

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TEHNOLOOGIAINSTITUUT

**Vähi-testise antigeeni MAGE-A10 iseloomustamine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Lisbeth Verk

Juhendaja prof Reet Kurg

Kaasjuhendaja PhD Margit Mutso

TARTU 2023

## **INFOLEHT**

### **Vähi-testise antigeeni MAGE-A10 iseloomustamine**

Vähi-testise antigeenid on potentsiaalsed vähivaktsiini sihtmärgid ja diagnostilised markerid vähi varajaseks avastamiseks. Üks enim uuritud vähi-testise antigeene on MAGE-A valguperekond, mille üks immunogeensemaid liikmeid on MAGE-A10. MAGE-A10 lokaliseerub rakutuumas, aga valgu täpne bioloogiline roll pole teada. Ühtlasi on MAGE-A10 puhul täheldatud ootuspärasest aeglasemat liikuvust SDS-PAGE geelelektroforeesil. Käesoleva töö eesmärkideks on iseloomustada MAGE-A10 N-terminuses paiknevate aminohappeliste asenduste mõju MAGE-A10 liikuvusele SDS-PAGE geelelektroforeesil ja rakulisele lokalisatsioonile.

Märksõnad: Vähi-testise antigeen, MAGE-A, MAGE-A10

CERCS: T490 Biotehnoloogia, P310 Proteiinid, ensümoloogia

### **Characterisation of cancer-testis antigen MAGE-A10**

Cancer-testis antigens are potential targets for cancer vaccines and diagnostical tools for early cancer diagnosis. MAGE-A10 is the most immunogenic member of one of the most studied cancer-testis antigens of the MAGE-A family. MAGE-A10 localises in the cell nucleus, but its biological role is not known. It has also been shown that MAGE-A10 has an anomalous migration in SDS-PAGE. The thesis aims to characterise MAGE-A10 N-terminal amino acids' role in migration in SDS-PAGE and cellular localisation.

Keywords: Cancer-testis antigen, MAGE-A, MAGE-A10

CERCS: T490 Biotechnology, P310 Proteins, enzymology

# SISUKORD

|   |           |
|---|-----------|
| <b>SISUKORD</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>SISSEJUHATUS</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>1.1. MAGE antigeenid</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>1.2. MAGE-A valguperekond</b> .....  | <b>7</b>  |
| 1.2.1. MAGE-A10 .....   | 8         |
| <b>1.3. Valkude transport tuuma</b> .....                                     | <b>9</b>  |
| 1.3.1. Tuuma lokaliseerimise signaal.....                                     | 10        |
| <b>1.4. Sisemiselt struktureeritud valgud</b> .....                           | <b>11</b> |
| <b>1.5. Valkude post-translatsioonilised modifikatsioonid</b> .....           | <b>12</b> |
| <b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>2.1. Töö eesmärgid</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>2.2. Materjal ja meetodika</b> .....                                       | <b>15</b> |
| 2.2.1. Kasutatud rakuliinid .....   | 15        |
| 2.2.2. Plasmidide konstrueerimine PIPE PCR meetodiga .....                    | 15        |
| 2.2.3. DNA elektroporatsioon .....  | 16        |
| 2.2.4. <i>Western blot</i> analüüs .....                                      | 17        |
| 2.2.5. Immunofluorestsentsanalüüs .....                                       | 18        |
| <b>2.3. Tulemused ja arutelu</b> .....  | <b>20</b> |
| 2.3.1. Mutantseid MAGE-A10 valke kodeerivate plasmidide genereerimine .....   | 20        |
| 2.3.2. Mutatsioonide mõju MAGE-A10 valgu liikuvusele SDS-PAGE-il .....        | 23        |
| 2.3.3. Mutatsioonide mõju MAGE-A10 1-120 deletandis .....                     | 25        |
| 2.3.4. Mutatsioonide mõju MAGE-A10 1-14 deletandis .....                      | 27        |
| 2.3.6. Mutatsioonide mõju MAGE-A10 lokaliseerimisele Cop5 rakkudes .....      | 29        |
| 2.3.7. Mutatsioonide mõju MAGE-A10 1-120 lokaliseerimisele Cop5 rakkudes..... | 31        |
| <b>KOKKUVÕTE</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>SUMMARY</b> .....  | <b>34</b> |
| <b>TÄNUSÕNAD</b> .....  | <b>36</b> |
| <b>KIRJANDUSE LOETELU</b> .....   | <b>37</b> |
| <b>KASUTATUD VEEBIAADRESSID</b> .....   | <b>44</b> |
| <b>LISAD</b> .....  | <b>45</b> |
| Lisa 1. Plasmidide genereerimiseks kasutatud praimerid .....                  | 45        |
| Lisa 2. MAGE-A perekonna valkude joondus.....                                 | 47        |
| <b>LIHTLITSENTS</b> .....   | <b>49</b> |

## KASUTATUD LÜHENDID

CTA – vähi-testise antigeen

DTT – ditiotreitool

IDP – sisemiselt struktuuritu valk

IDR – sisemiselt struktuuritu valguregioon

MAGE – melanoomi-seoseline antigeen

MHD – MAGE homoloogne domeen

NLS – tuuma lokalisatsiooni signaal

NPC – tuuma poori kompleks

PIPE PCR – *polymerase incomplete primer extension* PCR

## SISSEJUHATUS

Vähi-testise antigeenid on oma immunogeensuse ja piiratud ekspressioonimustri tõttu potentsiaalseteks vähivaktsiini sihtmärkideks ja diagnostilisteks markeriteks vähi varajasel avastamisel. Üks enim uuritud vähi-testise antigeene on MAGE-A valguperekond. Käesolevas töös uuritakse MAGE-A valguperekonda kuuluvat antigeeni MAGE-A10, mis ekspresseerub mitmetes erinevates vähitüüpides.

MAGE-A10 valgu, nagu ka teiste MAGE-A perekonna esindajate täpne bioloogiline funktsioon pole veel teada. MAGE-A10 on 369 aminohappe pikkune valk, mille C-terminuse lähedal paikneb 170 aminohappe pikkune MAGE homologne domeen, mis on omane kõigile MAGE perekonna valkudele. Ülejäänud osale valgust ühtegi struktuuri ennustatud pole. MAGE-A10 puhul on täheldatud ebatavalist liikuvust SDS-PAGE geelelektroforeesil, mistõttu on valgu katseline molekulmass oluliselt suurem arvutuslikust molekulmassist. Põhjust sellele ei teata. Lisaks eristab MAGE-A10 valku enamikest teistest MAGE-A perekonna valkudest see, et MAGE-A10 lokaliseerub rakutuumas, samas kui enamused teised MAGE-A perekonna esindajad lokaliseeruvad tsütoplasmas. Täpseid mehhanisme, kuidas MAGE-A10 tuuma transporditakse, kirjeldatud pole.

Uurimisgrupis varasemalt saadud avaldamata tulemused näitavad, et MAGE-A10 ebatavalises liikumises SDS-PAGE-il mängib olulist rolli N-terminaalne osa, täpsemalt esimesed 120 aminohapet, ning kõige rohkem mõjutavad liikuvust esimesed 15 aminohapet. Ühtlasi näitavad uurimisgrupis varasemalt läbiviidud katsed, et ka MAGE-A10 lokaliseerumise eest vastutab valgu N-terminus. Seega on antud uurimistöö põhieesmärkideks analüüsida, milline roll on MAGE-A10 N-terminusel valgu ebatavalises liikuvuses SDS-PAGE-il ja rakulises lokaliseerumises.

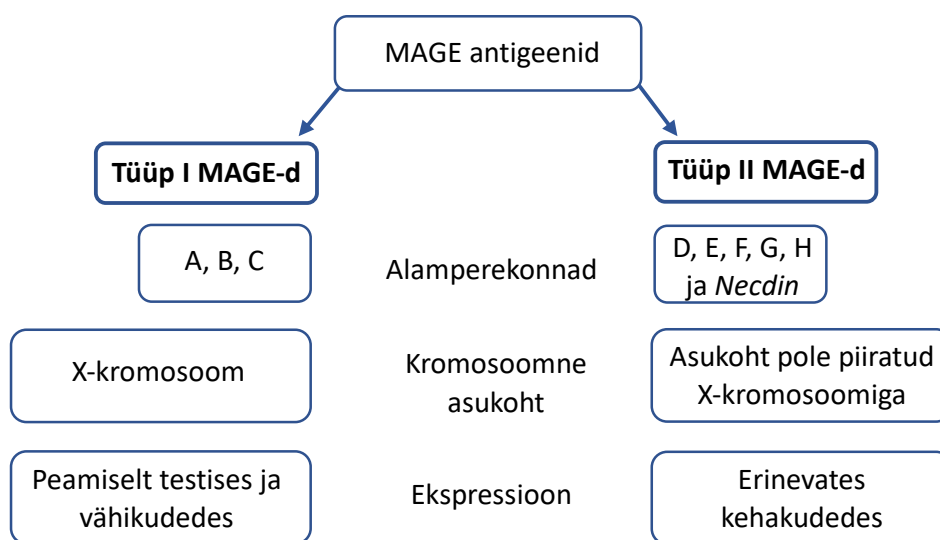
Uurimistöö valmis Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. MAGE antigeenid

Esimese MAGE (melanoomi-seoseline antigeen) geeni ja selle poolt kodeeritava antigeeni MAGE-A1 (varasemalt MZ2-E, MAGE1) avastasid van der Bruggen jt melanoomirakkudes (1991). See oli ühtlasi ka esimene kirjeldatud vähi-testise antigeen (CTA). Hiljem on teiste MAGE valkude ekspressiooni täheldatud veel soole-, aju-, eesnäärme-, rinnavähis ja mitmetes muudes vähitüüpides (Weon ja Potts, 2015).

Inimese MAGE perekonna valgud jagatakse nende ekspressioonimustri alusel kahte suuremasse gruppi: tüüp I MAGE valgud ja tüüp II MAGE valgud (Joonis 1). Tüüp I MAGE valkude geenid paiknevad X-kromosoomil ning nende hulka kuuluvad alamperekonnad MAGE-A, -B ja -C. Tüüp I MAGE valgud on oma olemuselt CTA-d. (Weon ja Potts, 2015) CTA-d ekspresseeruvad erinevates vähitüüpides ja normaalses koes ainult testise idurakkudes või naise reproduktiivorganites (Zendman jt, 2003). Tüüp II MAGE-de grupi moodustavad alamperekonnad MAGE-D, -E, -F, -G, -H ja -L ning *Necdin*. Erinevalt tüüp I MAGE-dest ekspresseeruvad tüüp II valgud mitmetes kehakudedes ning nende geenid ei asu ainult X-kromosoomil (Weon ja Potts, 2015).



Joonis 1. MAGE valkude klassifikatsioon.

MAGE valguperekonda kuuluvaid valke ühendab MAGE homoloogne domeen (MHD) (Weon ja Potts, 2015). MHD domeen on umbes 200 aminohappe pikkune ja paikneb enamasti valgu C-terminuse lähedal (Joonis 2). Ülejäänud valgujärjestus, eriti N-terminus, erineb

alamperekonni tugevalt, mis võib viidata MAGE perekonna valkude erinevatele funktsioonidele. (Chomez jt, 2001; Meek ja Marcar, 2012)

MAGE valkude ekspressiooni on täheldatud peamiselt vähirakkudes, mis on omandanud pahaloomulise fenotüübi ning on leitud, et MAGE valkude tugev ekspressioon mõjutab ka vähiravi edukust (Simpson jt, 2005). MAGE valkude ekspressiooni regulatsiooni täpne mehhanism on veel teadmata, aga on leitud, et MAGE geenide transkriptsiooni aktivatsioonil võivad rolli mängida promootorala metüülimine ja histoonide deatsetüülimine ning ekspressiooni mõjutavad ka post-transkriptsioonilised mehhanismid (Sang jt, 2011). Oma immunogeensuse ja piiratud ekspressiooni tõttu tavalises koes, aga laialdase ekspressiooni tõttu erinevates vähitüüpides, on CTA-d, sh MAGE valgud potentsiaalseteks diagnostilisteks markeriteks ja vähivaktsiini sihtmärkideks (Simpson jt, 2005).

## **1.2. MAGE-A valguperekond**

Üks enim uuritud CTA-sid on MAGE alamperekond MAGE-A. Valguperekonda kuulub 12 valku (MAGE-A1 – MAGE-A12) ning kõik 12 MAGE-A geeni paiknevad X-kromosoomil Xq28 regioonis (De Plaen jt, 1994; Wang jt, 1994). MAGE-A geenid ekspresseeruvad mitmetes vähitüüpides, näiteks leukeemia, melanoom, soole-, kopsu- ja rinnavähk. Kusjuures vähirakkudele on omane kahe või enama MAGE-A valgu või mõne muu CTA koekspressioon (Meek & Marcar, 2012). Normaalses koes MAGE-A valgud ei ekspresseeru, välja arvatud testises ning MAGE-A3, -A4 ja -A8–A11 puhul ka platsentas (De Plaen jt, 1994; van der Bruggen jt, 1991). MAGE-A-de ekspressiooni on täheldatud ka inimese varajases arengus loote staadiumis, kus need võivad rolli mängida kesknärvisüsteemi arengus (Gjerstorff jt, 2008).

Nagu kõikidele MAGE perekonna valkudele omane, sisaldavad MAGE-A valgud MHD domeeni. MAGE-A valkudest moodustab MHD umbes 70%, mis viitab nende ühisele struktuurile ja funktsioonile. Üldiselt on MAGE-A valgud omavahel sarnased ka MHD domeenist väljapoole jäävate alade poolest, kuid kõige rohkem erinevad ülejäänud perekonnast MAGE-A5, MAGE-A10 ja MAGE-A11. (Meek ja Marcar, 2012) MAGE-A7 ekspressiooni pole täheldatud, mistõttu peetakse seda pseudogeeniks (De Plaen jt, 1994).

MAGE-A valkude bioloogiline funktsioon ei ole veel teada, kuid praegused uuringud on keskendunud põhiliselt nende rollile vähi arengus. On leitud, et MAGE-A valkude ülekspressioon suurendab rakkude proliferatsiooni, mõjutades nii vähi arengut (Colemon jt, 2020). Samuti on uuritud MAGE-A valkude mõju kemoterapia edukusele. Näiteks on Colemon jt näidanud, et lisades rakkudele kemoterapilist agendi 5-fluorouratsiili või DNA-d kahjustavat agendi naatriumarseniiti, suurendab MAGE-A5 või MAGE-A10 ekspressioon rakkude ellujäämist (2020). Sellest järeldasid autorid, et MAGE-A valgud võivad suurendada raku vastupanu väliste stressoritele. Lisaks on mitme MAGE valguga puhul näidatud nende seondumist E3 RING ubikvitiinliigaasidega, moodustades MAGE-RING komplekse, ning reguleerides seeläbi liigaaside aktiivsust, määratledes neile uusi substraate ning muutes nende lokaliseerimist rakkudes (Lee ja Potts, 2017). Näiteks MAGE-A2, -A3 ja -A6 puhul on näidatud nende seondumist E3 ubikvitiin-liigaas TRIM28-ga (ka KAP1), mis osaleb transkriptsiooni regulatsioonil, rakkude diferentseerumisel ja DNA parandamisel (Doyle jt, 2010; Yang jt, 2007). Lisaks on leitud, et MAGE-A1 ja MAGE-A2 interakteeruvad histoonide deatsetülaasidega ja represserivad nii transkriptsiooni (Laduron jt, 2004; Monte jt, 2006).

### 1.2.1. MAGE-A10

MAGE-A10 on 369 aminohappe pikkune valk, arvutusliku molekulmassiga 41 kDa (Barker ja Salehi, 2002). Nagu kõik MAGE valgud, sisaldab ka MAGE-A10 MHD domeeni, aga ülejäänud osale valgust teadaolevaid struktuure ennustatud ei ole (vt Joonis 2). Valgu puhul on täheldatud ootuspärasest aeglasemat liikuvust SDS-PAGE geelelektroforeesil ning katseliselt saadud molekulmass on 72 kDa. MAGE-A10 paikneb tuumas, aga mitte tuumakestes. Seevastu enamused teised MAGE-A valgud paiknevad tsütoplasmas. (Rimoldi jt, 1999)



#### Joonis 2. MAGE-A10 struktuur.

MAGE-A10 koos MAGE-A11-ga eristuvad ülejäänud perekonnast veel seetõttu, et need valgud sisaldavad lisajärjestusi ehk inserte. MAGE-A10 puhul on N-terminuses 21 aminohappejäägi pikkune insert peale 37. aminohappejäägi ning 27 aminohappejäägi pikkune insert C-

terminuses. MAGE-A11 sisaldab 110 aminohappejäägi pikkust inserti valgus N-terminuses (vt Lisa 1). (Meek ja Marcar, 2012)

MAGE-A10 ekspresseerub normaalses koes ainult testises ja platsentas. Testises ekspresseerub MAGE-A10 spermatogoonides ja spermatotsüütides. Vähirakkude puhul on täheldatud tugevat ekspressiooni kopsu-, naha- ja uroteriaalsetes vähis. (Schultz-Thater jt, 2011) Vähirakkudes ekspresseerub MAGE-A10 sagedasti koos MAGE-A1-ga (Rimoldi jt, 1999).

MAGE-A10 on MAGE-A perekonna üks immunogeensemärgkeid, mistõttu on see potentsiaalseks sihtmärgiks vähi immunoteraapiates. MAGE-A10 ekspressioon võib olla abiks ka vähi prognoosi ennustamisel. On leitud korrelatsioon MAGE-A10 antigeeni ekspressiooni ja halva prognoosi vahel munasarjavähi puhul (Daudi jt, 2014).

### **1.3. Valkude transport tuuma**

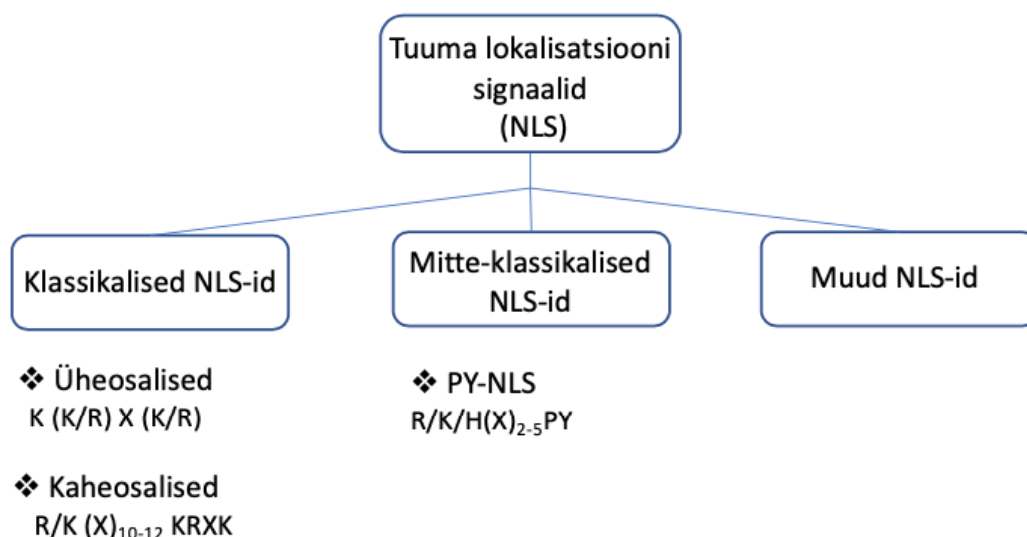
Eukarüootsetes rakkudes paikneb geneetiline materjal tuumas, mis on tsütoplasmast eraldatud kahekihilise membraaniga. Geneetilise materjali pakkimise, paljundamise ja ekspressiooni regulatsiooniga seotud valgud, näiteks histoonid ja transkriptsioonifaktorid, sünteesitakse aga tsütoplasmas, mistõttu on vajadus spetsiaalsete transpordimehhanismide järele, mis vahendavad valkude transporti tuuma. Molekulide transport tuuma ja tsütoplasma vahel toimub läbi tuuma poori komplekside (NPC), kusjuures transport läbi NPC-de on mõlemasuunaline ning transporditakse nii RNA-sid kui ka valke (Dworetzky ja Feldherr, 1988). NPC-d koosnevad nukleoporiinidest ning moodustavad kanali läbi mõlema tuumamembraani kihi (Hampoelz jt, 2019).

Molekulide transport läbi NPC-de võib toimuda passiivse või vahendatud difusiooni teel. Passiivse difusiooniga võivad liikuda NPC-dest läbi molekulid suurusega kuni 9 nm, kuigi 9 nm suuruste molekulide puhul on selline transpordiviis juba üsnagi väheefektiivne ning isegi väikeseid molekule nagu histoonid ja tRNA-d transporditakse pigem aktiivse transpordi teel (Paine jt, 1975). Aktiivne transport on rangelt reguleeritud ning selle toimumiseks on vaja signaaljärjestusi ning kandja-molekule. Transporti tuuma vahendavad spetsiaalsed tuuma transportervalgud – importiinid (ka karüoferiinid), mis interakteeruvad nii transporditava valguga läbi valgus sisalduvate signaaljärjestuste kui ka tuuma poori kompleksi nukleoporiinidega (Radu jt, 1995). Energia aktiivseks transpordiks tuleb Ras perekonna

GTPaasidelt, mis töötavad kui lülitid ning võimaldavad siduda ja vabastada transporditavaid molekule importiinidelt (Moore ja Blobel, 1993). Valkude signaaljärjestus mõjutab seda, kui tugevalt transporditav valk ja importiin omavahel seonduvad, mis omakorda mõjutab transpordi efektiivsust. Mida tugevam on afiinsus transporditava valgu signaaljärjestuse ja importiini vahel, seda suurema efektiivsusega transporditakse valk tuuma (Fanara jt, 2000).

### 1.3.1. Tuuma lokaliseerimise signaal

Tuuma transporditavatel valkudel peab olema tuuma lokaliseerimise signaal (NLS), mille tunnevad ära importiinid. Vastavalt signaaljärjestuse aminohappelisele koostisele jagatakse NLS-id klassikaliseks NLS-ideks, mitte-klassikaliseks NLS-ideks ja NLS-ideks, mis ei kuulu kummassegi gruppi (Joonis 3) (Lu jt, 2021).



Joonis 3. Tuuma lokaliseerimise signaalide (NLS) klassifikatsioon.

Klassikalised tuumalokaliseerimise signaalid (cNLS) jagatakse kahte kategooriasse – üheosalised (ingl *monopartite*) ja kaheosalised (ingl *bipartite*) signaalid. Üheosalised NLS-id kujutavad endast ühte klastrit, milles on neli kuni kaheksa aluselist aminohapet ning millest üldiselt neli või rohkem on positiivselt laetud aminohapped nagu arginiin või lüsiin. Üheosaline NLS järjestus on väljendatav kui K (K/R) X (K/R), kus X on suvaline aminohape (Kalderon jt, 1984a; Kalderon jt, 1984b). Kaheosalistel NLS-idel on kaks domeeni, mis sisaldavad aluselisi aminohappeid ning nende vahel on kümne aminohappe pikkune linker-regioon. Kaheosaline NLS järjestus on väljendatav kui R/K (X)<sub>10-12</sub> KRXX. Kaheosalise NLS järjestuse mõlemad

domeenid on vastastikku sõltuvad ning valgu õigeks lokaliseerumiseks on vaja mõlemat. (Robbins jt, 1991)

Mitte-klassikalised tuumalokalisatsiooni signaalid (ncNLS) ei sisalda proliini ja arginiini rikast konsensusjärjestust. ncNLS-e võib olla erinevaid, aga kõige enam uuritud grupi moodustavad proliin-türosiin tüüpi NLS-id (PY-NLS). PY-NLS-id koosnevad 20–30 aminohappest, sisaldavad N-terminaalseid hüdrofoobseid või aluselisi motiive ning C-terminaalseid R/K/H(X)<sub>2-5</sub>PY motiive (Lange jt, 2008).

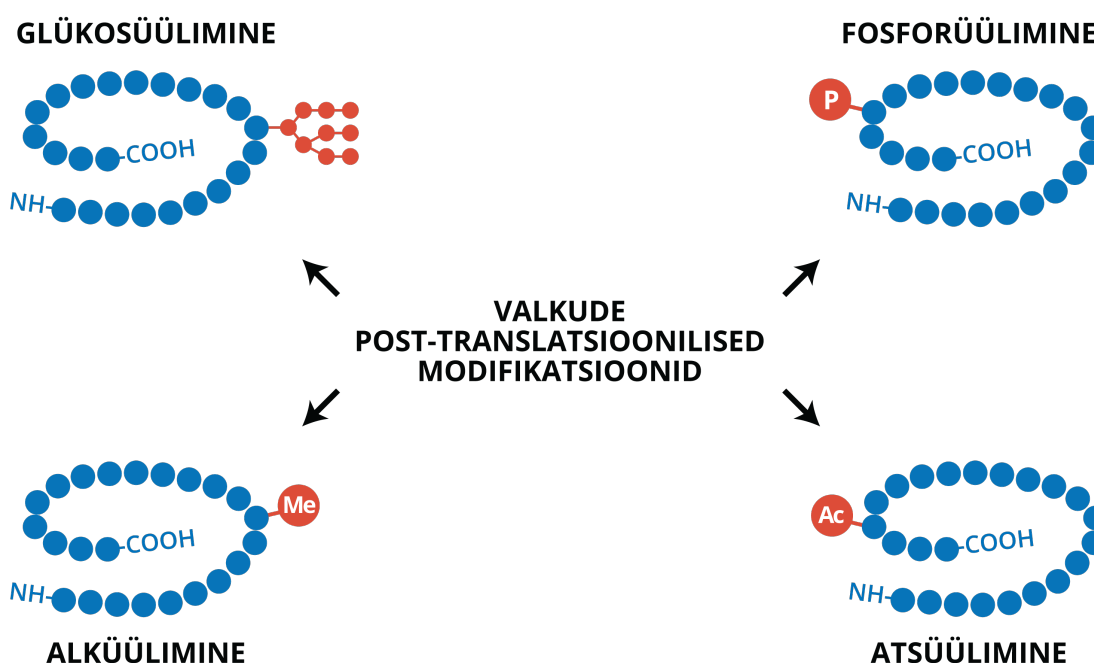
#### **1.4. Sisemiselt struktuuritud valgud**

Hinnanguliselt on rohkem kui 90% CTA-dest sisemiselt struktuuritud valgud (IDP, ingl *Intrinsically Disordered Proteins*) (Rajagopalan jt, 2011). IDP-del puudub kindel 3D struktuur, kuid need omavad siiski mitmeid bioloogilisi funktsioone (Uversky ja Dunker, 2010). IDP-d võivad olla täies ulatuses struktuuritud või sisaldada sisemiselt struktuuritud valguregioone (IDR, ingl *Intrinsically Disordered Regions*) (van der Lee jt, 2014). Bioinformaatiliste tööde põhjal hinnatakse, et kuni kolmandik eukarüootsetest valkudest on suures ulatuses struktuuritud (Oldfield jt, 2005). Valgu paindlik struktuur võimaldab interaktsioone mitmete erinevate molekulidega ning valgu efektiivsemat regulatsiooni läbi kiire degradatsiooni või post-translatsiooniliste modifikatsioonide (Uversky ja Dunker, 2010).

IDR-id ei moodusta hästi organiseeritud struktuure, sest nende aminohappelises koosseisus enamasti puuduvad suurte kõrvalahelatega hüdrofoobsed aminohapped, mistõttu ei saa moodustuda struktureeritud valgudomeenidele omane tugeva struktuuriga keskosa (Uversky jt, 2000). Struktureeritud ja struktureerimata valgudomeenide aminohappelise järjestuse võrdlemisel on leitud, et struktureerimata regioonidest leiab enim metioniini,alaniini, arginiini, glutamiini, seriini, proliini, glutamaati ja lüsiini. Samuti on leitud, et struktureerimata regioonides on aminohappeline mitmekesisus väiksem. (Romero jt, 2001)

## 1.5. Valkude post-translatsioonilised modifikatsioonid

Üks viis geeniekspressiooni regulatsiooniks on valkude post-translatsiooniline modifitseerimine, kus ensüümide kaasabil modifitseeritakse aminohapete kõrvalahelaid või peptiididemes osalevaid aatomeid. Üldiselt võib post-translatsioonilised modifikatsioonid jagatada kahte kategooriasse: ensüümide katalüüsitud keemiliste rühmade kovalentne lisamine aminohapete kõrvalahelatele ja polüpeptiidahela lõikamine nii proteaaside osalusel kui ka autokatalüütiliselt (Walsh jt, 2005). Kõige levinumad kovalentsed modifikatsioonid on fosforüülimine, atsüülimine, alküülimine ja glükosüülimine (Joonis 4). Kõiki modifikatsioone viivad läbi spetsiifilised ensüümid.



Joonis 4. Valkude levinumad post-translatsioonilised modifikatsioonid.

Fosforüülimisel lisatakse aminohappejäägile fosfaatrühm ja reaktsiooni viivad läbi kinaasid. Imetajates toimub fosforüülimine aminohappejääkides seriin, treoniin ja türosiin. (Ubersax ja Ferrell Jr, 2007) Polüpeptiidahelale laetud fosfaatrühma lisamine põhjustab valgus konformatsioonilisi muutusi, mistõttu on fosfaatrühmade lisamine aktivaatoriks erinevates signaaliradades, samuti on fosforüülimine oluline ka näiteks transpordi ja geenide transkriptsiooni regulatsioonil (Johnson ja Lewis, 2001).

Atsüülimise puhul lisavad atsüültransferaasid valkudele atsüülrühma, mille doonoriks on atsüül-CoA. Atsüülrühmaks võivad olla näiteks lühikese ahelaga hüdrofoobsed atsetüül- ja krotonüülrühm, pika ahelaga rasvhapped müristoüül- ja palmitoüülrühm või negatiivse

laenguga suktsinüül- ja malonüülrühmad. Lühikeste ahelate liitmine toimub enamasti lüsiinijääkidele, rasvhappe ahelaid liidetakse enamasti glütsiini-, lüsiini-, tsüsteiini- ja seriinijääkidele. (Shang jt, 2022)

Alküülimine kujutab endast metüülrühma (C1) või isoprenüülrühmade C15 ja C20 lisamist valkudele (Walsh jt, 2005). Atsüülrühmad muudavad valgud hüdrofoobsemaks. Kõige enamlevinud metülatsiooniks on N-metülatsioon, mis tähendab, et metüülrühm lisatakse lämmastikuaatomile. Näiteks histooni sabades toimub N-metüülimine lüsiini- ja arginiinijääkides. Metüülrühmade lisamist viivad läbi metüültransferaasid, kusjuures enamus neist lisavad metüülrühmi ainult spetsiifilistele aminohappejääkidele. (Marmorstein, 2001)

Glükosüülimisest esineb peamiselt N- ja O-glükosüülimist, kus suhkrujääke lisatakse vastavalt hapniku- või lämmastikuaatomitele. Kusjuures eukarüootsetes rakkudes on N-glükosüülrühmad pikemad ja keerulisemad kui O-glükosüülrühmad (Walsh jt, 2005). Glükoproteiinide puhul võib oligosahhariidi molekulaarne suurus olla võrreldav proteiini enda suurusega (Van den Steen jt, 1998).

N-glükosüülimine on eukarüootides enamlevinud valkude modifitseerimise tüüp, kus oligosahhariidid lisatakse valitud asparagiinijääkidele. Oligosahhariidi ja asparagiini kõrvalahela vahel katalüüsib N-glükosiidsideme teket oligosahharüültransferaas (Aebi, 2013). Oligosahhariid lisatakse asparagiinile, mis asub konsensusjärjestuses N-!P-S/T -!P (kus !P ei ole proliin). Harva on kasutusel konsensusjärjestus N-X-C. N-glükosüülimise saidid asuvad enamasti valgu lingu-struktuurides (Zielinska, 2010).

O-glükosüülimine toimub seriini-, treoniini-, türosiini-, hüdroksüproliini- ja hüdroksülüsiinijääkides. Transferaasid liidavad aminohappejäägile aktiveeritud monosahhariidi, millele võidakse lisada järgnevad sahhariidid ning moodustuvad oligosahhariidid. (Spiro, 2002)

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Vähi-testise antigeeni MAGE-A10 puhul on täheldatud ootuspärasest aeglasemat liikuvust SDS-PAGE geelelektroforeesil ning prof Reet Kure uurimisgrupis varasemalt läbiviidud katsete avaldamata tulemused näitavad, et valgu ebatavalise liikuvuse eest vastutab valgu N-terminaalne osa, esimesed 120 aminohapet, ning kõige rohkem mõjutavad MAGE-A10 liikuvust esimesed 15 aminohapet. MAGE-A10 1-120 osale ühtegi domeeni ega struktuuri ennustatud pole ja seega on eeldatavalt tegu IDR-iga.

Teine huvitav asjaolu, mis eristab MAGE-A10 valku teistest MAGE-A perekonna valkudest on see, et eksogeenne MAGE-A10 lokaliseerub rakutuumas, samas kui enamused teised MAGE-A valgud lokaliseeruvad tsütoplasmas. Kindlat NLS-i MAGE-A10 puhul kirjeldatud pole. Uurimisgrupis varasemalt saadud avaldamata tulemused näitavad, et kui deleteerida MAGE-A10 esimesed 15 aminohapet, siis valk lokaliseerub lisaks tuumale ka tsütoplasmas.

Käesolevas töös keskendutakse MAGE-A10 N-terminuses paiknevate aminohapete rollile valgu ebatavalises liikuvuses SDS-PAGE-il ja lokalisatsioonis. Konkreetsemalt keskendutakse positsioonidel 1-15 paiknevatele laetud kõrvalahelaga aminohapetele ja aminohapetele, mis on olulised valgu struktuuri moodustumisel.

Käesoleva töö eesmärkideks on:

- 1) iseloomustada N-terminuses paiknevate aminohappeliste asenduste mõju MAGE-A10 liikuvusele SDS-PAGE-il nii täispika valgu kui IDR-i kontekstis
- 2) iseloomustada N-terminuses paiknevate aminohappeliste asenduste mõju MAGE-A10 rakulisele lokalisatsioonile

## 2.2. Materjal ja meetodika

### 2.2.1. Kasutatud rakuliinid

Uurimistöö teostamisel kasutati rakuliini Cop5-EBNA, mis on hiire fibroblasti rakud, milles ekspresseeritakse Epstein-Barr'i viiruse tuumaantigeeni. Rakke kasvatati IMDM söötmes (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), kuhu oli lisatud 10% veise loote seerumit (FCS) ning antibiootikume penitsilliin (100 U/ml) ja streptomütsiin (100 ng/ml) (*Sigma*). Rakke kasvatati 37 °C inkubaatoris 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas (*Panasonic MCO-19AICUV-PE*).

### 2.2.2. Plasmiidide konstrueerimine PIPE PCR meetodiga

Plasmiidid konstrueeriti kasutades PIPE (ingl *polymerase incomplete primer extension*) PCR meetodit koht-spetsiifiliste mutatsioonide tegemiseks MAGE-10 N-terminuses (Klock ja Lesley, 2009). Plasmiidid valmisid uurimisgrupi ühise töö tulemusena.

PCR viidi läbi kasutades Phusion High-Fidelity DNA polümeraasi (*Thermo Scientific*) vastavalt tootja protokollile. PCR-i reaktsioonisegu tegemiseks kasutati: 10,8 µl mQ vett, 4 µl puhvrit (5x Phusion HF Buffer), 2 µl 2 µM dNTP segu, 1 µl 10 µM praimereid (Lisa 1), 1 µl *Phusion* polümeraasi ja ~5 ng DNA matriitsi. Matriitsidena kasutati plasmiide pQM MAGE-A10 E2Tag, pQM MAGE-A10 1-120 EGFP või p-1-15-GFP (*TÜ Tehnoloogiainstituut*). pQM MAGE-A10 P5/K6/R7A plasmiidi puhul oli matriitsiks juba valminud plasmiid pQM MAGE-A10 K6/R7A ning pQM MAGE-A10 P5/K6/R7A oli omakorda matriitsiks plasmiidi pQM P2/R3/P5/K6/R7A tegemisel.

PCR reaktsiooni läbiviimiseks kasutati järgmist programmi:

|     |   |       |            |
|-----|---|-------|------------|
| 1x  | { | 98 °C | 30 s       |
| 4x  | { | 98 °C | 10 s       |
|     |   | 50 °C | 15 s       |
|     |   | 72 °C | 1 min 30 s |
| 30x | { | 98 °C | 10 s       |
|     |   | 72 °C | 15 s       |
|     |   | 72 °C | 1 min 30 s |
| 1x  | { | 72 °C | 10 min     |
|     |   | 15 °C | ∞          |

Järgnevalt tehti PCR-i produktidele DpnI töötlus, et eemaldada segust matriits DNA. Selleks segati PCR-i segusse 2 µl puhvrit (10x FD Buffer, *Thermo Scientific*) ja 0,5 µl DpnI ensüümi (*Thermo Scientific*) ning inkubeeriti 1 tund 37 °C juures. Ensüümi inaktiveerimiseks inkubeeriti proove 80 °C juures 5 minutit.

Seejärel transformeeriti töödeldud PCR produkt *Escherichia coli* XL10 tüvesse. Transformeerimiseks kasutati kuumašoki meetodit. 100 µl bakterirakkudele lisati kogu töödeldud PCR-i produkt ning inkubeeriti rakke 30 minutit jääl. Järgnes inkubatsioon 42 °C juures 2 min, mille järel jahutati rakke jääl 2 minutit. Järgnevalt lisati rakkudele 800 µl LB söödet ning inkubeeriti 1,5 tundi 37 °C juures. Seejärel külvati transformeeritud rakud LB plaatidele, mis sisaldasid 100 µg/ml karbenitsilliini.

Transformeeritud rakke inkubeeriti üleöö 37 °C juures. Plaatide pealt valiti kolooniad, millest eraldati plasmiidne DNA, kasutades *FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit*'i (*Favorgen*) tootja protokoll järgi. DNA kontsentratsioon määrati NanoDrop2000 masinaga (*Thermo Scientific*) ning plasmiidide korrektsust kontrolliti restriksioonianalüüsiga ning soovivate mutatsioonide olemasolu kontrolliti lisaks veel sekveneerimisega. Töös kasutatud genereeritud plasmiidid on välja toodud tabelis 1.

Järgnevalt, et paljundada soovitud mutatsioonidega plasmide edasisteks analüüsideks, transformeeriti need uuesti *E. coli* XL10 rakkudesse, kasutades eelpool kirjeldatud kuumašoki meetodit. Transformeeritud ja plaaditud rakke inkubeeriti üleöö 37 °C juures ja seejärel külvati kolooniad LB vedelsöötmesse, inkubeeriti üleöö 37 °C juures ning eraldati plasmiidid, kasutades *NucleoBond® Xtra Midi EF kit*'i (*NucleoBond*) tootja protokoll järgi.

### **2.2.3. DNA elektroporatsioon**

Plasmiidide viimiseks Cop5-EBNA rakuliini kasutati elektroporatsiooni meetodit. Rakud koguti 100 mm läbimõõduga 70-80% konfluentsuseni kasvanud koekultuuri tassidelt: sööde eemaldati, rakud pesti 3 ml PBS-iga ning eemaldati tassilt 2 ml trüpsiinilahusega (0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA, *Corning*). Rakud kanti tsentrifuugitopsi, kuhu oli eelnevalt lisatud trüpsiinilahusega võrdsel hulgal IMDM söödet. Rakke tsentrifuugiti 5 minutit pööretel 1000 rpm ning temperatuuril 20°C (*Eppendorf Centrifuge 5810R*). Eemaldati supernatant, lisati 250 µl söödet ühe poratsiooni kohta ja suspendeeriti rakud. 250 µl rakususpensiooni kanti 4 mm

läbimõõduga elektroporatsiooni küveti, kuhu lisati ka 50 µg *Carrier* DNA-d (lõhe sperma DNA) ning 1 µg vastavat plasmidi. Elektroporatsioon teostati *Gene Pulser Xcell™* (Bio-Rad) aparaadiga pingel 230 V ja mahutavusel 975 µF. Peale poratsiooni lasti rakkudel küvettides taastuda 20 minutit toatemperatuuril. Seejärel tõsteti kogu sisu küvetist tsentrifuugitopsi, kuhu oli eelnevalt lisatud 5 ml IMDM söödet. Rakke tsentrifuugiti 5 minutit pöoretel 1000 rpm ja temperatuuril 20 °C. Järgnevalt eemaldati supernatant ning suspendeeriti rakud 10 ml IMDM söötmes. 100 µl rakkudest kanti 24 auguga plaadile edasiseks immunofluorestsentsanalüüsiks ning ülejäänud rakud kanti 100 mm koekultuuri tassile *Western blot* analüüsiks. Rakke kasvatati 48 tundi 37 °C juures 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas.

#### 2.2.4. *Western blot* analüüs

Valkude suuruse määramiseks kasutati *Western blot* meetodit. Elektroporeeritud rakke kasvatati 48 tundi 37 °C juures 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas koekultuuri tassidel.

Rakkude lüüsimiseks eemaldati rakkudelt sööde, pesti rakke 1 ml PBS lahusega ning lisati 1 ml PBS-EDTA lahust (3mM EDTA). Rakud eemaldati tassidelt ning kanti 1,5 ml mikrotuubi. Rakke tsentrifuugiti lauatsentrifuugis (*Sigma 1-14*) 5 minutit pöoretel 4000 rpm. Eemaldati supernatant ning rakud suspendeeriti 100 µl PBS lahuses ja lisati 100 µl 2x Laemmli lahust [4% SDS, 20% glütserool, 120 mM Tris pH 6,8; 0,02% broomfenoolsinine, 0,2 M DTT (ditriotreitool)] ja kuumutati 10 minutit temperatuuril 100 °C. Rakulüsaate säilitati temperatuuril -20 °C.

Valgud lahutati SDS-polüakrüülamiid geelelektrofooresiga (SDS-PAGE). Kasutati 10% polüakrüülamiid geele ning SDS puhvrit (125 mM Tris, 960 mM glütsiin, 0,5% SDS). Geelile kanti 5 µl rakulüsaati ja 3 µl markerit (*PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific*) ning geele jooksutati esimesed 15 minutit 100 V pingega ning edasi 150 V pingega kuni värvifront jõudis geeli alumisse osasse.

Seejärel kanti valgud polüakrüülamiidgeelilt üle PVDF (polüvinülideenfluoriid) membraanile (*Amersham™ Hybond™ P 0,45 PVDF*) poolkuiva ülekande meetodil (*Trans Blot SD Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories*). Ülekanne viidi läbi 15 V pingel 40 minuti jooksul (kahe geeli kohta).

Membraane blokeeriti 5% lõssilahuses (100 mM Tris-Cl, pH 7,5; 170 mM NaCl, 0,05% Tween20 + 5% lõssipulber) 1 tund toatemperatuuril või üleöö 4 °C juures. Seejärel inkubeeriti membraane primaarse antikehaga üleöö 4 °C juures. Primaarsete antikehadena kasutati antikehasid MAGE-A10 4B9 (*TÜ Tehnoloogiainstituut*) kontsentratsioonis 2 ng/µl, anti-E2 5E11 (*Icosagen*) kontsentratsioonis 1:10 000, anti-GFP (*TÜ Tehnoloogiainstituut*) kontsentratsioonis 1:10 000 ja anti- $\alpha$ -tubuliin (T5168, *Sigma*) kontsentratsioonis 1:10 000. Antikehad lahjendati 2% lõssilahuses (100 mM Tris-Cl, pH 7,5; 170 mM NaCl, 0,05% Tween20 + 2% lõssipulber). Peale inkubatsiooni pesti membraane Westerni pesulahuses (100 mM Tris-Cl, pH 7,5; 170 mM NaCl, 0,05% Tween20) 3x10 minutit. Seejärel toimus inkubatsioon HRP-ga konjugeeritud sekundaarsete antikehadega 1 tund toatemperatuuril, kasutati antikehasid *Goat anti-rabbit* või *Goat anti-mouse* (*Thermo Scientific*) kontsentratsioonis 1:10 000 ning lahjendatud 2% lõssilahuses. Järgnes taaskord membraanide pesu 3x10 minutit Westerni pesulahuses.

Sekundaarsed antikehad aktiveeriti ECL komplektiga (*GE Healthcare Amersham™ ECL™ Western Blotting Detecting Reagents*) ning signaal visualiseeriti autoradiograafiliselt röntgenfilmile (*AGFA CP-BU new Medical X-ray Film Blue, Agfa HealthCare*).

### **2.2.5. Immunofluorestsentsanalüüs**

Immunofluorestsentsanalüüsi jaoks kasvatati elektroporeetitud rakke 10 mm läbimõõduga katteklaasidel 48 tundi. Seejärel pesti proove 3x5 minutit PBS lahusega. Fikseerimiseks lisati 500 µl 4% paraformaldehüüdi ning inkubeeriti toatemperatuuril 10 minutit ja rakkude permeabiliseerimiseks pesti proove 0,2% TritonX100-PBS lahusega 2 minutit toatemperatuuril. Järgnes taaskord pesu 3x5 minutit PBS lahusega. Seejärel blokeeriti proovid 3% BSA-PBS lahuses 45 minutit kuni 1 tund toatemperatuuril. MAGE-A10 proovide puhul toimus ka inkubeerimine antikehadega. Primaarse antikehana kasutati MAGE-A10 1D12 (*TÜ Tehnoloogiainstituut*) kontsentratsioonis 2,5 ng/µl, ning inkubatsioon toimus 4 °C juures üleöö. Seejärel pesti proove 3x5 minutit PBS lahuses ning toimus inkubatsioon sekundaarse antikehaga toatemperatuuril 1 tund. Sekundaarse antikehana kasutati anti-mouse Alexa-Fluor 568 (*Thermo Scientific*) kontsentratsioonis 1:1000. Nii primaarne kui ka sekundaarne antikeha lahjendati 3% BSA-PBS lahuses. Seejärel pesti kõiki proove PBS lahusega 3x5 minutit ja

destilleeritud veega. Klaasid sulundati 4 µl DAPI-t sisaldava sulunduslahusega (*SlowFade™ Diamond Antifade Mountant with DAPI, Invitrogen*) alusklaasidele.

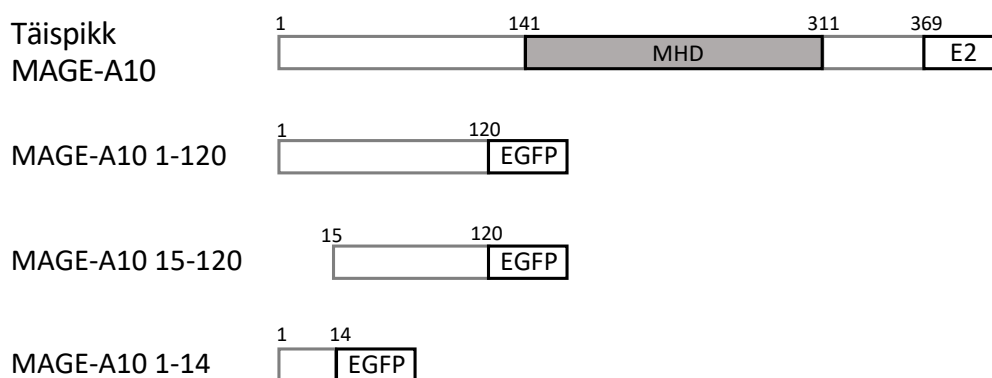
Rakud visualiseeriti ja pildistati Zeiss LSM 710 konfokaalmikroskoobiga 63x suurendusega objektiiviga, piltide töötlemiseks kasutati programmi Zeiss Zen 3.1 (blue edition).

## 2.3. Tulemused ja arutelu

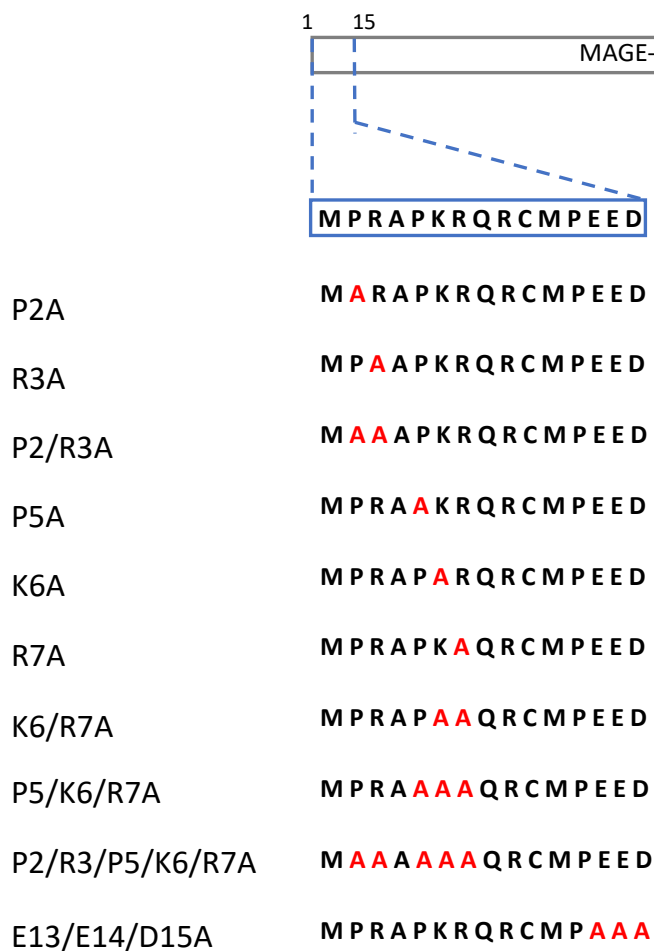
### 2.3.1. Mutantseid MAGE-A10 valke kodeerivate plasmiidide genereerimine

MAGE-A10 valgu puhul on täheldatud ootuspärasest aeglasemat liikuvust SDS-PAGE-il, aga põhjust sellele leitud pole. Prof Reet Kure uurimisgrupis varasemalt läbiviidud katsed näitasid, et MAGE-A10 liikuvust mõjutab valgu esimene osa, esimesed 120 aminohapet. Kui esimesed 120 aminohapet ära deleteerida, siis arvutuslik ja eksperimentaalne molekulmass kattuvad. Antud uurimistöös valiti lähemaks uurimiseks valgu esimesed 15 aminohapet, sest need on iseloomulikud MAGE-A10-le ja erinevad ülejäänud perekonna N-terminuse aminohappelisest järjestusest (Lisa 2).

Uurimaks, kas MAGE-A10 N-terminuses paiknevad aminohapped mõjutavad valgu suurust ja liikuvust geelelektroforeesil, tehti plasmiidid, mis kodeerivad mutantseid MAGE-A10 valke, kus valitud aminohapped on välja vahetatudalaniini vastu. Aminohappelised muudatused viidi sisse nii täispikas MAGE-A10 valgus kui ka MAGE-A10 deletantides MAGE-A10 1-120 ja MAGE-A10 1-14 (Joonis 5). Kõik töös uuritud aminohappelised asendused on välja toodud joonisel 6. Asendamiseks valiti aminohapped, mis osalevad tihti erinevates valkude vahelistes interaktsioonides [positiivse laenguga lüsiin (K) ja arginiin (R), negatiivse laenguga glutamaat (E) ja aspartaat (D)] või on olulised valgu struktuuri moodustumisel [proliin (P)]. Valitud aminohapped asendatialaniiniga (A), millel puudub suur kõrvalahel või laenguga kõrvalahel ja seega osaleb harva valgu funktsioonides.



**Joonis 5. Töös kasutatud MAGE-A10 konstruktid.** Numbrid märgivad MAGE-A10 valgu pikkust aminohapetes. Joonisel on märgitud ka valgule lisatud vastavad märgised. Täispika MAGE-A10 puhul on joonisele märgitud ka kõigile MAGE valkudele omase MAGE homoloogse domeeni (MHD) asukoht.



*Joonis 6. Töös uuritud aminohappelised muudatused MAGE-A10 valgus.*

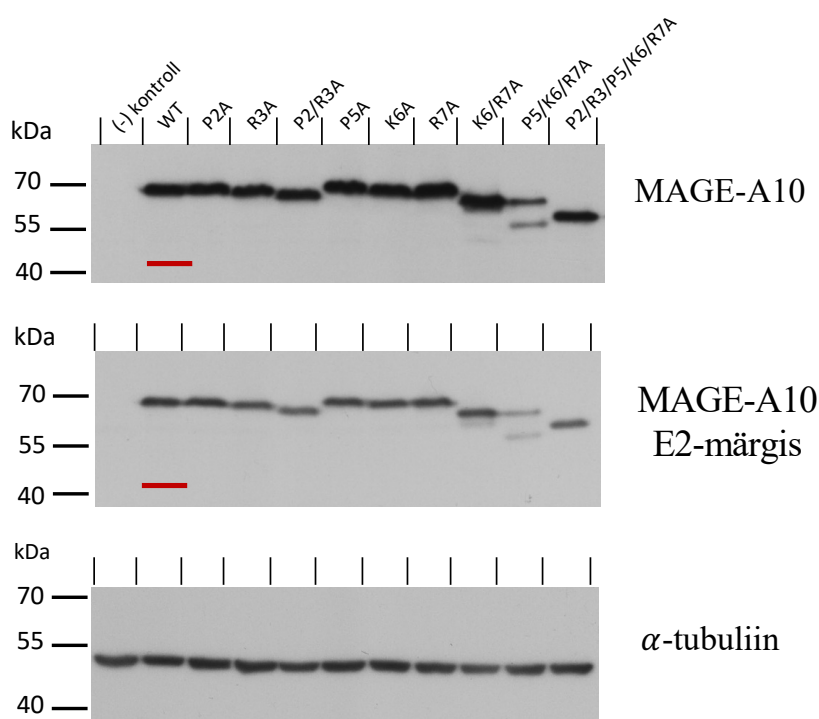
Plasmiidide genereerimiseks kasutati PIPE PCR meetodit, kus MAGE-A10 valku viidi sisse koht-spetsiifilised mutatsioonid spetsiifiliste praimerite ja PCR programmi abil. PCR reaktsioonis kasutati DNA matriitsina WT MAGE-A10 kodeerivat plasmiidi pQM MAGE-A10, MAGE-A10 esimest 120 aminohapet kodeerivat plasmiidi pQM MAGE-A10 1-120 EGFP ja MAGE-A10 esimest 14 aminohapet kodeerivat plasmiidi p-1-15-GFP. Töös kasutatud genereeritud plasmiidid on toodud tabelis 1 ja skemaatiliselt joonisel 6.

**Tabel 1. Töös kasutatud genereeritud plasmiidid.** Genereeritud plasmiidid on tähistatud numbritega ning lisaks on tabelis toodud ka PCR reaktsioonis matriitsina kasutatud plasmiidid. Tabelis on välja toodud ka plasmiidide arvutuslik suurus ja antud töös saadud tegelikud suurused.

| Tähis                              | Plasmiid                           | Märgis | Katseliselt saadud molekulmass (kDa) | Arvutuslik molekulmass (kDa) |
|------------------------------------|------------------------------------|--------|--------------------------------------|------------------------------|
| <b>Matriits pQM MAGE-A10</b>       |                                    | E2     | ~70                                  | 42,3                         |
| 1                                  | pQM MAGE-A10 P2A                   |        | ~70                                  |                              |
| 2                                  | pQM MAGE-A10 R3A                   |        | ~70                                  |                              |
| 3                                  | pQM MAGE-A10 P2/R3A                |        | ~67                                  |                              |
| 4                                  | pQM MAGE-A10 P5A                   |        | ~70                                  |                              |
| 5                                  | pQM MAGE-A10 K6A                   |        | ~70                                  |                              |
| 6                                  | pQM MAGE-A10 R7A                   |        | ~70                                  |                              |
| 7                                  | pQM MAGE-A10 K6/R7A                |        | ~65                                  |                              |
| 8                                  | pQM MAGE-A10 P5/K6/R7A             |        | ~65 ja 56                            |                              |
| 9                                  | pQM MAGE-A10 P2/R3/P5/K6/R7A       | ~60    |                                      |                              |
| <b>Matriits pQM MAGE-A10 1-120</b> |                                    | EGFP   | ~60                                  | 40,4                         |
| 10                                 | pQM MAGE-A10 1-120 P2/R3A          |        | ~55                                  |                              |
| 11                                 | pQM MAGE-A10 1-120 K6/R7A          |        | ~55                                  |                              |
| 12                                 | pQM MAGE-A10 1-120 P5/K6/R7A       |        | ~55 ja 50                            |                              |
| 13                                 | pQM MAGE-A10 1-120 P2/R3/P5/K6/R7A |        | ~48                                  |                              |
| 14                                 | pQM MAGE-A10 1-120 E13/E14/D15     | ~60    |                                      |                              |
| <b>Matriits pQM MAGE-A10 1-14</b>  |                                    | EGFP   | ~30                                  | 30,4                         |
| 15                                 | pQM MAGE-A10 1-14 P2A              |        | ~30                                  |                              |
| 16                                 | pQM MAGE-A10 1-14 R3A              |        | ~30                                  |                              |
| 17                                 | MAGE-A10 1-14 P2/R3A               |        | ~30                                  |                              |
| 18                                 | MAGE-A10 1-14 P5A                  |        | ~30                                  |                              |
| 19                                 | MAGE-A10 1-14 K6A                  |        | ~30                                  |                              |
| 20                                 | MAGE-A10 1-14 K6/R7A               |        | ~30                                  |                              |

### 2.3.2. Mutatsioonide mõju MAGE-A10 valgu liikuvusele SDS-PAGE-il

Saadud plasmiidid (vt Tabel 1, plasmiidid 1–9) viidi Cop5 rakkudesse elektroporatsiooni teel ning rakud lüüsi 48 tundi peale poratsiooni. Mutantsete valkude suuruse hindamiseks viidi läbi *Western blot* analüüs saadud rakulüsaatidele. Valkude detekteerimiseks kasutati primaarsete antikehadena MAGE-A10 spetsiifilist antikeha 4B9 ja E2-märgist ära tundvat antikeha 5E11 ning rakuliseks kontrolliks kasutati anti- $\alpha$ -tubuliin antikeha. *Western blot* analüüs anti- $\alpha$ -tubuliin antikehaga näitab, et analüüsitud proovides on valgukogus sarnane. Sekundaarse antikehana kasutati *Goat anti-mouse* antikeha. *Western blot* analüüsi tulemused on näha joonisel 7.



**Joonis 7. *Western blot* analüüs täispikkadele MAGE-A10 mutantidele valgu suuruse määramiseks.** Vastavaid aminohappelisi muudatusi kodeerivad plasmiidid viidi elektroporatsiooni teel Cop5 rakkudesse. Lisaks viidi rakkudesse plasmiid pQM MAGE-A10 E2Tag (WT) ja negatiivseks kontrolliks tühi plasmiid pQM C/A. *Western blot*'is inkubeeriti proove MAGE-A10 spetsiifilise antikehaga 4B9 ja E2-märgise spetsiifilise antikehaga 5E11. Rakulise kontrollina inkubeeriti proove ka anti- $\alpha$ -tubuliin antikehaga. Punase joonega on märgitud MAGE-A10 asukoht vastavalt arvutuslikule molekulmassile.

WT MAGE-A10 arvutuslik suurus on 42 kDa, aga *Western blot* analüüsil saadud eksperimentaalne suurus on 70 kDa. Seega kattub antud tulemus MAGE-A10 puhul varasemalt kirjeldatuga, et MAGE-A10 arvutuslik ja eksperimentaalne molekulmass on märkimisväärselt erinevad.

Antud metoodikat kasutades on vähetõenäoline, et MAGE-A10 ebatavaline liikuvus SDS-PAGE geelelektroforeesil on põhjustatud valgu kõrgemat järku struktuuridest, sest proovides on kasutatud SDS-i ja DTT-d, mis lõhuvad enamus nõrgemat tüüpi interaktsioonid, mis on vajalikud valgu sekundaarse ja tertsiaarse struktuuri moodustumiseks. Kuna eksperimentaalne molekulmass on suurem arvutuslikust, siis võib arvata, et valgule lisatakse juurde midagi, mis suurendab valgu massi. Lisatavad grupid peavad olema kovalentselt lisatud, sest muud interaktsioonid, näiteks ioonsed sidemed või hüdrofoobsed interaktsioonid antud metoodikaga lõhutakse. On võimalik, et MAGE-A10 valgule lisatakse post-translatsioonilise modifikatsiooni käigus kovalentselt seotud gruppe. Kuna suuruse erinevus eksperimentaalse ja arvutusliku suuruse vahel on ligi 30 kDa, siis peab tegu olema mõne suurema grupi lisamisega, näiteks glükosüülimine, või paljude väikeste gruppide lisamisega, näiteks fosforüülimine, metüülimine vm mitmes saidis.

*Western blot* analüüs MAGE-A10 mutantidele näitas, et P2A ja R3A asendused MAGE-A10 liikuvust oluliselt ei mõjutanud. Küll aga mõjutas MAGE-A10 liikuvust P2/R3A topeltasendus. Siiski mõjutas P2/R3A asendus valgu liikuvust vähesel määral (liikuvuse muutus võrreldes WT valguga 3 kDa) ning valgu suurus oli ikkagi tunduvalt suurem kui on arvutuslik suurus. Sarnaselt P2A ja R3A asendustele ei mõjutanud MAGE-A10 liikuvust SDS-PAGE-il üksikud asendused P5A, K6A ja R7A. Küll aga oli näha liikuvuse muutust topeltmutandi K6/R7A ning kolmikmutandi P5/K6/R7A puhul, aga jällegi ei saavuta MAGE-A10 oma arvutuslikku suurust. Kuna valgu liikuvuses toimus muutus just topeltmutantide ja kolmikmutandi puhul, aga mitte üksikmutantide puhul, siis võib tegu olla motiiviga, mida tunneb ära mõni rakuline valk, mis osaleb MAGE-A10 modifitseerimisel. Üksikmutandi puhul motiivi piisavalt ei rikuta ning modifitseerimine viiakse ikka läbi. Kõige rohkem mõjutas valgu suurust P2/R3/P5/K6/R7A asendus, mille puhul on liikuvuse erinevus 10 kDa.

Lisaks on P5/K6/R7A kolmikmutandi puhul näha kahte signaali (65 ja 56 kDa), mis võib viidata sellele, et sisse viidud aminohappelised asendused mõjutavad valgu stabiilsust ja/või struktuuri. Kuna K6/R7A topeltasenduse puhul valgu stabiilsus häiritud pole, siis võib arvata, et ebastabiilsust põhjustab 5. positsioonil paikneva proliini asendamine. Võimalik, et mutantset valku lõigatakse proteaaside poolt. Kuna kaks signaali on detekteeritavad ka E2-märgise spetsiifilise antikehaga ning antud katsetes kasutatud MAGE-A10 konstruktis asub E2-märgis valgu C-terminuses (Joonis 5), siis peaks valgu lõikamine toimuma valgu N-terminaalses pooles. Teiseks seletuseks, miks tekib kaks signaali, võib olla see, et P5A asendus muudab valgu struktuuri stabiilsust selliselt, et osadele valkudele liidetakse modifikatsioonid ja osadele

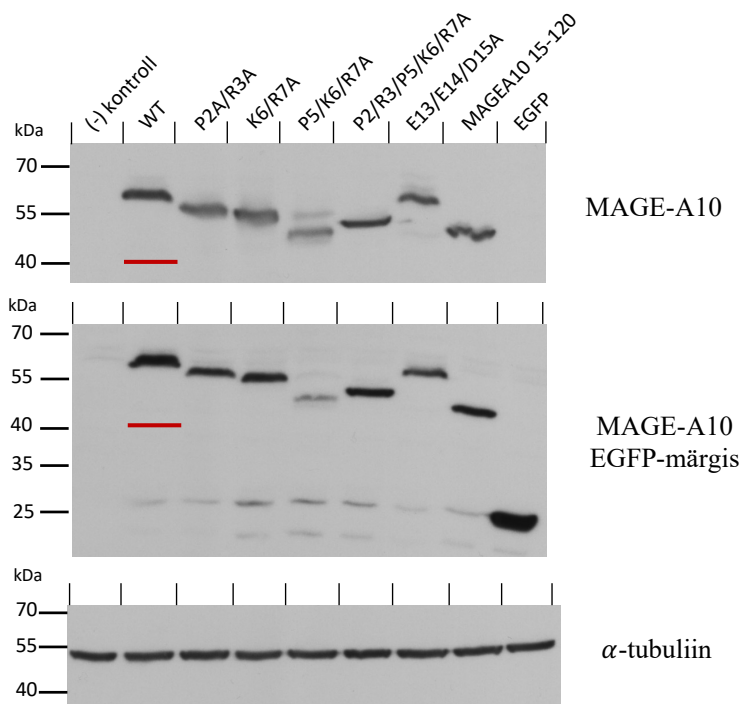
valkudele modifikatsioone ei liideta, sest modifikatsioonisait on varjestatud. Kuna antud tulemustes P5A ja P2/R3/P5/K6/R7A mutantide puhul MAGE-A10 ebastabiilsust näha ei ole, siis ei ole P5 positsiooni mõju valgu stabiilsusele üksühene, sest valgu stabiilsust mõjutab see ainult P5/K6/R7A asenduse puhul.

Valgu liikuvust kõige rohkem mõjutanud P2/R3/P5/K6/R7A asendus (liikuvuse erinevus võrreldes WT valguga 10 kDa) võib viidata sellele, et tegu on topeltasenduste P2/R3A (liikuvuse erinevus 3 kDa) ja K6/R7A (liikuvuse erinevus 5 kDa) koosmõjuga ning seega on tegu kahe motiiviga: PR ja (P)KR, mida modifitseeritakse. Tegu võib ka olla ühe suure motiiviga: **PRAPKR**, kus 3. ja 4. positsioonil võib olla ka mõni muu aminohape.

### 2.3.3. Mutatsioonide mõju MAGE-A10 1-120 deletandis

Täispikas MAGE-A10 valgus täheldati aminohappeliste asenduste P2/R3A, K6/R7A, P5/K6/R7A ja P2/R3/P5/K6/R7A mõju valgu suurusele (vt ptk 2.3.2) ning selle põhjal uuriti järgnevalt samade aminohappeliste asenduste mõju MAGE-A10 1-120 deletandis, mis sisaldas MAGE-A10 esimest 120 aminohapet (vt Joonis 5). Katseseeriasse lisati ka MAGE-A10 1-120 E13/E14/D15A mutant ning MAGE-A10 15-120 deletant, mis sisaldab aminohappeid positsioonidelt 15 kuni 120. E13/E14/D15A mutant kaasati selleks, et uurida, kas negatiivselt laetud aminohapped mõjutavad MAGE-A10 ebatavalist liikuvust SDS-PAGE-il ning MAGE-A10 15-120 deletant uurimaks, kas valgu liikuvust mõjutavad ainult N-terminuses paiknevad aminohapped.

Töö raames genereeritud plasmiidid (vt Tabel 1, plasmiidid 10–14) ning plasmiidid pQM MAGE-A10 1-120 EGFP (WT), pQM MAGE-A10 15-120 EGFP ja pEGFP-C1 viidi elektroporatsiooni teel Cop5 rakkudesse. Negatiivseks kontrolliks kasutati rakke, kuhu oli sisse viidud ainult *Carrier* DNA. Rakud lüüsi 48 tundi peale transfekteerimist ning rakulüsaatidele tehti *Western blot* analüüs. MAGE-A10 detekteerimiseks inkubeeriti proove MAGE-A10 spetsiifilise primaarse antikehaga 4B9 ning EGFP-märgist ära tundva primaarse antikehaga anti-EGFP. Sekundaarsete antikehadena kasutati vastavalt *Goat anti-mouse* ja *Goat anti-rabbit* antikehasid. Rakuliseks kontrolliks inkubeeriti proove ka anti- $\alpha$ -tubuliin primaarse antikehaga ja sekundaarse antikehana kasutati *Goat anti-mouse* antikeha. *Western blot* analüüsi tulemused MAGE-A10 1-120 deletantidele on näha joonisel 8.



**Joonis 8. Western blot analüüs MAGE-A10 1-120 mutantidele valgu suuruse määramiseks.** pQM MAGE-A10 1-120 EGFP (WT), aminohappelisi asendusi kodeerivad plasmiidid, pQM MAGE-A10 15-120 EGFP ja pEGFP-C1 viidi Cop5 rakkudesse elektroporatsiooni teel ning rakud lüüsi 48 tundi peale poratsiooni. Negatiivseks kontrolliks olid rakud, millesse viidi ainult Carrier DNA. Western blot'is inkubeeriti proove MAGE-A10 spetsiifilise antikehaga 4B9 ja EGFP-märgise spetsiifilise antikehaga anti-EGFP. Rakulise kontrollina inkubeeriti proove ka anti- $\alpha$ -tubuliin antikehaga. Punase joonega on märgitud MAGE-A10 1-120 EGFP asukoht vastavalt arvutuslikule molekulmassile.

Western blot analüüs näitas, et sarnaselt täispika WT MAGE-A10 valguga, tuleb ka MAGE-A10 1-120 deletandi puhul välja erinevus valgu arvutusliku molekulmassi (40 kDa) ja eksperimentaalselt saadud molekulmassi (60 kDa) vahel. Arvutuslike ja eksperimentaalsete molekulmasside vahed on täispika MAGE-A10 ja 1-120 deletandi puhul enam-vähem samad.

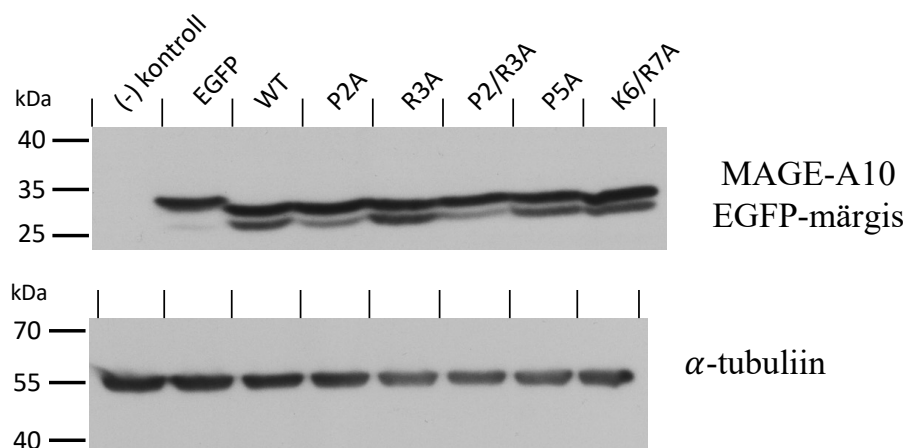
Sarnaselt täispika MAGE-A10 valguga tehtud Western blot'i analüüsi tulemustele, on näha MAGE-A10 1-120 liikuvuse muutumist topelmutantide P2/R3A ja K6/R7A puhul (liikuvuse muutus 5 kDa). Liikuvuse muutust on näha ka P5/K6/R7A mutandi puhul. Samuti on P5/K6/R7A asenduse puhul näha kahte signaali nagu oli näha täispika MAGE-A10 puhul.

E13/E14/D15A asendus MAGE-A10 liikuvust ei mõjutanud ja seega negatiivsed aminohapped MAGE-A10 liikuvust ei mõjuta. MAGE-A10 15-120 arvutuslik suurus on 39 kDa, aga antud Western blot'i analüüsil on MAGE-A10 15-120 suuruseks ~50 kDa, mis viitab sellele, et MAGE-A10 liikuvust ei mõjuta ainult esimesed 15 aminohapet. Kuna MAGE-A10 N-terminuses sisse viidud aminohappelised asendused küll mõjutasid valgu liikuvust, aga mitte

piisavalt, et MAGE-A10 saavutaks oma arvutusliku molekulmassi, siis on tulemused MAGE-A10 15-120 deletandiga ootuspärased ja kinnitavad, et MAGE-A10 ebatavalist liikuvust SDS-PAGE-il ei mõjuta ainult 15 esimest aminohapet. Võimalik, et valgu esimeses 120 aminohappelises järjestuses leidub veel üksikuid aminohappeid või motiive, mida modifitseeritakse.

### 2.3.4. Mutatsioonide mõju MAGE-A10 1-14 deletandis

Järgnevalt viidi läbi *Western blot* analüüs MAGE-A10 1-14 deletandiga, mis sisaldas ainult valgu 14 esimest aminohapet (vt Joonis 5). Selleks viidi Cop5 rakkudesse elektroporatsiooni teel tabelis 1 toodud plasmiidid 15-20 ning lisaks plasmiidid pQM MAGE-A10 1-14 EGFP (WT) ja pEGFP-C1. Negatiivse kontrollina kasutati rakke, kuhu oli sisse viidud ainult *Carrier* DNA. 48 tundi peale transfektoerimist rakud lüüsi ning viidi läbi *Western Blot* analüüs. Proove inkubeeriti EGFP järjestust ära tundva anti-EGFP antikehaga ning sekundaarse antikehana kasutati *Goat anti-mouse* antikeha. Rakuliseks kontrolliks inkubeeriti proove anti- $\alpha$ -tubuliin antikehaga, sekundaarse antikehana kasutati *Goat anti-rabbit*. Tulemused on toodud joonisel 9.



**Joonis 9. *Western blot* analüüs MAGE-A10 1-14 mutantidele.** Plasmiidid pEGFP-C1, pQM MAGE-A10 1-14-EGFP (WT) ning aminohappelisi asendusi kodeerivad plasmiidid viidi Cop5 rakkudesse elektroporatsiooni teel ning rakud lüüsi 48 tundi peale transfektoerimist. Negatiivseks kontrolliks olid rakud, millesse viidi ainult *Carrier* DNA. *Western blot*'is inkubeeriti proove anti-EGFP antikehaga. Rakulise kontrollina inkubeeriti proove ka anti- $\alpha$ -tubuliin antikehaga.

*Western blot* tulemustest on näha, et MAGE-A10 1-14 deletandi puhul kattub arvutuslik molekulmass (30,418 kDa) katselise molekulmassiga (~30 kDa). Ükski aminohappeline asendus MAGE-A10 1-14 deletandi liikuvust ei mõjutanud. Joonisel 9 on näha MAGE-A10

WT ja mutantide puhul kahte signaali, millest eeldatavalt ülemine on õige signaal ja alumised on laguproduktid.

Kuna MAGE-A10 1-14 deletandi puhul puudub valgu ebatavaline liikumine SDS-PAGE-il, siis tõenäoliselt mõjutab MAGE-A10 molekulmassi suurel määral ka ülejäänud osa valgust. Tulemused MAGE-A10 1-14 deletandiga on huvitavad selle poolest, et täispika ja 1-120 deletandiga tehtud katsete puhul oli selgelt näha, kuidas aminohappelised asendused valgu N-terminuses, esimeses 14 aminohappes, mõjutasid MAGE-A10 molekulmassi. On ka võimalik, et 1-14 deletandi puhul ei tulnud välja sama liikuvuse muutuse efekt nagu täispika valgu ja 1-120 deletandi puhul, sest lühike osa MAGE-A10 valgust oli varjestatud modifikatsioonide suhtes. Antud katses kasutati MAGE-A10 1-14 konstrukti, mille C-terminusse oli liidetud EGFP, mis on tugevalt struktureeritud valk ja võib seega takistada juurdepääsu MAGE-A10 valgule.

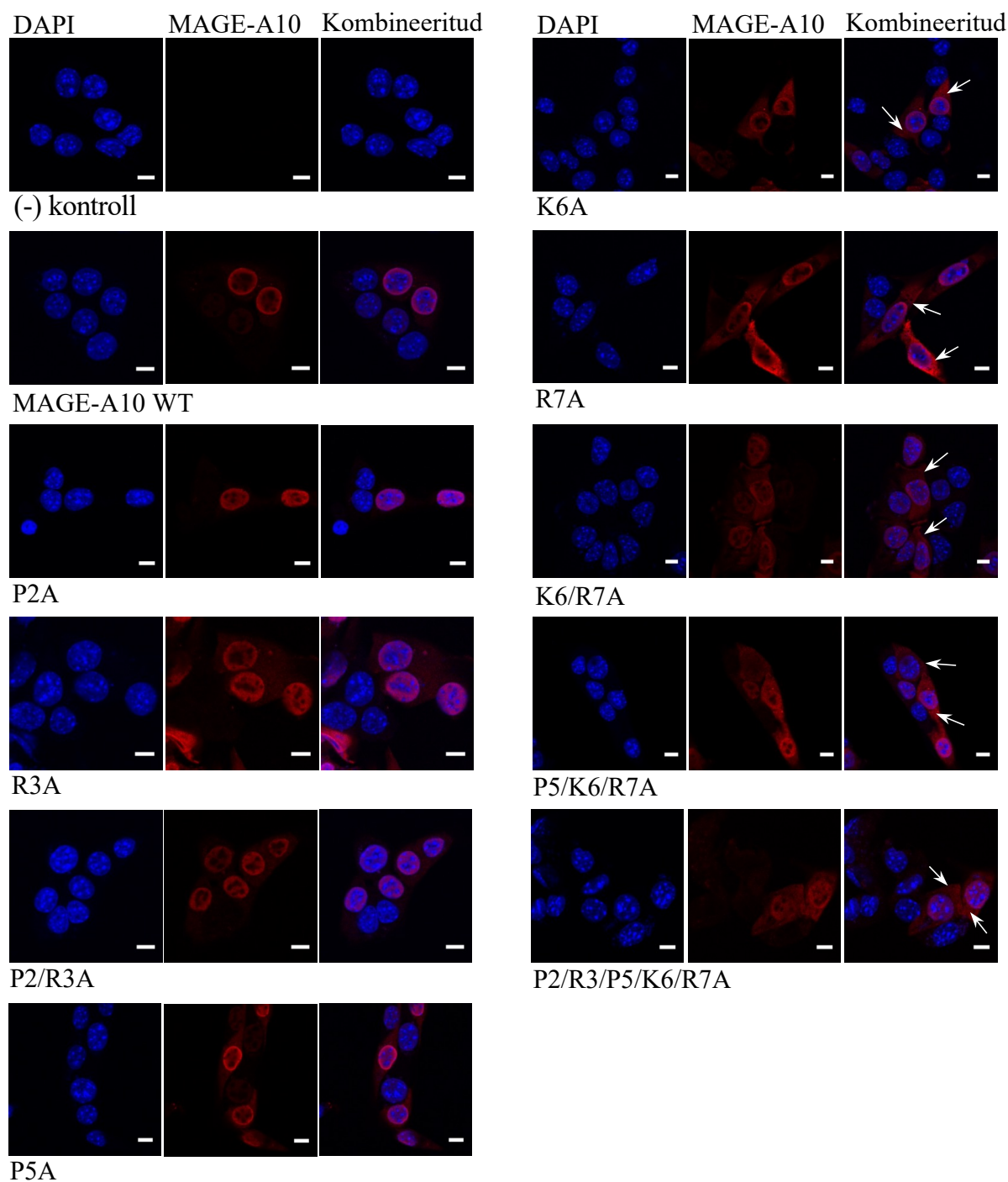
Läbiviidud *Western blot* analüüsid näitavad, et MAGE-A10 liikuvust SDS-PAGE-il mõjutavad oluliselt aminohappelised asendused K6/R7A, P5/K6/R7A ja P2/R3/P5/K6/R7A. Tulemused ei võimalda kindlaks teha täpset põhjust, miks MAGE-A10 katseline molekulmass on oluliselt suurem arvutuslikust molekulmassist. Kirjanduses on välja pakutud, et valkude ebatavalist liikuvust SDS-PAGE-il võivad põhjustada negatiivselt laetud aminohapped, mistõttu SDS-i seondumine valgule väheneb ja valgu liikuvus geelelektroforeesil on aeglasem (Shi jt, 2012). Kuna antud töös täheldati just proliini ja positiivselt laetud arginiini ja lüsiini mõju valgu liikuvusele, aga mitte negatiivselt laetud glutamaadi ja aspartaadi mõju MAGE-A10 liikuvusele, siis MAGE-A10 puhul selline põhjendus pigem ei kehti. Tõenäolisem on, et valgu ebatavalist liikuvust geelelektroforeesil põhjustavad post-translatsioonilised modifikatsioonid. MAGE-A10 N-terminuses sisse viidud üksikud aminohappelised asendused MAGE-A10 molekulmassi ei mõjutanud, küll aga mõjutasid molekulmassi topeltasendused P2/R3A ja K6/R7A ning kõige tugevamalt mõjutas molekulmassi P2/R3/P5/K6/R7A asendus. Nende tulemuste põhjal võib olla tegu kahe motiiviga [PR ja (P)KR] või suurema motiiviga **PRA(P)KR**, mida tunneb ära mõni modifikatsioon läbiviiv rakuline valk. Ei saa ka välistada, et pakutud motiivid on osa mõnest suuremast motiivist.

Antud töö käigus läbi viidud katsed näitavad ka seda, et kui tegu on post-translatsiooniliste modifikatsioonidega, siis valgu modifitseerimiseks ei piisa ainult motiividest valgu N-terminuses, oluline osa on ka ülejäänud valgul. Võimalik, et tegu on suurema motiiviga, mis hõlmab endas rohkem aminohappeid, kui ainult 15 esimest aminohapet. On ka võimalik, et

aminohapped positsioonidelt 15 kuni 120 on olulised, et moodustuks vajalik struktuur, mis võimaldaks interaktsioone MAGE-A10 ja modifitseerivate valkude vahel. Kuna MAGE-A10 1-120 osa puhul on teadaolevalt tegu IDR-iga ning IDR-ide paindlik struktuur võimaldab interaktsioone paljude erinevate valkudega, siis on vägagi tõenäoline, et just seda osa valgust aktiivselt modifitseeritakse. Töö käigus läbiviidud katsed ei võimalda kindlaks teha, mis on see konkreetne modifikatsioon, mis MAGE-A10 N-terminusse lisatakse. Kuna valgu liikuvust mõjutasid oluliselt aminohapete proliini, lüsiini ja arginiini asendamine, siis võib tegu olla selliste enamlevinud post-translatsiooniliste modifikatsioonidega nagu metüülimine, atsüülimine või O-glükosüülimine. Kindlate modifikatsioonide kindlaks tegemiseks tuleks läbi viia täiendavaid katseid.

### **2.3.6. Mutatsioonide mõju MAGE-A10 lokaliseerimisele Cop5 rakkudes**

Erinevalt teistest MAGE-A valkudest, mis enamasti lokaliseeruvad tsütoplasmas, lokaliseerub MAGE-A10 rakutuumas. MAGE-A10 esimesed 15 aminohapet on väga spetsiifilised MAGE-A10 valgule ning eristavad seda teistest MAGE-A perekonna valkudest. Uurimaks, kas MAGE-A10 N-terminuses paiknevad aminohapped mõjutavad valgu transporti tuuma ja kas seal paikneb potentsiaalne NLS, viidi läbi immunofluorestsentsanalüüs. Genereeritud plasmiidid (vt Tabel 1, plasmiidid 1–9) viidi elektroporatsiooni teel Cop5 rakkudesse. Lisaks viidi rakkudesse WT MAGE-A10 valgu kodeeriv plasmiid pQM MAGE-A10 E2Tag ning negatiivseks kontrolliks tühi plasmiid pQM C/A. Transfekteeritud rakke kasvatati 10 mm läbimõõduga katteklaasidel 48 tundi, misjärel rakud fikseeriti. MAGE-A10 detekteerimiseks inkubeeriti proove MAGE-A10 spetsiifilise primaarse antikehaga 1D12 ning visualiseerimiseks sekundaarse antikehaga *anti-mouse* Alexa-Fluor 568. Rakutuomad visualiseeriti DAPI-ga. Rakke vaadeldi ja pildistati konfokaalmikroskoobis Zeiss LSM 710 ning piltide töötlemiseks kasutati programmi Zeiss Zen 3.1 (blue edition). Tulemused on toodud joonisel 10.



**Joonis 10. Täispikkade MAGE-A10 mutantide lokalisatsioon rakus.** Plasmiidid viidi Cop5 rakkudesse elektroporatsiooni teel ning rakke kasvatati 48 tundi. Rakke inkubeeriti MAGE-A10 spetsiifilise antikehaga 1D12 (punane). Rakutuumad (sinine) värviti DAPI-ga. Nooltega on märgitud MAGE-A10 lokalisatsioon tsütoplasmas. Pildistamiseks kasutati 63x objektiivi. Mõõtkava on 10 µm.

Immunofluorestsentsanalüüsi tulemused MAGE-A10 mutantidega näitasid, et eksogeenne MAGE-A10 lokaliseerub ainult tuumas, mis kattub kirjanduses kirjeldatuga. MAGE-A10 P2A ja R3A mutandid ning topeltmutant P2/R3A lokaliseeruvad samuti tuumas. MAGE-A10 P5A mutandi puhul on tugevalt värvunud rakutuum ning kergelt värvunud ka tsütoplasma. K6A ja

R7A asenduste puhul on näha selgemini, et lisaks tuumale paikneb MAGE-A10 ka tsütoplasmas. Samamoodi lokaliseerub MAGE-A10 nii tuumas kui ka tsütoplasmas asenduste K6/R7A, P5/K6/R7A ja P2/R3/P5/K6/R7A puhul.

### **2.3.7. Mutatsioonide mõju MAGE-A10 1-120 lokalisatsioonile Cop5 rakkudes**

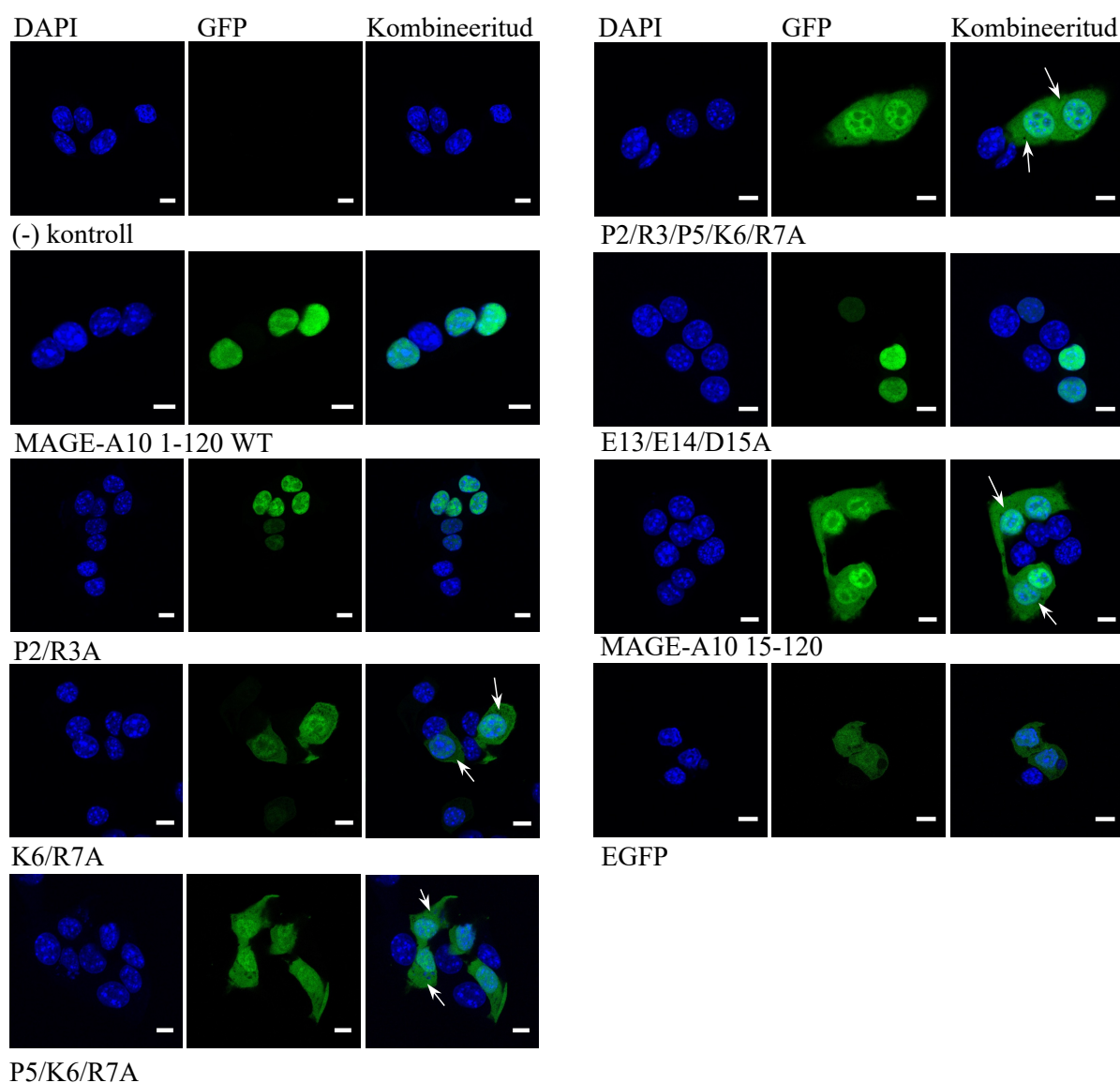
Järgnevalt uuriti, kas aminohappeliste asendused K6A, R7A, P5/K6/R7A ja P2/R3/P5/K6/R7A põhjustavad MAGE-A10 lokaliseerumist tsütoplasmas, nagu seda täheldati täispika MAGE-A10 puhul (vt ptk 2.3.3), ka juhul, kui osa valgust on deleteeritud. Selleks kasutati deletanti MAGE-A10 1-120 (vt Joonis 5). Töö raames genereeritud plasmiidid (vt Tabel 1, plasmiidid 10–14) ning plasmiidid pQM MAGE-A10 1-120 EGFP (WT) ja pQM MAGE-A10 15-120 EGFP viidi Cop5 rakkudesse. Negatiivse kontrollina kasutati rakke, kuhu oli sisse viidud ainult *Carrier* DNA. Transfekteeritud rakke kasvatati 10 mm läbimõõduga katteklaasidel 48 tundi ja seejärel rakud fikseeriti ning rakutuomad visualiseeriti DAPI-ga. Kuna MAGE-A10 konstruktid sisaldasid EGFP-märgist (Joonis 5), siis MAGE-A10 lokalisatsioon tehti kindlaks EGFP signaali järgi. EGFP ja DAPI signaal tuvastati ja rakud pildistati konfokaalmikroskoobis Zeiss LSM 710 ning piltide töötlemiseks kasutati programmi Zeiss Zen 3.1 (blue edition). Tulemused on toodud joonisel 11.

WT MAGE-A10 1-120 paikneb kindlalt rakutuumas. MAGE-A10 1-120 deletandi puhul on aminohappeliste asenduste mõju sarnane nagu täispika MAGE-A10 valgu puhul. Mutant P3/R3A lokaliseerub selgelt tuumas. MAGE-A10 paikneb lisaks tuumale selgelt ka tsütoplasmas asenduste K6A, R7A, P5/K6/R7A ja P2/R3/P5/K6/R7A korral nagu näitasid tulemused täispika MAGE-A10 puhul. Asenduse E13/E14/D15A puhul paikneb MAGE-A10 ainult tuumas. MAGE-A10 15-120 deletant paikneb tuumas ja tsütoplasmas.

Täispika MAGE-A10 ja MAGE-A10 1-120 deletandiga saadud tulemuste kattumine viitab sellele, et valgu lokalisatsiooni eest vastutab põhiliselt valgu N-terminaalne pool, täpsemalt esimesed 120 aminohapet. Asenduste K6A, R7A, P5/K6/R7A ja P2/R3/P5/K6/R7A puhul paiknes MAGE-A10 lisaks tuumale selgelt ka tsütoplasmas, mis viitab sellele, et transport tuuma on häiritud. Motiivid PKR ja PRXPKR sarnanevad kõige rohkem klassikalise üheosalise NLS-iga (K K/R X K/R). Täiendavalt võiks läbi viia katse, kus vastavad motiivid on fuseeritud mõne hästi-detekteeritava valguga, mis muidu tuumas ei lokaliseeru, ning vaadata sellise

konstrukti lokaliseerimiseks. Sellise katse tulemused aitaks kinnitada, kas motiiv PKR või PRXPKR on piisav MAGE-A10 tuuma transportimiseks ja kas on seega tegu NLS-iga.

Kuna MAGE-A10 mutandi P2/R3/P5/K6/R7A puhul on siiski selgelt näha valgu lokaliseerumist ka tuumas ning samuti lokaliseerub MAGE-A10 15-120 deletant tuumas, siis tõenäoliselt toimub MAGE-A10 transport tuuma mitmel viisil ja eelnevalt mainitud motiivid on potentsiaalselt ainult üks nendest mehhanismidest.



**Joonis 11. MAGE-A10 1-120 mutantide lokaliseerimine raku.** MAGE-A10 1-120 on fuseeritud EGFP-ga (roheline) ja rakutuumad on värvitud DAPI-ga (sinine). Nooltega on märgitud MAGE-A10 lokaliseerimine tsütoplasmas. Mõõtkava on 10 µm. Kasutatud on 63x suurendusega objektiiv.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti, milline on MAGE-A10 N-terminuses paiknevate aminohapete roll valgu ebatavalises liikuvuses SDS-PAGE geelelektroforeesil ja rakulises lokaliseerimises.

Leiti, et aminohappelised asendused P2/R3A, K6/R7A, P5/K6/R7A, P2/R3/P5/K6/R7A MAGE-A10 N-terminuses muudavad märkimisväärselt valgu liikuvust SDS-PAGE-il, kuid siiski mitte nii palju, et MAGE-A10 arvutuslik ja eksperimentaalne molekulmass kattuksid. Üheks võimalikuks põhjenduseks, miks MAGE-A10 liikuvus geelelektroforeesil on oodatust aeglasem, on see, et valgule liidetakse post-translatsioonilisi modifikatsioone. Antud töös leiti, et modifitseerimiseks on vajalikud kas kaks eraldi motiivi PR või (P)KR või üks suurem motiivi PRA(P)KR, mida tunneb ära mõni modifikatsioonide läbiviiv rakuline valk. Konkreetsete modifikatsioonide kindlaks tegemiseks tuleks läbi viia täiendavaid katseid.

Aminohappelistel asendustel oli sama mõju MAGE-A10 liikuvusele geelelektroforeesil nii täispika MAGE-A10 valgu puhul kui ka MAGE-A10 1-120 deletandi puhul, mis näitab, et MAGE-A10 ebatavalise liikuvuse eest geelelektroforeesil vastutab MAGE-A10 N-terminaalne osa, täpsemalt esimesed 120 aminohapet. MAGE-A10 1-15 deletandi puhul arvutuslik ja eksperimentaalne molekulmass kattusid ja mutatsioonid valgu liikuvust ei mõjutanud. Sellest järeldati, et MAGE-A10 N-terminuse modifitseerimine sõltub suuresti valgu pikemast N-terminaalsest osast. On ka võimalik, et antud katses kasutatud MAGE-A10 1-14 konstrukti iseloomust tulenevalt ei olnud näha ebatavalise liikuvuse efekti.

MAGE-A10 lokaliseerub tuumas, aga MAGE-A10 mutantide K6A, R7A, P5/K6/R7A ja P2/R3/P5/K6/R7A puhul lokaliseerub MAGE-A10 lisaks tuumale ka selgelt tsütoplasmas. Motiivid PKR ja PRXPKR sarnanevad kõige rohkem klassikalise NLS-iga. NLS-i kinnitamiseks tuleks läbi viia täiendavaid katseid. Kuna antud motiivi rikkumisel lokaliseerub MAGE-A10 teatud määral ikka tuumas, siis tõenäoliselt viiakse MAGE-A10 tuuma kasutades mitmeid mehhanisme.

Varasemalt on MAGE-A10 molekulaarseid omadusi kirjanduses vähe kirjeldatud, mistõttu lisavad antud töö tulemused teadmisi MAGE-A10 antigeenist. MAGE-A10 molekulaarsete omaduste ja funktsioonide kirjeldamine on oluline, et välja selgitada MAGE-A10 roll vähiarengus ning saada aru kas ja kuidas leiab MAGE-A10 kasutusala vähiravis ja diagnostikas.

## SUMMARY

### Characterisation of cancer-testis antigen MAGE-A10

Lisbeth Verk

Summary

MAGE-A10 (melanoma-associated antigen A) is a cancer-testis antigen (CTA). CTAs are widely expressed in different tumour types but their expression in normal tissue is restricted to testis and in some cases placenta. Because of their limited expression pattern, they have recently become of great interest as potential targets in cancer immunotherapies and diagnostical tools for diagnosis and prediction of treatment outcome.

One of the most studied CTAs is the MAGE-A protein family. The biological roles of MAGE-A family members are not yet well known. One of the most immunogenic members of the MAGE-A family is MAGE-A10. Previous studies have shown anomalous migration of MAGE-A10 in SDS-PAGE, but the reason for that is unknown. Unpublished results have shown that anomalous migration is mainly influenced by the first 120 amino acids. The first aim of this study was to characterise how mutations in the MAGE-A10 N-terminus affect the migration in SDS-PAGE.

The results showed that mutations P2/R3A, K6/R7A, P5/K6/R7A, P2/R3/P5/K6/R7A in MAGE-A10 clearly increase MAGE-A10 migration in SDS-PAGE. However, the experimental molecular mass was still somewhat greater than the calculated molecular mass. According to the results, the most plausible explanation of why MAGE-A10 migrates slower than expected in SDS-PAGE, is that the protein is post-translationally modified and added chemical groups increase the molecular mass of MAGE-A10. According to the results, motifs PR and (P)KR are proposed as potential sites which are recognised by modifying cellular enzymes. It is also possible that PRA(P)KR is one motif or that it is part of a larger motif. Further experimentation is needed to determine what are the exact modifications which are added to MAGE-A10.

Referred mutations had the same effect on full-length MAGE-A10 as well as MAGE-A10 1-120 deletant, which confirm that 1-120 part of MAGE-A10 is mostly responsible for the anomalous migration. Anomalous migration was not observed in case of MAGE-A10 1-14 deletant. It was concluded that larger N-terminal part of MAGE-A10 is needed for

modifications. It is also possible that the anomalous migration was not seen due to the properties of MAGE-A10 1-14 construct which was used in the experiment.

MAGE-A10 localises in the cell nucleus, unlike other members of the MAGE-A family, which localise in the cytoplasm. Localisation in the nucleus indicates that MAGE-A10 has a biological role in the nucleus. Previous unpublished results have shown that when the first 15 amino acids from MAGE-A10 N-terminus are deleted, MAGE-A10 localises also in the cytoplasm. Therefore, the second aim of this study was to analyse how mutations in N-terminus influence MAGE-A10 cellular localisation.

The results for cellular localisation showed that in the case of mutations K6A, R7A, P5/K6/R7A and P2/R3/P5/K6/R7A in MAGE-A10 N-terminus, there was a clear localisation in the cytoplasm in addition to nuclear localisation. This indicates that said mutations decrease the efficiency of nuclear transport of MAGE-A10. Motifs PKR and PRXPKR are potential nuclear localisation signals, with the amino acid composition most similar to classical nuclear localisation signals. There need to be done additional experiments to confirm if these motifs are sufficient enough to transport MAGE-A10 into the nucleus. The results also show that there are likely multiple mechanisms for MAGE-A10 transportation into the nucleus.

Molecular characteristics of MAGE-A10 have not been properly studied before, therefore results of this thesis add new knowledge about the antigen. Characterisation of MAGE-A10 and its functions are important to determine the MAGE-A10 antigen's biological role in cancer and to understand how can this antigen be used in cancer therapies and diagnostics.

## TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid prof Reet Kurge ja Margit Mutsot. Tänan Reeta, et ta andis mulle võimaluse uurimisgrupiga liituda ja pakkus mulle niivõrd huvitava lõputöö teema. Eriline tänu Margitile, kes mind igapäevaselt laboris kannatlikult juhendas ja lõputöö kirjutamisel suuresti abistas.

Tänan ka kõiki teisi TÜ Tehnoloogiainstituudi Reet Kure uurimisgrupi liikmeid, kes löid meeldiva töökeskkonna ning tekitasid minus huvi teadlase karjääri vastu. Eelkõige tahaks tänada Fred Väärtnõud, Eve Toomsood, Baiba Brūmelet ja Evgeniia Serovat, kes olid alati valmis mind laboris kõige vajalikuga abistama, ja Anneli Samelit, kes mulle esimesed vajalikud laborioskused selgeks õpetas.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Armougom, F., Moretti, S., Poirot, O., Audic, S., Dumas, P., Schaeli, B., Keduas, V., & Notredame, C. (2006). Espresso: Automatic incorporation of structural information in multiple sequence alignments using 3D-Coffee. *Nucleic Acids Research*, *34*(Web Server issue), W604-608. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl092>
- 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>
- 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<sup>1</sup>. *Cancer Research*, *61*(14), 5544–5551.
- Colemon, A., Harris, T. M., & Ramanathan, S. (2020). DNA hypomethylation drives changes in MAGE-A gene expression resulting in alteration of proliferative status of cells. *Genes and Environment*, *42*, 24. <https://doi.org/10.1186/s41021-020-00162-2>
- Daudi, S., Eng, K. H., Mhaweche-Fauceglia, P., Morrison, C., Miliotto, A., Beck, A., Matsuzaki, J., Tsuji, T., Groman, A., Gnjatic, S., Spagnoli, G., Lele, S., & Odunsi, K. (2014). Expression and Immune Responses to MAGE Antigens Predict Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *PLOS ONE*, *9*(8), e104099. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104099>
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J. J., Szikora, J. P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethé, B., & Lurquin, C. (1994). Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, *40*(5), 360–369. <https://doi.org/10.1007/BF01246677>

- 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>
- Dworetzky, S. I., & Feldherr, C. M. (1988). Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *The Journal of Cell Biology*, *106*(3), 575–584. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.575>
- Fanara, P., Hodel, M. R., Corbett, A. H., & Hodel, A. E. (2000). Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(28), 21218–21223. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002217200>
- Gjerstorff, M., Harkness, L., Kassem, M., Frandsen, U., Nielsen, O., Lutterodt, M., Møllgård, K., & Ditzel, H. (2008). Distinct GAGE and MAGE-A expression during early human development indicate specific roles in lineage differentiation. *Human reproduction (Oxford, England)*, *23*, 2194–2201. <https://doi.org/10.1093/humrep/den262>
- Hampoelz, B., Andres-Pons, A., Kastritis, P., & Beck, M. (2019). Structure and Assembly of the Nuclear Pore Complex. *Annual Review of Biophysics*, *48*, 515–536. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115308>
- Johnson, L. N., & Lewis, R. J. (2001). Structural basis for control by phosphorylation. *Chemical Reviews*, *101*(8), 2209–2242. <https://doi.org/10.1021/cr000225s>
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F., & Smith, A. E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature*, *311*(5981), 33–38. <https://doi.org/10.1038/311033a0>
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., & Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, *39*(3 Pt 2), 499–509. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90457-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90457-4)

- Klock, H. E., & Lesley, S. A. (2009). The Polymerase Incomplete Primer Extension (PIPE) method applied to high-throughput cloning and site-directed mutagenesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 498, 91–103. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-196-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-196-3_6)
- 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>
- Lange, A., Mills, R. E., Devine, S. E., & Corbett, A. H. (2008). A PY-NLS nuclear targeting signal is required for nuclear localization and function of the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA-binding protein Hrp1. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 12926–12934. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800898200>
- Lee, A. K., & Potts, P. R. (2017). A Comprehensive Guide to the MAGE Family of Ubiquitin Ligases. *Journal of Molecular Biology*, 429(8), 1114–1142. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.005>
- Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J., & Ruan, H. (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00741-y>
- Marmorstein, R. (2001). Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(6), 422–432. <https://doi.org/10.1038/35073047>
- Meek, D. W., & Marcar, L. (2012). MAGE-A antigens as targets in tumour therapy. *Cancer Letters*, 324(2), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.05.011>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(30), 11160–11165.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0510834103>
- Moore, M. S., & Blobel, G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, *365*(6447), Article 6447.  
<https://doi.org/10.1038/365661a0>
- Oldfield, C. J., Cheng, Y., Cortese, M. S., Brown, C. J., Uversky, V. N., & Dunker, A. K. (2005). Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins. *Biochemistry*, *44*(6), 1989–2000. <https://doi.org/10.1021/bi047993o>
- Paine, P. L., Moore, L. C., & Horowitz, S. B. (1975). Nuclear envelope permeability. *Nature*, *254*(5496), 109–114. <https://doi.org/10.1038/254109a0>
- Radu, A., Blobel, G., & Moore, M. S. (1995). Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(5), 1769–1773.
- Rajagopalan, K., Mooney, S. M., Parekh, N., Getzenberg, R. H., & Kulkarni, P. (2011). A majority of the cancer/testis antigens are intrinsically disordered proteins. *Journal of Cellular Biochemistry*, *112*(11), 3256–3267. <https://doi.org/10.1002/jcb.23252>
- Rimoldi, D., Salvi, S., Reed, D., Coulie, P., Jongeneel, V. C., 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*(6), 901–907. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990909\)82:6<901::AID-IJC21>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990909)82:6<901::AID-IJC21>3.0.CO;2-X)
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., & Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of

- bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, 64(3), 615–623.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90245-t](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90245-t)
- Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E. C., Brown, C. J., & Dunker, A. K. (2001). Sequence complexity of disordered protein. *Proteins*, 42(1), 38–48.  
[https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010101\)42:1<38::aid-prot50>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010101)42:1<38::aid-prot50>3.0.co;2-3)
- 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>
- Schultz-Thater, E., Piscuoglio, S., Iezzi, G., Le Magnen, C., Zajac, P., Carafa, V., Terracciano, L., Tornillo, L., & Spagnoli, G. C. (2011). MAGE-A10 is a nuclear protein frequently expressed in high percentages of tumor cells in lung, skin and urothelial malignancies. *International Journal of Cancer*, 129(5), 1137–1148.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.25777>
- Shang, S., Liu, J., & Hua, F. (2022). Protein acylation: Mechanisms, biological functions and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 396.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-01245-y>
- Shi, Y., Mowery, R. A., Ashley, J., Hentz, M., Ramirez, A. J., Bilgicer, B., Slunt-Brown, H., Borchelt, D. R., & Shaw, B. F. (2012). Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 21(8), 1197–1209.  
<https://doi.org/10.1002/pro.2107>
- 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), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrc1669>

- Spiro, R. G. (2002). Protein glycosylation: Nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, *12*(4), 43R-56R.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/12.4.43R>
- Zendman, A. J. W., Ruiter, D. J., & Van Muijen, G. N. P. (2003). Cancer/testis-associated genes: Identification, expression profile, and putative function. *Journal of Cellular Physiology*, *194*(3), 272–288. <https://doi.org/10.1002/jcp.10215>
- Ubersax, J. A., & Ferrell Jr, J. E. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(7), Article 7.  
<https://doi.org/10.1038/nrm2203>
- Uversky, V. N., & Dunker, A. K. (2010). Understanding protein non-folding. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1804*(6), 1231–1264. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.01.017>
- Uversky, V. N., Gillespie, J. R., & Fink, A. L. (2000). Why are „natively unfolded“ proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins*, *41*(3), 415–427.  
[https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20001115\)41:3<415::aid-prot130>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20001115)41:3<415::aid-prot130>3.0.co;2-7)
- Van den Steen, P., Rudd, P. M., Dwek, R. A., & Opdenakker, G. (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *33*(3), 151–208. <https://doi.org/10.1080/10409239891204198>
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B. J., Knuth, A., & Boon, T. (1991). *A Gene Encoding an Antigen Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Melanoma*.  
<https://doi.org/10.1126/science.1840703>
- van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R. J., Daughdrill, G. W., Dunker, A. K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D. T., Kim, P. M., Kriwacki, R. W., Oldfield, C. J., Pappu, R. V., Tompa, P., Uversky, V. N., Wright, P. E., & Babu, M. M. (2014). Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chemical Reviews*, *114*(13), 6589–6631. <https://doi.org/10.1021/cr400525m>

- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., & Gatto Jr., G. J. (2005). Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(45), 7342–7372. <https://doi.org/10.1002/anie.200501023>
- Wang, M. G., Zakut, R., Yi, H., Rosenberg, S., & McBride, O. W. (1994). Localization of the MAGE1 gene encoding a human melanoma antigen to chromosome Xq28. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 67(2), 116–119. <https://doi.org/10.1159/000133810>
- Weon, J. L., & Potts, P. R. (2015a). The MAGE protein family and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 37, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.002>
- Weon, J. L., & Potts, P. R. (2015b). The MAGE protein family and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 37, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.002>
- Yang, B., O'Herrin, S. M., Wu, J., Reagan-Shaw, S., Ma, Y., Bhat, K. M. R., Gravekamp, C., Setaluri, V., Peters, N., Hoffmann, F. M., Peng, H., Ivanov, A. V., Simpson, A. J. G., & 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>

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

Uniprot <https://www.uniprot.org> Viimati vaadatud 9.03.2023

T-COFFEE <https://tcoffee.crg.eu> Viimati vaadatud 8.05.2023

## LISAD

**Lisa 1. Plasmiidide genereerimiseks kasutatud praimerid**

| Plasmiid                        | Praimer              | Järjestus   |
|---------------------------------|----------------------|---|
| pQM MAGE-A10<br>P2A             | P2A_F                | 5' – ATG GCT CGA GCT CCA AAG CGT CAG<br>CGC TGC ATG CC – 3'     |
|                                 | P2A_R                | 5' – TCG AGC CAT CAC TAG AAG GCC TAC<br>GCG AAG CTT GG – 3'     |
| pQM MAGE-A10<br>R3A             | R3A_F                | 5' – CCT GCA GCT CCA AAG CGT CAG CGC<br>TGC ATG CCT GAA G – 3'  |
|                                 | R3A_R                | 5' – AGC TGC AGG CAT CAC TAG AAG GCC<br>TAC GCG AAG CTT G – 3'  |
| pQM MAGE-A10<br>P2/R3A          | P2A+R3A_F            | 5' – ATG GCT GCA GCT CCA AAG CGT CAG<br>CGC TGC ATG CCT – 3'    |
|                                 | P2A+R3A_R            | 5' – AGC TGC AGC CAT CAC TAG AAG GCC<br>TAC GCG AAG CTT – 3'    |
| pQM MAGE-A10<br>P5A             | P5A_F                | 5' – GCT GCA AAG CGT CAG CGC TGC ATG<br>CCT GAA GAA GAT – 3'    |
|                                 | P5A_R                | 5' – CTT TGC AGC TCG AGG CAT CAC TAG<br>AAG GCC TAC GCG – 3'    |
| pQM MAGE-A10<br>K6A             | A10 K6A F            | 5' – CCA GCC CGT CAG CGC TGC ATG CCT<br>GAA GAA – 3'            |
|                                 | A10 K6A R            | 5' – CTG ACG GGC TGG AGC TCG AGG CAT<br>CAC TAG – 3'            |
| pQM MAGE-A10<br>R7A             | A10 R7A F            | 5' – CCA AAG GCC CAG CGC TGC ATG CCT<br>GAA GAA – 3'            |
|                                 | A10 R7A R            | 5' – CTG GGC CTT TGG AGC TCG AGG CAT<br>CAC TAG – 3'            |
| pQM MAGE-A10<br>K6/R7A          | MAGEA10<br>K6A.R7A F | 5' – CCA GCC GCC CAG CGC TGC ATG CCT<br>GAA GAA – 3'            |
|                                 | MAGEA10<br>K6A.R7A R | 5' – CTG GGC GGC TGG AGC TCG AGG CAT<br>CAC TAG – 3'            |
| pQM MAGE-A10<br>P5/K6/R7A       | PKR 567 A_F          | 5' –GCT GCA GCC GCC CAG CGC TGC ATG<br>CCT GAA GAA – 3'         |
|                                 | PKR 567 A_R          | 5' –GGC TGC AGC TCG AGG CAT GAT GCT<br>AGA AGG CCT – 3'         |
| pQM MAGE-A10<br>P2/R3/P5/K6/R7A | 23+567_F             | 5' – GCT GCA GCC CCC CAG CGC TGC ATG<br>CCT GAA GAA GAT CT – 3' |
|                                 | 23+567_R             | 5' –CTG GGC GGC TGC AGC TGC AGC CAT<br>GAT GCT AGA AGG CCT – 3' |
| pQM MAGE-A10<br>1-120 P2/R3A    | P2A+R3A_F            | 5' – ATG GCT GCA GCT CCA AAG CGT CAG<br>CGC TGC ATG CCT – 3'    |
|                                 | P2A+R3A_R            | 5' – AGC TGC AGC CAT CAC TAG AAG GCC<br>TAC GCG AAG CTT – 3'    |

|  |                              |   |
|--|------------------------------|---|
| pQM MAGE-A10<br>1-120 K6/R7A             | MAGEA10<br>K6A.R7A F         | 5' – CCA GCC GCC CAG CGC TGC ATG CCT<br>GAA GAA – 3'            |
|  | MAGEA10<br>K6A.R7A R         | 5' – CTG GGC GGC TGG AGC TCG AGG CAT<br>CAC TAG – 3'            |
| pQM MAGE-A10<br>1-120 P5/K6/R7A          | PKR 567 A_F                  | 5' –GCT GCA GCC GCC CAG CGC TGC ATG<br>CCT GAA GAA – 3'         |
|  | PKR 567 A_R                  | 5' –GGC TGC AGC TCG AGG CAT GAT GCT<br>AGA AGG CCT – 3'         |
| pQM MAGE-A10<br>1-120<br>P2/R3/P5/K6/R7A | 23+567_F                     | 5' – GCT GCA GCC CCC CAG CGC TGC ATG<br>CCT GAA GAA GAT CT – 3' |
|  | 23+567_R                     | 5' –CTG GGC GGC TGC AGC TGC AGC CAT<br>GAT GCT AGA AGG CCT – 3' |
| pQM MAGE-A10<br>1-120<br>E13/E14/D15     | EED_AAA_F                    | 5' –CCT GCA GCA GCT CTT CAA TCC CAA<br>AGT GAG ACA CAG – 3'     |
|  | EED_AAA_R                    | 5' –AAG AGC TGC TGC AGG CAT GCA GCG<br>CTG ACG CTT TGG – 3'     |
| pQM MAGE-A10<br>1-14 P2A                 | P2A_F                        | 5' – ATG GCT CGA GCT CCA AAG CGT CAG<br>CGC TGC ATG CC – 3'     |
|  | P2A_egfp_R                   | 5' – TCG AGC CAT GGA TCC TCT AGA AGG<br>CCT ACG CGC TT – 3'     |
| pQM MAGE-A10<br>1-14 R3A                 | R3A_F                        | 5' – TCG AGC CAT GGA TCC TCT AGA AGG<br>CCT ACG CGC TT – 3'     |
|  | R3A_egfp_R                   | 5' – TCG AGC CAT GGA TCC TCT AGA AGG<br>CCT ACG CGC TT – 3'     |
| MAGE-A10 1-14<br>P2/R3A                  | P2A+R3A_F                    | 5' – ATG GCT GCA GCT CCA AAG CGT CAG<br>CGC TGC ATG CCT – 3'    |
|  | P2A+R3A_egfp_R               | 5' – ATG GCT GCA GCT CCA AAG CGT CAG<br>CGC TGC ATG CCT – 3'    |
| MAGE-A10 1-14<br>P5A                     | P5A_egfp_F                   | 5' – GCT GCA AAG CGT CAG CGC TGC ATG<br>CCT GAA GAA GGC – 3'    |
|  | P5A_egfp_R                   | 5' – CTT TGC AGC TCG AGG CAT GGA TCC<br>TCT AGA AGG CCT – 3'    |
| MAGE-A10 1-14<br>K6A                     | A10 K6A F                    | 5' – CCA GCC CGT CAG CGC TGC ATG CCT<br>GAA GAA – 3'            |
|  | A10 1-14 K6A R               | 5' – CTG ACG GGC TGG AGC TCG AGG CAT<br>GGA TCC – 3'            |
| MAGE-A10 1-14<br>K6/R7A                  | MAGEA10<br>K6A.R7A F         | 5' – CCA GCC GCC CAG CGC TGC ATG CCT<br>GAA GAA – 3'            |
|  | MAGEA10<br>K6A.R7A R<br>EGFP | 5' – CTG GGC GGC TGG AGC TCG AGG CAT<br>GGA TCC – 3'            |

## Lisa 2. MAGE-A perekonna valkude joendus

T-COFFEE, Version\_11.00 (Version\_11.00)  
 Cedric Notredame  
 CPU TIME:0 sec.  
 SCORE=84

\*  
 BAD AVG GOOD

\*  
 MAGEA1 : 88  
 MAGEA2 : 89  
 MAGEA3 : 89  
 MAGEA4 : 88  
 MAGEA5 : 38  
 MAGEA6 : 89  
 MAGEA8 : 88  
 MAGEA9 : 87  
 MAGEA10 : 85  
 MAGEA11 : 69  
 MAGEA12 : 89  
 cons : 8

```

MAGEA1 -----
MAGEA2 -----
MAGEA3 -----
MAGEA4 -----
MAGEA5 -----
MAGEA6 -----
MAGEA8 -----
MAGEA9 -----
MAGEA10 -----
MAGEA11 METQFRRGGLGCSPASIKRKKKREDSGDFGLQVSTMFSEDDFQSTERAPYGPQLQWSQDLPRVQVFREQANL
MAGEA12 -----
  
```

cons

```

MAGEA1 -----MSLEQRSSLHCKPEEAELEAQQEALGLVCVQAAT--
MAGEA2 -----MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATE
MAGEA3 -----MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATE
MAGEA4 -----MSSEQKSOHCKPEEGVEAQEEALGLVGAQAPTTE
MAGEA5 -----MSLEQKSOHCKPEEGLDTQEEALGLVGVQAATTE
MAGEA6 -----MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATE
MAGEA8 -----MLLGQKSQRYKAEGLQAQGEAPGLMDVQIPTAE
MAGEA9 -----MSLEQRSPHCKPDEDLEAQGEDLGLMGAQEPTGE
MAGEA10 -----MPRAPKRQRCMPEEDLQSQSETQGLEGAQAPLAV
MAGEA11 EDRSPRRTQRITGGEQVLWGPITQIFPTVRPADLTRVIMPLEQRSQHCKPEEGLQAQEEEDLGLVGAQALQAE
MAGEA12 -----MPLEQRSQHCKPEEGLEAQGEALGLVGAQAPATE
  
```

cons

\* : : .:\* ::\* \*\* .\*

```

MAGEA1 ----S-SS-----SPLVLGTLEEVPTA-GSTDPPQSPQGASAFPTTINFTRQRQP
MAGEA2 EQQTAS-SS-----STLVEVTLGEVPAA-DSPSPPHSPQGASSFSTTINYTLWRQS
MAGEA3 EQEAAS-SS-----STLVEVTLGEVPAA-ESPDPPQSPQGASSLPTTMNYPLWSQS
MAGEA4 EQEAAVSSS-----SPLVPGTLEEVPAA-ESAGPPQSPQGASALPTTISFTCWRQP
MAGEA5 EQEAVS-SS-----SPLVPGTLEEVPAA-GSPGPLKSPQGASAIPTAIDFTLWRQS
MAGEA6 EQEAAS-SS-----STLVEVTLGEVPAA-ESPDPPQSPQGASSLPTTMNYPLWSQS
MAGEA8 EQKAAS-SS-----STLIMGTLEEVTDS-GSPSPQSPQEGASSLTVTDSTLWSQS
MAGEA9 EEETTS-SSDS-----KEEEVSAA-GSSSPQSPQGGASSISVYYTLWSQF
MAGEA10 EEDASS-STSTSSSFSSFPSSSSSSSSSCYPLIPSTPEEVSADDETPNPPQSAQIACSSPSVVASLPLDQS
MAGEA11 EQEAAF-FS-----STLNVGTLEELPAA-ESPSPPQSPQEEFSPTAMDAIFGSLS
MAGEA12 EQETAS-SS-----STLVEVTLREVPAA-ESPSPPHSPQGASTLPTTINYTLWSQS
  
```

cons

. \* . : . \* : \* . :

```

MAGEA1 SEGSSSREEEGPSTSCI---L---ESLFRAVITKKVADLVGFLLLLKYRAREPVTKAEMLESVIKNYKHCFPE
MAGEA2 DEGSSNQEEEEGPRMFPD---L---ESEFQAALSRKMVELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLESVLRNCQDFFPV
MAGEA3 YEDSSNQEEEEGPSTFPD---L---ESEFQAALSRKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVGNWQYFFPV
MAGEA4 NEGSSQEEEEGPSTSPD---P---AESLFREALSNKVDLAHFLLLKYRAKELVTKAEMLERVIKNYKRCFPV
MAGEA5 IKGSSNQEEEEGPSTSPD---P---ESVFRAALSKKVADLIHFLLLKY---
MAGEA6 YEDSSNQEEEEGPSTFPD---L---ESEFQAALSRKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVGNWQYFFPV
MAGEA8 DEGSSSNEEEGPSTSPD---PAHLESLFREALDEKVAELVRFLLRKYQIKEPVTKAEMLESVIKNYKNHFPD
MAGEA9 DEGSSSQEEEEPSSSVDPPAQL---EFMFQEAALKLVAELVHFLLLHKYRVKEPVTKAEMLESVIKNYKRYFFV
MAGEA10 DEGSSSQKEESPSTLQVLPDS---ESLPRSEIDEKVTDLVQFLLFKYQMKEPITKAEILESSVIRNYEDHFPL
  
```

```

MAGEA11 DEGSQSQEKEGPSTSPD---LIDPEFSFSQDILHDKIIDLVHLLLRKYRVKGLITKAEMLGSVIKNYEDYFPE
MAGEA12 DEGSSNEEQEGPSTFPD---L---ETSFQVALSRKMAELVHFLLLKYRAREPFTKAEMLGSVIRNFQDFFPV

cons      :.*...:* *      *      *      :      :      * : . *      : ** **

MAGEA1   IFGKASESLQLVFGIDVKEADPTGHSYVLVTCLGLSYDGLLGDNQIMPKTGFLLIIVLVMIAMEGGHAPPEEI
MAGEA2   IFSKASEYLQLVFGIEVVEVVPISHLYILVTCLGLSYDGLLGDNQVMPKTGLLIIVLAI IAIEGDCAPEEKI
MAGEA3   IFSKASSSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCLGLSYDGLLGDNQIMPKAGLLIIVLAI IAREGDCAPEEKI
MAGEA4   IFGKASESLKMIFGIDVKEVDPASNTYTLVTCLGLSYDGLLGNNQIFPKTGLLIIVLGTIAMEGDSASEEEI
MAGEA5   -----
MAGEA6   IFSKASDSLQLVFGIELMEVDPIGHVYIFATCLGLSYDGLLGDNQIMPKTGFLLI IILAI IAKEGDCAPEEKI
MAGEA8   IFSKASECMQVIFGIDVKEVDPAGHSYILVTCLGLSYDGLLGDDQSTPKTGLLIIVLGMILMEGSRAPPEEI
MAGEA9   IFGKASEFMQVIFGTDVKEVDPAGHSYILVTALGLSCDSMLGDDGHSMKPAALLIIVLGVILTKDNCAPPEVI
MAGEA10  LFSEASECMLLVFGIDVKEVDPTGHSFVLVTSLGLTYDGM LSDVQSMKPTGILILILSIVFIEGYCTPEEVI
MAGEA11  IFREASVCMQLLVFGIDVKEVDPTSHSYVLVTSLNLSYDGIQCNEQSMKPSGLLIIVLGVIFMEGNCIPEEVM
MAGEA12  IFSKASEYLQLVFGIEVVEVVRIGHLYILVTCLGLSYDGLLGDNQIVPKTGLLIIVLAI IAKEGDCAPEEKI

cons      -----

MAGEA1   WEELSVMEVYDGREHSAYGEPRKLLTQDLVQEKYLEYRQVPSDPARYEFLWGPRALAE TSYVKVLEYVIKV
MAGEA2   WEELSMLEVFEGREDSVFAHPRKLLMQDLVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRALIETS YVKVLHHTLKI
MAGEA3   WEELSVLEVFEGREDSILGDPKLLTQHVFQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRALVETS YVKVLHMMVKI
MAGEA4   WEELGVMGVYDGREHTVYGEPRKLLTQDWVQENYLEYRQVPGSNPARYEFLWGPRALAE TSYVKVLEHVVRV
MAGEA5   -----
MAGEA6   WEELSVLEVFEGREDSIFGDPKLLTQYFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRALIETS YVKVLHMMVKI
MAGEA8   WEALSVMGLYDGREHSVYWKLRKLLTQEWVQENYLEYRQVAPGSDPVRYEFLWGPRALAE TSYVKVLEHVVRV
MAGEA9   WEALSVMGVYVGEHMFYGEPRKLLTQDWVQENYLEYRQVPGSDPAHYEFLWGSKAHAETS YEKVINYLVML
MAGEA10  WEALNMMGLYDGMELIYGEPRKLLTQDWVQENYLEYRQVPGSDPARYEFLWGPRAHAEIRKMSLLKFLAKV
MAGEA11  WEVLSIMGVYAGREHFLFGEPKLLTQNWVQEKYLVYRQVPGTDPACYEFLWGPRAHAE TSKMKVLEYIANA
MAGEA12  WEELSVLEASDGREDSVFAHPRKLLTQDLVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRALVETS YVKVLHLLLKI

cons      -----

MAGEA1   SARVRRFFFP SLREAAALREEEEGV-----
MAGEA2   GGEPHISYPP LHERALREGEE-----
MAGEA3   SGGPHISYPP LHEWVLEEGEE-----
MAGEA4   NARVRIAYPS LREAAALLEEEEGV-----
MAGEA5   -----
MAGEA6   SGGPRISYPP LHEWALREGEE-----
MAGEA8   NARVRIAYPS LHEEALGEE-KGV-----
MAGEA9   NAREPICYPS LYEEVLGEEQEGV-----
MAGEA10  NGSDPRSFP LWYEEALKDEEERAQDR IATDDTTAMASASSSATGFSFSYPE
MAGEA11  NGRDPTSYP SLYEDALREEEGEV-----
MAGEA12  SGGPHISYPP LHEWAFREGEE-----

cons      -----

```

**MAGE-A perekonna valkude joondus.** Joondamiseks kasutati T-COFFEE Espresso algoritmi (Armougom jt, 2006). Valkude aminohappelised järjestused võeti Uniprot andmebaasist. Sinise kastiga on märgitud MAGE-A10 esimesed 15 aminohapet, mis erinevad teiste MAGE-A perekonna esimestest aminohapetest ning millele antud töö käigus keskenduti.

## LIHTLITSENTS

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

Mina, Lisbeth Verk (sünnikuupäev 17.07.2001),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Vähi-testise antigeeni MAGE-A10 iseloomustamine“,

mille juhendaja on prof Reet Kurg ja kaasjuhendaja on PhD Margit Mutso,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace 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, alates **29.05.2026** 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.

*Lisbeth Verk*

Tartus, 29.05.2023