

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
TEHNOLOOGIA INSTITUUT

**MAGE-A4 lokalisatsiooni uurimine retraktsiooni fiibrites ja  
migrasoomides**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Rando Kalbus

Juhendaja PhD Reet Kurg

TARTU 2025

## **Infoleht**

### **MAGE-A4 lokalisatsiooni uurimine retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides**

Vähi-testise antigeeni MAGE-A4 ekspressiooni keharakkudes, väljaspool testist, seostatakse vähipatsiendi halva prognoosiga, kuid selle täpsed molekulaarsed toimemehhanismid ja roll tuumorogeneesis on siiani ebaselged. Varasemalt läbi viidud uuringutest on selgunud, et MAGE-A4 inkorporeeritakse eri suurustega ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse. Antud töö eesmärkideks oli uurida MAGE-A4 lokaliseerumist ja võimalikku rolli retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides. Lisaks iseloomustada MAGE-A4 positiivsetesse vesiikulitesse kaasatud valkude lokalisatsiooni (COPA, TALIN-1 ja FILAMIIN-A), mis on tuvastatud varasemalt IP ja proteoomika põhjal, eeltoodud struktuurides. Töö tulemusena leiti, et MAGE-A4 lokaliseerub retraktsiooni fiibritesse ja migrasoomidesse ning lokaliseerub lähestikku TALIN-1-ga ning nõrgemalt FILAMIIN-A ja COPA-ga.

**Märksõnad:** MAGE-A4, EV, retraktsiooni fiiber, migrasoom

**CERCS kood:** T490 Biotechnology; B200 cytology, oncology, cancerology

### **Investigating the localization of MAGE-A4 in retraction fibers and migrasomes**

The expression of the cancer-testis antigen MAGE-A4 outside the testis is associated with poor prognosis in patients, but its precise molecular mechanisms and role in tumorigenesis remain unclear. Previous studies have shown that MAGE-A4 is incorporated into extracellular vesicles of various sizes. The aim of this study was to investigate the localization of MAGE-A4 and its possible role in retraction fibers and migrasomes. Additionally, the study sought to characterize the localization of proteins that potentially interact with MAGE-A4 (COPA, TALIN-1 and FILAMIN-A) in EV-s and which have been previously identified via immunoprecipitation and proteomics in retraction fibres and migrasomes. We found that MAGE-A4 localizes to retraction fibers and migrasomes and shows close colocalization with TALIN-1 and weaker colocalization with FILAMIN-A and COPA.

**Keywords:** MAGE-A4, EV, retraction fiber, migrasome

**CERCS code:** T490 Biotechnology; B200 cytology, oncology, cancerology

# Sisukord

INFOLEHT.....	2
SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 VÄHI-TESTISE ANTIGEENID .....	7
1.1.1 MAGE ülemperekond.....	8
1.1.2 MAGE-A alamperekond.....	8
1.1.3 MAGE-A4.....	10
1.1.3.1 MAGE-A4 bioloogiline roll .....	11
1.1.3.2 MAGE-A4 terapeutiline potentsiaal.....	11
1.2 EKSTRATSELLULAARSED VESIHKULID .....	12
1.2.1 EV-de sisu ja funktsioon.....	13
1.2.2 Eksosoomid .....	13
1.2.3 Mikrovesiikulid .....	14
1.2.4 Apoptoetilised kehad .....	14
1.2.5 Migrasoomid.....	16
1.2.5.1 Migrasoomide moodustumine .....	17
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	18
2.1 TÖÖ EESMÄRGID .....	18
2.2 MATERJAL JA METOODIKA.....	19
2.2.1 Rakukultuuride kasvatamine.....	19
2.2.2 Kasutatud plasmiidid.....	19
2.2.3 Rakkude transfektsioon.....	19
2.2.5 Kasutatud antikehad .....	20
2.2.6 Kasutatud fluorestsentsvärvid .....	21
2.2.7 EV-de eraldamine söötimest .....	21
2.2.8 Western Blot analüüs .....	22
2.3 TULEMUSED.....	24
2.3.1 MAGE-A4 esinemine ekstratsellulaarsetes vesiikulites.....	24
2.3.2 MAGE-A4 lokaliseerimise jälgimine retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides .....	25
2.3.3 MAGE-A4 positiivsetesse vesiikulitesse kaasatud valkude immunofluorestsents analüüs .....	26
2.4 ARUTELU.....	31
2.4.1 MAGE-A4 lokaliseerimise jälgimine retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides .....	31
2.4.2 MAGE-A4 positiivsetesse vesiikulitesse kaasatud valkude kolokaliseerimise uurimine... ..	31
KOKKUVÕTE.....	34
TÄNUAVALDUSED .....	36
KASUTATUD KIRJANDUS .....	37
LIHTLITSENTS.....	44

## KASUTATUD LÜHENDID

- AMPK – AMP-aktiveeritud proteiin kinaas (ingl *AMP-activated protein kinase*)
- ARF6 – ingl *ADP-ribosylation factor 6*
- BAGE – ingl *B melanoma antigen family*
- BAX – apoptoosi regulaator BAX (ingl *apoptosis regulator BAX*)
- CDKN1A – tsükliinist sõltuv kinaas inhibiitor 1A (ingl *cyclin dependent kinase inhibitor 1A*)
- CHP – ingl *Cholesterol-bearing hydrophobized pullulan*
- CT-X – X-kromosoomilt kodeeritav vähi-testise antigeen
- CTA – vähi-testise antigeen (ingl *cancer-testis antigen*)
- DAPI – 4',6-diamidiino-2-fenüülindool (ingl *4',6-diamidino-2-phenylindole*)
- DTT – ditiotreitol (ingl *dithiothreitol*)
- ECL – võimendatud kemoluminestsents (ingl *enhanced chemiluminescence*)
- ECM – rakuväline maatriks (ingl *extracellular matrix*)
- EGFP – võimendatud roheliselt fluorestseeruv valk (ingl *enhanced green fluorescent protein*)
- ERK – ekstratsellulaarse signaaliga reguleeritud kinaas (ingl *extracellular signal-regulated kinase*)
- EV – ekstratsellulaarne vesiikul (ingl *extracellular vesicle*)
- FBS – vasika loote seerum (ingl *fetal bovine serum*)
- GAM – ingl *goat anti-mouse*
- GAR – ingl *goat anti-rabbit*
- GAGE - ingl *G antigen 1 family*
- HDAC1 – histooni deatsetülaas 1 (ingl *histone deacetylase 1*)
- HEPES – tsvitterioonse sulfoonhappe puhveraine (ingl *zwitterionic sulfonic acid buffering agent*)
- HRP – mädarõika peroksidaas (ingl *horseradish peroxidase*)
- IF – immunofluorestsents analüüs (ingl *immunofluorescence assay*)
- ILV – luumeni sisene vesiikul (ingl *intraluminal vesicle*)
- IMDM – Iscove'i modifitseeritud Dulbecco sööde (ingl *Iscove's Modified Dulbecco's Media*)
- IP – immunosadestamine, immunopretsipitatsioon (ingl *immunoprecipitation*)
- LIMK1 – ingl *LIM domain kinase 1*
- MAGE – ingl *Melanoma-associated antigen*
- MAGE-A – ingl *Melanoma-associated antigen family A*
- MAGE-D – ingl *Melanoma-associated antigen family D*
- MGC-803 – inimese mao kartsinoomirakud (ingl *gastric carcinoma cells*)

MHD - MAGE homoloogia domään (ingl *MAGE homology domain*)  
MV – mikrovesiikul (ingl *microvesicle*)  
MVK – multivesikulaarne keha (ingl *multivesicular body*)  
MZ2-E – MAGEA1 isovorm  
mQ – milli-Q vesi (ingl *milli-Q water*)  
NCBI – ingl *National Center for Biotechnology Information*  
NRK – roti neerurakud (ingl *normal rat kidney cells*)  
PAK2 – p21 poolt aktiveeritud kinaas 2 (ingl *p21 activated kinase 2*)  
PCNA – proliferatsiooni rakutuumne antigeen (ingl *proliferating cell nuclear antigen*)  
PFA – paraformaldehüüdi fikseerimislahus (ingl *paraformaldehyde*)  
PS – fosfatidüülseriin (ingl *phosphatidylserine*)  
PVDF – polüvinülideenfluoriidi membraan (ingl *polyvinylidene fluoride*)  
RAD18 – E3 ubikvitiin ligaas RAD 18 (ingl *E3 ubiquitin-protein ligase RAD18*)  
RING – ingl *Really Interesting New Gene; an E3 ubiquitin ligase*  
ROCK1 – ingl *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1*  
SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (ingl *sodium dodecyl sulphate*)  
SKIP – ski-iga interakteeruv valk (ingl *ski-interacting protein*)  
SMS2 – sfingomüeliini süntaas 2 (ingl *sphingomyelin synthase 2*)  
TEMA - tetraspaniinidega rikastatud makrodomäänid  
TLS – ingl *translesion DNA synthesis*  
TRIM28 – ingl *tripartite motif-containing 28*  
TSPAN4A – Tetraspaniin 4A (ingl *tetraspanin 4a*)  
U2OS – inimese osteosarkoomi vähirakkude püsiliin  
MRC5 – inimese kopsu fibroblastid  
VLP – viiruse laadne partikkel (ingl *virus-like particle*)  
WB – Western Blot'i analüüs  
WH-A – tiivakujuline heeliks A (ingl *winged helix A*)  
WH-B - tiivakujuline heeliks B (ingl *winged helix B*)  
WGA – ingl *wheat germ agglutinin*  
XAGE-2 – ingl X antigen family member 2

## Sissejuhatus

Vähi-testise antigeenid on suur valkude perekond, mille ekspressioon on piiratud testise ja platsentaga, kuid nende ekspressiooni väljaspool eeltoodud kudesid seostatakse tihti pahaloomuliste ja agressiivsete vähivormidega. Kuna vähi-testise antigeene normaaljuhul kehas peale eeltoodud immuunprivileeritud piirkondi ei ekspresseerita siis teeb see neist head kandidaadid vähkkasvajate spetsiifilise immuunteraapia väljatöötamisel ja diagnostikas.

Ekstratsellulaarsed vesiikulid (EV-d) on heterogeensed, nanosuuruses lipiidse kaksikkihiga ümbritsetud osakesed, mida eritatakse rakkude poolt verre ja teistesse kehavedelikkesse. EV-d võivad seal hulgas kanda bioaktiivseid molekule retsipient rakkudeni ning omavad võimet muuta retsipient rakkude fenotüüpi. Seega vähi-testise antigeenide kaasamine EV-desse võib potentsiaalselt kaasa aidata vähkkasvaja levikule.

Käesolevas töös uuriti vähi-testise antigeeni MAGE-A4, mille täpne molekulaarne toimemehhanism ja roll tuumorigeneesis on senini ebaselged. Varasemad uuringud on näidanud, et MAGE-A4 inkorporeeritakse erineva suurusega ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse, kuid siiani on teadmata, millised mehhanismid suunavad MAGE-A4 kaasamist EV-desse ning kas MAGE-A4 positiivsete EV-de vabanemine sõltub spetsiifilistest raku struktuuridest.

Antud töö eesmärgiks oli uurida vähi-testise antigeeni MAGE-A4 lokaliseerumist ja võimalikku rolli retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides. Lisaks iseloomustada MAGE-A4 positiivsetes vesiikulites leiduvate valkude lokaliseerumist neis struktuurides (COPA, TALIN-1 ja FILAMIIN-A), mis olid tuvastatud varasemalt immunopretsipitatsiooni põhjal.

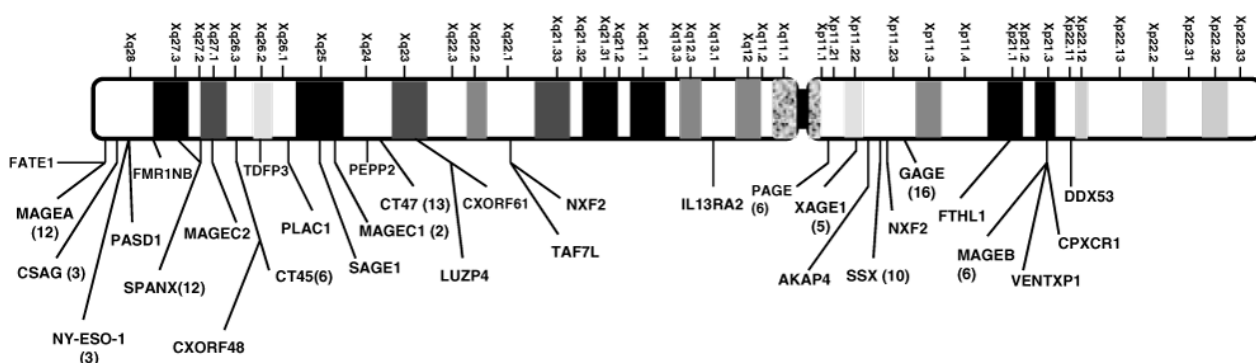
Uurimistöö tehti TÜ tehnoloogia instituudis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Vähi-testise antigeenid

Vähi-testise antigeenid ehk CTA-d (ingl *cancer testis antigens*) on klass antigeene, mille ekspressioon on spetsiifiline testisele ja vähirakkudele (Nin ja Deng, 2023). CTA-d avastati enam kui 30 aastat tagasi melanoomi rakuliini uuringus Thierry Boon ja teiste uurimisrühma liikmete poolt, kui tuvastati antigeeni MZ2-E ekspressiooni kontrolliv geen MAGE-A1. See avastus viis B-melanoomi antigeeni (BAGE) ja G-antigeeni (GAGE) perekondade avastamiseni samas rakuliinis (Boël et al., 1995; Van den Eynde et al., 1995). 2023 aasta seisuga on teada üle 270 CTA geeni ja 100 perekonna (Ai et al., 2023).

CTA-d jagunevad kahte kategooriasse: X-kromosoomilt kodeeritud CT-X antigeenid (vt Joonis 1) ja mitte-X-kromosoomilt kodeeritavad CT antigeenid (Lahn ja Page, 2000; Taguchi et al., 2014). Mitte-CT-X geenid on ühe koopiaga, CT-X aga multigeensed klastrid X-kromosoomil (Fratta et al., 2011; Jay et al., 2021). Testises ekspresseeruvad CT-X antigeenid peamiselt spermatogoonides, samas kui mitte-X-CT-d spermatotsüütides (Simpson et al., 2005), viidates seega CTA-de erinevatele rollidele erinevates arengufaasides. Kusjuures CTA-de ekspressioon ei piirdu ainult testise ja vähirakkudega, näiteks on MAGE-A3 ja XAGE-2 ekspressiooni täheldatud ka platsentas (Simpson et al., 2005).



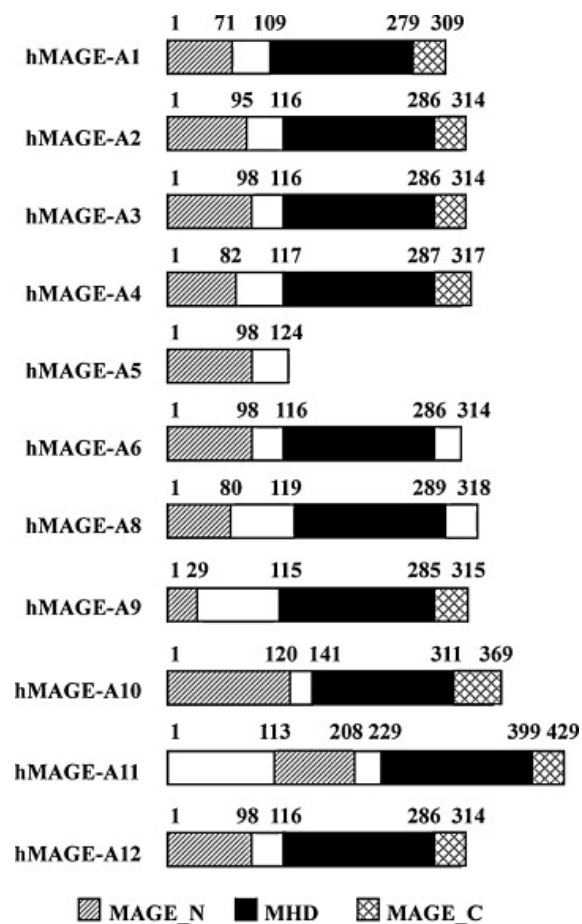
Joonis 1. CT-X jagunemine X kromosoomil. Teadaolevate alam perekonna liikmete arv on välja toodud sulgudes. Joonis on pärit Caballero ja Chen, 2009 artiklist.

### 1.1.1 MAGE ülemperekond

MAGE (ingl *melanoma associated antigen*) on suur ja evolutsiooniliselt konserveerunud valkude perekond, mille kõiki liikmeid iseloomustab ühine MAGE-homoloogiadomeen (MHD)(Weon ja Potts, 2015). MHD koosneb ligikaudu 170 aminohapest ning on inimese MAGE-valkude seas keskmiselt 46% ulatuses konserveerunud (Weon ja Potts, 2015). Kusjuures MAGE alamperekondades võib see protsent küündida MAGE-D alamperekonna puhul 75%-ni (Doyle et al., 2010). MAGE valgud koosnevad ligi 100 aminohappejäägi pikkusest N-terminaalsest piirkonnast, mis on heterogeene ja varieeruv, samas kui C-terminaalne piirkond on MAGE alamperekondade puhul konserveerunud (Lee ja Potts, 2017). N ja C terminaalset piirkonda ühendavad kaks tiivalaadset heeliksi domeeni WH-A ja WH-B, mis moodustavad MHD (Yang et al., 2020). Lisaks on näidatud, et WH-B-s olev di-leutsiini motiiv on oluline MAGE valkude interaktsiooniks teiste valkudega (Griffith Jones et al., 2024). MAGE ülemperekond jaotatakse kaheks tüübiks. I tüüpi MAGE-valgud kuuluvad vähi-testise antigeenide hulka ning inimestel hõlmavad need MAGE-A, -B ja -C alamperekondi, mis paiknevad X-kromosoomil (Lian et al., 2018). II tüüpi MAGE-valgud, sealhulgas MAGE-D, -E, -F, -G, -H, -L ja Necdin, avalduvad laiemalt erinevates kehakudedes ega ole X-kromosoomiga piiratud (Li et al., 2021). I tüüpi MAGE-valkude ekspressiooni reproduktiivkudedest väljaspool seostatakse agressiivsete, halva kliinilise prognoosiga vähivormidega. Näiteks Poojary et al. (2020) metaanalüüs leidis, et 44 selektsiooni läbinud kliinilises uuringus oli MAGE-A perekonna CTA-de ekspressioon seostatud patsientide halvema prognoosiga. II tüüpi MAGE valke seejuures ei seostata tüüpiliselt patoloogiatega vaid arengubioloogiliste protsessidega (Barker ja Salehi, 2001; De Donato et al., 2017).

### 1.1.2 MAGE-A alamperekond

MAGE-A alamperekond koosneb inimesel 12 geenist MAGE-A1 - A12 (vt Joonis 2), mis on kõrgelt konserveerunud ja klastritena X kromosoomil q28 õlas (Sang et al., 2011; Õunap et al., 2018). Sarnaselt teistele MAGE CTA-dele, seostatakse ka MAGE-A CTA-de ekspressiooni halva kliinilise prognoosiga. MAGE-A CTA-de ülesregulatsiooni on tuvastatud näiteks mitmetes melanoomides, osteosarkoomides, põie ja rinnavähkides, kopsu ja söögitoru kartsinoomides (Brasseur et al., 1995; Bergeron et al., 2009; Chen et al., 2019; Meijer et al., 2024; Zhai et al., 2015; Wang et al., 2016).

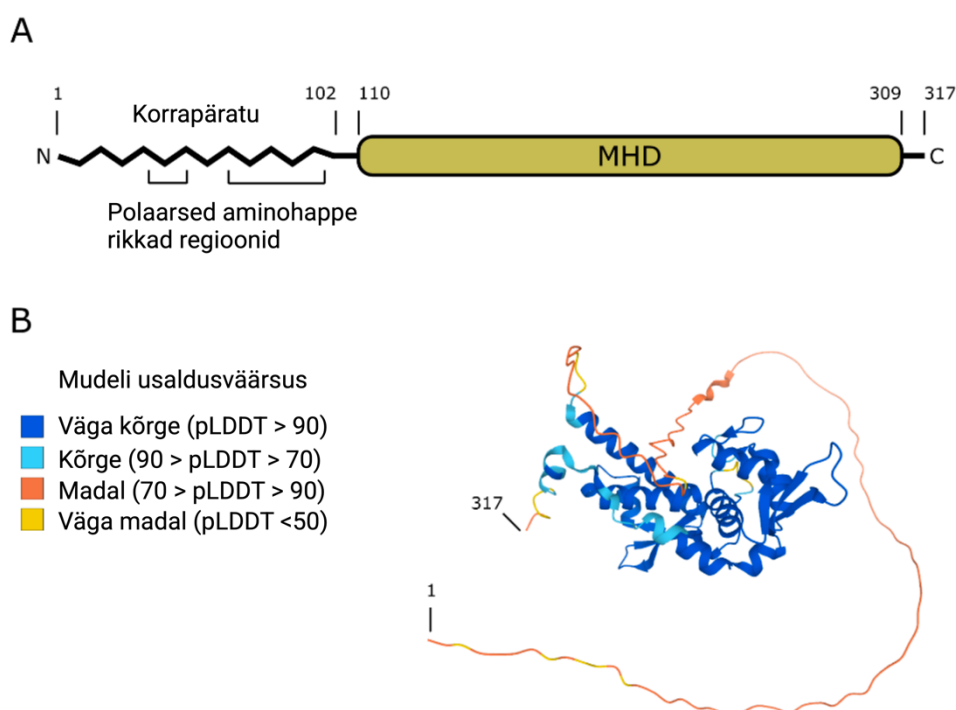


Joonis 2. **MAGE-A alamperekonna valgud.** Mustaga on tähistatud MHD regioon, viirulisega N-terminaalne regioon ja ruudukestega C-terminaalne regioon. Joonis on pärit *Sang et al., 2011* artiklist.

MAGE-A CTA-d omavad bioloogilist funktsiooni nii testises kui ka vähirakkudes. Näiteks on teada, et MAGE-A ekspressioon vähirakkudes soodustab rakkude migratsiooni ja epigeneetilist dereguleerimist, suurenenud proliferatsiooni, metastaaside teket ja suurenenud stressitaluvust (Fon Tacer et al., 2019; Liu et al., 2022; Liu et al., 2008; Oh et al., 2021). Mitmeid eeltoodud funktsioone läheb vaja ka spermatogeneesil osalevatel rakkudel. MAGE-A geenide tähtsus testises näitab näiteks Hou et al. (2016) uuring, kus deleteeriti MAGE-A1-A3, MAGE-A5-A6 ja MAGE-A8 genoomiline klaster, mis tekitas katses osalenud hiirtel 2 kuu vanuselt väiksema testise kui kontrollgrupil ning ka suurenenud apoptootiliste sugurakkude arvu. Molekulaarsel tasemel on näidatud MAGE-A valkude rolli p53 supressioonil, SKIP (ski-ga interakteeruv valk) ja HDAC1 (histooni deasetülaas 1) repressioonil, E3 ubikvitiin-ligaaside aktiveerimisel ja AMPK-i (AMP-aktiveeritud proteiin kinaas) degradatsioonil (Marcar et al., 2010; Laduron et al., 2004; Pineda et al., 2015; Yang et al., 2007).

### 1.1.3 MAGE-A4

MAGE-A4 (ingl *melanoma-associated antigen A4*) on vähi-testise antigeen, mille ekspressioon normaalses kudedes piirdub testise, platsenta ja embrüonaalsete munasarjadega, kuid on ülesekspresseritud mitmetes vähk-kasvajates (Zhu et al., 2025). MAGE-A4 geen kodeerib valku, mis on 317 aminohapet pikk ning sarnaselt teistele MAGEA alamperekonna geenidele on MAGE-A4 asukoht X kromosoomi q28 õlas (vt Joonis 3) (NCBI). Lisaks on teada, et MAGE-A4 võib lokaliseeruda nii tuumas kui ka tsütoplasmas kui ka mõlemas korraga (Fujiwara-Kuroda et al., 2018). MAGE-A4 ekspressioon korreleerub kliiniliselt arenenuma vähistaadiumiga s.t pahaloomuliste kasvajatega ning on seega halva prognoosi näitajaks. Näiteks seostatakse MAGE-A4 sünoviaalsarkoomi, pea ja kaela lamerakk-kartsinoomi, rinnavähi, munasarja, uroteeli, melanoomi ja gastroösofagealse vähiga (Hong et al., 2023; Ishihara et al., 2020; Nakamura et al., 2025; Zhu et al., 2025). Seega MAGE-A4 laialdane levik erinevates vähk-kasvajates võib viidata MAGE-A4 olulisele bioloogilisele rollile vähi arengus ning MAGE-A4 potentsiaalile biomarkerina ja ravimite sihtmärgina.



Joonis 3. **MAGE-A4 struktuur.** A. MAGE-A4 aminohappelise järjestuse regioonid. B. AlphaFold valgu struktuuri andmebaasist pärit MAGE-A4 3D struktuur. Pildid A. ja B pärit Reinsalu, 2022 doktoritööst ja modifitseeritud.

### 1.1.3.1 MAGE-A4 bioloogiline roll

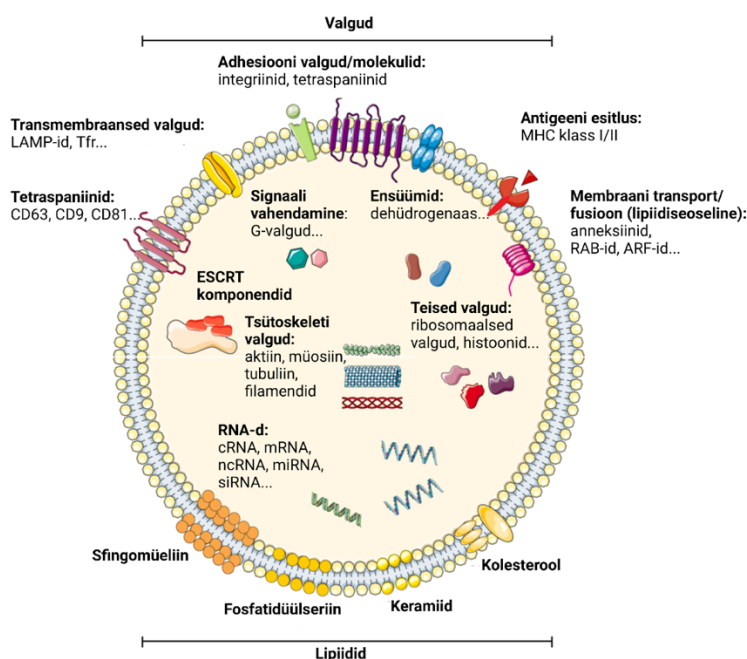
Sarnaselt teistele MAGE-A perekonna valkudele interakteerub MAGE-A4 E3 RING ubikvitiin ligaasidega ja surub maha p53 tuumor supressor valku. Selle jaoks seondub MAGE-A4 TRIM28-ga, mis aktiveerib E3 ubikvitiin ligaasi ning mis märgib p53 lagundamisele (Lee and Potts, 2017; Zhu et al., 2025). Näiteks Alsalloumi et al. (2023) uuring näitas, et inhibeerides MAGE-A4 TRIM28 interaktsiooni vähenes p53 valgu lagundamine. Kusjuures Bhan et al. (2012) leidsid enda uuringus, et MAGE-A4 võib inhibeerida apoptoosi vähendades p53-ga interakteeruvate BAX (apoptoosi regulaator BAX) ja CDKN1A (tsükliinist sõltuv kinaas inhibiitor 1A) kogust rakus. Samas uuringus näidati ka MAGE-A4 rolli G1 faasi arresti minemise vältimisel. Lisaks seostati Griffith Jones et al. (2024) uuringus MAGE-A4 ka RAD18 (E3 ubikvitiin ligaas RAD 18) stabiliseerimisega, vältides nii RAD18 auto-ubikvineerimist. See võimaldab RAD18-l monoubikvineerida PCNA-d (proliferatsiooni rakutuumne antigeen), mis omakorda aktiveerib translesioon DNA sünteesi (ingl *Translesion DNA Synthesis*). TLS võimaldab replikatsioonikahvlil mööduda DNA kahjustustest neid parandamata, mis võib suurendada mutatsioonide tekkimise riski ja soodustada vähi progresseerumist.

### 1.1.3.2 MAGE-A4 terapeutiline potentsiaal

Vähirakkudes reaktiveeritavad MAGE-A valgud sh MAGE-A4 tekitavad inimeses tuumor spetsiifilise immuunvastuse, mida tunnevad ära CD8+ rakud ning mida saab ära kasutada mitmetes ravi-teraapiates (Zhu et al., 2025). Seda omadust ära kasutades on MAGE-A4 vastu välja töötatud mitmeid teraapiaid, mida on hinnatud ka kliinilistes katsetes. Näiteks Hong et al. (2023) viisid läbi faas I kliinilise uuringu, kasutades autoloogset T-raku teraapiat MAGE-A4 vastu. Uuringust selgus, et MAGE-A4 manustamise järgne immuunvastus esines 44% sünoviaalsarkoomi põdevatest patsientidest, samas kui teiste vähkide korral reageeris teraapiale vaid 9% patsientidest. Lisaks esines 55% patsientidest efektor tsütokiinide vabanemine ning kõigil patsientidel ilmsid hematotoksilised kõrvalnähud. Lisaks on välja töötatud ka MAGE-A4 vastaseid vaktsiine. Näiteks Saito et al. (2014) löid vaktsiini, mis sisaldas MAGE-A4 valku ja kasutas adjuvandina CHP-d (ingl *Cholesterol-bearing hydrophobized pullulan*). Kliinilisest uuringust selgus, et 15 patsiendist 4-l tekkis spetsiifiline MAGE-A4 vastane humoraalne immuunvastus. Samas oli uuringu osalejate arv väga väike ja üldistuste tegemisega tuleks olla ettevaatlik.

## 1.2 Ekstratsellulaarsed vesiikulid

Ekstratsellulaarsed vesiikulid (edaspidi EV-d) on heterogeensed (vt Joonis 4), nanosuures lipiidse kaksikkihiga ümbritsetud osakesed, mida eritatakse rakkude poolt verre ja teistesse kehavedelikesse (Ramirez et al., 2018). EV võivad seal hulgas kanda bioaktiivseid molekule retsipient rakkudeni (Sheta et al., 2023). Teadaolevalt toodavad EV-sid kõik elusrakud prokarüootidest eukarüootideni kasutades selleks evolutsiooniliselt konserveerunud mehhanisme (Colombo et al., 2014; Ibrahim ja Khan, 2024). Ekstratsellulaarsed vesiikulid jaotatakse klassikaliselt biogeneesi (vt Joonis 5), suuruse ja molekulaarse koostise põhjal kolmeks: eksosoomideks (30-100 nm), mikrovesiikuliteks (50-1000 nm) ning apoptootilisteks kehadeks (200–5000 nm). Eksosoomid moodustuvad endosoomi pungumisel, moodustades multivesikulaarseid kehasid (MVK), mis omakorda sulanduvad kas lüsoosoomidega või raku plasmamembraaniga (Ibrahim ja Khan, 2024). Mikrovesiikulid ehk ektosoomid moodustuvad otseselt rakumembraanist välja pungudes (Ibrahim ja Khan, 2024). Apoptootilised kehad erinevad selle poolest, et need moodustuvad apoptootiliste ehk programmeeritud rakusurma minevate rakkude poolt ning on keskmiselt suuremad kui eksosoomid ja mikrovesiikulid (Battistelli ja Falcieri, 2020).



Joonis 4. EV-de üldine molekulaarne koostis. EV-d sisaldavad mitmesuguseid olulisi biomarkereid, näiteks valke, lipiide ja nukleiinhappeid. Iga loetletud komponent võib tegelikult esineda mõnes EV alatüübis ja mõnes teises mitte. Joonis on võetud *Shahraki et al., 2023* artiklist ja modifitseeritud.

### 1.2.1 EV-de sisu ja funktsioon

Üks EV-de olulisemaid bioloogilisi rolle on vahendada rakkudevahelist kommunikatsiooni, toimetades bioaktiivseid aineid, näiteks nukleiinhappeid, valke ja lipiide, ühest rakust teise (Berumen Sánchez et al., 2021). Selle keskmis on rakkude võime kontrollida EV-de koostist ja seeläbi edastada spetsiifilisi sõnumeid reguleeritud ja selektiivsel viisil (Carnino et al., 2020). Kusjuures EV-d võivad mõjuda kas rakule endale või retsipientrakule. Retsipienttrakkudes on täheldatud näiteks EV-de võimet muuta fenotüüpi, toimides ligandidena retsipienttraku retseptoritele ja aktiveerides nii erinevaid signaaliradasid (Dixson et al., 2023). Näiteks Xiao et al. (2021) uuringust selgus et mesenhümaalsetest tüvirakkudest pärit EV-d vähendasid vananenud endoteeli rakkudes vananemisega seotud fenotüüpi ja muid rakkude vananemisega kaasnevaid ilminguid. Peamisteks fenotüüpi reguleerivateks molekulideks EV-des peetakse RNA-d ja DNA-d. Seal hulgas on teada, et kasvajatest pärinevad EV-d sisaldavad tihti RNA-d ja onkogeenset DNA-d, mida seostatakse metastaaside tekke ja vähi progresseerumisega (Shinde et al., 2025). On näidatud, et RNA-d võib leida nii bakterite, seente, putukate, parasiitide, taimede kui ka imetajate EV-des, mis viitab sellele, et RNA-de kasutamine rakkude vahelises suhtluses on evolutsiooniliselt konserveerunud (Dellar et al., 2022).

### 1.2.2 Eksosoomid

Eksosoomid on väikesed endosoomset päritolu vesiikulid, mille koostis sõltub rakutüübist, raku seisundist ja keskkonnatingimustest. Seetõttu võivad eksosoomid omada prognostilist väärtust mitmete haiguste, sealhulgas vähi puhul, ning olla potentsiaalsed ravimikandjad (Ramirez et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Eksosoomid moodustuvad multivesikulaarkehadest (MVK), mis tekivad hilistest endosoomidest nende membraanide sissesopistumise kaudu (Wang et al., 2024). Selle protsessi käigus transporditakse valgud kas trans-Golgi võrgustikust või internaliseeritakse endotsütoosi teel, mille järel osa neist ubikvineeritakse (Sheta et al., 2023). Varajased endosoomid küpsevad hilisteks endosoomideks, mille membraanide invagineerumine viib luumenisiseste vesiikulite (ILV) moodustumiseni (Liese, 2020). Enamik ILV-dest vabaneb eksosoomidena, samas kui osa suunatakse lagundamiseks lüsoosoomidesse (Trajkovic et al., 2008).

Eksosoomide seostatakse muuhulgas vähiga ja selle progresseerumisega, kandes näiteks RNA-sid, mis võivad muuta retsipienttrakkude fenotüüpi ja edendada kasvajate arengut. Näiteks Shin et al. (2021) eraldasid eesnäärmevähiga patsientide seerumist eksosoomide miRNA-d ja võrdlesid neid kontrollgrupiga. Uuringus leiti, et vähipatsientidel oli miR-21 ja miR-451 ekspressioon ülesreguleeritud, samas kui miR-636 oli allareguleeritud. Kumar et al. (2020) omakorda analüüsisid pankrease adenokartsinoomi patsientide eksosoomide RNA profiili,

leides seal kõrgendatud mRNA, miRNA, lincRNA, tRNA ja piRNA ekspressiooni taseme võrreldes kontrollgrupiga, mis viitab EV-des leiduvate RNA-de potentsiaalile biomarkeritena. Siiski, mõlema uuringute piiranguks on väikesed katsegrupid, mis võib mõjutada tulemuste üldistatavust ning mistõttu on vaja täiendavaid uuringuid suurema hulga patsientidega.

### 1.2.3 Mikrovesiikulid

Mikrovesiikulid (edaspidi MV-d) on väikesed nanosuuruses osakesed, mis punguvad raku plasmamembraanist, mistõttu on MV-de membraani koostis sarnane vanemrakuga (Menck et al., 2020) ning erinedes ühtlasi nii ka eksosoomidest. Mikrovesiikulite vabanevad rakust füsioloogilistes tingimustes, kusjuures Ståhl et al. (2019) märgivad, et mikrovesiikulite moodustumine suureneb, kui rakud puutuvad kokku põletikusoodustavate stimulantidega, hüpoksia või oksüdatiivse stressiga. Lisaks sellele, seostatakse mikrovesiikuleid muuhulgas vähi ja immuunvastusega (Wang et al., 2024).

Mikrovesiikulite pungmisprotsess plasmamembraanist hõlmab valkude ja lipiidide ümberpaiknemist, tsütoskeleti kokkutõmbumist ning  $Ca^{2+}$  taseme tõusu rakus (Akers et al., 2013).  $Ca^{2+}$  aktiveerib flipaasid, flopaasid ja skramblaasid, mis vastutavad fosfolipiidide liikumise eest membraani sisemises ja välises kihis (Menck et al., 2020). Lisaks aktiveerib  $Ca^{2+}$  kalpaiini, mis eemaldab membraanivalke tsütoskeletonilt, ning gelsoliini, mis muudab aktiini filamentide struktuuri (Ståhl et al., 2019). Need muutused viivad tsütoskeleti ümberkorraldamiseni, võimaldades mikrovesiikulitel punguda plasmamembraani mikrodomeenidelt ja haarata kaasa materjali raku plasmamembraanist ja tsütoplastmast (Koel, 2013; Ståhl et al., 2019).

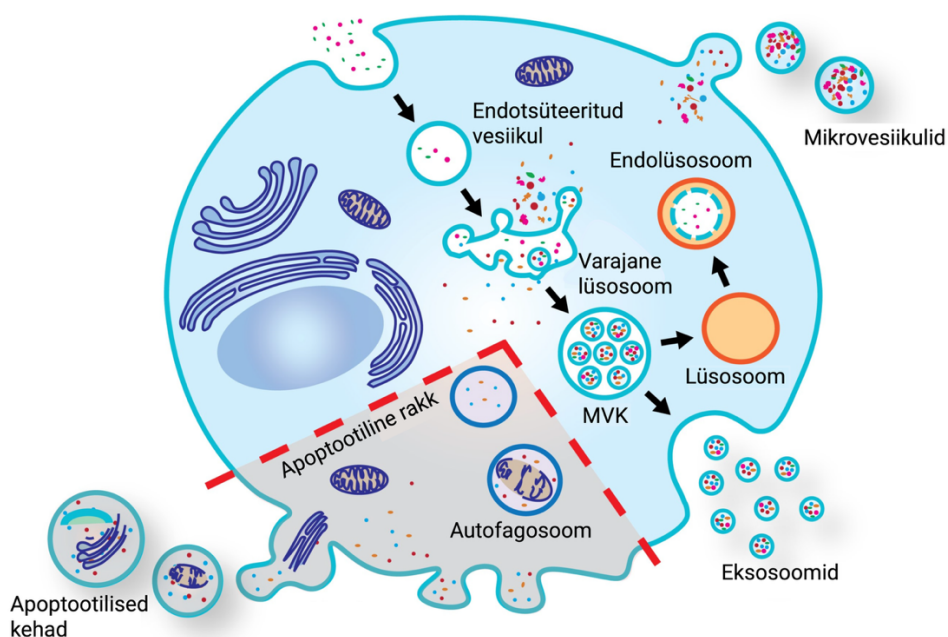
MV-de moodustumist mõjutavad muuhulgas ka keramiid ja kolesterool, mille puudumine neutrofiilides takistab nende vabanemist (Sedgwick ja D'Souza-Schorey, 2018). Lisaks lipiididele mängivad olulist rolli mitmed teised ensüümid, nagu ARF6 (ingl *ADP-ribosylation factor 6*), mis stimuleerib fosfolipaasi D ja seondub ERK-ga (ekstratsellulaarse signaaliga reguleeritud kinaas) plasmamembraanis, aktiveerides signaalikaskaadi, mis viib aktinomüosiini kokkutõmbumiseni ja MV-de vabanemiseni (Akers et al., 2013; Menck et al., 2020).

### 1.2.4 Apoptootilised kehad

Apoptootilised kehad (apoBD) on klassikalistest ekstratsellulaarsetest vesiikulitest suurimad ning moodustuvad apoptoosi käigus plasmamembraanist väljasopistudes. Apoptootilised kehad on erineva suurusega ja võivad sisaldada muuhulgas mikrotoomasid, DNA-d ja RNA-d, valke

ning organelle (Atkin-Smith et al., 2017; Elmore, 2007). Kusjuures apoptootilisi kehasid peeti alguses n.ö “rakuliseks prügiks”, kuni avastati nende võime kanda funktsionaalset sisu tervetesse retsipientrakkudesse (Zou et al., 2023). See võib seletada ka põhjust miks apoptootilistest kehadest teatakse hetkel vähem kui eksosoomide ja mikrovesiikulite kohta.

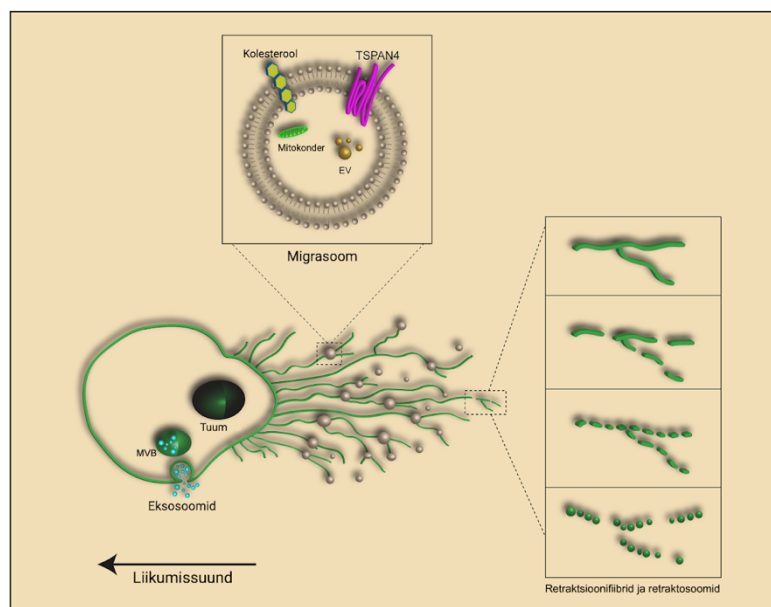
Apoptoos aktiveeritakse vastavalt kas surma retseptori aktiveerimisega või mitokondriliste kahjustuste tõttu, mis omakorda vallandab kaspasid kaskaadi, millele järgneb raku suuruse vähenemine, kromatiini kondensatsioon ja apoptootiliste kehade teke (Kakarla et al., 2020; Xu et al., 2019). Apoptoosi üheks tunnuseks on fosfolipiidide asümmeeria kadumine, mille käigus eksponeeritakse fosfatidüülseriin plasmamembraani väliskihile, käivitades membraani pungumise. Seda protsessi reguleerivad kinaasid ROCK1 (ingl *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1*), LIMK1 (ingl *LIM domain kinase 1*) ja PAK2 (p21 poolt aktiveeritud kinaas 2), mis viivad apoptootilise membraani eendumiseni ogakujulisteks mikrotuubuli struktuurideks (ingl *microtubule spikes*), apoptopoodideks ja helmetega apoptoodideks (Yu et al., 2023). PS-i (fosfatidüülseriin) eksponeerimine mängib olulist rolli mitte ainult apoptootilistes membraanides, vaid ka apoptootilistes kehas, olles “leia ja söö mind” signaaliks lümfotsüütidele, et nad eemaldaksid fragmenteerunud rakke (Yu et al., 2023).



Joonis 5. **EV-de biogenees.** Eksosoomid moodustuvad endosoomi pungumisel, moodustades multivesikulaarseid kehasid (MVK), mis omakorda sulanduvad kas lüüsoomidega või raku plasmamembraaniga. Mikrovesiikulid ehk ektosoomid moodustuvad rakumembraanist välja pungudes. Apoptootiliste kehade puhul toimub fosfolipiidide asümmeeria kadumine, mis käivitab membraani pungumise ja eendumise. Joonis pärit *Shahi et al., 2024* artiklist ja modifitseeritud.

## 1.2.5 Migrasoomid

Migrasoomid avastati hiljuti Ma et al. (2015) poolt ning on uut tüüpi EV-laadsed struktuurid, mis moodustuvad retraktsiooni fiibrites (ingl *retraction fibre*) rakkude migreerumisel (vt Joonis 6). Retraktsiooni fiibrid on aktiini rikkad torujad struktuurid (Cramer ja Mitchison, 1997). Kusjuures retraktsiooni fiibrid moodustuvad raku liikumissuunaga vastupidises suunas ning jäävad rakust maha koos migrasoomidega (Tan et al., 2023). Migrasoomid võivad puruneda ja vabastada enda sees olevat sisu, milleks võivad olla migrasoomidest pärit EV-laadsed nanopartiklid, mitokondrid ja mRNA-d (Jiao et al., 2021; Ma et al., 2023; Zhu et al., 2021). Eeltoodud sisu võidakse omastada rakkude poolt, kuid mis saab migrasoomide sisust edasi rakkude poolt omastamisel on hetkel veel ebaselge (Zhang et al., 2023; Wang et al., 2022). Migrasoomide seostatakse mitmete patoloogiatega, näiteks hepatotsellulaarse kartsinoomi ja glioblastoomiga kui ka mitmete arengubioloogiliste ning füsioloogiliste protsessidega (Huang et al., 2025; Zhang et al., 2024). Näiteks Jiao et al. (2021) näitasid, et kahjustunud mitokondrid transportitakse migrasoomidesse. Lisaks Jiang et al. (2019) poolt läbi viidud uuringust selgus, et kui teha sebrakalas (*Danio rerio*) Tspan4a ja Tspan7 *knockout* katse, siis väheneb märgatavalt migrasoomide moodustumine. Samuti oli organite morfogenees häiritud, kuid kui enne gastrulatsiooni viidi sisse puhastatud migrasoomid, siis jätkus organogenees normaalselt.



Joonis 6. Tüüpiline retraktsiooni fiibrite kimp ja nende lagunemine retraktosoomideks. Joonis pärit Tan et al., 2023 artiklist ja modifitseeritud.

### 1.2.5.1 Migrasoomide moodustumine

Migrasoomide moodustumine on tugevalt sõltuv rakkude võimest migreeruda. Kusjuures retraktsiooni fiibrid on seotud ECM-ga (rakuväline maatriks) just migrasoomide põhjas olevate integriinidega (Wu et al., 2017). Ning kui inhibeerida raku migreerumisel olulist müosiini II ja dünaamiini, siis väheneb oluliselt ka migrasoomide teke (Ma et al., 2015; Wu et al., 2017).

Mitmed uuringud on vaadanud migrasoomide moodustumist kui kaheastmelist protsessi. Esmalt moodustuvad retraktsiooni fiibrites lokaalsed tursed (ingl *local swellings*) ning sellele järgneb nende tursete stabilisatsioon tetraspaniinidega rikastatud makrodomäänide (TEMA) abil (Zhang et al., 2023). Kusjuures on leitud, et nendes etappides mängivad olulist rolli TSPAN4 (Tetraspaniin 4A) ja kolesterool. Näiteks Huang et al. (2019) testisid kolesterooli olulist migrasoomide moodustumisel ning leidsid, et nii rakkude töötlemine metüül- $\beta$ -tsüklodekstriini kui ka rakkude kasvatamine lipoproteiini puuduliku seerumiga koos või ilma prevastatiiniga vähendasid oluliselt migrasoomide moodustumist. Samuti TSPAN4 geeni *knockout* puhul NRK (ingl *normal rat kidney*) ja MGC-803 (ingl *human gastric carcinoma*) rakuliinides vähenes migrasoomide moodustumine (Dharan et al., 2023). Siiski on hetkel veel palju mida ei teata migrasoomidest, näiteks mis tingib migrasoomide moodustumise. Hiljuti leidsid Liang et al. (2023), et üheks migrasoomide moodustumisel oluliseks molekuliks on sfingomüeliin süntaas 2 (SMS2), mis koguneb klastriteks raku esi otsa ja raku migreerudes liigub retraktsiooni fiibritesse olles seal migrasoomide moodustumise stardipunktiks, kus SMS2 konverteerib keramiidi sfingomüeliiniks. Samas jääb selgusetuks, mis tingib SMS2 kogunemise raku esi otsa ning mis tingib SMS2 poolt sfingomüeliini tootmise. Peale selle ei teata hetkel ka millised vesiikulid on migrasoomides ning millise mehhanismi abil need moodustuvad, mis omakorda ilmestab, et migrasoomide kohta on hetkel veel palju teadmata.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Vähi-testise antigeeni MAGE-A4 ekspressiooni keharakkudes, väljaspool testist, seostatakse patsiendi halva prognoosiga, kuid selle täpsed molekulaarsed toimemehhanismid ja roll tuumorigeneesis on siiani ebaselged. Autori uurimisrühmas varasemalt läbi viidud uuringutest on selgunud, et MAGE-A4 inkorporeeritakse eri suurustega EV-desse ning seda hoiavad seal kinni tugevamad jõud kui nõrgad molekulide vahelised jõud. Kuid selgusetuks on jäänud kuidas MAGE-A4 kaasatakse EV-desse ja kust need EV-d rakuvälisesse keskkonda vabanevad ning kas MAGE-A4 positiivsete EV-de vabanemine on mingile rakustruktuurile spetsiifiline. Varasemalt uurimisrühmas läbi viidud katsetes on täheldatud, et MAGE-A4 positiivsete rakkude ümbruses on märgatavalt retraktsiooni fiibreid koos migrasoomidega ning EV-sid, kuid kuidas ja miks MAGE-A4 neisse struktuuridesse lokaliseerub on jäänud selgusetuks. Seega MAGE-A4 uurimine retraktsiooni fiibrites, migrasoomides ja EV-des võib aidata paremini mõista MAGE-A4 rolli vähi metastaaside tekkemehhanismides, pakkudes samas uusi võimalusi täpsemate diagnostiliste meetodite ja spetsiifiliste terapeutiliste ravide arendamiseks.

#### **Käesoleva töö eesmärkideks on:**

1. Uurida vähi-testise antigeeni MAGE-A4 lokaliseerumist ja võimalikku rolli retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides
2. Iseloomustada MAGE-A4 positiivsetes vesiikulites leiduvate valkude (COPA, TALIN-1 ja FILAMIIN-A) lokalisatsiooni retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides, mis olid tuvastatud varasemalt immunopretsipitatsiooni põhjal.

## 2.2 Materjal ja meetoodika

### 2.2.1 Rakukultuuride kasvatamine

Inimese osteosarkoomi rakuliini U2OS (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) ja inimese kopsu fibroblastide rakuliini MRC5 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) kasvatamiseks kasutati IMDM (ingl *Iscove's Modified Dulbecco's Media*) söödet, mis sisaldas 10% veise loote seerumit (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Rakke kasvatati 37 °C 5% CO<sub>2</sub> juures (Panasonic MCO-19AICUV-PE).

### 2.2.2 Kasutatud plasmiidid

Käesolevas töös kasutati kolme plasmiidkonstrukti: pQM-MAGE-A4, pQM-MAGE-A4-EGFP ja pEGFP-C1. Plasmiidis pQM-MAGE-A4 oli MAGE-A4 valku kodeeriv järjestus liidetud C-terminaalse E2Tag epitoobiga (Reinsalu et al., 2021). Plasmiidide amplifitseerimiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5α. Transformeeritud bakterirakke kasvatati LB söötmel ampitsilliini sisaldusega 100 µg/ml, et tagada selektiivne paljunemine. Plasmiidide puhastamiseks kasutati FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit'i (Favorgen) järgides tootja protokollit.

### 2.2.3 Rakkude transfektsioon

Plasmiidide transfektsiooniks U2OS ja MRC5 rakuliini kasutati elektroporatsiooni. Selleks kasvatati rakke 100 mm plaatidel 80-90% konfluentsuseni, misjärel aspireeriti sööde ja pesti plaate PBS-iga. Seejärel eraldati plaatidelt rakud trüpsiinilahusega (0,05% Trüpsiin, 0,53 mM EDTA, Corning) ja koguti 15 ml tuubidesse IMDM söötmesse. Peale rakkude kogumist tsentrifugeeriti rakke 5 minutit 1000 rpm 20 °C juures (Eppendorf Centrifuge 5810R), misjärel aspireeriti sööde ja rakud suspendeeriti IMDM söötmes. Seejärel lisati raku suspensioonile (50 µg) lõhe sperma DNA-d ja 1 µg vastavat plasmidi (vt meetoodika 2.2.2). Elektroporatsiooniks kasutati 4 mm läbimõõduga elektroporatsiooniküvette (4 mm, Cell Projects Ltd) Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad) masinaga 975 µF mahutavusel ja 220V pinge juures. Peale elektroporatsiooni lasti rakkudel taastuda toatemperatuuril 15 minutit, misjärel need suspendeeriti 4 ml IMDM söötmes ja tsentrifugeeriti 1000 rpm 20 °C juures 5 minutit (Eppendorf Centrifuge 5810R). Seejärel eemaldati sööde ja suspendeeriti sade uuesti IMDM söötmes, kusjuures vesiikulite eraldamise katse jaoks suspendeeriti sade uuesti EXOFREE IMDM söötmes. Peale seda lisati vastavas lahjenduses rakke 24-well plaadile ja inkubeeriti 48 või 72h.

## 2.2.4 Immunofluorestsents analüüs

Peale vastavat ajapunkti (72h) pesti rakke 2 korda PBS-iga. Peale pesu fikseeriti rakud 4% formaldehüüdiga (PBS/PFA) 10 minutit toatemperatuuril, misjärel permeabiliseeriti rakke 0,2% Triton x X-100-PBS-iga 1 minut. Seejärel pesti rakke 3× PBS-iga, misjärel blokeeriti rakke 1 tund 3% BSA/PBS lahusega. Blokeerimise järgselt inkubeeriti rakke üleöö 4 °C juures vastavate (vt Tabel 1) antikehadega, mis oli lahjendatud 3% BSA/PBS lahuses. Inkubatsiooni järgselt pesti üleliiged antikehad maha 3× PBS pesuga. Seejärel inkubeeriti rakke primaarset antikeha äratundva sekundaarse antikehaga 1 tund pimedas (vt Tabel 2), misjärel üleliigsed antikehad eemaldati 3× PBS ja sellele järgneva 2× MilliQ (MQ) pesuga. Katteklaaside alusklaasidele kandmiseks kasutati SlowFade Diamond (Thermo Fisher Scientific) sulandamislahust, mis sisaldas endas ka rakutuuma värvi DAPI-t. Rakkude mikroskopeerimiseks kasutati konfokaalmikroskoopi Zeiss LSM 900 63× objektiiviga (öli-immersioon) Zen Blue 3.7 tarkvaraga. Immunofluorestsents analüüs viidi läbi kolmes korduses nii MAGE-A4-EGFP liitvalku kui ka MAGE-A4 valku ekspresseerivate rakkudega (kokku n = 6).

## 2.2.5 Kasutatud antikehad

Tabel 1. Primaarsete antikehade tabel immunofluorestsents analüüsiks

Antikeha	Päritolu	Tootja	Kood	Lahjendus
anti-MAGE-A4	Küülik (rabbit)	Santa Cruz	Sc-292429	1:2000
anti-5E11-E2Tag	Hiir (mouse)	Icosagen Lab	5E11	1:2000
anti-TALIN-1	Küülik (rabbit)	Proteintech	14168-1	1:500
anti-FILAMIIN-A	Küülik (rabbit)	Atlas	HPA002925	1:500
anti-COPA	Hiir (mouse)	Santa Cruz	Sc-398099	1:250
anti- $\alpha$ -tubulin	Hiir (mouse)	Proteintech	66031-1-Ig	1:2000

Tabel 2. Sekundaarsete antikehade tabel immunofluorestsents analüüsiks

Antikeha	Tootja	Kontsentratsioon	Lahjendus
Anti-rabbit Alexa 488	Invitrogen	1 mg/ml	1:1000
Anti-mouse Alexa 488	Invitrogen	1 mg/ml	1:1000

Anti-rabbit Alexa 568	Invitrogen	1 mg/ml	1:1000
Anti-mouse Alexa 568	Invitrogen	1 mg/ml	1:1000

Tabel 3. Primaarsete antikehade tabel *Western Blot* analüüsiks

Antikeha	Päritolu	Tootja	Kood	Lahjendus
anti-MAGE-A4	Küülik (rabbit)	Santa Cruz	Sc-292429	1:10000

Tabel 4. Sekundaarsete antikehade tabel *Western Blot* analüüsiks

Antikeha	Tootja	Kontsentratsioon	Lahjendus
Goat anti-rabbit	LabAs	1 mg/ml	1:10 000

## 2.2.6 Kasutatud fluorestsensvärvid

Tabel 5. Fluorestsensvärvide tabel immunofluorestsents analüüsiks

Antikeha	Tootja	Kontsentratsioon	Lahjendus
Falloidiin	Invitrogen	1 mg/ml	1:1000

## 2.2.7 EV-de eraldamine söötimest

Ekstratsellulaarsete vesiikulite eraldamiseks EXOFREE IMDM söötimest kasvatati rakke elektroporatsiooni järgselt 72h 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> juures inkubaatoris (*Panasonic MCO-19AICUV-PE*). 72h möödudes koguti rakkudelt sööde kokku 50ml Falconi tuubidesse ja viidi läbi rida tsentrifuugimisi 4 °C juures.

1. 300g 10min surnud rakkude eemaldamiseks tsentrifuugiga (*Eppendorf Centrifuge 5810R*)
2. 2000g 20min apoptootiliste kehade ja suurte vesiikulite eraldamiseks tsentrifuugiga (*Eppendorf Centrifuge 5810R*)
3. 16500g (10 000 rpm) 20min mikrovesiikulite ja teiste väiksemate osakeste eraldamiseks ultratsentrifuugiga (*Beckman Coulter Optima™ L-90K Ultracentrifuge*, rootor SW28)
4. 120000g (27 000 rpm) 70min väikeste EV-de, sh eksosoomide, eraldamiseks ultratsentrifuugiga (*Beckman Coulter Optima™ L-90K Ultracentrifuge*, rootor SW28).

Peale igat tsentrifugimist kanti supernatant edasi uutesse 50ml Falconi tuubidesse, kusjuures esimese etapi järgselt visati tekkinud sade minema ning peale viimast tsentrifugimist tekkinud supernatant visati minema. Kõik sademed suspendeeriti 200 µl PBS-is ja hoiti 4 °C juures. EV-de eraldamisele järgnesid puhastusfuugimised söötmet vabanemiseks. 2K ja 16K puhul viidi proovi maht PBS-iga 1 milliliitrini ja tsentrifugiti proove jahutusega lauatsentrifuugiga (*MicroCL 21R Centrifuge, Thermo Scientific*) temperatuuril 4 °C 17 000g juures 20 min ning 120K vesiikulite puhul viidi maht PBS-iga 3 milliliitrini ja tsentrifugiti temperatuuril 4 °C 32 000 rpm 1,5 h ultratsentrifuugiga (*Beckman Coulter Optima™ L-90K Ultracentrifuge, rootor SW55*). Puhastusfuugide järel tekkinud sademed suspendeeriti 100 µl PBS-is ja mõõdeti Bradfordini meetodiga totaalvalgu kontsentratsiooni. Proove säilitati temperatuuril 4 °C. Saadud proove kasutati *Western Blot*'i analüüsiks.

Rakkude proovid koguti enne EV-de tsentrifugimisi. Ühelt positiivselt ja ühelt negatiivselt plaadilt koguti kokku rakud pestes neid esmalt 4ml PBS-iga ja seejärel suspendeerides 1ml PBS-EDTA-ga ning kogudes 1.5ml epsidesse. Rakke tsentrifugiti 5 min 4000 rpm lauatsentrifuugiga (Sigma 1-14 Microcentrifuge, Sigma Laborzentrifugen GmbH). Proove säilitati temperatuuril 4C ning proove kasutati *Western Blot* analüüsiks. EV-sid eraldati söötmet kolmes korduses (n = 3).

### **2.2.8 Western Blot analüüs**

Rakkude ja ekstratsellulaarsetes vesiikulite lüsaatides leiduvate valkude tuvastamiseks viidi läbi *Western blot* analüüs. Analüüsi jaoks valmistati valguproovid ette, lisades neile 2× Laemmli puhvrit, mis sisaldas 100 mM DTT-d, ning proove kuumutati 10min 100 °C. Elektroforeesiks kanti geelile 5 µl rakulüsaati ja 10 µl EV-de lüsaati. Analüüsiks lahutati valgud kõigepealt üksteisest SDS-poliüakrüülamiidgeeli elektroforeesiga (SDS-Page) 120 V juures SDS jooksupuhvriga (125 mM Tris, 960 mM glütsiin, 0.5% SDS) ning 10% akrüülamiidgeeli. Elektroforeesi viidi läbi pingel 120 V. Peale lahutamist kanti valgud geelilt üle PVDF membraanile (Amersham™ Hybond™ P 0.45 PVDF, GE Healthcare) poolkuiva ülekande meetodiga (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad), kasutades pinget 15 V ja kestvust 20 minutit membraani kohta. Membraan blokeeriti mittespetsiifiliste sidumiste vältimiseks 1h toatemperatuuril blokeerimislahuses 5% blokeerimislahuses (100 mM Tris-Cl, pH 7.5; 170 mM NaCl; 0,05% Tween 20; 5% lõssipulber) kallutil 60 minutit. Pärast blokeerimist inkubeeriti uuritavate valkude tuvastamiseks membraani üleöö primaarsete antikehadega (vt Tabel 3), mis olid lahustatud 2,5% blokeerimislahuses (100 mM Tris-Cl, pH 7.5; 170 mM NaCl; 0,05% Tween 20; 2,5% lõssipulber). Seejärel inkubeeriti membraani

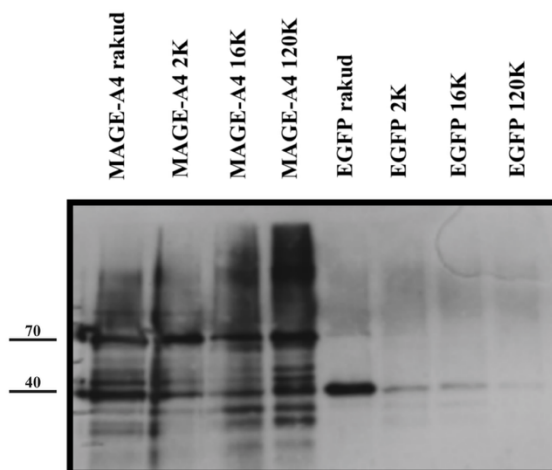
sekundaarse antikehaga, mis oli konjugeeritud mädarõika peroksüdaasiga (HRP), sobivas kontsentratsioonis ja lahjendatud 2,5% blokeerimislahuses (vt Tabel 4), 60 minutit kallutil toatemperatuuril. Peale teist pesutsükli (3 × 10 min) viidi läbi signaali ilmutamine ECL reaktiividega (Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA, USA) vastavalt tootja juhistele. Kemiluminestsentsi detekteerimiseks kasutati röntgenfilmi (AGFA CP-BU new Medical X-ray Film Blue, Agfa HealthCare, Mortsel, Belgium). Filmid skaneeriti EPSON EXPRESSION 1680 Pro skanneriga. Western blot analüüs viidi läbi kolmes korduses (n = 3).

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 MAGE-A4 esinemine ekstratsellulaarsetes vesiikulites

Varasemad uuringud on näidanud, et MAGE-A4 inkorporeeritakse erineva suurusega ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse (Kuldkepp et al., 2019), kuid siiani on teadmata, millised mehhanismid suunavad MAGE-A4 kaasamist EV-desse ning kas MAGE-A4-positiivsete EV-de vabanemine sõltub spetsiifilistest rakustruktuuridest. EV-d võivad kanda bioaktiivseid molekule retsipient rakkudeni ning omavad võimet muuta retsipient rakkude fenotüüpi (Dixson et al., 2023). Seega vähi-testise antigeenide kaasamine EV-desse võib potentsiaalselt aidata kaasa vähkkasvaja levikule.

Näitamaks, et MAGE-A4 inkorporeeritakse eri suurustega EV-desse viidi läbi vesiikulite eraldamise katse. U2OS rakud transfekteeriti plasmiididega (vt meetodika 2.2.2), mis ekspresseerisid MAGE-A4-EGFP liitvalku või EGFP valku. Seejärel inkubeeriti rakke 72 tundi ning sellele järgnes söötme kogumine ja rida ultratsentrifuugimisi eri pööretel (2K, 16K ja 120K) eraldamiseks eri fraktsioonides leiduvad osakesed. *Western blot*'i analüüsi jaoks kasutati MAGE-A4 tuvastamiseks fraktsioonidest MAGE-A4 vastast antikeha (vt Tabel 1). *Western blot* analüüs (vt Joonis 7) näitas, et MAGE-A4 leidub kõigis MAGE-A4-EGFP liitvalku ekspresseerivatest rakkudest pärinevates fraktsioonides, sealhulgas väiksemates ekstratsellulaarsetes vesiikulites (120K fraktsioon) ja suuremates vesiikulites või rakujäätmes (2K ja 16K fraktsioonid).



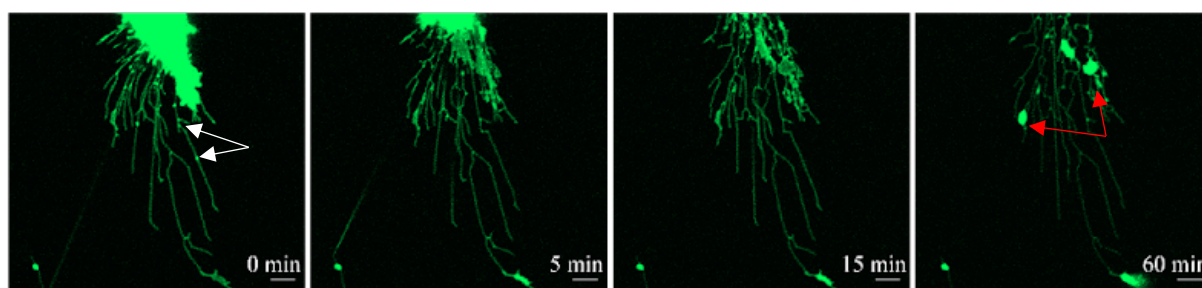
Joonis 7. **Western Blot analüüs.** U2OS rakkudesse transfekteeriti plasmiid, millelt ekspresseeriti kas MAGE-A4-EGFP liitvalku või EGFP valku. Seejärel inkubeeriti rakke 72h, misjärel koguti kokku sööde ning viidi läbi rida ultratsentrifuugimisi 300g (rakud), 2000g (2K), 16000g (16K) ja 120000g (120K) juures. Peale seda rakud lüüsi 2x Laemlii puhvris ja viidi läbi *Western Blot* analüüs. MAGE-A4 olemasolu tuvastamiseks proovides kasutati MAGE-A4 vastast antikeha. 70kDa juures olevad bändid on MAGE-A4-EGFP ja 40kDa juures raku endogeene MAGE-A4

EGFP-d ekspresseerivates rakkudes oli MAGE-A4 signaal märgatav rakkudes ja vähesel määral 2K fraktsioonis, kus võivad esineda ka apoptootilised kehad. Samuti vähesel määral 16K ja 120K fraktsioonis. MAGE-A4 signaali EGFP-d ekspresseerivate rakkude ning 2K, 16K ja 120K proovis seletab asjaolu, et U2OS rakud ekspresseerivad vähesel määral endogeenselt MAGE-A4.

### 2.3.2 MAGE-A4 lokalisatsiooni jälgimine retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides

Uurimisgrupis varasemalt läbi viidud immunofluorestsents analüüside põhjal on täheldatud, et MAGE-A4 valku ekspresseeriva plasmiidiga transfekteeritud U2OS ja MRC5 rakuliinides esineb IF-klaaside pinnal oluliselt rohkem retraktsiooni fiibreid ja migrasoomide võrreldes negatiivse kontrolliga, kus eeltoodud struktuuride esinemissagedus on märgatavalt madalam. Samuti on rakkude ja retraktsiooni fiibrite vahetus läheduses märgata märkimisväärses koguses MAGE-A4 positiivseid ekstratsellulaarseid vesiikuleid või nende laadseid sfäärilisi struktuure. Hiljutised uuringud on näidanud, et migrasoomid sisaldavad ja võivad vabastada EV-sid, mis võivad omakorda sisaldada mitmeid valke, lipiide ja RNA-sid (Ma et al., 2023). Seetõttu ei saa välistada, et vähemalt osad MAGE-A4 positiivsed EV-d võivad vabaneda migrasoomidest.

Jälgimaks MAGE-A4 lokaliseerumist retraktsiooni fiibritesse ja migrasoomidesse viidi läbi reaalaaja elusrakkude jälgimise katse. U2OS rakkudesse viidi plasmiid (vt meetoodika 2.2.2), mis ekspresseeris MAGE-A4-EGFP liitvalku või EGFP valku. Seejärel inkubeeriti rakke 48 tundi 2-well plaadil, et võimaldada rakkudel moodustada retraktsiooni fiibreid koos migrasoomidega ning jälgiti MAGEA4-EGFP valgu lokalisatsiooni retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides.



Joonis 8. **Retraktsiooni fiibrite ja migrasoomide dünaamika jälgimine elus raku.** U2OS rakkudesse transfekteeriti plasmiid, millelt ekspresseeriti MAGE-A4-EGFP liitvalku. Seejärel inkubeeriti rakke 48h. Pildid on võetud hetkel 0min, 5min, 15min ja 60min. 0 min pildil olevad valged nooled tähistavad migrasoomide. 60 min pildil olevad punased nooled tähistavad retraktsiooni fiibrites tekkivaid paksendeid. Pildid jäädvustati Zeiss LSM 900 konfokaalse mikroskoobiga (63-kordne suurendus, skaalariba 10  $\mu$ m).

Joonisel 8 on näha, et retraktsiooni fiibrid koos migrasoomidega moodustuvad raku liikumisuunaga vastupidises suunas, mis on ka eeltoodud struktuurile omane tunnus. MAGE-A4 lokaliseerub retraktsiooni fiibrite kimbu täies ulatuses seal hulgas migrasoomidesse. Kusjuures reaalaaja elusraku katse algfaasis on olemas MAGE-A4 positiivsed migrasoomid (vt Joonis 8, 0 min), kuid 60 min pärast on moodustunud MAGE-A4 paksendid (vt Joonis 8, 60 min) ning migrasoomide enam nii palju märgata ei ole. Selgusetuks jääb miks ja kuidas need paksendid tekivad. Kuigi antud eksperimendis jälgiti rakke kuni 60 minuti jooksul, viitavad tulemused sellele, et MAGE-A4 lokaliseerumine retraktsiooni fiibrites võib olla dünaamiline protsess. Seda seetõttu, et retraktsiooni fiibrite ja migrasoomide dünaamika jälgimisel elusrakus täheldati MAGE-A4 “kogumite” liikumist nii raku suunas kui ka rakust väljapoole. Kusjuures rakupoole liikudes sai “kogumi” liikumine alguse paksendist. Mis seda liikumist vahendab jääb hetkel selgusetuks. Tulevikus tuleks kindlasti pikendada elusraku katse kestust ning võimalusel jälgida retraktsiooni fiibrite ja migrasoomide teket algusest peale kuni raku täieliku lahkumiseni.

### **2.3.3 MAGE-A4 positiivsetesse vesiikulitesse kaasatud valkude immunofluorestsents analüüs**

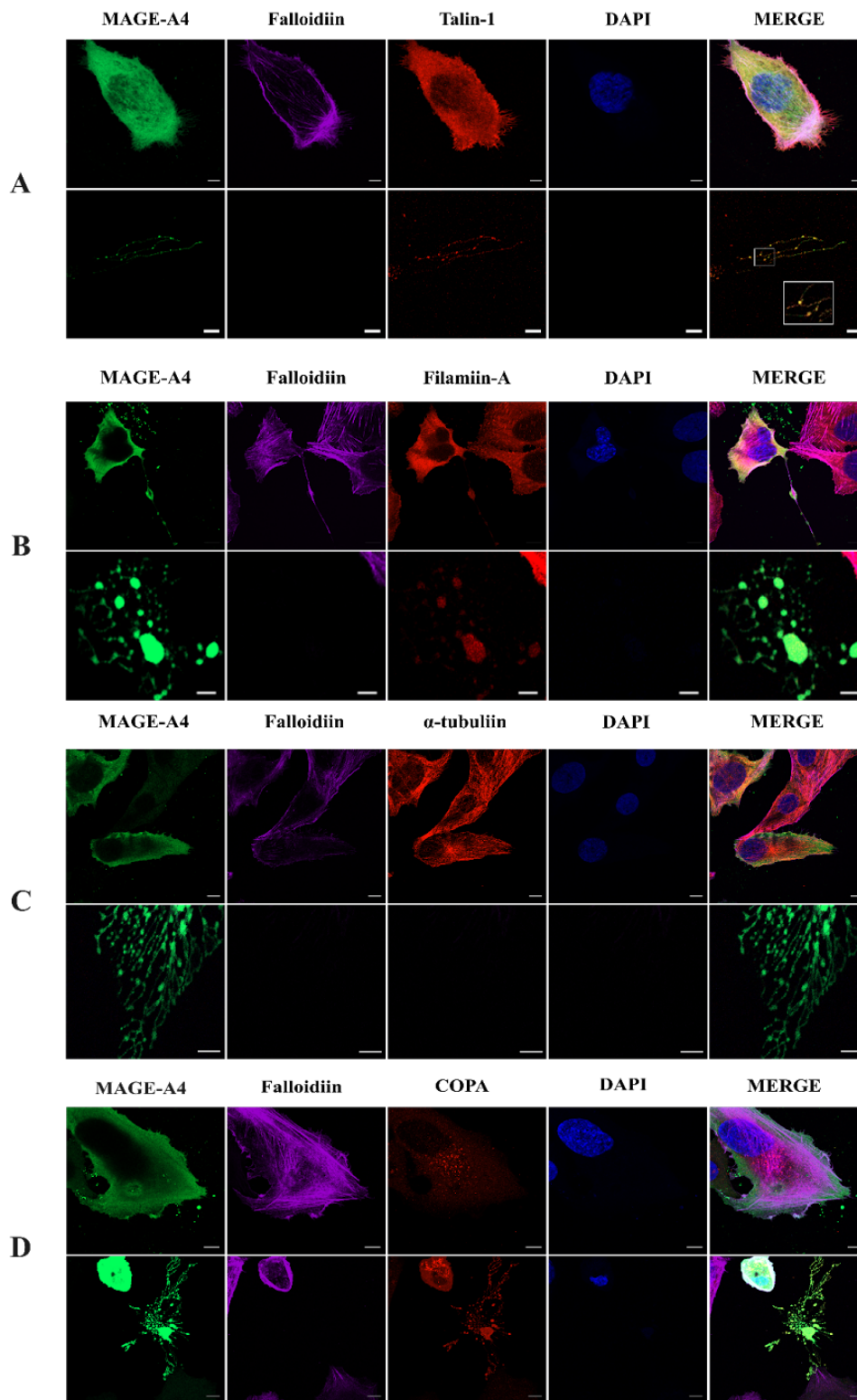
Autori töögrupis viidi varasemalt läbi katse, mille eesmärk oli tuvastada MAGE-A4 positiivsetesse vesiikulitesse kaasatud valgud. Selleks transfekteeriti COP5-EBNA rakke MAGE-A4 valku ekspresseeriva plasmiidiga ning koguti rakkude poolt söötmesse eraldatud vesiikulid. Seejärel viidi läbi immunopretsipitatsiooni katse MAGE-A4 suhtes, et eraldada MAGE-A4 positiivsed vesiikulid koos nendesse kaasatud valkudega. Eraldatud valkude koosseisu määramiseks kasutati massispektromeetriaal põhinevat proteoomikat. Tulemuste põhjal koostati sagedusandmestik, millest põhjal valiti välja kolm MAGE-A4-ga koos vesiikulites esinenud valku: COPA, FILAMIIN-A ja TALIN-1. Kusjuures valiti  $\alpha$ -tubuliin negatiivseks kontrollvalguks, kuna see ei lokaliseerunud retraktsiooni fiibritesse ega migrasoomidesse, võimaldades seeläbi hinnata kas eeltoodud valkude lokaliseerumine retraktsiooni fiibritesse ja migrasoomidesse on spetsiifiline uuritavatele valkudele. TALIN-1 on fokaalse adhesiooni valk, mis aktiveerib ja ühendab integriine aktiini tsütoskeletiga. FILAMIIN-A on valk, mis ristseob omavahel aktiini filamente ja seob aktiini filamente membraani glükovalkudega. COPA (ingl *Coatomer Protein Complex subunit Alpha*) on valk, mis on osa COPI valgu kompleksist ja on oluline vesiikulite transpordil Golgi kompleksist ER-i.  $\alpha$ -tubuliin on valk, mis koos beeta-tubuliiniga moodustab mikrotoobileid, aidates säilitada raku kuju, võimaldab rakusisest transporti ja osaleb raku jagunemisel.

Käesolevas töös viidi läbi eeltoodud valkude lokaliseerumise ja võimaliku kolokaliseerumise hindamiseks MAGE-A4-ga läbi immunofluorestsentsanalüüsid U2OS rakuliinis. Rakkudesse transfekteeriti plasmiid (vt metoodika 2.2.2), mis ekspresseeris kas MAGE-A4-EGFP liitvalku või EGFP valku. Parema eristusvõime saavutamiseks kasutati plasmidi, mis ekspresseeris MAGE-A4 valku ning negatiivse kontrollina sel juhul MOCK (ilma plasmiidita) proovi. Valkude tuvastamiseks kasutati uuritavate valkude vastaseid primaarseid antikehi (vt Tabel 1) ja sekundaarseid antikehi (vt Tabel 2). Sekundaarsed antikehad omasid rohelist fluorestsentsmärgist (Alexa Fluor 488) MAGE-A4 tuvastamiseks ning uuritavate valkude puhul punast fluorestsentsmärgist (Alexa Fluor 568).

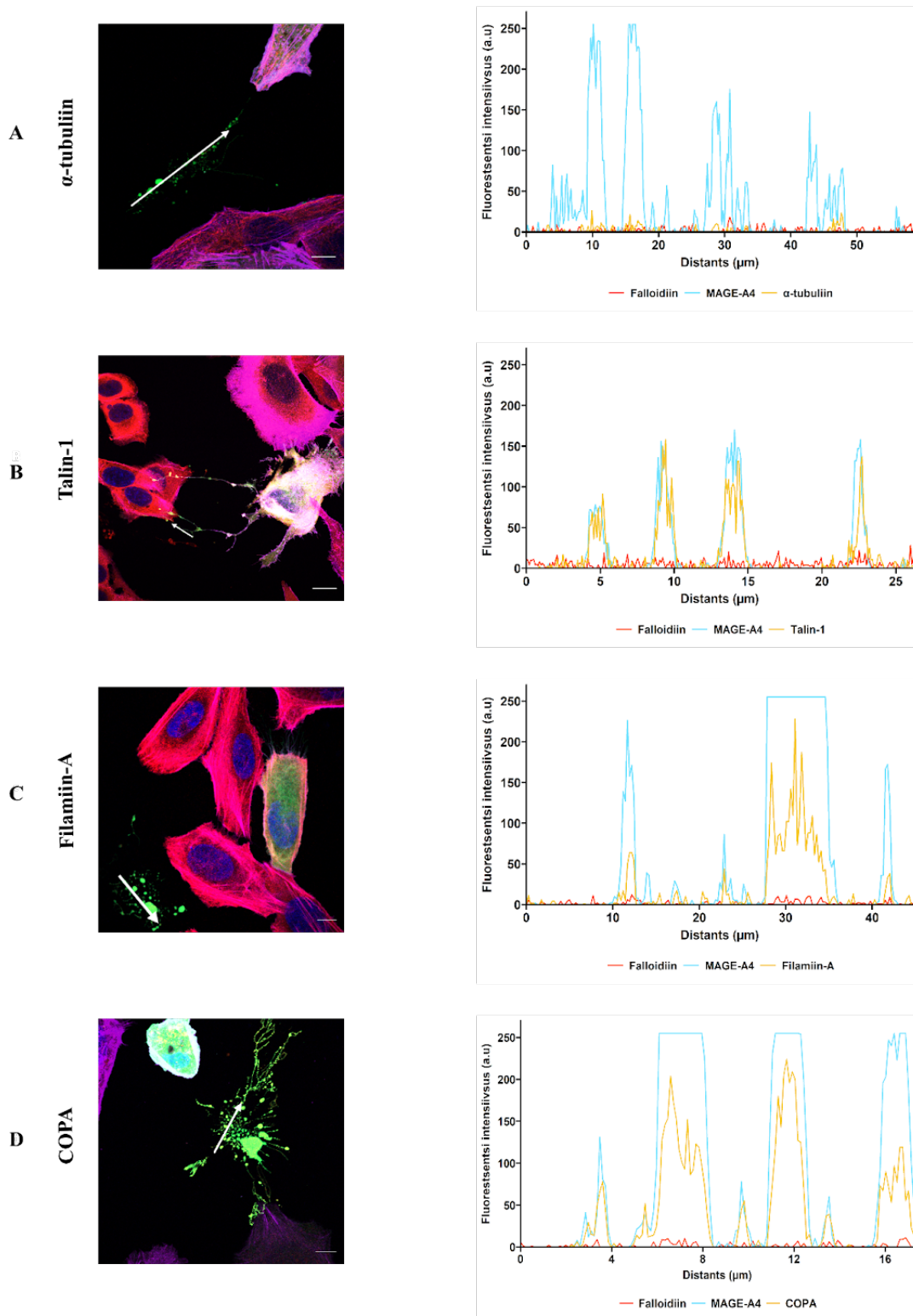
Immunofluorestsents analüüsi tulemustest selgus, et TALIN-1 ja MAGE-A4 signaalid asusid lähestikku ja kattusid retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides (Joonis 9A). FILAMIIN-A puhul täheldati lähedast või sarnast lokaliseerumist peamiselt migrasoomides ja nendega potentsiaalselt seotud paksendites, kuid mitte retraktsiooni fiibrites (Joonis 9B).  $\alpha$ -tubuliini ei tuvastatud retraktsiooni fiibrites ega migrasoomides (Joonis 9C). COPA valgu lokaliseerumise seotud tulemused osutusid varieeruvateks. Immunofluorestsents analüüsi põhjal oli võimalik tuvastada ekstratsellulaarseid vesiikuleid ning suuremaid retraktsiooni fiibrite kimpe ja migrasoomi, milles esines COPA signaali (vt Joonis 9D). Samas esines ka retraktsiooni fiibrite kimpe ja migrasoomi, milles COPA signaal puudus. Huvitaval kombel COPA ja MAGE-A4 kolokaliseerumise hindamisel ei kolokaliseerunud nad ühegi korral koos Golgi kompleksis. Seetõttu jääb selgusetuks miks esineb ikkagi MAGE-A4 ja COPA positiivseid vesiikuleid ja migrasoomi IF klaasidel.

Täiendava kvantitatiivse hindamise eesmärgil viidi läbi ka IF-piltide põhjal signaalide profiilanalüüs. Selleks valiti retraktsiooni fiibrite kimpudest sirged jooneprofiilid, mille ulatuses mõõdeti rohelist (MAGE-A4) ja punast (uuritava valgu) fluorestsents piikide intensiivsust. Lisaks kasutati Falloidiini (vt Tabel 5), mis värvis aktiini. Tulemuseks saadi fluorestsentsprofiilide graafikud, milles võrreldi signaalide piikide kattuvust.

$\alpha$ -tubuliini puhul (vt Joonis 10A) ei täheldatud fluorestsentsi piikide kattuvust üldse s.t  $\alpha$ -tubuliin esines ilma MAGE-A4 terve mõõdetud distantse ulatuses. TALIN-1 puhul (vt Joonis 10B) esines MAGE-A4 signaali (sinine) ja TALIN-1 signaali (kollane) piikide täieulatuslik kattuvus terve mõõdetud distantse ulatuses s.t 4 migrasoomi ulatuses, mistõttu on täheldatav graafikul ka 4 piiki. FILAMIIN-A puhul (vt Joonis 10C) esines samuti piikide kattuvust, kuid piikide kattuvus ei olnud täielik s.t esines alasid, kus MAGE-A4 esines FILAMIIN-A-st eraldi. COPA puhul olid tulemused sarnased FILAMIIN-A-le. Esines alasid, kus MAGE-A4 esines COPA-st eraldi (vt Joonis 10D).

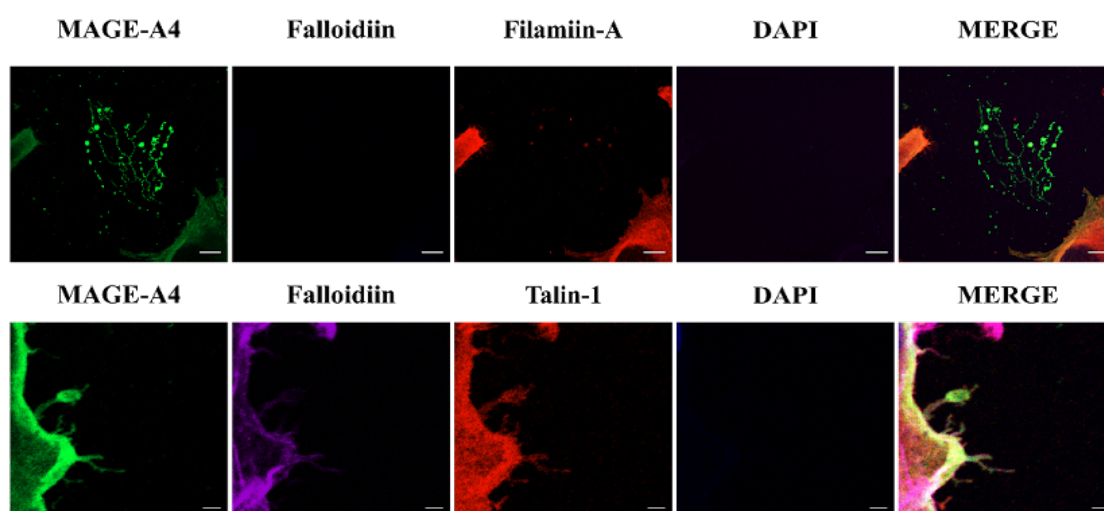


Joonis 9. Immunoflorestsents analüüs U2OS rakkudes 72h pärast plasmidi transfektsiooni, millelt ekspresseeriti MAGE-A4 valku. (A) TALIN-1 (punane), anti-VLP-MAGE-A4 (roheline), DAPI (sinine), Falloidiin (lilla); (B) FILAMIIN-A (punane), anti-MAGE-A4 (roheline), DAPI (sinine), Falloidiin (lilla); (C)  $\alpha$ -tubuliin (punane), anti-VLP-MAGE-A4 (roheline), DAPI (sinine), Falloidiin (lilla); (D) COPA (punane), anti-VLP-MAGE-A4 (roheline), DAPI (sinine), Falloidiin (lilla). Pildid jäädvustati Zeiss LSM 900 konfokaalse mikroskoobiga (63-kordne suurendus, õli-immersiooniga objektiiv, skaalariba 10  $\mu$ m)



Joonis 10. **Võrdlev signaalide profiilide analüüs.** Analüüs viidi läbi U2OS rakuliiniga tehtud IF piltide põhjal. Sinine signaal tähistab MAGE-A4 fluorestsentsi intensiivsust, punane signaal Falloidiini fluorestsentsi intensiivsust ja kollane ülevastavalt  $\alpha$ -tubuliini, TALIN-1, FILAMIIN-A või COPA fluorestsentsi intensiivsust. Pildidel olev valge nool tähistab uuritavat ala. Pildid jäädvustati Zeiss LSM 900 konfokaalse mikroskoobiga (63-kordne suurendus, õli-immersiooniga objektiiv, skaalariba 10  $\mu\text{m}$ )

Sama immunofluorestsentsanalüüs viidi läbi ka MRC5 rakuliinis, et näha kas MAGE-A4, TALIN-1, FILAMIIN-A,  $\alpha$ -tubuliini ja COPA lokaliseerumine on sarnane fibroblastides nagu U2OS rakuliinis. Tulemused olid sarnased, näidates, et MAGE-A4 kolokaliseerus TALIN-1-ga lähestikku nii retraktsiooni fiibrites kui ka migrasoomides. FILAMIIN-A puhul oli märgatav kolokaliseerumine peamiselt migrasoomides või paksendites.  $\alpha$ -tubuliini ei lokaliseerunud üldse retraktsiooni fiibritesse ega migrasoomidesse ning COPA tulemused varieerusid nagu U2OS rakuliinis. Kusjuures MRC5 kontrollproovis, kus rakkudesse ei transfekteeritud MAGE-A4 plasmidi ega polnud ka MAGE-A4 endogeenset ekspressiooni, täheldati TALIN-1 ja FILAMIIN-A lokaliseerumist samadesse struktuuridesse kui MAGE-A4 ekspresseerivates rakkudes ehk TALIN-1 lokaliseerus retraktsiooni fiibritesse ja migrasoomidesse ning FILAMIIN-A peamiselt vaid migrasoomidesse.



Joonis 11. Immunofluorestsents analüüs MRC5 rakkudes 72h pärast plasmidi transfektsiooni, millelt ekspresseeriti MAGE-A4 valku. TALIN-1 (punane), DAPI (sinine); FILAMIIN-A (punane), MAGE-A4 (roheline), Falloidiin (lilla). Pildid jäädvustati Zeiss LSM 900 konfokaalse mikroskoobiga (63-kordne suurendus, õli-immersiooniga objektiiv, skaalariba 10  $\mu$ m).

## 2.4 Arutelu

### 2.4.1 MAGE-A4 lokaliseerimise jälgimine retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida vähi-testise antigeeni MAGE-A4 lokaliseerumist ja potentsiaalset rolli retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides ning hinnata selle kolokaliseerumist MAGE-A4-positiivsetes vesiikulites tuvastatud valkudega (TALIN-1, FILAMIIN-A ja COPA).

Katsete tulemusena selgus, et MAGE-A4 lokaliseerub retraktsiooni fiibritesse ja migrasoomidesse ning selle lokaliseerumine nendesse struktuuridesse võib olla dünaamiline protsess. Reaalajas elusraku katsetes täheldati MAGE-A4 kogumite aktiivset transporti nii raku suunas kui ka rakust eemale. Lisaks täheldati MAGE-A4-positiivsete paksendite moodustumist retraktsiooni fiibrites. Paksenditest algas sageli ka MAGE-A4 kogumite liikumine raku suunas, kuid hetkel pole selge, millise mehhanismi alusel ja miks need paksendid tekivad. Üheks potentsiaalseks seletuseks võib olla see, et MAGE-A4 võib lokaliseeruda piirkondadesse, kus esineb suur mehaaniline pinge, mis põhjustab membraani lokaalset paisumist, näiteks migrasoomides. Võrreldes MAGE-A4-EGFP liitvalku ja EGFP valku ekspresseerivate rakkude morfoloogiat, täheldati, et MAGE-A4 ekspressiooniga rakkudel esines rohkem retraktsiooni fiibreid ja migrasoomide või migrasoomilaadseid struktuure. Lisaks täheldati suurenenud ekstratsellulaarsete vesiikulite kogust rakkude vahetusläheduses võrreldes kontrollprooviga. Võib oletada, et MAGE-A4 lokaliseerumisel retraktsiooni fiibritesse ja migrasoomidesse on potentsiaalne roll rakkudevahelises suhtluses. Varasemad uuringud on näidanud, et rakud võivad sisse võtta nii retraktsiooni fiibreid kui ka migrasoomide (Zhang et al., 2023; Ma et al., 2015). Seetõttu võib MAGE-A4 esinemine nendes struktuurides olla üheks viisiks kuidas MAGE-A4 levib rakkude vahel ja aitab kaasa vähi progresseerumisele.

Tulevikus tuleks kindlasti jälgida retraktsiooni fiibriite ja migrasoomide moodustumist pikemalt ja ka teistes rakuliinides. Kvantitatiivsete tulemuste saamiseks võiks migrasoomide puhul rakendada voolutsütomeetriat tuntud migrasoomide markeriga, näiteks integriin  $\alpha 5\beta 1$ , TSPAN4 või kolesterooliga, mis on omakorda fluorestsentsstähisega tähistatud. EV-de puhul võib rakendada sama meetodit või NanoParticle Tracking analüüsi.

### 2.4.2 MAGE-A4 positiivsetesse vesiikulitesse kaasatud valkude kolokaliseerimise uurimine

Uurimaks MAGE-A4 võimalikku interaktsiooni valgukompleksidega retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides, viidi läbi immunofluorestsents analüüsid U2OS ja MRC5 rakuliinides

valkudega TALIN-1, FILAMIIN-A ja COPA, mis olid eelnevalt tuvastatud MAGE-A4-positiivsetes vesiikulites. Kusjuures  $\alpha$ -tubuliini kasutati negatiivse kontrollina. Katsete tulemusel selgus, et TALIN-1 kolokaliseerus MAGE-A4-ga kõige sarnasemalt, nii retraktsiooni fiibrites kui ka migrasoomides. FILAMIIN-A kolokaliseerus MAGE-A4-ga peamiselt migrasoomides ja paksendites ning vähemal määral kui TALIN-1. COPA puhul olid tulemused varieeruvad. Seejuures ei täheldatud MAGE-A4 ja COPA lokaliseerumist Golgi kompleksis, mistõttu jääb ebaselgeks, millal ja miks COPA kaasatakse MAGE-A4 positiivsetesse retraktsiooni fiibritesse, migrasoomidesse ja EV-desse. Võib oletada, et nende kahe valgu potentsiaalne interaktsioon toimub väljaspool Golgi kompleksi ning COPA kaasamine võib olla selektiivne protsess, mis omakorda võib sõltuda spetsiifilisest signaalist. Samas ei saa välistada, et COPA signaalid võivad olla ka artefaktid, mis tekivad raku lagunemisel.  $\alpha$ -tubuliini kui negatiivse kontrolli puudumine nendest struktuuridest toetab uuritud valkude lokaliseerumise spetsiifilisust. Väärrib tähelepanu, et MRC5 rakuliinis MAGE-A4 plasmiidita rakkudes tuvastati TALIN-1 ja FILAMIIN-A lokaliseerumist samades struktuurides kui MRC5 rakkudes millesse oli MAGE-A4 plasmiid transfekteeritud või U2OS rakuliinides transfekteeritud ja transfekteerimata rakkudes. Seetõttu tuleb MAGE-A4 ja eeltoodud valkude kolokaliseerumist tõlgendada ettevaatlikult, kuna tegemist võib olla ruumilise koosinemisega, mis ei viita otsesele funktsionaalsele interaktsioonile. Tulevikus võiks kasutada spetsiaalset protokollit migrasoomide eraldamiseks ning kasutada MAGE-A4 kõrval migrasoomide markereid, et veenduda MAGE-A4 olemasolus migrasoomides ka biokeemiliselt. Peale selle võiks läbi viia ka Ko-IP katse eraldatud migrasoomidega, et näha, kas MAGE-A4 on migrasoomides potentsiaalselt kompleksis mõne valguga, näiteks eelmainitud TALIN-1 või FILAMIIN-A-ga.

MAGE-A4 kolokalisatsioon immunofluorestsents analüüsis TALIN-1 ja FILAMIIN-A-ga tekitab samas küsimuse, et miks toimub see kolokalisatsioon nende valkudega. On teada, et fokaalse adhesiooni valk nagu TALIN-1 vahendab mehaanilise jõu ülekannet intergriinide ja aktiini vahel oma spetsiifiliste subdomeenide abil. TALIN-1 võib aidata vähendada membraani lokaalset mehaanilist pinget, mida MAGE-A4 võib potentsiaalselt mõjutada. Siiski on selle potentsiaalse interaktsiooni täpne mehhanism veel ebaselge. Potentsiaalselt läheks see hüpotees vastuollu Yu ja Yu (2021) uuringuga, kus leiti, et migrasoomides esinevad integriini rikkad alad ei ole fokaalsed adhesioonid, kuna klassikalised fokaalsete adhesioonide markerid nagu paksilliin, vinkuliin ja züksiin ei lokaliseerunud migrasoomidesse. Samas aga ei mainita selles uuringus TALIN-1-te, mis potentsiaalselt ei välista TALIN-1 rolli migrasoomides.

Teisalt oletades, et MAGE-A4 ja TALIN-1 või FILAMIIN-A puhul esineb vaid ruumiline koospaiknemine ning potentsiaalne interaktsioon puudub võib pakkuda võimalikke seletusi

miks MAGE-A4 neisse struktuuridesse lokaliseerub. MAGE-A4 võib potentsiaalselt seonduda lipiidikogumite või mikrodomeenidega, mis stabiliseerivad piirkondi, kus esineb suurem mehaaniline pinge. See võiks aidata seletada ka, miks moodustuvad MAGE-A4-positiivsed paksendid. Varasemad uuringud on näidanud, et MAGE-A4 kaasamine EV-desse võib olla seotud MAGE-perekonnale omase MHD domeeniga. Kui viidi läbi MAGE-A4 N-terminaalse otsa (161 aa) deletsioon, vähenes selle inkorporatsioon EV-desse võrreldes täispika MHD-domeeniga variandiga (Kuldkepp, 2017). Seetõttu oleks tulevikus mõistlik läbi viia katseid, kus MHD-domeeni muteeritakse edasi ning analüüsitakse IF abil, kas MAGE-A4 ja TALIN-1 või FILAMIIN-A kolokaliseerumismustrid muutuvad ning kas MAGE-A4 kaasamine EV-desse või retraktsiooni fiibritesse ja migrasoomidesse muutub. See aitaks potentsiaalselt näidata ka kas MAGE-A4 interaktsioonis nende valkudega on toimunud muutusi. Lisaks on leitud, et MAGE-A4 võib omada biokeemilisi omadusi, mis võimaldavad sellel seonduda EV-de pinnale passiivse inkubeerimise teel (Reinsalu et al., 2021). See toetab hüpoteesi, et MAGE-A4 võib olla membraaniseoseline valk. Samuti on varasemalt näidatud, et MAGE-A4 ei seonu EV-de pinnale elektrostaatiliste interaktsioonide kaudu, vaid pigem tugevama, potentsiaalselt hüdrofoobse seose abil (Reinsalu et al., 2021). Seda toetab ka ChimeraX-iga visualiseeritud MHD domeeni kristallstruktuuri analüüs, mis näitas selgeid hüdrofoobseid regioone, mis toetab hüpoteesi, et MAGE-A4 võib membraanidega seonduda hüdrofoobsete interaktsioonide kaudu. Hüpoteesi, et MAGE-A4 on membraani seoseline valk uurimiseks võiks kasutada plasmamembraani värve, näiteks WGA-d (ingl *Wheat Germ Agglutinin*) ja viia seejärel läbi immunofluorestsents analüüs koos MAGE-A4-ga. Lisaks võiks raku lüsaadist eraldada membraani ja tsütoplasma fraktsiooni ja viia läbi *Western Blot* analüüs, et näha kas MAGE-A4 signaal seal on tugevam kui tsütoplasmas.

Tõestus, et MAGE-A4 on membraaniseoseline valk võiks potentsiaalselt aidata vastata ka varasemate uuringute küsimustele, kus leiti, et MAGE-A4 inkorporteeritakse EV-desse, kuid jäi ebaselgeks, millise mehhanismi abil see toimub. Seda teadmist saaks rakendada ka biotehnoloogiliselt ja kliiniliselt, näiteks arendades teraapiaid, mis sihivad just membraanidega seotud MAGE-A4 valke, võimaldades potentsiaalselt mõjutada ja selektiivselt suunata ravimolekulide sattumist EV-desse. Lisaks võiks MAGE-A4 membraani seondumisvõimet kasutada liposoomide või teiste nanopartiklite suunamiseks spetsiifiliselt vähirakkude membraanidele, avades uusi võimalusi immunoteraapias.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida vähi-testise antigeeni MAGE-A4 lokaliseerumist ja selle võimalikku rolli retraktsiooni fiibrites ja migrasoomides ning iseloomustada MAGE-A4 positiivsetesse vesiikulitesse kaasatud valkude lokaliseerumist (COPA, TALIN-1 ja FILAMIIN-A), mis on varasema töö käigus tuvastatud IP ja proteoomika abil.

Uuringus leiti, et MAGE-A4 lokaliseerub retraktsiooni fiibritesse ja migrasoomidesse ning lisaks ka paksenditesse, mis moodustuvad migrasoomidest või nendega vahetus läheduses asuvatest piirkondadest. Samuti näidati, et MAGE-A4 inkorporeerub erineva suurusega ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse. Seejärel püüti selgitada mehhanismi, mille abil võiks MAGE-A4 retraktsiooni fiibritesse ja migrasoomidesse sattuda. Varasemate proteoomika andmete põhjal leiti, et MAGE-A4 positiivsetesse vesiikulitesse kaastakse mitmeid tsütoskeleti ja adhesiooni valke. Järgnevalt viidi läbi rida immunofluorestsents analüüse koos MAGE-A4 positiivsetes vesiikulites enim esinenud valkudega: TALIN-1, FILAMIIN-A ja COPA, mida lisaks analüüsiti signaaliprofiili põhjal. TALIN-1 puhul täheldati lähestikust kolokaliseerumise signaali MAGE-A4-ga, mis moodustas kollase signaali. FILAMIIN-A kolokaliseerus peamiselt migrasoomidesse ja paksenditesse, kuid kolokaliseerumise signaal ei olnud sama tugev kui TALIN-1 puhul. COPA tulemused olid varieeruvad. Leiti retraktsiooni fiibreid ja migrasoomide või EV-sid, kus COPA ja MAGE-A4 kolokaliseerusid, kuid ka selliseid, kus kolokaliseerumise signaal ei toimunud.

**Investigating the localization of MAGE-A4 in retraction fibers and migrasomes**  
**Rando Kalbus**  
**Summary**

The expression of the cancer-testis antigen MAGE-A4 outside the testis is associated with poor prognosis in patients, but its precise molecular mechanisms and role in tumorigenesis remain unclear. Previous studies have shown that MAGE-A4 is incorporated into extracellular vesicles (EVs) of various sizes. Since EVs have the ability to influence the phenotype of recipient cells, the incorporation of MAGE-A4 in EVs may contribute to cancer progression.

The aim of this study was to investigate the localization of MAGE-A4 and its possible role in retraction fibers and migrasomes. Additionally, the study sought to characterize the localization of proteins that were recruited to MAGE-A4 positive vesicles (COPA, TALIN-1 and FILAMIN-A) and which were previously identified via immunoprecipitation and proteomics. The study found that MAGE-A4 localizes to retraction fibres and migrasomes and additionally to swellings that form on retraction fibres. The study also showed that MAGE-A4 gets incorporated into EV-s of different sizes. After that we sought to elucidate the mechanism how MAGE-A4 could potentially localize to retraction fibres and migrasomes. Previous data from proteomics was obtained and multiple proteins were found to be recruited to MAGE-A4 positive EV-s. Multiple immunofluorescence assays were carried out with TALIN-1, FILAMIN-A and COPA paired with signal profile analysis. TALIN-1 had a close colocalization signal with MAGE-A4 forming a yellow signal, mix of green and red fluorescence wave length, respectively of MAGE-A4 and TALIN-1, potentially hinting that MAGE-A4 could interact with TALIN-1. FILAMIN-A did colocalize with MAGE-A4 to migrasomes and swellings, but did not have as close colocalization signal as TALIN-1. COPA results were mixed, we could find retraction fibres and migrasomes and EV-s that had strong signal with MAGE-A4 but also where it did not colocalize at all.

Previous studies have shown that both migrasomes and retraction fibers can be taken up by other cells (Zhang et al., 2023; Ma et al., 2015). This raises the possibility that MAGE-A4, when present in these structures, could be transferred between cells and thereby contribute to cancer progression. Additionally the localization of MAGE-A4 to dynamic, membrane-associated structures such as retraction fibres, migrasomes, and EVs suggests that it may function as a membrane-binding protein, potentially through its MAGE homology domain (MHD), which we seek to elucidate in further studies.

## TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajat Reet Kurge võimaluse eest sooritada bakalaureusetöö tema uurimisrühmas. Vaatamata rohketele kohustustele leidis ta alati aega, et arutada tulemusi, jagada nõuandeid ning suunata mind läbi uurimistöö protsessi. Tema pühendumus ja toetav hoiak mängisid olulist rolli selle töö valmimisel.

Täna ka kogu laborirühma – te olite alati abivalmid, sõbralikud ja valmis jagama oma teadmisi. Teiega koos töötamine muutis kogu kogemuse märksa meeldivamaks ja rikastavamaks.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Ai, H., Yang, H., Li, L., Ma, J., Liu, K., & Li, Z. (2023). Cancer/testis antigens: Promising immunotherapy targets for digestive tract cancers. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1190883>
- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, 113(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>
- Alsalloum, A., Shevchenko, J. A., & Sennikov, S. (2023). The Melanoma-Associated Antigen Family A (MAGE-A): A Promising Target for Cancer Immunotherapy? *Cancers*, 15(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/cancers15061779>
- Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death—Susan Elmore, 2007. (s.a.). *Salvestatud* 20. aprill 2025, <https://journals.sagepub.com/doi/10.1080/01926230701320337>
- Atkin-Smith, G. K., Paone, S., Zanker, D. J., Duan, M., Phan, T. K., Chen, W., Hulett, M. D., & Poon, I. K. H. (2017). Isolation of cell type-specific apoptotic bodies by fluorescence-activated cell sorting. *Scientific Reports*, 7(1), 39846. <https://doi.org/10.1038/srep39846>
- Barker, P. A., & Salehi, A. (2002). The MAGE proteins: Emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *Journal of Neuroscience Research*, 67(6), 705–712. <https://doi.org/10.1002/jnr.10160>
- Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/biology9010021>
- Bergeron, A., Picard, V., LaRue, H., Harel, F., Hovington, H., Lacombe, L., & Fradet, Y. (2009). High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. *International Journal of Cancer*, 125(6), 1365–1371. <https://doi.org/10.1002/ijc.24503>
- Berumen Sánchez, G., Bunn, K. E., Pua, H. H., & Rafat, M. (2021). Extracellular vesicles: Mediators of intercellular communication in tissue injury and disease. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00787-y>
- Bhan, S., Chuang, A., Negi, S. S., Glazer, C. A., & Califano, J. A. (2012). MAGE-A4 induces growth in normal oral keratinocytes by inhibiting growth arrest and apoptosis. *Oncology Reports*, 28(4), 1498–1502. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1934>
- Boël, P., Wildmann, C., Sensi, M. L., Bresseur, R., Renauld, J.-C., Coulie, P., Boon, T., & van der Bruggen, P. (1995). BAGE: A new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity*, 2(2), 167–175. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(95\)80053-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(95)80053-0)
- Bresseur, F., Rimoldi, D., Liénard, D., ... Marchand, M. (1995). Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *International Journal of Cancer*, 63(3), 375–380. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910630313>
- Caballero, O. L., & Chen, Y.-T. (2009). Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Science*, 100(11), 2014–2021. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01303.x>
- Carnino, J. M., Ni, K., & Jin, Y. (2020). Post-translational Modification Regulates Formation and Cargo-Loading of Extracellular Vesicles. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00948>
- Chen, X., Cai, S., Wang, L., Zhang, X., Li, W., & Cao, X. (2019). Analysis of the function of MAGE-A in esophageal carcinoma by bioinformatics. *Medicine*, 98(21), e15774. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015774>

- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Théry, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 24), 5553–5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
- Cramer, L. P., & Mitchison, T. J. (1997). Investigation of the mechanism of retraction of the cell margin and rearward flow of nodules during mitotic cell rounding. *Molecular Biology of the Cell*, 8(1), 109–119. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.1.109>
- De Donato, M., Peters, S. O., Hussain, T., Rodulfo, H., Thomas, B. N., Babar, M. E., & Imumorin, I. G. (2017). Molecular evolution of type II MAGE genes from ancestral MAGED2 gene and their phylogenetic resolution of basal mammalian clades. *Mammalian Genome*, 28(9), 443–454. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9695-6>
- Dellar, E. R., Hill, C., Melling, G. E., Carter, D. R. F., & Baena-Lopez, L. A. (2022). Unpacking extracellular vesicles: RNA cargo loading and function. *Journal of Extracellular Biology*, 1(5), e40. <https://doi.org/10.1002/jex2.40>
- Dharan, R., Huang, Y., Cheppali, S. K., Goren, S., Shendrik, P., Wang, W., Qiao, J., Kozlov, M. M., Yu, L., & Sorkin, R. (2023). Tetraspanin 4 stabilizes membrane swellings and facilitates their maturation into migrasomes. *Nature Communications*, 14(1), 1037. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36596-9>
- Dixson, A. C., Dawson, T. R., Di Vizio, D., & Weaver, A. M. (2023). Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(7), 454–476. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00576-0>
- Doyle, J. M., Gao, J., Wang, J., Yang, M., & Potts, P. R. (2010). MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Molecular Cell*, 39(6), 963–974. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.029>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Fon Tacer, K., Montoya, M. C., Oatley, M. J., ... Potts, P. R. (2019). MAGE cancer-testis antigens protect the mammalian germline under environmental stress. *Science Advances*, 5(5), eaav4832. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav4832>
- Fratta, E., Coral, S., Covre, A., Parisi, G., Colizzi, F., Danielli, R., Nicolay, H. J. M., Sigalotti, L., & Maio, M. (2011). The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Molecular Oncology*, 5(2), 164. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.02.001>
- Fujiwara-Kuroda, A., Kato, T., Abiko, T., ... Hirano, S. (2018). Prognostic value of MAGE-A4 in primary lung cancer depends on subcellular localization and p53 status. *International Journal of Oncology*, 53(2), 713–724. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4425>
- Griffith-Jones, S., Alvarez, L., Mukhopadhyay, U., Gharbi, S., Rettel, M., Adams, M., Hennig, J., & Bhogaraju, S. (2024). Structural basis for RAD18 regulation by MAGE-A4 and its implications for RING ubiquitin ligase binding by MAGE family proteins. *The EMBO Journal*, 43(7), 1273–1300. <https://doi.org/10.1038/s44318-024-00058-9>
- Hong, D. S., Van Tine, B. A., Biswas, S., ... Butler, M. O. (2023). Autologous T cell therapy for MAGE-A4+ solid cancers in HLA-A\*02+ patients: A phase 1 trial. *Nature Medicine*, 29(1), 104–114. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02128-z>
- Hou, S., Xian, L., Shi, P., Li, C., Lin, Z., & Gao, X. (2016). The Magea gene cluster regulates male germ cell apoptosis without affecting the fertility in mice. *Scientific Reports*, 6(1), 26735. <https://doi.org/10.1038/srep26735>
- Huang, Y., Zucker, B., Zhang, S., ... Yu, L. (2019). Migrasome formation is mediated by assembly of micron-scale tetraspanin macrodomains. *Nature Cell Biology*, 21(8), 991–1002. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0367-5>

- Huang, Z., Wang, M., Chen, Y., ... Chen, L. (2025). Glioblastoma-derived migrasomes promote migration and invasion by releasing PAK4 and LAMA4. *Communications Biology*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-07526-w>
- Ibrahim, S. A., & Khan, Y. S. (2024). Histology, Extracellular Vesicles. StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562256/>
- Ishihara, M., Kageyama, S., Miyahara, Y., ... Shiku, H. (2020). MAGE-A4, NY-ESO-1 and SAGE mRNA expression rates and co-expression relationships in solid tumours. *BMC Cancer*, 20, 606. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07098-4>
- Jay, A., Reitz, D., Namekawa, S. H., & Heyer, W.-D. (2021). Cancer testis antigens and genomic instability: More than immunology,. *DNA repair*, 108, 103214. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103214>
- Jiang, D., Jiang, Z., Lu, D., ... Yu, L. (2019). Migrasomes provide regional cues for organ morphogenesis during zebrafish gastrulation. *Nature Cell Biology*, 21(8), 966–977. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0358-6>
- Jiao, H., Jiang, D., Hu, X., Du, W., Ji, L., Yang, Y., Li, X., Sho, T., Wang, X., Li, Y., Wu, Y.-T., Wei, Y.-H., Hu, X., & Yu, L. (2021). Mitocytosis, a migrasome-mediated mitochondrial quality-control process. *Cell*, 184(11), 2896-2910.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.027>
- Kakarla, R., Hur, J., Kim, Y. J., Kim, J., & Chwae, Y.-J. (2020). Apoptotic cell-derived exosomes: Messages from dying cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0362-8>
- Kakarla, R., Hur, J., Kim, Y. J., Kim, J., & Chwae, Y.-J. (2020). Apoptotic cell-derived exosomes: Messages from dying cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0362-8>
- Koel, M. (2013). Trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 mikrovesiikulite proteoomiline analüüs ja nende sissevõtmise endomeetriumi rakuliini RL95-2.
- Kuldkepp, A. (2017). MAGE-A perekonna valgud lülitatakse ekstratsellulaarsete vesiikulite koostisesse.
- Kuldkepp, A., Karakai, M., Toomsoo, E., Reinsalu, O., & Kurg, R. (2019). Cancer-testis antigens MAGEA proteins are incorporated into extracellular vesicles released by cells. *Oncotarget*, 10(38), 3694–3708. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26979>
- Kumar, S. R., Kimchi, E. T., Manjunath, Y., Gajagowni, S., Stuckel, A. J., & Kaifi, J. T. (2020). RNA cargos in extracellular vesicles derived from blood serum in pancreas associated conditions. *Scientific Reports*, 10(1), 2800. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59523-0>
- Laduron, S., Deplus, R., Zhou, S., Kholmanskikh, O., Godelaine, D., De Smet, C., Hayward, S. D., Fuks, F., Boon, T., & De Plaen, E. (2004). MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Research*, 32(14), 4340–4350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh735>
- Lahn, B. T. (2000). A human sex-chromosomal gene family expressed in male germ cells and encoding variably charged proteins. *Human Molecular Genetics*, 9(2), 311–319. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.2.311>
- Lee, A. K., & Potts, P. R. (2017). A comprehensive guide to the MAGE family of ubiquitin ligases. *Journal of Molecular Biology*, 429(8), 1114. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.005>
- Li, S., Shi, X., Li, J., & Zhou, X. (2021). Pathogenicity of the MAGE family (Review). *Oncology Letters*, 22(6), 1–7. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13105>
- Lian, Y., Meng, L., Ding, P., & Sang, M. (2018). Epigenetic regulation of MAGE family in human cancer progression-DNA methylation, histone modification, and non-coding RNAs. *Clinical Epigenetics*, 10(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0550-8>

- Liang, H., Ma, X., Zhang, Y., ... Yu, L. (2023). The formation of migrasomes is initiated by the assembly of sphingomyelin synthase 2 foci at the leading edge of migrating cells. *Nature Cell Biology*, 25(8), 1173–1184.
- Liese, S., Wenzel, E. M., Kjos, I., Rojas Molina, R., Schultz, S. W., Brech, A., Stenmark, H., Raiborg, C., & Carlson, A. (2020). Protein crowding mediates membrane remodeling in upstream ESCRT-induced formation of intraluminal vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(46), 28614–28624. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014228117>
- Liu, M., Li, J., Wang, Y., Ghaffar, M., Yang, Y., Wang, M., & Li, C. (2022). MAGEA6 positively regulates MSMO1 and promotes the migration and invasion of oesophageal cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(3), 204. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11127>
- Liu, W., Cheng, S., Asa, S. L., & Ezzat, S. (2008). The Melanoma-Associated Antigen A3 Mediates Fibronectin-Controlled Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Research*, 68(19), 8104–8112. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2132>
- Ma, L., Li, Y., Peng, J., Wu, D., Zhao, X., Cui, Y., Chen, L., Yan, X., Du, Y., & Yu, L. (2015). Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell Research*, 25(1), 24–38. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.135>
- Ma, Y., Li, T., Zhao, L., Zhou, D., Dong, L., Xu, Z., Wang, Y., Yao, X., & Zhao, K. (2023). Isolation and characterization of extracellular vesicle-like nanoparticles derived from migrasomes. *The FEBS Journal*, 290(13), 3359–3368. <https://doi.org/10.1111/febs.16756>
- Marcar, L., MacLaine, N. J., Hupp, T. R., & Meek, D. W. (2010). Mage-A Cancer/Testis Antigens Inhibit p53 Function by Blocking Its Interaction with Chromatin. *Cancer Research*, 70(24), 10362–10370. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1341>
- Meijer, D. M., Oost, S. van, Roelands, J. P., ... Bovee, J. V. M. G. (2024). Enhanced immune responses are accompanied by increased MAGEA expression in osteosarcoma metastases. *BMJ Oncology*, 3(1). <https://doi.org/10.1136/bmjonc-2024-000472>
- Menck, K., Sivaloganathan, S., Bleckmann, A., & Binder, C. (2020). Microvesicles in Cancer: Small Size, Large Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/ijms21155373>
- Nakamura, K., Saito, K., Higashi, C., ... Miyahara, Y. (2025). Evaluation of MAGE-A4 expression in breast cancer and its impact on prognosis. *Cancer Science*, 116(3), 744–752. <https://doi.org/10.1111/cas.16433>
- Nin, D. S., & Deng, L.-W. (2023). Biology of Cancer-Testis Antigens and Their Therapeutic Implications in Cancer. *Cells*, 12(6), 926. <https://doi.org/10.3390/cells12060926>
- Oh, C., Kim, H.-R., Oh, S., ... Yoo, K. H. (2021). Epigenetic Upregulation of MAGE-A Isoforms Promotes Breast Cancer Cell Aggressiveness. *Cancers*, 13(13), 3176. <https://doi.org/10.3390/cancers13133176>
- Pineda, C. T., Ramanathan, S., Fon Tacer, K., Weon, J. L., Potts, M. B., Ou, Y.-H., White, M. A., & Potts, P. R. (2015). Degradation of AMPK by a Cancer-Specific Ubiquitin Ligase. *Cell*, 160(4), 715–728. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.034>
- Poojary, M., Jishnu, P. V., & Kabekkodu, S. P. (2020). Prognostic Value of Melanoma-Associated Antigen-A (MAGE-A) Gene Expression in Various Human Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis of 7428 Patients and 44 Studies. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 24(5), 537–555. <https://doi.org/10.1007/s40291-020-00476-5>
- Ramirez, S. H., Andrews, A. M., Paul, D., & Pachter, J. S. (2018). Extracellular vesicles: Mediators and biomarkers of pathology along CNS barriers. *Fluids and Barriers of the CNS*, 15(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12987-018-0104-7>
- Reinsalu, O. (2022). Cancer-testis antigen MAGE-A4 is incorporated into extracellular vesicles and is exposed to the surface. <http://hdl.handle.net/10062/82891>

- Reinsalu, O., Samel, A., Niemeister, E., & Kurg, R. (2021). MAGE-A4 Coated Extracellular Vesicles Are Stable and Can Be Assembled In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ijms22105208>
- Saito, T., Wada, H., Yamasaki, ... Doki, Y. (2014). High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine*, 32(45), 5901–5907. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.09.002>
- Sang, M., Lian, Y., Zhou, X., & Shan, B. (2011). MAGE-A family: Attractive targets for cancer immunotherapy. *Vaccine*, 29(47), 8496–8500. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.014>
- Sedgwick, A. E., & D'Souza-Schorey, C. (2018). The biology of extracellular microvesicles. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 19(5), 319–327. <https://doi.org/10.1111/tra.12558>
- Shahi, S., Kang, T., & Fonseka, P. (2024). Extracellular Vesicles in Pathophysiology: A Prudent Target That Requires Careful Consideration. *Cells*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/cells13090754>
- Shahi, S., Kang, T., & Fonseka, P. (2024). Extracellular Vesicles in Pathophysiology: A Prudent Target That Requires Careful Consideration. *Cells*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/cells13090754>
- Shahraki, K., Boroumand, P. G., Lotfi, H., Radnia, F., Shahriari, H., Sargazi, S., Mortazavi, S. S., Shirvaliloo, M., Shirvalilou, S., & Sheervalilou, R. (2023). An update in the applications of exosomes in cancer theranostics: From research to clinical trials. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(10), 8087–8116. <https://doi.org/10.1007/s00432-023-04701-6>
- Sheta, M., Taha, E. A., Lu, Y., & Eguchi, T. (2023). Extracellular Vesicles: New Classification and Tumor Immunosuppression. *Biology*, 12(1), 110. <https://doi.org/10.3390/biology12010110>
- Shin, S., Park, Y. H., Jung, S.-H., Jang, S.-H., Kim, M. Y., Lee, J. Y., & Chung, Y.-J. (2021). Urinary exosome microRNA signatures as a noninvasive prognostic biomarker for prostate cancer. *Npj Genomic Medicine*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41525-021-00212-w>
- Shinde, U., Balasinor, N. H., Ravichandran, V., Kumar, A. S., & Gunasekaran, V. P. (2025). “Extracellular Vesicle DNA: Advances and Applications as a Non-Invasive Biomarker in Disease Diagnosis and Treatment”. *Clinica Chimica Acta*, 568, 120125. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2025.120125>
- Simpson, A. J. G., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y.-T., & Old, L. J. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5(8), 615–625. <https://doi.org/10.1038/nrc1669>
- Ståhl, A., Johansson, K., Mossberg, M., Kahn, R., & Karpman, D. (2019). Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 34(1), 11–30. <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3816-z>
- Taguchi, A., Taylor, A. D., Rodriguez, J., ... Hanash, S. M. (2014). A search for novel cancer/testis antigens in lung cancer identifies VCX/Y genes, expanding the repertoire of potential immunotherapeutic targets. *Cancer Research*, 74(17), 4694–4705. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3725>
- Tan, X., He, S., Wang, F., Li, L., & Wang, W. (2023). Migrasome, a novel organelle, differs from exosomes. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 35, 101500. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101500>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science*, 319(5867), 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>

- Van den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S., & Boon, T. (1995). A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Journal of Experimental Medicine*, 182(3), 689–698. <https://doi.org/10.1084/jem.182.3.689>
- Wang, H., Sang, M., Geng, C., Liu, F., Gu, L., & Shan, B. (2016). MAGE-A is frequently expressed in triple negative breast cancer and associated with epithelial-mesenchymal transition. *Neoplasma*, 63(01), 44–56. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2016\\_006](https://doi.org/10.4149/neo_2016_006)
- Wang, J., Barr, M., & Wehman, A. (2024). Extracellular vesicles. *Genetics*, 227. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyae088>
- Wang, Y., Gao, S., Liu, Y., Wang, D., Liu, B., Jiang, D., Wong, C. C. L., Chen, Y., & Yu, L. (2022). Retractosomes: Small extracellular vesicles generated from broken-off retraction fibers. *Cell Research*, 32(10), 953–956. <https://doi.org/10.1038/s41422-022-00666-2>
- Weon, J. L., & Potts, P. R. (2015). The MAGE protein family and cancer. *Current opinion in cell biology*, 37, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.002>
- Wu, D., Xu, Y., Ding, T., Zu, Y., Yang, C., & Yu, L. (2017). Pairing of integrins with ECM proteins determines migrasome formation. *Cell Research*, 27(11), 1397–1400. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.108>
- Xiao, X., Xu, M., Yu, H., Wang, L., Li, X., Rak, J., Wang, S., & Zhao, R. C. (2021). Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles mitigate oxidative stress-induced senescence in endothelial cells via regulation of miR-146a/Src. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00765-3>
- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z.-C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1), BSR20180992. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
- Yang, B., O'Herrin, S. M., Wu, J., ... Longley, B. J. (2007). MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C Proteins Form Complexes with KAP1 and Suppress p53-Dependent Apoptosis in MAGE-Positive Cell Lines. *Cancer Research*, 67(20), 9954–9962. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1478>
- Yang, S. W., Huang, X., Lin, W., ... Potts, P. R. (2020). Structural basis for substrate recognition and chemical inhibition of oncogenic MAGE ubiquitin ligases. *Nature Communications*, 11(1), 4931. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18708-x>
- Yu, L., Zhu, G., Zhang, Z., Yu, Y., Zeng, L., Xu, Z., Weng, J., Xia, J., Li, J., & Pathak, J. L. (2023). Apoptotic bodies: Bioactive treasure left behind by the dying cells with robust diagnostic and therapeutic application potentials. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 218. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01969-1>
- Zhai, X., Xu, L., Zhang, S., Zhu, H., Mao, G., & Huang, J. (2015). High expression levels of MAGE-A9 are correlated with unfavorable survival in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 7(4), 4871–4881. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6741>
- Zhang, K., Zhu, Z., Jia, R., Wang, N. A., Shi, M., Wang, Y., Xiang, S., Zhang, Q., & Xu, L. (2024). CD151-enriched migrasomes mediate hepatocellular carcinoma invasion by conditioning cancer cells and promoting angiogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 43(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s13046-024-03082-z>
- Zhang, X., Yao, L., Meng, Y., Li, B., Yang, Y., & Gao, F. (2023). Migrasome: A new functional extracellular vesicle. *Cell Death Discovery*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01673-x>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience*, 9. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zhu, M., Zou, Q., Huang, R., Li, Y., Xing, X., Fang, J., Ma, L., Li, L., Yang, X., & Yu, L. (2021). Lateral transfer of mRNA and protein by migrasomes modifies the recipient cells. *Cell Research*, 31(2), 237–240. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00415-3>

- Zhu, W., Yi, Q., Chen, Z., Wang, J., Zhong, K., Ouyang, X., Yang, K., Jiang, B., Zhong, J., & Zhong, J. (2025). Exploring the role and mechanisms of MAGE-A4 in tumorigenesis, regulation, and immunotherapy. *Molecular Medicine*, 31(1), 43.  
<https://doi.org/10.1186/s10020-025-01079-8>
- Zou, X., Lei, Q., Luo, X., Yin, J., chen, S., Hao, C., Shiyu, L., & Ma, D. (2023). Advances in biological functions and applications of apoptotic vesicles. *Cell Communication and Signaling*, 21(1), 260. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01251-9>
- Õunap, K., Kurg, K., Võsa, L., Maiväli, Ü., Teras, M., Planken, A., Ustav, M., & Kurg, R. (2018). Antibody response against cancer-testis antigens MAGE-A4 and MAGEA10 in patients with melanoma. *Oncology Letters*, 16(1), 211–218.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8684>

## **Kasutatud veebileheküljed**

National Center for Biotechnology Information (NCBI)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4103> Viimati vaadatud 20.03.2025 kell 12:30

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Rando Kalbus,

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose  
**“MAGE-A4 lokalisatsiooni uurimine retraktsiooni fiibrises ja migrasoomides“**,

mille juhendaja on Reet Kurg,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Rando Kalbus  
**23.05.2025**