

**TARTU ÜLIKOOL**  
**LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND**  
**MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT**

Sergei Jagur

**Melanoomi antigeenidega pseudotüpeeritud**  
**viirus-laadsete partiklite genereerimine**

Magistritöö

Juhendajad: Reet Kurg, *Ph. D*

Kiira Gildemann, *MSc*

**Tartu 2014**

# Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1 Viirus-sarnased partiklid .....	7
1.1.1. Viirus-sarnaste partiklite formeerumine .....	7
1.1.2. Teise põlvkonna VLP-d .....	10
1.1.3. Viirus-sarnaste partiklite immunogeensed omadused .....	10
1.1.4. VLP vaktsiinid .....	11
1.2 Melanoom.....	14
1.3 Melanoomi antigeenid.....	15
1.3.1. Türosinaas (TYR), TRP1 ja TRP2.....	15
1.3.2. PMEL/gp100 ja MART1 .....	17
1.3.3. MCAM ja HMW-MAA.....	17
1.3.4. MAGE-A perekonna valgud. MAGEA4 ja MAGEA10 .....	19
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	20
2.1. Töö eesmärgid.....	20
2.2. Materjalid ja meetodika.....	21
2.2.1. Kasutatud plasmiidid .....	21
2.2.2. Rakuliinid .....	21
2.2.3. Eukarüootsete rakkude transfektsioon elektroporatsiooni meetodil .....	22
2.2.4. VLP-de ja rakkude kogumine.....	22
2.2.5. VLP-de kontsentreerimine ja puhastamine.....	23
2.2.6. SDS-polüakrüülamiid geelelektroforees .....	23
2.2.7. <i>Western blot</i> analüüs .....	23
2.2.8. Immunofluorestsentsanalüüs.....	26
2.2.9. Ensüüm-immuunsorbtsioon (ELISA) analüüs .....	27

3. TULEMUSED .....	28
3.1 Melanoomi spetsiifiliste antigeenide ekspressioon imetajate rakkudes.....	28
3.2 Melanoomi spetsiifiliste antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-de formeerimine ...	31
3.3 VLP-de puhastamine .....	32
3.4 VLP-de analüüs ELISA meetodiga.....	36
3.5 VLP-de ELISA analüüsi meetodi optimeerimine.....	39
3.6 VLP-del põhineva ELISA kasutamine melanoomi patsientide seerumite analüüsil ....	41
ARUTELU .....	44
KOKKUVÕTE .....	47
Summary .....	48
KASUTATUD KIRJANDUS .....	50

## Kasutatud lühendid

APC - antigeeni presenteerivad rakkud (*antigen-presenting cells*)

BSA – veise seerumi albumiin (*bovine serum albumin*)

CMV – tsütomegaloviirus (*cytomegalovirus*)

Cop5 - hiire fibroblasti rakkud

CSPG4 - *Chondroitin sulfate proteoglycan 4*

CTL – tsütotoksilised T-lümfotsüüdid (*cytotoxic T lymphocyte*)

DAPI – 2,4-diamidino-2-fenüülindool (*2,4-diamidono-2-phenylindole*)

Dct - dopakroom tautomeraas (*Dopachrome tautomerase*)

DHI - 5,6- dihidroksüindool (*dihydroxyindole*)

DHICA - 5,6-dihidroksüindool-2-karboksüül hape (*dihydroxyindole-2-carboxylic acid*)

DOPA - 3,4-dihidroksüphenüülalaniin (*3,4- dihydroxyphenylalanine*)

EBNA - Epstein-Barr'i viiruse tuumaantigeen (*Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen*)

EHV-1 - hobuse tüüp 1 herpesviirus (*Equine herpesvirus 1*)

ELISA - ensüüm-immuunsorbtsiooni analüüs (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

EMT - epiteliaalne mesenhümaalne transitsioon (*epithelial–mesenchymal transition*)

ER- endoplasmaatiline retiikulum (*endoplasmic reticulum*)

FCS – vasika loote seerum (*fetal calf serum*)

HBV - hepatiit B viirus (*hepatitis B virus*)

Hef1A – inimese ellongatsiooni faktor 1A (*human elongation factor 1a*)

HIV-1 - inimese immuunpuudulikkuse viirus 1 (*Human immunodeficiency virus-1*)

HMW-MAA - *high-molecular weight melanoma associated antigen*

HPV – inimese papilloomiviirus (*human papillomavirus*)

HRP - mädarõika peroksüdaas (*horseradish peroxidase*)

IgG - immuunoglobuliin G

IF – immunofluorestsents (*immunofluorescence*)

kDa – kilodalton

MAA – melanoomaga seotud antigeen (*melanoma associated antigen*)

MAGE-A4 - *melanoma-associated antigen A4*

MAGE-A10 - *melanoma-associated antigen A10*

MART1 - *melanoma antigen recognized by T-cells 1*

MCAM - *melanoma cell adhesion molecule*

MHC - suur koesobivuskompleks (*major histocompatibility complex*)

MLV - hiire leukeemiaviirus (*Murine leukemia virus*)

NFDM – lössipulber (*non fat dry milk*)

NV – Norwalk viirus (*Norwalk virus*)

PBL - perifeerse vere lümfotsüüdid (*Peripheral blood lymphocytes*)

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (*phosphate buffered saline*)

PFA – paraformaldehüüd (*paraformaldehyde*)

PMEL- *premelanosome protein*

PVDF – polüvinülideendifloriid (*polyvinylidene difluoride*)

RGP - radiaalne kasvu faas (*radial growth phase*)

rpm – rootori pööret minutis

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

SV 40 – inimahvi vakuoleerumis viirus 40 (*simian vacuolating virus 40*)

TRP1 - türosinaasiga seotud valk 1 (*tyrosinase related protein 1*)

TRP2 - DOPAkroom tautomeraas (*tyrosinase related protein 2*)

TYR – türosinaas (*tyrosinase*)

VLP - viirus-laadne partikkel (*virus-like particle*)

VSV-G - vesikulaarse stomatiidi viiruse pinna glükoproteiin (*glycoprotein from vesicular stomatitis virus*)

## Sissejuhatus

Tänapäeval on inimestel üheks kõige ohtlikemaks haiguseks vähk - haiguste rühm, mille hulka kuulub üle 100 erineva kasvajalise haiguse ja mida iseloomustab rakkude kontrollimatu jagunemine, kasv ning metastaseerumine. Melanoom on pahaloomuline kasvaja, nahavähi eriliik, mis areneb melanotsüütidest ja esineb sagedamini heleda nahaga inimestel. See on üks ohtlikemaist pahaloomulistest kasvajatest inimesel. Igal aastal diagnoositakse Euroopas melanoomi umbes 26 100 mehel ja 33 300 naisel ning umbes 8 300 meest ja 7 600 naist surevad haiguse tõttu (Ferlay *jt.*, 2001). Eestis moodustab melanoom 15% kõikidest nahavähkidest. Melanoomi on uuritud juba parkümmend aastat ning meil on väga palju informatsiooni melanoomiga seotud protsessidest, välja kujunemise mehhanismidest ja melanoomi antigeenidest.

Viimastel aastatel on molekulaarbioloogias hakatud laialt kasutama viiruslaadseid partikleid ehk VLP-sid. Need on tühjad viiruspartiklid, mis ei ole võimelised nakatuma rakke. Üheks VLP-de eeliseks on head immunogeensed omadused: nad on võimelised sisenema sihtrakkudesse ja indutseerima sünnipärasest ja adaptiivset immuunvastust (Ludwig ja Wagner, 2007). Lisaks sellele saab nende pinnal eksponeerida erinevaid antigeene ja indutseerida nende antigeenide vastast immuunvastust inimesel. Kõik need omadused teevad VLP-d perspektiivseteks kandidaatideks uute vaktsiinide väljatöötamisel.

Käesoleva magistr töö eesmärgiks on anda ülevaade VLP-de omadustest, formeerumisest, kasutamisest vaktsiinidena ning melanoomist ja temaga seotud spetsiifilistest antigeenidest. Töö eksperimentaalse osa eesmärgiks on melanoomi spetsiifiliste antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-de produtseerimise tehnika välja töötamine, optimeerimine ning melanoomi antigeenide detekteerimiseks sobiva skriiningsüsteemi loomine.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Viirus-sarnased partiklid

Viirus-laadsed partiklid (*virus-like particles*) ehk VLP-d on kõrgelt organiseeritud sfäärilised struktuurid, mida nimetatakse ka lipopartikliteks. VLP-d on tühjad viiruspartiklid, mis ei sisalda infektsiooniks vajalikke nukleiinhappeid. Vaatamata sellele on lipopartiklid võimelised sisenema sihtrakkudesse ja indutseerima sünnipärasest ja adaptiivset immuunvastust (Ludwig ja Wagner, 2007). VLP-de formeerimine on esmakordselt kirjeldatud hepatiit B viirusega (HBV) nakatunud rakkudes, mis massiliselt produtseerisid 22 nanomeetrilisi partikleid, mis koosnesid HBV-e pinna antigeenist HBsAg (Bayer jt., 1968).

Viimastel aastatel on VLP-d leidnud laialdast kasutamist molekulaarbioloogia erinevates valdkondades. VLP-d on stabiilse struktuuriga ja kergesti manipuleeritavad ning on leidnud kasutamist näiteks heteroloogiliste molekulide transportimiseks ja eksponeerimiseks või ehitusplokkidena nanomaterjalides (Ludwig ja Wagner, 2007). Lipopartiklite head immunogeensed omadused on muutnud VLP-d väga atraktiivseteks kandidaatideks uute vaktsiinide väljatöötamisel. Kõik see teeb VLP-d väga populaarseks tööriistaks tänapäevases sünteetilises bioloogias.

### 1.1.1. Viirus-sarnaste partiklite formeerumine

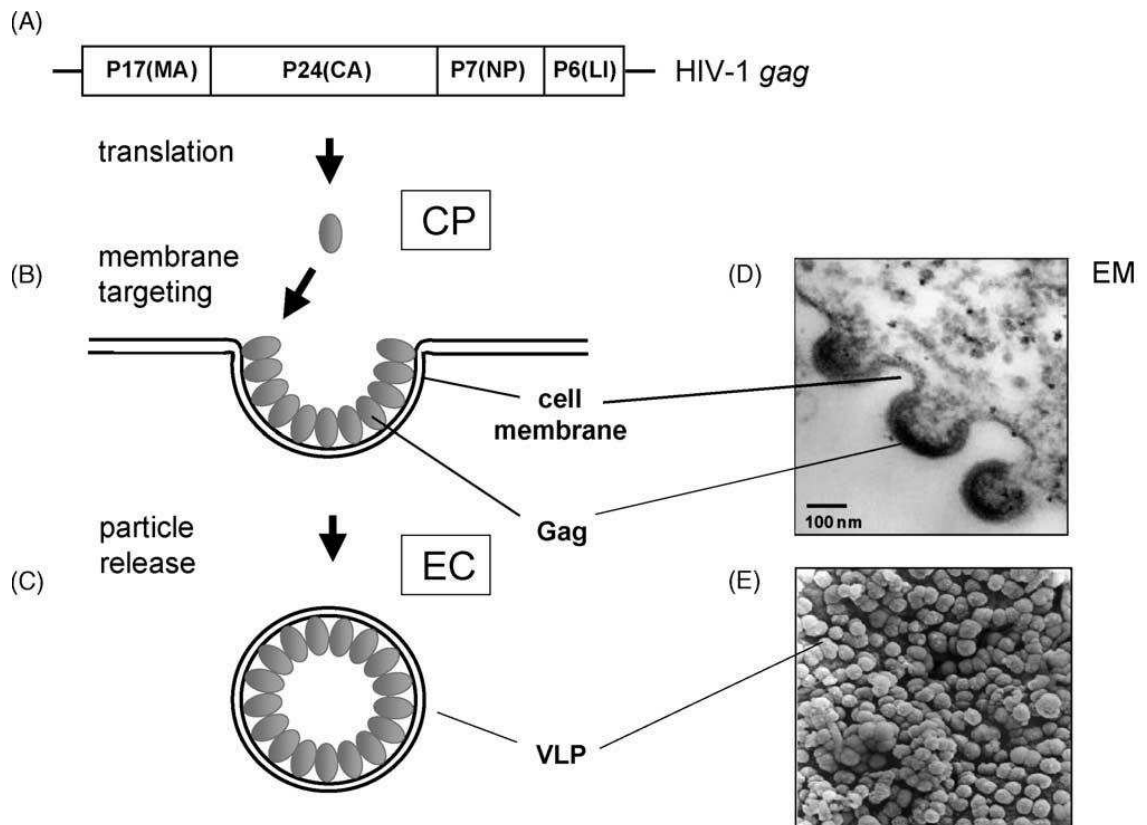
Retroviiruste Gag struktuurset valgust koosnevate VLP-de moodustamiseks kasutatakse tihti eukariootsete rakkude süsteeme. *Gag* geeni ekspresseerimisel eukariootses raku sünteesitakse Gag polüvalk tsütoplasmas ribosoomidel ja suunatakse plasmamembraani, kus nad omandavad lipiidse kihi ja punguvad välja tüüp I VLP-de kujul (Joonis 1). Tsütoplasmaatilise transpordi ajal Gag prekursorid moodustavad mitmeid vahevorme ja lõpuks assambleeruvad multimeeridena plasmamembraani sisemisele pinnale (Joonis 1D) (Gelderblom, 1991). Assambleerunud Gag valgu

kompleks indutseerib membraani väljasopistamist, mis viib punga moodustamisele. Pungumise ajal lülitakse tekkinud partiklisse selektiivselt viiruse glükoproteiinid või tootja rakkudes ekspresseeritud valgud ning seejärel moodustavad tüüp II VLP-d (Gelderblom *jt.*, 1987; Arthur *jt.*, 1992; Meerloo *jt.*, 1993).

Väga olulist rolli VLP formeerumisel mängivad viiruse struktuursete polüvalkude erinevad domäänid. Gag valgu prekursor, mis ei sisalda viiruse teisi valke või RNA-d, on võimeline katalüüsima mitte infitseerivate viirus-sarnaste partiklite formeerumist ja vabastamist, kui neid ekspresseeritakse putukate, pärmide või imetaja rakkudes (Delchambre *jt.*, 1989; Karacostas *jt.*, 1989; Wagner *jt.*, 1992; Mergener *jt.*, 1992; Wills *jt.*, 1989). Inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV-1) *gag* geen kodeerib kõrgelt konserveerunud struktuurset polüproteiini Pr55<sup>gag</sup> (Joonis 1A), mis koosneb järgmistest valkudest: p17 maatriks- (MA), p24 kapsiidi- (CA), p7 nukleokapsiidi- (NC) ja p6 linkervalgust (Deml *jt.*, 2004). p17 valgu erinevates domäänides paikneb regioon, mis vastutab Gag prekursorite seondumise eest raku sisemisele plasmamembraanile (Gottlinger *jt.*, 1989; Freed *jt.*, 1994). Samuti mõjutab p17 valk glükoproteiinide lülitamisprotsessi partiklite pinnale (Freed ja Martin, 1995). HIV Gag-i p24 domään omab olulist rolli VLP õigel formeerumisel (Chazal *jt.*, 1994). p7 domäänil on suur roll viiruse kokkupanemisel, sest p7 mutantidel tekivad defektid partiklite formeerumisel (Dorfman *jt.*, 1993; Hong ja Boulanger, 1993). Samuti tõestati hiljem, et p7 on oluline ka Gag valgu suunamisel ja seondumisel plasma membraaniga (Platt ja Haffar, 1994). Võrreldes teiste domäänidega ei oma p6 mingit olulist rolli VLP-de formeerumisel ja pungumisel nii putukate kui ka imetaja rakkudes (Hoshiwaja *jt.*, 1991; Royer *jt.*, 1991; Jowett *jt.*, 1992). Kokkuvõttes saab kindlalt öelda, et Gag valgu multimeriseerimisel ja partiklite formeerumisel omavad olulist rolli kõik struktuursete valkude domäänid, sest nende muteerumine võib häirida kogu protsessi (Deml *jt.*, 2004).

Viirus-sarnaseid partikleid, mis kasutatakse biokeemilistes ja immunoloogilistes analüüsid, puhastatakse ultratsentrifugeerimisega läbi sahharoosi või Optiprep gradiendi, mille tulemusel saadakse rohkem kui 80% puhtusega partikleid. Saadud 100-120 nm VLP-d sisaldavad umbes 1500-1800 Gag'i monomeeri ning on morfoloogiliselt

ja antigeeniliselt sarnased natiivsete virioonidega (Haffar *jt.*, 1992; Wagner *jt.*, 1992). VLP stabiilsus ja võimalus neid toota suures koguses teeb neid suurepäraseks vaktsiini kandidaatideks.



**Joonis 1: Skemaatiline joonis HIV Gag polüproteiinist ja partiklite formeerumisest.** (A) HIV Pr55gag polüproteiin koosneb erinevatest domäänidest (MA, CA, NC ja LI), mis aitavad (B) suunata Gag valgu tootja raku sisemisele plasmamebraanile ja (C) formeerida künse VLP. (D ja E) VLP pungumine HighFive putukate rakkudest. CP-tsütoplasma; EC-ekstratsellulaarne osa (Deml *jt.*, 2004).

### 1.1.2. Teise põlvkonna VLP-d

Gag valgul põhinevate VLP-de avastamine viis teise põlvkonna viirus-sarnaste partiklite ehk multi-epitoobiliste VLP-de arendamisele. Võrreldes esimese põlvkonna lipopartiklitega indutseerisid multi-epitoobilised VLP-d (sisaldavad enda pinnal spetsiifiliselt sünteesitud antigeenid) palju paremini humoraalsete antikehade vastust (Deml *jt.*, 2005). Antigeeni esinemise suurendamiseks VLP-de natiivses konformatsioonis viidi läbi erinevaid Env (*envelope*) valkude spetsiifilisi modifikatsioone (nt trunkeerimine või liitmine heteroloogiliste transmembraansete domäänidena) (Phogat ja Wyatt, 2007). See omakorda viis ristneutraliseerivate antikehade hulga suurenemisele.

Heteroloogiliste Env valkudega pseudotüpeeritud VLP-d võib kasutada platvormina spetsiifiliste valkude efektiivseks esitamiseks immuunsüsteemile. Partiklites olevate antigeenide suurt immunoloogilist potentsiaali rõhutab järgmine katse. Gag VLP-d, mis olid pseudotüpeeritud hobuse 1 tüüpi herpesviirusest (EHV-1) saadud gp14 glükoproteiiniga, kutsusid hiirtel esile tugeva immunkaitse EHV-1 vastu (Osterrieder *jt.*, 1995). Hiire leukeemiaviiruse (MLV- *Murine leukemia virus*) Gag-Env VLP-d, mis olid *in vitro* ekspresseeritud DNA plasmiidilt, indutseerisid tugeva spetsiifilise CTL vastust T-rakkude epitoopidega, kaitsedes hiire viiruse letaalsest mõjust (Bellier *jt.*, 2005).

### 1.1.3. Viirus-sarnaste partiklite immunogeensed omadused

Erinevalt lahustavatest antigeenidest, mida on vaja seonduda adjuvantidega immuunvastuse esilekutsumiseks, on VLP-d võimelised indutseerida tugeva rakulise ja humoraalse vastust otseste immunogeenidena (Grgacic ja Anderson, 2006).

VLP-de suurus on sobilik sisenemiseks dendriitrakkudesse läbi makropinotsütoosi või endotsütoosi, mis mängib olulist rolli sünnipärase ja adaptiivse immuunvastuse aktiveerimisel. Tänu oma struktuurile viib VLP-de sisenemine

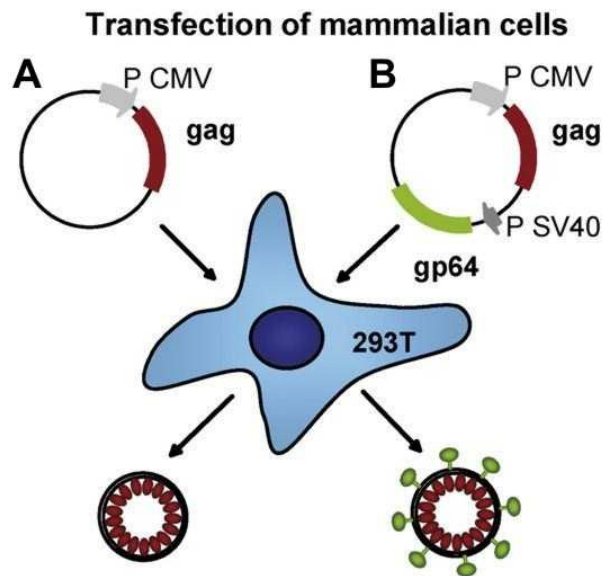
aktiivsele epitoopide töötlemisele ja esitamisele antigeeni presenteerivatele rakkudele (APCs). Protsessi toetavad VLP-de fusogeenne aktiivsus ja lipiidne koostis (Ludwig ja Wagner, 2007).

Katsed Gag VLP-dega, mis sisaldavad palju immunogeneetilisi epitoope, näitasid, et nad on võimelised stimuleerida rakulist immuunvastust nii I kui ka II klassi suure koosobivuskompleksi (MHC) radadelt (Deml *jt.*, 2005). Env valkude lisamine VLP-dele (nt VSV-G- *glycoprotein from vesicular stomatitis virus*), muudab lipopartiklite sisenemise läbi retseptorist sõltuva fusiooni efektiivsemaks ning suurendab epitoopide presenteerumist MHC I rajale ja indutseerib CTL vastuse kujunemist (Marsac *jt.*, 2002).

#### **1.1.4. VLP vaktsiinid**

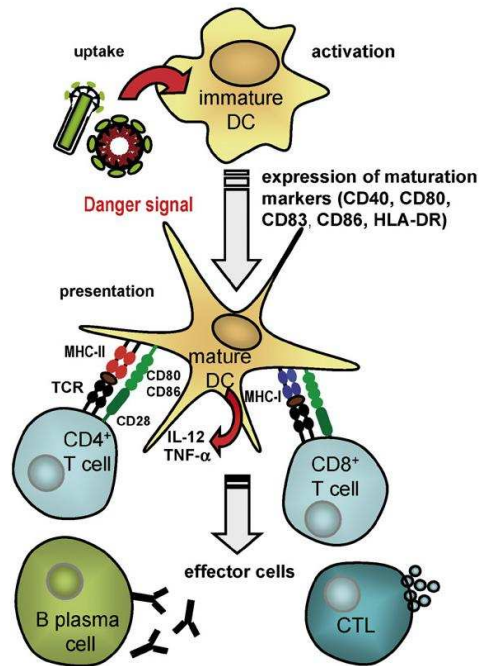
Tänu VLP-de struktuurile omavad VLP-del põhinevad vaktsiinid suurt eelist võrreldes tavaliste lahustavate antigeenidega, mis ei ole väga stabiilsed ja mõnedel juhtudel on nõrga immunogeensusega. Kuna VLP-d ei replitseeru ning ei nakata rakke, on nendel kindel eelis nõrgestunud viiruste vaktsiinide ees (Ludwig ja Wagner, 2007).

VLP produtseerimise muutus efektiivsemaks kui hakati kasutada rekombinantse DNA tehnoloogiat. 1984 aastal ekspresseeriti edukalt HBsAg antigeenist koosnevaid VLP-sid rekombinantsetes pärmi rakkudes (McAleer *jt.*, 1984). Tänapäeval kõige levinum viis VLP-de ekspresseerimiseks on imetaja rakkude transfekteerimine RNA-ga või DNA-ga (Joonis 2), ning putukate rakkude infitseerimine rekombinantse bakuloviirusega.



**Joonis 2: Imetajate 293 T rakkude transfekteeimine gag'i kodeeriva plasmiidiga.** (A) Imetajate rakkude transfekteeimine ainult gag geeni sisaldava plasmiidiga viib VLP-de, mis koosnevad ainult kapsiid valgust, formeerumisele. (B) Gp64 valgu ko-ekspressioon viib pseudotüpeeritud Gag VLP-de moodustamisele. P CMV- tsütomegaloviiruse promooter, P SV40- Simian viiruse 40 promooter (Ludwig ja Wagner, 2007).

VLP-de ekspresseerimine DNA plasmiididelt, mis kodeerivad gag geene, muutus efektiivseks strateegiaks kõrge immunogeensusega HIV vaktsiinide produtseerimisel (Young *jt.*, 2006). DNA-ga transfekteeitud rakkudes ekspresseeritavad VLP antigeenid on võimelised sisenema nii MHC I kui ka II klassi töötlemisrajale, stimuleerides nii CD8<sup>+</sup> ja CD4<sup>+</sup> T-rakulist ja lisaks ka B-rakulist vastust. Võrreldes lahustuvate antigeenidega on DNA vaktsiine lihtsam toota. VLP-de abil saab suurendada nõrgestatud vaktsiinide võimet stimuleerida MHC I poolt reguleeritud tsütotoksiliste T-lümfotsüütide (CTL) vastust (Joonis 3).



**Joonis 3: VLP vahendatud dendriit rakkude aktiveerimine.** VLP sisenemine aktiveerib raku läbi ohusignaali, mille tulemusel hakkatakse ekspresseerima küpsemismarkereid. Küpsed rakud edastab VLP-dest tulevad antigeene CD4<sup>+</sup> ja CD8<sup>+</sup> T-rakkudele läbi MHC I ja II raja. Tsütokiinide sekreteerimine stimuleerib diferentseerumist efektor B- ja T rakkudeks mille järgi toimub antikehade vabastamine ja CTL vastus (Ludwig ja Wagner, 2007).

Viimastel aastatel peetakse erinevaid lipopartikleid potentsiaalseks vaktsiinideks paljude viiruslike infektsioonide vastu: inimese immunodefitsiidi viirus (HIV), inimese papilloomiviirus (HPV), Norwalk viirus (NV), rotaviirus ja parvoviirus (Garcea ja Gissmann, 2004). HIV vastase vaktsiini väljatöötamisel selgus, et HIV-1 Pr55Gag polüproteiin ise formeerib partikli sfääre (Wagner *jt.*, 1992).

VLP-de pseudotüpeerimine heteroloogiliste Env valkudega võimendab VLP-de immunogeensust, sest suurendab VLP omastamist APC rakkude poolt (Ludwig ja Wagner, 2007). Näiteks vesikulaarse stomatiidi viiruse pinna glükoproteiini (VSV-G) liitmine HIV VLP-esse suurendas märkimisväärselt Gag-vastast antikehalist ja T-rakulist immuunvastust hiirtel ning vähendas vireemiat uuritavates ahvides (Kuate *jt.*, 2006).

## 1.2 Melanoom

Pahaloomulist melanoomi leidub küll harvemini kui sarnaseid basaalse ja lamerakuliste rakkude nahakasvajad, kuid ta on tervisele palju ohtlikum – melanoomi poolt põhjustatud surmade arv moodustab 75% kõikidest nahavähi poolt põhjustatud surmajuhtumitest. Melanoomi nimetatakse heleda nahaga inimeste haiguseks, kuid see võib areneda ka inimestel, kelle nahk on rohkem pigmenteerunud. Haiguse arengus toimuvad melanotsüütide pahaloomulised transformatsioonid (Vries ja Coebergh, 2004). Euroopas on melanoom oma esinemissageduselt vähkide pingereas meestel seitsmeteiskümnendal ja naistel kaheksandal kohal (Ferlay *jt.*, 2001). Melanoomi diagnoositakse tihti suhteliselt noortel inimestel (Osterlind, 1992).

Kõige olulisemaks teguriks nahavähkide, kaasa arvatud melanoomi, tekkimisel heleda nahaga inimestel on pikaajaline viibimine ultraviolettkiirguse käes (Armstrong ja Krickler, 1993). Kiirgus võib põhjustada melanoomi arengut kolme erineva mehhanismi kaudu: otseselt kahjustada DNA-d, mis viib mutatsioonide tekkele; produtseerida aktiivsed hapniku ühendid, mis omakorda kahjustavad DNA-d ja teisi raku struktuure või viia lokaalsele immunosupressioonile, mis blokeerib organismi kaitsevõimet (Ichihashi *jt.*, 2003). Lisaks ultraviolettkiirgusele mängivad olulist rolli nahavähi arengus ka endogeensed faktorid, nagu naha tüüp, immuunsüsteemi nõrkus, geneetiline eelsoodumus (Armstrong ja Krickler, 1993).

Melanooma kasvaja on uuritud palju tänu sellele, et varased uuringud näitasid antigeenide suurt sisaldust selles tuumori tüübis. (Parmiani *jt.*, 1990). Melanoomi antigeene uuriti palju aastaid raku tasemel tänu võimalusele saada T rakke melanoomi patsientide perifeerse vere (PBL) või lümfisõlmede lümfotsüütidest (Anichini *jt.*, 1987).

Kuna VLP meetodikat saab kasutada erinevate antigeenide sisselülitamiseks lipopartiklitesse, otsustati käesolevas töös konstrueerida melanoomi spetsiifiliste antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-d. Selleks valiti üheksa antigeeni, mis on seotud melanoomi kasvajaga või nendes toimuvate protsessidega. Väga heaks kandidaatideks oli melaniini sünteesi raja valgud (TYR, TRP1 ja TRP2) ning melanotsüütide diferentseerumisega seotud valgud (PMEL ja MART1). MCAM ja HMW-MAA

antigeenid kirjeldati esmakordselt melanoomi kasvajates. Kuna need on membraanivalgud, siis nende eksponeerimine VLP-de pinnal omab mitmeid eelisi. Membraanvalkude puhastamine on väga raskendatud, kui neid sünteesida imetajate rakkudes. Samuti, VLP-de pinnal antigeenid säilivad oma natiivse struktuuri. Lisaks eelnimetatud antigeenidele, valiti veel MAGE-A4 ja MAGE-A10 valke, mis saab leida paljudes kasvajates, kaasa arvatud melanooma tuumoris.

## **1.3 Melanoomi antigeenid**

### **1.3.1. Türosinaas (TYR), TRP1 ja TRP2**

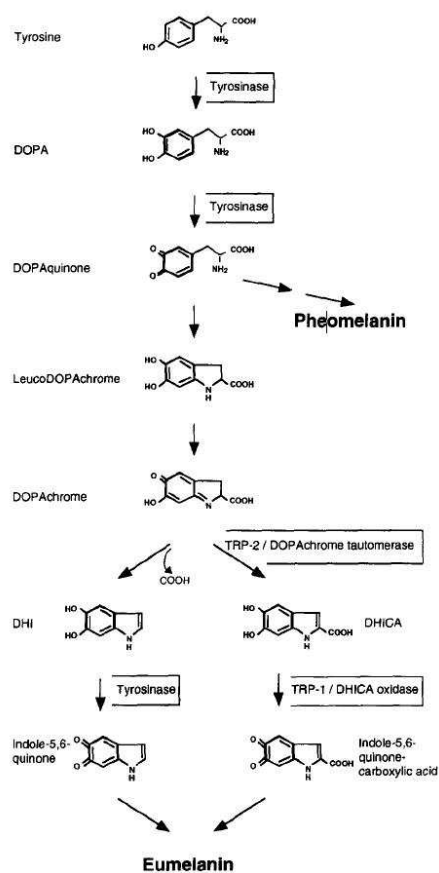
Melaniini süntees toimub melanotsüütides paiknevates spetsiaalsetes tsütoplasmaatilistes organellides - melanosoomides. Sünteesitakse kahte tüüpi melaniini: feomelaniin (kollane, punane) ja eumelaniin (pruun, must). Olulist rolli melaniini sünteesil omab ensüüm türosinaas (TYR), mis katalüüsib türosiini konverteerimist melaniini biopolümeeriks. Melaniini sünteesil osalevad veel kaks türosinaasiga seotud valku (TRPs; *tyrosinase related proteins*): TRP1 ja TRP2 (DOPAkroom tautomeraas) (del Marol ja Beermann, 1996).

Türosinaas on glükoproteiin, mis on N-terminuse kaudu seotud membraaniga. Türosinaas sünteesitakse endoplasmaatilises retiikulumis (ER) ja transporditakse läbi trans-Golgi võrgustiku melanosoomidesse (Garcia-Borron ja Solano, 2002). Türosinaas sünteesitakse 55 kDa valguna, edasine glükosüleerimine suurendab küpse valgu suurust 65-75 kDa-ni (Hearing ja Tsukamoto, 1991). Valk katalüüsib L-türosiini hüdroksüleerimist dihüdroksüphenüülalaniiniks (DOPA) ja DOPA oksüdeerimist DOPAkinooniks (Joonis 4) (Tripathi *jt.*, 1992). Mutatsioonid türosinaasi geenis põhjustavad inimestel albinismi (Oetting ja King, 1994).

Türosinaasiga seotud valgu 1 (TRP1) molekulmass on ~75 kDa (Halaban ja Moellmann, 1990). Valk koosneb 537 aminohapest ja omab 40-52% homoloogust türosinaasiga (Prota, 1992). Sarnaselt türosinaasile omab TRP1 hüdroksülaasset aktiivsust (Sarangerajan ja Boissy, 2001) ja on seotud L-türosinaasi konverteerimisega

DOPA-ks (Zhao *jt.*, 1994). Lisaks sellele omistatakse TRP1-le teisi katalüütilisi funktsioone, mis on seotud dopakroom tautomeraasiga (Dct), dihüdooksüindool (DHI) oksüdaasiga (Urabe *jt.*, 1993) ja 5,6-dihüdooksüindool-2-karboksüül happega (DHICA) (Olivares *jt.*,2001). Samuti on teada, et TRP1 on seotud melanosoomide struktuuri säilitamisega ja mõjutab melanotsüütide proliferatsiooni ja raku surma (Hirobe ja Abe, 1999). TRP1 on seotud ka türosinaasi katalüütilise aktiivsuse inaktiveerimisega (Manga *jt.*, 2000).

DOPAkroom tautomeraas (TRP2) osaleb DOPAkroom punase ühendi konverteerimisel värvitu eumelaniini vaheühendiks- DHICA-ks (Palumbo *jt.*, 1991). TRP2 küpse valgu molekulmass on ~75 kDa (Tsukamoto *jt.*, 1992).



**Joonis 4: Melaniini süntees türosiinist.** Joonisel näidatud türosinaasi, TRP1 ja TRP2 ensümaatilised reaktsioonid. DOPA- 3,4-dihüdooksüphenüülalaniin; DHICA- ja 5,6-dihüdooksüindool-2-karboksüül hape; DHI- 5,6- dihüdooksüindool (del Marol ja Beermann, 1996).

### 1.3.2. PMEL/gp100 ja MART1

PMEL/gp100 ja MART1 antigeenid esinevad melanoomis ja normaalsetes melanotsüütides ning on seotud melaniini biosünteesiga (Anichini *jt.*, 1993). PMEL/gp100 (*premelanosome protein*) on melanotsüütide spetsiifiline esimest tüüpi transmembraanne glükoproteiin. Seda valku leidub suurtes kogustes melanosoomides ja valgu peamiseks funktsiooniks on premelanosoomide struktuuri tagamine. PMEL valk on seotud maatriksi kiudude formeerumisega, mis on vajalik melanosoomide üleminekuks esimesest staadiumist teisse. Valgu õige funktsiooni omandamiseks peab ta läbima rida posttranslatsioonilise modifikatsioone (Watt *jt.*, 2013). Küpse valgu molekulmass on ~70,5 kDa. PMEL sekreteeritud valgu, mis on vabastatud proteolüütilisest ektodomäänist, saab kasutada melanoomi spetsiifilise seerumi markerina (Berson *jt.*, 2001).

MART1 (*melanoma antigen recognized by T-cells 1*) valk on kõrgelt ekspresseeritud varajastes melanosoomides ja on asendamatute nende küpsemisel. Peptiid koosneb 118 aminohapetest ning selle molekulmass on 18 kDa. (Wang *jt.*, 2001). (Kawakami *jt.*, 1997). MART1 on kolmandat tüüpi transmembraanne valk, mis paikneb endoplasmaatilises retiikulumis, trans-Golgi võrgustikus ja melanosoomides enamikus melanotsüütides ning melanoomi rakkudes. MART1 moodustab kompleksi PMEL valguga ja mõjutab PMEL valgu ekspressiooni, stabiilsust ja protsessingut posttranskriptsioonilisel tasemel (Hoashi *jt.*, 2005). MART1 tunnevad ära T-rakud ja teda kasutatakse tihti biomarkerina. MART1 mängib olulist rolli melanoomi immunoteraapias (Zippelius *jt.*, 2002).

### 1.3.3. MCAM ja HMW-MAA

MCAM (*melanoma cell adhesion molecule*) tugevat ekspressiooni detekteeriti kõigepealt progressiivse esmase ja metastaatilise melanoomi kudedes, kuid normaalsetes melanotsüütides selle valgu ekspressiooni ei esinenud. MCAM on

immunoglobuliini superperekonna adhesiooni molekul (Sers *jt.*, 1993). Küps valk, mille suurus on 113 kDa, koosneb ekstratsellulaarsest fragmendist (5 Ig domääni), ühest transmembraansesest regioonist ja tsütoplasmaatilisest sabast (Lehmann *jt.*, 1989). Antigeen omab olulist rolli erinevates melanoomiga seotud protsessides: tuumori kasv, metastaaside areng, homotüüpiline ja heterotüüpiline rakkude adhesioon ning suurenenud maatriksi metalloproteinaasi aktiivsus (Bu *jt.*, 2006). Viimased uuringud on näidanud, et MCAM on seotud signaali edastamisega rakkude vahel, rakkude migratsiooniga, mesenhümaalse tüvirakkude deferentseerumisega (Wang, Yan 2012), leukotsüütide migreerumisega perifeerse närvisüsteemi endoteliaalsetes rakkudes (Brucklacher-Waldert *jt.*, 2009) ning angiogeneesiga (Zhuang *jt.*, 2010).

HMW-MAA (*high-molecular weight melanoma associated antigen*) ehk CSPG4 (*Chondroitin sulfate proteoglycan 4*) antigeen tuvastati esmakordselt umbes 30 aastat tagasi inimese melanoomi rakkudes (Wilson *jt.*, 1981). See on esimest tüüpi raku pinnal paiknev transmembraanne valk molekulmassiga ~250kDa (Iida *jt.*, 2007). HMW-MAA valk koosneb kolmest struktuursest domäänist: suur ekstratsellulaarne domään, 25 aminohappeline transmembraanne regioon ja lühike 75 aminohappeline tsütoplasmaatiline domään (Stallcup, 2002). Valk on tugevalt seotud melanoomi tuumori formeerumisega ja kasvamisega (Price *jt.*, 2011). HMW-MAA antigeeni ekspressioon radiaalse kasvu faasis (RGP) inimese melanoomis aitab kaasa migratsioonile, proteaaside aktivatsioonile ning epiteeliale mesenhümaalsele transitsioonile (EMT). See viitab sellele, et valk mängib olulist rolli kasvaja progresserumisel radiaalsest kasvufaasist vertikaalsele (Yang *jt.*, 2009).

HMW-MAA valku ekspresseeritakse paljudes normaalsetes kudedes arengu käigus, mis viitab tema olulisele rollile kudede homeostaasis ja arengus. Uuringutes näidati, et antigeeni ekspressioon toimub ka melanotsüütides, kuid palju vähesemal määral kui melanoomis (Campoli *jt.*, 2010). Lisaks selle valgu rollile melanoomi kujunemisel on HMW-MAA seotud ka teiste pahaloomuliste kasvajatega: oligodendrotsütoom, glioom, rinnavähk ja lamerakkuline kartsinoom (Price *jt.*, 2011). Seega on HMW-MAA üks potentsiaalne terapeutiline sihtmärk pahaloomulise melanoomi ja teiste kasvujate ravimisel (Blank *jt.*, 2011).

### 1.3.4. MAGE-A perekonna valgud. MAGEA4 ja MAGEA10

MAGE (*melanoma-associated antigen*) perekond sisaldab 55 sarnast valgu (Chomez *jt.*, 2001). Vastavalt geeni struktuurile ja kohale, kus neid ekspresseeritakse, klassifitseeriti neid kaheks tüübiks: I tüüp - MAGE-A, MAGE-B ja MAGE-C ja II tüüp - MAGE-D geenid. II tüüpi geene ekspresseeritakse universaalselt kõikides kudedes. I tüüpi MAGE ekspressioon toimub vähesel määral normaalsetes kudedes (spermatotsüüdid, platsenta ja embrüonaalse arengu mõnedel etapidel) (Barker ja Salehi, 2002). I tüüpi MAGE antigeenide ekspressioon toimub paljudes pahaloomulistes kasvajates (Jang *jt.*, 2001). MAGE-A perekonna antigeenid ekspresseeritakse vähesel määral spermatotsüütides, tüümuses ja platsentas (Scanlan *jt.*, 2002). Suuremates kogustes saab neid leida erinevates pahaloomulistes kasvajates: melanoom, kopsuvähk, eesnäärmevähk, rinnavähk, hepatotsellulaarne vähk (Simpson *jt.*, 2005).

MAGE-A4 valk koosneb 317 aminohapetest ja tema teoreetiline molekulmass on 35 kDa. MAGE-A4 ekspressioon on leitud lamerakulises kartsinoomis, harvemini adenokartsinoomis. Valgu täpne funktsioon ei ole siiamani teada, kuid mõned uuringud näitavad, et ta võib olla seotud apoptoosi reguleerimisega (Peikert *jt.*, 2006). Hiljutistes uuringutes näidati, et MAGE-A4 C-terminaalne fragment indutseerib apoptoosi *in vitro* läbi p53-st sõltuva ja p53-sõltumatu raja (Sakurai *jt.*, 2001). See viidab sellele, et valk omab proapoptootilist efekti ja võib funktsioneerida tuumorsupressor valguna (Peikert *jt.*, 2006). Samuti on teada MAGE-A4 võimest osaleda apoptoosi reguleerimises testistes (Print ja Loveland, 2000).

MAGE-A10 on arvatavasti MAGE-A perekonna kõige immunogeensem antigeen (Groeper *jt.*, 2007). See on tuuma valk molekularmassiga ~70 kDa, mis ekspresseeritakse ainult spermatogooniumi rakkudes ja spermatotsüütides, aga mitte teistes normaalsetes kudedes (Scanlan *jt.*, 2002). Samas MAGE-A10 ekspresseeritakse suurel määral erinevates vähi tüüpides (Valmori *jt.*, 2001; Alves *jt.*, 2007; Lin *jt.*, 2004). Kõige rohkem on seda antigeeni leitud kopsu-, naha-, rinna- ja uroteliaalse vähi rakkudes (Schultz-Thater *jt.*, 2010, Lian *jt.*, 2012).

## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Vaatamata paljudele vähiuuringutele ja läbimurretele immunoloogias jääb melanoom tänapäeval üheks kõige ohtlikumaks vähitüübiks. Melanoom põhjustab inimestel kõrget suremust, kuna melanooma rakud ei allu ravile, nagu keemiateraapia või kiiritus. Siiaeni ei ole leitud head ravimi pahaloomulise melanoomi vastu, kuid uuringud pidevalt jätkuvad (Prota ja Mascagna, 1994).

Teiseks suureks probleemiks on melanoomi diagnoosimine. Vähi varajastel staadiumitel ei esine inimesel mingeid kindlaid sümptomeid, kuid melanoomi hilisemates staadiumites muutub haiguse ravimine väga raskeks. Praegu ei ole kahjuks ühtegi testi, mille abil saaks kindlaks teha melanoomi esinemist inimesel varajastel staadiumitel. VLP-de kasutamine inimese immunoloogilistes uuringutes avas meile palju uut võimalusi erinevate haiguste ravimisel. Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks on melanoomi spetsiifiliste antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-de produtseerimise tehnoloogia välja töötamine, kasutades imetajate rakkuliine, ning selle optimeerimine. Töö teiseks eesmärgiks oli melanoomi patsientide skriiningsüsteemi loomine. Skriiningu saaks teostada ELISA meetodiga, kasutades eelnevalt saadud VLP-d melanoomi spetsiifiliste antigeenidega.

## 2.2. Materjalid ja meetodika

### 2.2.1. Kasutatud plasmiidid

Melanoomi spetsiifiliste antigeenide ekspresseerimiseks VLP-de pinnal kasutati pQMCF ja pQMC vektoreid.

pQMCF-MLV-MAA (MAA-melanoma-associated antigen) vektori korral ekspresseeritakse CMV (*cytomegalovirus*) promootori alt MLV gag ja Hef1A (human elongation factor 1a) promootorilt melanoomi spetsiifiline antigeen. pQMCF vektorid konstrueeris Kiira Gildemann (TÜTI).

pQMC-MAA vektori korral ekspresseeritakse CMV promootorilt melanoomi spetsiifilise antigeeni, mille N-terminuses paikneb E2 Tag epitoop. pQMC-MAA vektorid on konstrueeritud Nele Jaansoniga (TÜTI) poolt.

Plasmiidide paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 $\alpha$ . Transformeeritud bakterirakke kasvatati LB söötmes kanamütsiini selektsiooni all (lõppkontsentratsioon- 100  $\mu$ g/ml). Plasmiidide eraldamiseks kasutati FavorPrep<sup>TM</sup> Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen) tootja protokoll järgi.

### 2.2.2. Rakuliinid

Eksperimendi läbiviimiseks kasutati imetaja rakuliini Cop5EBNA (hiire fibroblasti rakud, kus ekspresseeritakse Epstein-Barr'i viiruse tuumaantigeen). Rakke kasvatati IMDM söötmes (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), kuhu oli lisatud 10% veise loote seerumit (FCS) ning antibiootikume penitsilliin (100 U/ml) ja streptomütsiin (100 ng/ml) (Smart Media). Rakke kasvatati 37°C juures 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas (*Galaxy R CO<sub>2</sub> Incubator*).

### 2.2.3. Eukarüootsete rakkude transfektsioon elektroporatsiooni meetodil

Plasmiidide viimiseks Cop5EBNA rakkudesse kasutati elektroporatsiooni meetodit. Selleks koguti rakud 100 mm läbimõõduga 70-80% konfluentsuseni kasvanud koekultuuri tassidelt: sööde aspireeriti ning rakke pesti PBS-iga [0,15 M NaCl]. Seejärel rakud eemaldati tassilt 2 ml trüpsiinilahusega ning kanti tsentrifuugitopsi, kus oli 5 ml IMDM söödet. Rakud tsentrifuugiti põhja 1000 rpm 20°C juures 5 minutit (*Eppendorf centrifuge* 5810R). Supernatant aspireeriti ning rakkudele lisati 250 µl söödet ühe poratsiooni kohta. pH hoidmiseks kasutati NaBES puhvrit (pH=7,5) lõppkontsentratsioon 5 mM. Elektroporatsiooni küvetis segati 50 µg *carrier* DNA-d (lõhe sperma DNA), 3 µg ekspressioonivektoreid ja 250 µl rakususpensiooni. Elektroporatsioon viidi läbi *BioRad Gene Pulser II* aparaadiga 975 µF mahutavuse ning 230 V pinge juures. Rakkudel lasti seista ligikaudu 15 minutit, misjärel kanti 15 ml koekultuuri tuubidesse, millesse oli eelnevalt kantud 5 ml söödet ning tsentrifuugiti 5 minutit 1000 rpm 20°C juures (*Eppendorf centrifuge* 5810R). Seejärel sööde aspireeriti, rakud resuspendeeriti 1 ml söötmes ning kanti 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassidele, mis sisaldasid 8 ml söödet. Rakke kasvatati 72 tunni 37°C juures 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas (*Galaxy R CO2 Incubator*).

### 2.2.4. VLP-de ja rakkude kogumine

72 tunni pärast rakkude elektroporatsiooni koguti sööde ja rakud. Sööde valati tsentrifuugitopsi ja fuugiti 1000 rpm 20°C juures 5 minutit (*Eppendorf centrifuge* 5810R). Seejärel sööde filtreeriti läbi 0,45 µm filtri (*Sarstedt*) ja säilitati 4 °C juures. Rakud pesti PBS-ga, eemaldati neid 2 ml trüpsiiniga ning koguti 1,5 ml tsentrifuugituubidesse, lisades värsket söötme ja fuugiti põhja lauatsentrifuugis (*Sigma 1-14*) pöõretel 8300 rpm-i 5 minutit. Rakusade suspendeeriti 150 µl PBS-s ja lüüsi 30 µl 5xLaemmli puhvris (10% SDS, 50% glütserool, 250 mM Tris pH 6,8; 0,5% broomfenoolsinine) kuumutamiseks 10 minutit 100°C juures.

### 2.2.5. VLP-de kontsentreerimine ja puhastamine

VLP-de kontsentreerimiseks söötme proovid tsentrifuugiti läbi 5 ml 20% sahharoosi padja PBS-is 4°C juures 3 tundi 27000 rpm (SW28 rootor, *Beckmann*). VLP sade lahustati 300 µl TN puhvril (0,1M NaCl; 0,05M Tris-HCl) 24 tundi 4°C juures. Järgmisel päeval määrati proovides üldvalgu kontsentratsioon *Nanodrop*-iga 280 nm juures. 10 µg valku võeti *Western blot* analüüsile: lahustati PBS-is 20 µl-ni, lisati 5µl 5xLaemmli puhvri ja kuumutati 10 minutit 100°C juures.

VLP-de puhastamise järgmises etapis kasutati ultratsentrifuugimist sahharoosi astmelises gradiendis. Gradiendile, mis koosnes 20%, 35%, 45% ja 60% sahharoosi lahustest PBS-is, kanti 250 µl TN puhvril olevad VLP proovid ja fuugiti 4°C juures 3 tundi 32000 RPM (SW55 rootor, *Beckmann*). Gradiendid jagati 8 fraktsiooniks ja analüüsiti *Western blot* meetodil.

### 2.2.6. SDS-polüakrüülamiid geelelektroforees

VLP proovides olemasolevate valkude visualiseerimiseks lahutati valgud SDS polüakrüülamiid geelelektroforeesil (*SDS-Page*). Geelile kanti 20 µg valku. Kasutati 10% akrüülamiidgeeli ja 1xSDS jooksupuhvrit (125 mM Tris, 960 mM glütsiin, 0,5% SDS). Seejärel geeli värviti *PageBlue Protein Staining Solution* (*Thermo Scientific*) värviga ning pesti mitu korda destilleeritud veega.

### 2.2.7. *Western blot* analüüs

Võrdses koguses lüüsitud rakud ja VLP-de proovid (10 µg) lahutati SDS polüakrüülamiid geelelektroforeesi meetodil, kasutades 10% ja 12% akrüülamiidgeeli ja 1xSDS jooksupuhvrit. Valgud kanti geelist üle PVDF (*polyvinylidene fluoride*) filtrile (*Immobilon-P Millipore 0,45 µm*) poolkuiva ülekande abil (*Semi-Trans-Blotterile*, *Bio-Rad Manufactory*). Ülekanne viidi läbi 15 minutit 15 V pingel juures. Seejärel filter

blokeeriti ruumitemperatuuril 1 tund blokeerimislahuses [100 mM Tris (pH 7,5); 170 mM NaCl; 0,05% Tween 20 + 5% NFDM (lössipulber)]. Melanoomi spetsiifiliste antigeenide detekteerimiseks kasutati 5E11 antikeha ning antigeeni spetsiifilisi antikehi. 2% NFDM-iga Westerni pesulahusesse (100 mM Tris (pH 7,5); 170 mM NaCl; 0,05% Tween 20) lisati antikeha vastavas kontsentratsioonis (Tabel 1) ja inkubeeriti 1 tund kallutil. Pärast seda pesti filtrit 3 korda 15 minutit Westerni pesulahusega. Filter inkubeeriti 1 tund kallutil 2% lössipulbriga Westerni pesulahuses, kuhu oli vastavalt primaarsele antikehale lisatud HRP-ga konjugeeritud sekundaarne antikeha vastavas kontsentratsioonis (Tabel 1). Seejärel filter pesti jälle 3 korda 15 minutit Westerni pesulahusega, ning viidi läbi ilmutamisreaktsioon ECL *Kit*-iga (*Amersham Pharmacia Biotech*) vastavalt tootja protokollile. Signaal visualiseeriti autoradiograafiliselt *Fuji* röntgenfilmile.

*Tabel 1: Western blot analüüsi katsetes kasutatavate primaarsete ja sekundaarsete antikehade lahjendused.*

<b>Primaarne antikeha</b>	<b>Primaarse antikeha lahjendus</b>	<b>Vastav sekundaarne antikeha</b>	<b>Sekundaarse antikeha lahjendus</b>
anti-TYR (1E7) (TÜ Tehnoloogiainstituut)	1:3000	anti-mouse <i>HRP</i>	1:10000
anti-TRP2 ( <i>Santa Cruz Biotechnology</i> )	1:3000		
anti-MART1 ( <i>Santa Cruz Biotechnology</i> )	1:3000		
anti-MCAM ( <i>Santa Cruz Biotechnology</i> )	1:3000		
5E11 (TÜ Tehnoloogiainstituut)	1:3000		
anti-MAGE-A4 ( <i>Santa Cruz Biotechnology</i> )	1:100	anti-goat <i>HRP</i>	1:8000
anti-TRP1 ( <i>Santa Cruz Biotechnology</i> )	1:300		
anti-PMEL ( <i>Santa Cruz Biotechnology</i> )	1:100		
anti-MAGE-A10 ( <i>Santa Cruz Biotechnology</i> )	1:100	anti-rabbit <i>HRP</i>	1:10000
anti-HMW-MAA ( <i>Santa Cruz Biotechnology</i> )	1:1500		
anti-MLV gag ( <i>Icosagen</i> )	1:3000		

### 2.2.8. Immunofluorestsentsanalüüs

Immunofluorestsentsanalüüsi jaoks pandi 60 mm tassidele 18x18 mm läbimõõduga katteklasisid. Transfekteeritud rakke kasvatati 48 tunni 37°C juures 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas (*Galaxy R CO<sub>2</sub> Incubator*).

Transfekteeritud rakke pesti 3 korda PBS-ga, seejärel fikseeriti neid 15 minutit toatemperatuuril 4% PFA-PBS-ga ja pesti PBS-ga 3 korda 3 minutit loksutil. Membraani permeabiliseerimiseks töödeldi rakke 0,5% Triton X-100-ga PBS-s 10 minutit ning klaase pesti uuesti 3 korda 5 minutit.

Blokeerimiseks kanti alusklaasidele 1 ml 4% BSA-ga ja 0,05% Tween 20-ga PBS lahust. Rakke inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril loksutil. Seejärel lahjendati primaarne antikeha 1% BSA-ga ja 0,05% Tween 20-ga PBS lahuses lahjendusega 1:500, aspireeriti blokilahust ja kanti 100 µl primaarsete antikehade lahust igale alusklaasile ning inkubeeriti 1 tund loksutil. Siis pesti alusklaase 3 korda 5 minutit PBS-ga.

Sekundaarne antikeha lahjendati 1% BSA-ga ja 0,05% Tween 20-ga PBS lahuses lahjendusega 1:1000, pandi 100 µl lahust igale alusklaasile ja inkubeeriti 1 tund pimedas. Sekundaarse antikehana kasutati hiire IgG vastast antikeha, millele oli lisatud roheline fluorestsentsmärgis (anti-*mouse* Alexa 488, *Invitrogen*) ja küüliku vastast punase fluorestsentsmärgisega antikeha (anti-*rabbit* Alexa 568, *Invitrogen*). Siis pesti klaase 3 korda PBS-ga. Rakutuumade värvimiseks kasutati DAPI (4',6-diamidino-2-fenüülindool) värvi. Katteklasisid pesti destilleeritud veega ja tõsteti tagurpidi alusklaasidele (läbimõõt 76x26mm), kuhu oli pandud 6 µl sulunduslahust DAPI värviga (*Slowfade GOLD antifade reagent with DAPI, Invitrogen*). Immunofluorestsentsanalüüsi piltide tegemiseks kasutati Zeiss710 konfokaalmikroskoobi.

### 2.2.9. Ensüüm-immuunsorbtsioon (ELISA) analüüs

ELISA plaadid kaeti puhastatud VLP proovidega. Igasse *well*'i lisati PBS-is lahustatud VLP proovid, kokku 3 µg ja inkubeeriti üleöö 4°C juures.

Järgmisel päeval plaadid pesti 3 korda PBS-0,1% Tween-20 lahusega mitteseondunud VLP-de eemaldamiseks. Mittespetsiifiliste seondumissaite vähendamiseks blokeeriti plaate 5% NFD, 2% BSA ja 0,1% Tween-20 PBS lahuses, inkubeerides plaadi 1 tund 37°C juures. Seejärel plaadid pesti 4 korda 0,1% Tween-20 PBS lahusega. Igasse *well*'i lisati vastavaid spetsiifilisi primaarseid antikehi erinevates lahjenduses: 1/50, 1/150, 1/450 ja 1/1350 0,1% Tween-20 PBS lahuses, ning inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril loksutil. E2 tag valgu ekspresseerivatele VLP proovidele lisati 5E11 antikeha 1:5000, 1:20000, 1:80000 ja 1:320000 lahjendusega. Seerumite analüüsil tehti patsientide seerumitest erinevad lahjendused: 1/200, 1/400 ja 1/800 0,1% Tween-20 PBS lahuses ja negatiivseks kontrolliks Tween-20-PBS lahus ilma seerumita ning inkubeeriti plaate 1 tund toatemperatuuril loksutil. Melanoomipatsientide seerumite kogumiseks ja kasutamiseks on olemas Tallinna Meditsiiniuuringute Eetikakomitee luba (otsus nr. 2781).

Plaadid pesti jälle 4 korda 0,1% Tween-20 PBS lahusega (1 kord loputades ja 3 korda loksutil 3 minuti jooksul). Siis proovidele lisati vastavaid HRP-ga konjugeeritud sekundaarsi antikehi 100 µl 0,1% Tween-20 PBS lahuses järgmistes lahjendustes: anti-*mouse HRP*- 1/5000, anti-*goat HRP*-1/8000 ja anti-*rabbit HRP*-1/10000 ning inkubeeriti 45 minutit toatemperatuuril loksutil. Seejärel plaadid pesti jälle 4 korda 0,1% Tween-20 PBS lahusega, ning lisati 100 µl *TMB+ Substrate (BioRad)* reagendi ja inkubeeriti 10-15 minutit toatemperatuuril. Reaktsiooni peatumiseks lisati 100 µl 0,2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Reaktsioonide analüüsiks kasutati *Sunrise™ (Tecan)* mikroplaadi lugejat ning tulemus määrati 450 nm juures.

### **3. TULEMUSED**

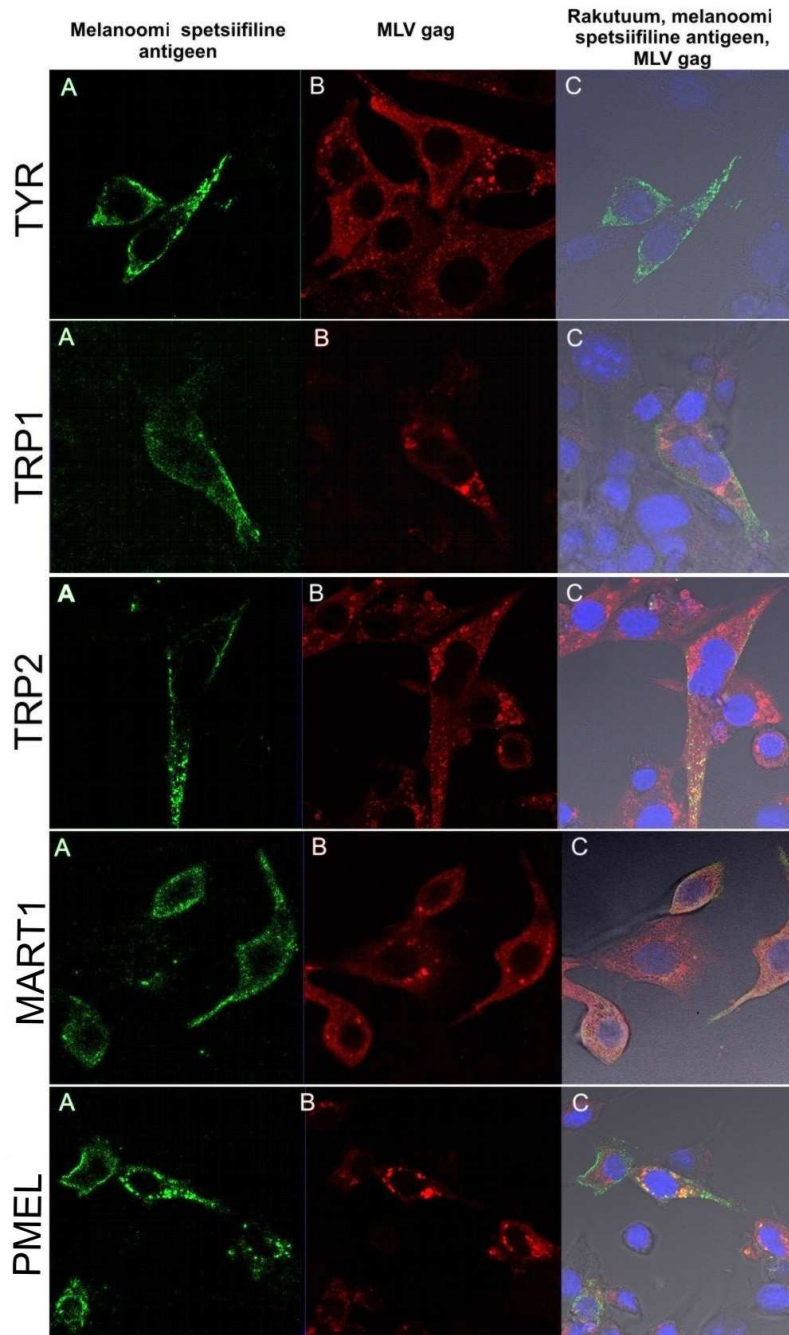
#### **3.1 Melanoomi spetsiifiliste antigeenide ekspressioon imetajate rakkudes**

Melanoomi spetsiifiliste antigeenide ekspresseerimiseks imetajate rakkudes ja edasiseks VLP produtseerimiseks transfekteeriti hiire fibroblasti rakud (Cop5EBNA) eelnevalt konstrueeritud plasmiididega, mis ekspresseerivad meid huvitavaid antigeene. Transformatsioon teostati kahel erineval viisil. Esimesel korral viidi rakkudesse plasmiid, kust ekspresseeritakse nii antigeeni valk kui ka MLV gag kapsiidi valk. Teisel korral transfekteeriti rakke kahe plasmiidiga korraga: ühelt ekspresseeritakse antigeeni valk koos E2 tag epitobiga ja teiselt- MLV gag kapsiidi proteiin. See andis meile võimaluse määrata melanoomi spetsiifiliste antigeenide esinemist VLP-des nii valgu spetsiifiliste antikehadega, kui ka E2 tag'i vastase antikehaga (5E11).

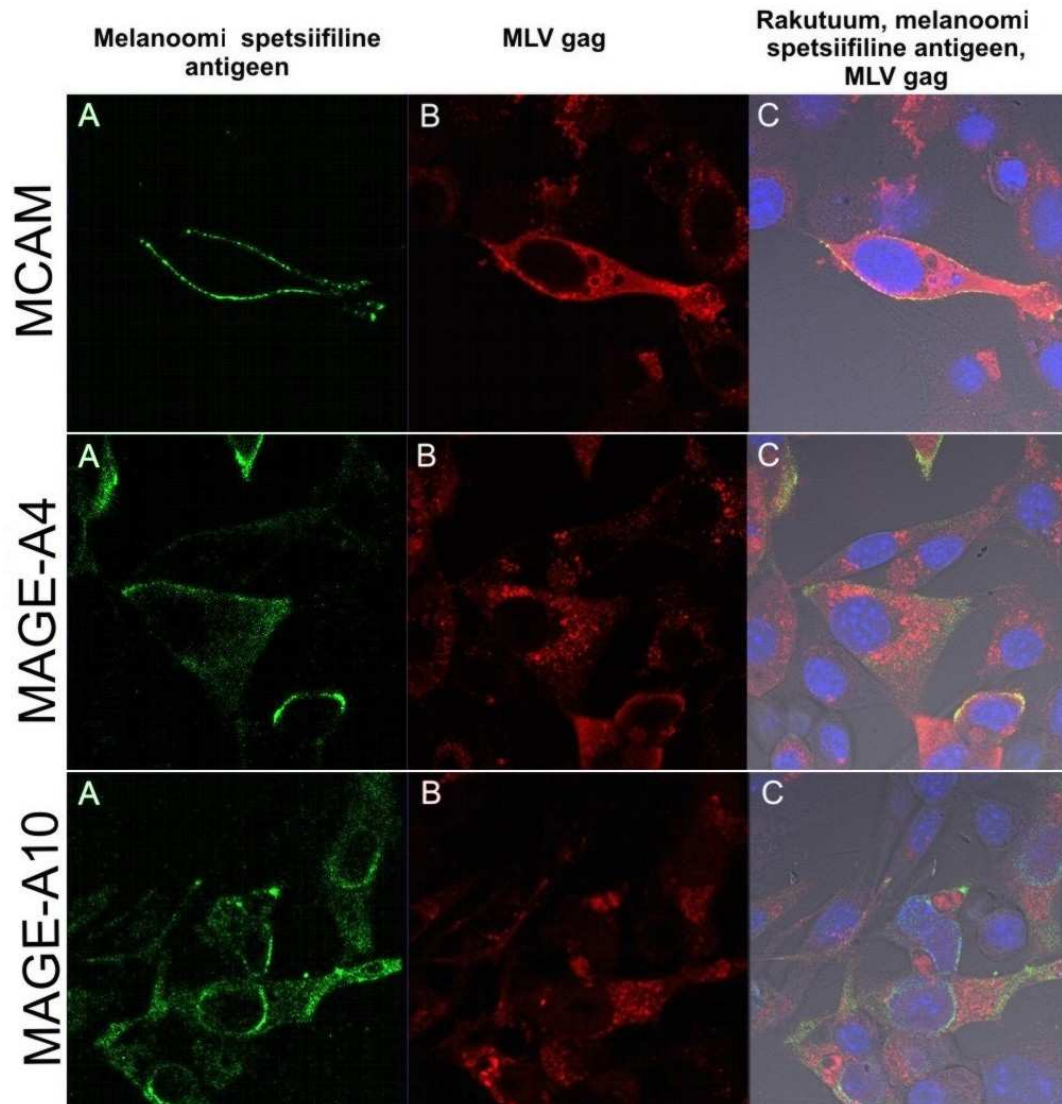
MLV gag valgu ja melanoomi spetsiifiliste antigeenide ekspressiooni ja lokalisatsiooni määramiseks viidi läbi immunofluorestsentsanalüüs. Kõigepealt IF analüüsi tulemused näitasid, et MLV gag valk lokaliseerub suurtes kogustes kõikides rakkudes tsütoplasmas (Joonis 5B, 6B). Kõik melaniini sünteesi raja antigeenid (TYR, TRP1 ja TRP2) ekspresseerivad raku tsütoplasmas (Joonis 5A). Samuti lokaliseeruvad raku tsütoplasmas melanotsüütide diferentseerumisega seotud antigeenid (MART1 ja PMEL) (Joonis 5A) ja MAGE-A4 valk (Joonis 6A).

Immunofluorestsentsanalüüsilt on näha, et MCAM ja HMW-MAA antigeenid ekspresseeritakse rakkude plasmamembraanides. MAGE-A10 antigeen leidub suuremates kogustes tuuma membraani all ning natuke vähesel määral rakkude tsütoplasmas (Joonis 6A).

Katse näitas, et kõik melanoomi spetsiifilised antigeenid ekspresseeritakse Cop5EBNA rakkudes ning nende lokalisatsioon vastab teistest allikatest saadud andmetele.



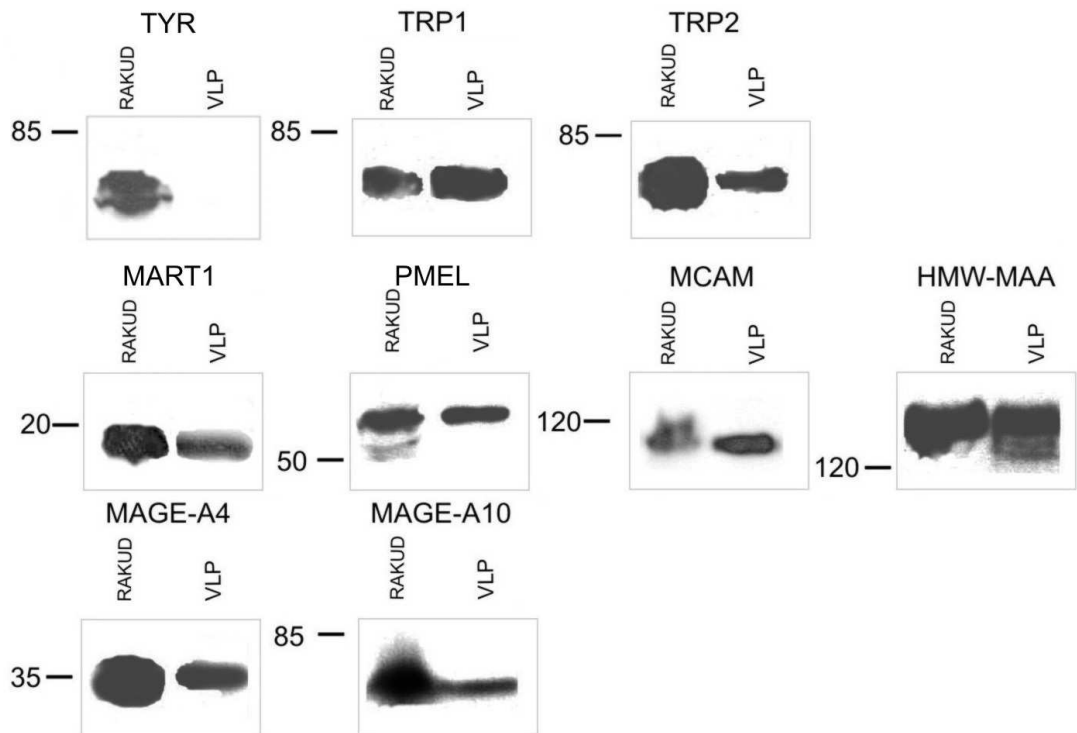
**Joonis 5: Melanosoomides paiknevat valkude ja MLV gag proteiini ekspressimine Cop5EBNA rakkudes.** (A,C) Melanoomi spetsiifiliste antigeenide detekteerimiseks kasutati E2 Tag'i vastast antikeha (TRP1 ja PMEL) või antigeeni spetsiifilist antikeha (TYR-1E7, TRP2 ja MART1) ja vastavat sekundaarset antikeha Alexa-488 fluorestsentsmärgisega (roheline). (B,C) MLV gag valgu detekteerimiseks kasutati MLV gag'i vastast antikeha ja sekundaarset antikeha anti-rabbit Alexa-568 (punane). (C) Rakutuumad on värvitud DAPI värviga (sinine). Kasutatud on konfokaalmikroskoop Zeiss LSM710.



*Joonis 6: Melanoomaga seotud transmembraanse valgu (MCAM), kasvaja antigeenide (MAGE-A perekond) ja MLV gag kapsiidvalgu ekspresserimine Cop5EBNA rakkudes. (A,C) Melanooma spetsiifiliste antigeenide detekteerimiseks kasutati E2 Tag'i vastast antikeha (MAGE-A4 ja MAGE-A10) või antigeeni spetsiifilist antikeha (MCAM) ja vastavat sekundaarset antikeha Alexa-488 fluorstsentsmärgisega (roheline). (B,C) MLV gag valgu detekteerimiseks kasutati MLV gag'i vastast antikeha ja sekundaarset antikeha anti-rabbit Alexa-568 (punane). (C) Rakutuumad on värvitud DAPI värviga (sinine). Kasutatud on konfokaalmikroskoop Zeiss LSM710.*

### 3.2 Melanoomi spetsiifiliste antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-de formeerimine

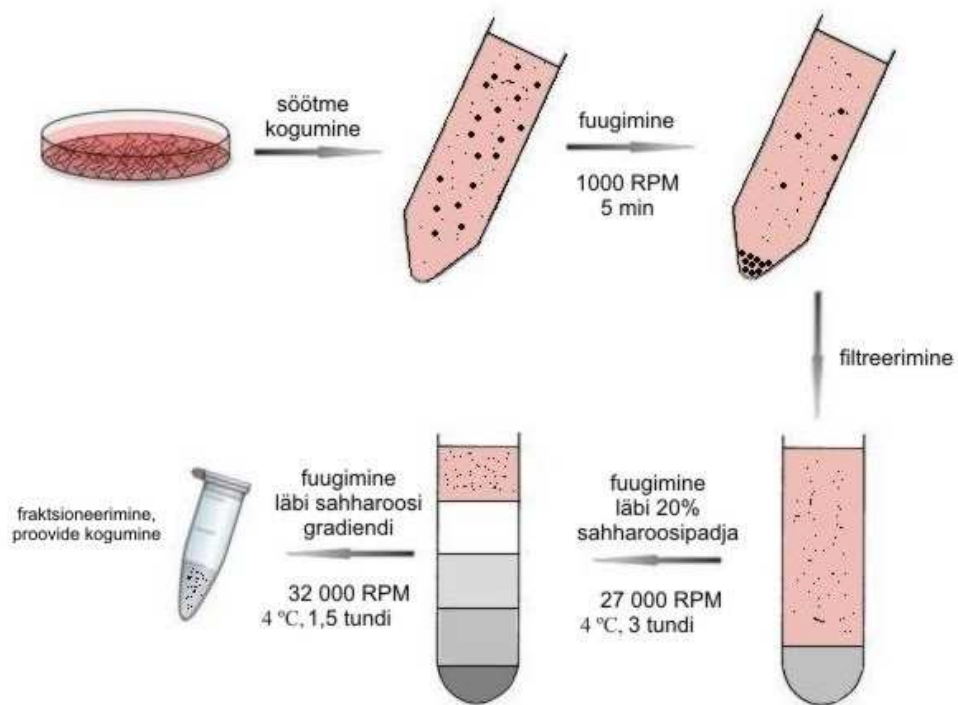
Melanoomi spetsiifiliste antigeenide ekspresseerumist VLP-des kontrolliti *Western blot* meetodi abil. Selleks võeti transfekteeritud rakkuliinidest rakkude proovid. VLP produtseerimise käigus lipopartiklid pungusid rakkude pinnalt ning jäid söötmesse, mis oli korjatud petri tassidelt ning filtreeritud, et saada lahti surnud rakkudest. Rakkude ja VLP proove lüüsi 5xLaemmli puhvris ja teostati geel elektroforees analüüs. Meid huvitavate valkude olemasolu kontrolliti *Western blot* analüüsiga. TRP2, MAGE-A4, PMEL ja MAGE-A10 valgud sisaldavad C-terminuses E2 Tag'i epitoobi. Nende antigeenide detekteerimiseks kasutati E2Tag'i vastast antikeha 5E11 kui primaarset antikeha ja HRP-ga konjugeeritud anti-*mouse* kui sekundaarset antikeha. TYR, TRP1, MART1, MCAM ja HMW-MAA ekspressiooni kontrolliks kasutati valgu spetsiifilisi antikehi ja nendele vastavat sekundaarse antikeha (Tabel 1). Ekspressiooni hindamiseks tehtud *Western blot* pildid on välja toodud joonisel 7. Piltidel on näha, et nii rakkudes, kui ka VLP-des ekspresseeritakse MART1, MCAM, TRP1, TRP2, MAGE-A4, MAGE-A10, HMW-MAA ja PMEL antigeene. TYR antigeeni ekspressiooni määrati rakkudes, kuid VLP proovides seda ei esinenud. Piltidelt on näha, et MART1 valgu suurus on alla 20 kDa, TRP1, TRP2 ja MAGE-A10 — alla 85 kDa, MCAM — alla 120 kDa, MAGE-A4 — umbes 35 kDa, HMW-MAA — üle 120 kDa ja PMEL üle 50 kDa. See kõik on vastavuses nende teoreetilise molekulmassiga ja varem kirjeldatud andmetega



*Joonis 7: Melanoomi spetsiifiliste antigeenide ekspresseerumine Cop5EBNA rakkudes ja nende poolt formeerunud VLP-des. Rakkudes ekspresseeritakse kõik valitud antigeene; VLP-des — kõik, välja arvatud TYR valk.*

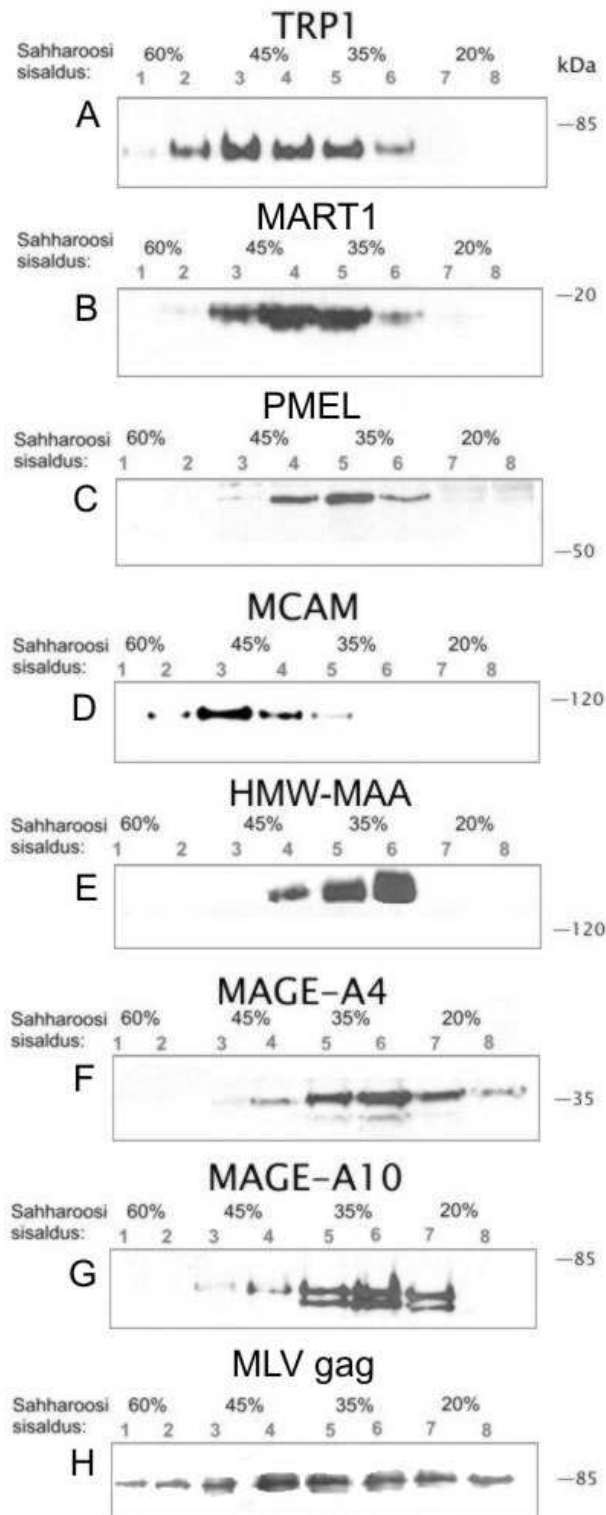
### 3.3 VLP-de puhastamine

Kõigepealt poreeritud rakkudest võetud söötme proovid filtreeritakse, et saada lahti surnud rakkudest ja ülejäänud rakkude osakestest. VLP-de kontsentreerimiseks fuugiti nad läbi 20% sahharoosi padja. VLP proovide puhtusastme suurendamiseks, et neid saaks kasutada skriining süsteemis, teostati veel üks puhastamisetapp. Selleks viidi läbi ultratsentrifuugimine läbi sahharoosi astmelise gradiendi (20%, 35%, 45% ja 60% sahharoosi PBS-s lahus). Pärast fuugimist jagati proovid 8 fraktsiooniks (Joonis 8).



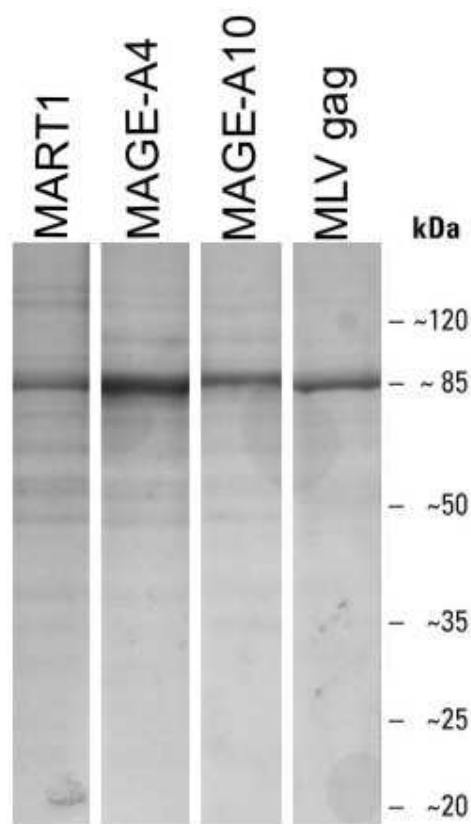
**Joonis 8: VLP-de puhastamis etapid.** Poreeritud rakkudest saadud söötme proovid filtreeritakse, fuugitakse läbi 20% sahharoosi padja, seejärel läbi sahharoosi astmelise gradiendi ning fraksioneeritakse.

Saadud proove analüüsiti *Western blot* meetodiga. Joonisel 9H on näha, et MLV gag valk jaotub üle kogu gradiendi. Pseudotüpeeritud VLP-de signaal oli detekteeritav vaid osades fraksioonides. MART1, TRP1 ja MCAM antigeeniga VLP-d jäid 35% ja 45% sahharoosi lahuse kihtidesse (Joonis 9A, 9B ja 9D). MAGE-A4 ja MAGE-A10 antigeeniga pseudotüpeeritud VLP-d paiknesid sahharoosi lahjemates kihtides (35% ja 20%) (Joonis 9F ja 9G) ning PMEL ja HMW-MAA antigeenidega VLP-d jäid 35% sahharoosi kihis (Joonis 9C ja 9E). TRP2-ga pseudotüpeeritud VLP-de signaal oli väga nõrk ja neid andmeid ei ole siin esitatud.



**Joonis 9: Melanoomi spetsiifiliste antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-de ja MLV gag valgu jaotus sahharoosi gradiendis. (A-G) Enamik pseudotüpeeritud VLP-dest jäävad 35% ja 45% sahharoosi-PBS lahuse kihtidesse. (H) MLV gag valk jaotub gradiendis ühtlaselt.**

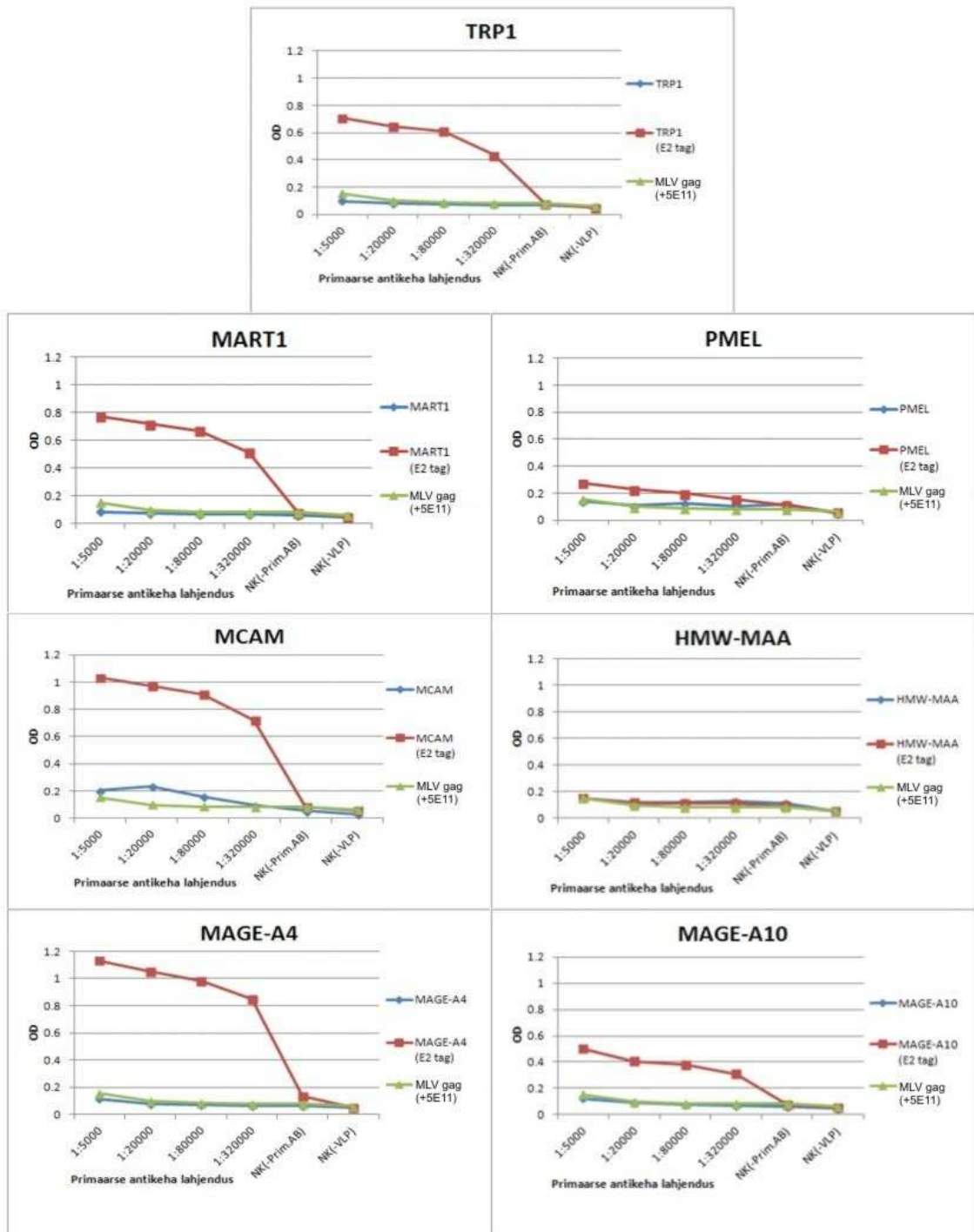
Samuti teostati geel elektroforees analüüs, et määrata puhastatud VLP-de valgulist koostist. Joonisel 10 on näha, et VLP proovides on kõige suuremas koguses MLV gag valku (85 kDa). Samuti on ka päris palju teisi valke, mis kuuluvad VLP-de koostisesse. Valkude värvimisel ei ole melanoomi spetsiifiliste antigeenide üleekspressioon detekteeritav. See viitab sellele, et nende osakaal VLP-des on suhteliselt väike.



**Joonis 10: VLP-de analüüs SDS-geel elektroforeesil.** Valgud on värvitud Coomassie Blue-ga.

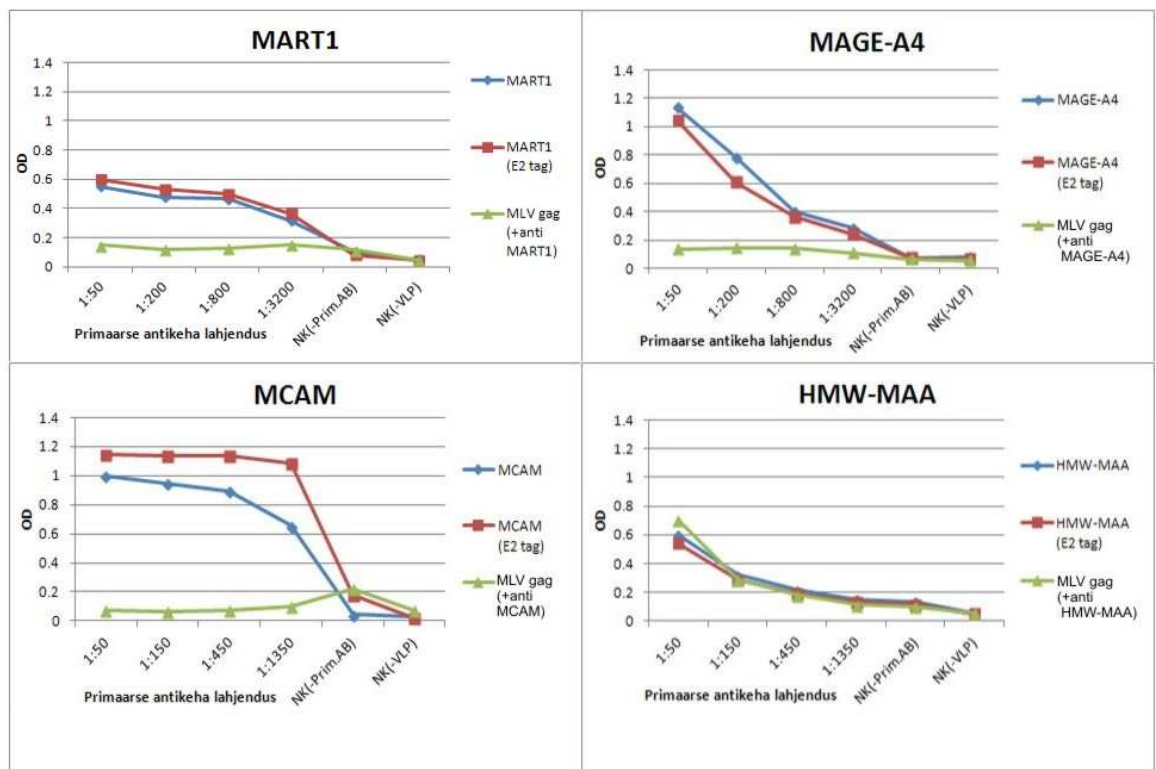
### 3.4 VLP-de analüüs ELISA meetodiga

Melanoomi spetsiifiliste antigeenide ekspresseerumist VLP-de pinnal kontrolliti ensüüm-immuunsorbtsiooni (ELISA) analüüsiga. Selleks võeti puhastatud VLP proovid rakuliinidest, mis olid transfekteeritud plasmiidiga, kus antigeeni C-terminuses paikneb E2 Tag epitooop. Seejärel ELISA plaadid kaeti pseudotüpeeritud VLP-dega, 3 µg VLP-sid iga well'i kohta. VLP-des ekspresseerivate antigeenide detekteerimiseks kasutati primaarsena antikehana 5E11 antikeha, mis andis võimaluse võrrelda omavahel erinevate antigeenide ekspressiooni taset. Sekundaarse antikehana kasutati anti-*mouse* antikeha, mis oli konjugeeritud HRP-ga. Negatiivseks kontrolliks kasutati analüüsis pseudotüpeerimata VLP-d (MLV gag) ning VLP-d, kus ekspresseeritakse antigeen ilma E2 tag valguta. Katse lõpus tuli välja, et kõige tugevam signaal oli detekteeritav MART1, MCAM, TRP1, MAGE-A4 ja MAGE-A10 pseudotüpeeritud VLP-de korral. PMEL antigeeniga VLP-dest tulenev signaal oli väga madalal tasemel (Joonis 11). HMW-MAA antigeeni E2 tag'i vastase antikehaga tuvastada ei õnnestanud.



Joonis 11: Melanoomi spetsiifiliste antigeene ekspresseerivate VLP-de ELISA analüüs kasutades 5E11 antikeha.

Järgmisena teostati ELISA analüüs MART1, MCAM, MAGE-A4 ja HMW-MAA antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-dega, kus antigeeni esinemist kontrolliti valkude spetsiifiliste antikehadega. Negatiivseks kontrolliks kasutati pseudotüpeerimata VLP-d (MLV gag). MART1, MCAM ja MAGE-A4 vastase antikehaga tehtud katsed andsid positiivse tulemuse, kuid HMW-MAA vastase antikeha kasutamine näitas, et spetsiifiline signaal on sama tugevusega, mis on negatiivsel kontrollil (Joonis 12). TRP1 ja PMEL vastast antikeha sel katsel kasutada ei saanud, kuna nende sekundaarne anti-goat antikeha andis ristreaktsiooni teiste VLP-des esinevatega valkudega. MAGE-A10 vastast antikeha ei kasutati, kuna selle afiinsus oli väga väike.

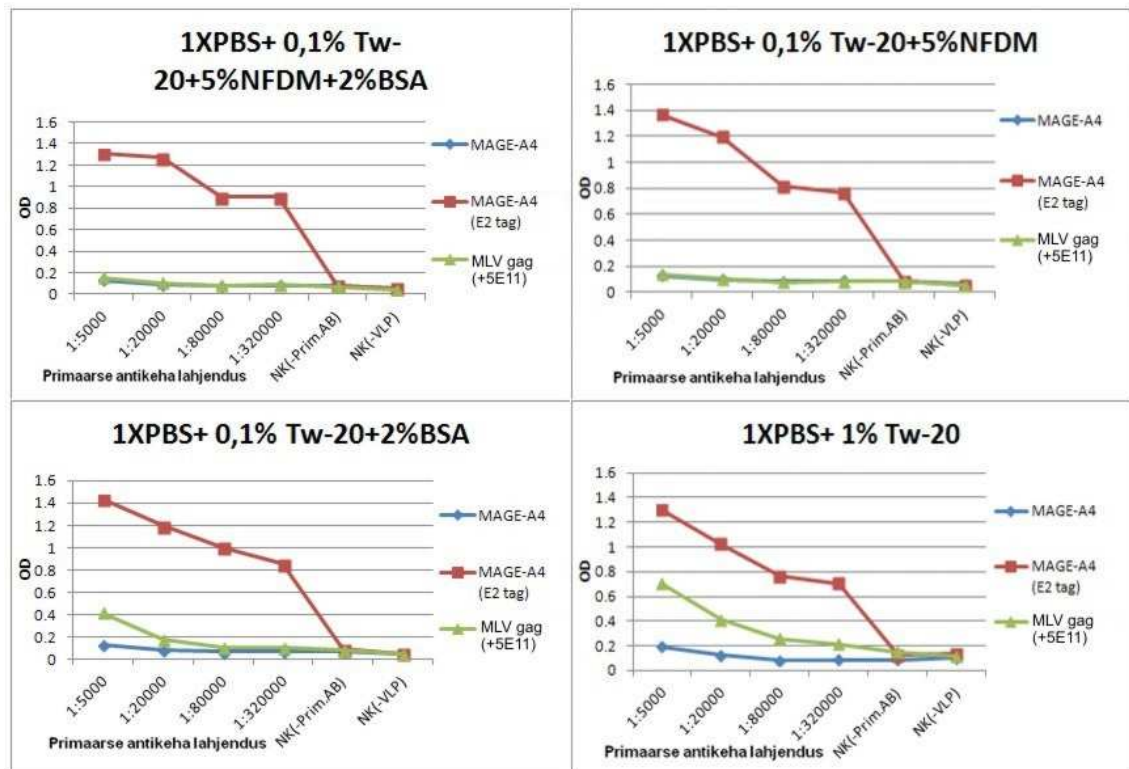


Joonis 12: Melanooma spetsiifiliste antigeene ekspresseerivate VLP-de ELISA analüüs kasutades antigeeni spetsiifilisi antikehi.

*Western blot* ja ELISA analüüside tulemused näitasid, et meil õnnestus saada pseudotüpeeritud VLP-sid viie melanoomi spetsiifilise antigeeniga (MART1, MCAM, TRP1, MAGE-A4 ja MAGE-A10). Neid otsustati kasutada edasises uuringus ning läbi viia melanoomi patsientide seerumite skriining.

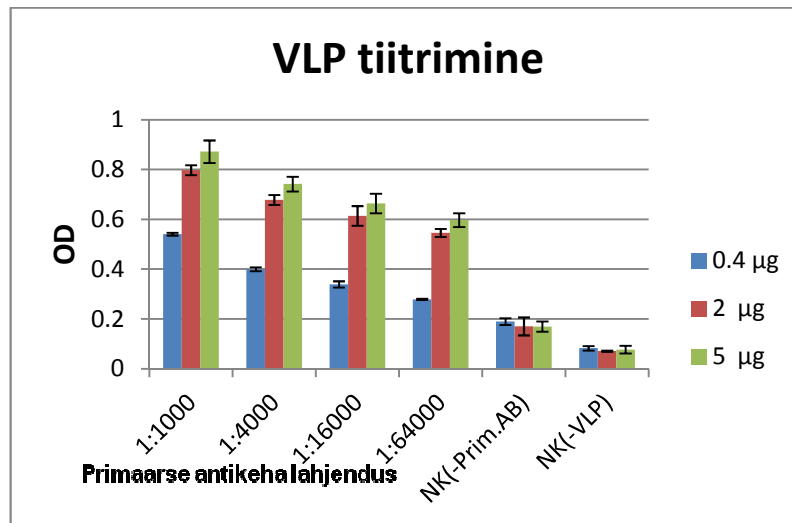
### **3.5 VLP-de ELISA analüüsi meetodi optimeerimine**

VLP-de kasutamiseks patsientide seerumite skriinimises viidi kõigepealt läbi ELISA analüüsi optimeerimine. Kuna VLP-d sisaldavad väga palju teisi valke, lisaks transfekteeritud plasmiididest sünteesitavale antigeenidele, prooviti kasutada erinevaid blokilahuseid mittespetsiifiliste seondumissaite vähendamiseks. Positiivseks kontrolliks kasutati VLP proove, mis olid pseudotüpeeritud MAGE-A4 antigeeniga koos E2 tag'iga. Negatiivseks kontrolliks kasutati pseudotüpeerimata VLP-sid (MLV gag) ja MAGE-A4 antigeeniga VLP-sid ilma E2 tag'ita. Valkude detekteerimiseks kasutati E2 Tag'i vastast 5E11 antikeha ja HRP-ga konjugeeritud sekundaarset anti-*mouse* antikeha. Esmase blokilahusena kasutati PBS- Tw-20 (0,1%) lahust, kuhu lisati 5% NFDM-i või veise 2% BSA-t (*bovine serum albumine*) ning nende kombinatsioone. PBS-i ja 1% Tw-20 lahuse blokeerimis omadused olid väga nõrgad, kuna negatiivne proov (MLV gag) andis positiivse signaali. Natuke parema tulemuse saime PBS- Tw-20 ja 2 % BSA lahuse kasutamisel. Kuid antikeha suuremas kontsentratsioonis (1:5000) andis negatiivne kontroll samuti positiivse signaali. Kõige parema tulemuse andsid PBS- Tw-20 lahused, kuhu oli lisatud 5% NFDM-i ning 2% BSA-t ja 5% NFDM-i koos. Positiivsed proovid olid mõlema lahusega sama tugevusega ning negatiivsetel kontrollidel ei esinenud ristreaktsiooni (Joonis 13). Edasiseks uurimiseks otsustati kasutada PBS- Tw-20 (0,1%) lahust 2% BSA-ga ja 5% NFDM-iga.



**Joonis 13: Erinevate blokilahuste kasutamine VLP-del põhineva ELISA analüüsi meetodil.** PBS- Tw-20 (0,1%) lahused, kuhu oli lisatud 5% NFDm-i või 2% BSA-t ja 5% NFDm-i koos blokeerisid mittespetsiifilisi saite kõige paremini. Valkude detekteerimiseks kasutati primaarse 5E11 antikeha ja HRP-ga konjugeeritud sekundaarse anti-*mouse* antikeha.

Lisaks sellele tehti VLP tiitrimine, et määrata ELISA analüüsiks vajalikku VLP-de kogust. ELISA plaadid olid kaetud epitoop tag'i sisaldava MART1 antigeeniga pseudotüpeeritud VLP proovidega erinevates kogustes: 0,4 µg, 2 µg ja 5 µg. Valkude detekteerimiseks kasutati primaarse 5E11 antikeha ja HRP-ga konjugeeritud sekundaarse anti-*mouse* antikeha. Katse tulemusega otsustati melanoomi patsientide seerumi skriinimisel kasutada 3 µg VLP proove, kuna 0,4 µg andis väga madala signaali ning 2 µg ja 5 µg vahel suurt erinevust ei esinenud (Joonis 14).

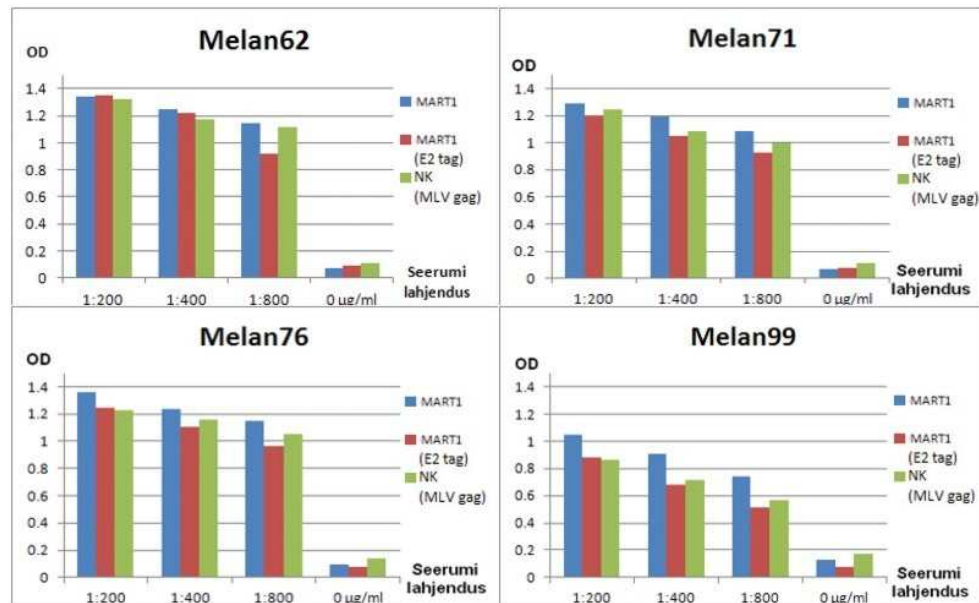


Joonis 14: VLP tiitrimine ELISA analüüsiks.

### 3.6 VLP-del põhineva ELISA kasutamine melanoomi patsientide seerumite analüüsil

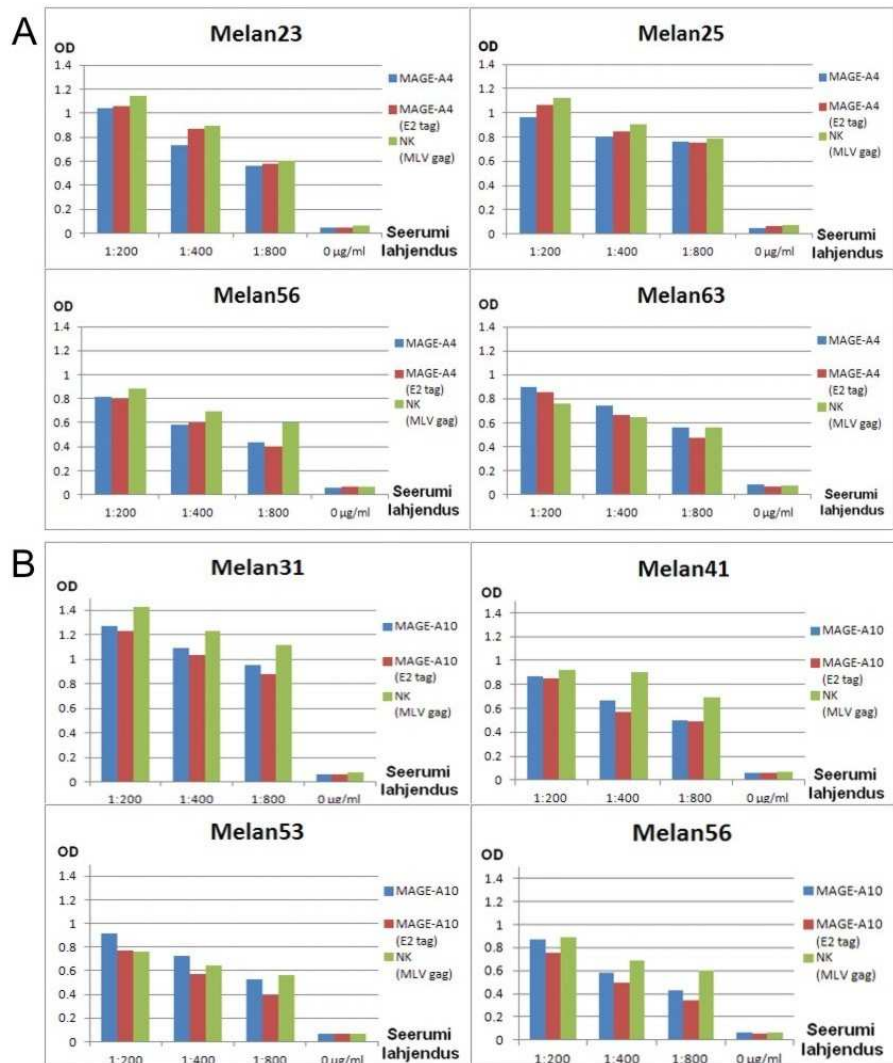
Melanoomi patsientide seerumite analüüsiks kaeti ELISA plaadid melanoomi spetsiifiliste antigeenidega (MART1, MCAM, TRP1, MAGE-A4 ja MAGE-A10) pseudotüpeeritud VLP-dega, lõppkogus 3 µg iga well'i kohta. Negatiivseks kontrolliks kasutati pseudotüpeerimata VLP-sid (MLV gag). VLP proovidele kanti erineva lahjendusega (1:200, 1:400 ja 1:800) melanoomi patsientide seerumi lahused PBS - Tw-20-s ning negatiivseks kontrolliks ainult PBS - Tw-20 lahus. Sekundaarse antikehana kasutati HRP-ga konjugeeritud anti-*human* antikeha. Varasemalt olid tehtud patsientide seerumite analüüsid kasutades bakteris sünteesitud MAGE-A4 ja MAGE-A10 valke ning imetaja rakkudes sünteesitud MART1 valku. Saadud tulemustest valiti VLP ELISA analüüsiks seerumid, mis andsid tugeva positiivse signaali nende antigeenide suhtes ja viidi nendega läbi analüüs samade antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-dega. Tulemused näitavad, et ükski patsiendi seerumi proov ei anna positiivset tulemust. MART1 antigeeniga pseudotüpeeritud VLP-dega katses olid kõik väärtused samal tasemel pseudotüpeerimata VLP-dega (MLV gag), välja arvatud *Melan99* patsiendi seerumiga, kus spetsiifilise antigeeniga VLP-dest tulenev signaal oli natuke kõrgem kui

negatiivsel kontrollil ja antigeeniga ning E2 tag'iga pseudotüpeeritud VLP-dest (Joonis 15).



**Joonis 15: Melanoomi patsientide seerumite ELISA analüüs MART1 antigeeniga pseudotüpeeritud VLP-dega.**

Nii MAGE-A4 kui ka MAGE-A10 antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-dega ELISA katsed ei andnud positiivseid tulemusi. Peaaegu kõikide patsientide seerumite analüüsil olid negatiivse kontrolli (pseudotüpeerimata VLP-d) signaalid kõrgemad võrreldes pseudotüpeeritud VLP-dega (Joonis 16A ja 16B). Saadud tulemused viitavad sellele, et VLP-del põhinev ELISA analüüs ei oma piisavat tundlikkust tänu antigeenide väikesele sisaldusele VLP-des, mida näitas eelnevalt tehtud geelektrofoores (Joonis 10).



Joonis 16: Melanoomi patsientide seerumite ELISA analüüs MAGE-A4 (A) ja MAGE-A10 (B) antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-dega.

## ARUTELU

Tänapäeval on üheks kõige ohtlikumaks haiguseks vähk. Melanoom on nahavähi vorm, mis põhjustab väga palju surma juhtumeid inimestel selle haiguse hilistes staadiumites. Siiani ei ole teadlastel õnnestunud leida ravi või vaktsiini, millega saaks melanoomiga haigestunud inimesi ravida. Lisaks sellele esinevad paljud probleemid melanoomi diagnoosimisega varajastel staadiumitel, kui haigust oleks palju lihtsam ravida. Diagnoosiks saaks kasutada viimasel ajal immunoloogilistes uuringutes laialt kasutatavat VLP-de süsteemi. VLP-d- on tühjad viiruspartiklid, mis ei sisalda infektsiooniks vajalikku materjali. Üheks lipopartiklite eeliseks on nende võime eksponeerida oma pinnal tootjarakkudes ekspresseeritud valke. Käesoleva töö esmärkideks oli VLP-de genereerimine koos nende pinnal asuvate melanoomi spetsiifiliste antigeenidega ning nende alusel melanoomi patsientide skriining süsteemi välja töötamine. Kuna seda tüüpi katseid tehti esmakordselt, siis töö käigus vajas VLP-de tootmis ja nende põhjal skriining süsteemid optimeerimist.

Kõigepealt valiti tööks välja üheksa antigeeni, mis on seotud melanoomi kasvajaga või nendes toimuvate protsessidega: melaniini sünteesi raja valgud- TYR, TRP1 ja TRP2 (Jackson, 1994), melanotsüütide diferentseerumisega seotud valgud - PMEL ja MART1 (Kawakami *jt.*, 1997; Watt *jt.*,2013), esmakordselt melanoomi kasvajates kirjeldatud antigeenid MCAM ja HMW-MAA ning MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud, mida on leitud paljudes kasvajates, kaasa arvatud melanooma tuumoris (Simpson *jt.*, 2005). Valitud antigeenide ekspresseerimiseks imetajate rakkudes ja VLP-des kasutati kahte tüüpi vektoreid: esimene, kus vektorisse oli sisse viidud melanoomi spetsiifilise antigeeni geen ja lipopartiklite kapsiidvalgu MLV gag geen ning teine, kus vektoris olev antigeeni piirkond oli ühendatud E2 tag epitobiga.

Töö alguses määrati meie poolt valitud antigeenide lokalisatsiooni rakkudes kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. Katses saadud tulemused läksid täiesti kokku eelnevalt saadud informatsiooniga valitud valkude kohta. Melaniini sünteesi raja, melanotsüütide diferentseerumisega seotud valgud ja MAGE-A4 ekspresseeruvad rakkude tsütoplasmas. Transmembraansete valkude (MCAM ja HMW-MAA) (Iida *jt.*,

2007) tugev lokalisatsioon toimus rakkude plasmamembraanis ja MAGE-A10 antigeen, mis on kirjeldatud kui tuumavalk (Schultz-Thater *jt.*, 2010), lokaliseerub põhiliselt tuuma membraani all.

VLP-de tootmissüsteemi väljatöötamiseks melanoomi spetsiifiliste antigeene sisaldavate vektoritega transfekteeriti rakke ja võeti sööde. VLP-de puhastamiseks sööde filtreeriti ja fuugiti läbi 20% sahharoosi padja, mis aitas lahti saada surnud rakkudest ja raku osakekestest. Melanoomi spetsiifiliste antigeenide esinemise testimisel tuvastati, et VLP-desse lülitati sisse kõik meie poolt valitud melanoomi spetsiifilised antigeenid, välja arvatud TYR valk. Samuti näitas analüüs, et VLP-des asuvate antigeenide suurused lähevad kokku nende valkude ennustatud suurustega, mis viitas sellele, et tegu on õigesti sünteesitud valkudega.

VLP-de puhtusastme suurendamiseks, et neid saaks kasutada skriining süsteemis, viidi läbi ultratsentrifuugimine sahharoosi gradiendis. See aitas meil lahti saada proovides olevates VLP-dest, mis ei sisaldanud melanoomi antigeene. Fraktsioonide analüüsi tulemused näitavad, et erinevate antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-d paiknevad erinevates sahharoosi kihtides, kuid kõige suuremates kogustes jäid nad 35% ja 45% sahharoosi kihtidesse. TRP2-ga pseudotüpeeritud VLP-d andsid ultratsentrifuugimisel väga madala signaali. Üheks selle põhjuseks võiks olla madal antigeenide sisaldus VLP-des. Seega otsustati TRP2-ga pseudotüpeeritud VLP-sid edasises uuringus mitte kasutada.

VLP-de valgulise koostise määramisel selgus, et proovides on kõige suuremas koguses MLV gag valku. Lisaks sellele on ka päris palju teisi valke, mis tulid rakkudest kaasa VLP formeerumisega. Kahjuks ei olnud detekteeritav melanoomi spetsiifiliste antigeenide üle-ekspressioon, mis viitab sellele, et nende kogus VLP-des on väga madal.

Melanoomi patsientide skriinimiseks otsustati kasutada ELISA meetodit. Kuna VLP-del põhineva ELISA meetodi kasutamisest oli väga vähe informatsiooni, tuli seda kõigepealt optimeerida. Selleks kasutati erinevaid blokeerimislahuseid ja teostati VLP tiitrimine. Melanoomi spetsiifiliste antigeenide ekspressiooni kontrolliks VLP-de pinnal

kasutati E2 tag'i vastast antikeha, mis andis võimaluse samadel tingimustel võrrelda omavahel erinevad pseudotüpeeritud VLP-sid. Lipopartiklite pinnal olevate antigeenide spetsiifilisust kontrolliti valkude spetsiifiliste antikehadega. Katse tulemused näitasid, et patsientide skriinimiseks saab kasutada TRP1, MART1, MCAM, MAGE-A4 ja MAGE-A10 antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-sid. Nende puhul vahed positiivsete ja negatiivsete väärtuste vahel olid märkimisväärselt suuremad, kui PMEL ja HMW-MAA antigeenidega VLP-de puhul. Kahe viimaste puhul võis tegu olla ka antigeenide madala sisaldusega lipopartiklite pinnal.

Melanoomi patsientide skriinimisel selgus, et VLP-del põhineva meetodi tundlikkus on väga madal ning sellega ei saa detekteerida melanoomi spetsiifiliste antigeenide vastaseid antikehi patsientide seerumis. Paralleelselt tehtud analüüside abil, kus kasutati imetaja rakkudes sünteesitud ja puhastatud MART1 valku ning bakteris sünteesitud ja puhastatud MAGE-A4 ja MAGE-A10 valku, tuvastati mitmeid positiivse signaali andnud patsiente ülaltoodud antigeenide suhtes. Samade patsientide skriinimisel VLP-de süsteemiga ei saadud aga positiivseid vastuseid.

Käesoleval töö käigus töötati välja melanoomi spetsiifiliste antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-de genereerimise meetodika. Selle põhjal loodud melanoomi patsientide skriining süsteem ei oma aga piisavat tundlikkust. Selle peamiseks põhjuseks on antigeenide väike sisaldus VLP-des ning suur arv tootjarakkudest kaasatulevaid valke, mis annavad väga palju ristreaktsioone. Kui tõsta spetsiifiliste antigeenide osakaalu VLP-des ning vähendada mittespetsiifiliste valkude arvu VLP-des, siis saaks suure tõenäosusega seda meetodit efektiivselt kasutada skriiningutes.

## KOKKUVÕTE

Melanoom on tänapäeval üks kõige ohtlikumaid nahavähi vorme. Võrreldes teiste nahakasvajatega põhjustab melanoom palju rohkem surmajuhtumeid. Väga oluline on melanoomi diagnoosimine varajastes staadiumites. Selle probleemi üheks lahenduseks võiks olla VLP-de kasutamine patsientide skriinimisel. VLP-d on tühjad viiruspartiklid, mis ei sisalda infektsiooniks vajalikku geneetilist materjali. Nende võime eksponeerida enda pinnal tootjarakkudes ekspresseeritud valke oleks suureks eeliseks skriiningsüsteemi loomisel.

Käesoleva magistritöö eksperimentaalse osa eesmärkideks oli melanoomi antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-de genereerimine ning nendel põhineva patsientide skriiningsüsteemi välja töötamine. Töö käigus töötati välja ja optimeeriti VLP-de produtseerimise ja puhastamise protokoll. Meil õnnestus saada kaheksa erineva melanoomi spetsiifilise antigeeniga pseudotüpeeritud VLP-d.

Lipopartiklitel põhineva skriiningsüsteemi kontrollimisel selgus, et mõnede antigeenidega pseudotüpeeritud VLP-d ei anna spetsiifilist signaali ELISA analüüsil. Selle üheks põhjuseks võiks olla spetsiifiliste antigeenide väike sisaldus VLP-de pinnal. Melanoomi patsientide seerumite skriinimisel kasutati viie antigeenidega pseudotüpeeritud lipopartikle. VLP-del põhineva skriinigu tulemused ei läinud kokku eelnevalt tehtud samade patsientide seerumite analüüsiga, mis oli teostatud puhastatud valkudega. Seega VLP-del põhinev ELISA analüüs ei ole piisavalt tundlik, et seda saaks kasutada antikehade detekteerimiseks vere seerumitest.

# **Generation of virus like particles pseudotyped with melanoma specific antigens**

Sergei Jagur

## **Summary**

Nowadays melanoma is one of the most dangerous skin cancers. It is much more fatal than the familiar basal and squamous cell tumours of the skin. Scientist have not find any treatment or vaccine against this disease yet. In addition, there is no diagnostic tool for screening of patients with early melanoma stadiums. One solution for this problem could be the construction of melanoma diagnostic tool that is based on VLP's. VLP's are empty viruse particles that do not contain any infectious material. VLP's have a big advantage in developing novel diagnostic tool, because they are able to present exogenously expressed membrane proteins on the surface of the particle.

The aim fo this study was to produce VLP's pseudotyped with the melanoma specific antigens and to develope a novel melanoma screening system based on pseudotyped VLP's. During this work we have optimized the production and purification of the lipoparticles, because there was not enough information about similar experiments. Finally we managed to produce eight VLP's with different melanoma specific antigens.

Unfortunately, we couldn't use VLP's pseudotyped with all eight melanoma antigens in screening system. Our data showed, that VLP's with some antigens don't give enough strong signal for detection of antigens with specific antibodies. It could be caused by the little percentage of the melanoma antigens on the surface of VLP. We used VLP's with five different antigens for screening of melanoma patients serum. ELISA analyse with purified melanoma specific antigens showed positive results against some melanoma patients serum. On the other hand, ELISA analyse with

pseudotyped VLP's didn't gave any positive signal with same patients serum. Therefore screening system based on pseudotyped VLP's is not enough sensitive for detection of antibodies in blood serum.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Alves PM, Levy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Givel JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F. **Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer.** *Cancer Immunol Immunother* 2007;**56**: 839–47.

Anichini A, Fossati G, Parmiani G: **Clonal analysis of the cyto-lytic T-cell response to human tumors.** *Immunol Today* 1987; **8**: 385-389

Anichini A, Maccalli C, Mortarini R, Salvi S, Mazzocchi A, Squarcina P, Herlyn M, Parmiani G: **Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients.** *J Exp Med* 1993; **177**: 989-998

Armstrong BK, Kricger A. **How much melanoma is caused by sun exposure?** *Melanoma Res* 1993, 3(6), 395–401.

Arthur, L.O., Bess Jr., J.W., Sowder, R.C., Benveniste, R.E., Mann, D.L., Chermann, J.C., Henderson, L.E., 1992. **Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines.** *Science* **258**, 1935–1938.

Barker PA, Salehi A. **The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease.** *J Neurosci Res* 2002;**67**:705–12.

Bayer ME, Blumberg BS, Werner B: **Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis.** *Nature* 1968, **218**:1057-1059.

Bellier B, Dalba C, Clerc B, Desjardins D, Drury R, Cosset FL, Collins M, Klatzmann D: **DNA vaccines encoding retrovirusbased virus-like particles induce efficient immune responses without adjuvant.** *Vaccine* 2006, **24**:2643-2655 Epub 2005 December 5.

Berson, J.F., Theos, A.C., Harper, D.C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M.S. (2003). **Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis.** *J. Cell Biol.* **161**, 521–533.

Blank, C.U., Hooijkaas, A.I., Haanen, J.B., and Schumacher, T.N. (2011). **Combination of targeted therapy and immunotherapy in melanoma.** *Cancer Immunol. Immunother.* **60**, 1359–1371.

Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. **Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis.** *Brain* 2009; **132**: 3329–41.

Bu P, Gao L, Zhuang J, Feng J, Yang D, Yan X. **Anti-CD146 monoclonal antibody AA98 inhibits angiogenesis via suppression of nuclear factor-kappaB activation.** *Mol Cancer Ther* 2006; **5**: 2872–8

Campoli, M., Ferrone, S., and Wang, X. (2010). **Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4.** *Adv. Cancer Res.* **109**, 73–121.

Chazal, N., Carriere, C., Gay, B., Boulanger, P., 1994. **Phenotypic characterization of insertion mutants of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor expressed in recombinant baculovirus-infected cells.** *J. Virol.* **68**, 111–122.

Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S. **An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family.** *Cancer Res* 2001;**61**:5544–51.

Delchambre, M., Gheysen, D., Thines, D., Thiriart, C., Jacobs, E., Verdin, E., Horth, M., Burny, A., Bex, F., 1989. **The GAG precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles.** *EMBO J.* **8**, 2653–2660.

Deml L, Speth C, Dierich MP, Wolf H, Wagner R: **Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses.** *Mol Immunol* 2005, **42**:259- 277 Review.

Dorfman, T., Luban, J., Goff, S.P., Haseltine, W.A., Gottlinger, H.G., 1993. **Mapping of functionally important residues of a cysteinehistidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein.** *J. Virol.* **67**, 6159–6169.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. **GLOBOCAN 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0.** *IARC cancerbase No.5.* Lyon, IARC Press, 2001.

Freed, E.O., Orenstein, J.M., Buckler White, A.J., Martin, M.A., 1994. **Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production.** *J. Virol.* **68**, 5311–5320.

Freed, E.O., Martin, M.A., 1995. **Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix.** *J. Virol.* **69**, 1984–1989.

Garcea RL, Gissmann L: **Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules.** *Curr Opin Biotechnol* 2004, **15**:513-517 Review.

Garcia-Borron, J. C. and Solano, F., **Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center.** *Pigm. Cell. Res.* 2002. **15**: 162–173.

Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H., Ozel, M., Pauli, G., Koch, M.A., 1987. **Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins.** *Virology* **156**, 171–176.

Gelderblom, H.R., 1991. **Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function.** *AIDS* **5**, 617–637.

Gottlinger, H.G., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., 1989. **Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5781–5785.

Grgacic EV, Anderson DA: **Virus-like particles: passport to immune recognition.** *Methods* 2006, **40**:60-65 Review.

Groeper C, Gambazzi F, Zajac P, Bubendorf L, Adamina M, Rosenthal R, Zerkowski HR, Heberer M, Spagnoli GC. **Cancer/testis antigen expression and specific cytotoxic T lymphocyte responses in non small cell lung cancer.** *Int J Cancer* 2007;**120**:337–43.

Haffar, O., Garrigues, J., Travis, B., Moran, P., Zarling, J., Hu, S.L., 1990. **Human immunodeficiency virus-like, nonreplicating, gag-env particles assemble in a recombinant vaccinia virus expression system.** *J. Virol.* **64**, 2653–2659.

Halaban R. and G. Moellmann, **Murine and human b locus pigmentation genes encode a glycoprotein (gp75) with catalase activity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 12, pp. 4809–4813, 1990.

Hearing V., K. Tsukamoto: **Enzymatic control of pigmentation in mammals.** *FASEB J.*, **5** (1991), pp. 2902–2909

Hirobe T. and H. Abe, **Genetic and epigenetic control of the proliferation and differentiation of mouse epidermal melanocytes in culture.** *Pigment Cell Research*, vol. 12, no. 3, pp. 147–163, 1999.

Hoashi T, Watabe H, Muller J, Yamaguchi Y, Vieira WD and Hearing VJ: **MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes.** *J Biol Chem* **280**: 14006-14016, 2005.

Hong, S.S., Boulanger, P., 1993. **Assembly-defective point mutants of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor phenotypically expressed in recombinant baculovirus-infected cells.** *J. Virol.* **67**, 2787–2798.

Hoshikawa, N., Kojima, A., Yasuda, A., Takayashiki, E., Masuko, S., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T., 1991. **Role of the gag and pol genes of human immunodeficiency virus in the morphogenesis and maturation of retrovirus-like particles expressed**

**by recombinant vaccinia virus: an ultrastructural study.** *J. Gen. Virol.* **72**, 2509–2517.

Ichihashi M, Ueda M, Budiayanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, et al. **UV-induced skin damage.** *Toxicology* 2003, **189(1–2)**, 21–39.

Iida, J., Wilhelmson, K.L., Ng, J., Lee, P., Morrison, C., Tam, E., Overall, C.M., and Mccarthy, J.B. (2007). **Cell surface chondroitin sulfate glycosaminoglycan in melanoma: role in the activation of pro-MMP-2 (pro-gelatinase A).** *Biochem. J.* **403**, 553–563.

Jackson I: **Molecular and Developmental Genetics of Mouse Coat Color.** *Annu. Rev. Genet.*, 1994, pp. **28**: 189–217

Jang SJ, Soria JC, Wang L, et al. **Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis.** *Cancer Res* 2001;**61**:7959–63.

Jowett, J.B., Hockley, D.J., Nermut, M.V., Jones, I.M., 1992. **Distinct signals in human immunodeficiency virus type 1 Pr55 necessary for RNA binding and particle formation.** *J. Gen. Virol.* **73**, 3079– 3086.

Karacostas, V., Nagashima, K., Gonda, M.A., Moss, B., 1989. **Human immunodeficiency virus-like particles produced by a vaccinia virus expression vector.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 8964–8967.

Kawakami Y, Battles JK, Kobayashi T, *et al*: **Production of recombinant MART-1 proteins and specific antiMART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1.** *J Immunol Meth* **202**: 13-25, 1997.

Kuate S, Stahl-Hennig C, Stoiber H, Nchinda G, Floto A, Franz M, Sauermann U, Bredl S, Deml L, Ignatius R et al.: **Immunogenicity and efficacy of immunodeficiency virus-like particles pseudotyped with the G protein of vesicular stomatitis virus.** *Virology* 2006, **351**:133-144.

Lehmann J.M., G. Riethmuller, J.P. Johnson, **MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 9891–9895.

Lian, Y., Sang, M., Ding, C., Zhou, X., Fan, X., Xu, Y., et al. (2012). **Expressions of MAGE-A10 and MAGE-A11 in breast cancers and their prognostic significance: a retrospective clinical study.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **138(3)**, 519-527.

Lin J, Lin L, Thomas DG, Greenson JK, Giordano TJ, Robinson GS, Barve RA, Weishaar FA, Taylor JM, Orringer MB, Beer DG. **Melanoma-associated antigens in esophageal adenocarcinoma: identification of novel MAGE-A10 splice variants.** *Clin Cancer Res* 2004;**10**:5708–16.

Ludwig, C., Wagner, R. **Virus-like particles - universal molecular toolboxes.** *Current Opinion in Biotechnology*, (2007). **18(6)**, 537-545.

Manga P., K. Sato, L. Ye, F. Beermann, M. Lynn Lamoreux, and S. J.Orlow, **Mutational analysis of the modulation of tyrosinase by tyrosinase-related proteins 1 and 2 in vitro** *Pigment Cell Research*, vol. 13, no. 5, pp. 364–374, 2000.

Marmol, V. D., & Beermann, F. **Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation.** *FEBS Letters*, (1996). **381(3)**, 165-168.

Marsac D, Loirat D, Petit C, Schwartz O, Michel ML: **Enhanced presentation of major histocompatibility complex class I restricted human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag specific epitopes after DNA immunization with vectors coding for vesicular stomatitis virus glycoprotein-pseudotyped HIV-1 Gag particles.** *J Virol* 2002, **76**:7544-7553.

McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR: **Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast.** *Nature* 1984, **307**:178-180.

Meerlo, T., Sheikh, M.A., Bloem, A.C., de Ronde, A., Schutten, M., van Els, C.A., Roholl, P.J., Joling, P., Goudsmit, J., Schuurman, H.J., 1993. **Host cell membrane proteins on human immunodeficiency virus type 1 after in vitro infection of H9 cells and blood mononuclear cells. An immuno-electron microscopic study.** *J. Gen. Virol.* **74**, 129–135.

Mergener, K., Facke, M., Welker, R., Brinkmann, V., Gelderblom, H.R., Krausslich, H.G., 1992. **Analysis of HIV particle formation using transient expression of subviral constructs in mammalian cells.** *Virology* **186**, 25–39.

Oetting, W. S., & King, R. A. (1994). **Analysis of Tyrosinase Mutations Associated With Tyrosinase-Related Oculocutaneous Albinism (OCA1).** *Pigment Cell Research*, **7(5)**, 285-290.

Olivares C., C. Jiméenez-Cervantes, J.A. Lozano, F. Solano, and J. C. Garcíia-Borrón, **The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase** *Biochemical Journal*, vol. 354, no. 1, pp. 131–139, 2001.

Osterlind A. **Epidemiology on malignant melanoma in Europe.** *Acta Oncol* 1992, **31(8)**, 903–908.

Osterrieder N, Wagner R, Brandmuller C, Schmidt P, Wolf H, Kaaden OR: **Protection against EHV-1 challenge infection in the murine model after vaccination with various formulations of recombinant glycoprotein gp14 (gB).** *Virology* 1995, **208**:500-510.

Palumbo,A., Solano,F., Misuraca,G., Aroca,P., Garcfa-Borr6n,J.C., Lozano,J.A. and Prota,G: **Comparative action of dopachrome tautomerase and metal ions on the rearrangement of dopachrome.** (1991) *Biochim. Biophys. Acta, in press.*

Parmiani G, Anichini A, Fossati G: **Cellular immune response against autologous human malignant melanoma: are in vitro studies providing a framework for a more effective immuno-therapy?** *J Natl Cancer Inst* 1990; **82**: 361-370

Peikert, T. **Melanoma Antigen A4 Is Expressed in Non-Small Cell Lung Cancers and Promotes Apoptosis.** *CANCER RESEARCH*, (2006). **66(9)**, 4693-4700.

Phogat S, Wyatt R: **Rational modifications of HIV-1 envelope glycoproteins for immunogen design.** *Curr Pharm Des* 2007, **13**:213-227 Review.

Platt, E.J., Haffar, O.K., 1994. **Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Pr55gag membrane association in a cell-free system: requirement for a C-terminal domain.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 4594–4598.

Price, M. A., Turley, E. A., Dudek, A. Z., Ferrone, S., Li, G., Xiang, B., et al. **CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma.** *Pigment Cell & Melanoma Research*, (2011). **24(6)**, 1148-1157.

Print CG, Loveland KL. **Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis.** *Bioessays* 2000;**22**:423–30.

Prota G., **Melanins and Melanogenesis**, *Academic Press, New York, NY, USA*, 1992.

Prota, G. and D. Mascagna, **Melanogenesis as a targeting strategy against metastatic melanoma: a reassessment.** *Melanoma Research*, 1994. **4(6)**: p. 351.

Royer, M., Cerutti, M., Gay, B., Hong, S.S., Devauchelle, G., Boulanger, P., 1991. **Functional domains of HIV-1 gag-polyprotein expressed in baculovirus-infected cells.** *Virology* **184**, 417–422.

Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, et al. **A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells.** *J Biol Chem* 2004;**279**:15505–14.

Sarangarajan R. and R. E. Boissy, **Tyrp1 and oculocutaneous albinism type 3.** *Pigment Cell Research*, vol. 14, no. 6, pp. 437– 444, 2001.

Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. **Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy.** *Immunol Rev* 2002;**188**: 22–32.

Schultz-Thater, E., Piscuoglio, S., Iezzi, G., Magnen, C. L., Zajac, P., Carafa, V., et al. **MAGE-A10 is a nuclear protein frequently expressed in high percentages of tumor cells in lung, skin and urothelial malignancies.** *International Journal of Cancer*, (2011). **129(5)**, 1137-1148.

Sers C., K. Kirsch, U. Rothbacher, G. Riethmuller, J.P. Johnson, **Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 8514–8518.

Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. **Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2005;**5**:615–25.

Stallcup, W.B. (2002). **The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects.** *J. Neurocytol.* **31**, 423–435.

Tripathi R., V. Hearing, K. Urabe, P. Aroca, R. Spritz: **Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase.** i **267** (1992), pp. 23707–23712

Tsukamoto, K., J.Jackson, I., Urabe, K., M.Montague, P., & J.Hearing, V. **A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase.** *The EMBO Journal*, (1992). **11**, 519-526.

Urabe K., P. Aroca, and V. J. Hearing, **From gene to protein: determination of melanin synthesis.** *Pigment Cell Research*, vol. 6, no. 4, pp. 186–192, 1993.

Valmori D, Dutoit V, Rubio-Godoy V, Chambaz C, Lienard D, Guillaume P, Romero P, Cerottini JC, Rimoldi D. **Frequent cytolytic T-cell responses to peptide MAGE-A10 in melanoma.** *Cancer Res* 2001; **61**:509–12.

Vries, E. d., & Coebergh, J. W. **Cutaneous malignant melanoma in Europe.** *European Journal of Cancer* 2004, **40**: 2355-2366.

Wagner R, Fliessbach H, Wanner G, Motz M, Niedrig M, Deby G, von Brunn A, Wolf H: **Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine.** *Arch Virol* 1992, **127**:117-137.

Wang, Z., & Yan, X. **CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion.** *Cancer Letters*, (2013). **330(2)**, 150-162.

Watt, B., Niel, G. v., & Marks, M. S. (2013). **PMEL: a pigment cell-specific model for functional amyloid formation.** *Pigment Cell Melanoma Res.*, **26**, 300–315.

Wills, J.W., Craven, R.C., Achacoso, J.A., 1989. **Creation and expression of myristylated forms of Rous sarcoma virus gag protein in mammalian cells.** *J. Virol.* **63**, 4331–4343.

Wilson, B.S., Imai, K., Natali, P.G., and Ferrone, S. (1981). **Distribution and molecular characterization of a cell-surface and a cytoplasmic antigen detectable in human melanoma cells with monoclonal antibodies.** *Int. J. Cancer* **28**, 293–300.

Yang, J., Price, M.A., Li, G.Y., Bar-Eli, M., Salgia, R., Jagedeeswaran, R., Carlson, J.H., Ferrone, S., Turley, E.A., and Mccarthy, J.B. (2009). **Melanoma proteoglycan modifies gene expression to stimulate tumor cell motility, growth, and epithelial-to-mesenchymal transition.** *Cancer Res.* **69**, 7538–7547.

Young KR, McBurney SP, Karkhanis LU, Ross TM: **Virus-like particles: designing an effective AIDS vaccine.** *Methods* 2006, **40**:98-117 Review.

Zippelius A, Pittet MJ, Batard P, *et al*: **Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans.** *J Exp Med* **195**: 485-494, 2002.

Zhao H., Y. Zhao, J. J. Nordlund, and R. E. Boissy, **Human TRP-1 has tyrosine hydroxylase but no dopa oxidase activity** *Pigment Cell Research*, vol. 7, no. 3, pp. 131–140, 1994.

Zhuang J, Jiang T, Lu D, Luo Y, Zheng C, Feng J, *et al*. **NADPH oxidase 4 mediates reactive oxygen species induction of CD146 dimerization in VEGF signal transduction.** *Free Radic Biol Med* 2010; **49**: 227–36.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sergei Jagur

Sünnikuupäev: 19.07.1989

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

„Melanoomi antigeenidega pseudotüpeeritud viirus-laadsete partiklite genereerimine“,

mille juhendaja on Reet Kurg ja Kiira Gildemann,

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 **31.05.2016** 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