

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Olavi Reinsalu

**Melanoomi antigeenidega rikastatud
viirus-laadsete partiklite iseloomustamine**

Magistritöö

Juhendaja *Ph. D.* Reet Kurg

TARTU 2015

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Melanoom	6
1.2 Melanoomi antigeenid	7
1.2.1 MAGEA4 ja MAGEA10	7
1.2.2 MART1 ja TRP1	8
1.2.3 MCAM	9
1.3 Viirus-laadsed partiklid.....	9
1.3.1 VLP-de tüübid	10
1.4 VLP-de immunogeensus	11
2 EKSPERIMENTAALNE OSA.....	14
2.1 Töö eesmärgid.....	14
2.2 Materjalid ja meetodika	15
2.2.1 Kasutatud plasmiidid	15
2.2.2 Rakuliinid	15
2.2.3 Antikehad	15
2.2.4 Eukarüootsete rakkude transfekteerimine	16
2.2.5 Rakkude kogumine ja lüüsimine	17
2.2.6 VLP-de kontsentreerimine ja puhastamine.....	17
2.2.7 Geelektroforees ja <i>Western blot</i> analüüs	18
2.2.8 Voolutsütomeetria analüüs elusate rakkudega ja VLP-dega	18
2.2.9 Transmissioonielektronmikroskoopia (TEM)	20
2.2.10 Ensüümseoseline immunosorbtsioonanalüüs (ELISA)	20
2.3 Tulemused.....	21
2.3.1 Viirus-laadsete partiklite genereerimine.....	21
2.3.2 VLP-de analüüs elektronmikroskoobiga	25
2.3.3 Melanoomi antigeenide paiknemine VLP-des	26
2.3.4 Melanoomi antigeenide ekspressioon rakkudes	28
2.3.5 VLP-de vastane immuunvastus	30
2.4 Arutelu	34
2.4.1 Melanoomi antigeene kandvate MLV VLP-de formeerimine.....	34
2.4.2 VLP-indutseeritud antikehade iseloomustamine	36

Kokkuvõte	38
Tänuavaldused	39
Kasutatud kirjandus	40
Summary.....	50
Lisad	51
Lisa 1.....	51

Kasutatud lühendid

APC – antigeeni esitlevad rakud

BCR – B-raku retseptorid

CMV - tsütomegaloviirus

CTA – kasvaja/testise antigeenid

CTL – tsütolüütilised T-lümfotsüüdid

ELISA – ensüümseoseline immunosorbtsioonanalüüs

FCS – vasika loote seerum

Hef1A - inimese elongatsioonifaktor 1A

MAGEA4 - melanoomi-seoseline antigeen A4

MAGEA10 - melanoomi-seoseline antigeen A10

MART1 - T-rakkude poolt äratuntav melanoomi antigeen 1

MCAM – melanoomi raku adhesioonimolekul

MLV – hiire leukeemiaviirus

TEM - transmissioonelektronmikroskoopia

TRP1 - türosinaas-seoseline proteiin 1

VLP – viirus-laadne partikkel

Sissejuhatus

Melanoom on inimese ohtlikum naha pahaloomuline kasvaja, olles seotud enamuse nahakasvajate poolt põhjustatud surmadega. Igal aastal tuvastatakse enam kui 232 000 uut melanoomi juhtu maailmas ning selle esinemissagedus on tõusmas. Seni enimlevinud melanoomivastased ravimeetodid, nagu kirurgiline eemaldamine, kemoterapia jt., pole piisavalt efektiivsed ning praegu on loomisel ja arendamisel uudsed melanoomivastased ravimeetodid. Nende hulka kuulub ka terapeutiline kasvajakavastane vaktsiin, mis eeldab kasvajale unikaalsete või ainult kasvajas kõrgelt ekspresseeritud antigeenide olemasolu. Melanoomi puhul on avastatud mitmeid erinevaid antigeene, mis vastavad vaktsiini loomiseks vajalikele kriteeriumitele. Käesoleva uurimustöö jaoks on nenda hulgast väljavalitud viis antigeeni: MAGEA4, MAGEA10, MART1, TRP1 ja MCAM.

Vaktsiini efektiivseks toimimiseks tuleb organismi immuunsüsteemile esitleda antigeene võimalikult immunogeensel viisil. Puhastatud antigeen üksinda ei kutsu esile piisavat immuunvastust, et organism oleks ise võimeline kasvajakarakke efektiivselt hävitama. Selle probleemi lahendamiseks kasutatakse viirus-laadseid partikleid (VLP) kui antigeenide esitusplatvorme. VLP-d on kui virionid, mis ei kanna viiruslikku geneetilist materjali ning on seetõttu ohutud. Lisaks on VLP-sid kirjeldatud kui kõrgelt immunogeenseid komplekse, mis kutsuvad esile nii tugevat humoraalset kui ka rakulist vastust.

Käesoleva uurimustöö eesmärgiks on genereerida melanoomi antigeene sisaldavaid hiire leukeemiaviiruse (MLV) VLP-sid eukariootses rakusüsteemis ilma liitvalgu tehnoloogiat ja keemilist sidumist rakendamata ning iseloomustada saadud melanoomi antigeenidega rikastatud VLP-sid. Teine eesmärk on iseloomustada MAGEA4 ja MART1 kandvate MLV VLP-de poolt jänese indutseeritud antikehasid.

Uurimustöö valmis Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Melanoom

Tänapäeval võib pidada inimese üheks ohtlikumaks haiguseks pahaloomulist kasvajat. See geneetiliste ja keskkonna faktorite koosmõjul põhjustatud haigus võib tekkida igas elavas koes. Inimese suurimas organis – naha surmavaimaks kasvajatüübiks on melanoom. Melanoom on pigmentrakkudest ehk melanotsüütidest arenenud pahaloomuline kasvaja, mis esineb nahas, ajukelme pehmes koes, limaskestas ja söögitorus. Seda esineb harvem kui mitte-melanoomseid naha pahaloomulisi kasvajaid, kuid on enamuse nahakasvajaga seotud surmade põhjuseks. Melanoomi esineb kõige sagedamini valge nahaga inimestel, kes elavad päikeselises kliimas nagu Austraalias, Uus-Meremaal, Põhja-Ameerikas ja -Euroopas. Melanoomi juhtude arv kasvab kiiresti peamiselt noorte täiskasvanute hulgas (Parkin jt, 2005; Watson, 2012). Aastal 2012 tuvastati enam kui 232 000 uut naha melanoomi juhtu maailmas ning esines 55 000 melanoomiga seotud surma (Stewart ja Wild, 2014). Melanoomi põdevate patsientide elulemus viie aasta jooksul on ligi 85% arenenud maades ning ligi 40% arengumaades (Parkin jt, 2005).

Enim levinud meetod melanoomi ravis on kasvaja kirurgiline eemaldamine. Erinevatel allikatel väidetakse kirurgia edukuseks varajase melanoomi ravis olevat 77-98%. Kuid kirurgiliselt eemaldatud melanoom võib naasta ligi 50% tõenäosusega (Mohs jt., 1991; Bene jt., 2008). Melanoomi tagasi tulemise vähendamiseks kasutatakse kiiritusravi, kuid elulemust see ei paranda (Bastiaannet jt., 2005). Täiendavalt on võimalik rakendada ka adjuvandi teraapiat interferoon α -2b manustamise näol. Hoolimata kõrge doosist tõstab interferooni manustamine elulemust kõigest 3-5% ning esineda võivad tõsised kõrvalnähud (Kirkwood jt., 1996). Lisaks teostatakse ka kemoterapiat, kuid selle efektiivsus on piiratud, eriti metastaatilisse faasi jõudnud melanoomi puhul (Bajetta jt., 2002).

Praegu teostatakse palju erinevaid teaduslikke uuringuid uudsete kasvajakasvatuste ravimite loomiseks ja arendamiseks. Nende hulka kuulub ka terapeutiline kasvajakasvatane vaktsiin. Terapeutilised kasvajakasvatased vaktsiinid on heterogeenne grupp komplekseid bioloogilisi reagente, mis eristuvad tsütotoksilistest ainetest ning on ühtlasi ka ohutumad (Hoos jt., 2007). Terapeutiliste kasvajakasvatuste vaktsiinide eesmärk on kõrvaldada tuumorirakud, kasutades selleks organismi enda immuunsüsteemi (Giarelli, 2007). Sellele on võimalik läheneda mitte-spetsiifiliselt või antigeen-spetsiifiliselt. Mitte-spetsiifiline strateegia hõlmab immuunvastust stimuleerivate ainete süstimist kasvaja koesse ja selle ümbrusesse. Kuid efektiivsem on kasutada antigeen-spetsiifilist lähenemist, kasutades tuntud tuumori-seoselisi

antigeene või patsiendi enda tuumorkoe antigeene, lõppeesmärgiga rünnata tuumori rakke kogu organismis (Acres jt., 2007).

1.2 Melanoomi antigeenid

Terapeutiline kasvavastane vaktsiin eeldab antigeenide olemasolu, mis on tuumorirakkudes unikaalsed või on esindatud tuumorirakkudes kõrgemal määral võrreldes mitte-tuumorirakkudega. Melanoomil on tuvastatud mitmeid antigeene, mis on heaks kandidaadiks kasvavastaste vaktsiinide loomisel. Melanoomi antigeene saab jaotada nelja peamisse gruppi:

- a) idurakkude kasvaja/testise antigeenid (CTA-d), mis on somaatilistes rakkudes vaigistatud, kuid melanoomi rakkudes aktiveeritud, sh NY-ESO, MAGE, BAGE ja GAGE perekonna valgud;
- b) diferentsiatsiooni antigeenid, mida ekspresseerivad ka normaalsed melanotsüüdid, sh türosinaas, türosinaas-seoseline proteiin 1 (TRP1), gp100, MART-1 ja dopakroom tautomeraas;
- c) üle-ekspresseeritud antigeenid, mis sisuliselt on muteeritud auto-antigeenid, sh mutatsioonid β -kateniinides ja tsükliin-sõltuvas kinaasis 4.
- d) sekvesteeritud antigeenid ehk kõikjal olevad antigeenid, mis on tavaliselt immuuntuvastuse eest peidetud;

Mitte kõik melanoomid ei ekspresseeri kõiki melanoomi antigeene ning ühes tuumoris võivad antigeeni ekspressiooni tasemed läbi aja muutuda (Cormier jt., 2013; Gyorki jt., 2013).

1.2.1 MAGEA4 ja MAGEA10

Melanoomi-seoselise antigeeni A (MAGEA) geeniperekonna valgud on 50% - 80% ulatuses omavahel identsed. Inimeses ei ekspresseerita MAGEA valke normaalsetes kudedes üldse, v.a idurakkudes testises ning mõningatel juhtudel ka platsentas. Osa selle geeniperekonna valkudest ekspresseeritakse erinevat histoloogilist päritolu kasvaja tuumorirakkudes, sh ka melanoomis. Selliselt esinevad nad antigeenidena, mis tuntakse ära tsütolüütiliste T-lümfotsüütide (CTL) poolt (Boon ja Van den Eynde, 1999). Tänu nende tuumori-spetsiifilisele ekspressioonile on need antigeenid suurt huvi äratanud antituumori immuunoteraapias (Chomez jt., 2001).

MAGEA4 on 317 aminohappet pikk ning ta teoreetiline mass on 35 kDa. Normaalsetest rakkudest on MAGEA4 tuvastatud testistest, täpsemalt spermatogoonides ning palju väiksemal määral ka primaarsetes spermatotsüütides (Takahashi jt., 1995; Aubry jt., 2001). MAGEA4 funktsiooni ei ole veel suudetud üheselt kindlaks määrata. Osa uuringuid on näidanud, et MAGE4 omab apoptoosi soosivat rolli (Nagao jt., 2003; Peikert jt., 2006), samas kui teised väidavad hoopis vastupidist (Bhan jt., 2012). On näidatud, et hiire rakkudes ekspresseeritakse inimese MAGEA4 valk tsütoplasmasse (Jagur, 2014).

MAGEA10 on 72 kDa suurune tuuma valk, mida peetakse üheks immunogeenseimaks CTA-ks (Bricard jt., 2005; Sartorius jt., 2008). Normaalsetest kudedest leidub MAGEA10 ainult platsentas ja testises, täpsemalt spermatogoonide ning spermatotsüütide tuumades. MAGEA10 leidub väga paljudes erinevates histoloogist tüüpi kasvaja tuumorites, kusjuures väga kõrget ekspressiooni esineb kopsu, naha ja uroepiteeli kasvajatates (Rimoldi jt., 1999; Schultz-Thater jt., 2011). MAGEA10 funktsioon on veel teadmata.

1.2.2 MART1 ja TRP1

T-rakkude poolt äratuntav melanoomi antigeen 1 (MART1, tuntud ka kui Melan-A) on tüüp III membraani valk, mille molekulmass on ligi 23 kDa. MART1 lokaliseerub endoplasmaatilises retiikulumis, trans-Golgi võrgustikus ja melanosoomides (Kawakami jt., 1997; Rimoldi jt., 2001; De Maziere jt., 2002). Kuigi MART1-l puudub homoloogia teiste tuntud melanosoomsete valkudega ning ensümaatiline aktiivsus, on MART1 siiski kõrgelt rikastatud just varajastes melanosoomides (Kushimoto jt., 2001). MART1 omab suurt rolli Pmel17 ekspressiooni, stabiilsuse ja töötuse reguleerimises, mis on oluline melanosoomide arengus ning seetõttu ka pigmentatsioonis (Hoashi jt., 2005). On näidatud, et MART1 ekspresseeritakse 85-97% varajastes melanosoomides ning 57-92% metastaatilistes melanosoomides (Kaufmann jt., 1998; Rochaix jt., 2003; Reinke jt., 2005; Zhang jt., 2008).

TRP1 (tuntud kui ka TYRP1 ja gp75), molekulmassiga ligi 75 kDa, on ilmselt kõige enam esindatud melanosomaalne valk melanotsüütides. See tüüp I transmembraanne glükoproteiin koosneb 537 aminohappest ning ühtlasi omab 40-52% homoloogust türosinaasiga. Transmembraanse valguna kuulub see rakusisesesse melanosoomi ümbritsevasse membraani (Hearing ja Jiménez, 1989; Halaban ja Moellmann, 1990; Vijayasaradhi jt., 1991; Xu jt., 1998). TRP1 on oluline türosinaasi stabiliseerimisel ning selle katalüütilise aktiivsuse moduleerimisel, mis on omakorda oluline melaniini sünteesiks (Manga jt., 2000). Lisaks on näidatud, et TRP1 omab rolli melanotsüütide morfoloogia

kujunemises, melanotsüütide proliferatsioonis ning apoptoosis (Sarangarajan ja Boissy, 2001). On leitud, et primaarsetes melanoomides on TRP1 kõrgemal määral ekspresseeritud kui arenenud melanoomis ning melanoomi metastaasides, juba areneva melanoomi invasiivne front on üldiselt TRP1 negatiivne (De Vries 1998; Fang jt., 2001; De Wit jt., 2002; Bolander 2008).

1.2.3 MCAM

Melanoomi raku adhesioonimolekul (MCAM, tuntud kui ka CD146, MUC18, A32 antigeen või S-Endo-1), mis kuulub immunoglobuliinide superperekonda, on peamiselt ekspresseeritud endoteelsete rakkude rakuvaheliidestel, kus see otseselt interakteerub VEGFR-2-ga (Lehmann jt., 1987; Stalin jt., 2013). See 113 kDa massiga transmembraanne glükoproteiin avastati algselt melanoomis, kuid nüüdseks on leitud, et MCAM omab rolli arengus, signaalilekandes, rakumigratsioonis, mesenhümaalsete tüvirakkude diferentsiatsioonis, angiogeneesis ja immuunvastuses (Wang jt., 2013). On näidatud, et MCAM korreleerub inimese melanoomi rakkude tuumori paksuse ja metastaatilise potentsiaaliga hiirtes (Holzmann jt., 1987; Luca jt., 1993). MCAM köidab tähelepanu uudse melanoomi progressiooni ja kehvemate prognoosidega patsientide biomarkerina (Braeuer jt., 2014; Rapanotti jt., 2014). Kui hilisema astme melanoomid ekspresseerivad MCAM-i tugevalt, siis varajastes melanoomides antigeen on tuvastatav madalamatel tasemetel ning harvem (Satyamoorthy jt., 2001; Haass jt., 2005).

1.3 Viirus-laadsed partiklid

Sagedasti esineb olukordi, kus viirusega nakatunud rakus kokkupandud viiruse kapsiid vabaneb rakust ilma, et sellesse oleks viiruse geneetiline materjal sisse pakitud. Selliseid virioni sarnaseid osakesi nimetatakse viirus-laadseteks patrikliteks (VLP). VLP-d mimikeerivad virione koosnedes viiruse struktuurilistest komponentidest, mis on säilitanud omaduse iseseisvalt assambleeruda. Vastupidiselt elusatele viirustele, ei ole VLP-d võimelised nakatama ega replitseeruma, sest nad ei sisalda viiruse geneetilist materjali, kuid on sellegipoolest võimelised sisenema oma sihtmärkrakku (Grgacic ja Anderson, 2006). Arvatakse, et nakatunud rakud väljutavad VLP-sid, et kutsuda esile peremeesorganismi immuunvastust viiruse vastu (Ludwig ja Wagner, 2007). Esmakordselt kirjeldati VLP-sid aastal 1968, kui täheldati massilist tühjade 22- nm läbimõõduga partiklite moodustumist

hepatiit B viirusega nakatunud rakkudest (Bayer jt, 1968). Sellest ajast alates, tänu VLP struktuuri ja funktsioonide parema mõistmise ning geenitehnoloogilisele lähenemisele, on VLP-d leidnud mitmekülgset rakendust erinevates bioloogia harudes. Eelkõige on VLP-d atraktiivsed vaktsiini kandidaadid, sest neil on loomupäraselt tugevad immunogeensed omadused. Lisaks kasutatakse neid tänu oma struktuurilisele stabiilsusele ja manipuleeritavusele heteroloogsete molekulide kandjate ja esitlejatena ning ehitusblokkidena uudsetes nanomaterjalides (Felnerova jt., 2004; Mao jt., 2004; Ludwig ja Wagner, 2007).

VLP-de sünteesimiseks kasutatakse efektiivseid homoloogseid või peamiselt heteroloogseid ekspressiooni-süsteeme nagu bakteri, pärmi või eukarüootsed rakukultuurid (Johnson ja Chiu, 2000, Pumpens ja Grens, 2002). VLP-sid on võimalik toota kas ühest või mitmest modifitseerimata või rekombinantsest viiruse struktuurivalgust, moodustades vastavalt natiivseid või kimäärseid VLP-sid. Kimäärsete VLP-de loomiseks teostatakse kovalentseid modifikatsioone funktsionaalsete omadustega polüpeptiidide, nt immunoloogilised epitoobid, sihtmärkraku või kapseldumise signaalid, liitmise või asendamise teel. Selleks liidetakse vastav polüpeptiidi kodeeriv järjestus VLP monomeeri geenijärjestusse või liidetakse soovitud peptiid, valk või muu molekul keemiliselt sidudes (Pumpens ja Grens, 2002; Bachmann ja Dyer, 2004). Kimäärseid VLP-sid luuakse kolmel peamisel eesmärgil:

- a) võõrepitoopide esitlemine kasutades VLP-sid immunogeenide kandjatena eesmärgiga luua uusi vaktsiine;
- b) erinevate terapeutiliste ja diagnostiliste reagentide kapseldamine, sh nukleiinhapped vaktsiini adjuvantidena või geeniteraapiaks, valke või mRNA-d diagnostilistel või terapeutilistel eesmärkidel, madala molekulaarmassiga ravimite toimetamine spetsiifilistesse rakkudesse;
- c) VLP-de suunamiseks soovitud organisse, koesse või rakku (Pushko jt., 2013).

1.3.1 VLP-de tüübid

Erinevatel viirustel on erinevad kujud ning erinevad peremeesorganismid. Viirused omavad geneetilist materjali kas DNA või RNA kujul, kapsiidi ning osad lisaks ka ümbrist, mis pärineb peremeesorganismist. Sõltuvalt sellest, kas virion omab ümbrist või mitte, saab erinevate viiruste VLP-d jaotada kahte gruppi.

Esimest tüüpi ehk ümbriseta VLP-d koosnevad ühest või mitmest viiruse komponendist, mis on võimelised iseseisvalt partikli moodustama, ning ei sisalda peremeesraku komponente. Sellised VLP-d moodustuvad ümbriseta viirustel nagu papilloomi viirus, rotaviirus, poliüomaviirus, nodaviirus jpt. I tüüpi VLP-de rekombinantsete ikosaeedrilised ja väiksemal määral ka helikaalsed struktuurid pakuvad erakordselt efektiivset keskkonda võõraste oligopeptiidide kõrgtihedusega sümmeetriliseks esitluseks. Sümmeetriliste VLP-de algsete ja sisestatud epitoopide regulaarne ja korduv muster ning õige konformatsioon on tähtsad tugeva immunoloogilise vastuse esilekutsumiseks (Pumpens ja Grens, 2002; Bachmann ja Dyer, 2004; Pumpens jt., 2008). I tüüpi VLP-de eeliseks II tüüpi VLP-de ees on nende puhastamise lihtsus (Pushko jt., 2013).

Teist tüüpi VLP-d ehk ümbrisega VLP-d on suhteliselt keerulise struktuuriga, mille koostisesse kuulub peremeesraku membraan ehk ümbris. Sarnaselt I tüüpi VLP-dega, teevad epitoopide korduvad ja regulaarsed mustrid ning õige konformatsioon II tüüpi VLP-dest erakordselt efektiivsed immunogeenid (Warfield jt., 2007; Roy ja Noad, 2009). Ümbrisega VLP-d on palju paindlikumad antigeenide integreerimise suhtes, võimaldades esitleda mitmeid autoloogseid või heteroloogseid antigeene korraga (Buonoguro jt., 2001). Ümbrise lipiidne kaksikkiht on suhteliselt elastne, mis annabki paindlikkuse ja pakub arvestatavat struktuurilist mahutavust ning lubab ekspresseerida suuri epitoope või lausa terveid võõrvalke VLP integraalsete osadena (Pushko jt., 2013). Osa II tüüpi VLP-sid saab produtseerida modifitseerimata viiruse valkudest, samas kui teisi tuleb optimeerida ning geneetiliselt töödelda (Pushko jt., 2007; Wang jt., 2007; Warfield jt., 2007; McGinnes jt., 2011). Ümbrisega VLP-de produtseerimine ja puhastamine on komplitseeritum protsess võrreldes I tüüpi VLP-dega. Lisaks võivad puhastusetapis kaasa sattuda erinevad rakulised lipiidid, karbohüdraadid, valgud, nukleiinhapped ning isegi eksosoomid (Pushko jt., 2013). Teist tüüpi VLP-sid on võimalik luua ümbrisega viiruste põhjal, näiteks gripiviirused, flaviviirused, retroviirused jpt (Gheysen jt., 1989; Baumert jt., 1998; Latham ja Galarza, 2001).

1.4 VLP-de immunogeensus

Läbi evolutsiooni on selgroogsed omandanud adaptiivse immuunsüsteemi, mis on võimeline kiirelt tuvastama, eristama ja vastama neile korduvatele ja korrapärasele struktuuridele, mida omavad virionide ning ühtlasi ka VLP-de pinnad (Bachmann ja Zinkernagel, 1996). Korduvad epitoobid VLP pinnal ristseostavad B-lümfotsüütide pinnal olevaid immunoglobuliine, mis sisaldavad B-raku retseptoreid (BCR). BCR ristseostamine

ning BCR-signaliseerimise mikrodomäänide stabiliseerimine on kriitiliselt olulised signaalid B-raku aktivatsiooniks, millele järgneb kohene T-rakust sõltumatu IgM vastus (Bachmann jt., 1995; Thyagarajan jt., 2003). Regulaarse ja korduva paigutusega ekspresseeritud viiruslikud valgud kui ka VLP-del liidetavad antigeenid on palju immunogeensemad kui lahustunud kujul ning on võimelised ületama B-raku tolerantsust (Bachmann jt., 1993; Schodel jt., 1993; Justewicz jt., 1995). Esitledes VLP-del organismi enda antigeene on võimalik indutseerida nn auto-antikehasid, mis on suunatud organismi enda molekulide vastu, mis põhjustavad haigusi. Immuunvastus võimendub ka seetõttu, et need korduvate struktuuridega seonduvad väga hästi ka immunoloogilise komplemendisüsteemi komponendid kui ka multivalentesed loomulikud antikehad, väljendudes võimendatud fagotsütoosis (Fanger jt., 1996; Matsushita ja Fujita, 2001). Lisaks indutseerivad VLP-de valgulised osad T-rakust sõltuvaid IgG vastuseid, germinaalse keskuse loomist, hüpermuteerumist ja B-raku mälu (Bachmann ja Zinkernagel, 1997). VLP-d indutseerivad B-raku vastust maksimaalsel määral isegi ilma adjuvantide olemasoluta (Jegerlehner jt., 2007). VLP mõõtmetega väiksed partiklid on võimelised edukalt difundeeruma manustamispunkti lümfisõlmedesse. Seega VLP-d saavad siseneda sekundaarsetesse lümfoidsetesse organitesse ning otseselt interakteeruda B-rakkudega ja kutsuda esile antikeha vastust. Arvestades, et aktiivset transporti ega vastuvõttu pole VLP-de esitlemiseks tarvis, on võimalik esitleda konformatsioonist sõltuvaid epitoope ja seetõttu indutseerida optimaalset B-rakulist vastust (Jennings ja Bachmann, 2008).

Tänu VLP-de väikestele mõõtmetele ja partikulaarsele olemusele fagotsüteeritakse VLP-d efektiivselt antigeeni esitlevate rakkude (APC), eelkõige dentriitrakkude, poolt. Võrreldes lahustunud valkudega on VLP-del, kui molekulaarsetel agregaatidel, suurendatud pind, mis kannab laengut, hüdrofoobseid ja retseptoriga interakteeruvaid omadusi ning seega omavad paremat võimekust interakteeruda rakuliste pindadega. Partikulaarsetel struktuuridel esitletud antigeenide ristseondumise efektiivsus on võrreldav MHC II molekulide esitlemise efektiivsusega (Kovacsovics-Bankowski jt., 1993; Harding ja Song, 1994; Storni ja Bachmann, 2004). On näidatud, et VLP-sid töötlevad ainult nn professionaalsed APC-d, kuid mitte teised rakutüübid nagu T-rakud või fibroblastid (Ruedl jt., 2002). Seda peetakse efektor T-rakkude vastust soodustavaks omaduseks, sest mitte-professionaalsed APC-d pigem inhibeerivad T-rakkude vastust kui soodustavad seda. Nõnda nagu teised rekombinantset antigeenid, indutseerivad ka VLP-d tüüpiliselt nõrka T-rakulist vastust ilma kaasasündinud immuunsüsteemi lisastiimuliteta. Stiimulite olemasoluta jääb CTL vastus ebaefektiivseks ning katkendlikuks, mille parandamiseks on VLP luumenisse võimalik adjuvante sisse pakkida. Oluline omadus on VLP-de võime lisaks T-rakulise vastuse ülesehitusele ka juba

olemasolevaid T-rakulisi vastuseid turgutada. Kui enamus ülesehitus-turgutus strateegiates tuleb teha muutus antigeeni kandjates ülesehituse ja turgutuse vahepeal, siis VLP-dega on võimalik indutseerida ja säilitada T-rakulist vastust, kui samu VLP-sid manustatakse korduvalt (Jennings ja Bachmann, 2008).

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis on algatatud melanoomi antigeenide uuringute projekt, mille üheks osaks on retroviiruste hulka kuuluva hiire leukeemiaviiruse (MLV) viirus-laadsete partiklite põhjal melanoomi vastase vaktsiini väljatöötamine. On püstitatud hüpotees, et imetaja rakukultuuri viidud plasmiidilt, mis sisaldab MLV Gag ja ühte melanoomi antigeeni geenijärjestust, on võimalik genereerida MLV VLP-sid, mille pinnal on eksponeeritud uuritavad kasvaja antigeenid.

Käesoleva uurimustöö eesmärkideks on:

- a) imetaja koekultuuri rakusüsteemis melanoomi antigeene (MAGEA4, MAGEA10, MART1, TRP1 ja MCAM) sisaldavate MLV-l baseeruvate viirus-laadsete partiklite genereerimine;
- b) melanoomi antigeenidega rikastatud MLV Gag valgul baseeruvate VLP-de iseloomustamine;
- c) MAGEA4 ja MART1 kandvate MLV VLP vastase antikehalise immuunvastuse iseloomustamine.

2.2 Materjalid ja meetoodika

2.2.1 Kasutatud plasmiidid

Melanoomi spetsiifiliste antigeenide ekspresseerimiseks VLP-de pinnal kasutati pQMCF vektorit (Icosagen).

pQMCF-MLV-MAA (MAA-*melanoma-associated antigen*) vektorilt ekspresseeritakse tsütomegaloviiruse promootori CMV alt MLV Gag ja inimese elongatsioonifaktor 1A promootorilt (Hef1A) melanoomi spetsiifiline antigeen. pQMCF vektorid konstrueeris Kiira Gildemann (TÜTI).

Plasmiidide paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5a. Transformeeritud bakterirakke kasvatati LB söötmes kanamütsiini selektsiooni all lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml. Plasmiidide eraldamiseks kasutati *FavorPrepTM Plasmid DNA Extraction Mini Kit-i* (*Favorgen*) tootja protokoll järgi.

2.2.2 Rakuliinid

Uurimistöö teostamisel kasutati imetaja rakuliini Cop5EBNA, 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 juures 5% CO₂ keskkonnas (*Galaxy R CO₂ Incubator*).

2.2.3 Antikehad

Käesolevas uurimistöös kasutati nii meie laboris genereeritud afiinsuspuhastatud melanoomi antigeenide vastaseid antikehasid kui ka kommertsiaalseid antikehasid. Afiinsuspuhastatud antikehad olid puhastatud jänese vereseerumist, kes olid immuniseeritud kahel moel. Jäneste immuniseerimiseks kasutati esiteks melanoomi antigeene MAGEA4, MAGEA10, mIgG2a- MART1 ja TRP1. MAGEA-d toodeti ja puhastati *Escherichia coli*-st, mida teostas Kadri Õunap ning mIgG2a-MART1 ja TRP1 eukarüootsetest CHO rakkudest, mida teostas Liisi Võsa. Teiseks immuniseeriti jäneseid MLV VLP-dega, mis kandsid MAGEA4 või MART1 antigeene, need olid toodetud ja puhastatud Cop5EBNA rakkudest Sergei Jaguri poolt. Jäneseid immuniseeriti ning antikehad puhastati biotehnoloogiaettevõttes Icosagen AS. Kommertsiaalsetest antikehadest olid kasutusel hiires produtseeritud MCAM

ning jänesele produtseeritud MLV Gag antikehad. Optimaalsed kasutatud antikehade kontsentratsioonid on toodud allolevas tabelis (tabel 1).

Tabel 1. Uurimistöös kasutatud primaarsed antikehad. Igale antikehale on toodud tema kasutamise kontsentratsioon vastavalt analüüsi tüübile.

Päritolu	Antikeha	Western blot	Voolutsütomeetria
Primaarsed aafiinsuspuhastatud antikehad			
Jänesele	anti-MAGEA4	0,1 µg/ml	1 µg/ml
	anti-VLP-MAGEA4	0,7 µg/ml	2 µg/ml
	anti-MAGEA10	0,6 µg/ml	2 µg/ml
	anti-MART1	0,5 µg/ml	2 µg/ml
	anti-VLP-MART1	1,9 µg/ml	2 µg/ml
	anti-TRP1	0,4 µg/ml	2 µg/ml
Primaarsed kommertsiaalsed antikehad			
Hiiresle	anti-MCAM (<i>Santa Cruz Biotechnology</i>)	0,1 µg/ml	2 µg/ml
Jänesele	anti-MLV Gag (<i>Icosagen</i>)	0,3 µg/ml	2 µg/ml

2.2.4 Eukariootsete rakkude transfekterimine

Plasmiidide viimiseks Cop5EBNA rakkudesse kasutati elektroporatsiooni meetodit. Selleks koguti rakud 100 mm läbimõõduga 70-80% konfluentsuseni kasvanud koekultuuri tassidelt: sööde aspireeriti ning rakke pesti PBS-iga. Seejärel rakud eemaldati tassilt 2 ml trüpsiinilahusega (0,05% trüpsiin, 0,02% EDTA PBS-s, *GE Healthcare*) ning kanti tsentrifuugitopsi, kus oli 5 ml IMDM söödet. Rakud tsentrifuugiti põhja 1000 rpm 20°C juures 5 minutit (*Eppendorf centrifuge 5810R*). Supernatant aspireeriti ning rakudele lisati 250 µl söödet ühe poratsiooni kohta. pH hoidmiseks kasutati NaBES puhvrit (pH=7,5) lõppkontsentratsioonis 5 mM. Elektroporatsiooni küvetis segati 50 µg *carrier* DNA-d (löhe sperma DNA), 2 µg ekspressioonivektoreid ja 250 µl rakususpensiooni. Elektroporatsioon viidi läbi *BioRad Gene Pulser II* aparaadiga 975 µF mahutavuse ning 230 V pingele juures. Poreeritud rakud kanti 15 milliliitristesse koekultuuri tuubidesse, millesse oli eelnevalt pandud 5 ml söödet ning tsentrifuugiti 5 minutit 1000 rpm temperatuuril 20°C (*Eppendorf centrifuge 5810R*). Seejärel sööde aspireeriti, rakud resuspendeeriti 1 ml söötmes ning kanti 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassidele, mis sisaldasid 8 ml söödet.

2.2.5 Rakkude kogumine ja lüüsimine

Elektroporeeritud Cop5EBNA rakke kasvatati 72 tundi temperatuuril 37°C 5% CO₂ keskkonnas (*Galaxy R CO₂ Incubator*), mille järel koguti sööde. Pärast söötme kogumist pesti rakud PBS-ga, eemaldati need 2 ml trüpsiinilahusega ning koguti 1,5 ml tsentrifuugituubidesse ja tsentrifuugiti tuubi põhja lauatsentrifuugis (Sigma 1-14) pööretel 4000 rpm 5 minutit. Supernatant aspireeriti ning rakusade pesti PBS-ga, mille järel proov tsentrifuugiti sarnaselt eelmisele korrale. Supernatant taaskord aspireeriti ning rakusade resuspendeeriti 150 µl PBS-s ja lüüsi 30 µl 5xLaemmli puhvris [10% SDS, 50% glütserool, 250 mM Tris pH 6,8; 0,5% broomfenoolsinine] kuumutamiseks 10 minutit temperatuuril 100°C. Rakulüsaate hoiustati temperatuuril -20°C.

2.2.6 VLP-de kontsentreerimine ja puhastamine

VLP-de kogumiseks kasvatati elektroporeeritud Cop5EBNA rakke 72 tundi temperatuuril 37°C 5% CO₂ keskkonnas (*Galaxy R CO₂ Incubator*), mille järel koguti sööde, mis valati tsentrifuugitopsi ja tsentrifuugiti 2000 rpm temperatuuril 20°C 10 minutit (*Eppendorf centrifuge 5810R*). Seejärel sööde filtreeriti läbi 0,45 µm filtri (*Sarstedt*).

VLP-de kontsentreerimiseks söötme proovid tsentrifuugiti läbi 5 ml 20% sahharoosi padja PBS-is temperatuuril 4°C 3 tundi 27000 rpm (SW28 rootor, *Beckmann*). VLP sade lahustati 300 µl TN puhvris (0,1M NaCl; 0,05M Tris-HCl) 24 tundi 4°C juures. Järgmisel päeval määrati proovides üldvalgu kontsentratsioon Bradfordi meetodil. 2 µg valku võeti *Western blot* analüüsile: vastavalt VLP proovi mahule lisati samas mahus 2xLaemmli puhvrit ja kuumutati 10 minutit 100°C juures.

VLP-de puhastamise järgmises etapis kasutati sahharoosi astmelise gradiendi ultratsentrifuugimist. Gradiendile, mis koosnes 20%, 35%, 45% ja 60% sahharoosi lahustest PBS-is, kanti 250 µl TN puhvris olevad VLP proovid ja tsentrifuugiti temperatuuril 4°C 1,5 tundi 32000 rpm (SW55 rootor, *Beckmann*). Gradiendid jagati 10 fraktsiooniks ja analüüsiti *Western blot* meetodil.

2.2.7 Geelektroforees ja *Western blot* analüüs

Uuritavate valkude visualiseerimiseks lahutati valgud SDS polüakrüülamiidgeelis elektroforeesi (*SDS-Page*) teel. Geelile kanti 2 µg valku VLP proovide puhul ning 2 µl rakulüsaatide puhul. Kasutati 8%, 10% ja 12% akrüülamiidgeele ja SDS jooksupuhvrit (125 mM Tris, 960 mM glütsiin, 0,5% SDS).

Rakulüsaate ja VLP-de proove lahutati SDS polüakrüülamiidgeelelektroforeesi meetodil, kasutades 8%, 10% ja 12% akrüülamiidgeele ja SDS jooksupuhvrit. Valgud kanti geelist üle PVDF (*polyvinylidene fluoride*) filtrile (*Immobilon-P Millipore 0,45 µm*) poolkuiva ülekande abil (*Semi-Trans-Blotter, Bio-Rad Manufactory*). Ülekanne viidi läbi 15 minutit pingel 15 V. Seejärel filter blokeeriti toatemperatuuril 1 tund blokeerimislahuses [50 mM Tris-Cl, pH 7.6; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20 + 5% NFDM (*non-fat dry milk*)]. Melanoomi spetsiifiliste antigeenide detekteerimiseks kasutati uuritavate antigeenide spetsiifilisi antikehi. Inkubeerimislahusesse [50 mM Tris-Cl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20 + 1% NFDM] lisati antikeha sobivas kontsentratsioonis (tabel 1) ja inkubeeriti 1 tund kallutil. Pärast seda pesti filtrit kolm korda 5 minutit Westerni pesulahuses [100 mM Tris-Cl, pH 7,5; 170 mM NaCl; 0,05% Tween 20]. Filter inkubeeriti 1 tund kallutil inkubeerimislahuses, kuhu oli vastavalt primaarsele antikehale lisatud HRP-ga konjugeeritud sekundaarne antikeha (*Lab AS*) lahjendusega 1:10000. Seejärel filter pesti kolm korda 10 minutit Westerni pesulahusega ning viidi läbi ilmutamisreaktsioon ECL komplektiga (*Amersham Pharmacia Biotech*) vastavalt tootja protokollile. Signaal visualiseeriti autoradiograafiliselt *Fuji* röntgenfilmile.

2.2.8 Voolutsütomeetria analüüs elusate rakkudega ja VLP-dega

Voolutsütomeetria katsete tarvis kasvatati transfekteeritud Cop5EBNA rakke 24 tundi temperatuuril 37°C 5% CO₂ keskkonnas (*Galaxy R CO2 Incubator*), mille järel sööde aspireeriti ning rakke pesti PBS-ga. Rakud eemaldati plaadilt 1 ml 3 mM EDTA-ga PBS-s ning kanti 1,5 ml tsentrifuugituubidesse. Seejärel need tsentrifuugiti 5 min 400xg (*Sigma I-14*) ning supernatant eemaldati. Elusale rakumassile lisati 1 ml jääkülma 10% FCS PBS-s. Edasi jätkati 100 µl rakususpensiooniga iga erineva rakuproovi jaoks voolutsütomeetria katsetes. Allesjäänud rakususpensioonid lüüsi sarnaselt peatükis 2.2.5 kirjeldatuga ning säilitati temperatuuril -20°C.

Kogutud 100 µl-sed elusate rakkude suspensiooniproovid blokeeriti 5% BSA/PBS-s pöörlejal 30 min temperatuuril 4°C. Seejärel need tsentrifuugiti 5 min 400xg ning eemaldati supernatant. Rakumassid resuspendeeriti 3% BSA/PBS lahustes, millesse oli lisatud sobivas kontsentratsioonis primaarseid uuritavate valkude vastaseid antikehasid (tabel 1, peatükk 2.2.3), ning inkubeeriti pöörlejal pimedas 1 h temperatuuril 4°C. Järgnevalt pesti proove, tsentrifuugides 5 min 400xg ja suspendeerides 3% BSA/PBS-s, kolm korda. Seejärel suspendeeriti rakuproovid 3% BSA/PBS-s, millesse oli lisatud vastavalt primaarsele antikehale Alexa488 fluorokroomiga konjugeeritud sekundaarne antikeha (*Invitrogen*) lahjendusega 1:1000, ning inkubeeriti pimedas pöörlejal 1 h temperatuuril 4°C. Pärast inkubeerimist taaskord pesti proove kolm korda. Rakud resuspendeeriti jääkülmas 500 µl 10% FCS/PBS-s ning mõõdeti voolutsütomeetria analüsaatoriga (LSR II, *BD Biosciences*) kasutades programmi *BD FACSDiva Software* (*BD Biosciences*). Tulemused analüüsiti programmis *FlowJo VX* (*Tree Star*).

VLP-dega katseteks võeti VLP-sid läbi sahharoosi padja puhastatud VLP proovidest kui ka läbi sahharoosi gradiendi puhastatud fraktsioonide proovidest. Mõlemal juhul lisati 30 µg (totaalvalgu järgi) VLP-dele 10 µl aldehüüd/sulfaat latekskerakesi (*Life Technologies*) ja inkubeeriti 15 min toatemperatuuril. Seejärel lisati PBS-i lõppmahuni 1 ml ning inkubeeriti pöörlejal üleöö temperatuuril 4°C. Järgmisel päeval blokeeriti VLP-dega latekskerakesed 100 mM glütsiin/PBS-is pöörlejal 30 min temperatuuril 4°C. Järgnevalt pesti kerakesi kolm korda: tsentrifuugiti 4000xg 15 min lauatsentrifuugis (Sigma 1-14), supernatant eemaldati ning kerakesed suspendeeriti pesupuhvris (2% BSA/PBS). Seejärel lisati uuritavate valkude vastaseid primaarseid antikehasid (tabel 1, peatükk 2.2.3) ning inkubeeriti 1 h pimedas pöörlejal temperatuuril 4°C. Taaskord pesti kerakesi kolm korda nagu eelnevalt. Peale pesu lisati Alexa488 fluorokroomi kandvaid sekundaarseid antikehasid (*Invitrogen*) vastavalt kasutatud primaarsetele antikehadele lahjendusega 1:1000 ning inkubeeriti 1 h pimedas pöörlejal temperatuuril 4°C. Veelkord pesti kerakesi kolm korda nagu eelnevalt, mille järel resuspendeeriti kerakesed 500 µl pesupuhvris ning 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 Transmissioonelektronmikroskoopia (TEM)

TEM-i tarvis koondati iga erineva VLP fraktsioonide seeriast kolm kõige kontsentreeritumat fraktsiooni üheks suspensiooniks, millest kontsentreeriti VLP-d kasutades 0,5 ml tsentrifugaalfiltreid (*Amicon Ultra, Millipore*) tootja protokoll järgi. Saadud proovidega teostati TEM vaatlused TUMRI-s Kärt Padari poolt. Preparaatide negatiivvärvimiseks kasutati 2% uranüülatsetaadi lahust. Vaatluseks kasutati transmissioonelektronmikroskoopi *FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN* pingel 120 kV. TEM pildid tehti 11 megapikselse digitaalkaameraga *Orius SC1000 CCD*.

2.2.10 Ensüümseoseline immunosorbtsioonanalüüs (ELISA)

96 kaevukesega ELISA plaat kaeti puhastatud VLP proovidega. Igasse kaevukesse lisati 0,1% Tween-20/PBS-is segatud 2 µg VLP-d ning inkubeeriti üleöö temperatuuril 4°C. Järgmisel päeval plaat pesti kolm korda 0,1% Tween-20/PBS lahusega mitteseondunud VLP-de eemaldamiseks. Mittespetsiifiliste seondumissaitide blokeerimiseks lisati kaevukestesse 5% NFDM, 2% BSA ja 0,1% Tween-20/PBS lahust ning inkubeeriti plaati 1 tund temperatuuril 37°C. Seejärel plaat pesti 4 korda 0,1% Tween-20/PBS lahusega. Igasse kaevukesse lisati uuritavatele valkudele vastavaid spetsiifilisi primaarseid antikehi erinevates kontsentratsioonides: 10 ng/ml, 2,5 ng/ml, 0,625 ng/ml ja 0,156 ng/ml 0,1% Tween-20/PBS lahuses. Primaarsete antikehadega inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril loksutil. Järgnevalt pesti plaat taas neli korda 0,1% Tween-20/PBS lahusega, kusjuures üks kord lihtsalt loputades ja kolmel korral loksutil 3 minutit loksutades. Seejärel proovidele lisati vastavaid HRP-ga konjugeeritud sekundaarseid antikehasid 0,1% Tween-20/PBS lahuses, nii anti-hiir kui ka anti-jänese, lahjendusega 1:10000 ning inkubeeriti 45 minutit toatemperatuuril loksutil. Seejärel plaadid pesti jälle 4 korda 0,1% Tween-20/PBS lahusega ning lisati *TMB + Substrate (BioRad)* reagent ja inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Reaktsiooni peatamiseks lisati 0,5M H₂SO₄. Reaktsioonide analüüsimiseks kasutati *Sunrise™ (Tecan)* mikroplaadi lugejat ning tulemus mõõdeti lainepikkusel 450 nm.

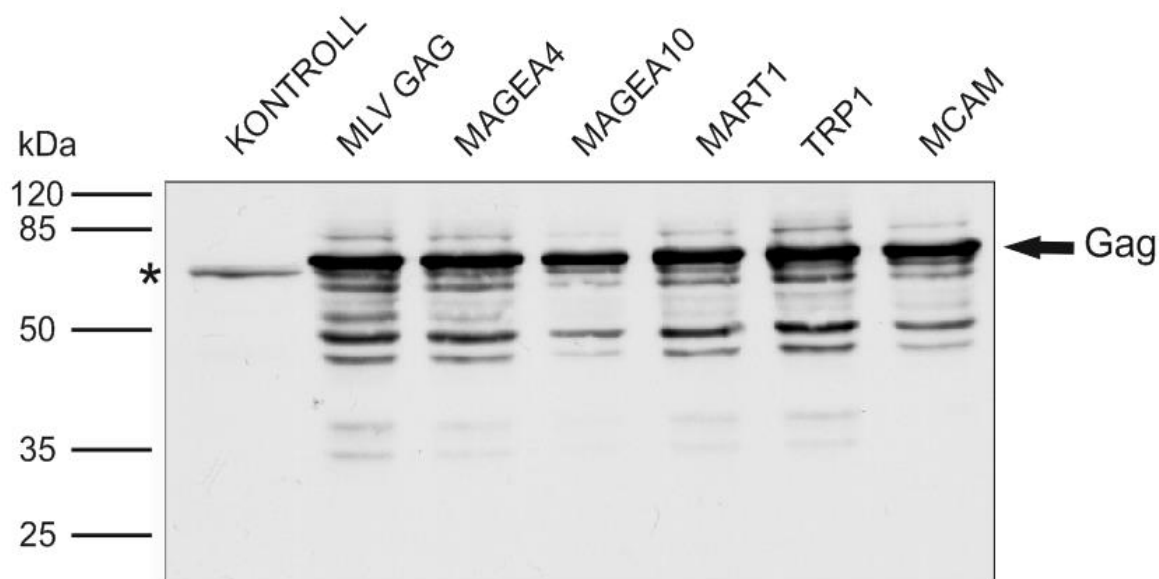
Sarnaselt eelmises lõigus kirjeldatuga teostati ELISA teste jänese vereseerumite analüüsiks. Igale plaadile kanti VLP-de asemel 2 µg melanoomi antigeene ning kasutatud vereseerumite lahjendused olid järgmised: 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 ja 1:12800. Ülejäänud etapid on samasugused nagu ülal kirjeldatud.

2.3 Tulemused

2.3.1 Viirus-laadsete partiklite genereerimine

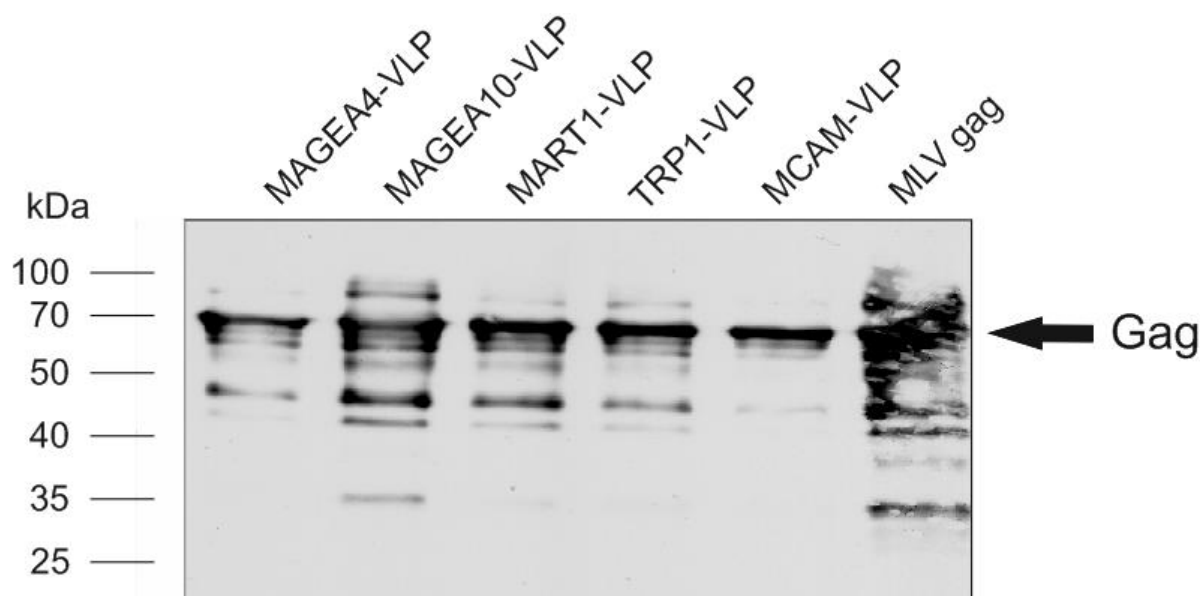
Melanoomi antigeene sisaldavate VLP-de genereerimiseks ja puhastamiseks kasutati 2014. aastal valminud S. Jaguri magistritöö raames välja töötatud meetodikat. Meetod hõlmab eukarüootsete rakkude transfekkeerimist MLV Gag-i ja üht antigeeni geenijärestust kandvate plasmiididega ja kahte olulisemat VLP puhastusetappi.

MLV-l põhinevate VLP-de moodustamiseks on vajalik Gag valgu ekspressioon. Selle kontrollimiseks elektroporeeriti hiire fibroblastirakke Cop5EBNA plasmiididega pQMCF-MLV Gag-MAA. Transfekteeritud rakkudel lasti kasvada ja ekspresseerida MLV Gag valku ning uuritavaid melanoomi antigeene vastavalt plasmiidile 24 tunni jooksul. Seejärel rakkudelt eemaldati sööde, nad lüüsiiti *Western blot*-i jaoks ning analüüsiti. Kasutades MLV Gag-i spetsiifilist antikeha tehti *Western blot*-iga kindlaks, et transfektsioonid olid edukad ning rakud produtseerisid MLV Gag-i märkimisväärset hulgal (joonis 1). Erinevate plasmiididega transfekteeritud rakkude produtseeritud MLV Gag-i hulgad erinesid minimaalselt.



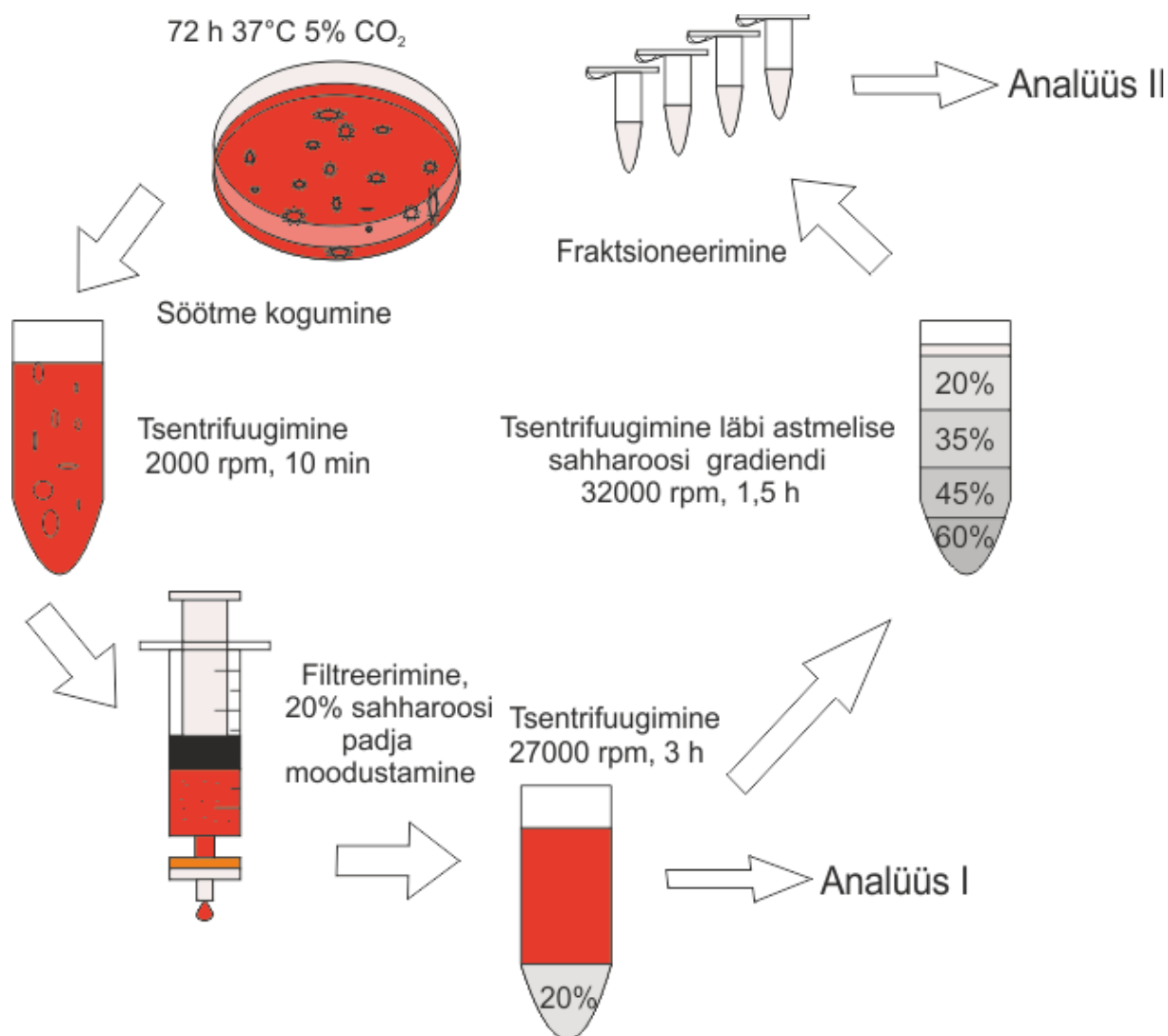
Joonis 1. Western blot analüüs transfekteeritud Cop5EBNA rakulüsaatidest MLV Gag spetsiifilise antikehaga. Cop5EBNA rakud lüüsiiti 24 h pärast transfektsiooni pQMCF-MLV Gag ja pQMCF-MLV Gag-MAA plasmiididega. Elektroforeesil kanti 2 µl igat lüsaadi proovi geeli radadele. Western blot-is inkubeeriti proove anti-MLV Gag antikehadega. Kontrollproov on rakulüsaat plasmiidiga transfekteerimata rakkudest. MLV Gag valgule vastavad bändid on tähistatud noolega. Kontrollproovil on näha antikeha ristreaktsiooni mõnele rakulisele valgule, mis on tähistatud tärniga.

Olles veendunud, et transfecteeritud Cop5EBNA rakud on võimelised ekspresseerima Gag valku, lasti rakkudel 72 tunni jooksul produtseerida VLP-sid, mis punguvad membraansete partiklitenä rakkude sötmesse. Kolme ööpäeva möödudes koguti rakkude sötme tseentrifuugituubidesse, milles need tseentrifuugiti ning filtreeriti läbi 45 µm-se filtri, et vabaneda sötmesse jäänud rakkude jäänustest jms. VLP-de kontseentreerimiseks ning puhastamiseks ultratseentrifuugiti sötmed läbi 20% sahharoosi padja PBS-s, mille tulemusena moodustunud sade suspendeeriti TN puhvrts. Nõnda moodustusid nõ. esmased VLP-de proovid, mille totaalvalgul põhinevad valgulised kontseentratsioonid jäid vahemikku 320-950 µg/ml. Poratsiooni ning ühtlasi ka VLP-de produktsiooni edukuse hindamiseks teostati *Western blot* analüüs tuvastades MLV Gag valgu olemasolu MLV Gag spetsiifilise antikeha abil. Selleks tuli eelnevalt VLP proovid Laemmlts puhvrts lüütsida ning lahutada polüakrüülamiidgeelis. Nagu on näha joonisel 2, on VLP-de formeerimine olnud edukas ning MLV Gag valku esineb üsnagi kõrges kontseentratsioonis kõigis VLP proovides. Lisaks saab täheldada, et melanoomi antigeenideta VLP-de puhul on MLV Gag valgu hulk veidi kõrgem, kui antigeene kandvatel VLP-del.



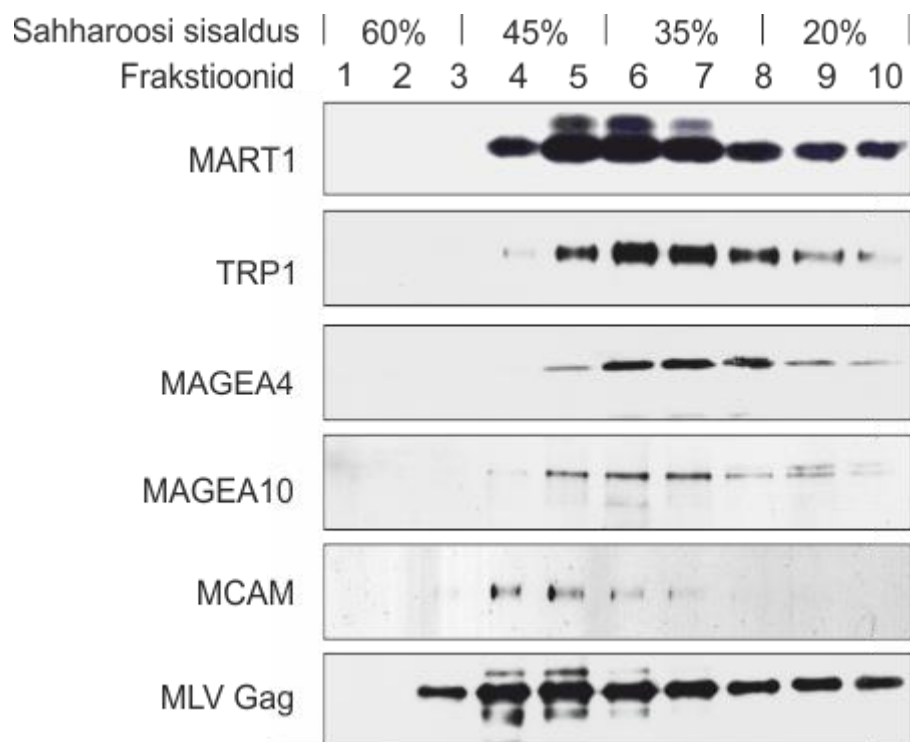
Joonis 2. *Western blot* analüüs läbi 20% suhkrupadja puhastatud VLP proovidest. Cop5EBNA rakkudele koguti sötme 72 h pärast transfectiooni pQMCF-MLV Gag ja pQMCF-MLV Gag-MAA plasmididega. Sötmed filtreeriti läbi 45 µm filtri ning tseentrifugeeriti läbi 20% sahharoosi padja. Elektroforeesil kanti 2 µg totaalvalgu järgi igat VLP proovi geeli radadele. *Western blot*-is inkubeeriti proove anti-MLV Gag antikehadega. Gag valgule vastavad bändid on tähistatud noolega.

Läbi 20% sahharoosi padja puhastatud VLP proovidega on võimalik teostada erinevaid katseid VLP-de analüüsimiseks, kuid täpsema tulemuse nimel teostati ka teine puhastusetapp. Selleks lisati sahharoosi padja läbinud VLP proovid astmelisele sahharoosi gradiendile ning ultratsentrifuugiti. Seejärel gradient fraktsioneeriti 10-ks võrdse mahuga fraktsiooniks (joonis 3).



Joonis 3. Skeem VLP puhastamise ja kontsentreerimise etappidest. VLP-de puhastamiseks ja kontsentreerimiseks läbivad need kolm tsentrifuugimist, filtreerimise ja fraktsioneerimise. Analüüse teostati proovidega, mis olid sahharoosi padjast läbi tsentrifuugitud, ning fraktsioonidega, mis moodustati pärast astmelises gradiendis tsentrifuugimist.

Uuritavate melanoomi antigeenide tuvastamiseks saadud fraktsioonides teostati *Western blot* analüüs (joonis 4) kasutades igale uuritavale melanoomi antigeenile spetsiifilist antikeha.

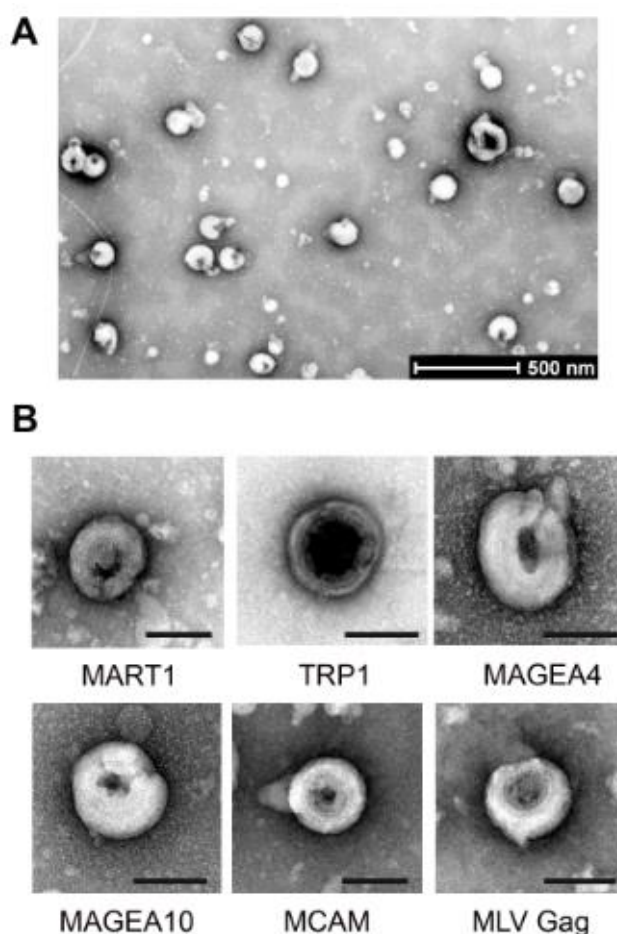


Joonis 4. VLP-de puhastamine läbi sahharoosi astmelise gradiendi. Cop5EBNA rakkudelt koguti sööde 72 h pärast transfektsiooni pQMCF-MLV Gag ja pQMCF-MLV Gag-MAA plasmiididega. Söötmed filtreeriti läbi 45 µm filtri, tsentrifugeeriti läbi 20% sahharoosi padja ja sahharoosi astmelise gradiendi ning fraktsioneeriti. Elektroforeesil kanti 2 µg totaalvalgu järgi igat VLP proovi geeli radadele. *Western blot*-is on iga antigeeni kandva VLP puhul on kasutatud vastava antigeeni spetsiifilist antikeha ning MLV Gag VLP puhul MLV Gag vastast antikeha.

Selgus, et VLP-d jaotuvad üsnagi laialt 35-45% sahharoosi sisaldusega fraktsioonides. MAGEA4, MAGEA10, MART1 ja TRP1 sisaldavate VLP-de kontsentratsiooni maksimumid jäävad fraktsioonidesse 6 ja 7 ehk suurem osa jaotub just 35% sahharoosi sisaldusega gradiendi astmesse. MCAM VLP-de ja ainult MLV Gag valguga saadud VLP-de maksimum on 4. või 5. fraktsioonis, mis näitab nende jaotumist 45% sahharoosi sisaldusega gradiendi astmesse. Samas tuleb tõdeda, et MLV Gag valku leidub vägagi ühtlaselt üle terve gradiendi. Selline tulemus esineb kõigi antigeenikandvate VLP proovide gradientides, kus MLV Gag jaotub ühtlaselt laiali, maksimumiga 4. või 5. fraktsioonis (joonistel pole näidatud). Fraktsioonid 9 ja 10 ehk 20 % sahharoosi sisaldusega gradiendi astmesse on tõenäoliselt kogunenud VLP-de fragmendid ehk lagunenu VLP-d.

2.3.2 VLP-de analüüs elektronmikroskoobiga

TEM analüüsid teostati proovidega, mis pärinesid iga erineva VLP kolmest kõige kontsentreeritumatest fraktsioonidest, mis olid negatiiv-värvitud kasutades 2% uranüülatsetaadi lahust. Elektronmikroskoobist nähtav tulemus oli küllaltki heterogeenne (joonis 5, A). Preparaatidel oli näha sfäärilisi ning regulaarse kujuga membraanseid partikleid, mille läbimõõdud jäid vahemikku 110–150 nm. Seal hulgas oli ka mitte-terviklikke või fragmentseid partikleid. Erinevaid melanoomi antigeene kandvate VLP proovides esinenud partiklid olid omavahel väga sarnased ning suuremaid omapärasid välja tuua ei saa (joonis 5, B). Lisaks oli preparaatidel näha ka väiksemaid membraanseid partikleid suurusega 60-80 nm.



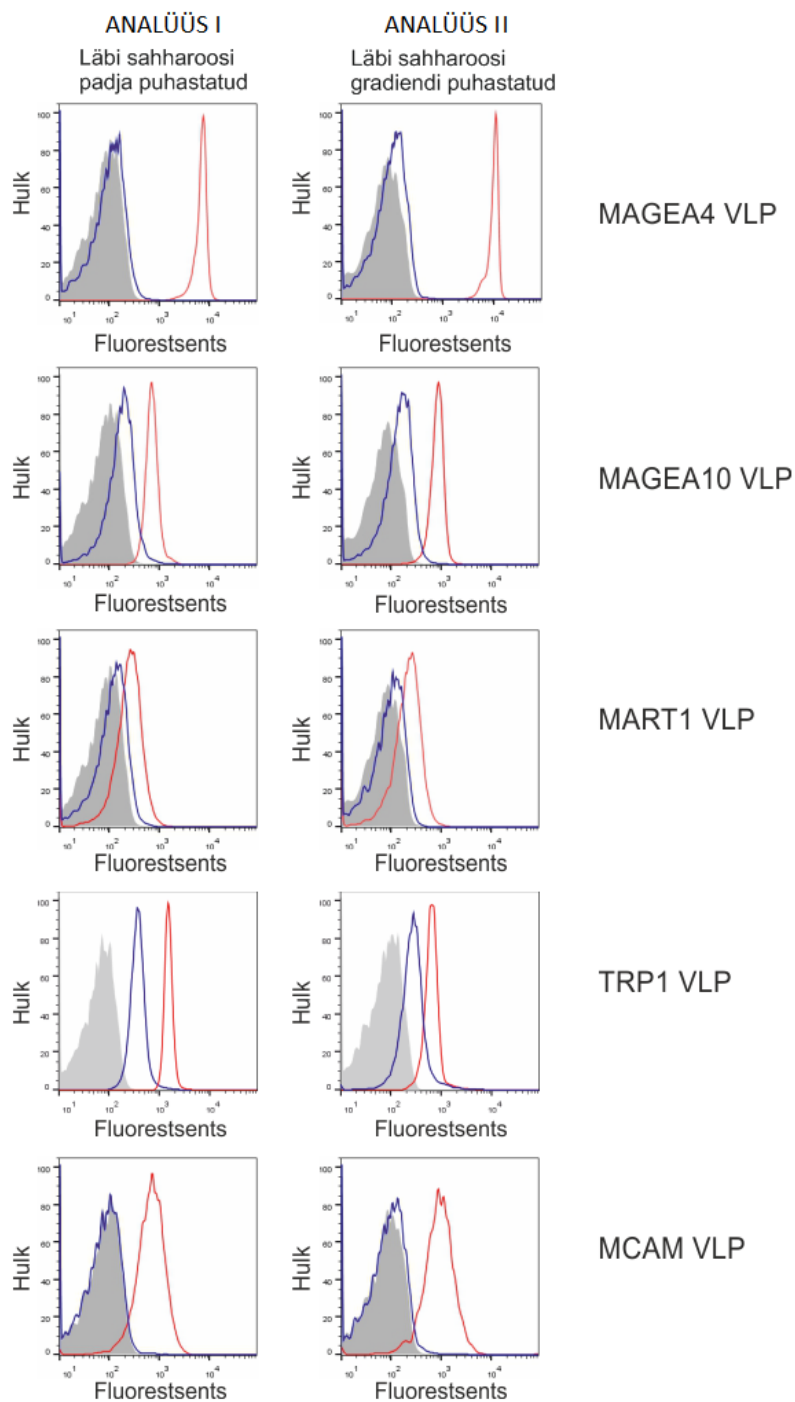
Joonis 5. Negatiiv-värvitud MLV VLP partiklid nähtuna läbi elektronmikroskoobi. VLP proovid on läbi sahharoosi gradiendi puhastatud ning fraktsioneeritud. Iga VLP variandi kolm kõige kontsentreeritumat fraktsiooni liideti, kontsentreeriti ja värviti 2% uranüülatsetaadiga. A. MLV VLP preparaat 6800 korda suurendatult. B Pildiseeria ükiskutest partiklitest igast erinevast uuritavast VLP variandist. Pildidel toodud must joon vastab 100 nm-le.

2.3.3 Melanoomi antigeenide paiknemine VLP-des

Töö järgmiseks eesmärgiks oli vaadata, kas uuritavad melanoomi antigeenid asuvad VLP-de pinnal. MLV VLP-d on väga väikesed, mistõttu pole neid võimalik voolutsütomeetriga analüüsida. Selle probleemi lahendamiseks seoti VLP-d 4 µm läbimõõduga latekskerakeste pinnale.

Voolutsütomeetria analüüse teostati nii läbi 20% sahharoosi padja puhastatud VLP proovidega, kui ka läbi sahharoosi astmelise gradiendi puhastatud VLP proovidega, mis olid inkubeeritud aldehüüd/sulfaat latekskerakestega. Kerakestega VLP-d inkubeeriti uuritavate valkude vastaste primaarsete antikehadega ning Alexa488 fluorokroomi kandvate sekundaarsete antikehadega. Võrreldes tulemusi läbi sahharoosi padja ja läbi sahharoosi gradiendi puhastatud VLP proovidest saab väita, et proovid on üsnagi sarnased ning fluorestsentsi signaali erinevused on üsnagi marginaalsed (joonis 6). Kõikidel juhtudel on antigeene kandvate VLP-de fluorestsentsi signaal tugevam kui antigeene mitte-kandvatel VLP-del, viidates asjaolule, et uuritavad melanoomi antigeenid ekspresseeritakse VLP-de pinnale. MAGEA4 ja MAGEA10 kandvate VLP-de puhul fluorestsentsi signaalid eristuvad läbi gradiendi puhastatud proovides paremini. MART1 ja MCAM-i kandvate VLP-de puhul on padjast ja gradiendist puhastatud proovide tulemused omavahel väga sarnased. TRP1 kandva VLP fluorestsentsi signaal on padjast puhastatud VLP proovides tugevam, kui vastav signaal gradiendis puhastatud proovil, ning signaali tugevuste vahe antigeeni kandva ja mitte-kandva VLP vahel on suurem just padjast puhastatud proovides. Tähelepanuväärne on ka see, et antigeeni mitte-kandva VLP fluorestsentsi signaal on anti-TRP1 antikeha kasutatud proovides kõrgem, kui teiste antikehadega inkubeeritud proovides, viidates anti-TRP1 antikeha ristreaktsioonide esinemisele VLP proovides.

Läbi 20% sahharoosi padja puhastatud VLP proovidega teostati ka ELISA, mille tulemused (lisa 1) ühtivad VLP-de voolutsütomeetria tulemustega kinnitades andmete paikapidavust.

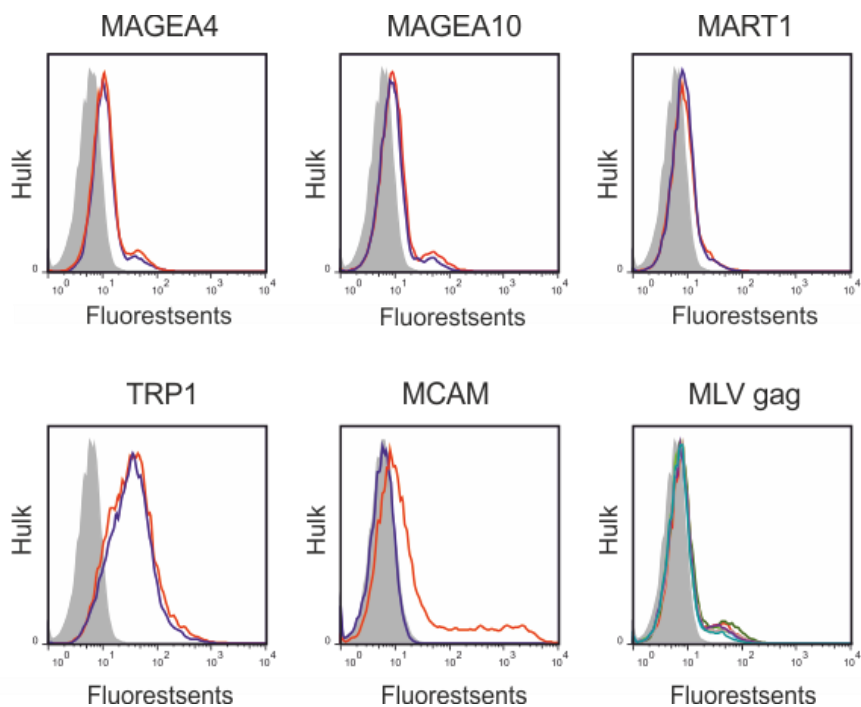


Joonis 6. Läbi sahharoosi padja ja läbi sahharoosi gradiendi puhastatud VLP-de voolutsütomeetria analüüs. Cop5EBNA rakkudelt koguti sööde 72 h pärast transfektsiooni pQMCF-MLV Gag ja pQMCF-MLV Gag-MAA plasmiididega. Söötmed filtreeriti läbi 45 µm filtri, tsentrifugeeriti läbi 20% sahharoosi padja (analüüs I) ja sahharoosi astmelise gradiendi ning fraksioneeriti (analüüs II). Igat 30 µg (totaalvalgu järgi) VLP proovi inkubeeriti 10 µl latekskerakeste lahusega 1 ml PBS-s, seejärel iga antigeeni vastase antikehaga inkubeeriti vastavat antigeeni sisaldava VLP proove ning MLV Gag proove. Halli taustaga kõver esindab kontrollproovi VLP-sid, mis pole primaarse antikehaga inkubeeritud. Sinine kõver vastab antigeene mitte-sisaldavate VLP-de tulemustele. Punase kõveraga on kujutatud antigeene kandvate VLP-de tulemused. Hulgad on normeeritud moodi alusel.

2.3.4 Melanoomi antigeenide ekspressioon rakkudes

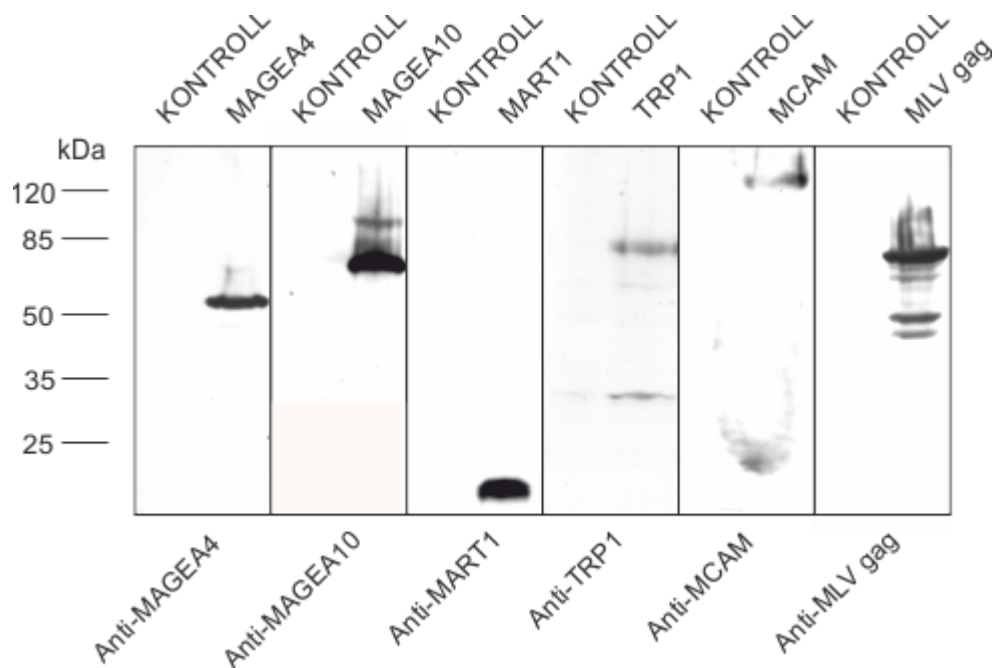
Varasematest töödest on teada, et melanoomi antigeene kodeerivate plasmiididega transfekteeritud rakud ekspresseerivad MAGEA4, MART1 ja TRP1 tsütoplasmasse, MAGEA10 tuuma ning MCAM plasmamembraani. Kuid polnud teada, kas need antigeenid eksponeeruvad ka raku välispinnal. Sellele küsimusele vastuse leidmiseks teostati käesolevas uurimuses voolutsütomeetria analüüs Cop5EBNA rakkudega, mis olid transfekteeritud uuritavaid antigeene kodeerivate plasmiididega.

24 tundi peale Cop5EBNA rakkude transfektsiooni eemaldati rakud tassidelt ning nendega viidi läbi uuritavate antigeenide ja MLV Gag spetsiifiliste antikehadega ning vastavate sekundaarsete Alexa488 antikehadega inkubeerimised madalatel temperatuuridel pimedas. Graafikutelt on näha (joonis 7), et MAGEA4, MAGEA10, MART1 ja TRP1 antigeene ekspresseerivate rakkude (punane kõver) fluorestsentsi signaal ühtib transfekteerimata rakkude (sinine kõver) signaaliga, mis viitab asjaolule, et nimetatud melanoomi antigeene transfekteeritud Cop5EBNA rakupinnale ei ekspresseerita. Märkimisväärne on TRP1 tulemus, milles nii transfekteeritud kui ka transfekteerimata rakuproovide fluorestsentsisignaal on tugevam, kui antikehadega inkubeerimata rakuproovi signaal. See viitab asjaolule, et TRP1 vastane antikeha moodustab ristreaktsioone mõne rakumembraani epitoobiga. Küll aga MCAM-i ekspresseerivad rakud annavad selgelt tugevamat fluorestsentsi signaali võrreldes transfekteerimata rakkudega, mis tähendab, et MCAM ekspresseeritakse Cop5EBNA rakupinnale ning on tuvastatav spetsiifilise antikeha poolt. MLV Gag-i graafikul on toodud kõigi transfekteeritud rakkude proovide kõverad, kusjuures nende kõigi fluorestsentsid ühtivad ka transfekteerimata rakkude signaaliga, mis näitab, et ka MLV Gag ei ekspresseerita Cop5EBNA rakupinnale.



Joonis 7. Cop5EBNA pinnamarkerite voolutsütomeetria analüüs. Cop5EBNA rakud koguti söötmelt 24 h pärast transfektsiooni pQMCF-MLV Gag ja pQMCF-MLV Gag-MAA plasmiididega. Iga antigeeni vastase antikehaga inkubeeriti vastavat antigeeni ekspresseerivaid rakke ning plasmiidiga transfekteerimata rakke. Kontrollproovi rakke ei inkubeeritud primaarsete antikehadega. Uuritavate melanoomi antigeenidega transfekteeritud rakkude kõverad on punased ning transfekteerimata rakkude kõverad on sinised. Halli taustaga kõver vastab Cop5EBNA rakkudele, mida pole primaarsete antikehadega inkubeeritud. Hulgad on normeeritud moodi alusel.

Arvestades, et enamuse antigeene voolutsütomeetria katses transfekteeritud Cop5EBNA rakkudelt ei tuvastatud, teostati *Western blot* analüüs samade rakususpensioonidega uuritavate antigeenide olemasolu kinnitamiseks. Analüüs tõestas, et hoolimata negatiivsest tulemusest voolutsütomeetria katses on transfektsioonid olnud edukad ning Cop5EBNA rakud ekspresseerisid uuritavaid melanoomi antigeene (joonis 8).



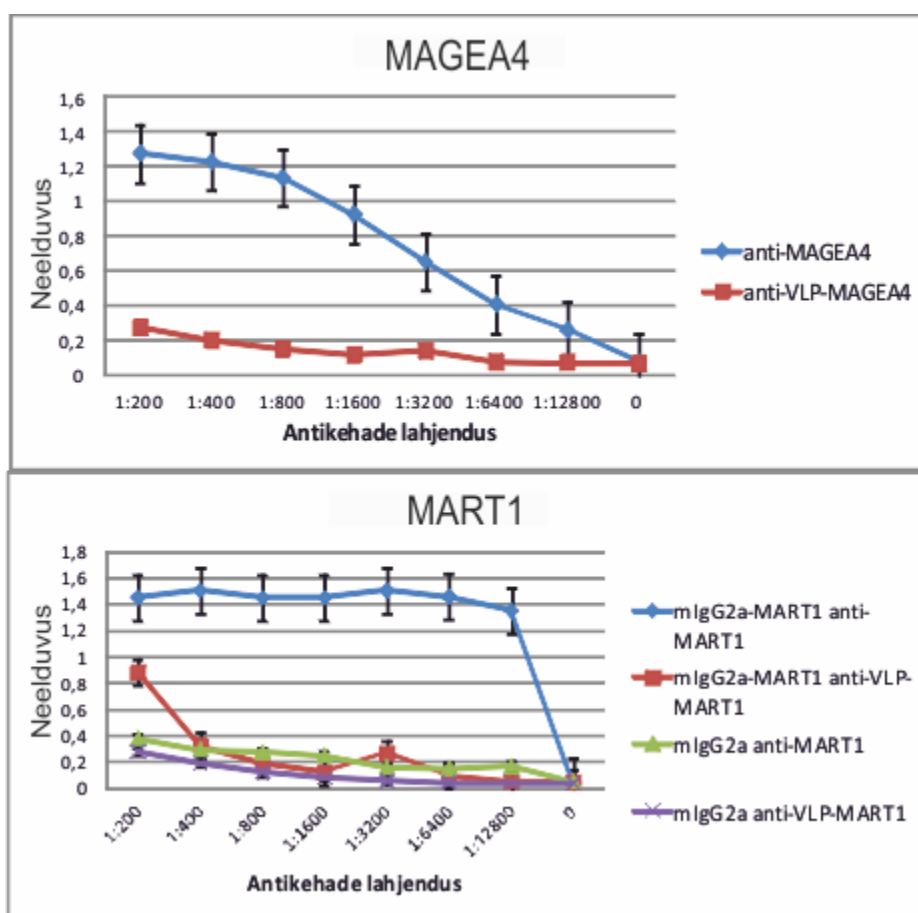
Joonis 8. Voolutsütomeetrias kasutatud rakkude Western blot analüüs. Cop5EBNA rakud koguti söötmelt 24 h pärast transfektsiooni pQMCF-MLV Gag ja pQMCF-MLV Gag-MAA plasmiididega ning lüüsisiti. Elektroforeesil kanti 2 µl igat rakulüsaati. Western blot-is on iga antigeeni ekspresseeriva rakuproovi puhul kasutatud vastava antigeeni spetsiifilist antikeha ning ainult MLV Gag-i ekspresseeriva rakkude puhul MLV Gag vastast antikeha. Kontrollproovideks on plasmiididega transfekteeimata rakud. Üleval on nimetatud Cop5EBNA proovid transfektsioonide järgi ning allpool on kasutatud antikehad.

2.3.5 VLP-de vastane immuunvastus

Melanoomi antigeenidega rikastatud VLP-de immunogeensete omaduste uurimiseks immuniseeriti jäneseid MAGEA4 ja MART1 sisaldavate MLV VLP-dega. Kontrollproovide jaoks immuniseeriti jäneseid ka puhastatud MAGEA4 ja mIgG2a-MART1-ga. Immuniseeritud jänestest koguti vereseerumid, mida kasutati ELISA testides.

Antigeeni suhtes antikehalise vastuse hindamiseks erinevates vereseerumites teostati ELISA analüüse puhastatud valkudega MAGEA4 ja mIgG2a-MART1. Antigeen MART1 kuulub antud analüüsis liitvalku koos immuunoglobuliin G2a-ga, seetõttu on teostatud MART1 vastaste antikehadega analüüs ka mIgG2a-ga, et MART1 antigeeni mõju osakaal oleks hinnatav. Selgus, et nii MAGEA4 kui ka MART1 antigeeni korral esineb tugevam antikehaline vastus kui VLP-ga immuniseerimise teel saadud vastus (joonis 9). Antikeha lahjendustel 1:200 kuni 1:800 on neelduvuste vahe anti-MAGE4 ja anti-VLP-MAGEA4 proovides kuni kaheksakordne. Anti-MART1 antikehad on antigeeni suhtes vägagi afiinsed – isegi antikeha lahjendusel 1:12800 püsis neelduvus kõrgel tasemel. Anti-VLP-MART1

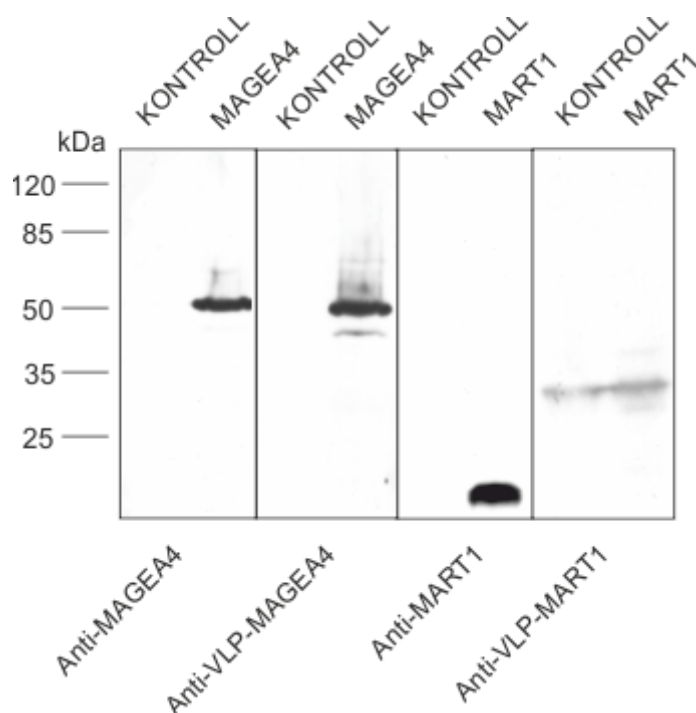
signaal antikeha lahjendusel 1:200 oli veidi enam kui pool anti-MART1 omast, kuid juba kaks korda lahjemas proovis tõusis vahe ligi viiekordseks. mIgG2a-st tulenevad neelduvused olid mõlemal juhul madalad.



Joonis 9. Jäneste vereseerumitega teostatud ELISA analüüsi tulemused. Graafikutel on kujutatud kahest jänest võetud vereseerumite keskmised tulemused koos standartvigadega. Igasse ELISA plaadi kaevukesse kanti 2 µg puhastatud valku. Igat valgu proovi inkubeeriti vastavate antigeenidega immuniseerimise teel saadud vereseerumitega erinevatel lahjendustel. Sinise kõveraga on toodud puhta valguga immuniseerimisest saadud vereseerumi tulemused ning punase kõveraga VLP-ga immuniseerimise teel saadud vereseerumi tulemused. MART1 graafikul mIgG2a proovides roheline ja lilla kõverad esindavad anti-MART1 ja anti-VLP-MART1 tulemusi vastavalt.

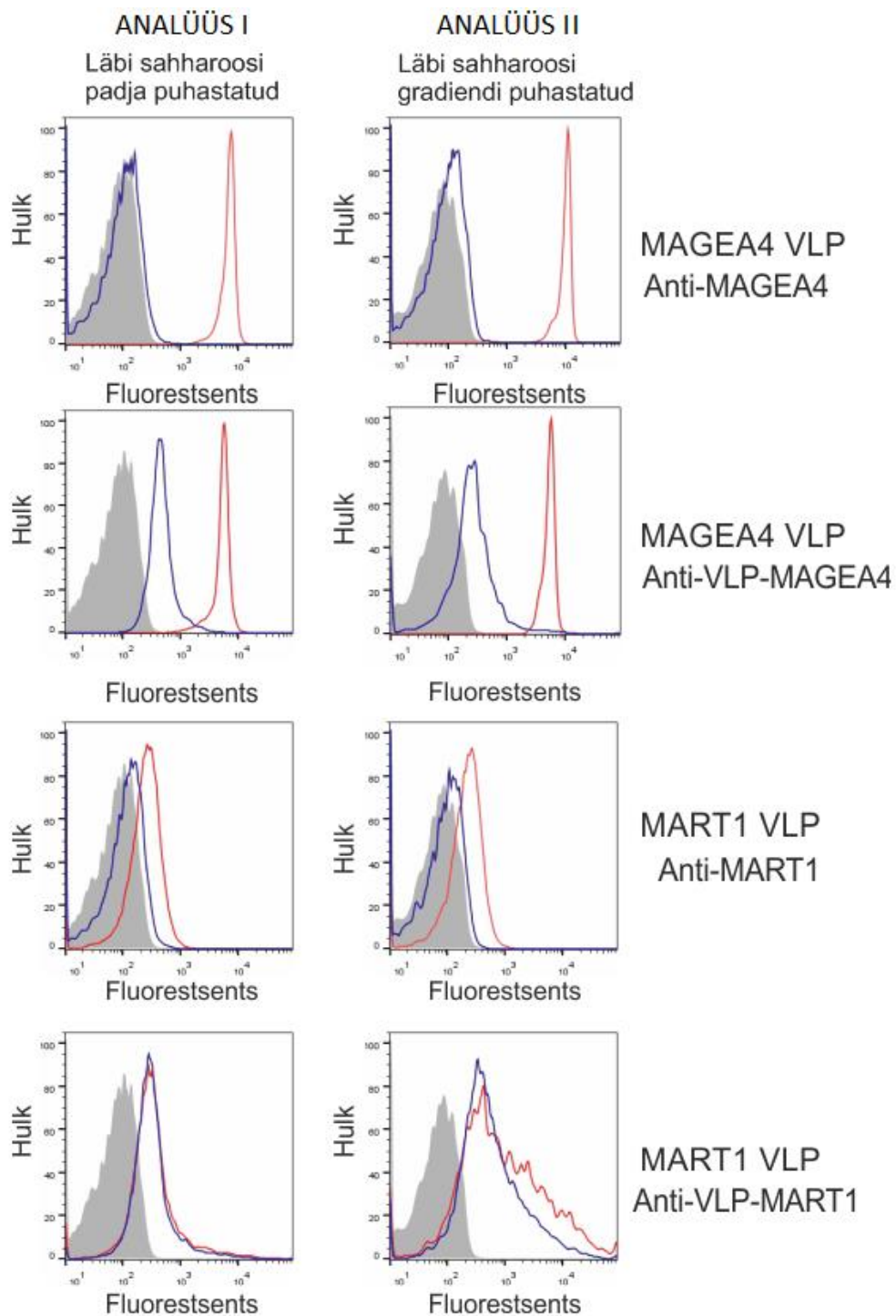
Järgmisteks analüüsideks puhastati antikehad jänese vereseerumitest aafiinsuskromatograafia abil. Edasised analüüsid on teostatud aafiinsupuhastatud polükloonaalsete antikehadega. Antikehasid võrreldi *Western blot*-i analüüsis, milles kasutati vastava antigeeni kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud ning transfekteerimata Cop5EBNA rakulüsaate. Nii anti-MAGEA4 kui ka anti-VLP-MAGEA4 antikehadega moodustub tugev bänd, mis vastab kirjanduses leiduva materjaliga MAGEA4 kohta (joonis 10). Samaväärselt moodustab ka MART1 bändi, mis vastab MART1 kirjeldustele kirjanduses. Kuid anti-VLP-

MART1 antikeha kutsub esile bändi nii transfekteeritud kui ka transfekteerimata rakkude proovi tulemustes, mis vastab ligi 35 kDa suurusele valgule.



Joonis 10. Antikehasid võrdlev Western blot analüüs. Cop5EBNA rakud koguti söötmelt 24 h pärast transfektsiooni pQMCF-MLV Gag-MAA plasmiididega ning lüüsi. Elektroforeesil kanti 2 µl igat rakulüsaati geeli radadele. Western blot-is on iga antigeeni ekspresseeriva rakuproovi puhul kasutatud vastava antigeeni uuritavat antikeha. Kontrollproovideks on plasmiididega transfekteerimata rakulüsaadid. Üleval on toodud Cop5EBNA rakud transfektsiooniti ning allpool on nimetatud kasutatud antikehad.

Lisaks teostati ka voolutsütomeetria analüüse VLP-dega antud antikehade võrdlemiseks. Selleks kasutati VLP proove, mis olid läbinud sahharoosi padja puhastusetapi, ning proove, mis olid puhastatud ka läbi sahharoosi astmelise gradiendi. Nii MAGEA4 kui ka MART1 sisaldavaid VLP-sid inkubeeriti mõlemat tüüpi uuritavate antikehadega. Sarnaselt anti-MAGEA4-le annab anti-VLP-MAGEA4 antikeha nii padjast puhastatud kui ka gradiendist puhastatud VLP proovides antigeene kandvatel VLP-del selgelt tugevama signaali kui antigeene mitte-kandvatel VLP-del. Samuti selgus, et VLP antikehad annavad ka antigeene mitte-kandva VLP puhul tugevama signaali võrreldes VLP-dega, mis pole primaarsete antikehadega töödeldud (joonis 11). See viitab ristreaktsioonide olemasolule. Kui anti-MART1 korral on kerge signaali maksimumide nihe VLP-de vahel, siis anti-VLP-MART1 antigeene kandvate ja mitte-kandvate VLP-de signaalimaksimumid ei erine. Lisaks läbi gradiendi puhastatud VLP proovide puhul toimub anti-VLP-MART1 signaali hajumine, viidates antikeha mitte-spetsiifilisusele.



Joonis 11. Voolutsütomeetria analüüs antikehade võrdlemiseks erinevates VLP proovides. Cop5EBNA rakkudelt koguti sööde 72 h pärast transfektsiooni pQMCF-MLV Gag ja pQMCF-MLV Gag-MAA plasmiididega. Söötmed filtreeriti läbi 45 µm filtri, tsentrifugeeriti läbi 20% sahharoosi padja (analüüs I) ja sahharoosi astmelise gradiendi ning fraktsioneeriti (analüüs II). Igat 30 µg (totaalvalgu järgi) VLP proovi inkubeeriti 10 µl latekskerakeste lahusega 1 ml PBS-s, seejärel iga uuritava antigeeni antikehaga inkubeeriti vastavat antigeeni sisaldava VLP proove ja MLV Gag VLP proove. Halli taustaga kõver esindab VLP-sid, mis pole primaarse antikehaga töödeldud. Antigeene kandvatele VLP-dele vastab punane kõver ning antigeen mitte-kandvatele VLP-dele sinine kõver. Hulgad on normeeritud moodi alusel.

2.4 Arutelu

2.4.1 Melanoomi antigeene kandvate MLV VLP-de formeerimine

Melanoomi ravi eesmärgil on väljatöötamisel mitmeid erinevaid lähenemisi, mille hulgas on ka terapeutiline kasvajakavastane vaktsiin. Terapeutiliste kasvajakavastaste vaktsiinide eelduseks on, et tuumorirakud omavad unikaalseid antigeene või ainult tuumoris kõrgelt ekspresseeritud antigeene. Melanoomi puhul on tuvastatud mitmeid selliseid antigeene, mille hulgast on antud uurimistööks valitud 5 valku: MAGEA4, MAGEA10, MART1, TRP1 ja MCAM. Varasemad uuringud on näidanud, et antigeenide esitlemine organismi immuunsussüsteemile lahustatud kujul ei ole efektiivne moodus immunoloogiliste vastuste esilekutsumiseks. Selle probleemi ületamiseks kasutatakse kõrgelt immunogeensete omadustega VLP-sid kui antigeeni kohaletoimetamise platvormi.

Käesolevas uurimistöös käsitletud melanoomi antigeene sisaldavate MLV VLP-de genereerimiseks kasutati 2014. aastal valminud Sergei Jaguri magistr töö raames välja töötatud meetodikat, mis on melanoomi vastaste vaktsiinide arendamises mitmes mõttes uudne lähenemine. Seni on melanoomivastaste vaktsiine väljatöötamiseks kasutatud poliömaviiruste ümbriseta VLP-sid, mille kapsiidivalgu geenijärjestuse lõppu liidetakse antigeeni geenijärjestus (Brinkman jt., 2004; Schumacher jt., 2007). Meie laboris kasutati MLV VLP-sid, mis on ümbritsetud rakumembraanist pärit lipomembraaniga. Uudne on ka see, et antigeenide inkorporeerimiseks VLP-desse ei kasutatud liitvalgu tehnoloogiat ega keemilist sidumist. Tõsi, teiste VLP-vaktsiinide loomisel on samuti näidatud, et rakumembraani kuuluvad antigeenid inkorporeeritakse ümbrisega VLP-desse ilma nimetatud meetodeid rakendamata (Cubas jt., 2011; Kirchmeier 2014), kuid antud juhul on MCAM ainuke antigeen, mida ekspresseeritakse raku membraani. Ülejäänud töös käsitletatavad melanoomi antigeenid ei kuulu raku ümbritsevasse membraani. Selliste antigeenide inkorporeerimine VLP pinnale on uudne lähenemine modifitseeritud ümbrisega VLP-de genereerimises. Meetod hõlmab eukariöotses rakukultuuris MLV Gag ja melanoomi antigeeni ekspresseerimist eraldi geenidelt, kuid ühest plasmiidist. Sellele järgneb puhastamine ja kontsentreerimine raku söötmest ultratsentrifuugimise teel läbi sahharoosi padja ja astmelise gradiendi.

Western blot analüüsid rakulüsaatide ning kontsentreeritud VLP proovidest näitasid, et kasutatud meetod võimaldab luua MLV VLP-sid, mis kannavad melanoomi antigeeni. Rakulüsaatide ja läbi sahharoosi padja puhastatud VLP proovide *Western blot* analüüsides selgus, et MLV Gag-i ekspresseeritakse suuremates kogustes juhul, kui plasmiid ei sisalda

antigeeni kodeerivat järjestust. Tõenäoliselt pole siin tegu antigeenide otsese interaktsiooniga ekspresioonisüsteemis, vaid ekspresseeritavate valkude vahel hajutatud ekspresioonivõimekusega. Elektronmikroskoopia andis visuaalse kinnituse, et MLV Gag valgud moodustavad sfäärilisi VLP-sid, mis on ümbritsetud lipiidse membraaniga. Tulemus on sarnane kirjanduses leiduva elektronmikroskoopia materjaliga MLV Gag partiklite kohta (Datta jt., 2011). Terviklike partiklite kõrval oli ka katkenud membraaniga ning fragmentseid VLP-sid, mis on kooskõlas gradiendi fraktsioonide *Western blot* analüüsiga, milles esines nii Gagi kui antigeenide suhteliselt tugev signaal ka 20% sahharoosi sisaldusega astmes. Ümbrisega VLP-de õrnemast ehitusest, stabiilsusest ja vastupidavusest, eriti töötlus ja puhastusprotsessides, on arutatud mitmel korral (Roldao jt., 2010; Vicente jt., 2011; Lua jt., 2014). Ultratsentrifuugitud sahharoosi gradiendi analüüsid näitasid, et MAGEA4, MAGEA10, MART1 JA TRP1 antigeene kandvad VLP-d akumulerevad 35% sahharoosi sisaldusega gradiendi astmesse, kuid samades proovides MLV Gag akumulereb pigem 45% sahharoosi sisaldusega gradiendi astmesse. Kuid põhjus, miks antigeene kandvad VLP-d võrreldes mitte-kandvate VLP-dega kogunevad väiksema sahharoosi sisaldusega gradiendi astmesse, ei ole hetkel teada.

S. Jaguri magistritöös leiti, et hiire fibroblasti rakke on võimalik edukalt transfekteerida plasmiidiga, mis kannab MLV Gag-i ja melanoomi antigeeni geenijärjestusi. Teostati immunofluorestsentsanalüüse rakulise ekspresiooni lokaliseerimiseks, milles selgus, et transfekteeritud rakud ekspresseerivad MAGEA4, MART1 ja TRP1 tsütoplasmasse, MAGEA10 tuuma ja osaliselt tsütoplasmasse ning MCAM plasmamembraani (Jagur 2014). Käesolevas uurimistöös teostati volutsütomeetria analüüse VLP-dega kontrollimaks hüpoteesi, mille järgi uuritavad melanoomi antigeenid ekspresseeritakse VLP-de pinnale. MLV VLP-d, mille läbimõõdud modifitseerimata kujul jäävad 80-120 nm vahemikku (Datta jt., 2011), on väga väikesed partiklid, mistõttu ainuüksi VLP-sid ei õnnestu volutsütomeetrias tuvastada. Selle probleemi lahendamiseks kasutati aldehüüd/sulfaatlatekskerakesi, mis seovad VLP-sid enda külge, moodustades piisavalt suure läbimõõduga agregaadid, mis on tuvastatav volutsütomeetria analüsaatori poolt. Analüüsid näitasid väga mitmekesiseid tulemusi erinevate melanoomi antigeenide kohta. MAGEA4, MAGEA10, MCAM sisaldavate VLP proovide tulemused viitavad, et nimetatud antigeenid on VLP-de pinnal. Arvestades asjaolu, et nimetatud MAGEA valgud tüüpiliselt ekspresseeritakse rakus vastavalt tsütoplasmasse või rakutuuma, siis ühtlasi on see tõestuseks, et antud töös kasutatud meetod võimaldab genereerida MLV VLP-sid, mille membraanisele pinnale ekspresseeritakse mitte-membraaniseid valke. MART1 kandvate VLP-de puhul ei esinenud mitte-antigeeni kandvate

VLP-dest nõnda palju tugevamat signaali kui eelnimetatud antigeenide korral. *Western blot* analüüsis esines MART1 tuvastamisel vägagi tugev signaal ning arvestades, et VLP proovides on märkismisväärne hulk mitte-terviklikke VLP-sid, võib oletada, et voolutsütomeetria tulemusel esinev nõrk signaal vastab MART1 kandvatele katkistele VLP-dele ning MART1 ekspresseeritakse vaid vähesel määral MLV VLP-de pinnale või kasutataud MART1 vastane antikeha ei tunne ära MLV pinnal esitatud epitoopi. TRP1 kandvate VLP-de märkimisväärselt tugevam signaal annab julgust oletada, et TRP1 võiks olla ekspresseeritud VLP pinnale, kuid samas antigeeni mitte-kandvate VLP-de signaal on palju tugevam kui antikehadega inkubeerimata VLP proovide signaal, mis viitab TRP1 antikeha suhteliselt tugevatele ristreaktsioonidele VLP pinnaepitopidega. *Western blot* analüüsid, kus valgud on denatureeritud kujul, TRP1 vastane antikeha ristreaktsoone ei moodustanud, mis viitab asjaolule, et TRP1 antikeha omab konformatsioonist sõltuvaid epitoope membraani pinnal. Antud olukorras ei saa üheselt kinnitada TRP1 antigeeni ekspresseerumist VLP pinnale.

Voolutsütomeetria analüüsid elusate Cop5EBNA rakkudega näitasid, et MCAM on ainuke uuritav melanoomi antigeen, mis ekspresseeritakse raku pinnale. See on täiesti ootuspärane, millest võib järeldada, et MCAM satub MLV VLP pinnale VLP-de rakust pungumise ajal. Küll aga MAGEA4 ja MAGEA10 antigeenide VLP pinnale paigutumise mehhanismi see ei seleta ning vastava protsessi avastamiseks tuleb teha edasiseid uuringuid. Rakkude analüüsides selgus, et TRP1 antikeha annab ka rakupinnal olevate pinnaepitopidega tugevaid ristreaktsioone, mis kinnitab, et töös esinevaid TRP1 voolutsütomeetria tulemusi adekvaatseteks lugeda ei saa.

2.4.2 VLP-indutseeritud antikehade iseloomustamine

Kirjanduses mainitakse, et VLP-d on väga immunogeensed ning ohutud, mistõttu sobivad need väga hästi kasutamiseks vaktsiinidena. Ühtlasi kirjeldatakse, et VLP-d induitseerivad heade omadustega antikehasid. Käesolevas uurimistöös teostati võrdlevaid analüüse puhastatud antigeeniga ja antigeeni sisaldavate VLP-dega immuniseerimise teel saadud vereseerumitega. Puhastatud valkudega immuniseerimise teel saadud vereseerumi antikehasid nimetatakse anti-MAGEA4 ja anti-MART1 ning VLP-dega immuniseeritud jänestest saadi anti-VLP-MAGEA4 ja anti-VLP-MART1 antikehad.

Rakulüsaatide *Western blot* analüüsi põhjal saab väita, et nii anti-MAGEA4 kui ka anti-VLP-MAGEA4 omavad väga head spetsiifikat MAGEA4 valgu suhtes, kuid ELISA tulemused puhastatud MAGEA4-l näitasid, et puhastatud MAGEA4 poolt induitseeritud

antikehaline vastus on kuni kaheksa korda nõrgem kui partikuleeritud antigeeni poolt indutseeritud vastus. Lisaks voolutsütomeetria VLP proovidega tõi välja anti-VLP-MAGEA4 ristreaktsioonide esinemise VLP-de pinnaepitopidega. Saab öelda, et MAGEA4 kandev MLV VLP on indutseerinud antikehalise vastuse, kuid moodustunud polükloonaalsete antikehade detailsemat analüüsi me teha ei saa. Antikehade täpsemate omaduste väljaselgitamiseks tuleb järgmisena teha monoklonaalseid antikehi. MAGEA4 sisaldava MLV VLP indutseeritud nõrk immunoloogiline vastus võib olla saavutatud tänu MAGEA4 paiknemisele VLP-de pinnal, kuid kui palju ja millise paigutusega antigeenid seal on, tuleb välja selgitada edasiste uuringute toel.

MART1 antigeeni puhul ei moodustanud anti-VLP-MART1 ühtegi spetsiifilist signaali *Western blot* analüüsis, kuid anti-MART1 korral ilmus tugev spetsiifiline signaal. ELISA analüüs näitas, anti-VLP-MART1 vastus puhastatud MART1 suhtes oli väga madal, lausa kuni 25 korda madalam kui anti-MART1 antikehal. Ka voolutsütomeetria katsetes ei ilmutanud partikuleeritud MART1 poolt indutseeritud antikeha positiivset signaali ning samas tulemus näitas ristreaktsioonide esinemist. Antud tulemusi arvestades võib järeldada, et MART1 antigeeni kandvad MLV VLP-d ei kutsunud esile antikehalist vastust immuniseeritud jänestel MART1 suhtes. See toetab antud uurimuse järeldusi, et MART1 tõenäoliselt ei ekspresseeru MLV VLP pinnale, vaid pigem pakitakse selle sisse ja seega ei kutsu esile antikehalist immuunvastust.

Kokkuvõte

Transfekteerides eukariootseid Cop5EBNA rakke plasmiididega, mis sisaldavad MLV Gag ja ühte melanoomi antigeeni geenijärjestust, on võimalik genereerida MLV VLP-sid, mis sisaldavad uuritavaid melanoomi antigeene. Selle meetodiga on võimalik ümbrisega VLP pinnale ekspresseerida transmembraanset valku MCAM ja rakusiseseid antigeene MAGEA4 ja MAGEA10. See on esimene kord kui kirjeldatakse mitte-membraansete antigeenide inkorporeerimist ümbrisega VLP-de pinnale ilma, et oleks rakendatud liitvalgu tehnoloogiat või ühendite keemilist sidumist. Antud hetkel ei ole võimalik üheselt kinnitada melanosoomi membraanivalkude MART1 ja TRP1 ekspresseerimist MLV VLP-de pinnale. MART1 pakitakse tõenäoliselt VLP sisse, kuid TRP1 puhul TRP1 vastase antikeha tugevate ristreaktsioonide esinemise tõttu puuduvad adekvaatsed andmed.

Genereeritud melanoomi antigeene MAGEA4 ja MART1 kandvate MLV VLP-dega immuniseeritud jänestest tugevat humoraalset vastust uuritavate antigeenide suhtes ei teki. MAGEA4 VLP indutseerib nõrga immunoloogilise vastuse võrreldes puhastatud valguga, kusjuures indutseeritud antikehad on küll MAGEA4 suhtes spetsiifilised, kuid afiinsus jääb madalamale tasemele. MART1 VLP praktiliselt ei indutseerigi MART1 vastaseid antikehasid, mis oleksid MART1 suhtes spetsiifilised või afiinsed. .

Tänuavaldused

Kõige suuremad tänusõnad kuuluvad minu juhendajale *Ph. D.* Reet Kurele tema meisterliku juhendamise ning võimaluse pakkumise eest, milles oli mul võimalik melanoomi antigeenide uuringu projektis kaasosaleda ning oma potentsiaali rakendada.

Täna kõik Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi neljanda korruse ja labori 431 inimesi, eelkõige Eve Toomsood ja laborikaaslasid Kadri Õunap, Liisi Võsa ja Lilian Leetsi, kes löid sõbraliku õhkkonna ning aitasid mind seal, kus mul jäi vajaka.

Kasutatud kirjandus

- Acres, B., Limacher, J., & Bonnefoy, J. (2007).** Discovery and development of therapeutic cancer vaccines. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 102, 185–192.
- Aubry, F., Satie, A.-P., Rioux-Leclercq, N., Rajpert-De Meyts, E., Spagnoli, G. C., Chomez, P., De Backer, O., Jégou, B., & Samson, M. (2001).** MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer*, 92, 2778–2785.
- Bachmann, M. F., & Zinkernagel, R. M. (1996).** The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. *Immunol. Today*, 17, 553–558.
- Bachmann, M. F., & Zinkernagel, R. M. (1997).** Neutralizing antiviral B-cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 235–270.
- Bachmann, M. F., Rohrer, U. H., Kundig, T. M., Burki, K., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (1993).** The influence of antigen organization on B-cell responsiveness. *Science*, 262, 1448–1451.
- Bachmann, M. F., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (1995).** T helper cell-independent neutralizing B-cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B-cell induction? *Eur. J. Immunol.*, 25, 3445–3451.
- Bachmann, M. F., & Dyer, M. R. (2004).** Therapeutic vaccination for chronic diseases: a new class of drugs in sight. *Nat Rev Drug Discov*; 3, 81–88.
- Bajetta, E., Del Vecchio, M., Bernard-Marty, C., Vitali, M., Buzzoni, R., Rixe, O., Nova, P., Aglione, S., Taillibert, S., & Khayat, D. (2002).** Metastatic melanoma: chemotherapy. *Semin. Oncol.*, 5, 427–445.
- Bastiaannet, E., Beukema, J., & Hoekstra, H. (2005).** Radiation therapy following lymph node dissection in melanoma patients: treatment, outcome and complications. *Cancer Treat Rev*, 31, 1, 18–26.
- Baumert, T. F., Ito, S., Wong, D. T., & Liang, T. J. (1998).** Hepatitis C. virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol*;72, 3827–3836.
- Bayer, M. E., Blumberg, B. S., & Werner B. (1968).** Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis *Nature*, 218, 1057–1059.

- Bene, N. I., Healy, C., & Coldiron, B. M. (2008).** Mohs micrographic surgery is accurate 95.1% of the time for melanoma in situ: a prospective study of 167 cases. *Dermatol Surg*, *34*, 5, 660–664.
- 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.
- Bolander, A., Agnarsdottir, M., Stromberg, S., Ponten, F., Hesselius, P., Uhlen, M., & Bergqvist, M. (2008).** The protein expression of TRP-1 and galectin-1 in cutaneous malignant melanomas. *Cancer Genomics Proteomics*, *5*, 293–300.
- Boon, T., & Van den Eynde, B. J. (1999).** Shared tumor-specific antigens Ed. 3. Rosenberg, S.A. (Ed.), *Principles and Practice of the Biologic Treatment of Cancer* (pp. 493-504), Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Braeuer, R. R., Watson, I. R., Wu, C. J., Mobley, A. K., Kamiya, T., Shoshan, E., & Bar-Eli, M. (2005).** Why is melanoma so metastatic? *Pigment Cell melanoma Res.* *27*, 19–36.
- Bricard, G., Bouzourene, H., Martinet, O., Rimoldi, D., Halkic, N., Gillet, M., Chaubert, P., Macdonald, H. R., Romero, P., Cerottini, J. C., & Speiser, D. E. (2005).** Naturally acquired MAGE-A10 and SSX-2-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J Immunol.* *174*, 1709–1716.
- Brinkman, M., Walter, J., Jennes, I., Neugebauer, M., Bertling, W., & Grein, S. (2004).** Recombinant murine polyoma virus-like-particles induce protective anti-tumor immunity. *Lett. Drug Des. Disc.* *1*, 137-147.
- Buonaguro, L., Buonaguro, F. M., Tornesello, M. L., Mantas, D., Beth-Giraldo, E., Wagner, R., Michelson, S., Prevost, M. C., Wolf, H., & Giraldo, G. (2001).** High efficient production of Pr55(Gag) virus-like particles expressing multiple HIV-1 epitopes, including a gp120 protein derived from an Ugandan HIV-1 isolate of subtype A. *Antiviral Res*, *49*, 35–47.
- 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.

- Cormier, J. N., Hijazi, Y. M., Abati, A., Fetsch, P., Bettinotti, M., Steinberg, S. M., Rosenberg, S. A., & Marincola, F. M. (1998).** Heterogeneous expression of melanoma-associated antigens and HLA-A2 in metastatic melanoma in vivo. *Int J Cancer*, *75*, 517–524.
- Cubas, R., Zhang, S., Li, M., Chen, C., & Yao, Q. (2011).** Chimeric Trop2 Virus-like Particles: A Potential Immunotherapeutic Approach Against Pancreatic Cancer. *J Immunother*, *3*, 251–263.
- Datta, S. A., Zuo, X., Clark, P. K., Campbell, S. J., Wang, Y. X., & Rein, A. (2011).** Solution properties of murine leukemia virus gag protein: differences from HIV-1 gag. *J Virol*. *85*, 12733–12741.
- De Maziere, A. M., Muehlethaler, K., van Donselaar, E., Slavi, S., Davoust, J., Cerottini, J. C., Levy, F., Slot, J. W., & Rimoldi, D. (2002).** The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins. *Traffic*, *3*, 678-693.
- De Vries, T. J., Trancikova, D., Ruiter, D. J., & van Muijen, G. N. (1998).** High expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, tyrosinase and TRP-1 in uveal melanoma. *Br J Cancer*. *78*, *9*, 1156-1161.
- De Wit, N. J., Burtscher, H. J., Weidle, U. H., Ruiter, D. J., & van Muijen, G. N. (2002).** Differentially expressed genes identified in human melanoma cell lines with different metastatic behaviour using high density oligonucleotide arrays. *Melanoma Res*. *12*, *1*, 57-69.
- Fang, D., Hallman, J., Sangha, N., Kute, T. E., Hammarback, J. A., White, W. L., & Setaluri, V. (2001).** Expression of Microtubule-Associated Protein 2 in Benign and Malignant Melanocytes: Implications for Differentiation and Progression of Cutaneous Melanoma. *Am J Path*, *15*, *6*, 2107–2115.
- Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., & Guyre, P. M. (1996).** Type I (CD64) and type II (CD32) Fc g receptormediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol*. *157*, 541–548.
- Felnerova, D., Viret, J. F., Gluck, R., & Moser, C. (2004).** Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs *Curr Opin Biotechnol*, *15*, 518–529.

- Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., & De Wilde M. (1989).** Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*, 59, 103–112.
- Giarelli, E. (2007).** Cancer vaccines: a new frontier in prevention and treatment. *Oncology*, 21, 11–18.
- Grgacic, E. V., & Anderson, D. A. (2006).** Virus-like particles: Passport to Immune recognition. *Methods*, 40, 60–65.
- Gyorki, D. E., Callahan, M., Wolchok, J. D., & Ariyan, C. E. (2013).** The delicate balance of melanoma immunotherapy. *Clin Trans Immunol.* 2, e5.
- Haass, N. K., Smalley, K. S., Li, L., & Herlyn, M. (2005).** Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 18, 150–159.
- Halaban, R., & Moellmann, G. E. (1990).** Murine and human b locus pigmentation genes encode a glycoprotein (gp75) with catalase activity. *Proc Natl Acad Sci.* 87, 4809–4813.
- Harding, C. V., & Song, R. (1994).** Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J. Immunol.* 153, 4925–4933.
- Hearing, V. J., & Jiménez, M. (1989).** Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level. *Pigment Cell Res.* 2, 75–85.
- Hoashi, T., Watabe, H., Muller, J., Yamaguchi, Y., Vieira, W. D., & Hearing, V. J. (2005).** MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J Biological Chem.* 280, 14006-14016.
- Holzmann, B., Brocker, E. B., Lehmann, J. M., Ruitter, D. J., Sorg, C., Riethmuller, G., & Johnson, J. P. (1987).** Tumor progression in human malignant melanoma: five stages defined by their antigenic phenotypes. *Int J Cancer.* 39, 466–471.
- Hoos, A., Parmiani, G., Hege, K., Sznol, M., Loibner, H., Eggermont, A., Urban, W., Blumenstein, B., Sacks, N., Keilholz, U., & Nichol, G. (2007).** A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics. *J Immunother.* 30, 1, 1–15.
- Jagur, S. (2014).** *Melanoomi antigeenidega pseudotüpeeritud viirus-laadsete partiklite genereerimine.* Magistritöö. Tartu Ülikool.

- Jegerlehner, A., Maurer, P., Bessa, J., Heather, H., Kopf, M., & Bachmann, M. F. (2007).** TLR9 signaling in B-cells determines class switch recombination to IgG2a. *J. Immunol.* 178, 2415–2420.
- Jennings, G. T., & Bachmann, M. F. (2008).** The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem*, 389, 5, 521-536.
- Johnson, J. E., & Chiu, W. (2000).** Structures of virus and virus-like particles. *Curr Opin Struct Biol.* 10, 229–235.
- Justewicz, D. M., Doherty, P. C., & Webster, R. G. (1995).** The B-cell response in lymphoid tissue of mice immunized with various antigenic forms of the influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* 69, 5414–5421.
- Kaufmann, O., Koch, S., Burghardt, J., Audring, H., & Dietel M. (1998).** Tyrosinase, melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. *Mod Pathol*, 11, 740–746.
- Kawakami, Y., Battles, J. K., Kobayashi, T., Wang, X., Tupesis, J. L., Marincola, F. M., Robbins, P. F., Hearing, V. J., Gonda, M. A., & Rosenberg, S. A. (1997).** Production of recombinant MART-1 proteins and specific antiMART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1 *J. Immunol. Meth.* 202, 13-25.
- Kirchmeier, M., Fluckiger, A.-C., Soare, C., Bozic, J., Ontsouka, B., Ahmed, T., Diress, A., Pereira, L., Schödel, F., Plotkin, S., Dalba, C., Klatzmann, D., & Anderson, D. E. (2014).** Enveloped Virus-Like Particle Expression of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Antigen Induces Antibodies with Potent and Broad Neutralizing Activity. *Clin Vaccine Immunol*, 21, 2, 174–180.
- Kirkwood, J., Strawderman, M., Ernstoff, M., Smith, T., Borden, E., & Blum, R. (1996).** Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol.* 14, 1, 7–17.
- Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B., & Rock, K. L. (1993).** Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 4942–4946.

- Kushimoto, T., Basrur, V., Matsunaga, J., Vieira, W. D., Muller, J., Appella, E., & Hearing, V. J. (2001).** A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 10698-10703.
- Kushnir, N., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2012).** Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31, 1, 58-83.
- Latham, T., & Galarza, J. M. (2001).** Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J Virol.* 75, 6154–6165.
- Lehmann, J. M., Holzmann, B., Breitbart, E. W., Schmiegelow, P., Riethmuller, G., & Johnson, J. P. (1987).** Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer Res.* 47, 841–845.
- Lua, L. H., Connors, N. K., Sainsbury, F., Chuan, Y. P., Wibowo, N., & Middelberg, A. P.-J. (2014).** Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 425-440.
- Luca, M., Hunt, B., Bucana, C. D., Johnson, J. P., Fidler, I. J., & Bar-Eli, M. (1993).** Direct correlation between MUC18 expression and metastatic potential of human melanoma cells. *Melanoma Res.* 3, 35–41.
- Ludwig, C., & Wagner, R. (2007).** Virus-like particles—universal molecular toolboxes. *Curr Opin Biotech.* 18, 6, 537-545.
- Manga, P., Sato, K., Ye. L., Beermann, F., Lamoreux, M. L., & Orlow, S. J. (2000).** Mutational analysis of the modulation of tyrosinase by tyrosinase-related proteins 1 and 2 in vitro. *Pigment Cell Res.* 13, 364–374.
- Mao, C., Solis, D. J., Reiss, B. D., Kottmann, S. T., Sweeney, R. Y., Hayhurst, A., Georgiou, G., Iverson, B., & Belcher, A. M. (2004).** Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires. *Science*, 303, 213–217.
- Matsushita, M., & Fujita, T. (2001).** Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol. Rev.* 180, 78–85.

- McGinnes, L. W., Gravel, K. A., Finberg, R. W., Kurt-Jones, E. A., Massare, M. J., Smith, G., Schmidt, M. R., Morrison, T. G. (2011).** Assembly and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles containing the respiratory syncytial virus F and G proteins. *J Virol.* 85, 366–377.
- Mohs, F. E., & Mikhail, G. R. (1991).** *Mohs micrographic surgery* (pp 13–14). Philadelphia: W.B. Saunders.
- 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. *J Biol Chem.* 278, 10668–10674.
- Parkin, D., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005).** Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55, 2, 74–108.
- Peikert, T., Specks, U., Farver, C., Erzurum, S. C., & Comhair, S. A. (2006).** Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res.* 66, 4693–4700.
- Pumpens, P., & Grens, E. (2002).** Artificial genes for chimeric virus-like particles; in Khudyakov, Y. E., Fields, H. A. (Eds.). *Artificial DNA: Methods and Applications* (pp 249–327). Boca Raton: CRC Press LLC.
- Pumpens, P., Ulrich, R., Sasnauskas, K., Kazaks, A., Ose, V., & Grens, E. (2008).** Construction of novel vaccines on the basis of the virus-like particles: hepatitis B virus proteins as vaccine carriers; in Khudyakov, Y. (Ed.). *Medicinal Protein Engineering* (pp 205–248). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Pushko, P., Pumpens, P., & Grens, E. (2013).** Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures. *Intervirology*, 56, 141–165.
- Pushko, P., Tumpey, T. M., Van Hoeven, N., Belser, J. A., Robinson, R., Nathan, M., Smith, G., Wright, D. C., & Bright, R. A. (2007).** Evaluation of influenza virus-like particles and Novasome adjuvant as candidate vaccine for avian influenza. *Vaccine*, 25, 4283–4290.

- Rapanotti, M. C., Suarez Viguria, T. M., Costanza, G., Ricozzi, I., Pierantozzi, A., Di Stefani, A., Campione, E., Bernardini, S., Chimenti, S., Orlandi, A., & Bianchi, L. (2014).** Sequential molecular analysis of circulating MCAM/MUC18 expression: a promising disease biomarker related to clinical outcome in melanoma. *Arc Dermatol Res*, 306, 6, 527–537.
- Reinke, S., Koniger, P., Herberth, G., Audring, H., Wang, H., Ma, J., Guo, Y., Sterry, W., Trefzer, U. (2005).** Differential expression of MART-1, tyrosinase, and SM5-1 in primary and metastatic melanoma. *Am J Dermatopathol*, 27, 401–406.
- Rimoldi, D., Muehlethaler, K., Salvi, S., Valmori, D., Romero, P., Cerottini, J. C., & Levy, F. (2001).** Subcellular Localization of the Melanoma-associated Protein Melan-A/MART-1 Influences the Processing of Its HLA-A2-restricted Epitope *J. Biol. Chem.* 276, 43189-43196.
- 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. *Int. J. Cancer*, 82, 901–907.
- Rochaix, P., Lacroix-Triki, M., Lamant, L., Pichereaux, C., Valmary, S., Puente, E., Al Saati, T., Monsarrat, B., Susini, C., Buscail, L., Delsol, G., & Voigt, J. (2003).** PNL2, a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant melanocyte antigen. *Mod Pathol*, 16, 481–490.
- Roldao, A., Mellado, M. C., Castilho, L. R., Carrondo, M. J., & Alves, P. M. (2010).** Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines*, 9, 1149–1176.
- Roy, P., & Noad, R. (2009).** Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Adv Exp Med Biol.* 655, 145–158.
- Ruedl, C., Storni, T.F., Lechner, F., Bachi, T., & Bachmann, M.F. (2002).** Cross-presentation of virus-like particles by skinderived CD8 dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur. J. Immunol.* 32, 818–825.
- Sarangarajan, R., & Boissy, R. E. (2001).** Tyrp1 and Oculocutaneous Albinism Type 3. *Pigment Cell Research*, 14, 437–444.

- Sartorius, R., Pisu, P., D' Apice, L., Pizzella, L., Romano, C., Cortese, G., Giorgini, A., Santoni, A., Velotti, F., & De, B. P. (2008).** The use of filamentous bacteriophage fd to deliver MAGE-A10 or MAGE-A3 HLA-A2- restricted peptides and to induce strong antitumor CTL responses. *J Immunol.* 180, 19–28.
- Satyamoorthy, K., Muyrers, J., Meier, F., Patel, D., Herlyn, M. (2001).** Mel-CAM-specific genetic suppressor elements inhibit melanoma growth and invasion through loss of gap junctional communication. *Oncogene.* 20, 4676–4684.
- Schodel, F., Peterson, D., Zheng, J., Jones, J. E., Hughes, J. L., & Milich, D. R. (1993).** Structure of hepatitis B virus core and e-antigen. A single precore amino acid prevents nucleocapsid assembly. *J. Biol. Chem.* 268, 1332–1337.
- 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. *Int. J. Cancer,* 129, 1137–1148.
- Schumacher, T., Ruehland, C., Schultheiss, C., Brinkman, M., Roedel, F., Reiser, C. O. A., & Reichel, C. (2007).** Advanced Antigen Delivery of Murine Survivin: Chimeric Virus-Like Particles in Cancer Vaccine Research. *Int. J. Biomed. Sci,* 3, 3, 199–205.
- Stalin, J., Harhour, K., Hubert, L., Subrini, C., Lafitte, D., Lissitzky, J. C., Elganfoud, N., Robert, S., Foucault-Bertaud, A., Kaspi, E., Sabatier, F., Aurrand-Lions, M., Bardin, N., Holmgren, L., Dignat-George, F., & Blot-Chabaud, M. (2013).** Soluble melanoma cell adhesion molecule (sMCAM/sCD146) promotes angiogenic effects on endothelial progenitor cells through angiomin. *J Biol Chem.* 288, 8991–9000.
- Stewart B.W. & Wild, C.P. (Eds.) (2014).** World Health Organization. *World Cancer Report 2014.* France: The International Agency for Research on Cancer.
- Storni, T. & Bachmann, M. F. (2004).** Loading of MHC class I and II presentation pathways by exogenous antigens: a quantitative in vivo comparison. *J. Immunol.* 172, 6129– 6135.
- Stoute, J. A., Slaoui, M., Heppner, D. G., Momin, P., Kester, K. E., Desmons, P., Welde, B. T., Garçon, N., Krzych, U., Marchand, M., Ballou, W. R., & Cohen, J. D. (1997).** A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 336, 86–91.

- Zhang, H., Bu, H., Chen, H., Wei, B., Liu, W., Guo, J., Li, F., Liao, D., Tang, Y., & Zhang, Z. (2008).** Comparison of immunohistochemical markers in the differential diagnosis of adrenocortical tumors: immunohistochemical analysis of adrenocortical tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *16*, 32–39.
- Takahashi, K., Shichijo, S., Noguchi, M., Hirohata, M., & Itoh, K. (1995).** Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res*, *55*, *16*, 3478–3482.
- Thyagarajan, R., Arunkumar, N., & Song, W. (2003).** Polyvalent antigens stabilize B-cell antigen receptor surface signaling microdomains. *J. Immunol.* *170*, 6099–6106.
- Vijayasaradhi, S., Doskoch, P. M., & Houghton, A. N. (1991).** Biosynthesis and intracellular movement of the melanosomal membrane glycoprotein gp75, the human b (brown) locus product. *Exp Cell Res* *196*, 233–240.
- Vicente, T., Roldao, A., Peixoto, C., Carrondo, M. J., & Alves, P. M. (2011).** Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *J. Invertebr. Pathol.* *107*, 42–48.
- Wang, B. Z., Liu, W., Kang, S. M., Alam, M., Huang, C., Ye, L., Sun, Y., Li, Y., Kothe, D. L., Pushko, P., Dokland, T., Haynes, B. F., Smith, G., Hahn, B. H., & Compans, R. W. (2007).** Incorporation of high levels of chimeric human immunodeficiency virus envelope glycoproteins into virus-like particles. *J Virol.* *81*, 10869–10878.
- Wang, Z., & Yan, X. (2013).** CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Lett.* *330*, 150–162.
- Warfield, K. L., Posten, N. A., Swenson, D. L., Olinger, G. G., Esposito, D., Gillette, W. K., Hopkins, R. F., Costantino, J., Panchal, R. G., Hartley, J. L., Aman, M. J., & Bavari, S. (2007).** Filovirus-like particles produced in insect cells: immunogenicity and protection in rodents. *J Infect Dis.* *196*, 421–429.
- Watson, M. (2012).** Drugs in Clinical Development for Melanoma. *Pharm Med.* *26*, *3*, 171–183.
- Xu, Y., Vijayasaradhi, S., & Houghton, A. N. (1998).** The cytoplasmic tail of the mouse brown locus product determines intracellular stability and export from the endoplasmic reticulum. *J Invest Dermatol.* *110*, 324–331.

Characterization of Virus-like Particles enriched with Melanoma Antigens

Olavi Reinsalu

Summary

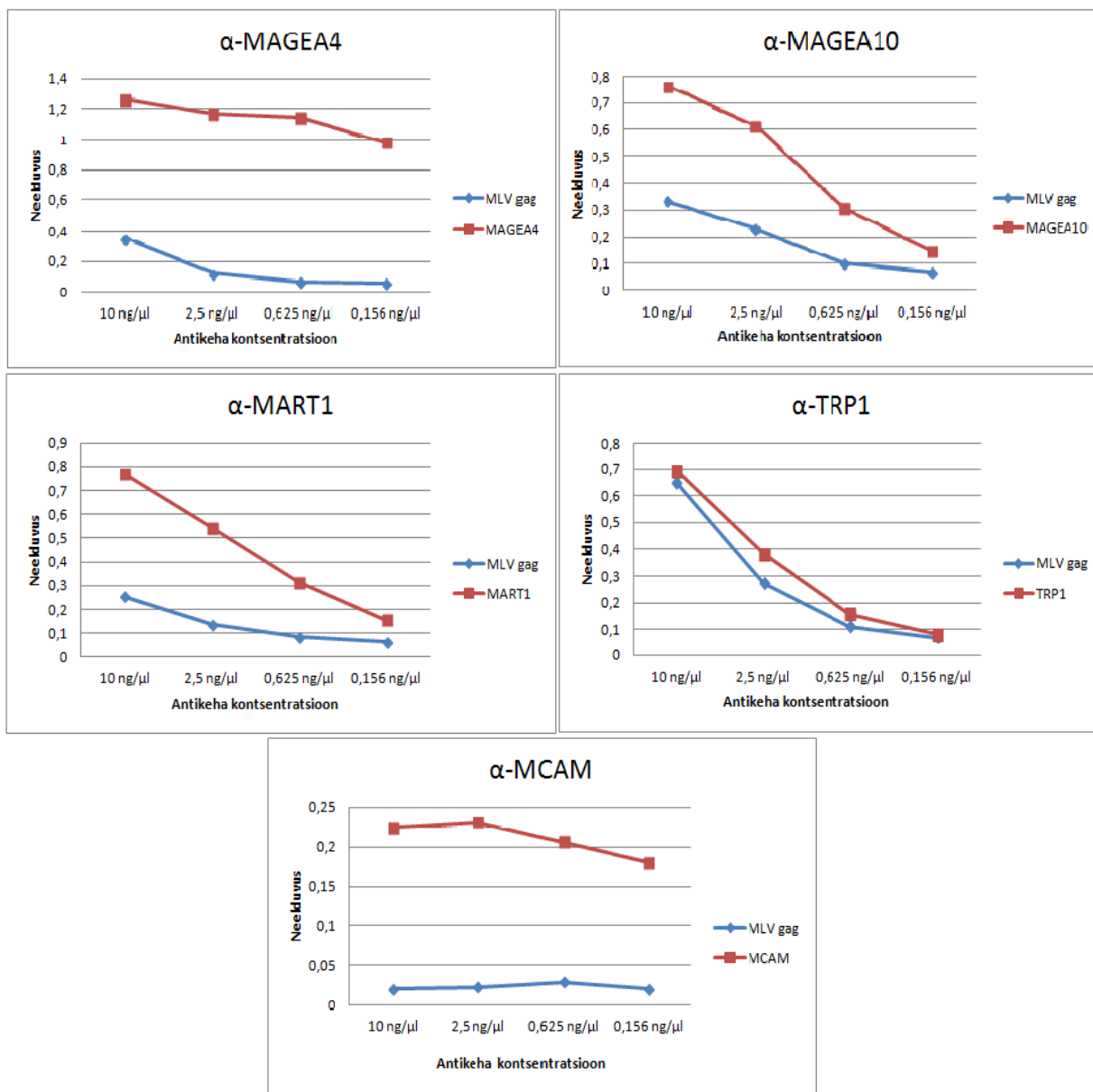
Melanoma is the most dangerous skin cancer in humans, being responsible for the majority of deaths related to skin cancer. With increasing rate there are more than 232 000 new melanoma incidences annually worldwide. Current popular melanoma treatments, including surgery, chemotherapy and others, are ineffective and novel melanoma treatment methods are developed. One of most promising methods are therapeutic cancer vaccines. In order to be effective antigens of cancer vaccine, they must be unique or highly expressed only in tumor and need to be presented in strongly immunogenic fashion. Virus-like particles (VLPs) are said to be very immunogenic and are being used as antigen delivery platforms in vaccines. In this study, our goal is to generate murine leukemia virus (MLV) based VLP-s that contain melanoma antigens, like MAGEA4, MAGEA10, MART1, TRP1 and MCAM.

We were able to successfully generate MLV VLPs that contain melanoma antigens. Our findings suggest that intracellular antigens MAGEA4, MAGEA10 and transmembrane antigen MCAM are expressed on the surface of the VLPs. This is the first time described that intracellular antigens are being expressed onto the surface of enveloped VLPs without fusion of antigen and viral component or chemical coupling. Relying on our results we believe that MART1 is being packed into the VLPs rather on the surface. Considering the strong cross-reactions of anti-TRP1 antibody we cannot confirm the presentation of TRP1 on the outer side of VLP membrane.

The analysis of antibodies induced by MAGEA4 and MART1 carrying VLPs determined that these VLPs do not elicit strong antibody responses in rabbits. The antibodies induced by MAGEA4 VLPs showed good specificity towards MAGE4 but had lower affinity. MART1 VLPs didn't induce any antibodies which were specific or had any affinity towards MART1 antigen.

Lisad

Lisa 1



ELISA testi analüüs läbi sahharoosi padja puhastatud MLV VLP proovidel. Cop5EBNA rakkudelt koguti sööde 72 h pärast transfektsiooni pQMCF-MLV Gag ja pQMCF-MLV Gag-MAA plasmiididega. Söötmed filtreeriti läbi 45 μm filtri ning tsentrifugeeriti läbi 20% sahharoosi padja. Igasse ELISA plaadi kaevukesse kanti 2 μg VLP-sid (totaalvalgu järgi). Iga uuritava antigeeni antikehaga inkubeeriti vastavat antigeeni sisaldava VLP proove ja MLV Gag VLP proove. Sinine kõver vastab antigeene mitte-sisaldavate VLP-de tulemustele. Punase kõveraga on kujutatud antigeene kandvate VLP-de tulemused.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Olavi Reinsalu

(sünnikuupäev: 29.07.1990)

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

„Melanoomi antigeenidega rikastatud viirus-laadsete partiklite iseloomustamine“,

mille juhendaja on *Ph D* 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 01.06.2017 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015.