

BIOMEDITSIINILISED UURINGUD KEEMILISE JA BIOLOOGILISE FÜÜSIKA INSTITUUDIS

Priit Kogerman, Valdur Saks

Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut

Biomeditsiiniliste uuringutega on Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudis (KBFI) tegeldud instituudi algusaegadest saadik. 1979. aastal avastati biokeemia laboratooriumis (Küberneetika Instituut, 1980. aastast KBFI) Kesk-Aasia madude mürkides närvikasvufaktor. Uuringud said laiema haarde pärast seda, kui molekulaargeneetika labori asutaja Mart Saarma tõi umbes 20 aastat tagasi Šveitsist Eestisse tollal väga uudse monoklonaalsete antikehade valmistamise tehnoloogia ja sügava huvi biomeditsiiniliste, eriti neurobioloogiliste uuringute vastu. KBFI molekulaargeneetika laboratoorium on siiani KBFI suurima isikkoosseisuga laboratoorium, kus muuhulgas tegeldakse intensiivselt ka biomeditsiiniliste uuringutega.

2004. a. täitus 20 aastat sellest, kui meie labor kolis oma praegusesse laborihoonesse Mustamäel. Käesolev artikkel annab väikese ülevaate biomeditsiiniliste uuringute arengust meie Instituudis läbi selle ajaloo, pöörates erilist tähelepanu viimase viie aasta arengutele.

MEIE EVALVATSIOONID, TUNNUSTUSED, GRANDID

2000. aastal läbi viidud molekulaarbioloogia evalvatsioonil said meie biomeditsiini alal tegelevad uurimisrühmad ja laborid (kasvajate bioloogia, neurobioloogia uurimisrühmad, bioenergeetika labor) *hea* hinde märkusega, et paremas uurimistöös keskkonnas oluks meil realistlik saavutada *väga hea* tulemus. Nii molekulaargeneetika kui bioorgaanilise keemia laborite üldist taset hinnati hindega *rahuldav*. Pärast evalvatsiooni viisime läbi ekspertide poolt soovitatud struktuursed muutused ja sellele järgnenud kõigi teadusalade Eesti tippkeskuste evalvatsioonil said biomeditsiini alal tegutsevad uurimisrühmad Analüütilise Spektroskoopia Tippkeskuse koosseisus juba hindeks *väljapaistev*. Meie viimase aja tunnustustest väärib märkimist Vabariigi Presidendi I noore teadlase preemia, Howard Hughesi Meditsiiniinstituudi (HHMI) Rahvusvaheline Uurimisstipendium (2001) ja kaks pres-

tižset Wellcome Trusti rahvusvahelist vanemuurija granti (2002) kasvajate bioloogia ja neurobioloogia uurimisrühmadele. Koostöös mitme partneriga kodu- ja välismaal osutus meie vähiuuringute keskus 2004. aastal edukaks ka Ettevõtluse Arendamise Sihtasutuse tehnoloogia arenduskeskuste konkursil. Nende ja muude grantide toel on osutunud võimalikuks meie infrastruktuuri oluline parandamine, kus suuremaks saavutuseks on moodsa, Euroopa Liidu nõuetele vastava transgeensete loomade vivaariumi hiljutine valmimine.

NEUROBIOLOOGIA I: AVANEV MAAILM

Meie labori väga edukas neurobioloogia uurimisuuna areng aeglustus iseseisvuse taastamisel mitmeks aastaks. Juba "perestroika" aegadel lahkusid end pikaajaliselt välismaa tipplaborites täiendama mitu tugevat tegijat, näiteks Toomas Neuman ja Madis Metsis. 1990. aastal valiti Helsingi Biotehnoloogia Instituudi direktoriks molekulaargeneetika labori asutaja Mart Saarma, kellega koos läks mitu tugevat kaastöötajat. Algul Helsingisse, hiljem Stockholmi suundus ka Tõnis Timmusk.

Molekulaargeneetika laboratooriumi esimeseks juhatajaks oli Mart Saarma, seejärel lühiajaliselt geneetik Rando Allikmets, kes lahkus peagi Ameerikasse ja nüüd on Columbia Ülikooli professor. Labori järgmiseks juhatajaks sai mitte kauaks välja paistev fermentatsiooni protsesside – metaboolmika uurija, praegune Tallinna Tehnikaülikooli biotehnoloogia professor Raivo Vilu. Seejärel sai labori juhiks dr Merike Kelve, kelle biomeditsiiniga seonduvatest uuringutest väärib märkimist kaasasündinud immuunsuses olulise 2'-5'A süsteemi uurimine.

Praegused uuringud keskenduvad süsteemi väljaarenemise evolutsioonilistele aspektidele ja võimalikele biotehnoloogilistele rakendustele. Bioorgaanilise keemia laboratooriumis on madude mürgist eraldatud ja iseloomustatud vere hüübimist mõjutavaid komponente: nii koagulante kui antikoagulante. Ve-

re faktor X aktivaator ja faktor V aktivaator on kasutatavad meditsiinilises diagnostikas, fibrinolüütiline ensüüm lebetaas lagundab efektiivselt trombi ja takistab trombotsüütide agregatsiooni.

SÜDAMELIHASE ENERGEETIKA

Kui 1980ndate aastate lõpul/90ndate algul lahkus teadlasi instituudist, siis natuke hiljem toimus ka vastupidiseid liikumisi. 1993. aastal tuli Moskva Kardioloogia Teaduslikust Uurimiskeskusest KBFIsse tööle professor Valdur Saks ja alguse sai KBFI bioenergeetika laboratoorium. 1997. aastal siirdus V. Saks Grenoble'i Ülikooli Prantsusmaal, kus ta rajas ja asus juhtima struktuurse ja kvantitatiivse bioenergeetika uurimisgruppi. Samal ajal säilis KBFIis väike efektiivselt töötav bioenergeetika labor, kus professor Saksa üldisel juhtimisel ja vanemteadur Peeter Siku eestvedamisel arendatakse uuringuid edasi. Koostöös Grenoble'i Ülikooli, Tartu Ülikooli arstiteaduskonna ja Tallinna Tehnikaülikooli Küberneetika Instituudiga moodustus uus rahvusvaheline efektiivselt töötav laboratooriumide rühmitus, kus jätkatakse uurimisgruppide poolt avastatud südamelihase energeetilise ühiku täpsemat iseloomustamist. Rühmituse kõrge produktiivsuse tunnuseks on vähemalt 10 publikatsiooni aastas rahvusvahelistes ajakirjades – *Am. J. Physiol, Biophysical Journal* jne.

Uuringute tulemusel on näidanud, et südame ja teiste oksüdatiivsete lihasrakkude struktuuril on oluline roll aine- ja energia vahetusprotsesside regulatsioonis. Tsütoskeleti ja raku organellide vastastikuse interaktsiooni tulemusel omab raku energeetika unitaarset struktuuri, põhinedes energeetiliste ühikute regulaarsele ülesehitusele rakus. Siit järgnevad uued regulatsioonimehhanismid – metaboolne kanalisatsioon, funktsionaalne konjugeeritus jt, mille kvantitatiivseks kirjelduseks on välja töötatud ja arendatakse vastavaid matemaatilisi mudeleid. Neid uudseid mehhanisme uuritakse, kasutades kaasaegseid biofüüsikalisi meetodeid, nagu konfokaalne mikroskoopia + fluorestsentsresonants energiaülekanne jne.

Üheks põhiliseks uurimisprobleemiks on ka lihasrakkude proteoomika, et välja selgitada, millised valgud vastutavad energeetiliste ühikute struktuuri moodustamise eest. See osa tööst viiakse põhiliselt läbi Eestis. Nende ühikute struktuuri ja funktsiooni muutused on tihti patoloogia tekkemehhanismide põhilised komponendid, mistõttu nende ühikute

muutuste uurimine on otseselt seotud biomeditsiini probleemidega.

GEENITEHNOLOOGIA KOOLITUS TALLINNA TEHNIKAÜLIKOO LIS

Kuna 1990ndate aastate keskel osutus suureks probleemiks noorte inimeste kaasamine instituudi töösse, siis eelkõige taimemolekulaarbioloog Erkki Truve initsiatiivil ja KBFI molekulaargeneetika laboratooriumi baasil asutati 1997. aastal Tallinna Tehnikaülikooli juurde geenitehnoloogia keskus, mis asus tegelema geenitehnoloogide väljaõpetamisega nii bakalaureuse-, magistri- kui doktoriõppe tasemel. Esimesteks professoriteks said lisaks E. Truvele M. Metsis ja M. Saarma. Õppetöö TTÜs tagas kvaliteetse spetsialistide juurdekasvu. Molekulaargeneetika labori baasil asutatud TTÜ geenitehnoloogia keskusest on tänaseks välja kasvanud TTÜ matemaatika-loodusteaduskonna geenitehnoloogia instituut.

KASVAJATE BIOLOOGIA

Kasvajate bioloogia uurimisgrupi tegevus käivitus Innovatsioonifondi projektiga KBFI 1998. aastal. Kuna esialgu olid grupi vahendid piiratud, jätkas P. Kogerman mõnda aega paralleelselt ka Karolinska Instituudi assistentprofessorina, mis võimaldas kaasata uuringute läbiviimiseks lisavahendeid. Uurimisgrupi rahastamises tekkis läbimurre 2001. aastal, kui P. Kogermanil õnnestus saada HHMI Rahvusvaheline uurimisstipendium. Samal aastal valiti P. Kogerman molekulaargeneetika laboratooriumi juhatajaks ja ta võttis üle ka sihtfinantseeritava teema juhtimise. Grupi olukord paranes veelgi 2002. aastal *Wellcome Trusti* vanemuurija grandii saamisega.

Meie kasvajate bioloogia alased uuringud keskenduvad peamiselt nii embrüogeneesis kui tuumorite geneesis olulise *hedgehog-patched-gli* signaaliraja ning kasvajate tekkes olulise angiogeneesi uurimisele. Viimase viie aasta (2000–2004) uuringute tähtsamad tulemused on järgmised:

- Iseloomustati kinaasi DYRK1 GLI1 fosforülevivat aktiivsust, mille tulemusena muidu tuuma ja tsütoplasma vahel aktiivselt transporditav transkriptsioonifaktor GLI1 muutub eelkõige tuumas lokaliseeruvaks valguks, mille transkriptsiooniline aktiivsus on kõrgenenud (P. Kogerman, P., Michelson, koostöös Connecticuti Ülikooli (USA) ja Karolinska Instituudi (Rootsi) teadlastega).

- Iseloomustati detailselt onkovaalk GLII ja tuumorsupressorvaik SUFUH interaktsioone. Tehti kindlaks aminohapped GLIIs, mis on vajalikud SUFUHga seostumiseks. Muteeriti need aminohapped ja näidati, et selliselt muteeritud GLII aktiivsust ei suuda SUFUH mõjutada (P. Kogerman, P. Michelson, koostöös Karolinska Instituudiga).
- Lokaliseeriti täpsemalt CD44 valgu angiogeneesi inhibeeriva ning metalloproteaaasi MMP9 seostav osa. Esialgsed tulemused viitavad 40 aminohappelisele regioonile, mis võiks olla piisav angiogeneesi inhibitsiooniks. Näidati, et MMP9 seostub samasse kohta CD44s kui hüaluroonhape. Alustati CD44 märklauda otsinguid endoteelirakkudel (L. Kasak, T. Päll, W. Anderson).
- Iseloomustati CYLD tuumorsupressorvalgu rolli NFκB signaalirajas ja SHH-PTCH signaalirajas. Näidati, et CYLD inhibeerib NFκB rada seostumise teel TRIP valguga. SHH-GLI rajad on oluline seostumine SUFUH valguga (P. Kogerman, L. Kogerman, koostöös Lausanne'i Ülikooli (Šveits) ja Karolinska Instituudi teadlastega).
- Analüüsiti detailselt PTCH1 geeni promotorit ja selle regulatsiooni. Näidati, et kolmest PTCH1 promotorigest on SHH-GLI raja poolt reguleeritav vaid 1B promotorige. (P. Kogerman, koostöös Karolinska Instituudi teadlastega).
- Iseloomustati GLI2 geeni ekspressiooni ja struktuuri. Näidati, et GLI2-1 on väga spetsiifiline ekspressioonimuster nii täiskasvanud hiires ja inimeses kui ka hiire lootes. Iseloomustati GLI2 geeni struktuuri nii hiires kui inimeses. Uuriti GLI2 proteolüütilist lõhustamist. Alustati GLI2-repressori *knockin-konstrukti* disaini (E. Valdre, O. Njunkova, I. Pata, P. Kotka, koostöös M. Speegiga TTÜst).
- Optimeeriti fermentatsioonitehnoloogiat vähivastaste potentsiaali omavate rekombinantsete valkude ekspressiooniks. Ekspresseeritud valkude hulka kuuluvad CD44, GLI3, SKI (M. Drews, L. Kasak, R. Tsanev).
- Alustati GLI valkude struktuuriuuringuid. Töötati välja ja rakendati meetodid polüpeptiidide ekspressiooniks ja märgistamiseks struktuuriuuringuteks. Identifitseeriti ja uuriti GLI3 repressioonidomeeni uudeid interaktoreid (K. Vanatalu, K. Tomson, P. Tiigimägi, R. Tsanev).
- Leiti uus meetod geeniülekanne efektiivsemaks muutmiseks, et seda oleks võimalik rakendada vähktõve geeniteraapias. Meetod seisneb transportpeptiidi TP10 kovalentses sidumises polüetüleenimiinile (A. Meikas, A. Valkna, P. Kogerman, Innovatsioonifondi projekti edasiarendus koostöös Stockholmi Ülikooli ja Karolinska Instituudi teadlastega).
- Alustati uut projekti, mille eesmärgiks on töötada välja taimeviirustel põhinev süsteem vähivastaste vaktsiinide saamiseks. Saadi Kartuliviiruse A täispikad infektsioonilised kloonid. On alustatud vähispetsiifiliste epitoopide valikut kloonimiseks PVA katevalgu geeni järjestusse (R. Hunt, V. Paalme, L. Järvekülg).
- Angiogeneesi projekti raames alustati koostööd Jüri Siiguri juhitava bioorgaanilise keemia laboriga, kelle poolt eraldatud maomürkide komponentidest omab mitu tugevat angiogeneesivastast toimet.

Meie töödest on inimkonnale ja Eesti ühiskonnale kasu ainult juhul, kui nende tulemusi õnnestub rakendada ka meditsiini praktikasse. Seega on teadustulemuste rakendamise seisukohalt olulisel kohal koostöö biotehnoloogia firmadega.

NEUROBIOLOOGIA II: TAGASI KODUS

Vahepeal takerdunud neurobioloogia uurimissuund hakkas uuesti arenema 1996. aastal, kui esimese HHMI rahvusvahelise uurimisstipendiumi tõi instituuti M. Metsis. 2002. aasta sügisel asus neurobioloogia uurimisrühma juhtima professor Tõnis Timmusk, kes on väga lühikese ajaga suutnud kaasata olulisi finantsvahendeid (*Wellcome Trusti* grant jne) ning üles ehitada suure ja hästi toimiva neurobioloogia uurimisrühma. Tema rahvusvaheliselt tuntud uuringud jätkavad juba M. Saarma poolt alustatud töid neurotrofiinide rollide selgitamisel närvisüsteemi arengus ja patoloogias. Koostöös Elena Cattaneo uurimisrühmaga Milanos on T. Timmusk viimasel ajal teinud olulisi avastusi neurotrofiini BDNF rolli tuvastamisel Huntingtoni tõve tekkes. Huntingtoni tõbi on pärilik neurodegeneratiivne haigus, mille korral on ekspandeerunud konserveerunud polüglutamiini kordusjärjestus, ja kuulub laiemasse polüglutamiiniga seotud neurodegeneratiivsete haiguste klassi. Timmuski, Cattaneo ja kaastöötajate avastus seisneb selles, et mutantne Huntingtin toimib läbi aju neurotroofse faktori (*Brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) regulatsiooni.

See avastus tõstab uuele tasemele meie arusaamise Huntingtoni tõve tekke molekulaarsetest põhjustest ja avab uusi väljavaateid selle neurodegeneratiivse haiguse teraapiaks.

Viimase aja arenguteks biomeditsiini alal on olnud reaalse teaduskoostöö tekkimine meie instituudi keemilise füüsika laboratooriumiga Analüütilise Spektromeetria Tippkeskuse raames, mis võimaldab kasutusele võtta erinevaid spektroskoopia meetodeid. Bioloogiliste ainete mass-spektroskoopia (MALDI-TOF MS, perspektiivis ka LC-MS/MS), tahke keha tuumamagnetresonants-spektromeetria krüogeenilistel temperatuuridel ning väikeloomade magnetresonantskuvamine (*magnetic resonance imaging*, MRI) annavad võimaluse väga originaalsete biomeditsiiniliste uuringute teostamiseks nii molekulaarsel kui funktsionaalsel tasemel.

Arstiharidusega vanemteadur Eola Valdre eestvedamisel oleme tihendamas oma koostööd ka Tallinna haiglatega (Põhja-Eesti Regionaalhaigla ja Ida-Tallinna Keskhaigla) ja näeme lähiaastatel Tallinnas moodustumas haiglate ja uurimisinstituutide koostöös tugevat biomeditsiiniliste uuringute klastrit. Samas on konkurents teadusmaailmas üha tihenev ning olemaks edukas, peame laiendama oma koostöövõrgustikku kolleegidega Tartus, Läänemere regioonis ja maailmas laiemalt. Selles näemegi meie lähiaastate ühte peamist väljakutset ja ülesannet.

KOKKUVÕTTEKS

Biomeditsiinilistel uuringutel on KBFI pikad traditsioonid. Neid uurimistöid tuleb nüüd arendada uuel tasemel, keskendudes kõige tugevamate uurimissuundade (neurobioloogia, südamelihase energaetika, kasvajate bioloogia) arendamisele nii alus- kui rakendusuringutes, rakendades läänemaailmas läbilõõnud teadlaste potentsiaali. Prioriteetideks on infrastruktuuri otsustav parandamine ja jätkuv koostöö ülikoolidega. Alusuuringutest lähtuv bioloogiliste protsesside parem mõistmine aitaks arendada uusi teraapia ja diagnostika meetodeid, mis tööstuses rakendatuna aitaks jõuda teadmispõhise majanduseni (Eesti Nokia). Edu võtmeks on siin tugevate uurimisrühmade jätkuv töö, füüsikute kaasabil arendatavad adekvaatsed analüütilised meetodid ning parima kompetentsi kaasamine nii siseriiklikus kui rahvusvahelises koostöös. Hädavajalik on seni Eestis sisuliselt puuduva bioloogiliste makromolekulide struktuuriuuringute heal tasemel käivitamine.

Tänuavaldused

Kuigi selle artikli autoritena on märgitud kaks nime, on juttu kollektiivi pikaajalisest tööst. Avaldame tänu kõigile KBFI inimestele, kes nende uuringute läbiviimisel on osalenud. Kriitiliste märkuste, kommentaaride ja täienduste eest siiras tänu M. Kelvele, M. Saarmale, A. Samosonile, J. Siigurile ja T. Timuskile.

Valitud publikatsioonid 2000–2004

Andrienko T., Kuznetsov A. V., Käämbre T., Usson Y., Orosco A., Appaix F., Tiivel T., Sikk P., Vendelin M., Margreiter R., Saks V. 2003. Metabolic consequences of functional complexes of mitochondria, myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *J. Exp. Biol.*, 206(12), 2059-2072.

Appaix F., Kuznetsov A. V., Usson Y., Kay L., Andrienko T., Olivares J., Käämbre T., Sikk P., Margreiter R., Saks, V. 2003. Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria. *Exp. Physiol.*, 88(1), 175-190.

Dunaeva M., Michelson P., Kogerman P., Toftgard R. 2003. Characterization of the physical interaction of Gli proteins with Sufu proteins. *J. Biol. Chem.*, 278(7), 5116-5122.

Ernst M., Meier M. A., Tuherm T., Samoson A., Meier B. H. 2004. Low-power high-resolution solid-state NMR of peptides and proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(15), 4764-4765.

Kaflak-Hachulska A., Samoson A., Kolodziejski W. 2003. H-1 mas and H-1 -> P-31 Cp/mas Nmr study of human bone mineral. *Calcified Tissue International*, 73(5), 476-486.

Kelve M., Kuuskalu A., Lopp A., Reintamm T. 2003. Sponge (2',5') oligoadenylate synthetase activity in the whole sponge organism and in a primary cell culture. *J. Biotechnol.*, 100(2), 177-180.

Kogerman P., Krause D., Rahnema F., Kogerman L., Uden A. B., Zaphiropoulos P. G., Toftgard R. 2002. Alternative first exons of Ptch1 are differentially regulated in vivo and may confer different functions to the Ptch1 protein. *Oncogene*, 21(39), 6007-6016.

Lemaitre V., Pike K. J., Watts A., Anupöld T., Samoson A., Smith M. E., Dupree R. 2003. New insights into the bonding arrangements of L- and D-

- glutamates from solid state O-17 Nmr. *Chem. Phys. Lett.*, 371(1-2), 91-97.
- Lopp A., Kuusksalu A., Samuel K., Kelve M. 2000. Expression and activity of 2-5a synthetase in the course of differentiation and apoptosis of Pc12 cells. *Cytokine*, 12(6), 737-741.
- Mao J. H., Maye P., Kogerman P., Tejedor F. J., Toftgard R., Xie W., Wu G. Q., Wu D. Q. 2002. Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J. Biol. Chem.*, 277(38), 35156-35161.
- Päll T., Gad A., Kasak L., Drews M., Strömblad S., Kogerman P. 2004. Recombinant CD44-HABD is a novel and potent direct angiogenesis inhibitor enforcing endothelial cell-specific growth inhibition independently of hyaluronic acid binding, *Oncogene*, 23(47), 7874-7881.
- Regamey A., Hohl D., Liu J. W., Roger T., Kogerman P., Toftgard R., Huber M. 2003. The tumor suppressor cyld interacts with trip and regulates negatively nuclear factor kappa B activation by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, 198(12), 1959-1964.
- Reintamm T., Lopp A., Kuusksalu A., Pehk T., Kelve M. 2003. Atp N-glycosidase - a novel Atp-converting activity from a marine sponge axinella polypoides. *Eur. J. Biochem.*, 270(20), 4122-4132.
- Saks V., Kuznetsov A., Andrienko T., Usson Y., Appaix F., Guerrero K., Käämbre T., Sikk P., Lemba M., Vendelin, M. 2003. Heterogeneity of Adp diffusion and regulation of respiration in cardiac cells. *Biophys. J.*, 84(5), 3436-3456.
- Saks V., Käämbre T., Sikk P., Eimre M., Orlova E., Paju K., Piirsoo A., Appaix F., Kay L., Regitz-Zagrosek V., Fleck E., Seppet, E. 2001. Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem. J.*, 356, 643-657.
- Siigur E., Aaspollu A., Siigur J. 2003. Anticoagulant serine fibrinogenases from *Vipera lebetina* venom: structure-function relationships. *Thromb. Haemost.*, 89(5), 826-831.
- Siigur E., Aaspollu A., Trummal K., Tonismagi K., Tammiste I., Kalkkinen N., Siigur J. 2004. Factor X activator from *Vipera lebetina* venom is synthesized from different genes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1702(1), 41-51.
- Siigur J., Trummal K., Tõnismägi K., Samel M., Siigur E., Vija H., Tammiste I., Subbi J. 2002. Use of Maldi-Tof mass spectrometry for specificity studies of biomedically important proteases. *Spectroscopy Int. J.*, 16(3-4), 161-170.
- Tiivel T., Kadaja L., Kuznetsov A., Käämbre T., Peet N., Sikk P., Braun U., Ventura-Clapier R., Saks V., Seppet E. 2000. Developmental changes in regulation of mitochondrial respiration by Adp and creatine in rat heart in vivo. *Mol. Cell. Biochem.*, 208(1-2), 119-128.
- Zuccato C., Tartari M., Crotti A., Goffredo D., Valenza M., Conti L., Cataudella T., Leavitt B. R., Hayden M. R., Timmusk T., Rigamonti D., Cattaneo E. 2003. Huntingtin interacts with Rest/Nrsf to modulate the transcription of Nrse-controlled neuronal genes. *Nat. Genet.*, 35(1), 76-83.