

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
TÄPPIS- JA NANOMEDITSIINI LABORATOORIUM

**Kasvajaselektiivsete kullerpeptiidide identifitseerimine
glioblastoomi loommudelites**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Kleer Siigur

Juhendajad
PhD Tambet Teesalu
MSc Jorgen Holm
knd Juhan Sedman

TARTU 2025

INFOLEHT

Kasvajaselektiivsete kullerpeptiidide identifitseerimine glioblastoomi loomudelites

Multiformne glioblastoom (GBM) on kõige levinum ja letaalsem primaarne ajukasvaja, mille patsientide elulemus on keskmiselt 15 kuud. Üheks lahendamata probleemiks GBM-i ravis on vere-aju barjäär, mis takistab süsteemsete ravimite jõudmist kasvajasse. Kullerpeptiidid on 3–15 aminohappest koosnevad molekulid, mida kasutatakse ravimite, kontrastainete ja nanoosakeste täppissuunamiseks. Need peptiidid seonduvad selektiivselt veresoonte pinnal asuvate makromolekulidega. Käesolevas bakalaureusetöös kasutati *in vivo* faagidisplei meetodit uute GBM-i suhtes selektiivsete kullerpeptiidide leidmiseks. Selleks viidi glioblastoomi loomudelites läbi neljatsükliline faagidisplei skriining, millele järgnes järgmise põlvkonna sekveneerimine ja bioinformaatiline andmeanalüüs. Uuringu tulemusena tuvastati mitu kandidaat-kullerpeptiidi, mille GBM-selektiivsuse ja rakendusvõimaluste selgitamiseks on vajalikud täiendavad uuringud.

Märksõnad: multiformne glioblastoom, kullerpeptiidid, vere-aju barjäär, faagidisplei

CERCS kood: B726 Kliiniline bioloogia; B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia

Identification of tumor-homing peptides in glioblastoma animal models

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and most lethal primary brain tumor, with a median patient survival of approximately 15 months. One of the key unresolved challenges in GBM treatment is the blood-brain barrier, which hinders the delivery of systemically administered drugs to the tumor site. Homing peptides are short peptides consisting of 3 to 15 amino acids which are widely used for the targeted delivery of drugs, contrast agents, and nanoparticles. These peptides selectively bind to marker molecules on the surface of blood vessels. In this bachelor's thesis, an *in vivo* phage display approach was used to identify novel homing peptides selective for GBM. To this end, a four-round phage display screening was carried out in glioblastoma animal models, followed by next-generation sequencing and bioinformatic analysis. As a result, several candidate homing peptides were identified. Further studies are needed to evaluate their GBM selectivity and therapeutic potential.

Keywords: glioblastoma multiforme, tumor-homing peptides, blood-brain barrier, phage display biopanning

CERCS code: B726 Clinical biology; B200 Cytology, oncology, cancerology

SISUKORD

SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Glioblastoom.....	8
1.1.1. Glioblastoomi modelleerimine.....	9
1.2. Nanomeditsiin ja selle väljakutsed.....	10
1.3. Veresoonte molekulaarne heterogeensus.....	11
1.4. Vere-aju barjäär.....	12
1.5. Vähiselektiivsed kullerpeptiidid.....	13
1.6. Kullerpeptiidide avastamine faagidisplei abil.....	13
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	16
2.1. Töö eesmärgid.....	16
2.2. Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1. Rakukultuur SB28-Ohlfest.....	17
2.2.2. Glioomi loomudel.....	17
2.2.2.1. Rakkude ettevalmistamine süstimiseks.....	17
2.2.2.2. Intrakraniaalne kasvajarakkude süstimine hiire aju.....	18
2.2.3. Loomade elupuhune kuvamine IVIS süsteemiga.....	19
2.2.4. Glioblastoomi hematoksüliin-eosiin värving.....	19
2.2.5. Faagidisplei.....	20
2.2.6. PCR ja sekveneerimine.....	22
2.3. Tulemused.....	23
2.3.1. Kasvaja arengu jälgimine hiirtel IVIS süsteemiga.....	23
2.3.2. Glioblastoomi histoloogia hematoksüliin-eosinvärvingus.....	24
2.3.3. <i>In vivo</i> faagidisplei.....	25
2.3.4. Sekveneerimistulemuste ülevaade.....	28

2.4. Arutelu.....	31
KOKKUVÕTE.....	33
RESÜMEE.....	34
TÄNUSÕNAD.....	36
KIRJANDUSE LOETELU.....	37
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	48
LISAD.....	49
LISA 1.....	49
LIHTLITSENTS.....	50

KASUTATUD LÜHENDID

CendR	C-terminuse reegel (ingl <i>C-end Rule</i>)
CPM	Lugemit miljoni kohta (ingl <i>counts per million</i>)
DMEM	Dulbecco modifitseeritud sööde (ingl <i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i>)
DPBS	Dulbecco fosfaatpuhverdatud soolalahus (ingl <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>)
ECM	Ekstratsellulaarne maatriks (ingl <i>extracellular matrix</i>)
FBS	Veise loote seerum (ingl <i>fetal bovine serum</i>)
GBM	Multiformne glioblastoom (ingl <i>glioblastoma multiforme</i>)
GEMM	Geneetiliselt muundatud hiire mudel (ingl <i>genetically engineered mouse model</i>)
IVIS	<i>In vivo</i> kuvamise süsteem (ingl <i>in vivo imaging system</i>)
LB	Lüsogeenne sööde (ingl <i>lysogeny broth</i>)
logFC	Logaritmiline <i>fold change</i> (ingl <i>logarithmic fold change</i>)
MQ	Milli-Q vesi (ingl <i>Milli-Q water</i>)
NP-40	Nonüülfenoksüpolüetoksüetanol, mitteioonne detergent (ingl <i>nonyl phenoxypolyethoxyethanol, non-ionic detergent</i>)
NRP-1	Neuropiliin-1 (ingl <i>neuropilin-1</i>)
OD	Optiline tihedus (ingl <i>optical density</i>)
PBS	Fosfaatpuhverdatud soolalahus (ingl <i>phosphate-buffered saline</i>)
PDX	Humaniseeritud hiire ksenotransplataadi mudel (ingl <i>patient-derived xenograft</i>)
PEG	Polüetüleenglükool (ingl <i>polyethylene glycol</i>)
PFU	Faagilaike moodustav ühik (ingl <i>plaque-forming unit</i>)

- RGD Arginiin-glütsiin-asparagiinhape (ingl *arginine-glycine-aspartic acid*)
- TBE Tris-boraat-EDTA (ingl *Tris-borate-EDTA*)
- THP Kasvajaselektiivsed kullerpeptiidid (ingl *tumor-homing peptides*)
- TPP Kasvajad penetreerivad peptiidid (ingl *tumor-penetrating peptides*)

SISSEJUHATUS

Glioblastoom on levinuim pahaloomuline primaarne ajukasvaja, mis saab alguse astrotsüütide maliigsest transformatsioonist ja kiirest paljunemisest ajus (Bleeker jt, 2012). Tegemist on suhteliselt agressiivse kasvajalise haigusega, mille standardravi (kirurgia, keemia- ja kiiritusravi) on väheefektiivne (Raucher, 2019). Keskmise glioblastoomiga patsiendi elulemus on kõigest 15 kuud, mistõttu on kriitiline uurida selle kasvaja bioloogiat ja molekulaarmehhanisme (Thakkar jt, 2014). Suureks väljakutseks ajukasvajaga võitlemisel on selektiivne vere-aju barjäär, mis takistab ravimolekulide transporti vereringest aju parenhüümi (Mo jt, 2021). Üheks võimalikuks lahenduseks on ravimite täppissuunamine vere-aju barjääri penetreerivate molekulidega, näiteks kullerpeptiididega, mis on võimelised läbima hematoentsefaalbarjääri ning seonduma otse glioblastoomirakkudel ekspresseeruvatele retseptoritele (Raucher, 2019).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli leida *in vivo* faagidisplei meetodit kasutades sellised kullerpeptiidid, mis süsteemselt manustatuna seonduvad kasvajas veresoontes ekspresseeruvate spetsiifiliste retseptoritega. Töö viidi läbi Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, biomeditsiini osakonnas, bio- ja siirdemeditsiini instituudis, täppis- ja nanomeditsiini laboratooriumis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Glioblastoom

Kesknärvisüsteemi kasvajate alla kuuluvad ajukasvajad, mida saab jaotada kahte suuremasse gruppi: primaarsed ja sekundaarsed ajukasvajad. Primaarsed võivad tekkida ajus erinevat tüüpi rakkudest, mille alla kuuluvad näiteks meningioomid, neurinoomid, astrotsütoomid, oligodendroglioomid ja teised (Bhowmik jt, 2015; *Types of Brain Tumours*, i.a.). Samuti liigitub siia ka üks tuntuim ja kõige agressiivsem ajukasvaja vorm – glioblastoom (Schaff ja Mellinghoff, 2023). Sekundaarsed ajukasvajad tekivad aga metastaasidest ehk teistest keha piirkondadest pärit kasvajarakkude migreerumisel moodustunud siiretest (Bhowmik jt, 2015). Need metastaasid võivad välja areneda näiteks kopsu-, eesnäärme-, rinna-, käärsoole- ja nahavähist (*Metastatic Brain Tumors*, 2021).

Multiformne glioblastoom (inglise keeles *glioblastoma multiforme*, GBM) on levinuim ja agressiivseim pahaloomuline primaarne ajukasvaja (Miller jt, 2021). GBM patsientide elulemus on keskmiselt 15 kuud ning see areneb välja peamiselt suuraju poolkerades asuvatest tähekujulistest gliiarakkudest, astrotsüütidest (Thakkar jt, 2014; Zong jt, 2015). Need rakud on olulised inimese kesknärvisüsteemi talitluses, sealhulgas vere-aju barjääri funktsioneerimises (Alvarez jt, 2013; Lee jt, 2022). Valdavalt on glioblastoomi asukohaks otsmikusagar, samuti ka oimu-, kiiru- ja kuklasagar, kuid harvemini esineb väikeajus. GBM rakud on lokaalselt invasiivsed ja võimelised levima algkoldest vastasajupoolkerasse ning seljaajju (Valenzuela-Fuenzalida jt, 2024).

GBM-i standardraviks on kirurgiline eemaldamine, kiiritusravi ning keemiaravi, kuid paraku pole nende meetodite abil siiski võimalik kasvajat täielikult likvideerida (Tan jt, 2020). Kasvaja kirurgiline eemaldamine ei võimalda kõrvaldada kõiki kasvaja perifeerias asuvaid infiltratiivseid rakke. Need invasiivse iseloomuga rakud põhjustavad kasvaja taastekke ning sekundaarseid kahjustusi. Üldjuhul on uued kasvajakolded kiiritus- ja keemiaravile veelgi resistentsemad kui operatsioonieelne kasvaja (Raucher, 2019). Üheks paljulubavaks strateegiaks GBM-i teraapias on afiinsusligandite kasutamine ravimite suunamiseks üle barjääride sihtrakkudesse. Selline täppissuunamine võimaldab erinevaid ühendeid – olgu nendeks tsütotoksilised ravimid, geeniteraapia vektorid või diagnostilised kontrastained – viia otse haiguskolletesse, vähendades

süsteemset toksilisust ja suurendades ravi efektiivsust (Ruoslahti jt, 2010; Yetisgin jt, 2020). Erinevatest afiinsusligandite klassidest (antikehad, aptameerid ja peptiidid) on just peptiidid oma väikese suuruse ja keemilise modifitseeritavuse tõttu eriti atraktiivsed kandidaadid (Ayo ja Laakkonen, 2021; Li jt, 2023).

1.1.1. Glioblastoomi modelleerimine

Glioblastoomi uurimiseks on kasutuses kolm põhilist mudelit: *in vitro*, *ex vivo* ja *in vivo*. Tänapäeval üritatakse teaduses vähendada loomkatseid, seetõttu on võetud vähiraviuuringutel kasutusse *in vitro* modelleerimise meetod. *In vitro* modelleerimises kasutatakse uurimiseks kasvajakultuuri, mis on sama fenotüübiga nagu ka organismis vastavas koes (Breslin ja O'Driscoll, 2012). Põhiliselt jaotatakse rakukultuurid 2D (kahedimensionaalne) ehk ühekihilisteks ja 3D (kolmedimensionaalne) ehk mitmekihilisteks (Chakraborty jt, 2021). 2D rakukultuure on suhteliselt odav ja lihtne käsitleda, mistõttu on need ka laialdaselt kasutuses. Neid rakke kasvatatakse tavaliselt ühekihiliselt, kinnitunud kas kultuurikolvis või Petri tassil, koos söötmega 37 °C juures (Breslin ja O'Driscoll, 2012). Sellel mudelil on aga märkimisväärsed puudused: rakukultuurid ei jäljenda loomulikke koe ja kasvaja struktuure, sest neil puuduvad normaalsed rakk-rakk ning raku ja ekstratsellulaarse matriksi vahelised ühendused, mis on vajalikud rakkude proliferaatsiooniks, diferentseerumiseks ja veel erinevateks rakulisteks funktsioonideks (Breslin ja O'Driscoll, 2012; Kapałczyńska jt, 2016). Rakukultuuri 3D mudelid põhinevad sferoidsel mitmedimensionaalsel struktuuril, mis üritab jäljendada kasvajas olevat keskkonda nii füüsiliste kui ka biokeemiliste omaduste poolest (Kapałczyńska jt, 2016).

Järgmisena kasutatakse ka *ex vivo* modelleerimist, mille puhul eraldatakse organismist uuritava kude või rakud ning säilitatakse seda koekultuuris kolmedimensionaalses keskkonnas (Nickl jt, 2022). Selle mudeliga on võimalik arendada personaalmeditsiini, kuna saab testida individualiseeritult erinevate ravimite seonduvust kasvajas ning samuti analüüsida kasvajate heterogeensust (Gagg jt, 2023). *Ex vivo* meetodika jaguneb kolme põhilisse alatüüpi: organotüüpsed lõigud, organoidid ja patsiendilt saadud primaarsed rakud (Nickl jt, 2022).

In vivo modelleerimine hõlmab loomade, tavaliselt hiirte, kasutamist protsesside ja põhiliste mehhanismide uurimiseks (Tratar jt, 2018). Hiiri kasutatakse seepärast, et neil on tõestatud märgatav genoomne ja füsioloogiline sarnasus hiire ning inimese kasvaja bioloogia vahel

(Waterston jt, 2002; Wang jt, 2019). *In vivo* mudeli alla kuuluvad omakorda mitmed erinevad mudelid. Humaniseeritud hiire ksenotransplataadi mudel (inglise keeles *patient-derived xenograft*, PDX) on üks nendest, mis põhineb inimese primaarsest kasvajast pärit rakkude või selle koe implanteerimist immuunodefitsiitsesse hiirde (Tratar jt, 2018; R jt, 2024). Kasvaja siirdamisel põhinevasse gruppi kuulub samuti süngeneetiline hiiremudel, mida nimetatakse ka allogeenseks hiire kasvaja siirdemudeliks. Selle puhul võetakse doonorhiire kasvajakud või -kude ning viiakse need sama geneetilise taustaga ja toimiva immuunsüsteemiga peremeeshiirde (Morton ja Houghton, 2007; Zhong jt, 2020). Nende mudelite puhul on kasvajaid võimalik transplanteerida hiirde kahte moodi: kas naha alla (subkutaanselt) süstides või siirdades sellesse organisme või koesse kehas, kus see ka loomulikult esineb (ortotoopselt) (Paez-Ribes jt, 2016; Tratar jt, 2018). Laialt kasutatakse ka geneetiliselt modifitseeritud või insenergeneetikaga muundatud hiire mudeleid (inglise keeles *genetically engineered mouse models*, GEMMs), mille puhul muudetakse hiire genoomi, et aktiveerida onkogeenseid geene ning initsieerida kartsinogeneesi ehk pahaloomulise kasvaja teket (Pasupuleti jt, 2023).

1.2. Nanomeditsiin ja selle väljakutsed

Nanomeditsiin on kiirelt arenev meditsiinivaldkond, mis ühendab endas nanotehnoloogia ja meditsiini (Webster, 2006; Tinkle jt, 2014). Sageli defineeritakse nanomeditsiini ka kui eriomadustega nanomõõtmeliste objektide või materjalide kasutamist meditsiinilistes uuringutes. Näiteks vähiuuringutes ja -ravis on väga vajalik erinevate bioloogiliste barjääride ületamine, mida just nanoosakesed võimaldavad (Wagner jt, 2006).

Nanomeditsiinis on olulisel kohal sihtmärgile suunatud ravimi kohaletoimetamise kontseptsioon, mille aluseks on haiguskolletega selektiivselt seonduvate aafiinsusligandite kasutamine nanoravimite suunamiseks haiguskolletesse. Soovitud tulemuseks on ravimi kõrge lokaalne kontsentratsioon haiguskoldes ning madal süsteemne tase organismis (Ruoslahti jt, 2010; Yetisgin jt, 2020). Täppis-suunatud nanokandjatega saab seeläbi suurendada ravimi tõhusust ja vähendada kõrvaltoimeid. Lisaks sellele, saab terapeutilistesse nanoosakestesse sisestada mitu erinevat ravimit korraga (Li jt, 2023). Kasvajakudude ekspressioonimuster erineb normaalsetest rakkudest, omades mõndade geenide puhul tavapärasest kõrgemat ekspressioonitaset (Hanahan, 2022). Seetõttu võivad sihtmärgile suunatud teraapiast palju kasu saada eeskätt vähki põdevad

patsiendid (Ruoslahti jt, 2010). Molekule, mis suudavad seonduda spetsiifiliste molekulaarsete sihtpunktidega kehas, nimetatakse aafiinsusliganditeks (Husni, 2024). Neid ligandeid on mitut erinevat tüüpi: valgud, aptameerid, antikehad, ensüümid, peptiidid, lektiinid jt (Kumar, 2018; Li jt, 2023).

Terapeutiliste ühendite märklaud-kudedesse suunamiseks kasutatakse kolme lähenemist. Esimene neist on molekulaarne konjugatsioon, mille puhul on ravim ligandile kinnitunud otse – see viiakse sihtmärki ja ligand seondub seal enda aafiinsuse tõttu spetsiaalse elemendiga. Sellist tüüpi transporti klassifitseeritakse tihti ka aktiivse sihtimise alla (Muro, 2012). Teisena võib välja tuua nanoosakestega sihtimise, kus ravim on kapseldatud partikli sisse ehk ravimaine on ümbritsetud polümeermembraaniga ning seda nimetatakse vesikulaarseks süsteemiks. Selline nanoosake võib toimida ka kui ravimi hoiustaja, et võimaldada terapeutiliste ainete väljastamist haiguskoahas pikema aja jooksul (Singh ja Lillard, 2009). Viimaseks viisiks on koosmanustamisel põhinev transport, mille puhul sisestatakse organismi kaks või enam ravimit ühekorraga, millel on erinev füsioloogiline ja füsiokeemiline taust, kuid toimides koos annavad kasvajale tõhusa terapeutilise efekti (Bostami jt, 2022).

1.3. Veresoonte molekulaarne heterogeensus

Veresoonte endoteel koosneb ühekihilisest ja heterogeensest rakukihist, mis katab arterite, veenide ja kapillaaride sisepinda. See on esmaseks barjääriks süsteemselt tsirkuleerivatele molekulidele, nanoosakestele (sh erinevad viirused) ning rakkudele (Reitsma jt, 2007; Krüger-Genge jt, 2019). Kõik veresooned ja eriti endoteliaalsed rakud pole samasugused. Neil on mitmeid erinevusi, näiteks ekspresseerivad endoteliaalsed rakupopulatsioonid koespetsiifilise muustriga markereid. On leitud, et ajus ekspresseeruvad kõrgemalt markerid nagu Axin2, Fzd6 ja Nkd1, kuid maksas seevastu Apc, Ep300 ja Lrp6 (Paik jt, 2020). Lisaks võib markerite ekspressioon erineda ka ühes samas organis erinevate veresoonte või piirkondade vahel (Pusztaszeri jt, 2005). Kasvaja veresoonekond on samuti väga mitmekesine ning ebanormaalse morfoloogiaga – veresooned on väljaarenemata, loogelised ja hüperläbilaskvad, puudub organiseeritus ning veresoonte hierarhia. Samuti võib kasvaja endoteel olla ka mitmekihiline ning suuresti angiogeenne ehk veresoonte moodustumist soodustav ja seda pro-angiogeensete faktorite üleekspresseerumise tõttu (Konerding jt, 2001; Hennigs jt, 2021). Selline hüpervaskulariseeritus mängib olulist rolli rakkude vitaalsuse säilitamisel, kasvaja agressiivsusel ning selle

mikrokeskkonna toimimisel (Pacheco jt, 2022). Samuti soodustab selline keskkond väärengut, hüpoksiat ehk hapnikuvaegust ning nekroosi ehk koekärbuse teket, luues soliidtumoritele sobivad tingimused arenemiseks ning ravimiresistentsuse välja kujunemiseks (Park ja Lee, 2022; Bauer jt, 2024).

1.4. Vere-aju barjäär

Vere-aju barjäär ehk hematoentsefaalbarjäär on kõrgelt spetsialiseerunud vaskulaarne barjäär, mille põhiülesandeks on kontrollida erinevate ionide, molekulide ja rakkude liikumist vere ning aju vahel, et kaitsta aju kahjulike ainete eest ning säilitada seal homöostaasi (Daneman ja Prat, 2015; Sweeney jt, 2018; Alajangi jt, 2022). Tegemist on kontrollitud mikrokeskkonnaga, kus mängivad olulist rolli ioonid, näiteks kaltsium on oluline homöostaasis, makrofaagide liikumiseks läbi barjääri ning hematoentsefaalbarjääri üldise terviklikkuse ja endoteeli morfoloogia loomisel (Kadry jt, 2020). Vere-aju barjäär on üks kahest barjäärist, mis eraldab aju perifeerse närvisüsteemi kesknärvisüsteemist ning see koosneb endoteelirakkudest, peritsüütidest, kapillaaride basaalmembraanist ja astrotsüütide jätketest (Bickel jt, 2001; Correale ja Villa, 2009). Barjääris moodustuvad tihedad rakuliidused aju endoteeli, koroidpõimik epiteeli ja ämblikvõrkkelme epiteelirakkude vahel, mistõttu on barjäär kõrge selektiivsusega ning enamusele vähiravimitele ja terapeutilistele ainetele raskesti läbitav (Abbott jt, 2009; Lo jt, 2021). Peamiselt pääsevad läbi vere-aju barjääri passiivse difusiooni teel lipiidlahustuvad molekulid, mis võib olla võimalik tänu ajutiste pooride moodustumisele fosfolipiidide kaksikkihis. Need poorid on kindla suurusega ja kuna ravimite osakesed on suurema ruumalaga kui poorid, siis vähendab see oluliselt nende läbitungimisvõimet (Kadry jt, 2020).

Hematoentsefaalbarjäär on ajutuumoritega väga tihedalt seotud ning samuti on selle läbilaskvus ja stabiilsus erinevate kasvajate pahaloomulisuse astme tõttu erinev (Pitz jt, 2011). Uuringud on näidanud, et see barjäär on paljudele ravimitele läbimatu, mille üheks põhjuseks on tihedad rakuliidused, mis piiravad igasuguste osakeste paratsellulaarset difusiooni kasvajas (Mo jt, 2021). Nii primaarsete kui ka sekundaarsete ajukasvajate puhul on vere-aju barjäär oluliselt läbilaskvam kui terve aju puhul ning läbilaskvus suureneb korrelatsioonis kasvaja pahaloomulisusega (Wu jt, 2020; Luo ja Shusta, 2020). Kasvajatele iseloomulik heterogeenne keskkond raskendab ravimi tõhusat ja ühtlast mõju, kuna mõnes kasvaja piirkonnas on

hematoentsefaalbarjäär endiselt terviklik ning raskesti läbitav (Mo jt, 2021). Seetõttu on vere-aju barjääri bioloogia mõistmine oluline ajukasvajate tõhusate teraapiate väljatöötamiseks.

1.5. Vähiselektiivsed kullerpeptiidid

Vähiselektiivsed kullerpeptiidid (inglise keeles *tumor-homing peptides*, THP) koosnevad tavaliselt spetsiifilistest 3–15 aminohappest koosnevatest järjestustest, mis seonduvad kindlate retseptoritega kasvajakudedes ning võimaldavad läbida füsioloogilisi barjääre, sealhulgas vere-aju barjääri. Angiogeensete veresoonte suhtes selektiivsete kullerpeptiide sihtmärgiks on kasvajas olevad veresooned ja üheks selliseks näiteks on arginiin-glütsiin-asparagiinhappe (RGD) motiivi sisaldavad peptiidid (Gostaviceanu jt, 2023). RGD peptiid on võimeline seonduma veresoontes üleekspresseeritud integriinidele, mis vahendavad peptiidi ja sellega seotud molekuli(de) või nanoosakeste endotsütoosi ja rakkudesse penetreerumist (Gostaviceanu jt, 2023; Milewska jt, 2024). Vähiselektiivste kullerpeptiidide hulka kuuluvad ka kasvaja ekstratsellulaarse maatriksi (ECM) suhtes selektiivsed peptiidid ja mitmed peptiidid mis seonduvad aktiveeritud endoteelirakkudes ekspresseeritud pinnamarkeritega (nt nukleoliin ja p32) (Christian jt, 2003; Lingasamy, 2020).

Mõned THP-d on võimelised läbima veresooni (ekstravaseeuma) ja seejärel tungima tuumori parenhüümis olevatesse rakkudesse. Sellised vähki penetreerivad peptiidid (inglise keeles *tumor-penetrating peptides*, TPP) koosnevad kolmest erinevast moodulist: (1) veresoont sihtiv motiiv (inglise keeles *vascular docking motif*, nt RGD), (2) R/KXXR/K C-terminuse reegli (*C-end Rule*) ehk CendR kude penetreeriv motiiv; (3) kasvajas üleekspresseeritud proteaasi lõikesait (Teesalu jt, 2013). Nende põhimõte on selline, et kõigepealt seondub iRGD peptiid enda RGD motiiviga kasvajas üleekspresseeritud integriinidega. Edasi paljastub peptiidi C-terminuse otsas R/KXXR/K motiiv, mis seondub neuropiliin-1-ga (NRP-1) ning käivitab CendR transpordiraja läbi veresoonte ja kasvajakoe (Teesalu jt, 2009; Sugahara jt, 2009).

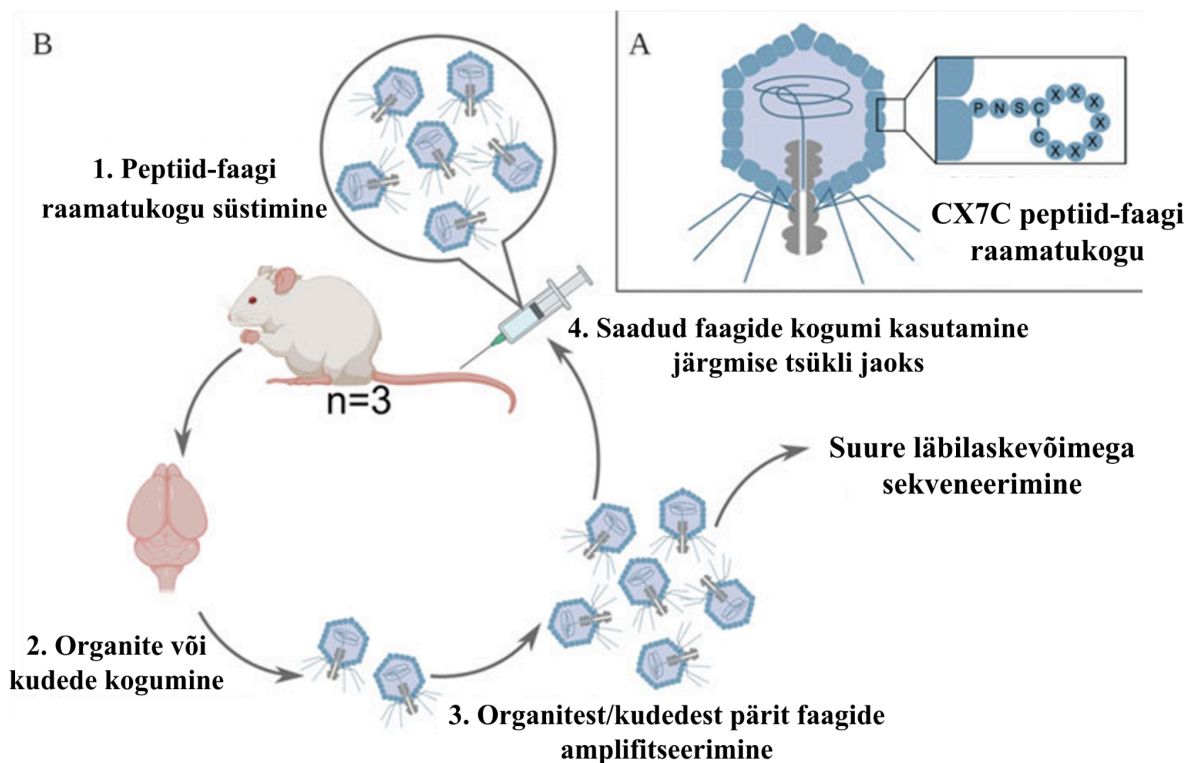
1.6. Kullerpeptiidide avastamine faagidisplei abil

Bakteriofaag ehk faag on bakteriviirus, mis nakatab bakterirakke ning replitseerub neis. Struktuurselt koosneb faag geneetilisest materjalist, mis võib olla kas DNA või RNA kujul, ning seda ümbritseb valgulise koostisega kapsiid ehk kest. Faagid on heaks lüliks kasvajate uurimiseks

ja nende põhjal on välja töötatud ka laialdaselt kasutuses olev meetod faagidisplei (Joonis 1) (Smith ja Petrenko, 1997). Faage on võimalik geneetiliselt muuta nii, et bakteriofaagi pinnavalku kodeerivasse geeni kloonitakse võõras DNA järjestus või randomiseeritud järjestuste raamatukogu, misjärel leiab aset peptiidide ekspressioon faagi pinnal fusioonina pinnavalguga (Bábíčková jt, 2013). Faagidisplei puhul kasutatakse randomiseeritud peptiid-faagiraamatukogusid märklauaga selektiivselt seonduvate peptiidide identifitseerimiseks. Sellist skriinimist korratakse mitu korda (tavaliselt on selleks vajalik 3–5 tsükli), et leida kõige tugevamalt molekuliga interakteeruvad peptiidid (Yayon jt, 1993).

Faagidisplei meetodis kasutatakse filamentoosseid ja T7 faage. Filamentoosete faagide alla kuulub näiteks M13 faag – juusjas, mittelütiline, üheaahelalise DNA-ga faag, mille genoomi suurus on 4.5–8 kilobaasi (kb), ning mis replitseerub kolibakteris, *Escherichia coli* (*E. coli*) (Tikunova ja Morozova, 2009; Hulo jt, 2010; Smeal jt, 2016). Arvestades, et M13 faag mahutab oluliselt vähem võõrgeene ja seetõttu on ka ebastabiilsem kui T7, siis peetakse viimast faagidispleis paremaks platvormiks (Yue jt, 2021). T7 bakteriofaag on lüütiline kaheaahelalise DNA-ga kolifaag, mille genoomi suurus on 40–42 kb (Demerec ja Fano, 1945; Hulo jt, 2010; Hu jt, 2013). T7 faag võimaldab moodustada suuremahulisi peptiid-faagi raamatukogusid ja neid kasutada näiteks kasvaja-spetsiifiliste peptiidide tuvastamisel (Deng jt, 2017). Oluline erinevus on veel see, et M13 faag ekspresseerib peptiide N-terminaalselt, aga T7 C-terminaalselt (Hoffman jt, 2004). T7 kapsiidvalgul on kaks vormi: 10A ja 10B, kus viimane sisaldab translatsioonilise raaminihke tõttu unikaalset piirkonda C-terminaalses otsas, mida kasutatakse ära faagidisplei süsteemis (Siple jt, 2018). Täpsemalt seisneb T7 faagidisplei mehhanism selles, et faagi pinnal ekspresseeritakse kapsiidvalgu 10B C-terminusega fusioonis juhuslikke peptiide (Kalniņa jt, 2008). Peptiidide koopiaarvust sõltuvalt kasutatakse erinevaid T7 vektoreid. Näiteks kõrge koopiaarvuga T7Select415-1 (415 koopiat faagi kohta) vektor on sobilik lühikeste, <15 aminohappe pikkuste peptiidide ekspresseerimiseks. Pikemate peptiidide jaoks kasutatakse keskmise koopiaarvuga T7Select10-3b (~15 koopiat faagi kohta) ja madala koopiaarvuga T7Select1 (0–1 koopiat faagi kohta) vektorit. Peptiide kodeerivad järjestused on kloonitud 10B valguga 348 aminohappe järele, kus eemaldatud loomulik translatsiooni raaminihke koht võimaldab kõikide vektorite puhul toota vaid ühte tüüpi kapsiidvalku (*T7Select® Phage Display System...*, i.a.). T7 lüütilise faagi eelis faagidispleis on tema stabiilsus karmides keskkonnatingimustes, kuni 1 kb suurte võõrgeenide sisestamise võimalikkus ning kiire kasv ja paljunemine, mis muudab kogu protsessi palju tõhusamaks (Li ja Caberoy, 2009; Deng jt, 2017).

Seonduvate peptiidide leidmiseks jaguneb faagidisplei kaheks põhitüübiks: madala ja kõrge kompleksusega skriinideks. Madala kompleksusega ehk rakuvaba sõelumine hõlmab endas peptiidide identifitseerimist *in vitro*, kus kasutatakse sihtmärkidena näiteks erinevaid valke, mis on kinnitunud magnetkerakestele. Kõrge kompleksusega skriinid viiakse läbi elussüsteemides *in vitro* või *in vivo* (Lingasamy jt, 2020). *In vivo* faagidisplei meetodi eeliseks on võimalus agnostiliselt avastada kullerpeptide, mis seonduvad organismi erinevatesse piirkondadesse, omamata eelinfot peptiidide võimalike seondumispartnerite osas. Sellised peptiidid võivad seonduda veresoontes spetsiifilistesse piirkondadesse, mida nimetatakse ka veresoonte „postiindeksiteks” (inglise keeles *vascular zip codes*), võimaldades kaardistada veresoonekonna heterogeensust (Arap jt, 2002; Pleiko jt, 2021).



Joonis 1. *In vivo* faagidisplei. A) T7 faagil ekspresseeritakse 10B kapsiidvalgule fuseerituna CX₇C peptiidi raamatukogu (C – tsüsteiin, X – juhuslik aminohape). **B)** *In vivo* faagidisplei tsükkel. 1) Hiirde süstitakse intravenoosselt peptiid-faagi raamatukogu; 2) Hiir perfuseeritakse, kogutakse organid ja isoleeritakse nendega seondunud faagid; 3) Faagid paljundatakse ja viiakse läbi peptiidi kodeeriva pinnavalgu geeni suure läbilaskevõimega sekveneerimine; 4) Paljundatud faage kasutatakse järgmise selektsioonitsükli jaoks. Identifitseeritakse kõige tugevamalt seondunud peptiidid. Joonis on kohandatud Põšnograjeva jt (2021) järgi.

2. EKSPERIMENTAALOSA

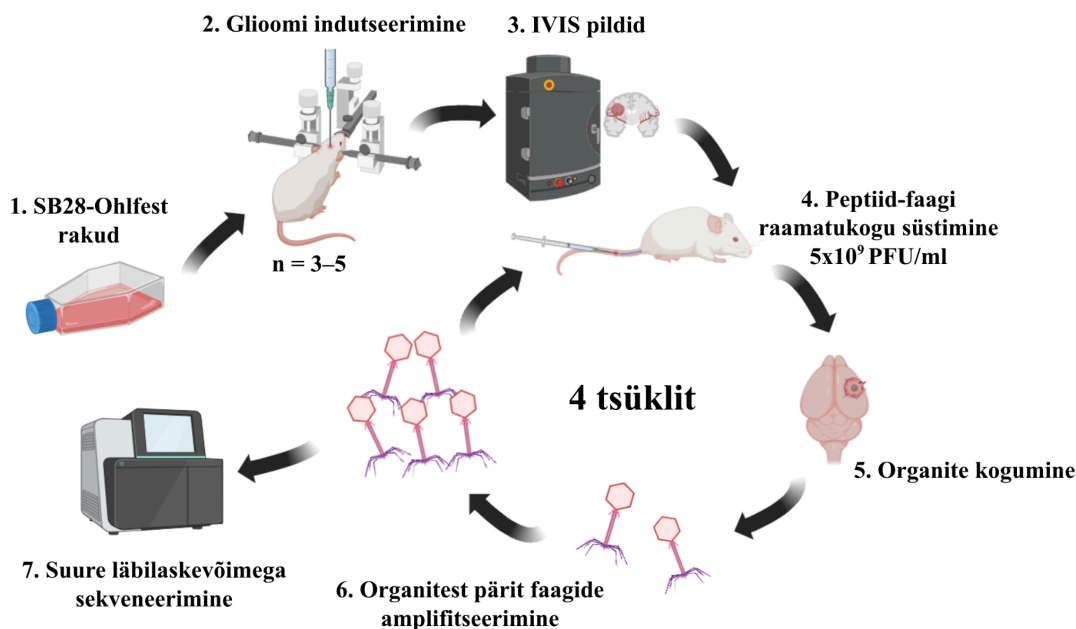
2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja selekteerida *in vivo* faagidisplei abil glioblastoomi suhtes selektiivsed kullerpeptiidid. Konkreetsete all-eesmärgid olid järgmised:

1. Indutseerida ortotoopsed GBM kasvajakud hiirtes ja kuvada nende progressiooni.
2. Viia läbi *in vivo* faagidisplei skriinid GBM loomudelil.
3. Analüüsida skriinide tulemusi ja identifitseerida kandidaatpeptiide järgnevateks uuringuteks.

2.2. Materjal ja meetodika

Eksperimentaalosa skeem on nähtav illustratiivse joonisena (Joonis 2).



Joonis 2. Bakalaureusetöös kasutatavate meetodikate illustratiivne skeem. 1) SB28-Ohlfest rakkude ettevalmistamine ja kasutamine glioomi induktsiooniks; 2) GBM-i induktsioonivastaste rakkude intrakraniaalne süstimine hiirtesse; 3) Kasvaja progressiooni jälgimine ja hindamine IVIS kuvamissüsteemi abil ning hematoksüliin-eosin värvimine; 4) Peptiid-faagi raamatukogu intravenoosne süstimine hiirtesse; 5) Hiirte perfusioon ja kontroll- ja sihtmärkorganite kogumine; 6) Organitest pärit faagide paljundamine uue selektsioonitsükli jaoks; 7) Seondunud peptiidjärjestuste tuvastamine suure läbilaskevõimega sekveneerimise abil. Joonis on koostatud BioRender veebirakenduses.

2.2.1. Rakukultuur SB28-Ohlfest

Töö läbiviimiseks kasutati vähirakuliini SB28-Ohlfest, mis põhjustab ajus glioblastoomi teket (Kosaka jt, 2014). SB28 rakud saadi koostööpartneri Flavio Curnise uurimisgrupi poolt San Raffaele teadusinstituudist Milanos. Need rakud on optimeeritud hiire mudelite jaoks ning jäljendavad inimese GBM-i, kuna nad on äärmiselt invasiivsed ja agressiivsed ning süngeensed C57BL/6 hiirtes. Lisaks ekspresseerivad need rakud visualiseerimise jaoks rohelist fluorestseeruvat valku (inglise keeles *green fluorescent protein*, GFP) ja lutsiferaasi (*Leibniz Institute DSMZ: Details*, i.a.). Rakke kasvatati Dulbecco modifitseeritud söötmes (inglise keeles *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*, DMEM; Corning, 10-013-CV), mis sisaldas 4.5 g/l glükoosi, L-glutamiini ja naatriumpüruvaati ning millele lisati 10% veise loote seerum (inglise keeles *fetal bovine serum*, FBS; Capricorn Scientific, FBS-11A), 1% GlutaMAX lahust (Gibco, 35050-061) ja 1% penitsilliini/streptomütsiini segu. Rakke inkubeeriti koekultuuri 25 cm² kolvis (TPP) 5% CO₂, 20% O₂ ja 37 °C juures MCO-19M O₂/CO₂ inkubaatoris (Sanyo). Söödet vahetati iga kahe päeva tagant. Rakkudega tehtud katseid korrati neli korda.

2.2.2. Glioomi loomudel

Katsetes kasutati 8–14 nädala vanuseid emaseid C57BL/6NTac hiiri. Loomkatsed viidi läbi nõuetekohaselt ning vastavuses Eesti loomakaitseadusega Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskuse vivaariumis. Loomkatsed olid eelnevalt kinnitatud Põllumajandusministeeriumis eetikakomitee nõusolekuga (load nr 159 ja 299).

2.2.2.1. Rakkude ettevalmistamine süstimiseks

Operatsiooni päeval valmistati süstimiseks ette SB28-Ohlfest kasvajakud, mille konfluentsus oli umbes 85%. Selleks võeti need inkubaatorist välja ning viidi järgnevad sammud läbi II klassi A2 tüüpi bioloogilise turvalisuse tõmbekapi (Esco Labculture) all. T25 rakukultuuri kolvis olevatelt kinnitunud rakkudelt eemaldati klaasist otsikuga sisseimava toruga DMEM sööde. Seejärel pesti rakke 5 ml Dulbecco fosfaatpuhverdatud soolalahusega (inglise keeles *Dulbecco's phosphate-buffered saline*, DPBS; Corning, 21-031-CV) kasutades seroloogilist pipetti. DPBS eemaldati ning rakkudele lisati pipetiga 500 µl Cellstripper lahust (ensüümivaba lahus rakkude

eemaldamiseks kultuurinõu pinnalt; Corning, 25-056-CI) – sellel lasti mõjuda 5 minutit, et rakud kolvi pinnalt lahti tuleks. Kasvajakukkudele lisati veel seroloogilise pipetiga 5 ml DMEM söödet, millega rakud kolvis pesemise ja suspendeerimise teel üksteisest eraldada. Järgmisena võeti kolvist kõik rakud ja pandi 15 ml koonilisse tsentrifuugituubi. Rakud tsentrifuugiti Eppendorf 5810 R tsentrifuugis 250 p/min juures 5 min. Tõmbekapi all eemaldati vaakumi abil supernatant ning rakusade suspendeeriti rakusöötmes. Uude puhtasse kolbi 5 ml söötmega lisati 1 : 8 lahjendatud rakud. Süstimiseks vajaliku rakkude koguse leidmiseks loendati rakud Bio-Rad automatiseeritud Cellcounter masinas ja seejärel tehti lahjendus lõppkontsentratsiooniga 8×10^6 rakku ml kohta (2000 rakku 2.5 μ l-s).

2.2.2.2. Intrakraniaalne kasvajakukkude süstimine hiire ajju

Hiirte pead raseeriti päev enne süstimist, kasutades karvaeemalduskreemi Veet. Glioomi indutseeriti kasvajakukkude intrakraniaalse süstimise teel. Enne operatsiooni algust uinutati hiir, kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan (0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini) ning süstiti selja peal naha alla valuvaigistit Carprofen (4 mg/kg). Hiire silmade kuivamise eest kaitsmiseks operatsiooni ajal kasutati silmageeli Lakripos. Karvadeta pealagi puhastati 70% etanooliga ning seejärel tehti peanahka skalpelliga ~1–1.5 cm lõige. Edasi puhastati kolju 3% vesinikperoksiidiga, et *Bregma* (sagitaalõmbluse ja pargõmbluse kokkupuutekoht, mida kasutati orientiirina) nähtavale tuleks. Järgmiseks fikseeriti katselooma pea stereotaktilises seadmes. Fikseeritud hiire koljusse puuriti rakkude süstimiseks Foredom K.1070 puuriga *Bregmast* 2 mm paremal ning 2 mm üleval umbes 1 mm läbimõõduga auk paremasse striatumisse ehk juttkehasse. 2000 SB28-Ohlfest rakku sisaldavat rakususpensiooni 2.5 μ l DMEM söötmes süstiti kiirusega 0.5 μ l/min hiire paremasse striatumisse (2.5 mm sügavusele). Tagasivoolu vältimiseks oodati peale süstimise lõppu 1 minut enne süstla eemaldamist. Auk koljus täideti luuvahaga ning nahalõige suleti 1–3 õmblusega. Vältimaks loomade alajahtumist, hoiti loomi soojamatil (37 °C) nende ärkamiseni. Operatsioonijärgsetel päevadel jälgiti ja kaaluti hiiri ning manustati neile valuvaigistit Carprofen (4 mg/kg).

2.2.3. Loomade elupuhune kuvamine IVIS süsteemiga

SB28-Ohlfest rakuliinis oleva lutsiferaasi signaali kasutati hiirtes glioblastoomi kasvu jälgimiseks ning hindamiseks *in vivo* kuvamissüsteemis IVIS (IVIS Lumina III LT). Hiirde süstimiseks kasutati 15 mg/ml D-lutsiferiini (D-Luc) DPBS-is, mis enne süstimist puhastati 22 µl filtriga. Lutsiferaasi ja lutsiferiini reaktsiooni alustamiseks süstiti 10 µl/g (hiire kehakaalu kohta) D-lutsiferiin lahust intraperitoneaalselt (i.p., süstimine kõhuõõnde). Süstid tehti korraga kuni 3 hiirele, mis oli IVIS masina vaatevälja maksimum. Lutsiferiinil lasti tsirkuleerida 6 minutit, misjärel hiired anesteeriti hapniku-isofluraani seguga. Anesteesia all olevad hiired asetati kõrvuti kõhuli pimendatud instrumendialale ning võeti analüüsiks pildid eelnevalt kineetilise kõveraga määratud seadetega (Luminestsents, F/stopp 1, FOV D, subjekti pikkus 1.5 cm, säritus 20 sekundit ja 40 sekundit; ajapunktid süstimise algusest vastavalt 12 minutit ja 13 minutit). Peale kuvamist viidi hiired tagasi puuri toibuma. Hiirte silmi niisutati pildistamise ajal silmageeliga Lakripos. Tuumori indutseerimisest alates kuvati loomi iganädalaselt.

2.2.4. Glioblastoomi hematoksüliin-eosiin värving

Multiformse glioblastoomi histoloogiliseks analüüsimiseks ajus viidi läbi koelõikude hematoksüliin-eosiin värving. Ajukude eraldati glioblastoomiga hiirtelt kirurgiliselt pärast 5 minutit DexDomitor/BioKetan anesteesiat ja 10 ml südamesisest perfusiooni fosfaatpuhverdatud soolalahusega (inglise keeles *phosphate-buffered saline*, PBS). Lõikude valmistamiseks kasutati mikrotoomi (Leica), millega saadi alusklaasile 20 µm paksusega ajukoelõigud, hõlmates tervet kasvajat. Koeklaasid fikseeriti 2 minutit jääkülmas metanoolis, seejärel värviti 3 minutit hematoksüliiniga ning loputati 5 minutit jooksva kraanivee all. Edasi värviti lõigud 5 sekundit eosiiniga ja loputati uuesti 5 minutit kraaniveega. Viimaks pesti koelõigud kaks korda 1 minut 96% etanooliga ning 2 minutit Roticlear lahusega (CarlRoth). Preparaatidele lisati DPX kinnitusvahendit (DPX Mountant for histology; SIGMA, 06522-500ML) ja pealisklaas ning lasti kuivada. Hematoksüliin värvib rakkude tuumad lillakas-siniseks ning eosiin ekstratsellulaarse maatriksi ja tsütoplasma roosaks. Preparaatide digitaliseerimiseks kasutati Aperio VERSA mikroskoop-skännerit (Leica).

2.2.5. Faagidisplei

Faagidisplei läbiviimiseks kasutati laboris eelnevalt valmistatud tsüklilist CX₇C faagide raamatukogu, kus T7 faagide kapsiidi valgu C-terminaalses otsas on ekspresseeritud erinevad randomiseeritud peptiidid, mille teoreetiline mitmekesisus on 1.28×10^9 (Põšnograjeva jt, 2025). Raamatukogu alikvoote ehk portsjone säilitati -80 °C juures külmutatuna 10% glütserooli sisaldavas PBS-is. Iga hiir sai 100 µl faagilahust ja kuna kogu peptiid-faagi raamatukogu oli 5×10^{10} PFU (*plaque-forming unit*)/ml, siis saadi 5×10^9 PFU-d hiire kohta. Hiir asetati liikumist piiravasse seadeldisse ning saba soojendati sooja vees veenide laiendamiseks. 100 µl peptiid-faagi lahust süstiti hiire sabaveeni. Pärast 30 minutist tsirkulatsiooni, tuimestati hiired DexDomitor/BioKetan lahusega 5 minutit enne järgmist etappi ja viidi läbi perfusioon PBS-iga. Hiirt perfuseeriti umbes 10 ml PBS-iga südamesiseselt, et eemaldada gravitatsioonivooluga tilgutisüsteemi abil esmalt seondumata faagid suurest vereringest ning seejärel väiksest vereringest ehk kopsuvereringest. See kestis seni, kuni kasvajast ja kontrollorganitest oli veri eemaldatud. Koguti katses kasutatavad organid (aju, ajus olev kasvaja, maks, kopsud, neerud ja viimases tsüklis ka süda), pesti korraks PBS-iga ning asetati 14 ml koonilistesse tuubidesse, mis sisaldas 1 ml LB (lüsogeenne sööde) ja detergendi NP-40 (nonüülfenoksüpolüetoksüetanool) lahust. Protseduuri korrati kontrollhiirtel. Sihtmärk- ja kontrollorganid kaaluti ning homogeniseeriti jääs käeshoitava vahetatavate otsikutega koehomogeniseerijaga (Omni International Inc.).

Faagide hulga määramiseks organites tiitriti homogeniseeritud organid kasutades *E. coli* tüve BLT5615. 20 ml LB/karbenitsilliini söödet inokuleeriti ühe BLT5615 kolooniaga värskelt triibutatud LB/ampitsilliini agarplaadilt. Seda inkubeeriti 100 ml Erlenmeyeri kolvis bakteriaalses loksutis temperatuuril 37 °C ja 200 p/min üleöö. Edasi lahjendati üleöö kultuur 1 : 100-le eelsoojendatud LB- ja karbenitsilliiniga söötmes ning inkubeeriti loksutil temperatuuril 37 °C ja 2000 p/min juures, kuni bakterikultuuri OD₆₀₀ oli 0.5, mis on ligikaudu 4×10^8 rakku/ml. Valmistati faagide lahjendusterida LB- ja karbenitsilliiniga söötmes lahjendustega 10³–10⁹. Plaatimiseks segati kokku 15 ml koonilisse tuubi 100 µl lahjendatud faagilahust, 500 µl bakterilahust ja 5 ml 2 mM IPTG-d (isopropüül-β-D-1-tiogalaktopüranosiid) sisaldavat eelsoojendatud top-agarit. Valminud segu segati vorteksil ja valati kohe LB/ampitsilliini sisaldavale agarplaadile. Plaadid inkubeeriti üleöö toatemperatuuril või 3–5 tundi 37 °C

inkubaatoris. Faagiga nakkunud bakterite kolooniad loendati ja arvutati faagi kogus lahjendamata proovi kohta. Faagi tiitri arvutamiseks kasutati plaate, millel oli vahemikus 20-200 faagilaiku, mis on lüüsitud bakterite indikaatoriks.

Faagide kogumi amplifikatsiooniks kogutud organitest kasutati *E. coli* tüve BLT5403 eelsoojendatud LB- ja karbenitsilliiniga söötmes, mille OD₆₀₀ on 0.5. OD₆₀₀ = 0.5 saavutati sarnaselt tüvega BLT5615. Seejärel lisati organite homogeniseeritud lahusele iga proovi kohta 7 ml bakterit ja 28 ml top-agarit, mis segati vorteksiga. Segu valati LB- ja karbenitsilliini sisaldavatele 7 Petri tassile seroloogilise pipetiga, 5 ml iga tassi kohta. Erandiks oli kasvajat sisaldav homogenisaat, mille puhul kasutati 14 Petri tassi proovi kohta ning homogeniseeritud proov jagati kahte tuubi – mõlemasse tuubi lisati 7 ml bakterilahust ja 28 ml agarit. Plaadid inkubeeriti 37 °C juures kuni faag on lüüsinud enamiku bakterist. Amplifitseeritud faagi elueerimiseks lisati iga tassi peale 3 ml faagide elueerimispuhvrit (20 mM Tris pH = 8, 100 mM NaCl, 6 mM MgSO₄) ning hoiti 4 °C juures üleöö loksutil. Järgmisel päeval koguti elueeritud faag 50 ml koonilistesse tuubidesse.

Kokku kogutud faagi eluaadid puhastati polüetüleenglükooliga, mille molekulmass on ligikaudu 8000 (PEG8000). Selleks lisati faagituubi iga 1 ml kohta 100 µl 5 M NaCl lahust ning segati vorteksil. Lüsmaat eraldati bakteriraku jääkidest, tsentrifuugides 12000 g ja 4 °C juures 10 minutit. Uude tuubi viidud supernatandile lisati 200 µl 50% PEG8000 lahust PBS-is iga 1 ml supernatandi kohta ning segati vorteksil. 30 minutilise jääl inkubeerimise järgselt tsentrifugeeriti faag sadestamiseks 8000 g ja 4 °C juures 10 minutit. Supernatant eemaldati ning sade kuivatati õhu käes. Kuivanud sade resuspendeeriti 1.5 ml PBS-is.

Süstimiseks vajaliku puhtuse saamiseks puhastati faag ultratsentrifuugis CsCl gradiendiga puhastuse teel. Selleks valmistati 62.5% CsCl PBS lahusest CsCl : PBS lahjendused suhtes 2 : 1, 1 : 1 ja 1 : 2 (Tabel 1). Tsentrifugimisel jääb faag 2 : 1 kihi peale. Lahjendused lisati järgnevas järjekorras:

Tabel 1. PEG puhastamise etapiks vajalikud tihedusgradiendid.

CsCl : PBS 2 : 1	1.2 ml
CsCl : PBS 1 : 1	1.2 ml
CsCl : PBS 1 : 2	0.25 ml

Kõige viimaseks kihiks oli 1.7 ml faag PBS-is. Tuubides olevad gradiendid ultratsentrifuugiti, kasutades SW 60 Ti swing-out rootorit (Beckman Coulter) 40 000 p/min (113 000–216 000 g) pöoretel 22 °C juures 45 minutit. Tekkinud faagikiht koguti ühekordselt kasutatava süstlaga. Kiht eemaldati torgates nõelaga läbi tuubi 0.5 cm allpool faagikihti ja koguti 0.5–1 ml süstlasse. Väiksemate ebavajalike ainete eemaldamiseks faagilahusest viidi läbi dialüüs. Selleks kasutati Slide-A-Lyzer 3500 MW katkestusvõimega dialüüsikassette, kuhu süstiti kogutud faagilahused. Kassette loksutati 2 korda 1 tund toatemperatuuril PBS-is, mille maht oli 500 korda suurem kui faagilahuse maht. Puhastatud faagid hoiustati 4 °C juures.

Uue faagidisplei tsükli jaoks kasutati sisendina neid faage, mis koguti eelmise tsükli kõigi hiirte kasvajatest. Iga järgmise tsükliga pidi faagitiiter sihtmärkorganis ehk ajus glioblastoomis suurenema. Neid tsükleid korrati kokku 4 korda.

2.2.6. PCR ja sekveneerimine

Polümeraasi ahelreaktsioon (inglise keeles *polymerase chain reaction*, PCR) ja sekveneerimine viidi läbi laboris laboritehnika Kaarel Kurmi poolt. PCR-reaktsiooniks kasutati CsCl-ga puhastatud faage, et amplifitseerida bakteriofaagi genoomist peptiidi kodeerivat järjestust. Ühe reaktsioonisegu komponentideks olid: 1 µl pärisuunaline (*forward*) praimer, 1 µl vastassuunaline (*reverse*) praimer, 1 µl matriitsjärjestus ehk faagi DNA proov (faagi kontsentratsioon tavaliselt 2–40 ng/µl), 1 µl dNTP-d (deoksünukleosiidtrifosfaadid, 10 mM), 0.5 µl Phusion Green Hot Start II (Thermo Scientific F-537L) polümeraas, 35.5 µl Milli-Q vesi (MQ) ja 10 µl 5x Phusion puhver. PCR teostati Biometra termotsükleris.

PCR programm:

- 1) Eelkuumutus 98 °C 30 sekundit
- 2) Denaturatsioon 98 °C 20 sekundit
- 3) Elongatsioon 72 °C 30 sekundit
- 4) Järelsüntees 72 °C 5 minutit

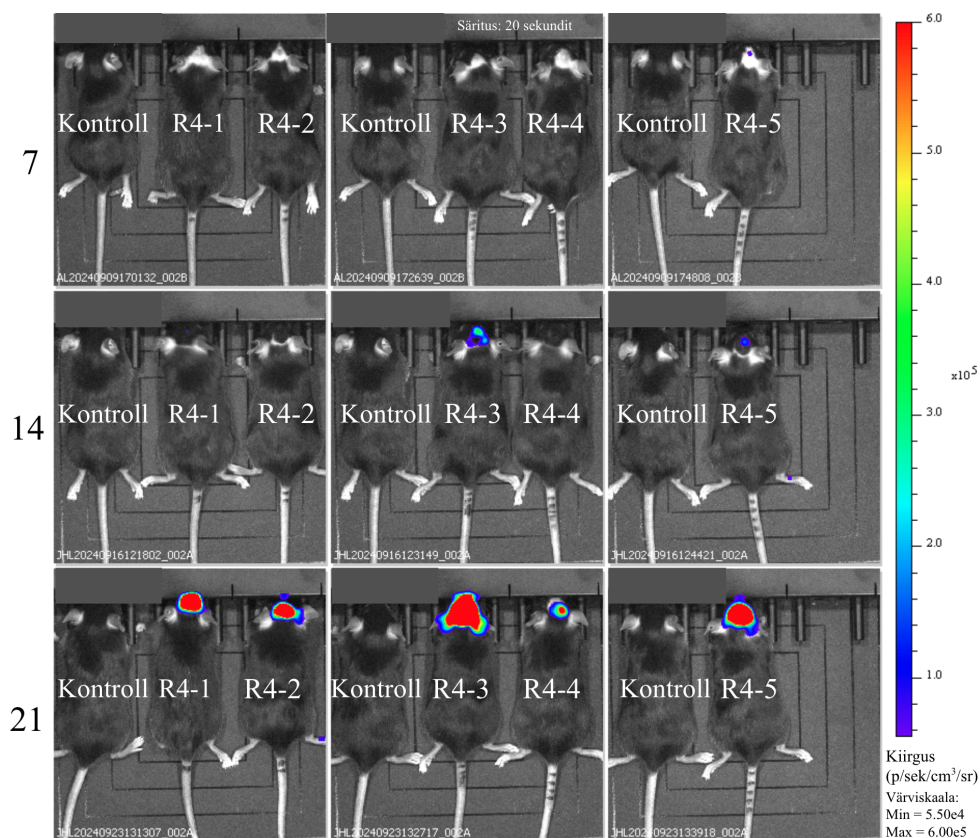
Etappe 2–3 korrati 20 tsükli.

Amplikoni kontrolliks teostati elektroforees 3% TBE (Tris-boraat-EDTA) geelil. Viimaks viidi läbi suure läbilaskevõimega sekveneerimine, kus kasutati Ion Torrent Personal Genome Machine (Ion PGM) sekveneerimisseadet ning Ion PGM HiQ View sekveneerimiskomplekti. Diferentsiaalanalüüsiks kasutati .fastq-lõpuga faile, kust eraldati labori poolt välja töötatud T7 faagidisplei peptiidiotsimise tööriistaga nende järjestused ning iga üksiku peptiidi kohta sekveneerimisest saadud lugemite arv.

2.3. Tulemused

2.3.1. Kasvaja arengu jälgimine hiirtel IVIS süsteemiga

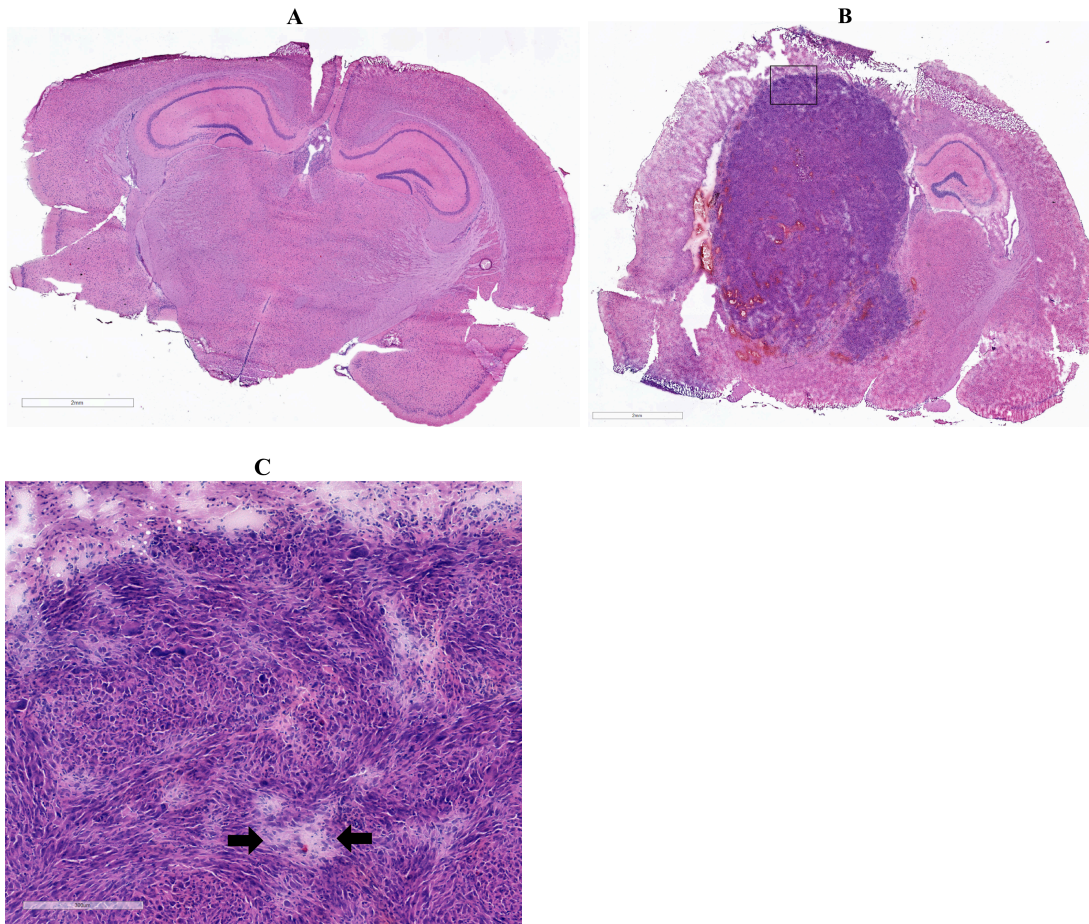
Esiteks hinnati seda, kuidas glioblastoom peale kasvajarakkude süstimist hiirte ajus areneb. Progressi jälgimiseks tehti IVIS kuvamissüsteemiga pildid 7, 14 ja 21 päeva tagant, mõnel juhul ka 28. päeval. Erinevate faagidisplei tsükli hiirte puhul oli näha, et enamasti ei olnud kasvaja esimese kahe nädala jooksul veel piisavalt arenenud, ainult üksikutel hiirtel oli võimalik tuvastada nõrgemat signaali. Kolmandal nädalal aga toimus märgatav muutus – glioblastoomi signaal ajust oli väga tugev (Joonis 3). Erandiks oli üks hiir, kellel tekkis signaal alles neljandal nädalal. Saab järeldada, et pärast 14 päeva toimus hiirtes glioblastoomi agressiivne areng, mida põhjustas kasvajarakkude kiire paljunemine.



Joonis 3. Neljandas faagidisplei tsükliks kasutatud glioblastoomide dünaamika. Hiiri pildistati IVIS kuvamissüsteemiga 7, 14 ja 21 päeva möödudes pärast kasvajakude süstimist. Vasakpoolne hiir iga glioblastoomiga hiirte grupi kõrval on kontrollhiir. R4 tähistab faagidisplei tsükli arvu, millele järgneb vastava hiire number. Lisas 1 iga nädal eraldi grupeerituna.

2.3.2. Glioblastoomi histoloogia hematoksüliin-eosiinvärvingus

Hematoksüliin-eosiiniga värvitud koepreparaatidel oli näha, et SB28-Ohlfest rakkudega indutseeritud glioblastoomiga ajukoos erines rakkude tihedus oluliselt tavalisest ajukoest – kasvaja piirkonna tugevalt sinakas värvus viitab rakutuumade suurenenud tihedusele (Joonis 4A, B). Pärast 32-päevast kasvu olid GBM-i rakud nähtavalt tunginud ka ümbritsevasse ajukoosse, hõlmates peaaegu terve ajupoolkera. Seetõttu oli ka kasvaja selgete piiride määramine keeruline (Joonis 4B). Lähemalt uurides ilmnes, et glioblastoomi kude oli tugevalt pleomorfne ja hüpertsellulaarne, millele viitasid hematoksüliiniga värvunud sinakate tuumade ebakorrapärane kuju ja suurenenud mitooside arv. Lisaks täheldati mitmes kasvaja piirkonnas nekrootilisi piirkondi, mida ümbritsesid tihedalt asetsevad kasvajakud (Joonis 4C).



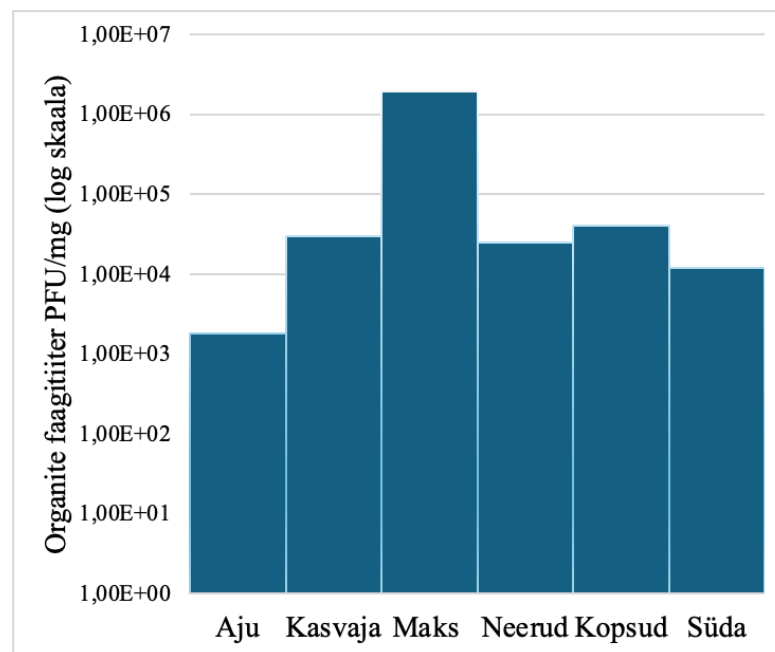
Joonis 4. Hematoksüliin-eesiiniga värvitud normaalse ja glioblastoomiga ajukoe preparaadid. A) Terve normaalne ajukude, mõõteskaala 2 mm; B) Glioblastoomiga terve ajukude, mõõteskaala 2 mm; C) Kasvajakoe piirkond lähemalt, mõõteskaala 300 μm . Nooltega on tähistatud nekrootiline piirkond.

2.3.3. *In vivo* faagidisplei

Faagidispleid teostati neli vóoru, mille puhul kasutati igas bioselekteerimise tsüklis kindlat arvu hiiri: esimeses 8 (5 kasvajaga + 3 kontrolli), teises ja kolmandas 4 kasvajaga ning neljandas vóorus 6 hiirt (3 kasvajaga + 3 kontrolli). Iga hiire puhul koguti järgmised proovid: aju, ajus olev glioblastoom, maks, kopsud, neerud ja viimases raundis ka süda ning määrati nende faagitiitrid. Pärast organite tiitrimist viidi läbi ka faagide amplifikatsiooni etapp, mille põhieesmärgiks oli paljundada kasvajaga seondunud faage, et neid kasutada järgmises faagidisplei tsüklis spetsiifilisuse tõstmiseks. Võrdlemiseks paljundati ka kontrollorganitega seondunud faage. Selle etapiga suurendati glioblastoomiga seondunud faagide hulka, mille kontsentratsiooniks oleks süstimiseks ligikaudu 5×10^9 PFU/ml. Multiformsest glioblastoomist saadud faagide arv suurenes märgatavalt, ulatudes 10^8 – 10^9 kordajate vahele. Teises tsüklis saadud kontsentratsioon

oli oodatust 10 korda madalam (5×10^8 PFU/ml), kuid ülejäänutel voorudel saavutati soovitud faagitiiter keskmise tulemusena 5×10^9 PFU/ml, mis oli optimaalne järgmiste tsüklitega jätkamiseks.

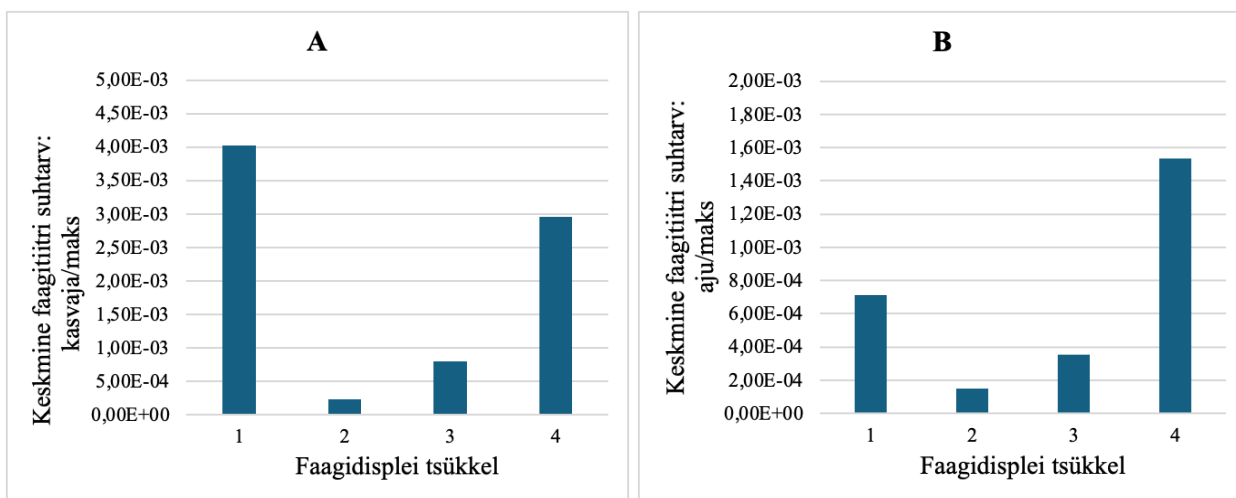
Viimase faagidisplei tsükli tulemuste analüüsimiseks leiti organite keskmised faagitiitrid ning esitati logaritmilises skaalas. Pärast kõiki tsükleid oli suurim faagide akumulatsioon maksas ning kõige väiksem ajus. Seevastu kasvajas olevate faagide arv oli ajust veidi kõrgem (Joonis 5). Maksa kõige kõrgem väärtus on tulenev sellest, et tegemist on organismi filtersüsteemiga. Aju madalaim väärtus on tingitud selektiivsest vere-aju barjäärist. Kasvaja kõrgem faagitiiter võrreldes ajuga võib viidata teatud peptiidide spetsiifilisele seondumisele ja kasvajatele iseloomulikule veresoonte suurenenud läbilaskvusele.



Joonis 5. Neljanda faagidisplei tsükli kolme kasvajaga hiire keskmine organite faagitiiter (PFU/mg) logaritmilisel skaalal.

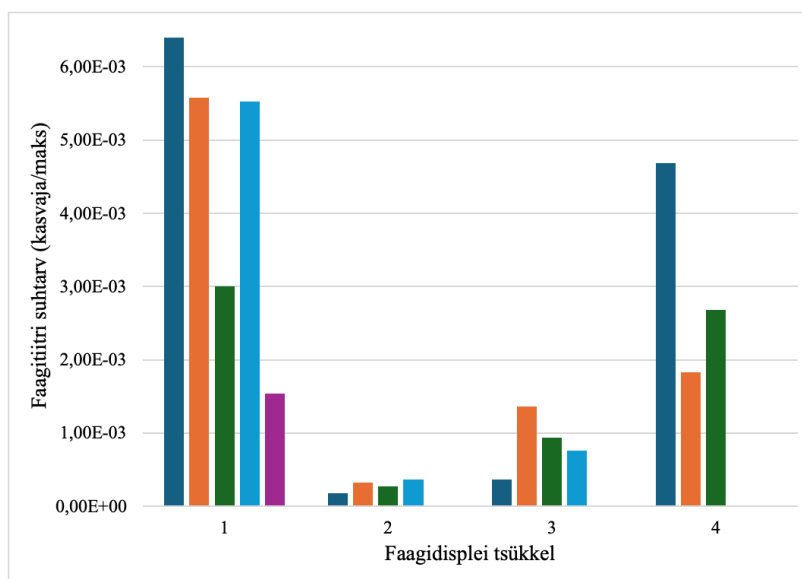
Selleks, et hinnata peptiid-faagide rikastumist järjestikuste faagidisplei tsüklite järel, jagati iga vooru kasvaja ja aju keskmine faagitiiter maksa tiitriga. Teises tsükliis täheldati nii kasvaja/maks kui ka aju/maks suhtarvu märkimisväärset langust, kuid aju puhul oli erinevus siiski väiksem. Põhjuseks võib olla, et tehnilistel põhjustel manustati teises voorus loomadesse kümme korda väiksem faagikogus kui esimeses. Teisest kuni viimase faagidisplei vooruni ilmnes kasvaja/maks

ja aju/maks suhete tõusutrend (Joonis 6). Seega suudeti lõpuks saavutada kasvajas järk-järgulist glioblastoomi-spetsiifiliste peptiidide tõusu.



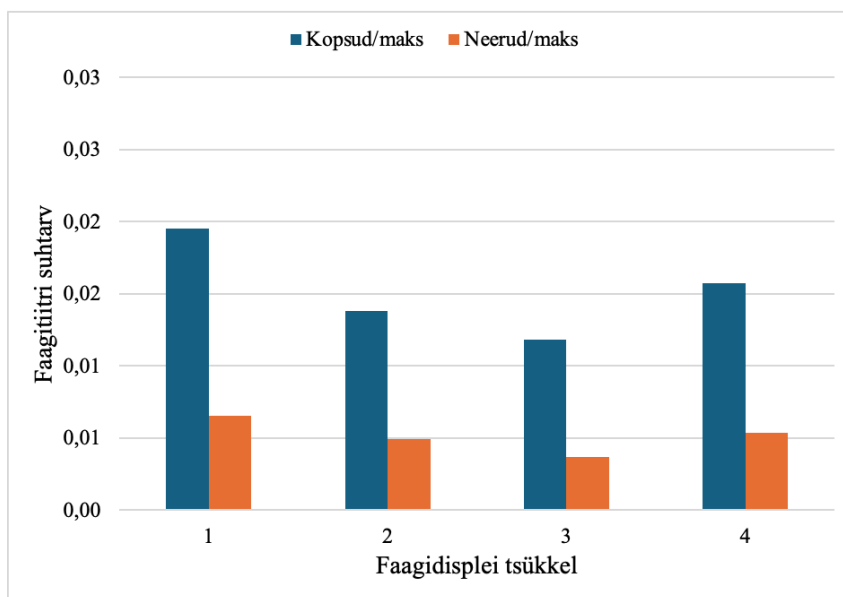
Joonis 6. Keskised faagitiitrite suhtarvud faagidisplei tsüklite lõikes. A) Kasvaja jagatud maksaga faagitiitrite suhtarvud; B) Aju jagatud maksaga faagitiitrite suhtarvud.

Iga üksiku kasvajaga hiire faagidisplei faagitiitrite tulemuste võrdlemiseks tsüklite lõikes jagati samuti nende faagitiitrid vastava maksa tulemustega läbi. Suuremas pildis jäid faagitiitrid tsüklile vastavalt enam-vähem võrdsele tasemele, aga näiteks eriti esimeses voorus on tuvastatav ka hiirte vaheline bioloogiline erinevus. Lisaks on nähtav alates teisest tsüklist faagide rikastumine kasvajas (Joonis 7).



Joonis 7. Glioblastoomiga hiirte kasvaja ja maksa faagitiitrite suhtarv erinevate faagidisplei tsüklite lõikes. Iga tulp tähistab erinevat hiirt.

Ühtlasi oli lisaks huvipakkuvate organitele oluline analüüsida ka kontrollorganeid, kopsu ja neere. Selleks leiti faagidisplei tsüklite kontrollorganite suhtarvud, kus jagati normaliseerimiseks nende keskmised faagitiitrid vastava maksa faagitiitritega läbi. Leiti, et kõigis neljas tsüklis jäid organite suhtarvud stabiilselt samale tasemele, kusjuures neerude väärtused olid järjepidevalt madalamad (Joonis 8). See tulemus kinnitab faagidisplei selektsiooniprotsessi õnnestumist.



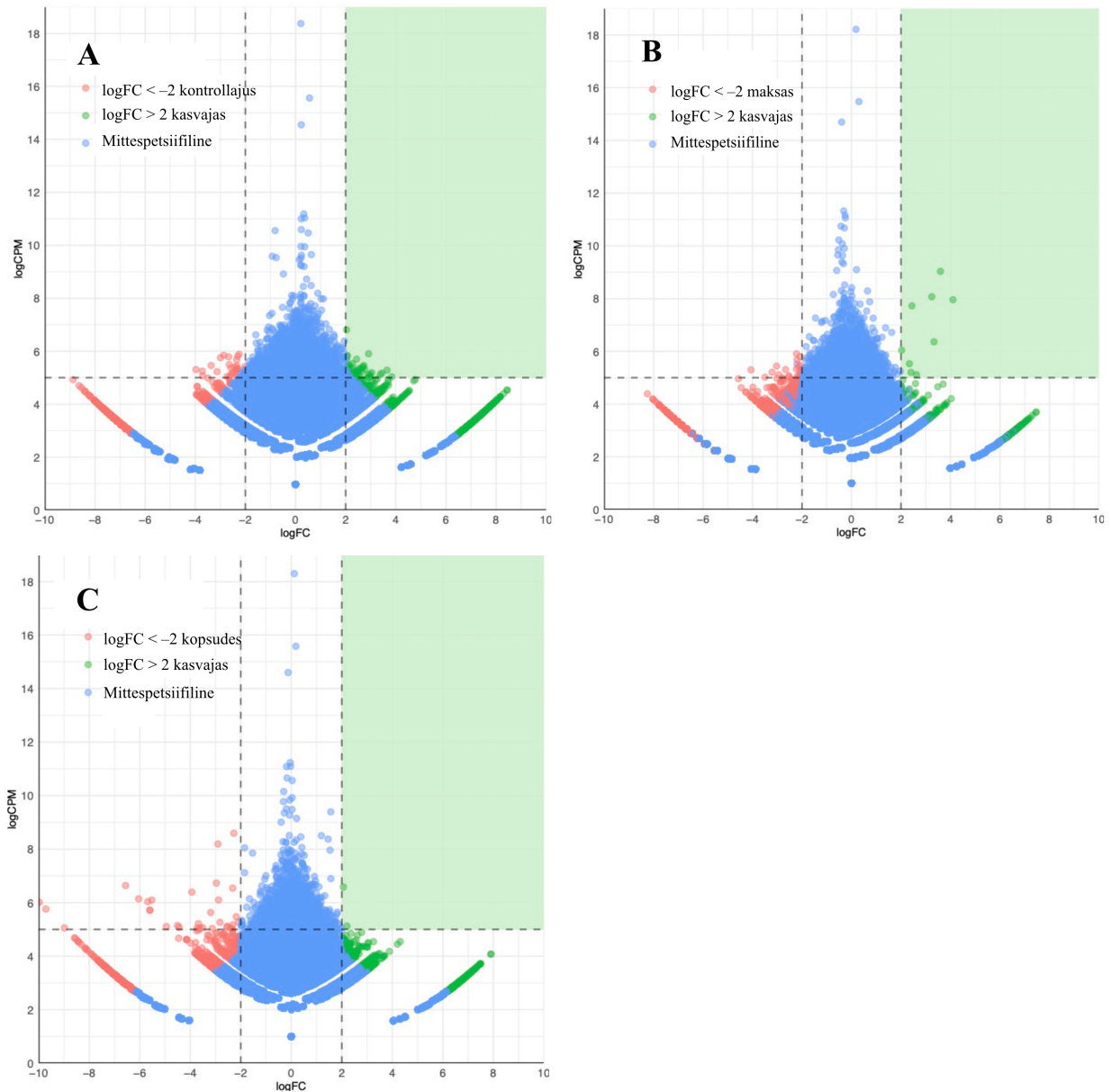
Joonis 8. Kontrollorganite (kopsude ja neerude) ning maksa keskmiste faagitiitrite suhtarvud iga faagidisplei tsükli kohta.

2.3.4. Sekveneerimistulemuste ülevaade

Faagidisplei jaoks kasutati tsüklilist naiivset peptiidide-faagide raamatukogu, peptiidijärjestusega CX₇C, kus “X” tähistas seitset tundmatut aminohapet, kontsentratsiooniga 5×10^9 PFU/ml (Põšnograjeva jt, 2021). Peptiidide analüüsimiseks sekveneeriti lisaks tuumorile ja ajule ka kontrollorganeist (maks, kopsud, neerud ja viimasest tsüklis saadud süda) puhastatud faagid. Algses raamatukogus oli peptiidijärjestusi umbes 2.5 miljardit, millest enamik olid lühemad kui 20 aminohapet. Peale nelja selektsioonitsükli toimus diversiteedi kollaps 2692 peptiidile.

Seejärel viidi läbi erinevates kudedes esindatud peptiidijärjestuste võrdlev analüüs, kus GBM-is akumulunud järjestusi võrreldi kontrollorganites (kontrollajus, maksas ja kopsudes) esinevate järjestustega. Logaritmiline analüüs teostati teadur Karlis Pleiko poolt, kes kasutas kõrge läbilaskevõimega sekveneerimise andmeid diferentsiaalanalüüsiks. Kontrollaju kasvajaga

võrdlemisel tekkisid mõned spetsiifiliselt tuumoriga seonduvad peptiidid (Joonis 9A). Seevastu võrdlus maksaga andis tulemuseks rea GBM-ile spetsiifilisi peptiide, kus parima selektiivsusega peptiidi puhul leiti esindatus 512 lugemit miljoni sekveneerimislugemi kohta (*counts per million*, CPM) (Joonis 9B). Kopsudega võrreldes ilmnis rohkem kopsule kui kasvajale spetsiifilisi peptiide. See tulemus oli ootuspärane, kuna need peptiidid sisaldasid CendR järjestust (R/KXXR/K), mis on teadaolevalt kopsule seonduvad. Üksikud peptiidid, mis glioblastoomi rohkem seonduvad, olid vastavalt lugemiga 32 CPM (Joonis 9C). Kokkuvõtteks tuvastati käesolevas töös läbiviidud *in vivo* faagidisplei tulemusel rida kandidaatpeptiide, millele tuleks edaspidistes uuringutes keskenduda.



Joonis 9. Kontrollorganite ja kasvaja peptiidide sagedusvõrdlus suure läbilaskevõimega sekveneerimise andmete põhjal. A) Kontrollaju ja kasvaja; B) Maks ja kasvaja; C) Kopsud ja kasvaja. X-teljel on logaritmiline *fold change* (logFC), mis kajastab selektiivsust kasvajas võrreldes kontrollkoega, ja y-teljel logaritmiline lugemite sagedus miljoni kohta (logCPM), mis näitab peptiidi rohkest, arvatatuna siht- ja kontrollorgani keskmisena. LogFC väärtused vähem kui -2 viitavad kontrollkoele omastele peptiididele, väärtused üle 2 aga glioblastoomis esinevatele peptiididele. Peptiidid, mille logFC on üle 2 ja logCPM üle 5, on tõenäoliselt glioblastoomi-spetsiifilised. Andmete analüüsiks kasutati *edgeR* paketti.

2.4. Arutelu

Antud bakalaureusetöö eesmärk oli leida *in vivo* faagidispleiga sellised kullerpeptiidid, mis süsteemselt manustatuna seonduksid selektiivselt glioblastoomi paikmetega. See on oluline, sest multiformse glioblastoomi elulemus inimesel on keskmiselt 15 kuud ning puuduvad tervistava ravi võimalused (Thakkar jt, 2014). Käesoleva töö puhul kasutati põhilise kullerpeptiidide identifitseerimismeetodina faagidisplei bioselekteerimist. Viidi läbi neli selektsioonivooru SB28-Ohlfest glioblastoomi ortotoopses hiire mudelis.

IVIS tulemuste analüüs näitas, et multiformse glioblastoomi järsk areng kasvajas toimus kolmandal nädalal, kui ilmnes tugev lutsiferaasi signaal ajus (Joonis 3). Mõne hiire puhul ilmnes signaal alles neljandal nädalal. Lisaks uuriti ka hematoksüliin-eosiin värvinguga kasvajakoe histoloogiat. Skaneeritud preparaadilt avastati, et võrreldes tavalise ajukoega oli glioblastoom levinud hajusalt peaaegu tervesse ipsilateraalsesse ajupoolkerasse (Joonis 4A, B). Lisaks esinesid kasvajakoes iseloomulikud tihedalt paiknevad pleomorfseid tuumad ja kõrge mitootiline aktiivsus. Mitmes piirkonnas täheldati ka nekroosi (Joonis 4C), mis ilmneb sageli ka kliinilise glioblastoomi paikmetes (Lan jt, 2024).

Seejärel viidi läbi *in vivo* faagidisplei katsed ning hinnati faagide akumulatsiooni ülevaate saamiseks ja järgmise tsükli sisendi kontsentratsiooni määramiseks organite faagitiitrid. Varasemalt meie labori poolt läbi viidud faagidisplei katsete tulemused on näidanud, et peale faagide intravenooset manustamist on kõrgeim faagitiiter maksas ning madalaim ajus (Põšnograjeva jt, 2021). Käesolev töö kinnitas neid tulemusi (Joonis 5). Füsioloogiliselt on maks filtersüsteem, mille üheks ülesandeks on vereringest elimineerida nanoskaalas osakesed, sh viirused ja faagid. Aju puhul on madal faagide seonduvus seotud selektiivse vere-aju barjääriga selles organis. Glioblastoomis leiti ajust kõrgem faagitiiter (Joonis 5), mis võib näidata teatud peptiidide selektiivsust kasvajasse. On oluline märkida, et vere-kasvaja barjäär on üldiselt rohkem läbilaskvam kui vere-aju barjäär (Wu jt, 2020).

Multiformses glioblastoomis ja ajus eeldasime näha faagitiitrite kontsentratsiooni tõusu iga faagidisplei tsükli järel. Selle analüüsimiseks kasutati suhtarve, kus tulemuste normaliseerimiseks jagati organi keskmine faagitiiter vastava maksa faagitiitriga läbi. Glioblastoomi ja aju suhtarvude analüüsi tulemustes täheldati teises faagidisplei voorus mõlemal väärtuse langust,

kusjuures aju puhul oli muutus väiksem (Joonis 6). Languse põhjuseks oli selles tsükli tehnilistel põhjustel kümme korda väiksema faagide koguse süstimine hiirtesse. Teisest vöorust alates suurenes faagide akumulëerumine glioblastoomi paikmetes iga järgmise tsükliga, viidates kasvaja-spetsiifiliste peptiidide suuremale esindatusele (Joonis 6). Edasi vaadeldi täpsemalt iga faagidisplei tsükli glioblastoomiga hiirte faagitiitrite suhtväärtuseid maksaga ka eraldiseisvana. Kuigi suhtväärtused olid üldjoontes iga vöoru kohta omale tsüklile vastavalt samas suurusjärgus, esines ka sama tsükli sees hiirtes individuaalseid erinevusi (Joonis 7). Sellised varieeruvused on ootuspärased, kuna iga organism on bioloogiliselt mõnevõrra erinev.

Eksperimendi õnnestumise analüüsimiseks olid olulised ka kontrollorganid, mis näitavad saadud andmete usaldusväärsust ja võimaldavad hinnata sihtkudede spetsiifilisust. Neerude ja kopsude keskmised faagitiitrid jagati läbi maksa väärtustega ning analüüsiti faagide akumulatsiooni kõigi faagidisplei tsükli vältel. Leiti, et vöorude lõikes olid tulemused stabiilsed, kusjuures neerude suhtarv jäi alati veidi madalamale, mis viitab kontrollorganite suhtes peptiidide spetsiifika puudumisele (Joonis 8).

Sekveneerimistulemused näitasid peptiidiraamatukogu diversiteedi langust. Glioblastoomis akumulëerunud faagide peptiidide järjestusi kõrvutati erinevate kontrollorganite omadega ning leiti mõned potentsiaalselt kasvajaselektiivsed kullerpeptiidid (Joonis 9). Nende tulemuste kinnitamiseks on vajalikud täiendavad uuringud individuaalsete kandidaat-peptiididega.

Käesolevas bakalaureusetöös tuvastati *in vivo* faagidisplei abil kandidaatpeptiide, mis seonduvad glioblastoomi paiknemiskohtadega. Töö tulemused kinnitavad, et kasutatud meetodid võimaldavad leida agressiivsele multiformsele glioblastoomile spetsiifilisi peptiide. Veelgi enam, täheldati kasvajale selektiivsete peptiidide akumulëerumise suurenemist ja varieeruvuse vähenemist, mis viitab nende võimalikule kasutuspotentsiaalile sihtotstarbeliste ravimkandjatena. Tulemuste kinnitamiseks on siiski vajalikud täiendavad uuringud individuaalsete kandidaatpeptiididega, et selgitada nende selektiivsuse ja spetsiifilisuse mehhanisme ning tagada leitud seoste usaldusväärsus.

KOKKUVÕTE

Multiformne glioblastoom on üks levinumaid ja agressiivsemaid ajukasvajaid, mille vere-aju barjäär piirab tõhusate ravimite jõudmist kasvajasse (Miller jt, 2021; Mo jt, 2021). Ühe võimaliku lahendusena selektiivseks ravimitranspordiks saab kasutada kullerpeptiide, mis ületavad hematoentsefaalbarjääri ja seonduvad spetsiifiliselt kasvajarakkudega (Teesalu jt, 2013).

Käesoleva töö eesmärk oli leida *in vivo* faagidisplei abil peptiide, mis tunneksid ära glioblastoomile omaseid molekulaarseid signatuure. Selleks viidi läbi neljatsükliline faagidisplei skriin ortotoopses SB28-Ohlfest glioblastoomi hiiremudelil. Kasvaja arengut jälgiti IVIS-kuvamissüsteemiga, mille põhjal määrati sobiv ajastus faagidispleiks. Pärast kolmandat nädalat koguti organid ning määrati faagitiitrid glioblastoomis ja kontrollkudedes. Peptiidjärjestuste esindatust hinnati kõrge läbilaskevõimega sekveneerimise teel.

Tulemused näitasid faagide suurimat akumulatsiooni maksas ja madalaimat ajus. Glioblastoomis täheldati mõõdukat faagide akumulatsiooni, mis viitab kasvaja ümbruses oleva barjääri selektiivsusele identifitseeritud peptiidide suhtes. Kontrollorganites olulist spetsiifilist akumulatsiooni ei esinenud. Sekveneerimistulemused näitasid, et glioblastoomi akumulatsioonid peptiidide varieeruvus vähenes, viidates selektiivsuse kasvule.

Töö käigus leitud kandidaat-kullerpeptiidid vajavad edasist valideerimist, et hinnata nende potentsiaali täppissuunatud ravimikandjatena glioblastoomi ravis.

RESÜMEE

Identification of tumor-homing peptides in glioblastoma animal models

Kleer Siigur

Summary

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most lethal and prevalent forms of malignant brain tumors, with many drugs struggling to reach the tumor due to the selective nature of the blood-brain barrier (Miller *et al.*, 2021; Mo *et al.*, 2021). A potential solution to this problem could be tumor-homing peptides capable of crossing the barrier and binding to tumor cells (Teesalu *et al.*, 2013).

The goal of this bachelor's thesis was to identify tumor-homing peptides through *in vivo* phage display that specifically bind to receptors present in glioblastoma tumors in the brain. To achieve this, a four-round phage display biopanning was conducted using *in vivo* mouse models. SB28-Ohlfest tumor cells, which mimic human GBM, were injected intracranially into mice, and the progression of glioblastoma was monitored using the IVIS imaging system. By the third week post-injection, the glioblastoma signal from the brain became markedly intensified. Subsequent analysis of tumor tissue histology using hematoxylin and eosin staining revealed that the tumor at this stage was highly hypercellular and pleomorphic, occupying nearly the entire cerebral hemisphere. Three weeks following tumor induction, we initiated *in vivo* phage display screening by injecting mice with a peptide-phage library. Brains and tumors as well as control organs, including liver, lungs, kidneys, and heart, were collected. In total, four rounds of biopanning were conducted to progressively select for phages homing to glioblastoma lesions. Subsequently, phage amplification was carried out, utilizing the phages obtained from the tumor as the input for the next round of selection.

Following *in vivo* dosing of the T7 phage library, the highest titers were observed in the liver and the lowest in the brain. Liver is a known site of accumulation of biological and synthetic nanoparticles, including phage particles. The low titer in the brain may be attributed to the presence of the selective blood-brain barrier. The tumor showed a higher accumulation than control brain, suggesting an increase in tumor-specific peptides in the glioblastoma.

Whereas average phage titers in the glioblastoma and brain, normalized to the liver, revealed a decrease during the second phage display round due to the lower phage injection dose, we observed an upward trend in titer in both the glioblastoma and the brain in the subsequent rounds. At the same time, kidney to liver and lung to liver ratios remained unchanged.

High-throughput sequencing was used to assess the representation of phage-displayed peptides in target and control tissues through the screens. Sequencing results indicated a reduction in peptide diversity within the glioblastoma lesions. A panel of candidate glioblastoma homing peptides were identified that will be further validated during follow-up studies.

In conclusion, this bachelor's thesis demonstrated that the methods used in this study can successfully identify peptides targeting aggressive glioblastoma multiforme. Our studies resulted in identification of several candidate glioblastoma homing peptides that will be further evaluated in follow-up studies.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada enda juhendajaid Tambet Teesalut, Jorgen Holmi ja Juhan Sedmanit suure abivalmiduse ja juhendamise ning kannatlikkuse eest terve perioodi vältel. Samuti tänan meie täppis- ja nanomediitsiini laboratooriumi töötajaid Kaarel Kurmi ja Karlis Pleikot, ilma kelleleta oleks mu bakalaureusetööst oluline osa puudu. Lõpetuseks sooviksin tänada enda lähedasi ja teisi häid inimesi, kes minule sellel teekonnal suureks toeks ja abiks olid.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R. ja Begley, D. J. (2009). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Alajangi, H. K., Kaur, M., Sharma, A., Rana, S., Thakur, S., Chatterjee, M., Singla, N., Jaiswal, P. K., Singh, G. ja Barnwal, R. P. (2022). Blood–brain barrier: emerging trends on transport models and new-age strategies for therapeutics intervention against neurological disorders. *Molecular Brain*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13041-022-00937-4>
- Alvarez, J. I., Katayama, T. ja Prat, A. (2013). Glial influence on the blood brain barrier. *Glia*, 61(12), 1939–1958. <https://doi.org/10.1002/glia.22575>
- Arap, W., Kolonin, M. G., Trepel, M., ... Pasqualini, R. (2002). Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nature Medicine*, 8(2), 121–127. <https://doi.org/10.1038/nm0202-121>
- Ayo, A. ja Laakkonen, P. (2021). Peptide-Based strategies for targeted tumor treatment and imaging. *Pharmaceutics*, 13(4), 481. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040481>
- Bábíčková, J., Tóthová, L., Boor, P. ja Celec, P. (2013). In vivo phage display — A discovery tool in molecular biomedicine. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1247–1259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.004>
- Bauer, N., Beckmann, D., Reinhardt, D., Frost, N., Bobe, S., Erapanedi, R., Risse, B. ja Kiefer, F. (2024). Therapy-induced modulation of tumor vasculature and oxygenation in a murine glioblastoma model quantified by deep learning-based feature extraction. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52268-0>

- Bhowmik, A., Khan, R. ja Ghosh, M. K. (2015). Blood Brain Barrier: A challenge for Effectual therapy of brain tumors. *BioMed Research International*, 2015, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2015/320941>
- Bickel, U., Yoshikawa, T. ja Pardridge, W. M. (2001). Delivery of peptides and proteins through the blood–brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), 247–279. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00139-3](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00139-3)
- Bleeker, F. E., Molenaar, R. J. ja Leenstra, S. (2012). Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *Journal of neuro-oncology*, 108(1): 11–27. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0793-0>
- Bostami, R. D. A., Abuwatfa, W. H. ja Hussein, G. A. (2022). Recent advances in Nanoparticle-Based Co-Delivery systems for cancer therapy. *Nanomaterials*, 12(15), 2672. <https://doi.org/10.3390/nano12152672>
- Breslin, S. ja O’Driscoll, L. (2012). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(5–6), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>
- Chakraborty, S., DePalma, T. J. ja Skardal, A. (2021). Increasing Accuracy of In Vitro Cancer Models: Engineering Stromal Complexity into Tumor Organoid Platforms. *Advanced NanoBiomed Research*, 1(12). <https://doi.org/10.1002/anbr.202100061>
- Christian, S., Pilch, J., Akerman, M. E., Porkka, K., Laakkonen, P. ja Ruoslahti, E. (2003). Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *The Journal of Cell Biology*, 163(4), 871–878. <https://doi.org/10.1083/jcb.200304132>
- Correale, J. ja Villa, A. (2009). Cellular elements of the Blood-Brain barrier. *Neurochemical Research*, 34(12), 2067–2077. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0081-y>

- Daneman, R. ja Prat, A. (2015). The Blood–Brain barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>
- Demerec, M. ja Fano, U. (1945). BACTERIOPHAGE-RESISTANT MUTANTS IN ESCHERICHIA COLI. *Genetics*, 30(2), 119–136. <https://doi.org/10.1093/genetics/30.2.119>
- Deng, X., Wang, L., You, X., Dai, P. ja Zeng, Y. (2017). Advances in the T7 phage display system (Review). *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7994>
- Gagg, H., Williams, S. T., Conroy, S., ... Wells, G. (2023). Ex-vivo drug screening of surgically resected glioma stem cells to replace murine avatars and provide personalise cancer therapy for glioblastoma patients. *F1000Research*, 12, 954. <https://doi.org/10.12688/f1000research.135809.1>
- Gostaviceanu, A., Gavrilaş, S., Copolovici, L. ja Copolovici, D. M. (2023). Membrane-Active peptides and their potential biomedical application. *Pharmaceutics*, 15(8), 2091. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082091>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>
- Hennigs, J. K., Matuszcak, C., Trepel, M. ja Körbelin, J. (2021). Vascular endothelial cells: Heterogeneity and targeting approaches. *Cells*, 10(10), 2712. <https://doi.org/10.3390/cells10102712>
- Hoffman, J. A., Laakkonen, P., Porkka, K., Bernasconi, M. ja Ruoslahti, E. (2004). In vivo and ex vivo selections using phage-displayed libraries. In *Oxford University Press eBooks* (pp. 171–192). <https://doi.org/10.1093/oso/9780199638734.003.0010>
- Hu, B., Margolin, W., Molineux, I. J. ja Liu, J. (2013). The bacteriophage T7 virion undergoes extensive structural remodeling during infection. *Science*, 339(6119), 576–579. <https://doi.org/10.1126/science.1231887>

- Husni, D. G. (2024). A closer look at affinity ligands. *BioPharm International*.
<https://www.biopharminternational.com/view/a-closer-look-at-affinity-ligands>
- Hulo, C., De Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I. ja Mercier, P. L. (2010). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_1), D576–D582. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq901>
- Kadry, H., Noorani, B. ja Cucullo, L. (2020). A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1).
<https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>
- Kalniņa, Z., Siliņa, K., Meistere, I., Zayakin, P., Rivosh, A., Ābols, A., Leja, M., Minenkova, O., Schadendorf, D. ja Linē, A. (2008). Evaluation of T7 and lambda phage display systems for survey of autoantibody profiles in cancer patients. *Journal of Immunological Methods*, 334(1–2), 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.01.022>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł. ja Lamperska, K. (2016). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*.
<https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
- Konerding, M. A., Fait, E. ja Gaumann, A. (2001). 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *British Journal of Cancer*, 84(10), 1354–1362. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1809>
- Kosaka, A., Ohkuri, T. ja Okada, H. (2014). Combination of an agonistic anti-CD40 monoclonal antibody and the COX-2 inhibitor celecoxib induces anti-glioma effects by promotion of type-1 immunity in myeloid cells and T-cells. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 63(8), 847–857. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1561-8>
- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. ja Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: an update. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4411.
<https://doi.org/10.3390/ijms20184411>

- Kumar, P. (2018). *Biophysics and Molecular Biology 4th edition*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/355381497_Biophysics_and_Molecular_Biology_4th_edition#fullTextFileContent
- Lan, Z., Li, X. ja Zhang, X. (2024). Glioblastoma: an update in pathology, molecular mechanisms and biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 3040. <https://doi.org/10.3390/ijms25053040>
- Lee, H., Wheeler, M. A. ja Quintana, F. J. (2022). Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(5), 339–358. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00390-x>
- Li, J., Wang, Q., Xia, G., Adilijiang, N., Li, Y., Hou, Z., Fan, Z. ja Li, J. (2023). Recent advances in targeted drug delivery strategy for enhancing oncotherapy. *Pharmaceutics*, 15(9), 2233. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092233>
- Li, W. ja Caberoy, N. B. (2009). New perspective for phage display as an efficient and versatile technology of functional proteomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 909–919. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2277-0>
- Lingasamy, P. (2020). Development of multitargeted tumor penetrating peptides. *ResearchGate*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22360.21767/1>
- Lingasamy, P., Tobi, A., Kurm, K., Kopanchuk, S., Sudakov, A., Salumäe, M., Rätsep, T., Asser, T., Bjerkvig, R. ja Teesalu, T. (2020). Tumor-penetrating peptide for systemic targeting of Tenascin-C. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62760-y>
- Lo, Y., Lin, H., Hong, S., Chang, C., Wang, C. ja Lin, A. M. (2021). Lipid polymeric nanoparticles modified with tight junction-modulating peptides promote afatinib delivery across a blood–brain barrier model. *Cancer Nanotechnology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12645-021-00084-w>

- Luo, H. ja Shusta, E. V. (2020). Blood–Brain barrier modulation to improve glioma drug delivery. *Pharmaceutics*, 12(11), 1085. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111085>
- Milewska, S., Sadowska, A., Stefaniuk, N., Misztalewska-Turkowicz, I., Wilczewska, A. Z., Car, H. ja Niemirowicz-Laskowska, K. (2024). Tumor-Homing peptides as crucial component of Magnetic-Based Delivery systems: Recent developments and pharmaco-economical perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 6219. <https://doi.org/10.3390/ijms25116219>
- Miller, K. D., Ostrom, Q. T., Kruchko, C., ... Barnholtz-Sloan, J. S. (2021). Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA a Cancer Journal for Clinicians*, 71(5), 381–406. <https://doi.org/10.3322/caac.21693>
- Mo, F., Pellerino, A., Soffietti, R. ja Rudà, R. (2021). Blood–Brain Barrier in Brain Tumors: Biology and Clinical Relevance. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12654. <https://doi.org/10.3390/ijms222312654>
- Morton, C. L. ja Houghton, P. J. (2007). Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nature Protocols*, 2(2), 247–250. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.25>
- Muro, S. (2012). Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 164(2), 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.05.052>
- Nickl, V., Schulz, E., Salvador, E., ... Hagemann, C. (2022). Glioblastoma-Derived Three-Dimensional Ex Vivo Models to evaluate effects and efficacy of tumor treating fields (TTFields). *Cancers*, 14(21), 5177. <https://doi.org/10.3390/cancers14215177>
- Pacheco, C., Martins, C., Monteiro, J., Baltazar, F., Costa, B. M. ja Sarmiento, B. (2022). Glioblastoma Vasculature: From its Critical Role in Tumor Survival to Relevant in Vitro Modelling. *Frontiers in Drug Delivery*, 2. <https://doi.org/10.3389/fddev.2022.823412>

- Paetz-Ribes, M., Man, S., Xu, P. ja Kerbel, R. S. (2016). Development of patient derived xenograft models of overt Spontaneous breast cancer metastasis: A cautionary note. *PLoS ONE*, *11*(6), e0158034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158034>
- Paik, D. T., Tian, L., Williams, I. M., Rhee, S., Zhang, H., Liu, C., Mishra, R., Wu, S. M., Red-Horse, K. ja Wu, J. C. (2020). Single-Cell RNA sequencing unveils unique transcriptomic signatures of Organ-Specific endothelial cells. *Circulation*, *142*(19), 1848–1862. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.119.041433>
- Park, J. H. ja Lee, H. K. (2022). Current understanding of hypoxia in glioblastoma multiforme and its response to immunotherapy. *Cancers*, *14*(5), 1176. <https://doi.org/10.3390/cancers14051176>
- Pasupuleti, V., Vora, L., Prasad, R., Nandakumar, D. ja Khatri, D. K. (2023). Glioblastoma preclinical models: Strengths and weaknesses. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1879*(1), 189059. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189059>
- Pitz, M. W., Desai, A., Grossman, S. A. ja Blakeley, J. O. (2011). Tissue concentration of systemically administered antineoplastic agents in human brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, *104*(3), 629–638. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0564-y>
- Pleiko, K., Põšnograjeva, K., Haugas, M., Paiste, P., Tobi, A., Kurm, K., Riekstina, U. ja Teesalu, T. (2021). In vivo phage display: identification of organ-specific peptides using deep sequencing and differential profiling across tissues. *Nucleic Acids Research*, *49*(7), e38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1279>
- Pusztaszeri, M. P., Seelentag, W. ja Bosman, F. T. (2005). Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *54*(4), 385–395. <https://doi.org/10.1369/jhc.4a6514.2005>

- Põšnograjeva, K., Pleiko, K., Haugas, M. ja Teesalu, T. (2021). New tools for streamlined in vivo homing peptide identification. *Methods in Molecular Biology*, 385–412. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1752-6_25
- Põšnograjeva, K., Pleiko, K. ja Teesalu, T. (2025). Identification of Organ- and Disease-Specific homing peptides using in vivo Peptide-Phage display. In *Methods in pharmacology and toxicology* (lk 177–212). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4374-7_9
- R, R. R., AlSawafth, N. M. ja Husseini, G. A. (2024). Modeling of brain tumors using in vitro, in vivo, and microfluidic models: A review of the current developments. *Heliyon*, 10(10), e31402. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31402>
- Raucher D. (2019). Tumor targeting peptides: novel therapeutic strategies in glioblastoma. *Current opinion in pharmacology*, 47: 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.01.006>
- Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., Van Zandvoort, M. a. M. J. ja Egbrink, M. G. a. O. (2007). The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 454(3), 345–359. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0212-8>
- Ruoslahti, E., Bhatia, S. N. ja Sailor, M. J. (2010). Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *The Journal of Cell Biology*, 188(6), 759–768. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910104>
- Schaff, L. R. ja Mellinghoff, I. K. (2023). Glioblastoma and other primary brain malignancies in adults. *JAMA*, 329(7), 574. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.0023>
- Singh, R. ja Lillard, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 86(3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>
- Siple, J., Stassi, D., Dunn, J. ja Goldman, E. (2018). *Analysis of bacteriophage T7 gene 10A and frameshifted 10B proteins*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5952207/>

- Smeal, S. W., Schmitt, M. A., Pereira, R. R., Prasad, A. ja Fisk, J. D. (2016). Simulation of the M13 life cycle I: Assembly of a genetically-structured deterministic chemical kinetic simulation. *Virology*, *500*, 259–274. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.08.017>
- Smith, G. P. ja Petrenko, V. A. (1997). Phage display. *Chemical Reviews*, *97*(2), 391–410. <https://doi.org/10.1021/cr960065d>
- Sugahara, K. N., Teesalu, T., Karmali, P. P., Kotamraju, V. R., Agemy, L., Girard, O. M., Hanahan, D., Mattrey, R. F. ja Ruoslahti, E. (2009). Tissue-Penetrating Delivery of Compounds and Nanoparticles into Tumors. *Cancer Cell*, *16*(6), 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.10.013>
- Sweeney, M. D., Sagare, A. P. ja Zlokovic, B. V. (2018). Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, *14*(3), 133–150. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>
- Zhong, W., Myers, J. S., Wang, F., ... Rejto, P. A. (2020). Comparison of the molecular and cellular phenotypes of common mouse syngeneic models with human tumors. *BMC Genomics*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6344-3>
- Zong, H., Parada, L. F. ja Baker, S. J. (2015). Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(5), a020610. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020610>
- Tan, A. C., Ashley, D. M., López, G. Y., Malinzak, M., Friedman, H. S. ja Khasraw, M. (2020). Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA a Cancer Journal for Clinicians*, *70*(4), 299–312. <https://doi.org/10.3322/caac.21613>
- Teesalu, T., Sugahara, K. N., Kotamraju, V. R. ja Ruoslahti, E. (2009). C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(38), 16157–16162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908201106>

- Teesalu, T., Sugahara, K. N. ja Ruoslahti, E. (2013). Tumor-Penetrating peptides. *Frontiers in Oncology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00216>
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S. ja Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and Molecular Prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 23(10), 1985–1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-14-0275>
- Tikunova, N. ja Morozova, V. (2009). *Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3347532/>
- Tinkle, S., McNeil, S. E., Mühlebach, S., Bawa, R., Borchard, G., Barenholz, Y., Tamarkin, L. ja Desai, N. (2014). Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1313(1), 35–56. <https://doi.org/10.1111/nyas.12403>
- Tratar, U. L., Horvat, S. ja Cemazar, M. (2018). Transgenic mouse models in cancer research. *Frontiers in Oncology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00268>
- Valenzuela-Fuenzalida, J. J., Moyano-Valarezo, L., Silva-Bravo, V., ... Gutiérrez Espinoza, H. (2024). Association between the Anatomical Location of Glioblastoma and Its Evaluation with Clinical Considerations: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Medicine*, 13(12), 3460. <https://doi.org/10.3390/jcm13123460>
- Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A. ja Zweck, A. (2006). The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1211–1217. <https://doi.org/10.1038/nbt1006-1211>
- Wang, S., Lai, X., Deng, Y. ja Song, Y. (2019). Correlation between mouse age and human age in anti-tumor research: Significance and method establishment. *Life Sciences*, 242, 117242. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117242>

- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., . . . Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520–562. <https://doi.org/10.1038/nature01262>
- Webster, T. J. (2006). Nanomedicine: what's in a definition? *International Journal of Nanomedicine*, 1(2), 115–116. <https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.2.115>
- Wu, S., Tsai, C., Huang, Y. ja Hynynen, K. (2020). Focused Ultrasound and Microbubbles-Mediated drug delivery to brain tumor. *Pharmaceutics*, 13(1), 15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010015>
- Yayon, A., Aviezer, D., Safran, M., Gross, J. L., Heldman, Y., Cabilly, S., Givol, D. ja Katchalski-Katzir, E. (1993). Isolation of peptides that inhibit binding of basic fibroblast growth factor to its receptor from a random phage-epitope library. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(22), 10643–10647. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10643>
- Yetisgin, A. A., Cetinel, S., Zuvin, M., Kosar, A. ja Kutlu, O. (2020). Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. *Molecules*, 25(9), 2193. <https://doi.org/10.3390/molecules25092193>
- Yue, H., Li, Y., Yang, M. ja Mao, C. (2021). T7 Phage as an Emerging Nanobiomaterial with Genetically Tunable Target Specificity. *Advanced Science*, 9(4). <https://doi.org/10.1002/advs.202103645>

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

BioRender. Kasutatud 28.04.2025 <https://BioRender.com>

Leibniz Institute DSMZ: details. (i.a.). Kasutatud 01.02.2025
<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-880>

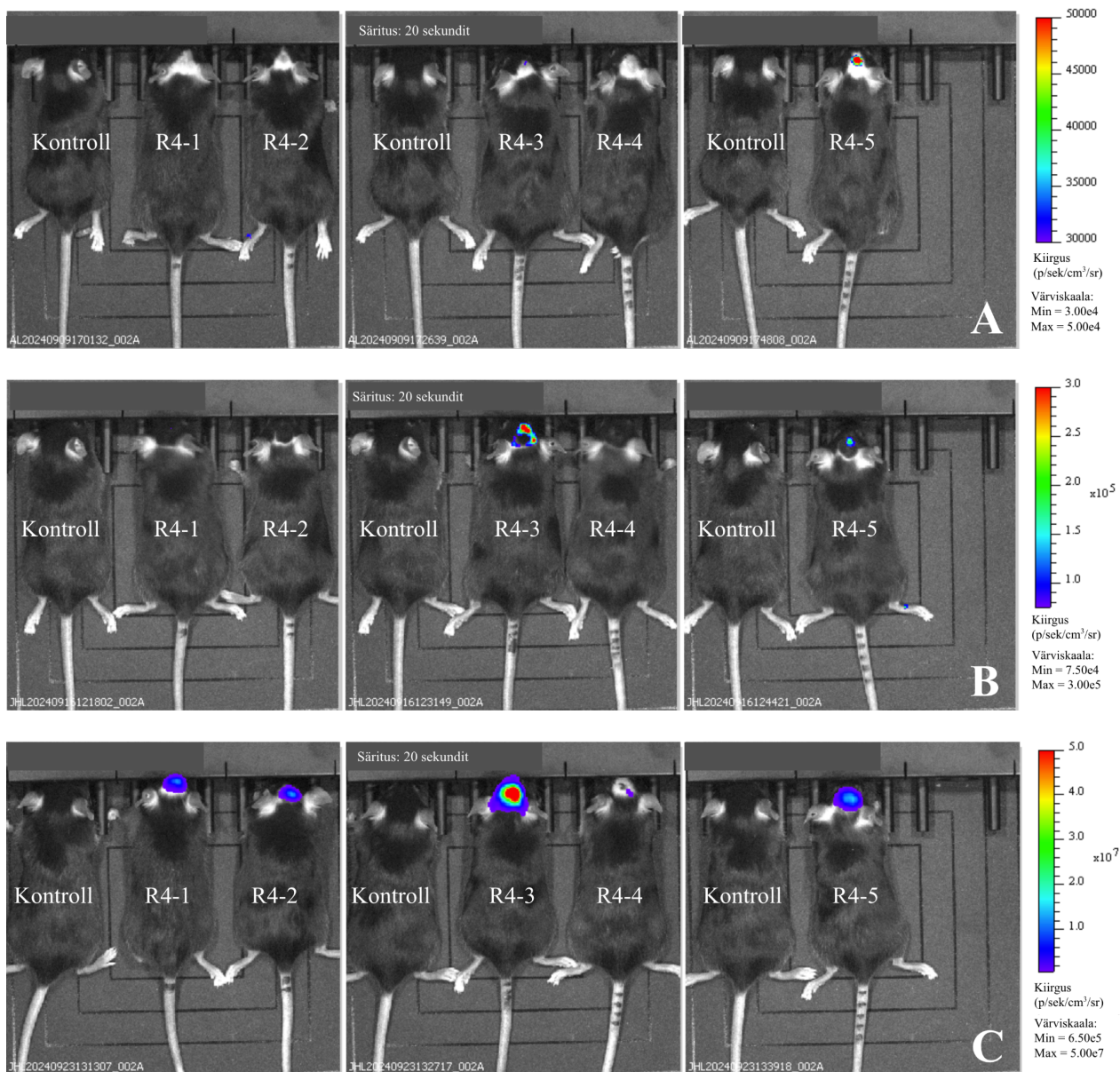
Metastatic brain tumors. (2021). Johns Hopkins Medicine. Kasutatud 15.01.2025
<https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/metastatic-brain-tumors>

Types of brain tumours. (i.a.). Cancer Research UK. Kasutatud 13.02.2025
<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/brain-tumours/types>

T7Select® phage display system, Novagen® | Cloning Kits and Ligation. (i.a.). Kasutatud 12.05.2025
<https://www.avantorsciences.com/ni/en/product/20924197/t7select-phage-display-system-novagen>

LISAD

LISA 1. Neljanda tsükli hiirte kasvaja areng IVIS kuvamissüsteemiga iga nädal eraldi grupeerituna. A) Esimene nädal, B) teine nädal ja C) kolmas nädal peale kasvajarakkude süstimist.



LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kleer Siigur

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose „Kasvajaselektiivsete kullerpeptiidide identifitseerimine glioblastoomi loommudelites”, mille juhendajad on PhD Tambet Teesalu, MSc Jorgen Holm ja knd Juhan Sedman, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kleer Siigur

25.05.2025