

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIAINSTITUUT

Daniel Hendrikson

Vähi antigeenide MAGE-A4 ja MAGE-A10 puhastamine ja kasutamine melanoomi biomarkeritena

Bakalaureusetöö

Juhendaja Ph.D. Reet Kurg

Tartu 2014

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus	5
1 Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Immunogeenne melanoom	6
1.2 Melanoomi antigeenid.....	6
1.3 MAGE – <i>Melanoma-associated antigens</i>	7
1.4 MAGE-A antigeenide perekond.....	8
1.5 MAGE-A antigeenide funktsioonid	9
1.6 Melanoomi biomarkerid ning prognoosimine	10
2. Töö eesmärgid.....	12
3 Metoodika ja materjalid	13
3.1 Plasmiidid, rakutüved ja söötmed	13
3.2 Kloneerimine.....	13
3.3 DNA ligeerimine	13
3.4 Geel elektroforees ja DNA puhastamine.....	13
3.5 Transformatsioon	13
3.6 Plasmiidse DNA eraldamine	14
3.7 Valgu ekspresseerimine.....	14
3.8 Rakulüsaatide tegemine.....	15
3.9 Valkude puhastamine	15
3.10 Puhastatud valkude analüüs SDS-geelelektroforeesil	15
3.11 Puhastatud valkude puhvrivahetus	15
3.12 Western blot	15
3.13 ELISA - <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	16
4 Tulemused ja arutelu	17

4.1	Ekspressioonivektorite kontrueerimine	17
4.2	Valkude ekspressioon bakteris	17
4.3	Valkude puhastamine afiinsuskromatograafiaga.....	19
4.4	Puhastatud valkude kontroll	20
4.5	Melanoomi patsientide seerumite analüüs ELISA-ga	22
	Kokkuvõte	25
	Summary	26
	Kasutatud kirjanduse loetelu	27
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	32

Kasutatud lühendid

BP	Bulloosne pemphigoid
BPAG	Bulloosse pemphigoidi antigeen
CDK	tsükliin-sõltuv kinaas
CTA	Vähi-testise antikehad
CTAB	Tsetüül trimetüülammoonium bromiid
DTT	Ditiotreitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
MAGE	Melanoomiseoselised antigeenid
MART	T-rakkude poolt äratuntud melanoomi antigeenid
MHD	MAGE homoloogia domään
Ni-NTA	nikkel-nitriilotriatsetaat
NP-40	nonüül-fenoksüülpolüetoksüületanool
SDS	naatrium dodetsüülsulfaat
SKI	Sloan-Ketteringi instituut
TBS	Tris-puhverdatud soolalahus

Sissejuhatus

Melanoom on pahaloomuline nahavähi erivorm, mis areneb välja melanotsüütidest. Seda on tihti seostatud liigse UV-kiirgusega. Melanoom algab melanoomirakkude horisontaalse levikuga mööda naha pinda ning seejärel tungivad potentsiaalse metastaasihuga melanoomirakud sügavamale naha sisse (Clark, Jr jt., 1969). Inimese organism on melanoomi vastu näidanud suurt immunoloogilist vastust ja seetõttu peetakse seda kasvajat kõige immunogeensemaks. Seetõttu otsitakse biomarkereid, mis võimaldaks melanoomi avastada varajases staadiumis.

Seoses melanoomiseoseliste antigeenide (MAGE) struktuurilise varieeruvuse, erineva kromosomaalse asukoha ning koespetsiifilise avaldumisega on MAGE antigeenid jagatud kahte suurde gruppi: MAGE-I ja MAGE-II. Mõlema grupi antigeenid asuvad X-kromosoomis ning neid on kokku üle 60 (De Plaen jt., 1994).

MAGE-A antigeenid, mis kuuluvad MAGE-I gruppi, asuvad Xq28 regioonis. Need on tavaliselt ekspresseeritud erinevates vähkkasvajates, kaasa arvatud rinna-, kopsu-, ja nahavähis. Kuigi üksikute MAGE-A geenide funktsioonidest rakus pole väga palju teada, on nad rangelt kasvajaspetsiifilised ning seeläbi väga heaks märklauaks vähkkasvajate immunoteraapias (Simpson jt., 2005; Sang jt., 2011; Scanlan jt., 2002)

Käesolevas töös antakse lühike ülevaade melanoomist ja tema antigeenidest. Täpsemalt tutvustatakse MAGE-A antigeenide gruppi koos nende oletatavate funktsioonidega ja testitakse auto-antikehade esinemist kahe melanoomi antigeeni vastu ELISA analüüsiga. Bakalaureusetöö eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

Märksõnad: melanoom, antigeen, MAGE-A, auto-antikeha

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Immunogeenne melanoom

Pahaloomuline melanoomivorm on väga suure metastaasiohu ning väikese elulemusega nahavähi tüüp (Bello jt., 2013). Melanoomi progressi *in situ* kuni metastaasilise tüübini on kliinilistel ja patoloogilistel tingimustel palju kirjeldatud. Rakujagunemise puhul tähtsate geenide geneetilised muudatused, rakkude diferentseerumine ning invasioon ja angiogenees on vajalikud, et tavalisest melanotsüüdist tekiks metastaasiline melanoom (Haluska jt., 1998). Melanoomi arengul on eristatud kaks kasvufaasi: horisontaalne ja vertikaalne. Suurem osa melanoome algab horisontaalse kasvufaasiga, millega kaasneb melanoomirakkude horisontaalne levik epidermises mööda naha pinda. Histoloogiliste uuringute ajal on tihti täheldatud, et nahas olevate T-lümfotsüütide sekkumisel võib kasvaja osaliselt regresseeruda horisontaalses kasvufaasis (Clark, Jr. jt., 1969). Horisontaalsele kasvufaasile järgneb vertikaalne faas, kus metastaasiohuga melanoomirakud tungivad sügavamale naha kihtidesse. Kui horisontaalses faasis ründasid dermaalsed lümfotsüüdid melanoomirakke sagedasti, siis vertikaalse faasi ajal on sellist infiltrerimist täheldatud üsna harva (10-20% kõigist juhtumitest). Lümfotsüütide infiltratsiooni olemasolu vertikaalse faasi ajal on seotud inimese parema elulemusega võitluses melanoomi vastu. Vähenenud on ka melanoomiga seotud metastaasijuhtumid (Clark, Jr. jt., 1989; Clemente jt., 1996). Mõnedel üksikutel juhtudel on laialdaselt levinud melanoom teinud läbi spontaanse taandumise. Patoloogilised uuringud on näidanud, et kasvaja taandumise põhjustas lümfotsüütide, plasmarakkude ja makrofaagide infiltratsioon haiguse koldesse (Bulkley jt., 1975). Idee, et melanoom on immunogeenne kasvaja, on saanud palju toetust. Laboratoorsete uuringute katsed on näidanud, et **a**) haiguse koldesse infiltrerivad lümfotsüüdid on peamiselt α/β T-rakud; **b**) regresseeruvad melanoomid toovad tõendeid T-rakkude klonaaalsest amplifikatsioonist, *in situ*; **c**) regresseeruvatest melanoomidest isoleeritud T-rakud näitavad autoloogsete melanoomide vastu üles tsütoloogilist aktiivsust (Mackensen jt., 1993, 1994; Ferradini jt., 1993).

1.2 Melanoomi antigeenid

Inimese immuunsüsteem suudab ära tunda ja hävitada kasvajakasvaja. Inimese melanoomi peetakse kõige immunogeensemaks kasvajas, sest algstaadiumis olevad melanoomid võivad vahepeal täiesti spontaanselt, kas osaliselt või täielikult regresseeruda. Kuigi organism näitab melanoomi vastu suurt immunoloogilist vastust, on siiski tegemist väga ohtliku pahaloomulise kasvajaga, mida iseloomustab suur suremus. Viimastel aastatel on aktiivselt

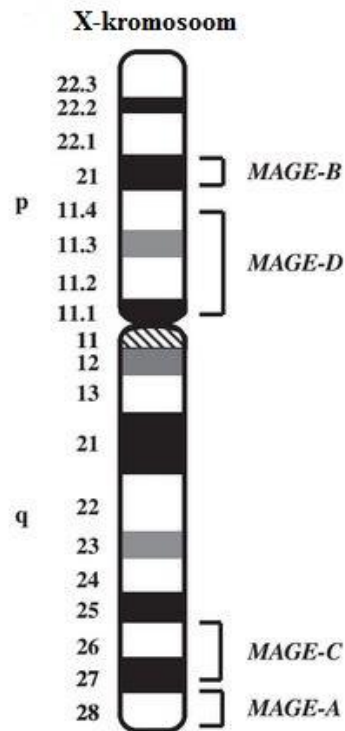
tegeletud melanoomi antigeenide otsimise ja iseloomustamisega. Autoloogsetel T-rakkudel ning antikehadel põhinevate katsete järgi võib inimese melanoomi antigeenid jagada mitmesse põhilisse klassi:

1. Melaniini sünteesivad antigeenid: nt türosinaas (Brichard jt., 1993), gp100/PMEL (Kawakami jt., 1995), MART-1/Melan-A (Kawakami jt., 1994; Coulie jt., 1994).
2. Vähi-testise (CTA) antigeenid: nt MAGE perekond (Van Den Bruggen jt., 1991) ja NY-ESO-1 (Chen jt., 1997).
3. Tavalised valgud, millel on mõni väike antigeenne mutatsioon, näiteks kodeerimisjärjestuses: CDK4 (Wolfel jt., 1995), β -kateniin (Robbins., 1996).
4. Antikehad, mis on identifitseeritud monoklonaalsete antikehadega: gangliosiidid (Irie jt., 1986; Livingston jt., 1987)

1.3 MAGE – *Melanoma-associated antigens*

Esimesed melanoomiseoselised antigeenid kirjeldati 1991. aastal, mil melanoomipatsientidelt võetud proove seostati kasvajaseoseliste antigeenidega (Van der Bruggen jt., 1991). Seoses melanoomiseoseliste antigeenide (MAGE) struktuurilise varieeruvuse, erineva kromosomaalse asukoha ning koespetsiifilise avaldumisega on MAGE antigeenid jagatud kahte suurde gruppi: MAGE-I ja MAGE-II.

MAGE-I on nn vähi-testise (CTA) antigeenid. Nad on oma nime saanud neile tüüpilise avaldumise järgi vähirakkudes, aga tavalistes kudedes on nende ekspressioon piiratud testistega (Van Den Bruggen jt., 1991). Nende ekspressioon on arengu käigus allasurutud promootori DNA metülatsiooniga. MAGE I geenide promootorid demetüleeruvad epigeneetilise reprogrammeerumise käigus. Promootorite demetüleerimine tagab nende ekspressiooni kasvaja rakkudes (Simpson jt., 2005). MAGE-I grupp koosneb perekondadest MAGE-A, MAGE-B ja MAGE-C. Kõik nende perekondade antigeenid asuvad inimese X-kromosoomis (joonis 1) (De Plaen jt., 1994): MAGE-A perekonna asukoht on Xq28 regioonis (De Plaen jt., 1994; Rogner jt., 1995). MAGE-B antigeenid on leitavad Xp21 regioonis (Dabovic jt., 1995; Lurquin jt., 1997; Muscatelli jt., 1995) ning MAGE-C Xq26-27 regioonis (Lucas jt., 1998, 2000). Kui pseudogeene välja jätta (MAGE-A7), siis on MAGE-I grupis kokku 24 antigeeni, millest 11 on MAGE-A perekonnas (MAGE-A1-12), 9 tükki MAGE-B perekonnas ning 4 MAGE-C omas.



Joonis 1. MAGE-I antigeenide asukohad inimese X-kromosoomis. (Pilt: Sang jt., 2011)

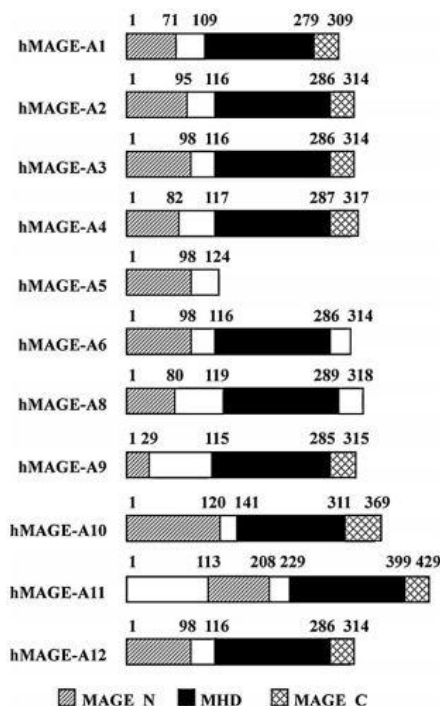
MAGE-II grupi antigeenid pole erinevalt MAGE-I grupist sugugi vähkkasvajatega seotud. Nende hulka kuulub perekond MAGE-D. Nende levik pole organismis piiratud, vaid nad on avaldatud paljudes normaalsetes organismi kudedes (Chomez jt., 2001). MAGE-D perekonna geenid asuvad ka organismi X-kromosoomis nagu ka melanoomiseoselistel antigeenidel, aga p11.1-11.4 regioonis. Praeguseks on kokku identifitseeritud üle 60 MAGE antigeeni.

MAGE valkude ekspressiooni on leitud paljudest vähkkasvajatest, eesotsas melanoomi ja kopsuvähiga, kus MAGE-I geenide mRNA ekspressioonisagedus on kõige kõrgem. Leitud on MAGE-I antigeene ka rinnavähis, põievähis ja eesnäärme vâhis, aga seal pole nende mRNA ekspressioonisagedus nii kõrge kui melanoomi ja kopsuvâhi korral. Kõige rohkem uuritud vähitestise antigeenid on MAGE-A perekonnas olevad antigeenid. Kuna nad on rangelt kasvajaspetsiifilised, on MAGE-A antigeenid heaks aluseks vähkkasvajate immunoteraapiaks.

1.4 MAGE-A antigeenide perekond

MAGE-A valke on suurel hulgal avaldunud erinevates vähkkasvajates, kaasa arvatud naha-, rinna-, munasarja-, põie- ja kopsuvâhis (Simpson jt., 2005; Sang jt., 2011; Scanlan jt., 2002), kuid MAGE-A ja teiste MAGE-I geenide avaldumine somaatilistes kudedes on allasurutud. Kromosoomi Xq28 regioonis paiknevate MAGE-A1-12 valkudes on üle 300 aminohappe ning nendest valkudest pärinevad peptiidid on võimelised siduma end mistahes leukotsüüdi

antigeenidega inimorganismis. Moodustunud komplekse tunnevad ära autoloogsed T-lümfotsüüdid (Sang jt., 2011). Valgujärjestuse suure sarnasuse tõttu MAGE-A perekonnaliikmete seas on raske välja töötada spetsiifilisi antikehi (Busam jt., 2000; Rimoldi jt., 2000). MAGE valkudele on iseloomulik kõrgelt konserveerunud domään nimega MAGE homoloogia domään (MHD), mis koosneb umbes 170 aminohappest. Teised regioonid, eriti N-terminus, on täiesti erinevad. MAGE-A perekonna valkudel hõlmab MHD ligi 70% valgust. Kõrge MHD konserveerumine võib viidata sarnasele struktuurile ning funktsioonile rakus (Meek jt., 2012).



Joonis 2. Inimese MAGE-A valkude skemaatiline joonis. Näidatud on MAGE NH₂ - terminaalne regioon (MAGE_N), MAGE homoloogia regioon (MHD) ja MAGE COOH-terminaalne regioon (MAGE_C). Pilt: Sang jt., 2011^B

1.5 MAGE-A antigeenide funktsioonid

MAGE-A valkude funktsioon rakus ja organismis tervikuna on senimaani jäänud suuresti tundmatuks, aga järjest rohkem koguneb tõendeid nende osaluse kohta rakutsükli regulatsioonis ja apoptoosis. MAGE-A1 käitub molekulaarsel tasandil kui transkriptsiooni inhibiitor, kui ta seostub proto-onkovalgu SKI-ga ja tuues kohale histoonide deatsetülaase (Laduron jt., 2004). Morishima jt. (2002) näitasid, et MAGE-A3 valgu ekspressioon võib kaitsta vähirakke, kui nende rakusiseseid organeid rünnatakse. MAGE-A11 suurendab androgeeni retseptori transkriptsioonilist aktiivsust, kui see seostub androgeeni retseptori

NH₂-terminusega (Bai jt., 2005). Samuti soodustab MAGE-A11 suurenenud ekspressioon eesnäärmevähi teket androgeeni retseptor-sõltuva kasvaja kasvuga (Bai jt., 2008). Hiljutised publikatsioonid on näidanud, et mõned MAGE-A liikmetest (MAGE-A1, -A2, -A3, -A6) on võimeline alla suruma p53 transaktivatsiooni. Monte jt. (2006) näitasid, et MAGE-A2 on näiteks selline antigeen. MAGE-A2 on võimeline p53-ga füüsiliselt seonduma ning kutsuma transkriptsiooni repressori histooni deatsetülaasi 3 MAGE/p53 kompleksi. Tulemuseks on valgu p53 transkriptsioonilise aktiivsuse inhibitsioon. Ülaltoodud MAGE-A valkude funktsioonid viitavad nende sarnastele omadustele onkovalkudega.

Kontrastiks eelnevale võib MAGE-A4 valk seonduda onkovalgule p28GANK. Seostudes sellega, inhibeerib MAGE-A4 selle kartsinoomse efekti (Nagao jt., 2003). Bandić jt. (2006) uurisid, et MAGE-A4 positiivsetel patsientidel oli palju suurem elulemus kui MAGE-A4 negatiivsetel patsientidel. MAGE-A valkude bioloogiliste funktsioonide kohta on ülaltoodud puuduliku info põhjal raske lõplikke järeldusi tuua.

1.6 Melanoomi biomarkerid ning prognoosimine

Varajane vähkhaiguste sh melanoomi diagnoosimine suurendab märkismisväärselt patsientide elulemust. Viimastel aastatel on palju vaeva nähtud kasvajamarkerite uuringutega, mis võimaldaksid varajase diagnoosi määramist patsiendile. On leitud mitmeid melanoomi kasvajamarkereid, näiteks gp100, MART-1 ja türosinaas, mis on välja pakutud immunoteraapiaks (Bossert 2006; Gould Rothberg jt., 2009; Ohsie jt., 2008). Shimbo jt. (2010) uurisid kasvajate antigeene ning nende auto-antikehi ja identifitseerisid bulloosse ehk villilise *pemphigoidi* antigeeni 1 (BPAG1). Melanoomi antigeeni määrati BPAG1 auto-antikehade järgi. Auto-antikehad BPAG1 vastu on detekteeritavad inimese vereseerumis ning BPAG1 võib olla suuresti immunogeenne valk. 55 anonüümselt melanoomi patsiendilt võetud proovidest andis positiivse vastuse BPAG1 auto-antikehade vastu 13 patsienti (23.6%). Tehtud on ka analüüse uurimaks, kui suur on melanoomipatsientide humoraalne immuunvastus erinevate melanoomi antigeenide vastu võrreldes tervete inimeste tulemustega. Stockert jt. (1998) viis läbi uuringu, kus testis 127 patsiendi humoraalset immuunvastust antigeeni NY-ESO-1 vastu. Positiivse vastuse andis 9.4% proovidest. 169 tervest inimesest andis positiivse vastuse NY-ESO-1 vastu kõigest 0.6% (Maio jt., 2003; Stockert jt., 1998; Chapman jt., 2008; Nakamura jt., 2006). Samuti on testitud patsientide immuunvastust ka türosinaasi vastu. 150-st patsiendist andis positiivse tulemuse 8.7% ning 93-st kontrollproovist andis positiivse tulemuse 1.1% inimestest (Stockert jt., 1998; Huang jt.,

1998). Katsetest, kus kontrollitakse patsientide humoraalset immuunvastust MAGE-A antigeenide vastu, puuduvad publikatsioonid. Rohkemade markerite olemasolu ja nende mõistmine võimaldab tulevikus lihtsamini ja kiiremini prognoosida vähi arengut ja määrata varasemat diagnoosi, mis mõjub positiivselt patsientide elulemusele. Vähi seostuvad autoantikehi hinnatakse suurepäraseks vähi biomarkerite kandidaatideks. Nad käituvad kui biosensordid, mis on indikatiivsed arenevale kasvajale (Chatterjee jt., 2006).

2. Töö eesmärgid

Käesoleva Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi projekti eesmärk on leida melanoomi biomarkereid, mis sobiksid melanoomi varajaseks avastamiseks. Otsitakse peamiselt biomarkereid, mida saab dektekteerida vereseerumist. Kuna melanoomiga kaasneb suur MAGE-A valkude ekspressioon, siis meie ülesanne on uurida, kas patsientidel on nende vastu auto-antikehad ja kas neid saab kasutada melanoomi biomarkeritena.

Minu bakalaureusetöö eesmärgid olid järgmised:

1. MAGE-A4 ja MAGE-A10 valku ekspresseeriva vektori konstrueerimine
2. MAGE-A4 ja MAGE-A10 antigeenide ekspresseerimine bakteris
3. MAGE-A4 ja MAGE-A10 antigeenide puhastamine *His-tag*-i abil
4. ELISA analüüs puhastatud MAGE-A4 ja MAGE-A10 valkudega, kasutades melanoomihaigete patsientide vereseerumeid

3 Metoodika ja materjalid

3.1 Plasmiidid, rakutüved ja söötmed

Baktereid kasvatati Luria Bertani (LB) vedelsöötmel [pärmiekstrakt 5 g/l, trüpton 10 g/l, NaCl 10 g/l], kuhu lisati kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml, või selektiivsel LB tardsöötmel. Plasmidi paljundamiseks kasutati *E.coli* bakteritüve DH5α ning valgu ekspresseerimiseks *E.coli* tüve BL21-CodonPlus™-RP. Baktereid vedelkultuuris kasvatati 30 - 37°C loksutil ning tardsöötmed 37°C inkubaatoris.

3.2 Kloneerimine

Plasmiide pQMCF MAGE-A4 ja MAGE-A10 restrikteeriti ensüümidega NheI ja BoxI, mis jätsid vastavalt üleulatuva ja tõmbi otsa. Plasmidi pET-28a lõigati ensüümiga HindIII ja otsad sünteesiti tõmbiks DNA polümeraasi Klenowi fragmentide abil. Produkt puhastati UltraClean® 15 DNA Purification Kit-iga (Mo Bio Laboratories, Inc) ja puhastamisprotokolliks kasutati tootja poolt soovitatud protokoll. Seejärel restrikteeriti lineariseeritud pET-28a vektorit ensüümiga NheI. Kõik ensüümid olid Thermo Scientific'u toodetud ning lähtusime tootja soovitatud protokollidest.

3.3 DNA ligeerimine

DNA-d pandi omavahel ligeerima üleöö 4°C juurde. Kokku tuli teha 3 eraldi ligeerimissegu. Ligeerimiseks kasutati Thermo Scientific ensüüme ja protokoll. Ligeerimissegud sisaldasid vastavalt MAGE-A4, MAGE-A10 geene või vett (negatiivseks kontrolliks) ja lineariseeritud vektorit pET-28a.

3.4 Geel elektroforees ja DNA puhastamine

Geeliks kasutati 0.8 – 1.2% agarosi, millele lisati etiidiumbromiidi 0.5 µg/ml. Markeriks kasutati 1kb DNA Ladder-it (Thermo Scientific) ning jooksupuhvriks 1xTAE puhvrit [0.04 M Tris-atsetaat, 0.001 M EDTA]. Forees viidi läbi 100 V juures 35 minuti jooksul. Soovitud DNA-d lõigati geelist välja UV valguse käes ning puhastati UltraClean® 15 DNA Purification Kit-iga (Mo Bio Laboratories, Inc) ning nende poolt soovitatud protokolliga.

3.5 Transformatsioon

Plasmiidide paljundamiseks ja kloneerimiseks kasutati kompetentseid *E.coli* bakteritüve DH5α rakke. Rakud sulatati jääl üles ning lisati DNA ja seejärel inkubeeriti 15 minutit jääl aeg-ajalt segades. Seejärel tehti kuumašokk ja hoiti rakke 3 minutit 37°C inkubaatoris. Pärast seda inkubeeriti rakke uuesti jääl 10-15 minutit. Seejärel lisati 800 µl LB vedelsöödet ja inkubeeriti 37°C loksutil 30-45 minutit. Rakud fuugiti põhja (3000 rpm ja 5 minutit),

eemaldati supernatant ja resuspenseeriti 100 µl LB-s. Seejärel plaaditi LB tardsöötmele. Plaadid hoiti 37°C inkubaatoris üleöö.

3.6 Plasmiidse DNA eraldamine

Bakterikolooniaid kasvatati 3 ml-s LB vedelsöötmesse, kuhu lisati kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml ning lasti kasvada üleöö 37°C loksutil. Järgmisel päeval eraldati DNA keetmise teel. Üleöö kasvanud bakterirakud viidi üle 1.5 ml tuubidesse ning rakud tsentrifuugiti 4000 rpm juures 5 minutit. Seejärel eemaldati supernatant ning rakud suspenseeriti 200 µl STET puhvriss [0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5% Triton X-100 ja 1 mM EDTA (pH 8,0)], kuhu oli eelnevalt lisatud RNAaasi lõppkontsentratsiooniga 2 µg/ml. Seejärel lisati 4 µl lüsootsoomi (50 mg/ml) ja inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Järgnevalt keedeti proove 45 sekundit 100°C juures ja peale seda fuugiti rakud põhja 14 000 rpm juures 10 minutit. Sade võeti hambaorgiga tuubist välja ja supernatandile lisati 8 µl 5% CTAB-i (tsetüül trimetüülammoonium bromiid). Segati kuni sademe tekkimiseni (umbes 5 minutit) ja tsentrifuugiti (4°C) 14 000 rpm juures 5 minutit. Peale seda eemaldati supernatant ja sade lahustati 300 µl 1.2 M NaCl-is. DNA sadestati 2.5 kordse ruumala (750µl) EtOH (96%) lisamisega ning inkubeeriti 20 minutit -20°C kapis. Proovid tsentrifuugitakse (4°C) pärast seda 13 000 rpm juures 10 minutit ning eemaldatakse supernatant. Sade lahustatakse 100 µl TE-s [10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0)].

3.7 Valgu ekspresseerimine

Üleöö kasvanud bakterikultuurist tehti lahjendused LB vedelsöötmesse, nii et OD 600 nm juures oleks 0.05 – 0.1 vahel. Vedelsöötmesse lisati kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 1 mM. Lahjendatud kultuuri inkubeeriti 37°C loksutil nii kaua, kuni selle OD 600 nm juures oleks umbes 0.6 – 0.8. Seejärel tehakse kasvanud kultuurist glütseroolistockid. Selleks võetakse 500 µl kasvatatud bakterikultuuri ning lisatakse glütserooli nii, et lõppkontsentratsioon oleks 15% ja hoiustatakse -80°C juures. Need on vajalikud, et järgmistel kordadel saaks kiiremini valku ekspresseerima hakata. Järgmisena indutseeritakse rakke induktori IPTG lisamisega (lõppkontsentratsioon 1 mM) ja inkubeeritakse järgmised 2 tundi 37°C loksutil. Pärast tsentrifuugitakse bakterirakud põhja 4000 rpm juures 5 minutit. Super eraldatakse ning rakud hoiustatakse vajadusel -20°C juures. Kontrolliks tehakse SDS-geelelektroforees 12% geeliga, et kontrollida valgu ekspressiooni. Markeriks kasutatakse Unstained Protein Markerit (Thermo Scientific). Geelile kantavad proovid tuleb eelevalt segada 1:1 vahekorras 2 x Laemmli puhvriga [50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 100 mM DTT, 2 % SDS, 0,1 % broomfenool sinine, 10 % glütserool]. Forees viidi läbi 150 V juures ühe tunni jooksul.

3.8 Rakulüsaatide tegemine

Rakud suspenseeritakse NAT puhvril (kogus sõltub rakkude hulgast) [50 mM Tris (pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1% NP-40, 5% glütserool], lisatakse lüsootsoomi (50 mg/ml) 50-100 µl ning inkubeeritakse jääl 30 minutit. Rakulahust sonikeeriti Bioruptor sonikaatoriga mõni kuni mõnikümmend sekundit *high* režiimil. Lüsaat tsentrifugeeriti (4°C) 20 minutit 13 000 rpm juures. Supernatant kanti teise tuubi. Vajadusel hoiustatakse -20°C kapis.

3.9 Valkude puhastamine

MAGE-A4 ja MAGE-A10 valke puhastati Ni-Sepharose™ 6 Fast Flow (GM Healthcare) kerakestega. Kõigepealt tasakaalustati 200 µl NSK 1.2 ml natiivses sidumispuhvril [50 mM Tris (pH 8.0), 500 mM NaCl] . Tsentrifugeeritakse (4°C) 3 minutit 8000 rpm juures ja eemaldatakse supernatant ning suspenseeritakse 600 µl natiivses seondumispuhvril. MAGE-A10 lüsaadile (10 ml) lisati võrdne ruumala järgmist lahust – 50 mM Tris (pH 8.0), 500 mM NaCl ja 20 mM imidasool ning MAGE-A4 lüsaadile järgmist lahust - 50 mM Tris (pH 8.0), 500 mM NaCl ja 40 mM imidasooli ja 500 µl tasakaalustatud nikkli sefaroosikerakesi. Lüsaati koos kerakete ja imidasoolilahusega hoiti end-over-end segajal 30 – 45 minutit 4°C juures. Puhastamiseks kasutati Micro Bio-spin (Biorad) kolonne. Suspensioon kanti üle kolonnidesse ja nikkli sefaroosikerakesi pesti pesupuhvril [50 mM Tris (pH 8.0), 500 mM NaCl, 25 mM imidasool] 5 x 1 ml. Järgnevalt elueeriti kolonnides olevad valgud elueerimispuhvril [50 mM Tris (pH 8.0), 500 mM NaCl, 250 mM imidasool] 3 x 0.3 ml, mis koguti 1.5 ml tuubidesse. Eluaadid hoiustatakse -20°C kapis.

3.10 Puhastatud valkude analüüs SDS-geelelektroforeesil

Uuritavad valgud segatakse 1:1 vahekorras 2 x Laemmli puhvril ning keedetakse 10 minutit 100°C juures. Proovidest kantakse 10 µl 8-15% akrüülamiidgeelile. Forees käis tingimustel 150 V kuniks kogu broomfenoolsinine on geelist välja jooksnud. Järgnevalt pestakse geel destilleeritud veega 3 x 10 minutit loksutil, et vabaneda SDS jääkidest. Geel värvitakse Pageblue™ Protein Staining Solution (Thermo Scientific) värviliga üks tund kuni üleöö.

3.11 Puhastatud valkude puhvrivahetus

Puhvrivahetuses kasutati Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices filtreid ning nendega kaasa tulnud firma poolt soovitatud protokollil. Vahetati ära imidasooli sisaldav elueerimispuhver 50 mM Tris (pH 8.0) – 150 mM NaCl puhvril vastu.

3.12 Western blot

Valgulahustele lisati võrdne ruumala 2 x Laemmli puhvril. Proovid kanti 8-12% akrüülamiidgeelile. SDS-geelelektroforees, kus valgud lahutati moodustunud elektriväljas,

jooksis tingimustel 150 V kuniks kogu broomfenoolsinine on geelist välja jooksnud. Peale foreesi pandi geel tasakaalustuma paariks minutiks Semi-Dry [39 mM glütsiin, 48 mM Tris alus, 0,037 % SDS, 20 % etanool] puhvrise. Aksüülamiidgeelil olevad valgud kanti üle membraanile (Millipore™ Immobilon®-P Transfer Membrane; poori suurus 0.45 µm) mis tuleb eelnevalt korraks kasta metanooli, mis aktiveerib selle. Ülekandeks kasutati aparati Trans-Blot, Semi-Dry Transfer Cell 15 V 25 minuti vältel. Järgnevalt tuleb membraan blokeerida blokeerimislahuses [1 x TBS, 0.05 % Tween-20, 5% lõssipulber] 30-60 minutit toatemperatuuril. Primaarseks antikehaks kasutati rabbit anti-MAGE-A4 (H-32) või rabbit anti-MAGE-A10 (C-23) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) vastavalt MAGE-A4 või MAGE-A10 valkude detekteerimiseks. Primaarse antikehaga (1:500) inkubeeriti membraani 1 % lõssipulbrit sisaldavas lahuses [1 x TBS, 0.05 % Tween-20, 1 % lõssipulber] tund aega toatemperatuuril. Peale seda pesti membraani 3 x 10 minutit Westerni pesulahuses [50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20]. Sekundaarseks antikehaks kasutati goat anti-rabbit HRP konjugaati (LabAS Ltd., Eesti). Sekundaarse antikehaga (1:1000) inkubeeriti membraani 1 % lõssipulbrit sisaldavas TBS ja Tween-20 sisaldavas lahuses 60 minutit toatemperatuuril. Enne ilmutust pesti membraani 3 x 10 minutit Westerni pesulahusega. Antikehade signaal detekteeriti ECL™ kit-ga (GE Healthcare), kasutades tootjapoolset protkollit ja ilmutati röntgenfilmile.

3.13 ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*

ELISA-ks kasutati 96 kannuga mikrotiiterplaati (MaxiSorp, Nunc), kuhu pipeteeriti igasse kannu 100 µl rekombinantse valgu lahust [2-3 µg/µl rekombinantne valk, PBS puhver]. Plaat seisab üleöö 4°C juures. Järgnevalt tuleb kannud pesta 3 korda 200 µl PBS-0.1% Tween-20-ga ning seejärel blokkida need 200 µl 2% BSA PBS-0.1% Tween-20 lahuses 30 minutit toatemperatuuril segajal (Titertek, kiirus 3-4). Seejärel tuleb kannud taaskord pesta ning lisada 100 µl soovitud kontsentratsiooniga seerumi lahust PBS-0.1% Tween-20-s ja inkubeerida 1 tund segajal toatemperatuuril. Sellel järgneb taaskord 3 korda pesu ning 45-minutiline segajal inkubeerimine 100 µl sekundaarse antikehaga anti-human HRP konjugaadiga (Zymax/Invitrogen) lahjendusega 1:5000 PBS-0.1% Tween-20-s. Kuna sekundaarne antikeha on väga tundlik, siis tuleb kannud pesta seekord 4 korda samas pesulahuses. Edasi järgneb ilmutusprotsess, kus kannudesse pipeteeritakse 100 µl peroksüdaasi ilmutuslahust (BioPanda Diagnostics) ja lastakse laua peal seista 10-15 minutit ja seejärel lõpetatakse reaktsioon 50 µl 0.5 M H₂SO₄ lisamisega. Plaat loetakse sisse ELISA Readeriga (Tecan) 450 nm juures.

4 Tulemused ja arutleu

4.1 Ekspressioonivektorite konstrueerimine

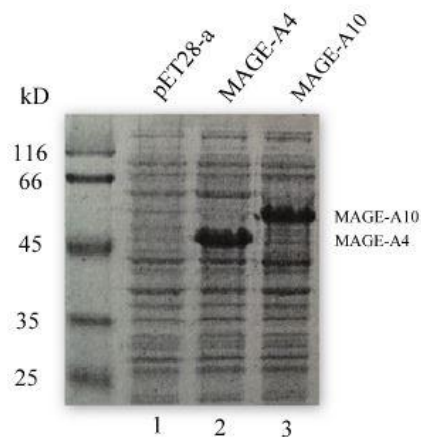
MAGE-A4 ja MAGE-A10 valkude ekspressiooniks bakteris kasutati pET-28a vektorit. See vektor sisaldab kanamütsiini resistentsusgeeni, multikloneerimissaiti, hübriidset T7/lac promootorit, lacI kodeerimisjärjestust ning T7 terminaatorit. T7/lac promootor on indutseeritav IPTG-ga. MAGE-A4 ja MAGE-A10 valke kodeerivad järjestused kloneeriti pET-28a ekspressioonivektori multikloneerimissaiti His-tag-i ette, nii et His-tag jääks valgus N-terminusse. His-tag lihtsustab valkude puhastamist afiinsuskromatograafia abil. Kloneeritud geenide järjestused kontrolliti sekveneerimise teel.

4.2 Valkude ekspressioon bakteris

Kõige tähtsam on alguses kindlaks teha, kas meie konstrueeritud ekspressioonivektorid suudavad ekspresseerida sinna sisestatud valkude kodeerivaid järjestusi ja kui suures mahus.

Ekspressioonikonstruktid pET-28a-MAGE-A4 ja pET-28a-MAGE-A10 transformeeriti *E.coli* ekspressioonitüvesse BL21-CodonPlus™-RP. Rakke kasvatati LB söötmes 37°C juures kuniks nende OD 600 nm juures jäi vahemikku 0.6-0.8 ning siis lisati söötmesse induktorit IPTG-d, nii et lõppkontsentratsioon oleks 1mM. IPTG lisamisega indutseeriti bakterirakkudes T7 RNA polümeraasi tootmine ning sellega ka valgusüntees. Rakud tsentrifugeeriti, siis eemaldati sööde. Põhja tsentrifugeeritud bakterirakud resuspenseeriti NAT puhvrts. MAGE-A4 ja MAGE-A10 valkude ekspressioonitase tehti kindlaks teha 12% SDS-geelelektroforeesiga (joonis 3). Joonisel 3 on näha, et on toimunud soovitud valkude tugev üleekspressioon. MAGE-A4 ja MAGE-A10 eeldatavad suurused on vastavalt 35 kD ja 41 kD, His-liitvalkudel vastavalt 38 kD ja 44 kD.

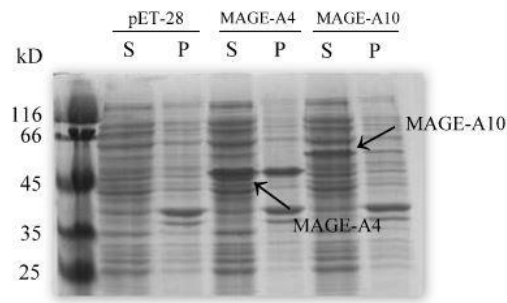
Joonis 3 peal nähtavad valkude suurused on eeldatud suurustest natukene suuremad ja ei lähe kokkuandmebaasis toodud arvutuslike molekulmassidega. Selle põhjus ei ole teada, kuid on võimalik, et MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud liiguvad geelis erinevalt teoreetiliselt välja pakutud molekulmassidest.



Joonis 3. MAGE-A4 ja MAGE-A10 valkude ekspressioon bakteris. 10% SDS-geelelektroforees. Kõiki proove lisati akrüülamiidgeelile 10 µl. Geel on värvitud Pageblue™ Protein Staining Solution-ga (Thermo Scientific).

Meie töö eesmärgiks on ekspresseerida ja puhastada MAGE-A valgud natiivsel kujul. Järgmiseks on vaja kindlaks teha, kas soovitud üleekspresseeritud valgud on lahustuvad.

Natiivses puhvril suspendeeritud *E.coli* rakkudele lisatakse vastavalt rakkude kogusele lüsootsüüme ning inkubeeritakse jääl 30 minutit. Kuna rakkude lõplikuks lüüsiks jääb ainult lüsootsüümidest väheks, siis kasutatakse selleks ka mehaanilist rakkude lõhkumist – sonikeerimist ultraheliga. Seejärel rakulüsaat tsentrifuugitakse, et eraldada teineteisest lahustumatud valgud ja muud bakteriaalsed rakukesta jäänuised. Supernatant viiakse uude tuubi ning sade resuspendeeritakse PBS puhvril. Valkude lahustuvuse hindamiseks analüüsitakse superit ja sadet SDS-geelelektroforeesil (joonis 4). Jooniselt on näha, et sellise meetodikaga on võimalik kätte saada lahustuvas vormis MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud. Samas jääb mingi osa valkudest ka lahustumatusse fraktsiooni. See on tõenäoliselt tingitud üleekspressioonist tulenevast valkude vigasest pakkimisest ja inklusioonkehade tekkimisest. Valkude lahustuvust on võimalik parandada bakterikultuuri madalamal temperatuuril inkubeerides. Madalal temperatuuril väheneb valkude süntees ja rakkude elutegevus ning ekspresseeritud valkudel on rohkesti aega õigesti voltuda, mille tagajärjel suureneb lahustuvate valkude hulk.

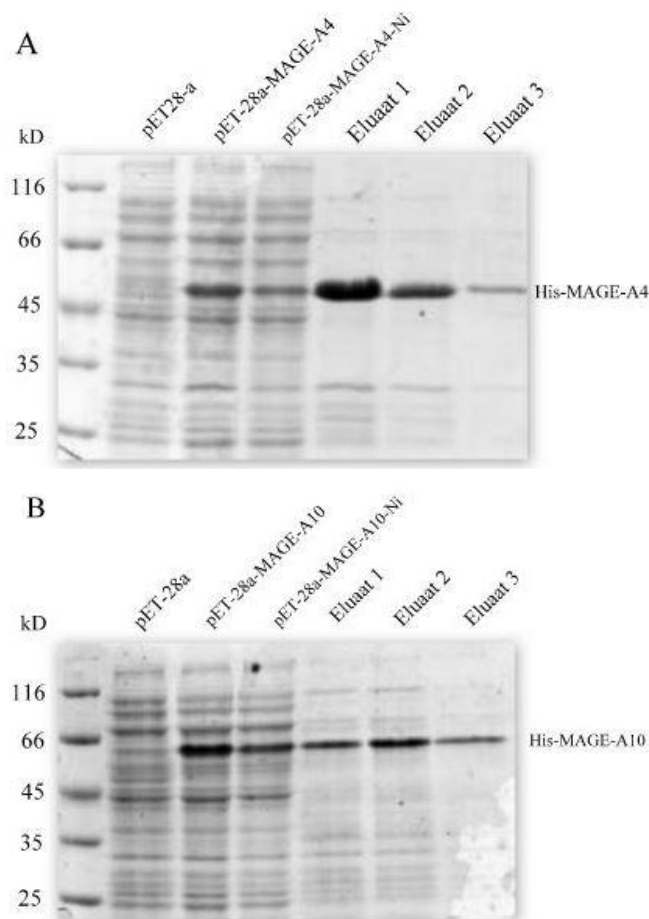


Joonis 4. MAGE-A4 ja MAGE-A10 lahustuvuse analüüs. 12% SDS-geelelektroforees. Kõiki proove lisati akrüülamiidgeelile 20 µl. Geel on värvitud Pageblue™ Protein Staining Solution-ga (Thermo Scientific)

4.3 Valkude puhastamine afiinsuskromatograafiaga

Tagitud valkude puhastamine afiinsuskromatograafiaga on üks sageli kasutatavamaid ja lihtsamaid valkude puhastamise viise. Afiinsuskromatograafia eelised on tugev ja spetsiifiline valkude seondumine ja leebed elueerimistingimised. Samuti saab sellega kontrollida valkude seondumise selektiivsust, lisades puhvrissse väheses koguses imidasooli. Kuna histidiin seostub väga hästi nikkliga, siis kasutasin enda töös Ni-NTA (nikkel-nitriilotriatsetaat) puhastamissüsteemi.

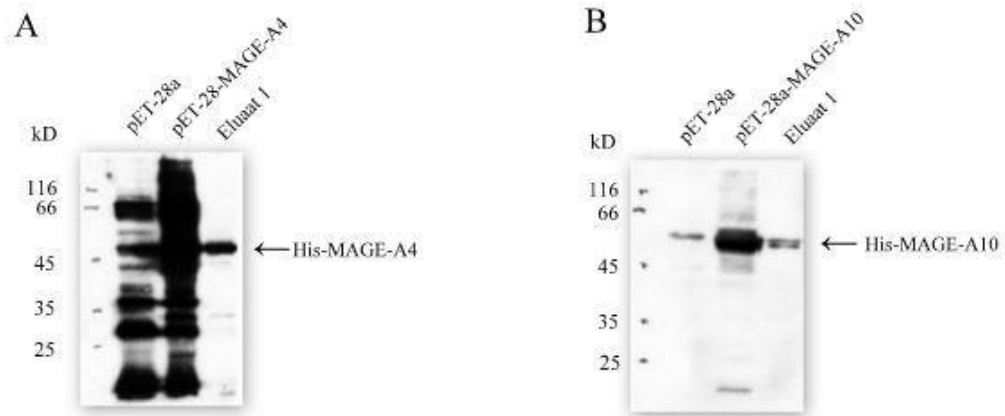
Kui nikkli sefaroosikerakesed on tasakaalustatud ja rakulüsaadile lisatud, hoitakse lüsaate 30 – 45 minutit end-over-end segajal. Sel ajal seonduvad histidiini *tag*-iga märgitud valgud kerakestele. Imidasooli sisaldav seondumispuhver hoiab suuremal määral ära soovimatute valkude seondumise nikkli sefaroosikerakestega. Järgnevalt kantakse nikkli sefaroosikerakesed kolonnidesse. Kolonne pestakse ja His-tagitud valgud elueeritakse imidasooliga. Kuna imidasool on histidiini analoog, siis elueerides valke kange imidasoolilahusega tõrjutakse tugevamini seonduv molekul (imidasoool) välja nõrgemini seondunud His-valgud. Eluaadid kogutakse 1.5 ml tuubidesse ning puhastatud valkude suuruse, puhtuse ning koguse hindamiseks tehakse SDS-geelelektroforees. Joonisel 5 on näidatud MAGE-A4 kui MAGE-A10 puhastamise tulemused. Mõlema valgu puhul on täheldatav mõningate lisavalkude esinemine eluaatides, kusjuures His-MAGE-A4 on puhtam kui His-MAGE-A10. Väiksema molekulmassiga valkude korral võib tegu olla ka laguproduktidega, mis tekivad puhastamise käigus. Sellele vaatamata leidsime, et mõlemaid valke on piisavas koguses ning piisavas puhtusastmes edasiseks tööks. Eluaatidel viidi läbi puhvrivahetus ja valkude kontsentratsioon mõõdeti Bradfordi meetodil 595nm juures, kus aluseks võeti BSA lahjenduste (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 mg/ml) rea optilised tihedused. Kokku õnnestus puhastada 0.26 mg His-MAGE-A4 ja 0.27 mg His-MAGE-A10.



Joonis 5. His-MAGE-A4 (A) ja His-MAGE-A10 (B) valkude puhastamise analüüs SDS-geelelektroforeesil. 12% SDS-geelelektroforees. Akrüülamiidgeelile lisati kõiki proove 10 µl. Geel värviti Thermo Scientific’u Pageblue™ Protein Staining Solution-ga. Piltidel on välja toodud negatiivne kontroll; pET-28a-MAGE-A4/10 natiivne lüsaat – indutseeritud 2 h IPTG-ga; pET-28a-MAGE-A4/10 natiivne lüsaat pärast inkubeerimist Ni-sefaroosikerakestega; eluaadid 1, 2 ja 3. Kõik eluaadid on elueeritud 250 mM imidasoolilahusega.

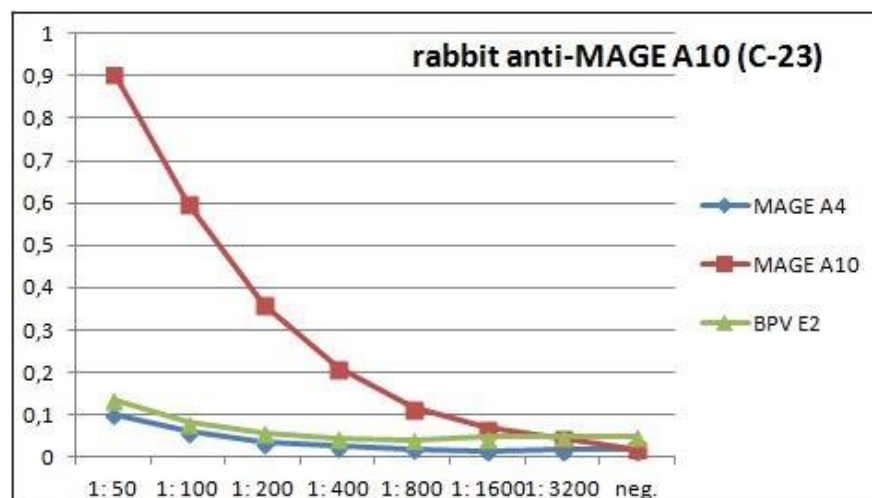
4.4 Puhastatud valkude kontroll

Järgmisena viidi läbi puhastatud valkude analüüs kommertsiaalselt saada olevate apetsiifiliste antikehadega. Western blot analüüs näitas, et MAGE-A4 antikeha seondub spetsiifiliselt bakteris ekspresseeritud ja afiinsuskromatograafiaga puhastatud valguga (Joonis 6). MAGE-A4 vastane antikeha (H-32) andis ka reaktsioone väga paljude natiivses lüsaadis ja negatiivses kontrollis olevate bakteriaalsete valkudega, seega MAGE-A4 vastane Santa Cruze antikeha on nõrga spetsiifikaga, sest annab ristreaktsioone teiste valkudega. MAGE-A10 vastane antikeha seondub hästi puhastatud MAGE-A10 valguga. Western blotil olevad signaalid annavad kinnitust, et tegemist on õigete antigeenidega

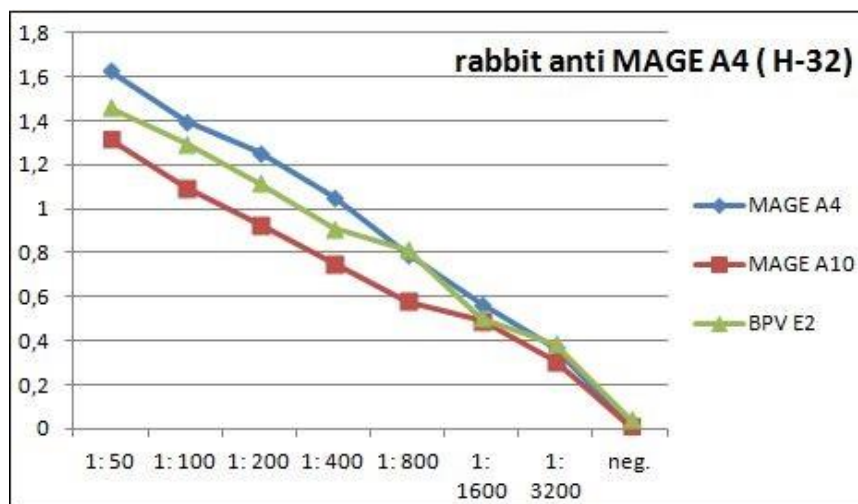


Joonis 6. His-MAGE-A4 (A) ja A10 (B) valkude analüüs Western blotiga. His-MAGE-A4 ja A10 valkude lahjendused on 1:10 PBS puhvril. Välja on toodud negatiivne rada pET-28a; pET-28a-MAGE-A4/10 natiivsed lüsaadid, mis on indutseeritud 2 h IPTG manulusel ja esimene eluaat, elueeritud 250 mM imidasoolilahusega. Antikehade signaal detekteeriti ECL™ kit-ga (GE Healthcare) ja ilmutati röntgenfilmile.

Paralleelselt Western blotiga tein kontrolliks ka ELISA analüüsi. ELISA plaat kaeti antigeenide (2 µg/ml) lahusega ja valke inkubeeriti samade antikehadega, mida kasutati Western blot analüüsil. Primaarseks antikehaks oli rabbit anti-MAGE-A10 (C-23) ja rabbit anti-MAGE-A4 (H-32) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) ja sekundaarseks antikehaks anti-rabbit HRP konjugaat (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Jooniselt 7 on näha, et nagu ka Western blot analüüsil, toimib rabbit anti-MAGE-A10 väga hästi ja ei anna ristreaktsioone ei MAGE-A4-ga ega ka kontrolliks võetud veise papilloomviiruse E2 valguga. Ent samas rabbit anti-MAGE-A4 antikeha on üsna madala spetsiifikaga ja ei ole kasutatav ELISA analüüsil, kuna lisaks MAGE-A4 signaalile, annab see ristreaktsioone ka kõigi teiste valkudega (joonis 8)



Joonis 7. His-MAGE-A10 valgu analüüs ELISA-ga



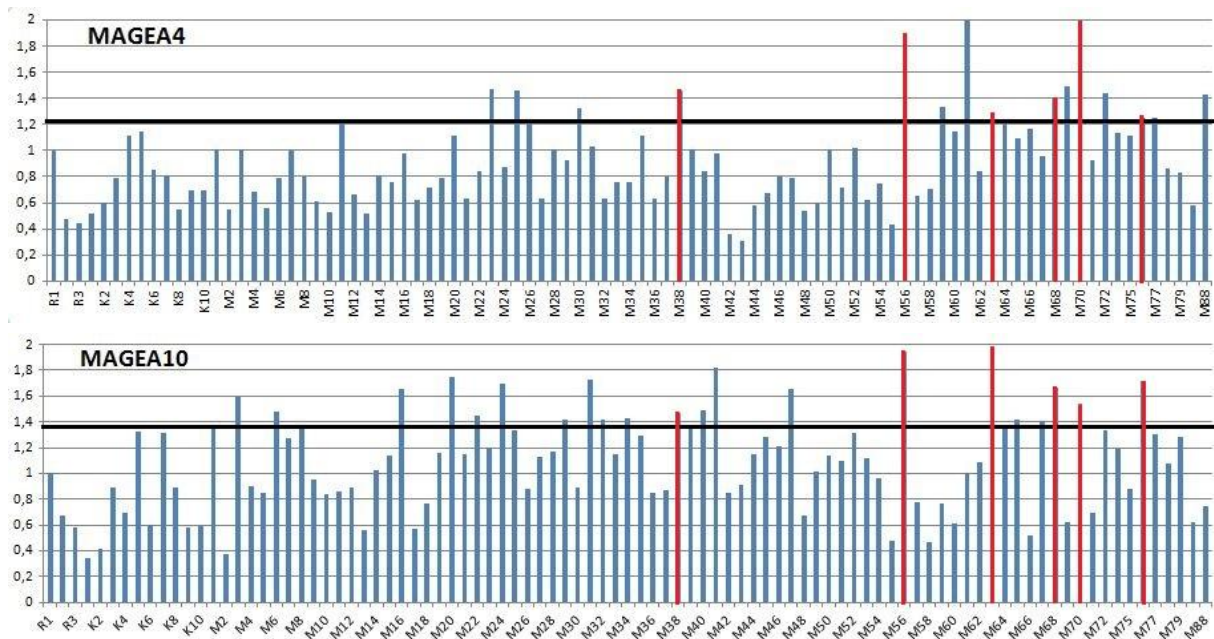
Joonis 8. His-MAGE-A4 valgu analüüs ELISA-ga

4.5 Melanoomi patsientide seerumite analüüs ELISA-ga

Humoraalse immuunsüsteemi peamiseks teguriteks on B-lümfotsüütide poolt toodetud antikehad e immunoglobuliini molekulid, mis moodustavad umbes veerandi vereseerumi valkudest. Vereseerumeid kasutatakse erinevates biokeemilistes katsetes ning samuti ka seroloogilistes ja immunoloogilistes uuringutes.

Käesolevas osas saadi melanoomide patsientide ja tervete doonorite vereseerumid Tartu Ülikooli Kliinikumist ja Põhja-Eesti Regionaalhaiglast. Melanoomi patsientide seerumite kogumiseks ja kasutamiseks on olemas Tallinna Meditsiiniuuringute Eetikakomitee luba (otsus nr. 2781). Seerumeid kasutati ELISA analüüsil MAGE-A4 ja MAGE-A10 vastaste autoantikehade tuvastamiseks. Tulemusi võrreldi kontrollgrupiga. Iga seerumiga teostatakse ELISA-s lahjenev kontsentratsioonirida kontsentratsioonidega 1:200, 1:400, 1:800 ja 0. Plaat loeti sisse ELISA Reader-iga lainepikkusel 450 nm. Kokkuvõttes analüüsiti mõlema valguga 13 kontrollseerumit ja 80 patsiendi seerumit. Tulemused koondati Microsoft Excelisse ning arvesse võeti OD näit kontsentratsioonil 1:800. Selle põhjal arvutati keskmine tulemus ning standardviga. Piir, millest kõrgem tulemus loetakse positiivseks, saadakse, kui liidetakse

keskmine kontrollseerumite tulemus ja kahekordne standardviga. Positiivse ja negatiivse tulemuse vaheline piir on MAGE-A4 1.21211 ja MAGE-A10 1.37823.



Joonis 9. MAGE-A4 ja MAGE-A10 vastu testitud patsientide seerumite tulemused. Graafikul on mustaga välja toodud piir, millest kõrgem tulemus loetakse positiivseks. Punasega on märgitud patsiendid, kellel on mõlema valgu suhtes positiivne vastus.

80 uuritud seerumist andis positiivse tulemuse MAGE-A4 vastu 21.2 % patsientidest ja MAGE-A10 vastu 27.5% patsientidest. Järelikult on patsientidel rohkem tekkinud auto-antikehi MAGE-A10 valgu vastu. Positiivset vastust ei teki paljudel melanoomi patsientidel, mis tuleneb iga inimese organismi immuunsüsteemide erinevustest. Joonistelt 9 on tuvastatav, et kui patsiendil on positiivne vastus MAGE-A4 vastu olemas, siis ei pruugi see tähendada positiivset vastust ka MAGE-A10 puhul. Aga on ka erandeid, sest mõlema antigeeni vastu on positiivne vastus olemas kuuel patsiendil (joonis 9, märgitud punasega). Selle põhjuseks on kas organismis auto-antikehade olemasolu mõlema antigeeni vastu või ristreaktsioonide esinemine. MAGE-A10 ja MAGE-A4 valgud on 70% osas teineteisega homoloogsed (Meek jt 2012), mistõttu võivad osadel patsientidel tuvastatavad auto-antikehad ära tunda mõlemat valku ristreaktsioonide tõttu. See tähendab, et tuntakse ära just MAGE homoloogia regioon (MHD).

Patsientide humoraalset immuunvastust MAGE-A antigeenide vastu pole varem uuritud. Humoraalset immuunvastust on aga uuritud kahe teise melanoomi antigeeni, NY-ESO-1 ja türosinaasi vastu. Tulemused olid positiivsed vastavalt 9.4% (Stockert jt., 1998) ja 8.7% (Stockert jt., 1998; Huang jt., 1998) patsientidest. Positiivsete vastuse osakaal antigeeni BPAG-1 vastu testides oli 23.4% (Shimbo jt., 2010), mis on sarnane MAGE-A4 ja MAGE-A10 tulemustele. NY-ESO-1 antigeeni auto-antikehade CTA vastane toime võib olla praegu

kõige sagedamini uuritud, aga praeguse uuringu tulemusi arvestades annavad MAGE-A4 ja MAGE-A10 mitu korda kõrgema tulemuse. Me ei tea veel MAGE-A antigeenide funktsioonide kohta väga palju, aga praegustest tulemustest selgub, et patsientide vereseerumites olevate auto-antikehade sagedused MAGE-A valkude A4 ja A10 vastu suhteliselt suured ja paistab, et need sobivad potentsiaalseteks melanoomi biomarkeriteks,

Miks on patsientidel MAGE-A10 vastu rohkem auto-antikehi? Täpset vastust siinkohal muidugi anda ei saa. Autoantikehad tekivad organismis ründamaks oma enda valgulisi struktuure, mis võivad organismile olla rohkem kahjuks kui kasuks. Põhjus, miks MAGE-A10 vastu tekkivate auto-antikehade sagedus on suurem kui MAGE-A4 vastu, võib seisneda selles, et MAGE-A4 oletatav funktsioon rakus on rohkem organismi kaitsev kui hävitav (Nagao jt., 2003). Kuigi me ei oska kindlalt nende täpsete funktsioonide kohta palju öelda, siis võib välja öelda, et MAGE-A antigeenid MAGE-A4 ja MAGE-A10 sobivad üpris hästi melanoomi biomarkeriteks ning nende kasutamine melanoomi varajaseks prognoosiks ja diagnoosiks on võimalik.

Me oleme võimelised suhteliselt lihtsalt, kiirelt ja odavalt detekteerima patsientidel autoantikehi soovitud antigeenide vastu. Kuigi MAGE-A4 ja –A10 antigeene on võimalik kasutada biomarkeritena melanoomi puhul, pole melanoomi varajast prognoosi võimalik teostada nende antigeenidega kõikidel patsientidel. Uuritud biomarkerid pole universaalsed ega toimi kõikidele melanoomi patsientidele. See tähendab, et haiguse tunnusmärkidena toimivad need juhul, kui patsiendi organismis on olemas selle kindla antigeeni autoantikehad. Hetkel on see MAGE-A4 ja MAGE-A10 vastu kuni 27% testitud patsientidest. MAGE-A valkudel töötab tulla helge tulevik melanoomi biomarkeritena.

Kokkuvõte

Töö kirjanduse osas antakse ülevaade antakse lühike ülevaade melanoomi antigeenidest. Täpsemalt kirjeldatakse MAGE perekonda kuuluvat MAGE-A antigeenide gruppi ning põgusalt ka nende oletatavatest funktsioonidest inimorganismis. Lõpetuseks tuuakse välja mõned katsed, kus testiti inimese humoraalset immuunvastust melanoomi antigeenide vastu.

Käesoleva töö eesmärgiks oli melanoomi antigeenide MAGE-A4 ja MAGE-A10 puhastamine ja nende kasutamine ELISA analüüsil auto-antikehade detekteerimiseks. Valgud ekspresseeriti bakteritüves BL21-CodonPlus™-RP ja puhastati natiivsetes tingimustes.

Antigeenid puhastati Ni-NTA puhastussüsteemiga. Käesoleva töö peamine ülesanne oli puhastatud antigeene analüüsida melanoomi patsientide vereseerumites olevate auto-antikehade vastu. MAGE-A4 ja MAGE-A10 vastu andsid positiivseid vastuseid vastavalt 21.2% ja 27.5% testitud patsientidest. Saadud tulemused on väga head ning näitavad, et MAGE-A antigeenide perekond on heaks potentsiaalseks biomarkeriteks varajaseks melanoomi prognoosimisel ja diagnoosimisel.

Cancer Antigens MAGE-A4 and MAGE-A10 as Biomarkers in Melanoma Patients

Daniel Hendrikson

Summary

Melanoma is a form of skin cancer derived from melanocytes. It is often associated with excessive UV radiation. The human organism has shown great immunological activity against human melanoma and it has been described to be the most immunogenic tumor. There is an intensive search for cancer biomarkers that could identify melanoma in primary stages.

MAGE-A antigens, that belong to MAGE-I group, are located in the chromosome X, region q28. These are commonly expressed in different cancers, included breast, lung and skin cancer. Although the function of different MAGE-A proteins is not known they are strictly tumor-specific and hence good targets in tumor immunotherapy.

First we constructed the expression vectors. MAGE-A4 and MAGE-A10 coding sequences were inserted into bacterial expression vector pET-28a. Our next task was to over-express the MAGE-A4 and MAGE-A10 antigens. *E.coli* strain BL21-CodonPlus™-RP was used for that.

The antigens were successfully purified with the Ni-NTA purification system. Purified proteins were used in ELISA assay. Our aim was to detect auto-antibodies against MAGE-A4 and MAGE-A10 antigens in the blood sera of patients of melanoma. The positive results for MAGE-A4 and MAGE-A10 were respectively 21.2% and 27.5% of tested patients. We suggest that MAGE-A family antigens are good potential biomarkers for early diagnoses and prognoses of melanoma.

Kasutatud kirjanduse loetelu

Bai, S., He, B., Wilson, E.M. (2005). Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction. *Mol. Cell. Biol.* 25: 1238–1257.

Bai, S., Wilson, E.M. (2008). Epidermal-growth-factor-dependent phosphorylation and ubiquitinylation of MAGE-11 regulates its interaction with the androgen receptor. *Mol. Cell. Biol.* 28: 1947–1963.

Bandić, D., Juretić, A., Sarcević, B., Separović, V., Kujundzić-Tiljak, M., Hudolin, T., *et al* (2006). Expression and possible prognostic role of MAGE-A4, NY-ESO-1 and HER-2 antigens in women with relapsing invasive ductal breast cancer: retrospective immunohistochemical study. *Croat. Med. J.* 47: 32–41.

Bello, B.M., Ariyan, C.E., Carvajal, R.D. (2013). Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. *Cancer Control* 20: 261–281.

Bosserhoff, A.K. (2006). Novel biomarkers in malignant melanoma. *Clin. Chim. Acta.* 367: 28–35.

Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De Plaen, E., Lethe, B., Coulie, P., and Boon (1993). T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 178: 489–495.

Bulkley, G.B., Cohen, M.H., Banks, P.M., Char, D.H., Ketcham, A.S. (1975) Long-term spontaneous regression of malignant melanoma with visceral metastases. Report of a case with immunologic profile. *Cancer* 36: 485–494.

Busam, K.J., Iversen, K., Berwick, M., Spagnoli, G.C., Old, L.J., Jungbluth, A.A. (2000) Immunoreactivity with the anti-MAGE antibody 57B in malignant melanoma: frequency of expression and correlation with prognostic parameters. *Mod. Pathol.* 13: 459–465.

Chapman, C.J., Murray, A., McElveen, J.E., *et al* (2008). Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure. *Thorax.* 63: 228–233.

Chatterjee, M., Draghici, S., Tainsky, M.A. (2006). Immunotherapeutics. Breaking tolerance in immunotherapy using tumor autoantigens identified on protein microarrays. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 9: 380–385.

- Chen, Y. T., Boyer, A. D., Viars, C. S., Tsang, S., Old, L. J., and Arden, K. C. (1997). Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenet. Cell. Genet.* 79: 237–240.
- Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T., Lucas, S. (2001). An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.* 61: 5544–5551.
- Clark Jr, W.H., From, L., Bernardino, E.A., Mihm, M.C. (1969). The histogenesis and biological behaviour of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 29: 705–727.
- Clark Jr, W.H., Elder, D.E., Guerry, D.T., *et al* (1989). Model predicting survival in stage melanoma based on tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.* 81: 1893–1904.
- Clemente, C.G., Mihm Jr, M.C., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77: 1303–1310.
- Coulie, P. G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J. P., *et al* (1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 180: 35–42.
- Dabovic, B., Zanaria, E., Bardoni, B., Lisa, A., Bordignon, C., Russo, V., *et al* (1995). A family of rapidly evolving genes from the sex reversal critical region in Xp21, *Mamm. Genome* 6: 571–580.
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., *et al* (1994). Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family, *Immunogenetics* 40: 360–369.
- Ferradini, I., Mackensen, A., Geneve, C., *et al* (1993). Analysis of T-cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a regressive melanoma. *J. Clin. Invest.* 91: 1183–1190.
- Gould-Ruthberg, B.E., Bracken, M.B., Rimm, D.L. (2009). Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 101: 452–474.

- Haluska, F.G., Hodi, F.S. (1998). Molecular genetics of familial cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* 16: 670–682.
- Huang, S.K., Okamoto, T., Morton, D.L., *et al* (1998) Antibody responses to melanoma/melanocyte autoantigens in melanoma patients. *J. Invest. Dermatol.* 111: 662–667.
- Irie, R.F., Morton, D.L. (1986). Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8694–8698.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., Miki, T., and Rosenberg, S. A. (1994). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3515–3519.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Appella, E., and Rosenberg, S. A. (1995). Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with *in vivo* tumor regression. *J. Immunol.* 154: 3961–3968.
- Laduron, S., Deplus, R., Zhou, S., Kholmanskikh, O., Godelaine, D., De Smet, C., *et al* (2004). MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Res.* 32: 4340–4350.
- Livingston, P.O., Natoli, E.J., Calves, M.J., Stockert, E., Oettgen, H.F., Old, L.J. (1987). Vaccines containing purified GM2 ganglioside elicit GM2 antibodies in melanoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2911–2915.
- Lucas, S., De Plaen, E., Boon, T. (2000). MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2 and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int. J. Cancer* 87: 55–60.
- Lucas, S., De Smet, C., Arden, K.C., Viars, C.S., Lethe, B., Lurquin, C., *et al* (1998). Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res.* 58: 743–752.
- Lurquin, C., De Smet, C., Basseur, F., Muscatelli, F., Martelange, V., De Plaen, E., *et al* (1997). Two members of the human MAGEB gene family located in Xp.21.3 are expressed in tumors of various histological origins. *Genomics* 46: 397–408.

- Mackensen, A., Ferradini, I., Carcelain, I.G., *et al* (1993). Evidence for *in situ* amplification of cytolytic T-lymphocytes with antitumor activity in a human regressing melanoma. *Cancer Res.* 53: 3569–3573.
- Mackensen, A., Carcelain, S., Viels, S., *et al* (1994). Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a regressive melanoma. *J. Clin. Invest.* 93: 1397–1402.
- Maio, M., Coral, S., Sigalotti, L., *et al* (2003). Analysis of cancer/testis antigens in sporadic medullary thyroid carcinoma: expression and humoral response to NY-ESO-1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 748–754.
- Meek, D.W., Marcar, L. (2012). MAGE-A antigens as targets in tumour therapy. *Cancer Letters* 324: 126-132.
- Monte, M., Simonatto, M., Peche, L.Y., Bublik, B.R., Gobessi, S., Pierotti, M.A., *et al* (2006). MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance chemotherapeutic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 11 160 – 11 165.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., Yasuhiko, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase 12. *J. Biol. Chem.* 277: 34 287 – 34 294.
- Muscatelli, F., Walker, A.P., De Plaen, E., Stafford, A.N., Monaca, A.P. (1995). Isolation and characterization of a MAGE gene family in the Xp21.3 region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4987–4991.
- Nagao, T., Higashitsuij, H., Nonoguchi, K., Sakurai, T., Dawson, S., Mayer, R.J., *et al* (2003). MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J. Biol. Chem.* 278: 10 668 – 10 674.
- Nakamura, S., Nouse, K., Noguchi, Y., *et al* (2006). Expression and immunogenicity of NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21: 1281–1285.
- Ohsie, S.J., Sarantopoulos, G.P., Cochran, A.J., Binder, S.W. (2008). Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J. Cutan. Pathol.* 35: 433–444.
- Rimoldi, D., Salvi, S., Schultz-Thater, E., Spagnoli, G.C., Cerottini, J.C. (2000) Anti-MAGE-3 antibody 57B and anti-MAGE-1 antibody 6C1 can be used to study different proteins of the MAGE-A family. *Int. J. Cancer* 86: 749–765.

- Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., *et al* (1996). A mutated B-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183: 1185–1192.
- Rogner, U.C., Wilke, K., Steck, E., Korn, B., Poustka, A. (1995). The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28. *Genomics* 29: 725–731.
- Sang, M., Wang, L., Ding, C., Zhou, X., Wang, B., Lian, Y., Shan, B., (2011^A) Melanoma-associated antigen genes – an update. *Cancer Lett.* 302: 85–90.
- Sang, M., Lian, Y., Zhou, X., Shan, B., (2011^B) MAGE-A family: Attractive targets for cancer immunotherapy. *Vaccine* 29: 8496–8500.
- Scanlan, M.J., Gure, A.O., Jungbluth, A.A., Old, L.J., Chen, Y.T. (2002). Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 188: 22–32.
- Shimbo, T., Tanemura, A., Yamazaki, T., Tamai, K., Katayama, I., Kaneda, Y. (2010). Serum anti-BPAG1 auto-antibody is a novel marker for human melanoma. *Plos One* 5: e10566
- Simpson, A.J., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.T., Old, L.J., (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 5: 615–625.
- Stockert, E., Jäger, E., Chen, Y.T. (1998). A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J. Exp. Med.* 187: 1349–1354.
- Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643–1647.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Beach, D (1995). A p16INK4a insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269: 1281–1284.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Daniel Hendrikson**

13.06.1992

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Vähi antigeenide MAGE-A4 ja MAGE-A10 puhastamine ja kasutamine melanoomi biomarkeritena,**“ mille juhendaja on **Reet Kurg, PhD**

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **31.06.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014