

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

**MAGE-A perekonna valgud lülitatakse ekstratsellulaarsete
vesiikulite koostisesse**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Anneli Kuldkepp

Juhendaja *PhD* Reet Kurg

TARTU 2017

MAGE-A perekonna valgud lülitatakse ekstratsellulaarsete vesiikulite koostisesse

Viimasel ajal on populaarseks uurimisteenaks saanud vähi-testise antigeenid. Uuritakse võimalusi nende rakendamiseks vähivastases immunoteraapias ja diagnostikas ning selgitatakse, millist rolli mängivad need kasvaja tekkimisel ja arengus. Hiljuti avastati, et vähi-testise antigeenid lülitatakse retroviiruse valgu Gag poolt indutseeritud viirus-laadsete partiklite koostises. Selles töös näidatakse, et samamoodi lülitatakse need loomulikult teel tekkivate ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse, kusjuures valgud eksponeeruvad vesiikulite pinnale. See asjaolu võib tulevikus anda aimu, kuidas saavad vähi-testise antigeenid mõjutada kasvajast kaugemal olevaid keharakke.

Märksõnad: MAGE-A, MAGE-A4, MAGE-A10, ekstratsellulaarsed vesiikulid, Cop5

CERCS: T490 Biotehnoloogia, P310 Proteiinid, ensüümid

MAGE-A family proteins are incorporated into extracellular vesicles

Cancer/testis antigens have recently become a popular subject for researchers. Possibilities for their usage in cancer immunotherapy and early diagnosis as well as their putative functions in tumorigenesis are being suggested continuously. It has been discovered that cancer/testis antigens are able to exit tumor cells and move around in the organism. In this study, we show that they are incorporated into naturally occurring extracellular vesicles, whereas being exposed on the surface of the particles. In the future, this discovery may shed light onto the mechanisms how cancer/testis antigens are able to influence cells that are further away from the tumor.

Keywords: MAGE-A, MAGE-A4, MAGE-A10, extracellular vesicles, Cop5

CERCS: T490 Biotechnology, P310 Proteins, enzymes

Sisukord

Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Vähi-testise antigeenid	7
1.2 MAGE-A perekond	7
1.2.1 Ekspressioon tavakudedes ja vähkkasvajates	8
1.2.2 MAGE-A valkude struktuur	9
1.2.3 Roll rakkudes ja organismis	10
1.2.4 MAGE-A perekonna esindajad	12
1.3 MAGE-A geeniproduktide terapeutiline potentsiaal.....	13
1.3.1 Biomarkerid.....	13
1.3.2 Vaktsiinid	13
1.4 Ekstratsellulaarsed vesiikulid (EV)	14
1.4.1 Apoptoetilised kehad (2K)	15
1.4.2 Mikrovesiikulid (16K).....	15
1.4.3 Eksosoomid (120K).....	15
1.5 Ekstratsellulaarsed vesiikulid informatsiooni kandjatena	16
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1 Töö eesmärgid	18
2.2 Materjal ja meetodika.....	19
2.2.1 Kasutatud plasmiidid	19
2.2.2 Rakuliinid	19
2.2.3 Antikehad	19
2.2.4 Eukarüootsete rakkude transfekterimine	20
2.2.5 Rakkude kogumine ja lüüsimine	20
2.2.6 EV-de eraldamine söötimest.....	21

2.2.7 Geelektroforees ja Western Blot analüüs	22
2.2.8 Voolutsütomeetria analüüs EV-dega	22
2.2.9 Ensüümseoseline immunosorbtsioonanalüüs (ELISA)	23
2.2.10 EV-de inkubeerimine eri omadustega lahustes	23
2.3 Tulemused	25
2.3.1 MAGE-A valkude ekspresseerumine Cop5 rakkudes ja EV-des	25
2.3.2 MAGE-A4 valgu deletandid.....	27
2.3.3 MAGE-A4 ekspressiooni sõltuvus kontsentratsioonist.....	30
2.3.4 MAGE-A4 valgu interaktsioonid EV-dega	32
2.4 Arutelu	33
2.4.1 MAGE-A perekonna valkude lülitumine EV-de koostisesse.....	33
2.4.2 MAGE-A valkude interaktsioonid EV-dega	34
Kokkuvõte	36
Summary.....	37
Kasutatud kirjandus	38
Kasutatud veebileheküljed.....	44
Lihtlitsents	45

Kasutatud lühendid

CMV - tsütomegaloviirus

DTT – ditiotreitool

EV – ekstratsellulaarsed vesiikulid

FCS – veise loote seerum

HDAC – histoondeatsetülaas

HLA – inimese leukotsüüdi antigeen

IMDM – *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

LNX1 - *Ligand of Numb-protein X 1*, Numb-valk X1 ligand

MAGE – melanoomi-seoseline antigeen

MAGE/RING kompleks – melanoomi-seoselise antigeeni ja RING (*really interesting new gene*, inglise keeles „väga huvitav uus geen“) sõrme domeeni kompleks

MAGE-A – melanoomi-seoseline antigeen A

MFI – *mean fluorescence intensity*, fluorestsentsi intensiivsuse keskväärtus

MHD – MAGE homoloogidomeen

MLV-Gag – hiire leukeemiaviiruse kapsiidivalk

MVB – multivesikulaarne keha

NSE1 – *Non-structural maintenance of chromosomes element 1 homolog, Non-SMC element 1 homolog*, mittestruktuurne kromosoomide hoolduselemendi homoloog 1

PVDF – polüvinülideenfluoriid

SKIP – SKI-seonduv valk

TRIM – *tripartite motif*, kolmepoolne motiiv (kolmest motiivist koosnev ubikvitiinligaas: RING, *B-box* ja *coiled-coil*)

VLP – viirus-laadne partikkel

Sissejuhatus

Vähi-testise antigeenid on viimasel ajal muutunud populaarseteks uurimisobjektideks nende immunoloogilise potentsiaali tõttu. Neid proovitakse rakendada vähivastases immunoteraapias, kuna need on võimelised kutsuma esile tugevat immuunvastust. Samas uuritakse järjepidevalt võimalusi kasutamaks vähi-testise antigeene biomarkeritena vähkkasvaja avastamiseks ja haiguse kulu jälgimiseks ning üritatakse aru saada nende rollist tumorigeneesis. Käesolevas töös uuritakse vähi-testise antigeenide perekonna MAGE-A esindajaid MAGE-A4 ja MAGE-A10, mis on esindatud paljudes erinevates vähiliikides.

Eelnevalt on avastatud, et vähi-testise antigeenid väljuvad vähirakust ning on võimelised liikuma organismis ringi ja kutsuma esile immuunvastust. Selle toimemehhanism on suuresti veel arusaamatu, kuid hiljuti näidati, et MAGE-A perekonna antigeenid väljuvad rakust indutseeritud viirus-laadsete partiklite (VLP) koostises, olles eksponeerunud nende pinnale.

Selle uurimistöö eesmärgiks on teha kindlaks, kas MAGE-A perekonna antigeenid väljuvad rakkudest ka loomulikul teel tekkivate ekstratsellulaarsete vesiikulite (EV) koostises ning kas ka sel juhul on valgud eksponeeritud partiklite pinnale. Teiseks eesmärgiks on kirjeldada MAGE-A valkude ja EV-de vahelisi interaktsioone.

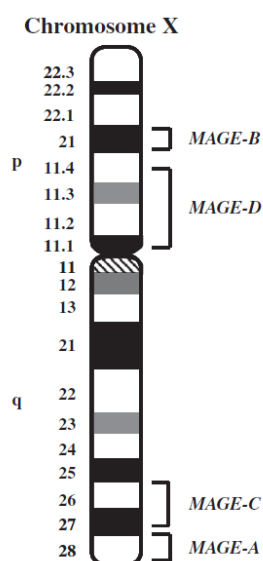
Töö on teostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Vähi-testise antigeenid

Vähi-testise antigeenid on suurim grupp vähiga seonduvaid antigeene, mis kutsuvad organismis esile T rakkude vahendatud immuunvastuse. Esmalt avastati nende olemasolu melanoomi rakkudes, kuid tänaseks on neid leitud mitmetest inimese vähkkasvajatest (van der Bruggen jt, 1991). Vähi-testise antigeenid ei ekspresseeru enamikes inimese tavakudedes, aga nende avaldumist on täheldatud testistes ja mõningatel juhtudel platsentas (De Plaen jt, 1994; Caballero ja Chen, 2009). Siiani on tuvastatud üle 140 vähi-testise antigeeni, mis jaotuvad 70 perekonna vahel (Almeida jt, 2009). Vähi-testise antigeenid võib jagada nende asukoha järgi kaheks: X kromosoomil asuvad ja X kromosoomi välised vähi-testise antigeenid (Simpson jt, 2005). Arvatakse, et X kromosoomil olevatest geenides 10% kuuluvad vähi-testise antigeenide perekondade alla.

1.2 MAGE-A perekond



Joonis 1. Inimese MAGE geenide asukohad X kromosoomil (Sang jt, 2011).

MAGE-A (melanoomi-seoseline antigeen A) geeniperekonda kuulub 12 vähi-testise antigeeni (*MAGE-A1* kuni *-A12*), mis asuvad X kromosoomi regioonis Xq28 (vt Joonis 1) (De Plaen jt, 1994). Nende hulka kuulub esimene kindlaks määratud vähi-testise antigeen *MAGE-A1* (eelnevalt *MAGE-1*, *MZ2-E*) (van der Bruggen jt, 1991). Kaheteistkümnest geenist 11 kodeerivad valke, *MAGE-A7* on pseudogeen (Chomez jt, 2001).

1.2.1 Ekspressioon tavakudedes ja vähkkasvajates

Üldiselt on *MAGE* (melanoomi-seoseline antigeen) geenid inimorganismis vaigistatud, kuid ekspresseeruvad teadaolevalt testistes, platsentas, loote munasarjades ja trofoblastides (Meek ja Marcar, 2012). Lisaks täiskasvanud organismi kudedele on täheldatud *MAGE-A* avaldumist areneva loote eri staadiumites (Nelson jt, 2007; Gjerstorff jt, 2008). Täiskasvanu organismis ekspresseeruvad *MAGE-A* antigeenid rakkudes või kudedes, millel on teatav immunoloogiline privileeg, kuna nende pinnale ei ekspresseerita HLA (inimese leukotsüüdi antigeen) molekule, mistõttu ei saa need rakud esitleda *MAGE-A* antigeenide immunogeenseid peptiide ega kutsuda esile immuunvastust (Simpson jt, 2005; Fijak ja Meinhardt, 2006; Hutter ja Dohr, 1998).

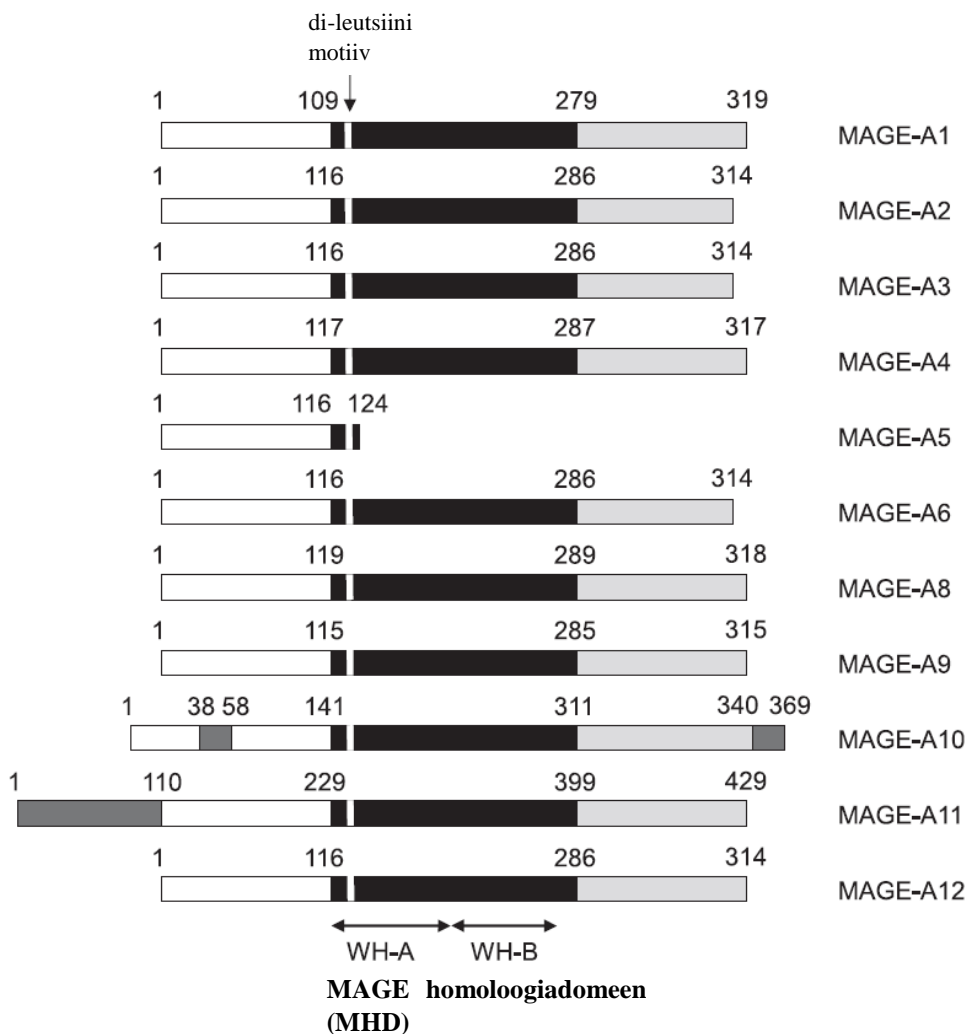
Kindlaks on tehtud, et avaldumine testistes piirdub spermatogoonide ja primaarsete spermatotsüütidega, kusjuures viimastes on ekspressioonitase nõrgem. See annab alust oletada, et teise mitootilise jagunemise alguses blokeeritakse geenide avaldumine (Aubry jt, 2001). Platsentas on täheldatud *MAGE-A* mRNA-de avaldumist, kuid mitte funktsionaalseid valke, mis võib tuleneda väga madalatest valgu kontsentratsioonidest või olla seotud sellega, millises raseduse staadiumis platsentat on uuritud (Jungbluth jt, 2000). Täiskasvanud naise munasarjades pole *MAGE-A* valkude olemasolu siiani kinnitust leidnud, kuigi on leitud mõningaid vähi-testise antigeenide mRNA-sid. Samas leidsid Nelson jt, et vähi-testise antigeenid *MAGE-A1*, *-A3*, *-A4* avalduvad valkudena loote munasarjades 13. rasedusnädalast maksimaalselt 40. rasedusnädalani. Kõige tugevamalt ekspresseerusid valgud 16.-st 23. rasedusnädalani ning avaldumine piirdus oogoonide ja primaarsete ootsüütidega. Siinkohal on teatav sarnasus ekspressiooniga testistes (Nelson jt, 2007). Peale loote munasarjade avalduvad *MAGE-A* geenid ka embrüonaalsete närvirakkude varajases arengus ning on arvatavasti seotud algse närvisüsteemi kujunemisega (Gjerstorff jt, 2008).

Vähkkasvajates on *MAGE-A* geenide ekspressiooni keeruline üheselt määratleda nende kõrge konserveeritusse tõttu. Siiani välja töötatud antikehad tunnevad ära mitut erinevat *MAGE-A* valku ning sellepärast on keeruline väita, millised valgud esinevad kindlas kasvajas (Sang jt, 2011). Üldiselt on teada, et *MAGE-A* valke leidub metastaatilises melanoomis, pea- ja kaelapiirkonna kartsinoomides, kopsu-, kusepõie-, rinna- ning munasarjavähis, kuid mitte käärsoole, neerude ega eesnäärme kartsinoomides (Jungbluth jt, 2000). On tähele pandud, et paljude vähiliikide puhul toimub *MAGE-A* geeniekspressioon valdavalt halvaloomulistes vähkkasvajates, mis on muutunud invasiivseteks või metastaatilisteks (Simpson jt, 2005). *MAGE-A* geeniekspressioon on seotud genoomi metülatsiooni ulatusega. Organismi tavakudede rakkudes, milles ei avaldu *MAGE-A* geenid, on DNA suuremas ulatuses

metüleeritud kui *MAGE-A*-sid ekspresseerivates rakkudes (De Smet jt, 1996). Vähirakkudes toimuvate genoomsete muutuste tagajärjel demetüleeritakse osa DNA-st, sealhulgas *MAGE-A* geenide promooterites asuvad CpG dinukleotiidid. Tavalistes rakkudes inhibeerib nende dinukeotiidide metülatsioon *MAGE-A* geenide ekspressiooni, takistades transkriptsioonifaktorite seondumist DNA-le (De Smet jt, 1996). *MAGE-A* geenide avaldumist saab esile kutsuda või võimendada, töödeldes rakuliine demetüleerivate ainetega, näiteks 5-asa-2'-deoksütsütidiiniga (Weber jt, 1994).

1.2.2 *MAGE-A* valkude struktuur

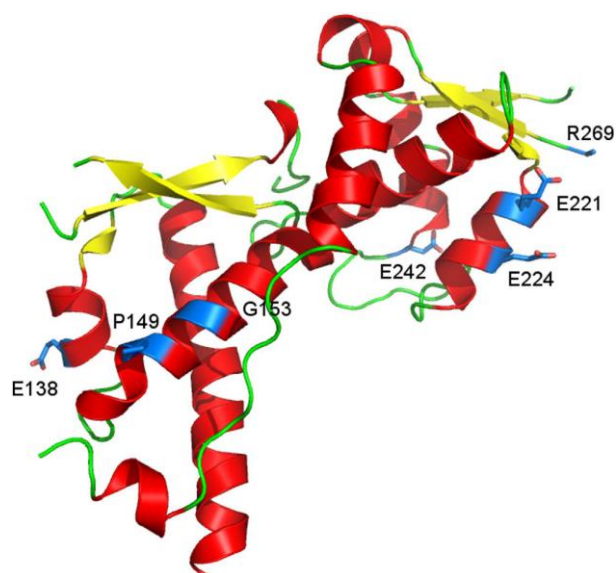
Kõikidel *MAGE* valkudel on olemas kõrgelt konserveerunud umbes 170 aminohappe jäägi pikkune domeen MHD (*MAGE* homoloogiadomeen). *MAGE-A* perekonna valkude puhul hõlmab domeen ligikaudu 70% kogu valgust. MHD-st väljapoole jäävad regioonid, eelkõige N-terminuse poolsed, erinevad perekonniti ning võivad määrata spetsiifilisi funktsioone.



Joonis 2. Inimese *MAGE-A* valkude struktuur, joondatud MHD domeenide paiknemise alusel (Meek ja Marcar, 2012).

MAGE-A perekonna valgud on üksteisega sarnased nii MHD kui ka sellega külgnevate alade poolest. Suurimad märgatavad erinevused paistavad välja valkude MAGE-A5, -A10 ja -A11 puhul. MAGE-A5 on perekonna väikseim valk ning termineerub 124. aminohappejärgi juures, mis paikneb MHD domeeni alguses. MAGE-A10 ja -A11 on suuremad valgud ning sisaldavad inserte. MAGE-A10 inserdid paiknevad 27. aminohappe järel (21 aminohappe jääki) ja C-terminuses (27 aminohappe jääki) ning MAGE-A11 insert asetseb N terminuses (110 aminohappe jääki) (vt Joonis 2) (Meek, Marcar, 2012).

MAGE-A4 valgu kristallstruktuuri (vt Joonis 3) määramisel selgus, et MHD on neerukujuline ja koosneb peamiselt kahest tiivalaadsest heeliksist: tiivalaadne heeliks A (WH-A joonisel 2) ja tiivalaadne heeliks B (WH-B joonisel 2). Domeeni tiivalaadses heeliksis A sisaldub ülimalt konserveerunud kahest leutsiinijärgist koosnev motiiv, mis osaleb MAGE/RING kompleksi seondumises (vt Joonis 2). (Doyle jt, 2010)



Joonis 3. MAGE-A4 valgu MHD kristallstruktuur. Sekndaarstruktuuri heeliksist on joonisel kujutatud punaselt, β -leht struktuurid kollaselt. (Hagiwara jt, 2016)

1.2.3 Roll rakkudes ja organismis

Kuigi MAGE-A valkude struktuuri ja avaldumist on laialdaselt uuritud, ei teata enamasti nende bioloogilisi funktsioone organismis ega vähkkasvajates. Teadustöodes on välja tulnud erinevaid, vahel teineteisele vastu käivaid fakte ning nende täpsustamise kallal tehakse aktiivselt tööd.

Mitme MAGE valgu puhul on täheldatud võimet siduda RING domeeni sisaldavaid E3 ubikvitiinligaase ning arvatakse, et see omadus on konserveerunud kogu MAGE

valguperekonna ulatuses. MAGE-A perekonna valgud (näiteks MAGE-A2, -A3 ja -A6) seonduvad TRIM perekonna E3 ubikvitiinligaasi TRIM28-ga. Teiste MAGE valkude puhul on nähtud seandumist ka TRIM27 ja muude E3 ubikvitiinligaasidega, näiteks NSE1 ja LNX1. Doyle jt näitasid, et MAGE valgud seonduvad E3 ubikvitiinligaasidega MHD domeeni kaudu, kuid täpne seandumisjärjestus varieerub olenevalt valgust. Antud uuringus selgus veel, et lisaks RING domeeni sisaldavate E3 ubikvitiinligaaside seondamisele suurendavad MAGE perekonna valgud ka nende aktiivsust. Võttes arvesse, et TRIM28 ubikvitiinüleerib valku p53, saab väita, et MAGE perekonna valgud osalevad aktiivselt p53 degradatsioonil ning reguleerivad selle taset rakus. (Doyle jt, 2010)

MAGE-A4 puhul on avastatud, et see interakteerub maksas leiduva onkoproteiini ganküriiniga ning vähendab selle tumorigeenset (vähkkasvajate tekitavat) aktiivsust. Nagao jt leidsid, et MAGE-A4 seondub ganküriiniga C-terminaalse regiooni kaudu, milles sisalduvad HLA-A2 poolt esitletavat dekapeptiidid. Seandumisega kaasneva nähtusena täheldati, et inhibeeritud on rakkude kinnitumisest sõltumatu kasvamine (*anchorage-independent growth*). Kuna eelmainitud tunnust on seostatud rakkude võimega muutuda pahaloomulisteks kasvajateks, siis järeldati, et MAGE-A4 seandumine ganküriiniga vähendab viimase onkogeensust. (Nagao jt, 2003)

Mitmes teadustöös on leitud informatsiooni selle kohta, et MAGE-A valgud käituvad transkriptsiooniliste repressoritena (Laduron jt, 2004; Monte jt, 2006; Bhan jt, 2012). Näidati, et MAGE perekonna valgud on võimelised kutsuma kohale histoondeatsetülaase (HDAC), mis mängivad olulist rolli geenide ekspressiooni mahasurumisel. Näiteks vähendab MAGE-A2 p53-sõltuva transaktivatsiooni mõju, kutsudes kohale HDAC3-e, mis deatsetüleerib p53 sidumissaidi ümbruses olevad histoonid ning p53 valgu enda. (Monte jt, 2006) MAGE-A1 ja MAGE-A4 puhul on täheldatud seandumist transkriptsiooniregulaatoriga SKIP, mistõttu on nad võimelised takistama Notch1-IC vahendatud transkriptsiooni aktivatsiooni. Toimemehhanism pole kindlaks tehtud, kui Laduron jt pakkusid välja, et tegemist võib olla nii SKIP konformatsiooniliste muutustega pärast MAGE-A1/A4-ga seandumist, MAGE-A1 võimega takistada transkriptsioonikompleksi moodustumist või seotud asjaoluga, et MAGE-A1 on võimeline kohale kutsuma HDAC1 valgu, mis võib modifitseerida nii kromatiini kui sellega seonduvaid valke. (Laduron jt, 2004) Lisaks võimele seonduda transkriptsiooniregulaatoriga SKIP on MAGE-A4 võimeline oraalsetes keratinotsüütides inhibeerima p53-sõltuvat apoptoosi ning stimuleerima rakkude kasvu. MAGE-A4 mõjutab kahte p53 sihtmärkgeeni, mis osalevad apoptoosi regulatsioonis. (Bhan jt, 2012)

MAGE-A geenide üleekspressiooni vähirakkudes on seostatud resistentsusega kemoterapeutiliste ainete paklitakseel ja doksorubitsiin vastu. Duan jt läbi viidud uuringus tõestati, et *MAGE-A2* ja *MAGE-A6* liigne avaldumine võib endaga kaasa tuua mõõduka resistentsuse kemoteraapiale. Uuringu käigus leiti, et paklitakseelile ja doksorubitsiinile resistentsetes vähirakuliinides on *MAGE-A* geenide ekspressioon väga kõrge. Kinnitamaks, et see on seotud resistentsuse tekkega, transfekteeriti kemoteraapiale alluvaid rakuliine *MAGE-A2* või *MAGE-A6* DNA-ga. Pärast transfekteerimist täheldati resistentsuse teket eelnevalt mitteresistentsetes rakkudes. Seega võib väita, et *MAGE-A* geenide üleekspressioon on seotud resistentsusega kemoteraapiale. (Duan jt, 2003)

1.2.4 MAGE-A perekonna esindajad

MAGE-A4

MAGE-A4 on 317 ah pikkune valk foreetilise molekulmassiga umbes 50 kDa (arvutuslik molekulmass on 35kDa) (Barker ja Salehi, 2002). *MAGE-A4* geenil on 3 eksonit nagu enamikul *MAGE* geenidel. *MAGE-A4* valk lokaliseerub raku tsütoplasmas ja tuumas (*CTdatabase*). Selle valgu puhul on täheldatud mitmeid omadusi, mis võivad mõjutada rakkude elutegevust. Näiteks seondub *MAGE-A4* valk ganküriiniga, mis on maksa onkoproteiin, ning vähendab arvatavasti selle onkogeensust (Nagao jt, 2003).

MAGE-A10

MAGE-A10 on 369 ah pikkune valk foreetilise molekulmassiga 72kDa (arvutuslik molekulmass on 41 kDa) (Barker ja Salehi, 2002), mida on võimalik detekteerida anti-*MAGE-A1* monoklonaalse antikehaga (*CTdatabase*). Seda kodeeriv mRNA on umbes 2,5kb pikkune ning sellel on teiste *MAGE* perekonna mRNA-dega võrreldes pikem 3' mittetransleeritav ala. *MAGE-A10* geenil on erinevalt enamikest *MAGE-A* geenidest 4 eksonit, kusjuures teine ekson on homoloogne ülejäänud *MAGE-A* geenide intronjärjestustega (v.a *MAGE-A2*, millel on samuti 4 eksonit). *MAGE-A10* valk lokaliseerub rakutuumas, jättes välja tuumakesed, erinedes selle poolest enamikest *MAGE-A* valkudest, mis lokaliseeruvad tsütoplasmas (Rimoldi jt, 1999).

MAGE-A valkude puhul (eriti *MAGE-A10*) on täheldatud tavalisest aeglasemat liikuvust SDS-PAGE geelelektrofooresil ning selle tõttu paistavad need valgud olevat suurema molekulmassiga kui nad tegelikult on. Sellele anomaaliale pole veel ühest vastust leitud (Rimoldi jt, 1999).

1.3 *MAGE-A* geeniproductide terapeutiline potentsiaal

MAGE-A valgud on teadlasi huvitanud oma kõrge immunogeensuse ning võime tõttu aktiveerida tsütolüütilisi T-rakke. Immunoloogilised uuringud on keskendunud peamiselt *MAGE-A* valkudele kui biomarkeritele või vaktsiinidele. Mõlemal uurimissuunal on tehtud avastusi, mis mõne aja pärast võivad meditsiini vallas väga kasulikuks osutada.

1.3.1 Biomarkerid

MAGE-A valgud või nende mRNA-d võivad olla tulevikus erinevate vähkkasvajate prognostilisteks markeriteks, näiteks munasarjavähi või maksarakkude kartsinoomi puhul (Hussein jt, 2012; Daudi jt, 2014; Sang jt, 2014). Nii munasarjavähi kui maksarakkude kartsinoomi patsientide perifeerses verest on leitud *MAGE-A* geenide produkte (munasarjavähi puhul valke ja maksarakkude kartsinoomi puhul mRNA-sid) (Hussein jt, 2012; Sang jt, 2014). Sang jt pakkusid oma uurimuses välja, et *MAGE-A* valkude ekspressioon perifeerses veres võib olla indikaatoriks vereringes leiduvatest tsirkuleerivatest vähirakkudest (Sang jt, 2014). Samale järeldusele jõuti ka maksarakkude kartsinoomi patsientide puhul, kuid markeriks olid *MAGE-A3* või *MAGE-A4* mRNA-d (Hussein jt, 2012). Mõlemas töös jõuti järelduseni, et vastavate markerite skriining võiks kaasa aidata kasvaja metastaaside varajasele avastamisele ning kiirendaks ravi. Lisaks metastaaside avastamisele võib *MAGE-A* valkudest olla kasu haiguse kulu ennustamisel. Daudi jt leidsid, et *MAGE-A1* ja *MAGE-A10* valkude ekspressioon munasarjavähis võib olla seotud vähkkasvaja kiirema arengu ja haiguse halvema prognoosiga. Järeldati, et *MAGE-A* valkude avaldumist jälgides saab paremini ennustada, milliseks kujuneb haiguse kulg. Lisaks pakuti välja, et *MAGE-A* valgud (eelistatult A1, A4 ja A10) võiksid olla immunoteraapia peamisteks sihtmärkideks, kuna need arvatavasti mõjutavad kasvaja arengut kõige enam. (Daudi jt, 2014)

1.3.2 Vaktsiinid

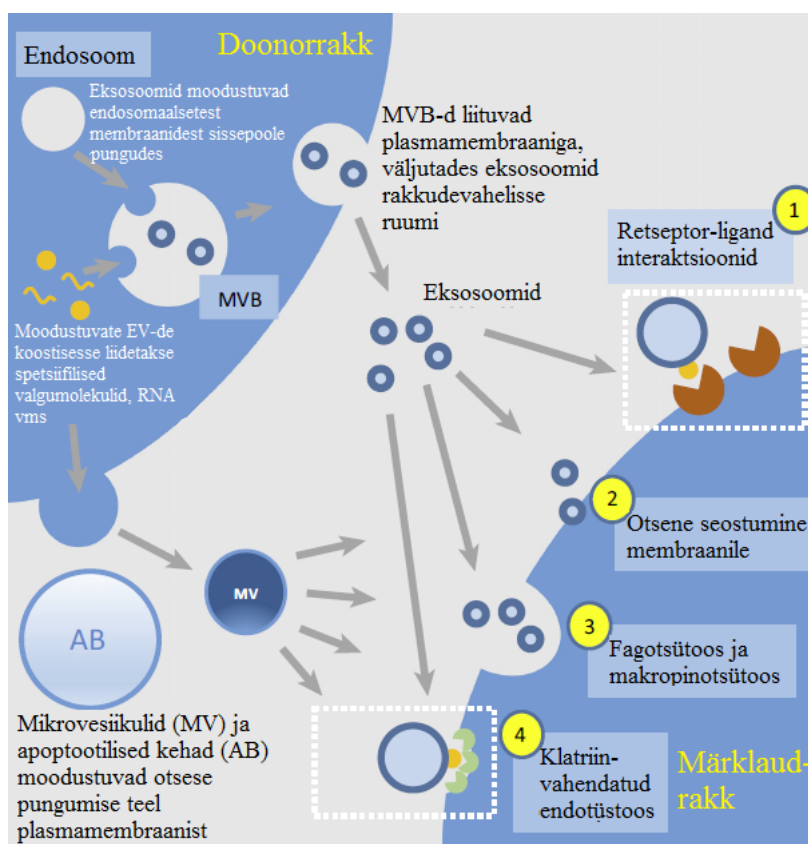
MAGE-A valgud või nendest saadud peptiidid on atraktiivsed kandidaadid vähivastasteks vaktsiinideks. Mitmetes uuringutes on tõestatud, et *MAGE-A* perekonna valgud ja nendest genereeritud peptiidid on head immunogeenid. Vaktsineerimine *MAGE-A3* valguga või selle peptiididega käivitab nii T-helper rakud ja B-rakud kui ka tsütolüütilised T-rakud, mistõttu toodetakse kehas antigeeni vastaseid antikehi ning hävitatakse vastavat valku tootvad vähirakud (Atanakovic jt, 2004). Lisaks *MAGE-A3* valgule on tugevalt immunogeensed veel peptiidid *MAGE-A1* 96 – 104 ja *MAGE-A10* 254 – 262 (Slingluff jt, 2007) ning valk *MAGE-A4*, mille

puhul arvatakse, et seda on võimalik kasutada vaktsineeritud patsientide jälgimiseks, ennustamaks haiguse kulu muutusi pärast vaktsineerimist (Saito jt, 2014).

1.4 Ekstratsellulaarsed vesiikulid (EV)

Ekstratsellulaarsed vesiikulid (EV) on membraaniga ümbritsetud tsirkuleerivad partiklid, mis väljutatakse erinevatest rakutüüpidest ning suudavad uuesti siseneda mõnda teise raku. Need on võimelised endas kandma erineva iseloomuga bioloogilist materjali: DNA-d, RNA-d valke jm, mis liiguvad vesiikulite vahendusel rakkude vahel. See on üks paljudest rakkudevahelist suhtluse vormidest (Heijnen jt, 1999; Zaborowski jt, 2015; Huang-Doran jt, 2017).

EV-sid liigitatakse suuruse ja biogeneesi alusel apoptootilisteks kehadeks, mikrovesiikuliteks ja eksosoomideks ning need võivad siseneda märklaudrakkudesse mitmetel eri viisidel. (Heijnen jt, 1999; Zaborowski jt, 2015). Pärast väljumist doonorrakust võivad EV-d märklaudrakke mõjutada, viies nendesse erinevaid biomolekule. Ainete transport (EV-de sisenemine raku) võib toimuda spetsiifiliste retseptorite ja nende ligandide vahendusel, otsese membraanile seostumise kaudu, fago- või pinotsütoosi teel või klatriin-vahendatud endotsütoosiga (vt Joonis 4).



Joonis 4. Ekstratsellulaarsete vesiikulite alaliigid, nende tekkimine ja interaktsioonid märklaudrakuga. (Huang-Doran jt, 2017)

1.4.1 Apoptoosilised kehad (2K)

Apoptoosilised kehad on fosfolipiidse kaksikkihiga ümbritsetud vesiikulid suurusega ~0,5 – 5 µm, millele on iseloomulik fosfatidüülseriini välispidine lokalisatsioon. Need tekivad apoptoosi raames toimuva raku fragmenteerumise käigus. Apoptoosiliste protsesside algfaasis punguvad vesiikulid plasmamembraanist, hiljem laguneb rakk tervenisti väiksemateks osadeks. Apoptoosilised kehad sisaldavad raku organelle (näiteks mitokondreid ja membraanitükke) ja tuumafragmente, sealhulgas fragmenteerunud DNA-d. Need osised säilivad vesiikulite sees hästi ning neid võivad omastada naaberrakud, fagotsüteerides apoptoosilised kehad. Algselt võib rakkudes tuvastada fagotsüteeritud apoptoosilisi kehakesi, kuid aja möödudes need lagundatakse. Kui apoptoosilist keha ei fagotsüteerita teiste rakkude poolt, siis laguneb see protsessis, mida nimetatakse sekundaarseks nekroosiks. (Saraste jt, 2000; Beyer jt, 2010; Zaborowski jt 2015)

1.4.2 Mikrovesiikulid (16K)

Mikrovesiikulid (ka ektosoomid, nanopartiklid või väljutatavad vesiikulid) on 100 nm – 1 µm suurused fosfolipiidse kaksikkihiga ümbritsetud partiklid, mis punguvad raku elutegevuse käigus plasmamembraanist rakkudevahelisse ruumi. Need sisaldavad tsütoplasmaatilist kargot (valgud, DNA, RNA, metaboliidid), mis pärineb doonorrakust. Mikrovesiikulite pungumise kiirus on üldiselt aeglane, välja arvatud tuumorirakkude puhul, mis väljutavad neid pidevalt. Regulaarset MV-de tootmist saab indutseerida, aktiveerides raku pinnareseptoreid või apoptoosilisi radu või suurendades rakusisest Ca²⁺ ionide kontsentratsiooni. Sarnaselt apoptoosilistele kehadele on mikrovesiikulitel fosfatidüülseriin suunatud vesiikuli välisküljele, kuigi on leitud ka MV-sid, mille puhul see nii pole. (Heijnen jt, 1999; Baroni jt, 2007; Kahner jt, 2008; Smalley jt, 2008; Connor jt, 2010; Huang-Doran jt, 2017)

1.4.3 Eksosoomid (120K)

Eksosoomid on fosfolipiidse kaksikkihiga ümbritsetud EV-d, mille diameeter on umbes 30 – 100 nm. Need tekivad rakusiseselt endosomaalsetest membraanidest pungumise teel. Endosoomist saab sissepoole pungumise tagajärjel multivesikulaarne keha (MVB, *multivesicular body*), mis ühineb kas lüsoosoomide või raku plasmamembraaniga. Ühinedes lüsoosoomi(de)ga lagundatakse MVB sisu, kuid plasmamembraaniga fuseerudes väljutatakse rakuvälisesse keskkonda kehas olevad vesiikulid, eksosoomid. (Colombo jt, 2014; Zaborowski jt, 2015; Huang-Doran jt, 2017)

Eksosoomid on võimelised endas kandma funktsionaalseid RNA molekule, näiteks mRNA ja miRNA (Valadi jt, 2007).

1.5 Ekstratsellulaarsed vesiikulid informatsiooni kandjatena

Rakkudevaheline infovahetus toimub ekstratsellulaarsete vesiikulite kaudu. Kuigi enamik kirjandusest vaatleb infoedastajatena vaid eksosoomi, on tõestatud, et ka suuremad vesiikulid võtavad osa rakkudevahelisest suhtlusest. Oluline osa materjali edasikandumisest EV-dega on, et iga molekuli jaoks ei kasutata oma mehhanismi, vaid paljud erinevad ained satuvad raku korraga, kusjuures raku sisenemine on reguleeritud ainult vesiikuli omastamise tasemel. (Chin ja Wang, 2016)

Hulkakse organismi ning koe tasemel mõjutavad EV-d mitmeid eri protsesse, transportides metaboliite, signaalmolekule jm. Üks olulisemaid aspekte selle juures on immuunsüsteemi mõjutamine eri olukordades.

On kindlaks tehtud, et eksosoomid, mis pärinevad dendriitrakkudest, kannavad endas MHC I ja II klassi molekul-peptiid komplekse. Eksosoomid transportivad MHC-peptiid komplekse edasi teistele dendriitrakkudele ja aktiveerivad immuunrakke, olles ka ise antigeeni esitleja rollis. Lisaks antigeeni esitlemisele on immuunsüsteemi eksosoomid võimelised osalema T-rakkude aktivatsiooniprotsessis, kuna sisaldavad T-lümfotsüütide kostimulatoorseid faktoreid. (Bobrie jt, 2011)

Sarnast vesiikulite käitumist on täheldatud ka kesknärvisüsteemis. Kesknärvisüsteemi kahjustuse korral, näiteks põletiku puhul ekspresseerivad mikroglia rakud enda pinnale MHC-antigeen komplekse ning kutsuvad sellega esile immuunvastuse. Kompleksid on ka mikrogliaast pärinevate eksosoomide pinnal. Selline tõhus antigeeni esitusviis kindlustab kiire ja efektiivse immuunvastuse tekke. (Poticchio jt, 2005, Yang jt, 2010)

Peale immuunsüsteemi aktiveerimise, osalevad EV-d ka selle mahasurumises. Rasedate naiste verest eraldatud platsenta päritolu EV-d sisaldavad immunosupressiivseid molekule, mis aitavad kaasa tolerantsi tekkimisele loote suhtes. Partiklite pinnal olevad agendid mõjutavad ema tsütotoksilisi T-rakke ja loomulikke tapjarakke (NK-rakke), nii et need ei hävitaks emakas arenevat loodet. (Hedlund jt, 2009)

Lisaks valkudele ja signaalmolekulidele võivad EV-d edasi kanda ka nukleiinhappeid ning nende kaudu mõjutada märklaudraku elutegevust. On kindlaks tehtud, et EV-de kaudu liiguvad ühest rakust teise erineva otstarbega RNA molekulid, peamiselt mRNA ja miRNA, mis suudavad reguleerida pärast vesiikulist väljumist retsipientraku geeniekspressiooni (Baj-

Krzyworzeka jt, 2006; Valadi jt, 2007; Skog jt, 2008). Täheldatud on ka DNA ülekannet, kuid väga vähesel määral (Fischer jt, 2016).

Suurt huvi pakub EV-de vahendatud info edastamine vähirakkude vahel, kuna viimased eritavad rohkem EV-sid kui tavapärased keharakud. Sealjuures on vähirakkudest pärinevatel EV-del nii vähkkasvajale kui normaalsele rakule omaseid faktoreid, mistõttu võivad nad liikuda vähikoldest kaugemale, transformeerides uusi rakke ning tekitades sedamoodi metastaase. Vähirakkudest pärinevate EV-de koostises võib olla veel immunosupressiivseid molekule, mis takistavad tuumorivastase immuunvastuse teket, soodustades uute kasvajate teket ja arengut. (Yu jt, 2007, Xiang jt, 2009, Chin ja Wang, 2016)

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis aset leidva melanoomi antigeenide uuringute projekti raames uurisin MAGE-A perekonda kuuluvate antigeenide avaldumist rakust väljuvates ekstratsellulaarsetes vesiikulites. Uurimuse aluseks on hüpotees, et rakus ekspresseeruv MAGE-A perekonna valk lülitub ekstratsellulaarsete vesiikulite koostisesse ning võib seega organismis ringi liikuda, aidates kaasa vähkkasvaja levikule.

Käesoleva töö eesmärkideks on:

- 1) MAGE-A perekonna valkude ekstratsellulaarsetesse vesiikulitesse lülitumise näitamine ja iseloomustamine;
- 2) MAGE-A4 valgu ja ekstratsellulaarsete vesiikulite vaheliste interaktsioonide kirjeldamine.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud plasmiidid

MAGE-A4 ja MAGE-A10 ekspresseerimiseks Cop5 rakkudes ja ekstratsellulaarsetes vesiikulites (EV) kasutati pQM vektorit (TÜTI).

pQM vektorilt ekspresseeritakse MAGE-A antigeene tsütomegaloviiruse promootorilt (CMV) ning pCG3F12 vektorilt ekspresseeritakse MAGE-A4 deletante CMV promootorilt.

Plasmiidide paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α . Transformeeritud bakterirakke kasvatati LB söötmes ampitsilliini selektsiooni all lõppkontsentratsiooniga 100 μ g/ml. Plasmiidide eraldamiseks kasutati *FavorPrepTM Plasmid Extraction Mini Kit*'i (*Favorgen*) tootja protokoll järgi.

2.2.2 Rakuliinid

Uurimuse läbiviimiseks kasutati imetaja rakuliini Cop5, mis on hiire fibroblasti rakud. Rakke kasvatati IMDM söötmes (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), kuhu oli lisatud 10% veist loote seerumit (*FCS*) ning antibiootikume penitsilliin (100 U/ml) ja streptomüsiin (100 ng/ml) (*Sigma*). Rakke kasvatati 37°C inkubaatoris 5% CO₂ keskkonnas (*Panasonic MCO-19AICUV-PE*)

2.2.3 Antikehad

Tabel 1. Uurimuses kasutatud primaarsed antikehad. Iga antikeha puhul on välja toodud nii algne kontsentratsioon kui kasutamise kontsentratsioon vastavalt analüüsi tüübile.

Antikeha	Päritolu	Tootja	Kontsentratsioon	Western Blot	ELISA	Voolutsütomeetria
anti-MAGE-A4	Jänesest	Afinsuspuhastatud (Kurg jt, 2016)	2,5 mg/ml	1:25 000 / 1:10 000	1 ng/ μ l	1 ng/ μ l
anti-MAGE-A10			1,1 mg/ml	1:2200	-	2 ng/ μ l
anti-VLP-MAGE-A4			3,7 mg/ml	1:6000	-	2 ng/ μ l
anti-TSG101	Hiirest	Sigma	2 mg/ml	1:10 000	-	-
anti-5E11-E2Tag		Icosagen	1 mg/ml	1:4000	-	-
anti- β -aktiin AC-74 kloon		Sigma	2 mg/ml	1:1000	-	-

Tabel 2. Uurimuses kasutatud sekundaarsed antikehad. Iga antikeha puhul on välja toodud nii algne kontsentratsioon või soovituslik lahjendus kasutamiseks kui kasutamise kontsentratsioon.

Antikeha	Tootja	Kontsentratsioon	Reaktsioonides
Goat anti-mouse	LabAs	1 mg/ml	1:10 000
Goat anti-rabbit	LabAs	1 mg/ml	1:10 000
anti-rabbit Alexa 488	Invitrogen	1 mg/ml	1:1000
anti-mouse Alexa 488	Invitrogen	1 mg/ml	1:1000

2.2.4 Eukarüootsete rakkude transfekteerimine

Plasmiidide viimiseks Cop5 rakkudesse kasutati elektroporatsiooni meetodit. Selleks koguti rakud 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassidelt: sööde aspireeriti ja rakke pesti PBS-iga. Sellele järgnevalt eemaldati rakud tassidelt 1 ml trüpsiinilahusega (0,05% trüpsiin, 0,02% EDTA PBS-s, *GE Healthcare*) ning kanti tsentrifuugitopsi, kuhu oli eelnevalt kantud 3 ml IMDM söödet. Rakud tsentrifuugiti 5 minutit 1000 rpm 20°C juures (*Eppendorf Centrifuge 5810R*). Supernatant aspireeriti ja rakkudele lisati 250 µl söödet ühe poratsiooni kohta. 4 mm läbimõõduga elektroporatsiooniküvetis segati kokku 50µg *carrier* DNA-d (lõhe sperma DNA), 2 µg ekspressioonivektoreid (kontsentratsioonisõltuvuse katses 0, 0,75, 1,5 ja 3 µg) ja 250 µl rakususpensiooni. Elektroporatsioon teostati *BioRad GenePulser Xcell™* aparaadiga 975µF mahutavuse ja 230 V pinge juures. Poreeritud rakud kanti üle 15 milliliitristesse tsentrifuugitopsidesse, millesse oli eelnevalt pipeteeritud 3 ml IMDM söödet ja tsentrifuugiti põhja 5 minutit 1000 rpm temperatuuril 20°C (*Eppendorf Centrifuge 5810R*). Järgnevalt aspireeriti sööde ning rakud resuspendeeriti 1 ml eksosoomivabas IMDM söötmes ja kanti üle 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassidele, kuhu oli eelnevalt lisatud 8 ml eksosoomivaba IMDM söödet. Rakuplaadid asetati kasvama 37° inkubaatorisse 5% CO₂ keskkonda (*Panasonic MCO-19AICUV-PE*).

2.2.5 Rakkude kogumine ja lüüsimine

Elektroporeeritud Cop5 rakke kasvatati 37°C inkubaatoris 5% CO₂ keskkonnas 72 h (*Panasonic MCO-19AICUV-PE*). Seejärel koguti rakkudelt sööde ning pärast seda pesti rakud PBS-iga ja eemaldati need plaatidelt 1 ml PBS-EDTA lahusega (1x PBS, 3mM EDTA). Rakud koguti 1,5 ml tsentrifuugituubidesse ja tsentrifuugiti põhja lauatsentrifuugis (Sigma 1-14) pööretel 4000 rpm 5 minutit. Supernatant aspireeriti ja rakud resuspendeeriti 1 ml PBS-is. Tuubist võeti välja 40 µl rakke ja lüüsi samas mahus 2x Laemmli puhvris [4% SDS; 20%

glütserool; 120mM Tris-Cl, pH 6,8; 0,02% broomfenoolsinine; 0,2M DTT (ditiotreitol)] ja kuumutati proove 100°C juures 10 minutit. Rakulüsaate säilitati temperatuuril -20°C.

2.2.6 EV-de eraldamine söötmet

Käesolev metoodika EV-de eraldamiseks on *PhD* Reet Kure modifikatsioon Crescitelli jt välja pakutud eraldamisprotokollist (Crescitelli jt, 2013).

Ekstratsellulaarsete vesiikulite (EV) eraldamiseks IMDM söötmet kasvatati elektroporeeritud Cop5 rakke 72 h 37°C inkubaatoris 5% CO₂ keskkonnas (*Panasonic MCO-19AICUV-PE*). Seejärel koguti rakkudelt sööde, mis valati tsentrifuugitopsi ja tsentrifuugiti temperatuuril 4°C neljaastmeliselt:

- a) 300g 10 min rakutükkide jm prügi eemaldamiseks (*Eppendorf Centrifuge 5810R*);
- b) 2 000g 20 min apoptootiliste kehade ja suurte vesiikulite (2K vesiikulite) sadestamiseks (*Eppendorf Centrifuge 5810R*);
- c) 16 500g (10 000 rpm) 20 min mikrovesiikulite (16K vesiikulite) sadestamiseks (*Beckman Coulter Optima™ L-90K Ultracentrifuge*, rootor SW28);
- d) 120 000g (27 000 rpm) 70 min eksosoomide (120K vesiikulite) sadestamiseks (*Beckman Coulter Optima™ L-90K Ultracentrifuge*, rootor SW28).

Iga etapi järel kanti supernatant (sööde) edasi uutesse tsentrifuugitopsidesse, ainult viimase etapi järel sööde aspireeriti. Esimeses etapis tekkinud sade visati minema, kõigis teistes etappides tekkinud sademed suspendeeriti 200 µl PBS-is.

Pärast eraldamist pesti partiklid PBS-iga. 2K ja 16K puhul viidi proovi maht PBS-iga 1 milliliitrini ja tsentrifuugiti proove jahutusega lauatsentrifuugis (*MicroCL 21R Centrifuge*, *Thermo Scientific*) temperatuuril 4°C 17 000g juures 15 min ning 120K vesiikulite puhul viidi maht PBS-iga 3 milliliitrini ja tsentrifuugiti temperatuuril 4°C 32 000 rpm 1,5 h (*Beckman Coulter Optima™ L-90K Ultracentrifuge*, rootor SW55). Sademed suspendeeriti 100 µl PBS-s ja mõõdeti valgu üldkontsentratsioon (*NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000*). Proove säilitati temperatuuril 4°C. Alternatiivselt mõõdeti totaalvalgu kontsentratsioon, kasutades Bradford'i meetodit.

Saadud proove kasutati *Western Blot*, ELISA ja voolutsütomeetria analüüsideks. *Western Blot* analüüsi tarbeks võeti välja 20 µl proovi ja lüüsi EV-d samas mahus 2x Laemmli puhvris ja kuumutati proove 100°C juures 10 minutit. Lüsaate säilitati temperatuuril -20°C.

2.2.7 Geelektroforees ja *Western Blot* analüüs

Uuritavate valkude visualiseerimiseks lahutati valgud SDS-polüakrüülamiidgeelis elektroforeesi teel (*SDS-Page*). Geelile kanti 5 µl rakulüsaati ja 10 µl EV-de lüsaate. Kasutati 10% akrüülamiidgeeli ja SDS jooksupuhvrit (125 mM Tris, 960 mM glütsiin, 0,5% SDS).

Rakulüsaadid ja EV-de proovid lahutati SDS-polüakrüülamiidgeelektroforeesi meetodil, kasutades 10% akrüülamiidgeeli ja SDS jooksupuhvrit. Valgud kanti geelist üle PVDF (polüvinülideenfluoriid) filtrile (*AmershamTM HybondTM P 0,45 PVDF*) poolkuiva ülekande abil (*Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad*). Ülekanne teostati pingel 15 V 20 minuti jooksul (ühe membraani kohta). Seejärel filter blokeeriti kas 30 minuti jooksul toatemperatuuril või üleöö 4°C juures blokeerimislahuses [50 mM Tris-Cl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% Tween20 + 2% NFDM (*non-fat dry milk*)]. Valkude detekteerimiseks kasutati uuritavate antigeenide spetsiifilisi antikehi, mida lisati sobivas kontsentratsioonis (vt Tabel 1) inkubeerimislahusesse [50 mM Tris-Cl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% Tween20 + 2% NFDM (*non-fat dry milk*)]. Filtrit inkubeeriti antikeha lahuses 1 h kallutil toatemperatuuril. Seejärel pesti filtrit kolm korda 10 minutit *Western*'i pesulahuses (100 mM Tris-Cl, pH 7,5; 170 mM NaCl; 0,05% Tween20). Pärast pesu inkubeeriti filter 1 h kallutil toatemperatuuril inkubeerimislahuses, kuhu oli vastavalt primaarsele antikehale isatud HRP-ga konjugeeritud sekundaarne antikeha (vt Tabel 2, peatükk 2.2.3). Järgnevalt pesti filtrit uuesti kolm korda 10 minutit *Western*'i pesulahusega ning teostati ilmutamisreaktsioon ECL komplektiga (*GE Healthcare AmershamTM ECLTM Western Blotting Detection Reagents*) tootja protokollil alusel. Signaal visualiseeriti autoradiograafiliselt AGFA röntgenfilmile (*AGFA CP-BU new Medical X-ray Film Blue, Agfa HealthCare NV*). Pildid skänniti *EPSON EXPRESSION 1680 Pro* skänneriga.

2.2.8 Voolutsütomeetria analüüs EV-dega

Voolutsütomeetria katsete tarvis valmistati EV-d ette sarnaselt peatükis 2.2.6 kirjeldatule ning seejärel seoti partiklid 4µm läbimõõduga aldehüüd/sulfaat latekskerakestele (*Life Technologies*). Selleks lisati 10 µg (totaalvalgu kontsentratsiooni järgi) EV-dele 10 µl aldehüüd/sulfaat latekskerakesi ja inkubeeriti segu 15 minutit toatemperatuuril. Seejärel viidi maht PBS-iga 1 milliliitrini ning segu inkubeeriti 4°C juures pöörlejal üleöö. Järgmisel päeval blokeeriti EV-dega latekskerakesed 100 mM glütsiin/PBS lahuses 30 min toatemperatuuril. Seejärel tsentrifugeeriti kerakesed põhja 3 minutit 4000 rpm temperatuuril 4°C (*MicroCL 21R Centrifuge, Thermo Scientific*). Supernatant aspireeriti. Järgnevalt pesti EV-dega kerakesi kaks

korda: tekkinud sade suspendeeriti 500 µl PBS/0,5% BSA lahuses ja tsentrifuugiti 3 minutit 4000 rpm temperatuuril 4°C (*MicroCL 21R Centrifuge, Thermo Scientific*). Pärast pesuetapi lõppu inkubeeriti proove uuritavate valkude vastaste antikehadega (vt Tabel 1, peatükk 2.2.3) 1 h pöörlejal temperatuuril 4°C. Kerakesi pesti uuesti kaks korda sarnaselt eelnevaga. Seejärel inkubeeriti proove 1 h pöörlejal temperatuuril 4°C fluorokroomi Alexa 488 kandvate sekundaarsete antikehadega (vt Tabel 2, peatükk 2.2.3). Proove pesti uuesti kaks korda, kuid mahus 150 µl, ning tekkinud sade resuspendeeriti 300 µl PBS/0,5% BSA lahuses. Proovid mõõdeti voolutsütomeetria analüsaatoriga (LSR II, *BD Biosciences*), kasutades programmi *BD FACSDiva Software (BD Biosciences)*. Tulemused analüüsiti programmis *FlowJo VX (Tree Star)*.

2.2.9 Ensüümseoseline immunosorbtsioonanalüüs (ELISA)

96 kaevukesega plaat kaeti söötmest eraldatud ja puhastatud EV-dega. Selleks lisati igasse kaevukesse PBS/0,1% Tween20 lahuses segatud 3 µg EV-sid ning inkubeeriti 4°C juures üleöö. Järgmisel päeval pesti plaati segajal kolm korda 10 min 200 µl PBS/0,1% Tween20 lahusega, et eemaldada mitteseondunud partiklid. Seejärel blokeeriti mittespetsiifilised seondumissaidid, inkubeerides kaevukesi 100 µl 2% BSA-PBS/0,1% Tween20 lahusega 30 min segajal toatemperatuuril. Pärast blokeerimist pesti plaati uuesti kolm korda 10 minutit nagu eelnevalt. Seejärel lisati kannukestesse uuritavatele valkudele vastavad spetsiifilised primaarsed antikehad erinevates kontsentratsioonides: 1 ng/µl, 0,25 ng/µl ja 0,0625 ng/µl PBS/0,1% Tween20 lahuses. Plaat inkubeeriti segajal 1 h toatemperatuuril. Järgnes pesu kolm korda 10 minutit nagu eelnevalt kirjeldatud. Pärast pesu lisati kannukestesse vastavalt primaarsetele antikehadele HRP-ga konjugeeritud sekundaarsed antikehad PBS/0,1% Tween20 lahuses ja inkubeeriti plaati 45 min segajal toatemperatuuril. Järgnevalt pesti plaati neli korda 10 min 200 µl PBS/0,1% Tween20 lahusega. Siis lisati igasse kannukesse 100 µl *TMB + Substrate (BioRad)* reagenti ning inkubeeriti 10 – 15 minutit toatemperatuuril segajal. Reaktsioon peatati 50 µl 0,5M H₂SO₄ lahuse lisamisega. Reaktsioonide analüüsimiseks kasutati *SunriseTM (Tecan)* mikroplaadi lugejat ja tulemus mõõdeti lainepikkusel 450 nm.

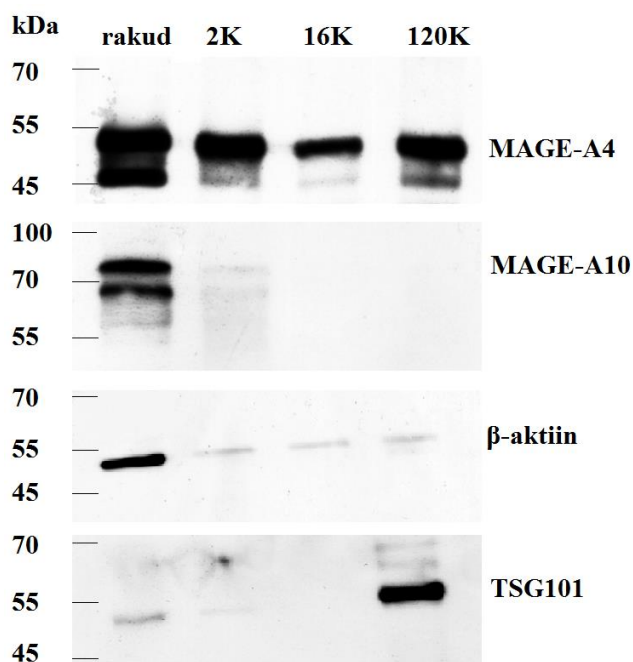
2.2.10 EV-de inkubeerimine eri omadustega lahustes

150 µl uuritavasse lahusesse lisati 30 µg EV-sid (totaalvalgu järgi) ning inkubeeriti proovi 15 minutit toatemperatuuril. Kasutusel olid neutraalne pesulahus PBS, tugeva ioonse jõuga soolalahused 0,4M ja 0,8M NaCl, detergendid 0,1% TritonX-100 (mitteioonne), 0,1% SDS (anioonne) ja 0,1% Tween20 (mitteioonne). Pärast inkubatsiooni pesti partiklid vastavalt

peatükis 2.2.6 toodud protokollile ja resuspendeeriti partiklid 30 µl PBS-is. Proove analüüsiti *Western Blot* meetodil.

2.3 Tulemused

2.3.1 MAGE-A valkude ekspresseerumine Cop5 rakkudes ja EV-des



Joonis 5. Western Blot analüüs transfekteeeritud Cop5 rakkude ja EV-de lüsaatidest MAGE-A4, MAGE-A10, β -aktiini ja 120K markeri TSG101 spetsiifiliste antikehadega. Cop5 rakkudelt koguti sööde ning rakud lüüsiiti 72 h pärast transfekteeerimist pQM-MAGE-A4 või pQM-MAGE-A10 plasmiididega. Söötmed tsentrifugeeriti neljaastmeliselt erinevatel kiirustel, eraldades erineva suurusega EV-d. Elektroforeesil kanti radadele 5 μ l rakulüsaati või 10 μ l partiklite lüsaati. *Western Blot*'is inkubeeriti proove anti-MAGE-A4, anti-MAGE-A10, anti- β -aktiini või anti-TSG101 antikehadega.

MAGE-A perekonna valkude ekspressiooni uurimiseks Cop5 rakkudes ja nende sekreteeritud EV-des teostati katse, kus rakkudesse viidi elektroporatsiooni teel plasmiidid, mis sisaldasid vastavalt MAGE-A4 või MAGE-A10 antigeenide DNA järjestusi. Pärast DNA elektroporatsiooni kasvatati rakke 37°C inkubaatoris 5% CO₂ keskkonnas 72 tundi. Seejärel koguti rakkudelt sööde ning eraldati sellest erineva suurusega ekstratsellulaarsed vesiikulid, tsentrifugeerides söödet neljaetapiliselt erinevatel pööretel. Lisaks koguti plaadilt kokku rakud 1ml PBS-EDTA lahusega. Saadud rakke ja partikleid analüüsiti *Western Blot* meetodi ja voolutsütomeetrilise analüüsi abil.

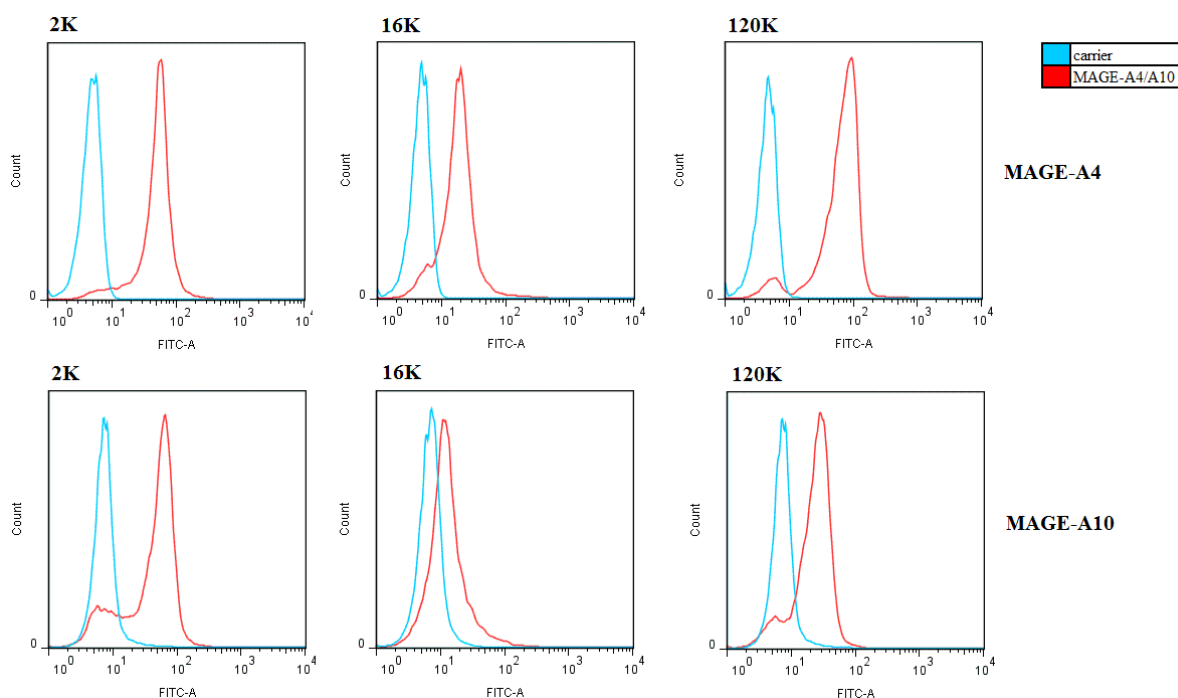
Western Blot katse tarbeks lüüsiiti rakud ja partiklid 2x Laemmli puhvril ja lahutati produktid elektroforeetilisel 10% SDS-polüakrüülamiidgeelil. MAGE-A4 ja MAGE-A10 valke tuvastati spetsiifiliste jänese toodetud antikehadega (Kurg jt, 2016). Kontrollidena kasutati β -aktiini

(rakuline kontroll) ja 120K EV-de markeri TSG101 vastaseid spetsiifilisi antikehi, millega näidati, et partiklid on rakulise päritoluga ning on tsentrifugimise käigus efektiivselt eraldatud.

Katse tulemusel selgus, et pärast vastava DNA sisestamist rakkudesse elektroporatsiooni teel ekspresseeruvad MAGE-A valgud nii Cop5 rakkudes kui nende poolt eritatavates EV-des. Tähelepanu, et MAGE-A4 lülitub EV-desse efektiivsemalt kui MAGE-A10, kuna *Western Blot*'i analüüsil on näha MAGE-A4 puhul tugev signaal kõikides radades, MAGE-A10 puhul tugev signaal ainult rakkudes ning nõrk signaal 2K rajal (vt Joonis 5).

Voolutsütomeetriliste katsete jaoks seoti EV-d 4 µm läbimõõduga aldehüüd/sulfaat latekskerakestele, kuna partiklite mõõtmed on liiga väikesed, et neid FACS analüsaatoriga detekteerida. Latekskerakestele seotud partikleid inkubeeriti jänesele toodetud MAGE-A4 ja MAGE-A10 vastaste spetsiifiliste antikehadega vastavalt sisestatud geneetilisele materjalile ning signaali tuvastamiseks vajaliku sekundaarse antikehaga Alexa 488.

Analüüs voolutsütomeetrial FACS näitas samuti, et MAGE-A4 emiteeritav signaal on märgatavalt tugevam MAGE-A10 omast. On näha veel, et MAGE-A valgud lülituvad 2K ja 120K EV-de koostisesse efektiivsemalt kui 16K EV-desse (vt Joonis 6 ja Tabel 3).



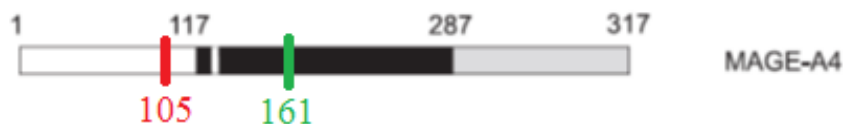
Joonis 6. Söötmetst eraldatud EV-de voolutsütomeetria analüüs. Cop5 rakkudelt koguti sööde 72 h pärast transfektsiooni pQM-MAGE-A4 ja pQM-MAGE-A10 plasmiididega. Söödet tsentrifugiti neljastapiliselt, eraldades erineva suurusega EV-d. Partikleid inkubeeriti 10 µl latekskerakeste lahusega 1 ml PBS-is ning seejärel iga antigeeni vastase spetsiifilise antikehaga. Sinine kõver vastab EV-dele, mis ei sisalda antigeene, ja punane kõver esindab antigeene kandvaid EV-sid.

Voolutsütomeetrilise katsega tõestati veel, et MAGE-A valgud, olles lülitunud EV-de koostisesse, eksponeeruvad nende pinnale. Selle järelduseni jõuti, kuna latekskerakestele seotud EV-d emiteerisid pärast antikehadega inkubatsiooni loetavaid signaale. Kui MAGE-A valgud oleksid lokaliseerunud EV-de luumenis, poleks voolutsütomeetriga detekteeritavaid signaale, kuna antikehad ei saaks valkudele seonduda.

Tabel 3. Voolutsütomeetria analüüsi fluorestsentsi intensiivsuse keskväärtused. Tabelis on välja toodud Joonisel 4 olevaid graafikuid iseloomustavad arvulised väärtused, mis näitavad iga proovi (piigi) keskmist fluorestsentssignaali tugevust. Negatiivse kontrollina olid kasutusel ainult *carrier*-DNA-ga poreeritud rakkudest eraldatud partiklid.

MFI				
	Negatiivne kontroll	MAGE-A4	Negatiivne kontroll	MAGE-A10
2K	129	1457	243	1338
16K	127	635	197	490
120K	123	1965	243	662

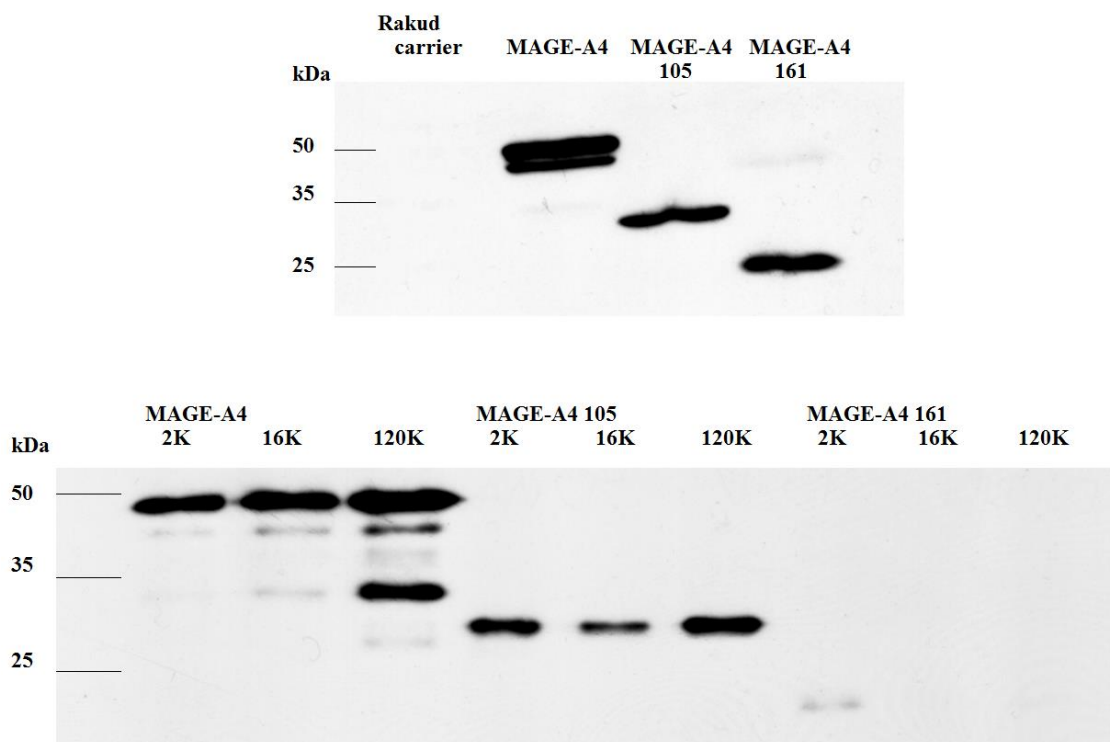
2.3.2 MAGE-A4 valgu deletandid



Joonis 7. MAGE-A4 deletantide 105 ja 161 alguspunktid. Joonisel on ligikaudu märgitud, millisest aminohappejäägist algavad MAGE-A4 deletandid MAGE-A4 105 ja MAGE-A4 161. Originaalpilt Meek ja Marcar, 2012.

Uurimaks, missugused valgu osad on vajalikud EV-dele seostumiseks, kasutati MAGE-A4 valgu deletante MAGE-A4 105 ja MAGE-A4 161, mis algavad vastavalt täispika valgu 105. ja 161. aminohappejäägist. Joonisel 7 on märgitud deletantide alguspunktid, kust on näha, et MAGE-A4 105 deletant algab umbes 10 aminohappejääki enne MHD-d ning MAGE-A4 161 deletant MHD seest. MAGE-A4 valgu deletantide MAGE-A4 105 ja MAGE-A4 161 ekspresseerimiseks Cop5 rakkudes ja EV-des kasutati pCG3F12 vektorit (TÜTI). Kloneerimise vahevektorina PCR produkti paljundamiseks kasutati pTZ57R/T vektorit *Thermo Scientific InsTAclone PCR Cloning Kit*'i (*Thermo Fisher Scientific*) koosseisus. PCR-iga paljundatud deletsooniga DNA-d kloneeriti kõigepealt vektorisse pTZ57R/T, kust pärast *E. coli*'s paljundamist lõigati see välja restriктаasidega XbaI ja XhoI ning kloneeriti vektorisse

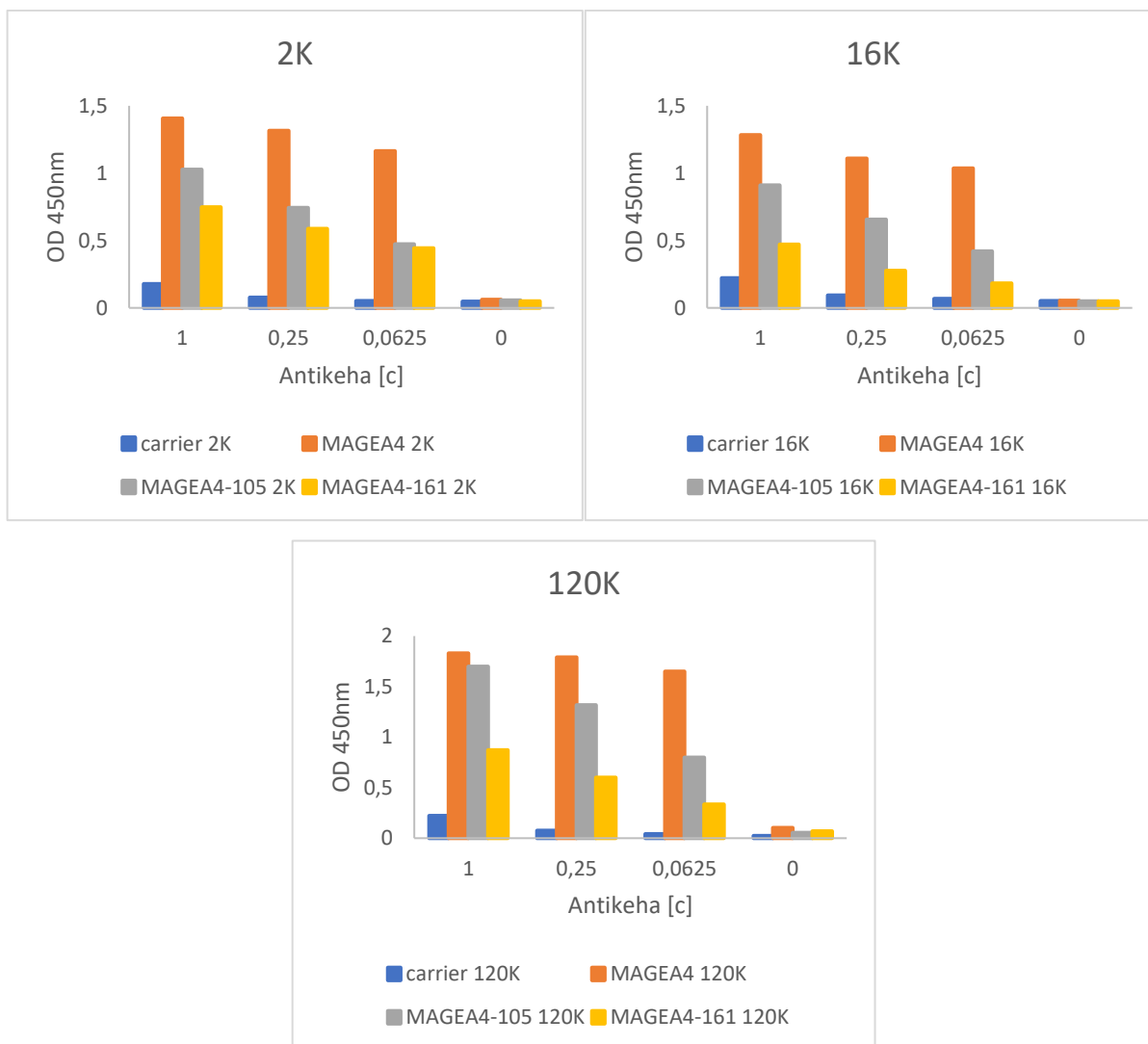
pCG3F12. Seda paljundati omakorda *E. coli*'s ning puhastati sealt välja, kasutamaks seda rakuliinis Cop5. Saadud plasmiidid ja täispikka valku kodeeriv plasmiid sisestati rakkudesse elektroporatsiooni teel. Saadud materjali analüüsiti *Western Blot* ja ELISA meetodeil. MAGE-A4 täispikka valku ja deletante detekteeriti rakkudes valgukonstrukti C-terminuses oleva 5E11-E2Tag järjestuse vastase spetsiifilise antikehaga ning EV-des spetsiifilise MAGE-A4 vastase antikehaga. ELISA katses kasutati 3µg partikleid ja neljakordseid anti-MAGE-A4 antikeha lahjendusi, alustades kontsentratsioonist 1 ng/µl.



Joonis 8. *Western Blot* analüüs MAGE-A4 valgu ja sellest genereeritud deletantide MAGE-A4 105 ja MAGE-A4 161 ekspressioonist Cop5 rakkudes ja EV-des. Cop5 rakkudel koguti sööde ja rakud lüüsi 72 h pärast transfekteerimist pQM-MAGE-A4, pCG3F12-MAGE-A4 105 või pCG3F12-MAGE-A4 161 plasmiididega. Söötmed tsentrifugeeriti neljaastmeliselt erinevatel kiirustel, eraldades erineva suurusega EV-d. Elektroforeesil kanti radadele 5µl rakulüsaati või 10 µl partiklite lüsaati. *Western Blot*'is inkubeeriti rakuproove valgukonstrukti leiduva 5E11-E2Tag vastase antikehaga ning EV-de proove anti-MAGE-A4 antikehaga.

Katsete tulemusena selgus, et kõik valgud ekspresseeruvad Cop5 rakkudes, kuid lülitumine EV-desse on deletantide puhul häiritud. *Western Blot* katse näitas, et deletant MAGE-A4 105 lülitub EV-desse sarnaselt täispikka valguga, kuid MAGE-A4 161 käitub erinevalt, olles detekteeritav vaid rakkudes ja 2K EV-des (vt Joonis 8). ELISA katsest selgus, et EV-desse lülitumise efektiivsus on seotud tervikliku MHD domeeni olemasoluga. Deletant MAGE-A4 105, millel

on MHD täisulatuses olemas, lülitub EV-de koostisesse märgatavalt efektiivsemalt kui MAGE-A4 161, millel on MHD N-terminaalsest osast aminohappejääke puudu (vt Joonis 9). ELISA analüüsi tulemused erinevad veidi *Western Blot*'i omadest, kuna seal on nähtav detekteeritav signaal kõigis partiklites ka MAGE-A4 161 deletandi puhul. Erinevus võib tuleneda kahe meetodi erinevast tundlikkusastmest, kuna ELISA analüüsiga on võimalik tuvastada nõrgemaid signaale kui *Western Blot* meetodiga.



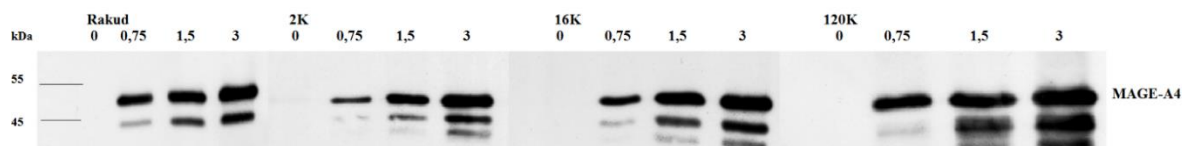
Joonis 9. ELISA testi analüüs MAGE-A4 valgu ja selle deletantide ekspresioonitasemetest EV-de pinnal erinevate antikeha kontsentratsioonide juures (ng/μl). Cop5 rakkudelt koguti sööde 72 h pärast transfekteerimist pQM-MAGE-A4, pCG3F12-MAGE-A4 105 või pCG3F12-MAGE-A4 161 plasmiididega. Söötmed tsentrifuugiti neljaastmeliselt erinevatel kiirustel, eraldades erineva suurusega EV-d. Igasse ELISA plaadi kaevukesse kanti 3 μg EV-sid (totaalvalgu järgi). Proove inkubeeriti anti-MAGE-A4 antikehaga. Sinine tulp vastab antigeene mitte sisaldavate EV-de tulemustele, oranž tulp esindab täispikka MAGE-A4 valgu sisaldavate EV-de tulemusi, hall tulp kajastab MAGE-A4 105 deletanti sisaldavate EV-de tulemusi ja kollane tulp näitab MAGE-A4 161 deletanti sisaldavate EV-de tulemusi.

2.3.3 MAGE-A4 ekspressiooni sõltuvus kontsentratsioonist

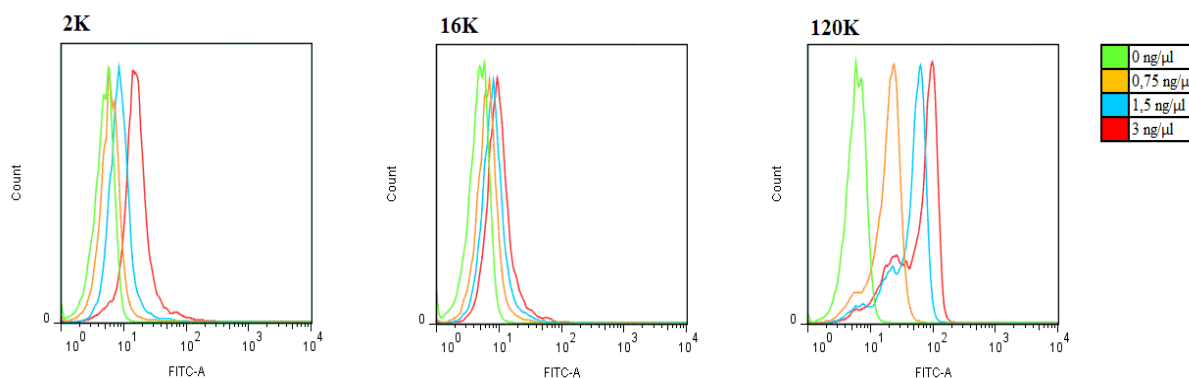
MAGE-A4 valgu kontsentratsioonilise sõltuvuse uurimiseks teostati katse, mille käigus sisestati Cop5 rakkudesse elektroporatsiooniga pQM-MAGE-A4 plasmidi kolmes erinevas kontsentratsioonis (0,75, 1,5 ja 3 ng/μl) ja kontrolliks olid rakud, millesse sisestati ainult *carrier* DNA (pQM-MAGE-A4 kontsentratsioon on 0 ng/μl). MAGE-A4 valgu detekteeriti spetsiifilise jänese toodetud anti-VLP-MAGE-A4 antikeha abil (Kurg jt, 2016). Voolutsütomeetrilise katse tarbeks seoti partiklid 4 μm läbimõõduga aldehüüd/sulfaat latekskerakestele, kuna iseseisvalt on nende mõõtmed liiga väikesed, et neid detekteerida. Latekskerakesi inkubeeriti spetsiifilise anti-VLP-MAGE-A4 antikehaga ja detekteerimiseks vajaliku sekundaarse antikehaga Alexa 488.

Rakkude ja EV-de analüüs *Western Blot* meetodil ja voolutsütomeetriga FACS näitas, et valgu ekspressioonitase tõuseb vastavuses DNA kontsentratsiooni suurenemisega (vt Joonised 10 ja 11 ja Tabel 4). Rakkude või partiklite küllastumist MAGE-A4 valguga ei näidanud kumbki katse.

Ekspressioonitase ei erinenud fraktsiooniti, nii rakkudes kui kõigis EV-des on näha sarnast signaalitugevuse tõusu.



Joonis 10. *Western Blot* analüüs MAGE-A4 valgu ekspressioonitaseme sõltuvusest rakkudes sisestatud DNA kontsentratsioonist (ng/μl). Cop5 rakkudelt koguti sööde ja rakud lüüsiiti 72 h pärast transfekteerimist erinevates kontsentratsioonides pQM-MAGE-A4 plasmiidiga. Söötmed tsentrifugeeriti neljaastmeliselt erinevatel kiirustel, eraldades erineva suurusega EV-d. Elektrofooresil kanti radadele 5 μl rakulüsaati või 10 μl partiklite lüsaati. *Western Blot*'is inkubeeriti proove anti-MAGE-A4 antikehaga.

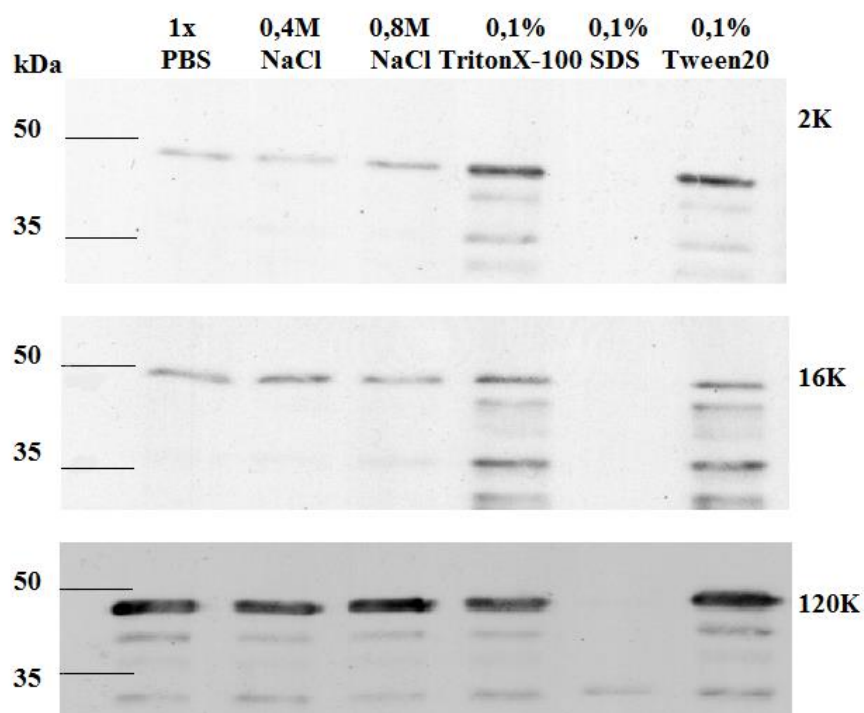


Joonis 11. Voolutsütomeetria analüüs MAGE-A4 valgu ekspressioonitaseme sõltuvusest rakkudes sisestatud DNA kontsentratsioonist (ng/μl). Cop5 rakkudele koguti sõõde 72 h pärast transfekkeerimist pQM-MAGE-A4 plasmiidiga erinevates kontsentratsioonides (0, 0,75, 1,5 ja 3 ng/μl). Sõõdet tsentrifugeeriti neljaetapiliselt, eraldades erineva suurusega EV-d. Partikleid inkubeeriti 10 μl latekskerakete lahusega 1 ml PBS-is ning seejärel antigeeni vastase spetsiifilise antikehaga. Roheline kõver vastab EV-dele, mis ei sisalda antigeene (0 ng/μl), kollane kõver kujutab EV-sid, millesse sisestati DNA kontsentratsioon 0,75 ng/μl, sinine kõver näitab EV-sid, millesse sisestati DNA kontsentratsioon 1,5 ng/μl ja punane kõver esindab EV-sid, millesse sisestati DNA kontsentratsioon 3 ng/μl.

Tabel 4. Kontsentratsioonirea voolutsütomeetria analüüsi fluorestsentsi intensiivsuse keskvaartused. Tabelis on välja toodud Joonisel 8 olevaid graafikuid iseloomustavad arvilised väärtused, mis näitavad iga proovi (piigi) keskmist fluorestsentssignaali tugevust.

	MFI			
	0 ng/μl	0,75 ng/μl	1,5 ng/μl	3 ng/μl
2K	140	207	302	596
16K	133	199	281	333
120K	164	529	1285	1745

2.3.4 MAGE-A4 valgu interaktsioonid EV-dega



Joonis 12. Western Blot analüüs MAGE-A4 valgu ekspressioonitasemest EV-des pärast inkubeerimist erinevate lahustega. Cop5 rakkudest koguti sööde ja rakud lüüsi 72 h pärast transfekteerimist pQM-MAGE-A4 plasmiidiga. Söötmed tsentrifugeeriti neljaastmeliselt erinevatel kiirustel, eraldades erineva suurusega EV-d. Proove inkubeeriti toatemperatuuril 15 min mõnes lahuses. Seejärel pesti proove PBS-ga ning valmistati lüsaadid. Elektroforeesil kanti radadele 5µl rakulüsaati või 10 µl partiklite lüsaati. *Western Blot*'is inkubeeriti proove anti-MAGE-A4 antikehaga.

MAGE-A4 valgu ja EV-de vaheliste interaktsioonide iseloomustamiseks, inkubeeriti söötmetest eraldatud partikleid toatemperatuuril 15 minutit erinevate omadustega lahustes. *Western Blot* analüüsi tulemustest on näha, et kõige efektiivsem MAGE-A4 valgu eemaldamises EV-de pinnalt oli 0,1% SDS lahus. Mitteioonsed detergendid 0,1% TritonX-100 ja 0,1% Tween20 võimendavad näiliselt signaali 2K ja 16K partiklite puhul (vt Joonis 12). Ülejäänud lahuste puhul suuremaid muutusi märgata ei olnud.

2.4 Arutelu

2.4.1 MAGE-A perekonna valkude lülitumine EV-de koostisesse

Eelnevates uuringutes on selgunud, et rakkudesse sisestatud MAGE-A4 ja MAGE-A10 valgud eksponeeruvad MLV-Gag (hiire leukeemiaviiruse kapsiidivalk) indutseeritud VLP-de (viiruslaadsete partiklite) pinnal, kuigi tegemist pole rakumembraanis lokaliseeruvate valkudega (Kurg jt, 2016). Sellest tulenevalt uuriti käesolevas töös, kas MAGE-A perekonna valgud MAGE-A4 ja MAGE-A10 lülituvad raku tavapärase elutegevuse käigus tekkivate EV-de koostisesse sarnaselt indutseeritud VLP-dega ning kas need eksponeeruvad eritatavate vesiikulite pinnale.

Katsete tulemusena näidati, et Cop5 rakke on võimalik edukalt transfekteerida MAGE-A perekonna antigeenide järjestusi sisaldavate plasmiididega ning et plasmiidilt ekspresseeritav valk lülitub loomulikult teel tekkivate EV-de koostisesse, kusjuures MAGE-A4 teeb seda efektiivsemalt kui MAGE-A10. Erinevus kahe valgu käitumise vahel võib tuleneda nendevahelistest erinevustest. MAGE-A perekonna valgud on teadaolevalt omavahel väga sarnased, kuid sellegipoolest võivad väikesed erinevused valgu aminohappelises järjestuses tuua kaasa muutusi, mis mõjutavad valgu lokalisatsiooni ja omadusi rakus. Lisaks võib MAGE-A10 madalam ekspressioonitase EV-des olla tingitud asjaolust, et MAGE-A10 on oma olemuselt tuumavalk, kusjuures MAGE-A4 lokaliseerub tsütoplasmas. Tuumne lokalisatsioon võib tingida olukorra, et valk ei satu suurtes kogustes rakust väljuvatesse partiklitesse, kuna ei asu kohas, kust rakumaterjali vesiikulite koostisesse kaasatakse. Kolmas asjaolu, seletamaks erinevusi võib olla seotud materjali detekteerimisega tehtud analüüside käigus, kuna MAGE-A4 ja MAGE-A10 tuvastamiseks kasutati erinevaid antikehi. On võimalik, et MAGE-A4 spetsiifilised antikehad on tundlikumad kui MAGE-A10 omad ning seega on MAGE-A4 ekspressioon paremini detekteeritav.

Tõestus, et MAGE-A valgud eksponeeruvad EV-de pinnal, tekitas rohkem küsimusi kui vastuseid. Katsetest nähtub, et algselt tuumas (MAGE-A10) või tsütoplasmas (MAGE-A4) lokaliseerunud valgud on liikunud partiklite pinnale. Selgusetuks jäi aga asjaolu, kuidas ja miks need liikusid membraani välisküljele. Tuvastatud fenomen vajaks täiendavat uurimist ja mehhanismide kindlaks tegemist. Lisaks täheldati, et MAGE-A valgud eksponeeruvad efektiivsemalt 2K ja 120K pinnal, 16K EV-de pinnalt loetav signaal on eelnevatest nõrgem. Ka siinkohal ei anna praegused tulemused kindlaid vastuseid küsimusele, miks see nii võib olla. See võib tuleneda partiklite koostise või generatsiooniradade erinevustest või mõnest seni avastamata asjaolust. Samuti võib olla määravaks katse tehniline pool, kuna väiksemaid

partikleid seostub latekskerakeste pinnale suuremal hulgal ning seetõttu võib olla nendelt loetav signaal tugevam kui suuremate partiklite puhul. See seletaks signaalitugevuse erinevusi 120K ja teiste partiklite vahel, kuid jätkaks vastuseta küsimuse, miks on 16K signaal nõrgem 2K omast.

Teadmine, et MAGE-A perekonna valgud lülituvad raku poolt sekreteeritavatesse vesikiulitesse võib anda aimu, kuidas satuvad vähi antigeenid vereringesse ja sealt edasi kasvajast kaugematesse kudedesse. Nende liikumine kehas võib potentsiaalselt kaasa aidata näiteks kaugete metastaaside tekkele ja vähkkasvaja arengule. Samas võib see mehhanism olla ka organismile kasulik, kuna partiklite pinnal olevad antigeenid on paremini esitletud immuunsüsteemile kui raku sees olevad valgud. Seega tuleks antud teemat kindlasti edasi uurida, et mõista selle kliinilist potentsiaali vähiravis või selle varajasel diagnoosimisel.

Mehhanism, kuidas MAGE-A valgud võiksid liikuda partiklite välispinnale, on veel suures osas arusaamatu. Selle kohta andsid mõningast informatsiooni katsed valgu deletantidega, millest järeldus, et valgu ekspressioonitase partiklites on madalam, kui perekonnale iseloomulik MHD domeen pole terviklik. See annab alust oletada, et MAGE-A valkude kaasamine EV-de koostisesse on seotud antud domeeniga, kuna kõige ebaefektiivsemalt lülitus partiklitesse deletant MAGE-A4 161, milles on ära lõigatud osa MHD N-terminaalsest otsast. Samas vähenes ekspressioonitase ka MAGE-A4 105 deletandi puhul, millel on MHD täies ulatuses olemas. Seega võivad EV-desse lülitumist mõjutada ka valgu teised osad, mehhanism ei pruugi olla seotud ainult MHD-ga. Selle kindlaks määramine vajaks edasisi analüüsi rohkemate deletantide või muude meetoditega.

Vaadates MAGE-A valgu liikumist EV-de membraanidesse teisest küljest, tuleb tähele panna asjaolu, et antud töös teostatud kontsentratsioonirea katsetega ei õnnestunud partiklite pinda antigeeniga küllastada. Siit võib oletada, et MAGE-A valgud ei liigu membraani välisküljele, kasutades mõnd retseptorit või kandjat. Seda seetõttu, et katses kasutatud suuremate DNA kontsentratsioonide puhul võiks märgata ekspressioonitaseme jõudmist platoole, kuna toimuks vastavate molekulide küllastumine melanoomi antigeeniga. Seega võib olla nii, et MAGE-A valgud liiguvad membraani välisküljele iseseisvalt või kasutavad liikumiseks retseptoreid või kandjamolekule, mida on väga suures koguses ja selle tõttu keeruline küllastada.

2.4.2 MAGE-A valkude interaktsioonid EV-dega

Enne vastavate katsete läbi viimist kehtis hüpotees, et MAGE-A4 valk on EV-de pinnale seotud nõrkade molekulidevaheliste sidemetega (näiteks Van der Waals'i või elektromagnetilised jõud). See väide lükkus ümber, kuna valk oli endiselt detekteeritav pärast inkubatsiooni nii

tugeva ioonse jõuga lahustes kui ioonsetes ja mitteioonsetes detergentides. Seega jõuti järelduseni, et MAGE-A4 valgu ja EV-de vaheliste interaktsioonide puhul on tegemist tugevamate jõudude või keemiliste sidemetega, mida pole võimalik kergesti lõhkuda. Täpsete interaktsioonide kindlakstegemine vajab veel edasisi uuringuid. Arvatavasti võib tegu olla seni avastamata valgumodifikatsioonidega või -domeenidega. Pole välistatud, et mõni MAGE-A perekonna valkude domeenidest võib käituda transmembraanse domeeni või molekulaarse ankruna, mis hoiaks valku tugevalt partikli küljes. Samas võivad ankruna käituda ka valguhela külge liidetud kõrvalrühmad, näiteks glükoos. Siiani pole suudetud taolisi modifikatsioone MAGE-A valkude puhul täheldada, kuid nende olemasolu pole ka täielikult välistatud.

Kokkuvõte

Kui transfekteerida eükariootseid Cop5 rakke mõne MAGE-A perekonna antigeeni järjestust sisaldava plasmiidiga, on söötmes detekteeritavad ekstratsellulaarsed vesiikulid (EV), mille koostises on vastav antigeen. Töös kasutatud valgud MAGE-A4 ja MAGE-A10 lülitusid erineva suuruse ja päritoluga EV-desse ning eksponeerusid nende pinnale, kuigi algselt on tegemist vastavalt tsütoplasmaatilise või tuumse valguga. Kahe valgu käitumises oli näha teatavaid erinevusi, kuid katsetest ei selgunud, mis põhjusel antigeenid teineteisest erinevad.

Mehhanismid, kuidas MAGE-A perekonna valgud EV-de pinnale liiguvad ning kuidas need sinna kinnitunud on, jäid selgusetuks. Töö käigus tuvastati, et MAGE-A4 valku pole võimalik EV-de küljest eemaldada ei erinevate soolalahuste ega detergentidega, mistõttu võib oletada, et interaktsioonid valgu ja partikli vahel on küllalt tugevad. Vesiikuli pinnale liikumisel ja seal püsimisel on arvatavasti oma osa MAGE-A perekonna iseloomulikul domeenil MHD, kuna selle terviklikkus mõjutab MAGE-A4 valgu lülitumist EV-de koostisesse.

MAGE-A family proteins are incorporated into extracellular vesicles

Anneli Kuldkepp

Summary

Cancer/testis antigens have recently become very popular in the field of microbiology due to their immunological potential. Because of their high immunogenicity, scientists seek ways to utilise cancer/testis antigens in cancer immunotherapy. In addition, numerous efforts are made to understand their role in tumorigenesis and to make use of them as cancer biomarkers for early diagnosis and monitoring of the disease. It has come to our knowledge that cancer/testis antigens are able to exit their cell of origin and move around the organism, inducing immune responses and affecting other cells. Recently, it was discovered that cancer/testis antigens MAGE-A4 and MAGE-A10 of the MAGE-A protein family are secreted from cells via induced virus-like particles (VLP), whereas they are exposed on the surface of these particles.

In this study, we were able to show that the same proteins also exit their cells of origin via naturally occurring extracellular vesicles (EV). We discovered that the antigens are incorporated into EVs of different size and origin and were exposed on their surface, although neither of the proteins are located within the cell's plasma membrane. The two antigens showed some differences in how effectively they were incorporated into the vesicles but our data do not show why these differences occurred.

The mechanisms how MAGE-A4 and MAGE-A10 are exposed on the surface of EVs are still mostly unclear. Our findings show that it is impossible to remove the antigens from the surface using different salt and detergent solutions. This indicates that the interactions between the antigens and EVs are stronger than expected. In regard of the migration mechanisms it is possible that they involve the MAGE homology domain (MHD) because we were able to show that if the domain is not intact, the effectiveness of incorporating the antigen into the vesicles decreases.

Kasutatud kirjandus

Almeida, L.G., Sakabe, N.J., deOliveira, A. R., ... Vasconcelos, A.T. (2009). CT database: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res.* 37: D816 – D819.

Atanackovic, D., Altorki, N.K., Stockert, E., ... Gnjatic, S. (2004). Vaccine-Induced CD4+ T Cell Responses to MAGE-3 Protein in Lung Cancer Patients. *The Journal of Immunology* 172: 3289 – 3296.

Aubry, F., Satie, A.P., Rioux-Leclercq, N., Rajpert-De Meyts, E., Spagnoli, G.C., Chomez, P., De Backer, O., Jegou, B., Samson, M. (2001). MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* 92: 2778 – 2785.

Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Węglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Brański, P., ... & Zembala, M. (2006). Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55: 808 – 818.

Barker, P.A., Salehi, A. (2002). The MAGE proteins: Emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *Journal of Neuroscience Research* 67: 705 – 712.

Baroni, M., Pizzirani, C., Pinotti, M., Ferrari, D., Adinolfi, E., Calzavarini, S., Caruso, P., Bernardi, F., Di Virgilio, F. (2007). Stimulation of P2 (P2X7) receptors in human dendritic cells induces the release of tissue factor-bearing microparticles. *FASEB J* 21: 1926 – 1933.

Beyer, C., Pisetsky, D.S. (2010). The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6: 21 – 29.

Bhan, S., Chuang, A., Negi, S.S., Glazer, C.A., Califano, J.A. (2012). MAGEA4 induces growth in normal oral keratinocytes by inhibiting growth arrest and apoptosis. *Oncology Reports* 28: 1498 – 1502.

Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., Thery, C. (2011). Exosome secretion: Molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 12: 1659 – 1668.

Caballero, O.L., Chen, Y.T. (2009). Cancer/testis antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 100: 201 – 2021.

- Chin, A.R., Wang, S.E. (2016).** Cancer-derived extracellular vesicles: the ‘soil conditioner’ in breast cancer metastasis? *Cancer and Metastasis Reviews* 35: 669 – 676.
- Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T., Lucas, S. (2001).** An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.* 61: 5544 – 5551.
- Colombo, M., Raposo, G., Thery, C. (2014).** Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30: 255 – 289.
- Connor, D.E., Exner, T., Ma, D.D., Joseph, J.E. (2010).** The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb. Haemost.* 103: 1044 – 1052.
- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T.G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., Buzás, E.I., Lötvall, J. (2013).** Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles* 2: 20677 1 – 10.
- Daudi, S., Eng, K.H., Mhawech-Fauceglia, P., ... Odunsi, K. (2014).** Expression and Immune Responses to MAGE Antigens Predict Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *PLOS One* 9: e104099 1 – 10.
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., et al. (1994).** Structure, Chromosomal Localization, and Expression of 12 Genes of the MAGE Family. *Immunogenetics.* 40: 360 – 369.
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., Boon, T. (1996).** The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 7149 – 7153.
- Doyle, J.M., Gao, J., Wang, J., Yang, M., Potts, P.R. (2010).** MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Mol. Cell* 39: 963 – 974.
- Duan, Z., Duan, Y., Lamendola, D., Yusuf, R.Z., Naeem, R., Penson, R.T., Seiden, M.V. (2003).** Overexpression of MAGE/GAGE Genes in Paclitaxel/Doxorubicin resistant Human Cancer Cell Lines. *Clinical Cancer Research* 9: 2778 – 2785.
- Fischer, S., Cornils, K., Speiseder, T., Badbaran, A., Reimer, R., Indenbirken, D., Grundhoff, A., Brunswig-Spickenheier, B., Alawi, M., Lange, C. (2016).** Indication of Horizontal DNA Gene Transfer by Extracellular Vesicles. *PLOS ONE* 11: 1 – 22.

- Gjerstorff, M.F., Harkness, L., Kassem, M., Frandsen, U., Nielsen, O., Lutterodt, M., Mollgard, K., Ditzel, H.J. (2008).** Distinct GAGE and MAGE-A expression during early human development indicate specific roles in lineage differentiation. *Hum. Reprod.* 23: 2194 – 2201.
- Hagiwara, Y., Sieverling, L., Hanif, F., Anton, J., Dickinson, E. R., Bui, T. T., ... & Nikolova, P. V. (2016).** Consequences of point mutations in melanoma-associated antigen 4 (MAGE-A4) protein: Insights from structural and biophysical studies. *Scientific reports*, 6.
- Hedlund, M., Stenqvist, A.C., Nagaeva, O., Kjellberg, L., Wulff, M., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L. (2009).** Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: Evidence for immunosuppressive function. *J. Immunol.* 183: 340 – 351.
- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., Sixma, J.J. (1999).** Activated platelets release two types of membrane vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94: 3791 – 3799.
- Huang-Doran, I., Zhang, C.-Y., Vidal-Puig, A. (2017).** Feature Review: Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 28: 3 – 18.
- Hussein, Y.M., Ghareib, A.F., Mohamed, R.H., Radwan, M.I., Elsayy, W.H. (2012).** MAGE-3 and MAGE-4 genes as possible markers for early detection of metastases in hepatitis C virus Egyptian patients complicated by hepatocellular carcinoma. *Medical Oncology* 29: 994 – 999.
- Hutter, H., Dohr, G. (1998).** HLA expression on immature and mature human germ cells. *J. Reprod. Immunol.* 38: 101 – 122.
- Jungbluth, A.A., Kolb, D., Iversen, K., Coplan, K., Old, L.J., Busam, K.J., Chen, Y.T., Spagnoli, G.C. (2000).** Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *International Journal of Cancer* 85: 460 – 465.
- Kahner, B.N., Dorsam, R.T., Kunapuli, S.P. (2008).** Role of P2Y receptor subtypes in platelet-derived microparticle generation. *Front. Biosci.* 13: 433 – 439.
- Kurg, R., Reinsalu, O., Jagur, S., Õunap, K., Võsa, L., Kasvandik, S., Padari, K., Gildemann, K., Ustav, M. (2016).** Biochemical and proteomic characterization of retrovirus Gag based microparticles carrying melanoma antigens. *Scientific Reports* 6: 29425 1 – 11.

- 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: 4340 – 4350.
- Meek, D.W., Marcar, L. (2012).** Mini-review: MAGE-A antigens as targets in tumor therapy. *Cancer Letters* 324: 126 – 132.
- Monte, M., Simonatto, M., Peche, L.Y., Bublik, D.R., Gobessi, S., Pierotti, M.A., Rodolfo, M., Schneider, C. (2006).** MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *PNAS* 103: 11160 – 11165.
- Nagao, T., Higashitsuji, H., Nonoguchi, K., Sakurai, T., Dawson, S., Mayer, R.J., Itoh, K., Fujita, J. (2003).** MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *Journal of Biological Chemistry* 278: 10668 – 10674.
- Nelson, P.T., Zhang, P.J., Spagnoli, G.C., Tomaszewski, J.E., Pasha, T.E., Frosina, D., Cabarello, O.L., Simpson, A.J.G., Old, L.J., Jungbluth, A.A. (2007).** Cancer/testis (CT) antigens are expressed in fetal ovary. *Cancer Immunity Archive* 7: 1 – 8.
- Potolicchio, I., Carven, G.J., Xu, X., Stipp, C., Riese, R.J., Stern, L.J., Santambrogio, L. (2005).** Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: Metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J. Immunol.* 175: 2237 – 2243.
- Rimoldi, D., Salvi, S., Reed, D., Coulie, P., De Plaen, E., Brasseur, F., Rodriguez, A.-M., Boon, T., Cerottini, J.-C. (1999).** cDNA and protein characterization of human MAGE-10. *International Journal of Cancer* 82: 901 – 907.
- Saito, T., Wada, H., Yamasaki, M., Miyata, H., Nishikawa, H., Sato, E., Kageyama, S., Shiku, H., Mori, M., 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: 5901 – 5907.
- Sang, M., Wang, L., Ding, C., Zhou, X., Wang, B., Wang, L., Lian, Y., Shan, B. (2011).** Mini-review: Melanoma-associated antigens – An update. *Cancer Letters* 302: 85 – 90.
- Sang, M., Wu, X., Fan, X., Sang, M., Zhou, X., Zhou, N. (2014).** Multiple MAGE-A genes as surveillance marker for the detection of circulating tumor cells in patients with ovarian cancer. *Biomarkers* 19: 34 – 42.

- Saraste, A., Pulkki, K. (2000).** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovasc. Res.* 45: 528 – 537.
- Simpson, A.J., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.T., Old, L.J. (2005).** Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 5: 615 – 625.
- Skog, J., Würdinger, T., Van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Curry, W. T., ... & Breakefield, X. O. (2008).** Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*, 10: 1470 – 1476.
- Slingluff, C.L., Petroni, G.R., Chianese-Bullock, K.A., ... Rehm, P.K. (2007).** Immunologic and Clinical Outcomes of a Randomized Phase II Trial of Two Multi-peptide Vaccines for Melanoma in the Adjuvant Setting. *Clinical Cancer Research* 13: 6386 – 6395.
- Smalley, D.M., Sheman, N.E., Nelson, K., Theodorescu, D. (2008).** Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J. Proteome. Res.* 7: 2088 – 2096.
- Zaborowski, M.P., Balaj, L., Breakefield, X.O., Lai, C.P. (2015).** Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience* 65: 783 – 797.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., Lotvall, J.O. (2007).** Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell. Biol.* 9: 654 – 659.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T. (1991).** A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643 – 1647.
- Weber, J., Salgaller, M., Samid, D., Johnson, B., Herlyn, M., Lassam, N., Treisman, J., Rosenberg, S.A. (1994).** Expression of the MAGE-1 Tumor Antigen Is Up-Regulated by the Demethylating Agent 5-Aza-2'-Deoxycytidine. *Cancer Research* 54: 1766 – 1771.
- Xiang, X., Poliakov, A., Liu, C., Liu, Y., Deng, Z. B., Wang, J., ... & Grizzle, W. E. (2009).** Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *International journal of cancer*, 124: 2621 – 2633.
- Yang, I., Han, S.J., Kaur, G., Crane, C., Parsa, A.T. (2010).** The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J. Clin. Neurosci.* 17: 6 – 10.

Yu, S., Liu, C., Su, K., Wang, J., Liu, Y., Zhang, L., ... & Falkson, C. (2007). Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells. *The Journal of Immunology*, *178*: 6867 – 6875.

Kasutatud veebileheküljed

CTdatabase <http://www.cta.lncc.br/> Viimati vaadatud 03.03.2017 kell 10.47

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anneli Kuldkepp

(sünnikuupäev: 07.03.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „MAGE-A perekonna valgud lülitatakse ekstratsellulaarsete vesiikulite koostisesse“, mille juhendaja on *PhD* Reet Kurg,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.2017