and detection: principles and paradigms", *The Analyst*, vol. 139, no. 12, pp. 2968-2981.
- Rodriguez, P.L., Harada, T., Christian, D.A., Pantano, D.A., Tsai, R.K. ja Discher, D.E. 2013, "Minimal "Self" peptides that inhibit phagocytic clearance and enhance delivery of nanoparticles", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 339, no. 6122, pp. 971-975.
- Salata, O. 2004, "Applications of nanoparticles in biology and medicine", *Journal of nanobiotechnology*, vol. 2, no. 1, pp. 3.
- Sanchez, F. ja Sobolev, K. 2010, "Nanotechnology in concrete – A review", *Construction and Building Materials*, vol. 24, no. 11, pp. 2060-2071.
- Schneider, P., Bodmer, J.L., Holler, N., Mattmann, C., Scuderi, P., Terskikh, A., Peitsch, M.C. ja Tschopp, J. 1997, "Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 30, pp. 18827-18833.
- Sergeeva, A., Kolonin, M.G., Molldrem, J.J., Pasqualini, R. ja Arap, W. 2006, "Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, no. 15, pp. 1622-1654.
- Shah, M., Badwaik, V.D. ja Dakshinamurthy, R. 2014, "Biological applications of gold nanoparticles", *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 14, no. 1, pp. 344-362.
- Singh, D., Dubey, P., Pradhan, M. ja Singh, M.R. 2013, "Ceramic nanocarriers: versatile nanosystem for protein and peptide delivery", *Expert opinion on drug delivery*, vol. 10, no. 2, pp. 241-259.
- Smith, G.P. 1985, "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 228, no. 4705, pp. 1315-1317.
- Sokoloff, A.V., Bock, I., Zhang, G., Hoffman, S., Dama, J., Ludtke, J.J., Cooke, A.M. ja Wolff, J.A. 2001, "Specific recognition of protein carboxy-terminal sequences by natural IgM antibodies in normal serum", *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 3, no. 6, pp. 821-830.
- Sokoloff, A.V., Bock, I., Zhang, G., Sebestyen, M.G. ja Wolff, J.A. 2000, "The interactions of peptides with the innate immune system studied with use of T7 phage peptide display", *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 2, no. 2, pp. 131-139.
- Sokoloff, A.V., Wong, S.C., Ludtke, J.J., Sebestyen, M.G., Subbotin, V.M., Zhang, G., Budker, T., Bachhuber, M., Sumita, Y. ja Wolff, J.A. 2003, "A new peptide ligand that targets particles and heterologous proteins to hepatocytes in vivo", *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 8, no. 6, pp. 867-872.
- Srivastava, A.S., Kaido, T. ja Carrier, E. 2004, "Immunological factors that affect the in vivo fate of T7 phage in the mouse", *Journal of virological methods*, vol. 115, no. 1, pp. 99-104.

- Tang, M., Russell, P.J. ja Khatri, A. 2007, "Magnetic nanoparticles: prospects in cancer imaging and therapy", *Discovery medicine*, vol. 7, no. 38, pp. 68-74.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P. ja Bannerjee, S.K. 2012, "Drug delivery systems: An updated review", *International journal of pharmaceutical investigation*, vol. 2, no. 1, pp. 2-11.
- Torchilin, V.P. 2005, "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers", *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 4, no. 2, pp. 145-160.
- Velappan, N., Fisher, H.E., Pesavento, E., Chasteen, L., D'Angelo, S., Kiss, C., Longmire, M., Pavlik, P. ja Bradbury, A.R. 2010, "A comprehensive analysis of filamentous phage display vectors for cytoplasmic proteins: an analysis with different fluorescent proteins", *Nucleic acids research*, vol. 38, no. 4, pp. e22.
- Zahr, A.S., Davis, C.A. ja Pishko, M.V. 2006, "Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface modified with poly(ethylene glycol)", *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 22, no. 19, pp. 8178-8185.
- Zhang, L., Gu, F.X., Chan, J.M., Wang, A.Z., Langer, R.S. ja Farokhzad, O.C. 2008, "Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments", *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. 83, no. 5, pp. 761-769.
- Zinkernagel, R.M., LaMarre, A., Ciurea, A., Hunziker, L., Ochsenbein, A.F., McCoy, K.D., Fehr, T., Bachmann, M.F., Kalinke, U. ja Hengartner, H. 2001, "Neutralizing antiviral antibody responses", *Advances in Immunology*, vol. 79, pp. 1-53.
- Zolnik, B.S., Gonzalez-Fernandez, A., Sadrieh, N. ja Dobrovolskaia, M.A. 2010, "Nanoparticles and the immune system", *Endocrinology*, vol. 151, no. 2, pp. 458-465.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

- ^{1,6} <http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/novagen/C166-000.pdf> (10.05.2014)
- ² http://www.favorgen.com/products/nucleic_dna_fragment_purification/GEL_PCR_kit.html (15.05.2014)
- ³ <http://web.expasy.org/translate/> (08.04.2014)
- ⁴ <https://lifescience.roche.com> (02.05.2014)
- ⁵ <http://www.uniprot.org/uniprot/P03748> (19.05.2014)
- ⁷ <http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (08.04.2014)

LISAD

Lisa 1. Faagi amplifitseerimise protokoll

1. Üleöökultuuri kasvatamine *E. coli* BLT5403 (faagi amplifitseerimiseks) ja BLT5615 (faagi tiitrimiseks) algkultuuridest

- Bakteri üleöö ehk *ON* (ingl.k. *over night*) kultuuri kasvatamiseks valmistati vedelsööde: 600 ml LB-söötmele (*Sigma-Aldrich Co, USA*) lisati 600 µl karbenitsiliini (50 mg/ml; *Carbosynth Ltd, UK*)
- 25 ml eelnevalt valmistatud söödet mõõdeti paralleelselt kahte 250 ml klaaskolbi
- Ühte 250 ml klaaskolbi inokuleeriti *E. coli* BLT5403 ja teise *E. coli* BLT5615 (*Novagen, USA*)
- Mõlemat kultuuri kasvatati loksutis (*Eppendorf AG, USA*) 200 rpm 37 °C juures üleöö
- Võimaliku faagi kontaminatsiooni tuvastamiseks mõõdeti 500 µl *ON*-kultuuri 15 ml plastiktuubi ja lisati 4 ml ~60 °C juures hoitud topagarit (*Lab M Ltd, Suurbritannia*) ja 1 M IPTG (*Carbosynth Ltd, UK*) lahust suhtega 500:1-le
- Seejärel valati eelnevalt valmistatud 1xLB Milleri söötmega (*Sigma-Aldrich Co, USA*) Petri-tassidele (valmistatud TÜ vähibioloogia labori spetsialisti Kaarel Kurm, MSc poolt) ja hoiti 37 °C juures vähemalt 3 h
- Puhta *E. coli* BLT5403 ja BLT5615 (*Novagen, USA*) *ON* kultuur villiti varasemalt autoklaavitud klaaspurkidesse ja hoiustati kuni üks nädal 4 °C juures

2. *E. coli* BLT5403 ja BLT5615 *ON* kultuuridest $OD_{600}=0,5$ kultuuride saamine

- Et saada *E. coli* BLT5615 ja BLT5403 (*Novagen, USA*) bakterikultuurid, mille optiline tihedus (ingl.k. *optical density, OD*; optiline tihedus) 600 nm lainepikkuse juures (OD_{600}) oleks 0,5, mõõdeti paralleelselt kahte 2 l klaasanumasse 250 ml punktis 1 valmistatud vedelsöödet
- Ühte anumasse pipeteeriti 2,5 ml *E. coli* BLT5615 (*Novagen, USA*) *ON* kultuuri ning teise *E. coli* BLT5403 (*Novagen, USA*) *ON* kultuuri

- Mõlemat kultuurid kasvatati loksutil (*Eppendorf AG, USA*) 200 rpm 37 °C juures ligikaudu ~2,5 h, täpsemalt kuni *BioPhotometer plus* (*Eppendorf, USA*) spektrofotomeetriga mõõdeti OD_{600} väärtuseks 0,5
- Puhtad *E. coli* BLT5615 ja BLT5403 (*Novagen, USA*) $OD_{600}=0,5$ kultuurid villiti varasemalt autoklaavitud klaaspurkidesse ja hoiustati kuni üks nädal 4 °C juures

3. A. Faagi amplifikatsioon koos preamplifikatsiooniga

- Valmistati faagi preamplifikatsioonilahus (vajalik ainult madala faagi kontsentratsiooni korral): 15 ml plastiktuubi pipeteeriti (1) vastavalt 1000:10:100 suhtes 1 ml LB-sööde (*Sigma-Aldrich Co, USA*), karbenitsilliin (50 mg/ml; *Carbosynth Ltd, UK*) ja *E. coli* BLT5403 (*Novagen, USA*) lahust ning (2) 10 µl uuritavat faagi
- Suspensiooni inkubeeriti loksutil (*Eppendorf AG, USA*) 200 rpm 37 °C juures ~2h
- Valmistati lüüsilahus, milleks valati kokku 25 ml *E. coli* BLT5403 (*Novagen, USA*) $OD_{600}=0,5$ kultuuri ja ~1 ml faagi preamplifikatsioonilahust
- Suspensiooni inkubeeriti loksutil (*Eppendorf AG, USA*) 200 rpm 37 °C juures ~1,5 h, kuni lüüsilahus selgines ehk bakter lüüsus

B. Faagi amplifikatsioon ilma preamplifikatsioonita

- Valmistati lüüsilahus, milleks valati kokku 25 ml *E. coli* BLT5403 (*Novagen, USA*) $OD_{600}=0,5$ kultuur ja kuni 2 ml kõrge kontsentratsiooniga faagisuspensiooni
- Suspensiooni inkubeeriti loksutil (*Eppendorf AG, USA*) 200 rpm 37 °C juures ~1,5 h, kuni lüüsilahus selgines ehk bakter lüüsus

Lisa 2. Faagi puhastamise protokoll

1. Faagi PEG-puhastamine (etapid viidi läbi jääl)

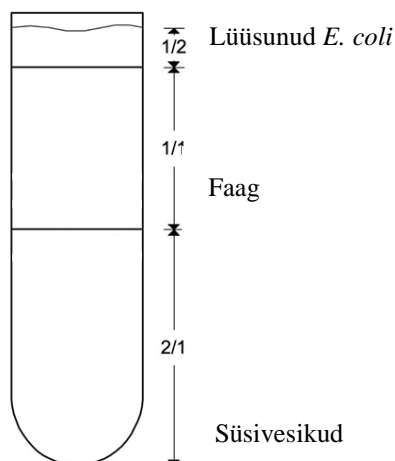
- Lüsaaat valati 50ml plastiktuubi. Lüsaaadile lisati 3 ml 5 M NaCl (*Sigma-Aldrich Co, USA*), segati korralikult, seejärel tsentrifugeeriti 10 min 8000 rpm 4 °C juures (rootor ss34)
- Saadud supernatandile lisati 8,4 ml 50% PEG8000 (valmistatud TÜ vähibioloogia labori spetsialisti Kaarel Kurm, MSc poolt), segati korralikult, seejärel inkubeeriti ~30 min jääl ja 4 °C külmikus
- Tsentrifugeeriti 8000 rpm (rootor ss34) 10 min 4 °C juures, eemaldati supernatant ning lasti sademel 1-2 min kuivada
- Sade resuspendeeriti 2 ml-s 1x PBS-s (*PAA, Austria*)

2. Faagi CsCl₂- puhastamine

- Valmistati 62,5%-ne CsCl₂ alglahus: 25 g CsCl₂ (*Sigma-Aldrich Co, USA*) + 15 ml 1xPBS (*PAA, Austria*). Lahus filtreeriti läbi d=0,22 µm filtri (*Merck Millipore Ltd, IRL*)
- Kolm kihti erineva kontsentratsiooniga lahust pipeteeriti kindlas järjekorras ja mahus ultratsentriifuugi tuubi (*Beckman Coulter Inc, USA*). Tabelis 10 on toodud CsCl₂ alglahuse (*Sigma-Aldrich Co, USA*) ja 1x PBS-i (*PAA, Austria*) suhted, pipeteerimise järjekord ja maht. Iga kihi tase märgistati tuubile, kõige peale lisati 2 ml PEG-puhastatud faagi
- Seejärel ultratsentriifuugiti (*Beckman L7-65; Beckman Coulter Inc, USA*) 2 h 30 min 40 000 rpm (rootor sw50.1) toatemperatuuril
- Pärast ultratsentriifuugimist jaotusid PEG-puhastatud faagisuspensiooni komponendid vastavalt joonisel 6 kujutatud skeemile
- 3 ml süstal torgati plastiktuubi seinast läbi ja ~2 ml faagisuspensiooni koguti süstlasse

Tabel 10. CsCl₂ lahuste valmistamine ning pipeteerimise kogused.

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



Joonis 6. CsCl₂-puhastamise ultratsentrifuugimisejärgnev kihtide jaotumine. 1/2-kihi pinnale jäävad lüüsitud *E. coli* tükid, 2/1 kihi pinnale jäävad faagid ning põhja süsivesikud.

3. Dialüüs

- ~2 ml CsCl₂-puhastatud faagi süstiti 3500 MWCO-ga dialüüsikasseti (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*)
- Dialüüsi kassetis olevat faagisuspensiooni dialüüsiti 2 l 1x PBS-s (*PAA, Austria*) magnetsegajal (*Biosan, Läti*) 1 h 4 °C juures, seejärel vahetati puhver ning dialüüsiti veelkord 1 h
- 3 ml süstlaga tõmmati dialüüsikassetist (*Thermo Fisher Scientific Inc, USA*) puhastatud faagisuspensioon ja määrati selle tiiter
- Puhastatud faagi säilitati 4 °C juures

Lisa 3. Tiitrimine

- Faagi lahjendusteseeria LB-söötmes (*Sigma-Aldrich Co, USA*):
 - kui eeldatav faagi tiiter oli 10^2 - 10^8 PFU/ml (Tabel 11a; tärniga on tähistatud algne ehk tiitritav faagisuspensioon)
 - kui eeldatav faagi tiiter oli 10^8 või rohkem PFU/ml (Tabel 11b; tärniga on tähistatud algne ehk tiitritav faagisuspensioon)
- 100 µl lahjendust ja 500 µl *E. coli* BLT5615 (*Novagen, USA*) $OD_{600}=0,5$ kultuuri ning pipeteeriti 15ml.
- Lisati 4 ml ~60 °C topagari (*Lab M Ltd, Suurbritannia*) ja 1 M IPTG (*Carbosynth Ltd, UK*) segu suhtega 500:1-le. Segati hoolikalt ning valati eelnevalt valmistatud (TÜ vähibioloogia labori spetsialisti Kaarel Kurm, MSc poolt) 1xLB Milleri söötmega (*Sigma-Aldrich Co, USA*) Petri-tassidele. Tasse hoiti 37 °C juures vähemalt 3 h

Tabel 11a. Faagi lahjendusteseeria LB-söötmes, kui eeldatav faagi tiiter on 10^2 - 10^8 PFU/ml.

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

Tabel 11b. Faagi lahjendusteseeria LB-söötmes. Kui eeldatav faagi tiiter on 10^8 või rohkem PFU/ml.

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

Lisa 4. Fosfolüeeritud 5' otstega oligonukleotiidid kloneerimisetapi jaoks.

Nimetus	Peptiid	Senss/ antisenss	Oligonukleotiidid 5'-3' suunas
CD47	GNYTCEVTELTREGETIIELK	Senss	AATTCTGGCAACTATACCTGCGAAGTGACCGAACTGACCCGCGAAGGCGAAACCATTATTGAACTGAAATA
		Antisenss	AGCTTATTTTCAGTTCAATAATGGTTTCGCCTTCGCGGGTCAGTTCGGTCACTTCGCAGGTATAGTTGCCAG
T7 sabafiibri mutatsioon	QWCDETKGFVDEADRF	Senss	AATTCTCAGTGGTGCGATGAAACCAAAGGCTTTGTGGATGAAGCGGATCGCTTTTA
		Antisenss	AGCTTAAAAGCGATCCGCTTCATCCACAAAGCCTTTGGTTTCATCGCACCCTGAG

Lisa 5. Praimerid faagi T7 multikloneerimissaiti (geenis 10) viidud inserdi sekveneerimiseks.

Jrk nr	Praimeri tähis	5'-3' järjestus
1.	T7 UP	AGCGGACCAGATTATCGCTA
2.	T7 DOWN	AACCCCTCAAGACCCGTTTA

Lisa 6. Praimerid T7 sabafiibrit kodeeriva geeni mutatsiooni (geenis 17) sekveneerimiseks.

Jrk nr	Praimeri tähis	5'-3' järjestus
1.	<i>Forward</i>	TCTGACAAAGGCTTGGGGTC
2.	<i>Reverse</i>	TTCCCAGCAGATGTAGCGTA

Lisa 7. Sanger sekveneerimise PCR programm

1. 95 °C 12 min
 2. 95 °C 30 sek
 3. 50 °C 30 sek
 4. 72 °C 20 sek
 5. 72 °C 10 min
 6. 4 °C STOPP
- } 35x

Lisa 8. Forward ja reverse praimerite järjestused Ion Torrent analüüsile eelneva PCR reaktsiooni jaoks.

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

Lisa 9. Ion Torrent analüüsile eelnev PCR programm

1. 95 °C 12 min
 2. 95 °C 20 sek
 3. 62 °C 20 sek
 4. 72 °C 10 sek
 5. 72 °C 10 min
 6. 4 °C STOPP
- } 20x

Lisa 10. Ion Torrent loendusandmed seitsme selekteeritud peptiidi jaoks

Jrk nr	Peptiid	Ion Torrent loendusandmed
1.	CKSTRRGVC	8400
2.	CREAGSGSC	3452
3.	CHESVGRVC	605
4.	CLSKGRSGC	4978
5.	CKRGDGGSC	4395
6.	CNKEGRATC	2750
7.	CVMSSPGKC	2308

Lisa 11. 28 peptiidi raamatukogu

- | | |
|---------------|---------------|
| 1. CLRTSKESC | 18. CCVPMDKLC |
| 2. CPLMVIYEC | 19. CHMWWDIQC |
| 3. CAQEPLDHC | 20. CQRADNHGC |
| 4. CYKKDTLKC | 21. CNNLPLENC |
| 5. CHAELDKGC | 22. CEMNRGTNC |
| 6. MMVVCMWC | 23. CLHIGNNIC |
| 7. CRHIFYTAC | 24. CPSHTSVKC |
| 8. CMFPIDKDC | 25. CDLIWNFSC |
| 9. CKRSRDKEC | 26. CENALHYTC |
| 10. CACSYIELC | 27. CADSHKTTC |
| 11. CEMNRGTNC | 28. CTKDSCHEC |
| 12. CYEQDHQKC | |
| 13. CLKMNHDVC | |
| 14. CQVWDHMEC | |
| 15. CLYNCAAHC | |
| 16. CGIHMLSIC | |
| 17. CHNLVQYDC | |



ASUTUSEISESEKS KASUTAMISEKS
PÖLLUMAJANDUSMINISTEERIUM
Märge tehtud "22". november 2011 .a.
Juurdepääsupiirang kehtib kuni „21.11.2016“
või
Alus: Avaliku teabe seadus § 35 lg 1 p17,

PÖLLUMAJANDUSMINISTEERIUM

LOOMKATSE LÄBIVIIMISE LOAKOMISJON

OTSUS
Tallinn

22. november 2011 nr 90

Loomkatse läbiviimise luba

“Loomakaitseaduse” § 45 lõike 3 ja § 47 lõike 6 alusel ning loomkatse läbiviimise loakomisjoni 21. novembri 2011. a istungi protokoll nr 48 kohaselt otsustati:

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

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

2) katseloomade liik ja arv: 3560 hiirt;

3) loomkatse rakendatavad menetlused: a) nahaaluste tuumorite tekitamiseks dissotsieeritud tuumorirakkude nahaalun injektsioon.
b) ortotroopsete eesnäärme- ja pankreasevähi mudel – üldnarkoosi all (avertiin i.p. segu ketamiinist (100mg/kg ja xylasine´st (10 mg/kg) i.p.) süstitakse prostata vähirakud eesnäärme eessagarasse või pankrease põrnasagarasse. Kõhuõone sein suletakse õmblustega, haav desinfitseeritakse.
c) glioomide implanteerimine ajukoosse – üldnarkoosis katselooma koljusse puuritakse 1 mm diameetriga avaus ja vähirakud süstitakse 3,5 mm sügavusele. Ava koljus suletakse luuvahaga, naha haav suletakse õmblustega ning desinfitseeritakse.
d) peale vähirakkude implantatsiooni jälgitakse regulaarselt tuumorite suurust, hiirte kaalu ja käitumist. Nahaaluse vähiga hiirte puhul jälgitakse, et kasvaja diameeter ei ületaks 1 cm. Kurtumuse ilmnemisel rakendatakse eutanaasiat.

Eutanaasia toimub üldnarkoosis hiirte ekssanguinatsiooni teel, kasutades süsteemset perfusiooni PBSiga (või 4% paraformaldehüüdiga). Alternatiivina kasutatakse CO₂.

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

Sulev Kõks

allkirjastatud digitaalselt/

Komisjoni esimees

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Annika Jürimäe (sünd. 08.05.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Immuunsüsteemi vältivate peptiidide tuvastamine faagidisplei meetodil *in vivo* tingimustes**“, mille juhendajad on Kuldar Kõiv, MSc ning Sulev Ingerpuu, PhD.

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

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu 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,

26.05.2014