

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Dovilė  
STRAVINSKIENĖ

Monokloninių ir rekombinantinių  
antikūnų prieš karboanhidrazes  
kūrimas

**DAKTARO DISERTACIJA**

Technologijos mokslai  
chemijos inžinerija **T 005**

---

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2012–2018 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

**Mokslinė vadovė:**

**prof. dr. Aurelija Žvirblienė** (Vilniaus universitetas, Biotechnologijos institutas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005)

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	6
ĮVADAS.....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	16
1.1. Monokloniniai ir rekombinantiniai antikūnai .....	16
1.1.1. Humoralinis įgytasis imuninis atsakas ir jo komponentai.....	16
1.1.2. Imunoglobulinų struktūra.....	19
1.1.3. Antikūnus koduojantys genai.....	20
1.1.4. Plazminių ląstelių ir aukšto giminingumo antikūnų susidarymas .....	23
1.1.5. Monokloniniai antikūnai ir jų kūrimas.....	25
1.1.6. Rekombinantiniai antikūnai ir jų taikymas .....	28
1.2. Karboanhidrazės, jų savybės ir sąsajos su ligomis.....	34
1.2.1. $\alpha$ -karboanhidrazės .....	34
1.3. Su vėžiu susijusios membraninės karboanhidrazės.....	37
1.3.1. Žmogaus karboanhidrazės IX apibūdinimas .....	37
1.3.2. Žmogaus karboanhidrazės XII apibūdinimas.....	39
1.3.3. Su vėžiu siejamų karboanhidrazių IX ir XII raiškos reguliavimas ....	41
1.3.4. Karboanhidrazių IX ir XII sąsajos su vėžiniais pakitimais .....	43
1.3.5. Karboanhidrazių IX ir XII tyrimai ir jų reikšmė vėžio diagnostikai..	45
1.3.6. Karboanhidrazės IX ir XII – vėžinės terapijos taikiniai.....	50
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	54
2.1. Medžiagos .....	54
2.1.1. Tirpalai ir terpės .....	54
2.1.2. Antriniai antikūnai .....	56
2.1.3. Rinkiniai.....	56
2.1.4. Restrikcijos endonukleazės .....	57
2.1.5. Klinikiniai mėginiai .....	57
2.1.6. Izotipinės kontrolės.....	58

2.1.7. Antigenai.....	58
2.1.8. Eksperimentiniai gyvūnai .....	58
2.1.9. Ląstelių linijos.....	58
2.1.10. Bakterijų kamienai .....	60
2.1.11. Pradmenys .....	60
2.1.12. Vektoriai.....	62
2.2. Metodai .....	63
2.2.1. Metodai, skirti darbui su žinduolių ląstelių kultūromis.....	63
2.2.2. Hibridomų kūrimas .....	64
2.2.3. Metodai, skirti rekombinantinių baltymų tyrimams ir monokloninių antikūnų apibūdinimui.....	66
2.2.4. Metodai, skirti nustatyti monokloninių antikūnų sąveikai su ląstelių baltymais .....	71
2.2.5. Molekulinės biologijos ir genų inžinerijos metodai.....	73
2.2.6. Rekombinantinių baltymų sintezė ir gryninimas .....	79
2.2.7. Bioinformatikos metodai.....	82
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	84
3.1. Monokloninių antikūnų prieš karboanhidrazę IX kūrimas, apibūdinimas ir taikymas.....	85
3.1.1. Monokloninių antikūnų prieš karboanhidrazę IX sukūrimas.....	85
3.1.2. Monokloninių antikūnų apibūdinimas .....	86
3.1.3. Monokloninių antikūnų sąveika su karboanhidraze IX biologiniuose mėginiuose .....	90
3.1.4. Karboanhidrazės IX raiškos tyrimas vėžinėse ląstelių linijose .....	95
3.1.5. Dviepitopės imunofermentinės analizės sistema, skirta tirpios karboanhidrazės IX nustatymui.....	101
3.2. Monokloninių antikūnų prieš karboanhidrazę XII kūrimas, apibūdinimas ir taikymas.....	106
3.2.1. Monokloniniai antikūnai prieš rekombinantinę bakterijose susintetintą karboanhidrazę XII.....	106
3.2.2. Monokloniniai antikūnai prieš karboanhidrazės XII fragmentą.....	113

3.2.3. Monokloniniai antikūnai prieš rekombinantinę žmogaus ląstelėse susintetintą karboanhidrazę XII.....	117
3.3. Rekombinantinių antikūnų prieš karboanhidrazę XII kūrimas .....	129
3.3.1. Monokloninio antikūno 14D6 kaičiųjų sričių identifikavimas .....	130
3.3.2. Viengrandžių antikūnų fragmentų konstravimas ir raiška .....	133
3.3.3. Viengrandžių antikūnų fragmentų su žmogaus IgG1 pastoviuoju regionu konstravimas ir raiška .....	137
DISKUSIJA.....	140
IŠVADOS.....	149
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS .....	150
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	153
CURRICULUM VITAE .....	167
PADĖKA.....	168
UŽRAŠAMS .....	169

## SANTRUMPOS

6-FAM – reporterinis dažas, angl. *6-carboxyfluorescein*;  
A431 – žmogaus odos plokščialąstelinės karcinomos ląstelių linija;  
A498 – žmogaus inkstų karcinomos ląstelių linija;  
A549 – žmogaus plaučių vėžio ląstelių linija;  
ADCC – antikūnų nulemtas ląstelinis citotoksiškumas, angl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*;  
APS – amonio peroksosulfatas;  
ar. – aminorūgštis;  
AT-kPGR – tikro laiko (arba kiekybinė) atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininės reakcija;  
AZM – acetazolamidas;  
BCR – B ląstelės receptoriai, angl. *B-cell receptor*;  
BHQ-1 arba BHQ-2 – fluorescencijos signalo slopikliai, angl. *Black Hole Quencher*;  
BSA – jaučio serumo albuminas, angl. *bovine serum albumin*;  
CA – karboanhidrazė, angl. *carbonic anhydrase*;  
CA IX – karboanhidrazė IX;  
CA IX<sup>+PG</sup> – rekombinantinis CA IX katalizinis domenas su PG domenu;  
CA IX<sup>-PG</sup> – rekombinantinis CA IX katalizinis domenas be PG domeno;  
CA XII – karboanhidrazė XII;  
CA12<sup>DE3</sup> – rekombinantinis CA XII baltymas susintetintas *E. coli* Rosetta DE3 kamiene;  
CA12<sup>HEK</sup> – rekombinantinis CA XII baltymas susintetintas žmogaus HEK-293 ląstelėse;  
CARP – su CA siejami baltymai, angl. *Carbonic Anhydrase Related Protein*;  
CAR-T – modifikuotos T ląstelės, kurios paviršiuje sintetina chimerinį antigeno receptorių, angl. *chimeric antigen receptor T cell*;  
CaSki – žmogaus gimdos kaklelio plokščialąstelinės karcinomos ląstelių linija;  
CDR – komplementariosios sekos arba hiperkaičiosios sritys, angl. *complementarity determining region*;  
CEM – žmogaus ūminės limfogeninės leukemijos ląstelių linija;  
cG250 – chimerinis G250 antikūnas;  
CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> ir CH<sub>3</sub> – pastovieji sunkiosios grandinės domenai;  
CHO – kininio žiurkėno kiaušidžių ląstelių linija, angl. *Chinese hamster ovary cells*;  
Cy5 – reporterinis dažas, angl. *Cyanine-5*;

CIS – karcinoma *in situ*;  
CL – lengvosios grandinės pastovusis domenas;  
CNS – centrinė nervų sistema;  
COLO – gaubtinės žarnos karcinomos ląstelių linija;  
CV – AT-kPGR standartų variacijos koeficientas;  
D – įvairovės genų segmentai angl., *diversity*;  
DMEM – *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė;  
E – AT-kPGR reakcijos efektyvumas;  
EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;  
Fab – fragmentas sąveikaujantis su antigenu, angl. *fragment antigen binding*;  
FBS – fetalinis veršiuko serumas, angl. *fetal bovine serum*;  
Fc – pastovusis fragmentas, angl. *fragment crystallisable*;  
FDA – JAV maisto ir vaistų administracija, angl. *USA Food and Drug Administration*;  
FITC – fluoresceino izotiocianatas, angl. *Fluorescein isothiocyanate*;  
FR – struktūriniai karkasiniai regionai, angl. *structural framework regions*;  
Fv – kaitusis fragmentas, angl. *fragment variable*;  
GuHCl – guanidino hidrochloridas;  
H – sunkioji grandinė, angl. *heavy chain*;  
h – valanda;  
H9 – žmogaus limfomos ląstelių linija;  
HACA – žmogaus antikūnai prieš chimerinius antikūnus, angl. *human anti-chimeric antibody*;  
HAMA – žmogaus antikūnai prieš pelės imunoglobulinus, angl. *human anti-mouse antibody*;  
HAT – hipoksantinas, aminopterinas, timidinas;  
HCT – žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos ląstelių linija;  
HEK-293 – žmogaus embrioninių inkstų ląstelių linija, angl. *Human embryonic kidney 293 cells*;  
HeLa – žmogaus gimdos kaklelio karcinomos ląstelių linija, angl. *human cervical carcinoma cell line*;  
HGPRt – hipoksantino-guanino-fosforibozil transferazė, angl. *hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase*;  
HIF-1 – hipoksijos indukuojamas veiksnys 1, angl. *hypoxia inducible factor 1*;  
HRE – hipoksijos atsako elementas, angl. *hypoxia response element*;  
HRP – krienų peroksidazė, angl. *horseradish peroxidase*;  
Huh 7 – žmogaus kepenų karcinomos ląstelių linija;  
HUT – žmogaus limfomos (*Sezary* sindromas) ląstelių linija;

IB – imunoblotingas, angl. *Western Blot*;  
IC50 – slopinimo konstanta;  
IF – imunofluorescencinė analizė;  
IFA – imunofermentinė analizė, angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)*;  
Ig – imunoglobulinas;  
IgG, IgM, IgE, IgD, IgA – imunoglobulinas G, imunoglobulinas M, imunoglobulinas E, imunoglobulinas D, imunoglobulinas A;  
IHC – imunohistocheminė analizė;  
IP – imunoprecipitacija;  
IPTG – izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozidas;  
iRNR – informacinė RNR, angl. *messenger RNA*;  
J – jungiamieji genų segmentai, angl. *joining*;  
JOE – reporterinis dažas dichlorodimetoksifluoresceinas, angl. *dichlorodimethoxyfluorescein*;  
Jurkat – žmogaus ūmios T ląstelių leukemijos ląstelių linija;  
K-562 – žmogaus lėtinės mielogeninės leukemijos ląstelių linija;  
 $K_d$  – tariamoji giminingumo konstanta;  
kDNR – kopijinė DNR;  
KLH – moliusko hemocianinas, angl. *Keyhole limpet hemocyanin*;  
KPV – kiaulių parvovirusas, angl. *porcine parvovirus*;  
KT – kambario temperatūra;  
L – lengvoji grandinė, angl. *light chain*;  
LB – *Luria-Bertani E. coli* augimo terpė;  
M – AT-kPGR kalibracinės kreivės nuokrypis;  
MAk – monokloniniai antikūnai;  
MCF-7 – žmogaus krūties karcinomos ląstelių linija;  
MDA-MB-231 – žmogaus krūties adenokarcinomos ląstelių linija;  
OT – optinis tankis;  
PAk – polikloniniai antikūnai;  
PBS – fosfatinis buferinis tirpalas;  
PEG – polietileno glikolis;  
PET/imuno-PET – pozitronų emisijos tomografija, angl. *Immuno-positron emission tomography*;  
PG – proteoglikaninis domenai, angl. *proteoglycan-related region*;  
PGR – polimerazės grandininė reakcija;  
PHD – prolil-4-hidroksilazė, angl. *prolyl-4-hydroxylase*;  
pH<sub>e</sub> – užląstelinis pH, angl. *extracellular*;  
pH<sub>i</sub> – viduląstelinis pH, angl. *intracellular*;



RAk – rekombinantiniai antikūnai;  
RCC – inkstų ląstelių karcinoma, angl. *renal cell carcinoma*;  
RE – restrikcijos endonukleazė  
RSS – rekombinacijos signalinės sekos, angl. *recombination signal sequences*;  
scFv – viengrandis antikūno fragmentas, angl. *Single-chain variable fragment*;  
scFv-Fc – scFv prijungtas prie pastoviojo žmogaus IgG1 Fc fragmento;  
SDS – natrio dodecilsulfatas, angl. *sodium dodecyl sulfate*;  
SDS-PAGE – baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis, angl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*;  
Sp2/0 – pelės mielomos ląstelių linija;  
TC – tėkmės citometrija;  
TdT – terminalinė deoksinukleotidil transferazė, angl. *Terminal deoxynucleotidyl transferase*;  
TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diaminas;  
T<sub>FH</sub> – folikulinės T pagalbininkės, angl. *T follicular helper cell*;  
U-87 – glioblastomos ląstelių linija;  
V – kaitieji genų segmentai, angl. *variable*;  
VH – sunkiosios grandinės kaitusis (arba variabilusis) domenas;  
VL – lengvosios grandinės kaitusis (arba variabilusis) domenas;  
VHL – *von Hippel-Lindau* baltymas;  
VPC – Valstybinis patologijos centras;  
VU GMC BTI BVTS – Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyrius;  
VU GMC BTI ILBS – Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyrius.



## ĮVADAS

Moksliniai tyrimai, susiję su įvairių ligų, pavyzdžiui, vėžio, diagnostika ir terapija, vystomi daugelyje pasaulio laboratorijų. Mokslininkai bando sukurti naujus įrankius, kurie padėtų tiksliai diagnozuoti ligą ar su ja susijusius pakitimus, prognozuotų eigą ar skirtos terapijos efektyvumą. Taip pat reikalingi specifiški terapiniai agentai, kurie paveiktų ligos atsiradimui ar vystymuisi svarbius komponentus, tokius kaip ląstelių fermentai ar receptoriai, ir sukeltų kuo mažiau pašalinių reiškinių. Monokloniniai antikūnai (MAK) ypač tinka tiksliai diagnostikai, kadangi gali itin specifiskai jungtis su tiriamuoju objektu, yra gana lengvai pagaminami ir pritaikomi įvairiems tyrimo metodams. Rekombinantiniai antikūnai (RAK) vis plačiau taikomi įvairių ligų gydymui. Jie sukelia mažiau žalos visam organizmui nei citotoksinio poveikio vaistai, nes veikia tik tam tikras antigenų sintetinančias ląsteles.

Labai svarbu surasti tinkamą taikinį, prieš kurį būtų tikslinga kurti MAK ir RAK. Šiame darbe buvo pasirinktos dvi žmogaus karboanhidrazių izoformos IX ir XII (CA IX ir CA XII), kurios abi siejamos su vėžiniais pakitimais ir laikomos hipoksiją patiriančio vėžio biožymenimis. Šie fermentai gali būti antikūnų taikiniai, kadangi yra transmembraniniai baltymai su aktyviuoju centru nukreiptu į ląstelės išorę. CA IX ir CA XII prisideda prie vėžinių ląstelių išgyvenimo ir proliferacijos susidarius hipoksijai, o jų raiška būna padidėjusi vėžiniuose audiniuose. Atlikta daug tyrimų, kurie parodė CA IX svarbą vėžiniuose procesuose. Buvo sukurti MAK/RAK specifiskai sąveikaujantys su CA IX, kurie jau yra pasiekę klinikinių tyrimų stadiją tiek vėžio diagnostikos, tiek imunoterapijos srityse. CA XII vaidmuo kancerogenezeje tyrinėtas mažiau, o gauti rezultatai nėra vienareikšmiai, todėl naujų įrankių, skirtų CA XII tyrimams, poreikis labai didelis. CA XII kaip taikinio vėžio terapijai potencialas taip pat ne visai aiškus, kadangi dar nėra MAK/RAK kurie būtų pasiekę klinikinius bandymus.

Daugėja tyrimų, kurie šias izoformas sieja ne tik su vėžiu, bet ir su kitomis ligomis, pavyzdžiui, CA IX galimai prisideda prie kylančiosios aortos dilatacijos, CA IX ir CA XII gali sietis su sąnarių ligomis ir gali būti potencialiais taikiniai reumatoidinio artrito terapijoje. Todėl nauji ir specifiški MAK/RAK gali turėti labai platų pritaikymą, tiek tiriant CA IX ir CA XII svarbą patologiniuose procesuose, tiek ligų gydymui.

Kuriant MAK, svarbu juos apibūdinti įvairiais imunocheminiais metodais, siekiant kuo geriau iširti jų savybes bei įvertinti jų taikymo tyrimams, diagnostikai ar terapijai perspektyvas. Tik natyvų baltymą atpažįstantys MAK

gali būti panaudoti diagnostikai ar taikinių terapijai, o turintys baltymo funkciją neutralizuojančių savybių yra dar vertingesni.

Šiame darbe buvo sukurti nauji MAk, kurie buvo pritaikyti CA IX ir CA XII tyrimams vėžinių ląstelių linijose ir klinikiniuose mėginiuose. Pavyko sukurti MAk, kuris slopino CA XII fermentinį aktyvumą ir atpažino natyvią ląstelėse lokalizuotą CA XII. Iš šios hibridomų linijos buvo sukurti du RAK variantai – vienas mažesnės molekulinės masės viengrandis antikūno fragmentas (scFv), kitas scFv prijungtas prie pastoviojo žmogaus imunoglobulino fragmento Fc (scFv-Fc). Viengrandis scFv lengviau prasiskverbia į audinius ir gali būti panaudotas tiek diagnostikai, tiek terapijai, kaip, pavyzdžiui, toksiškų junginių nešiklis. Fc modifikuotas RAK yra tinkamas terapijai, nes gali aktyvinti žmogaus imuninės sistemos komponentus kovoti su vėžinėmis ar antigeną sintetinančiomis ląstelėmis.

Šis darbas priskiriamas tarpdisciplininių tyrimų kategorijai, nes jo metu buvo panaudoti įvairūs imunologijos, ląstelės biologijos, molekulinės biologijos ir genų inžinerijos metodai, kurie pritaikyti kuriant naujus įrankius, turinčius potencialų biotechnologinį ir biomedicininį pritaikymą.

## **Darbo tikslas**

Sukurti naujus monokloninius ir rekombinantinius antikūnus, skirtus žmogaus karboanhidrazių CA IX ir CA XII raiškos tyrimams biologiniuose mėginiuose ir turinčius potencialų pritaikymą taikinių terapijai.

## **Darbo uždaviniai**

1. Sukurti naujas hibridomas, sekretuojančias monokloninius antikūnus (MAk) prieš rekombinantines karboanhidrazes CA IX ir CA XII.

2. Sukurtus MAk apibūdinti įvairiais imunocheminiais ir biocheminiais metodais: ištirti jų neutralizuojantį aktyvumą, sąveiką su ląstelėse lokalizuotais antigenais, kryžmines reakcijas su kitomis karboanhidrazių izoformomis, nustatyti afiniškumą, atlikti epitopų analizę.

3. Įvertinti naujų MAk tinkamumą CA IX ir CA XII raiškos tyrimams vėžinėse ląstelių linijose, jas auginant normoksijos ir hipoksijos sąlygomis.

4. Įvertinti naujų MAk diagnostinį potencialą, tiriant CA IX ir CA XII raišką klinikiniuose mėginiuose.

5. Atrinkti perspektyviausius MAk prieš CA XII ir iš juos sekretuojančių hibridomų genetinės medžiagos sukurti rekombinantinius antikūnus, turinčius potencialų taikymą taikinių terapijai.

Tyrimai buvo atlikti vykdant šiuos Lietuvos Mokslo Tarybos (LMT) finansuojamus mokslinius projektus ir studentų mokslines praktikas:

LIG-16/2010 „Karboanhidrazių, kaip vėžinių ląstelių žymenų, diagnostinio potencialo įvertinimas“ (vadovas dr. D. Matulis),

LIG-09/2012 „Karboanhidrazės hCA XII, kaip vėžinių ląstelių žymens, diagnostinio potencialo įvertinimas“ (vadovas dr. D. Matulis),

MIP-37/2012 „Rekombinantinių antikūnų prieš karboanhidrazę kūrimas“ (vadovė dr. A. Žvirblienė),

SEN-04/2015 „Žmogaus karboanhidrazės IX, kaip vėžinių ląstelių žymens, taikymo onkologinių ligų diagnostikai, vaizdinimui bei prognozei, tyrimas“ (vadovė dr. J. Matulienė),

VP1-3.1-ŠMM-01-V-02-003 „Karboanhidrazės XII fragmentų konstravimas ir jų taikymas antikūnų epitopų nustatymui“ (vadovė D. Stravinskienė),

VP1-2.2-ŠMM-09-V-01-009 „Monokloninių antikūnų prieš karboanhidrazę XII kūrimas ir charakterizavimas“ (vadovė D. Stravinskienė),

VP1-09.3.3.-LMT-K-712-09-0124 „Ląstelių linijų, sekretuojančių rekombinantinius antikūnus, kūrimas“ (vadovė D. Stravinskienė).

LMT taip pat finansavo doktorantės D. Stravinskienės akademinės išvykas, skirtas pristatyti tyrimo rezultatus tarptautinėse konferencijose:

DOC-29/2014 – Europos biochemikų draugijų federacijos ir Europos molekulinės biologijos organizacijos (FEBS-EMBO 2014) konferencija Paryžiuje, Prancūzijoje. Pristatytas standinis pranešimas „Nauji monokloniniai antikūnai inhibuojantys su vėžiu siejamą karboanhidrazę XII“ (angl. „Novel inhibitory monoclonal antibodies against tumour-associated carbonic anhydrase XII);

DOC-30/2015 – 4-oji Europos imunologijos konferencija (ECI 2015) Vienoje, Austrijoje. Pristatytas standinis pranešimas „Su vėžiu siejamos karboanhidrazės XII raiškos tyrimai vėžinėse ląstelėse“ (angl. „Investigation of tumor-associated carbonic anhydrase XII expression in cancer cells“).

Buvo gautos LMT finansuojamos doktoranto stipendijos už akademinis pasiekimus 2012, 2013 ir 2014 metais.

## **Darbo mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė**

MAk, prieš vėžiniuose ar kituose patologiniuose procesuose dalyvaujančius baltymus, turi didelę diagnostinę ir terapinę vertę, todėl šiame darbe buvo sukurtos dvi naujos didelės MAk prieš CA IX ir CA XII kolekcijos. Pirmą kartą MAk prieš CA IX ir CA XII kūrimui buvo panaudoti rekombinantiniai antigenai, susintetinti bakterijų ir žinduolių ląstelėse. Anksčiau aprašytieji MAk prieš šias CA izoformas buvo sukurti, naudojant vėžines ląsteles arba jų lizatus. Tokiu būdu galima gauti natyvius baltymus atpažįstančius MAk, tačiau jų atranka yra labai sudėtinga, nes susidaro antikūnai prieš antigenų mišinį. Dažniausiai gaunami tik konformacinius epitopus atpažįstantys MAk, kurių taikymo galimybės gana ribotos.

Imunizacijai naudojant rekombinantinius baltymus, MAk atranka tampa paprastesnė ir gali būti atliekama standartinės imunofermentinės analizės metodu, tačiau išlieka rizika, kad MAk gali neatpažinti natyvių, ląstelėse lokalizuotų CA IX ir CA XII. Todėl sukurtieji MAk buvo visapusiškai apibūdinti: ištirtos jų kryžminės reakcijos su įvairiomis CA izoformomis, sąveika su natyviais antigenais, nustatytas giminingumas, identifikuoti epitopai. Šie tyrimai parodė, kad rekombinantiniai CA IX ir CA XII antigenai yra tinkami kuriant MAk, kurie sąveikauja su natyviais, ląstelėse lokalizuotais baltymais ir gali būti pritaikomi CA IX ir CA XII tyrimams įvairiais imunocheminiais metodais. Be to, pavyko sukurti MAk, kurie slopino CA XII fermentinį aktyvumą. Tai rodo, kad sukurtieji MAk gali turėti potencialų pritaikymą su CA IX ir CA XII siejamų ligų diagnostikai ar taikinių terapijai.

Iš hibridomų, sekretuojančių neutralizuojančius MAk prieš CA XII, genetinės medžiagos, buvo sukurti rekombinantinių antikūnų variantai scFv ir scFv-Fc ir patvirtintas jų funkcinis aktyvumas bei specifiškumas antigenui. Tokių formatų RAK prieš CA XII buvo sukurti pirmą kartą, jie užpatentuoti (LT patentas Nr. 6331 B).

## **Ginamieji teiginiai**

1. Rekombinantiniai bakterijų ar žinduolių ląstelėse susintetinti CA IX ir CA XII baltymai yra tinkami antigenai hibridomų, sekretuojančių aukšto giminingumo ir specifškumo MAk, kūrimui.

2. MAk sukurti prieš rekombinantines CA IX ir CA XII specifškaitai jungiasi su ląstelėse lokalizuotomis CA IX ir CA XII, todėl gali būti taikomi šių CA izoformų tyrimams klinikiniuose mėginiuose ir vėžinėse ląstelių linijose.

3. Hibridomų, sekretuojančių neutralizuojančius MAk prieš CA XII, genetinė medžiaga gali būti panaudota potencialios terapinės paskirties RAK kūrimui.

4. Nustačius MAk prieš CA XII lengvosios ir sunkiosios grandinių variabiliųjų fragmentų sekas, atsakingas už sąveiką su antigenu, galima sukurti įvairių formų funkciškai aktyvius RAK, išlaikančius specifškumą CA XII antigenui.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Monokloniniai ir rekombinantiniai antikūnai

Antikūnai yra įgytojo humoralinio imuninio atsako komponentai. Jų funkcija – atpažinti, neutralizuoti antigenus arba inicijuoti kitų imuninės sistemos komponentų atsaką į juos (Shishido et al., 2012). Antikūnai yra viena iš didžiausių baltymų grupių, naudojamų ne tik įvairiems tyrimams, bet ir ligų diagnostikai, jų prevencijai bei terapijai (Kunert and Reinhart, 2016). Proveržis šioje srityje įvyko 1975 metais, kai *G. Köhler* ir *C. Milstein* sukūrė ir publikavo metodą, kuris dabar vadinamas hibridomų technologija. Metodika leidžia sukurti hibridines ląsteles, kurios gali ilgai išgyventi kultivuojamos *in vitro*, bei sekretuoja vieną epitopą atpažįstančius monokloninius antikūnus (MAk), kurie pasižymi homogeniškumu, specifiškumu antigenui ir gali būti gaunami beveik neribotais kiekiais. MAk sukėlė tikrą perversmą įvairiose srityse – nuo fundamentinių tyrimų iki panaudojimo imunoterapijai, kadangi jų taikymo galimybės yra labai plačios (Siddiqui, 2010). Vėliau, išstobulėjus molekulinės biologijos ir genų inžinerijos technologijoms, pradėti kurti įvairaus formato rekombinantiniai antikūnai (RAk), kurie konstruojami taip, kad būtų kuo mažiau imunogeniški žmogui (Kunert and Reinhart, 2016). RAk yra laikomi ypač perspektyvia ir greitai augančia terapinių reagentų kategorija – keli šimtai jų yra patvirtinti medicininiam naudojimui arba yra klinikinių tyrimų stadijoje (Nelson et al., 2010).

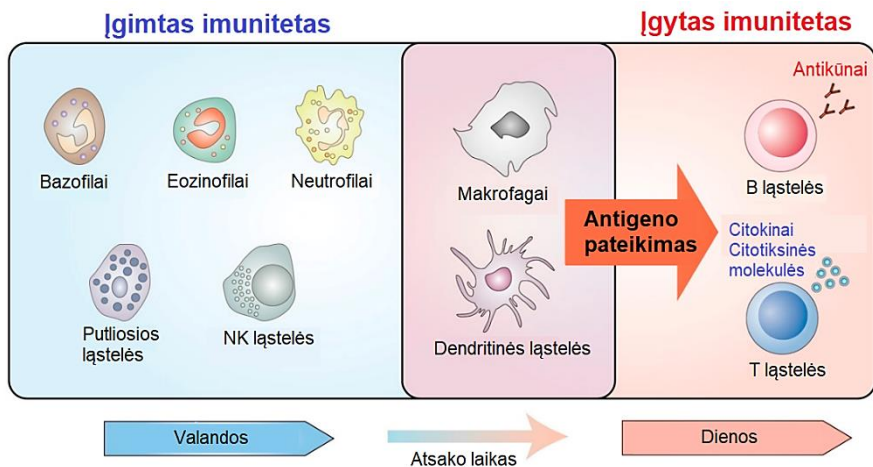
### 1.1.1. Humoralinis įgytasis imuninis atsakas ir jo komponentai

Imuninė sistema yra labai sudėtinga, tačiau evoliucionavo taip, kad šeimininkas nuo patogeninių mikroorganizmų būtų apsaugotas optimaliu keliu. Svarbiausia imuninės sistemos savybė, mobilizuojant atsaką prieš patogeną, yra sugebėjimas atskirti savus organizmo komponentus nuo svetimų. Šeimininkas pasinaudoja tiek įgimtojo, tiek įgytojo imuniteto mechanizmais aptinkant ir sunaikinant svetimkūnį (Chaplin, 2010).

Tradiciskai įgimtasis imunitetas yra apibrėžiamas kaip greitas, nespecifiškas, kiekybiškai ir kokybiškai vienodas, esant pasikartojančioms infekcijoms. Dauguma įgimtojo imuniteto ląstelių gyvuoja trumpą laiką, pavyzdžiui, neutrofilų gyvavimo trukmė yra nuo kelių valandų iki dienų, todėl laikoma, kad įgimtajam imunitetui nebūdinga imuninė atmintis patogeniui. Priešingai, esminiai įgytojo imuniteto bruožai yra ilgai gyvujančių antigenui specifiskų ląstelių susidarymas po pirmojo susidūrimo su antigenu ar



patogenu, kurios gali daug greičiau ir stipriau reaguoti, jei tas pats patogenas į organizmą patenka pakartotinai. Tai laikoma imunologine atmintimi (Lanier and Sun, 2009; Ratajczak et al., 2018). Nors atrodo, kad įgimtas ir įgytasis imunitetas yra labai nutolę vienas nuo kito, bet jų abiejų sąveika yra būtina tinkamam imuninės sistemos funkcionavimui ir efektyviam atsakui į patogeną. Imuninės sistemos komponentai sąveikauja tarpusavyje, taip sudarydami optimalias sąlygas patogeno sunaikinimui (1 pav.) (Lanier and Sun, 2009; Yamauchi et al., 2019).

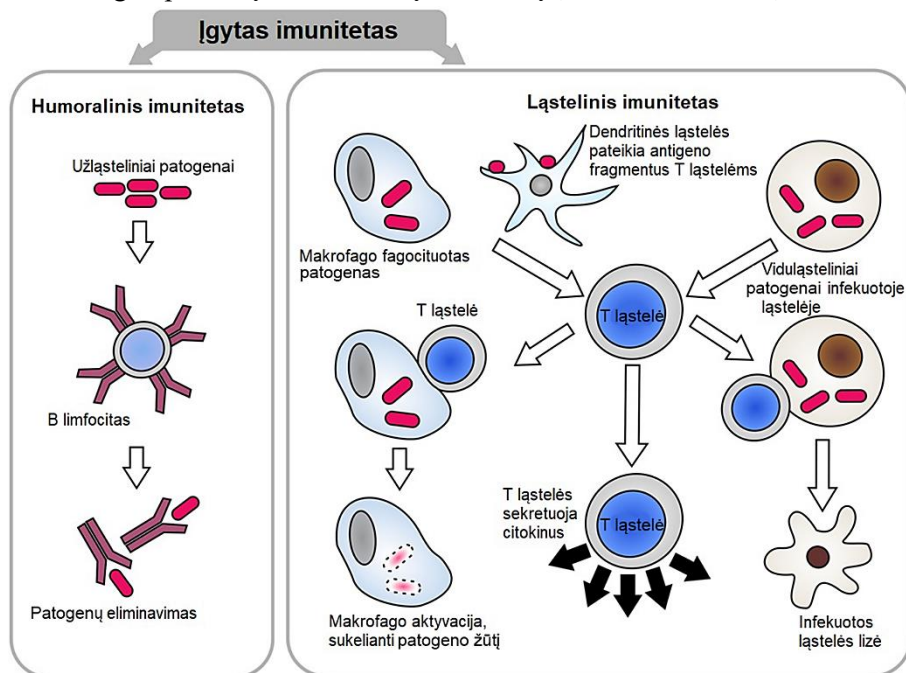


**1 pav.** Ląsteliniai imuninės sistemos komponentai. Įgimtojo imuniteto ląstelės bazofilai, eozinofilai, neutrofilai, putliosios, NK (angl. *natural killer*) ląstelės, makrofagai ir dendritinės ląstelės suteikia pirmąją kovojant su bakterijomis, virusais ar pakitusiomis paties šeimininko ląstelėmis. Įgytajam imunitetui susiformuoti reikia keleto dienų; jis yra specifiškas antigenui ir atsakingas už ilgalaikę apsaugą nuo patogeno. Įgytojo imuniteto B ląstelės atsakingos už humoralinį imuninį atsaką, o T ląstelės – už ląstelinį. Makrofagai ir dendritinės ląstelės yra profesionalios antigeną pateikiančios ląstelės, todėl yra būtinos aktyvinant įgytojo imuniteto ląsteles per antigeno pateikimą (Yamauchi et al., 2019).

Įgytasis imunitetas dar yra skirstomas į humoralinį ir ląstelinį, kadangi jų mechanizmuose dalyvauja skirtingi komponentai, kurių funkcija – sunaikinti skirtingų tipų patogenus (2 pav.). Ląstelinis atsakas yra vykdomas T ląstelių, dar vadinamų T limfocitais, kurios kovoja su viduląsteliniais virusais ar bakterijomis, išgyvenusiais ir besidauginančiais fagocitų viduje ir kitose šeimininko ląstelėse ir yra nepasiekiami antikūnams. T ląstelės skatina patogenų žūtį fagocitų viduje ar sunaikina infekuotą ląstelę, taip eliminuodamos infekcijos rezervuarą. T ląstelės prisideda ir prie užląstelinio patogenų naikavimo, kadangi pritraukia leukocitus į infekcijos vietą, bei

padeda B ląstelėms sekretuoti efektyvesnius antikūnus (Abbas et al., 2014; Marshall et al., 2018).

B ląstelės (B limfocitai) sekretuoja molekules, vadinamas antikūnais, kurios cirkuliuoja kraujyje ar gleivinėse. Antikūnai atpažįsta patogeno antigeną, neutralizuoja jo virulentiškumą ir pažymi patogeną sunaikinimui, pasitelkiant įvairius imuninės sistemos komponentus. Humoralinis imunitetas yra nukreiptas prieš užląstelinius patogenus ir jų toksinus, kadangi sekretuojami antikūnai gali jungtis su jais ir prisidėti prie jų eliminavimo, tačiau negali patekti į infekuotos ląstelės vidų (Abbas et al., 2014).



**2 pav.** Schemoje pavaizduotos dvi įgytojo imuniteto šakos, humoralinis ir ląstelinis imunitetas, kurios sudaro apsaugą prieš užląstelinius ir viduląstelinius patogenus (Evensen, 2016).

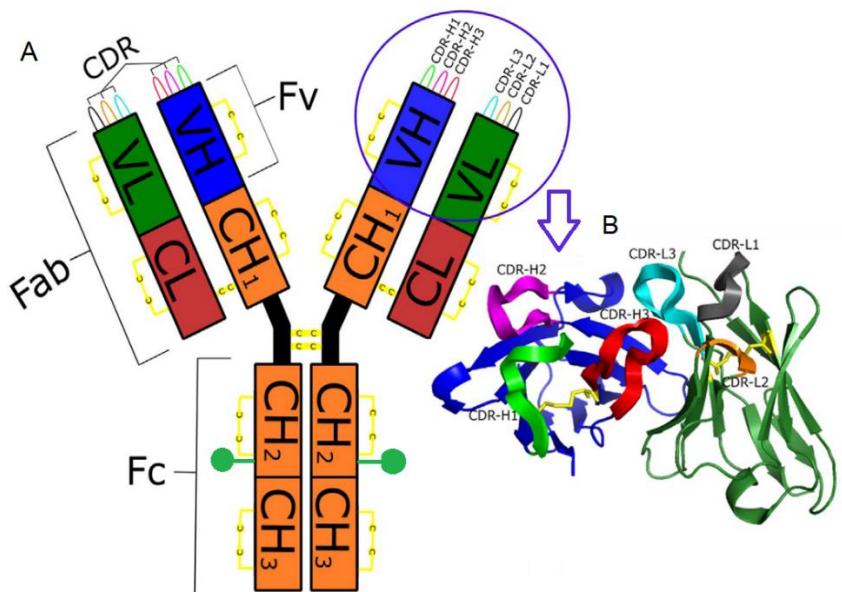
Vienintelis antikūnų šaltinis organizme yra B ląstelės, išsivysčiusios iki plazminių ląstelių. Tai yra centrinis elementas, kalbant apie įgytojo humoralinio imuninio atsako susidarymą. B ląstelės vystosi iš hemopoetinių kamieninių ląstelių, jų brendimas prasideda kaulų čiulpuose. Nesubrendę B limfocitai keliauja į blužnį, kur tampa subrendusiais naiviaisiais B limfocitais. Naivosios B ląstelės iš pradžių reziduoja blužnyje, po to recirkuliuoja ir kolonizuoja įvairius antrinius periferinius limfinius organus (limfmazgius, tonziles, Peyer plokšteles), kuriuose sutikti antigeną yra didžiausia tikimybė (Thomas et al., 2006).

B ląstelei bręstant kaulų čiulpuose, svarbiausias procesas yra B ląstelės receptoriaus (BCR, angl., *B cell receptor*), kuris yra membraninis imunoglobulinas ir sekretuojamo antikūno pirmtakas, formavimasis (Yam-Puc et al., 2018).

### 1.1.2. Imunoglobulinų struktūra

Antikūnai, dar vadinami imunoglobulinais (Ig), priklauso Ig superšeimai, kurią sudaro daugiau kaip 700 ląstelės paviršiaus ir sekretuojamų baltymų, turinčių bent vieną Ig domeną. Šie baltymai dalyvauja įvairiuose ląstelių atpažinimo, adhezijos, vystymosi procesuose ir yra vieni svarbiausių įgimtojo ir įgytojo imuniteto komponentų (Yap et al., 2014).

Antikūno, konkrečiai imunoglobulino G (IgG), molekulė susideda iš keturių polipeptidinių grandinių, tarpusavyje sujungtų disulfidiniiais ryšiais (3 pav., A). Dvi identiškios sunkiosios grandinės (H) turi po vieną kaitųjį (VH) ir po tris pastoviuosius (CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> ir CH<sub>3</sub>) domenus. Dvi identiškios lengvosios (L) grandinės sudarytos iš vieno kaičiojo (VL) ir pastoviojo (CL) domeno. Grandinės pavadintos pagal jų molekulinę masę: vienos H grandinės molekulinė masė yra ~50 kDa, L grandinės ~25 kDa, o bendrai visos keturios grandinės suformuoja ~150 kDa molekulę (Bentley, 1994; Kovaltsuk et al., 2017; Tamošiūnas et al., 2012).



**3 pav.** (A) Schematiškai pavaizduota IgG struktūra. (B) Fv regiono struktūra (VH – mėlyna spalva, VL – žalia spalva, CDR hiperkaičiosios sekos – įvairios spalvos). Disulfidiniai ryšiai pavaizduoti geltona spalva, žali apskritimai – asn297 N-glikozilavimo vietos (Kovaltsuk et al., 2017).

Ig molekulėje išskiriami keli fragmentai, svarbūs antikūno funkcijoms. Fab fragmentas (angl. *fragment antigen binding*) – molekulės dalis atsakinga už sąveiką su antigenu. Sudarytas iš abiejų pilnų L grandinių ir abiejų H grandinių VH ir CH<sub>1</sub> domenų. N-galo VL ir VH domenai kartu vadinami kaičiuoju fragmentu (Fv, angl., *fragment variable*), kuriame yra antigeno surišimo sritis, kurių IgG turi dvi (3 pav., B). Pagrindinės sekos, tiesiogiai prijungiančios antigeną, yra vadinamos komplementariosiomis arba hiperkaičiosiomis sritimis (CDR, angl. *complementarity determining region*). Viename Fv domene yra 3 CDR sekos, sudarytos tiek iš L, tiek iš H grandinių aminorūgščių (ar.). Fc fragmentas (angl. *fragment crystallisable*) – sunkiosios grandinės C-galo dalis, sudaryta iš CH<sub>2</sub> ir CH<sub>3</sub> pastoviuųjų domenų ir atsakinga už antikūno efektorines funkcijas per sąveiką su komplemento baltymais ir Fc receptoriais, esančiais įvairiose imuninėse ląstelėse. Pagal Fc fragmentą sudarančios H grandinės tipą yra išskiriamos antikūnų klasės (1 lentelė) (Abbas et al., 2014; Deisenhofer, 1981; Poljak et al., 1973; Tamošiūnas et al., 2012).

**1 lentelė.** Žmogaus ir pelės Ig klasės (Abbas et al., 2014; Schroeder et al., 2010).

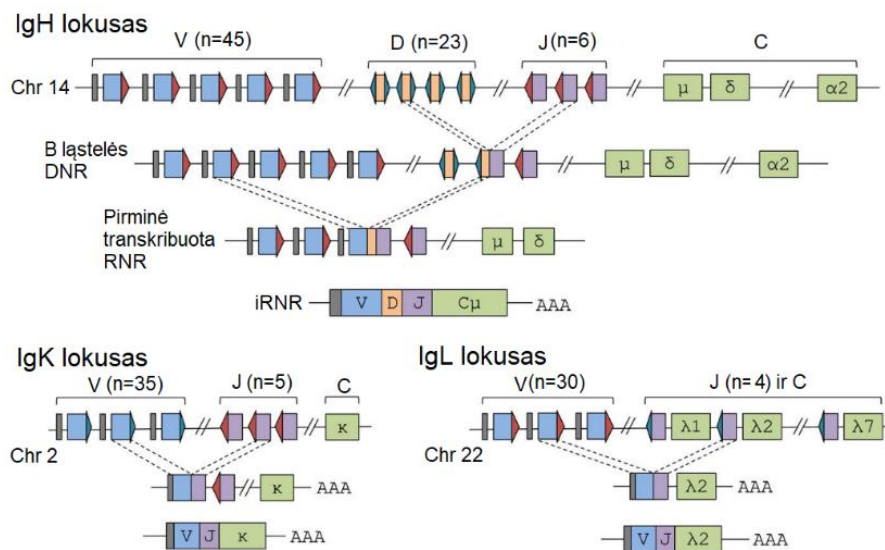
Organizmas	Ig tipai
Žmogaus	IgM, IgG (turi 4 poklasių: IgG1, IgG2, IgG3 ir IgG4), IgA (turi 2 poklasių: IgA1 and IgA2), IgD ir IgE
Pelės	IgM, IgG (turi 4 poklasių: IgG1, IgG2a (IgG2c), IgG2b ir IgG3), IgA, IgD ir IgE

H grandinės tipas atitinka ją koduojančio geno pavadinimą –  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  ir  $\alpha$ . Skirtingų klasių antikūnai skiriasi struktūriškai ir turi skirtingas efektorines funkcijas, o jų susidarymą nulemia B limfocito aktyvavimo metu įjungiamas klasių perjungimo mechanizmas, siekiant optimizuoti humoralinį imuninį atsaką prieš tam tikrą patogeną (Stavnezer and Schrader, 2014). L grandinė taip pat gali būti skirtingų tipų –  $\lambda$  ir  $\kappa$  – tačiau jų funkcijos nesiskiria. Dažniausiai tie Ig, kurie turi  $\lambda$  grandinę, yra susidarę po receptoriaus redagavimo, kai reikia pakeisti autoreaktyvų nesubrendusios B ląstelės receptorių, todėl dažniau yra sutinkama  $\kappa$  grandinė. Pavyzdžiui, pelės organizme 95 % IgG klasės antikūnų turi  $\kappa$  lengvąją grandinę ir tik 5 %  $\lambda$  lengvąją grandinę (Abbas et al., 2014; Luning Prak et al., 2011).

### 1.1.3. Antikūnus koduojantys genai

Antikūno molekulę koduojantys genai yra išsidėstę trijose skirtingose vietose: H grandinės – 14 chromosomoje, L  $\kappa$  grandinės – 2 chromosomoje ir L  $\lambda$  – 22 chromosomoje. Gemalinėje DNR šie genai yra segmentuoti ir

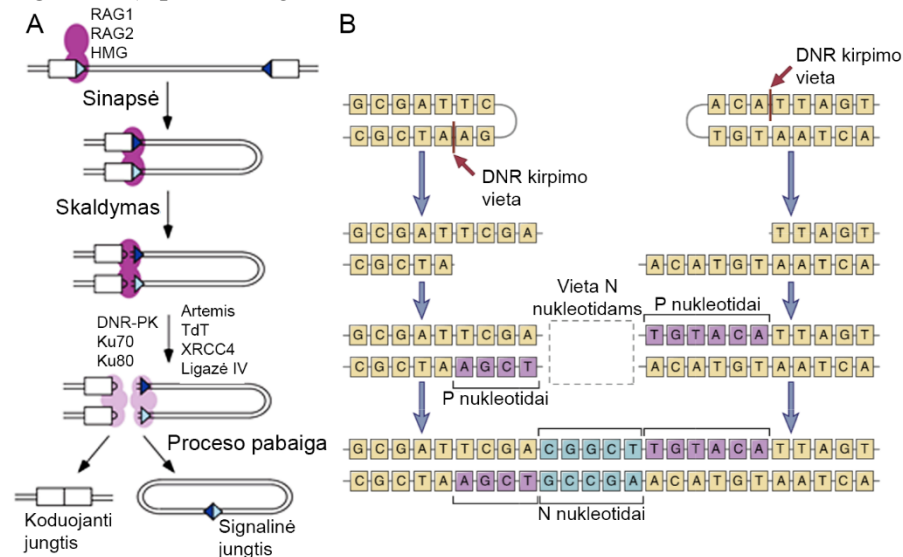
neaktyvūs (4 pav.) (Brack et al., 1978; Tonegawa, 1983). B limfocitams bręstant (pro-B ląstelėse) prasideda B ląstelių receptorius (antikūnus) koduojančių genų somatinė rekombinacija – pertvarka, kuri dar vadinama V(D)J rekombinacija. Šis procesas vyksta genų srityje, kuri yra atsakinga už antikūno Fv fragmente esančių CDR sekų susidarymą ir tai nulemia jų variabilumą. Antikūnai gali sąveikauti beveik su neribotu skaičiumi molekulių būtent dėl V(D)J rekombinacijos (Dunn-Walters et al., 2018; Jung and Alt, 2004).



**4 pav.** H (IgH), L κ (IgK) ir L λ (IgL) grandinės koduojančių genų lokusai. V, D ir J genų segmentai yra sujungiami atsitiktinai V(D)J rekombinacijos metu. Pastovusis C segmentas yra prijungiamas iRNR brendimo metu. Turčio spalvos trikampis – 12 bazių porų rekombinacijos signalinės sekos (RSS, angl. *recombination signal sequences*), raudonas – 23 bazių porų RSS (Abbas et al., 2014; Dunn-Walters et al., 2018).

H grandinės geno lokusas sudarytas iš kaičiųjų (V, angl. *variable*), įvairovės (D, angl., *diversity*) ir jungiamųjų (J, angl. *joining*) genų segmentų, o L grandinių – iš D ir J segmentų, taip pat visuose genuose yra koduojamos ir pastoviojo C regiono sekos. Nors V, D ir J segmentų skaičius gemalinėje DNR yra baigtinis, tačiau antikūnų įvairovė nuo to nenukenčia, nes segmentų sujungimas yra atsitiktinis, o jungiant atskirus fragmentus yra nukerpami ar įjungiami papildomi nukleotidai – tai vadinama sujungimo įvairove (angl. *junctional diversity*) (Abbas et al., 2014). V(D)J rekombinacija yra tiksliai organizuoti DNR skaldymo ir sujungimo veiksmai, koordinuojami baltymų komplekso, vadinamo V(D)J rekombinaze, kurį sudaro tik limfoidinėms

ląstelėms būdingi RAG1 (angl. *recombination activating gene 1*) ir RAG2 (angl., *recombination activating gene 2*) baltymai (5 pav.) (Bednarski and Sleckman, 2019; Roth, 2014; Schatz and Swanson, 2011). RAG baltymai sąveikauja su RSS, kurios yra ganėtinai konservatyvių sekų heptamerai ir nonamerai, nutolę 12 arba 23 bazių porų tarpu ir esančios šalia V, D ir J genų segmentų (4 pav.) (Jung and Alt, 2004; Schatz and Swanson, 2011).



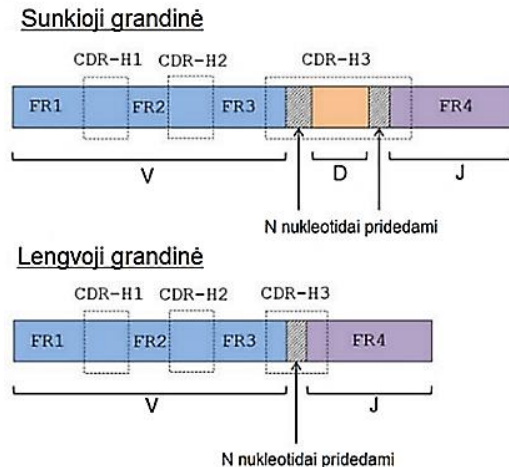
**5 pav.** A – Schematiškai pavaizduota V(D)J rekombinacijos reakcija. RAG1, RAG2 ir HMG (angl. *high mobility group*) baltymai inicijuoja pradinį DNR skaldymą, o vėliau DNR sujungime dalyvauja didelė baltymų grupė sudaryta iš nuo DNR priklausomos baltymų kinazės DNR-PK (angl. *DNA-dependent protein kinase*), Ku70 ir Ku80 heterodimero, *Artemis* nukleazės, terminalinės deoksinukleotidil transferazės TdT (angl. *Terminal deoxynucleotidyl transferase*), DNR ligazės XRCC4 (angl. *X-ray repair cross-complementing protein 4*) ir DNR ligazės IV. Keturkampiai vaizduoja koduojančius segmentus, spalvoti trikampiai skirtingas RSS (Krangel, 2003). B – Sujungiant skirtingus genų segmentus pridedami arba pašalinami nukleotidai suformuoja naują nukleotidų ir ar. seką jungties vietoje. P nukleotidai pridedami pagal susidariusią matricą kirpimo vietoje, o N nukleotidai pridedami atsitiktinai TdT fermento, dėl to susidaro visiškai nauja ir unikali nukleotidų seka, kuri nėra koduojama gemalinėje DNR (Abbas et al., 2014).

Rekombinacijos sinapsės kompleksą visada sudaro viena 12 bazių porų RSS, esanti šalia atsitiktinio segmento, ir viena 23 bazių porų RSS, esanti prie kito atsitiktinio segmento. RAG baltymai, turintys endonukleazinį aktyvumą, padaro dvigrandį DNR trūkį tarp RSS koduojančių segmentų. DNR trūkio užtaisyme dalyvauja baltymų kompleksas, kuris kartu suformuoja koduojančią jungtį ir signalinę jungtį (Krangel, 2003). Susidariusi nauja koduojanti jungtis yra labai netiksli, nes joje atsiranda papildomų nukleotidų,



arba nukleotidai yra prarandami. Todėl tik trečdalis pabaigtų koduojamų jungčių bus produktyvios ir pataikys į skaitymo rėmelį bei koduos funkcionalų antigeno receptorių (Abbas et al., 2014).

Po somatinės rekombinacijos susiformavęs funkcionalus antikūną koduojantis genas variabiliajame regione turi 4 struktūrinius elementus, vadinamus karkasiniais regionais FR (angl., *structural framework regions*), kurių sekos labiau konservatyvios tarp skirtingų Ig molekulių, bei 3 hiperkaičiausias CDR sritis, kurios nulemia savitas antikūno savybes reaguoti su tam tikru antigenu (6 pav.) (Dunn-Walters et al., 2018).



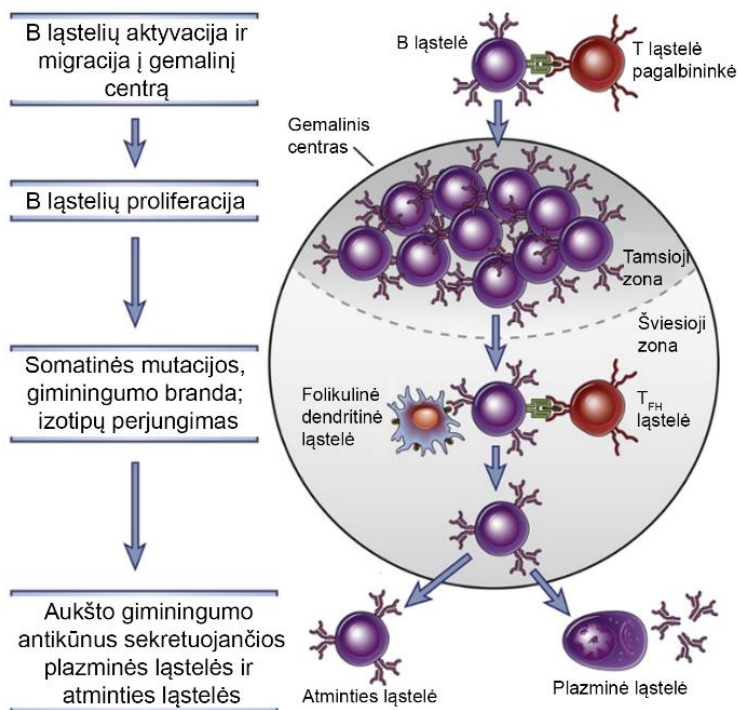
**6 pav.** Funkcionalus kaitusis regionas sudarytas iš 4 konservatyvių struktūrinių FR ir 3 variabiliųjų CDR sekų. Didžiausi sekų skirtumai yra CDR3 regione, kadangi jis susidaro genų segmentų sujungimo vietoje ir turi papildomai įterptų atsitiktinių (N) nukleotidų (Dunn-Walters et al., 2018).

Tinkamai susintetinus H grandinę arba pre-BCR, limfocitas išgyvena ir pereina į pre-B ląstelės stadiją, kurioje vyksta L grandinės genų pertvarka ( $\kappa$  arba  $\lambda$  lokuse). Sėkmingos pertvarkos galutinis rezultatas – tinkamai suformuotas BCR. Taip ląstelė pereina į nesubrendusio B limfocito stadiją (Bednarski and Sleckman, 2019).

#### 1.1.4. Plazminių ląstelių ir aukšto giminingumo antikūnų susidarymas

B ląstelių brendimas baigiasi blužnyje, kur susidaro subrendęs B limfocitas, membranoje turintis IgM ir IgD klasių receptorių, susidariusius dėl alternatyvaus iRNR brandinimo. Subrendęs limfocitas gali patekti į periferinius limfinius organus, pvz., limfmazgius, ir būti aktyvintas antigenu. Kol B ląstelė nėra sutikusi antigeno, ji yra vadinama naiviuoju B limfocitu (Hoffman et al., 2016). Limfmazgiuose B ląstelei susidūrus su antigenu, ji yra

aktyvinama, prasideda proliferacija, kuri dar vadinama klonų ekspansija, vėliau vyksta diferenciacija iki plazminių ląstelių, kurios sekretuoja antikūnus, ir B atminties ląstelių, kurios atsakingos už ilgalaikę atmintį prieš patogeną (7 pav.) (Abbas et al., 2014).



**7 pav.** Aktyvintos B ląstelės migruoja į folikulą ir proliferuoja, sudarydamos tamsiąją gemalino centro zoną. Šiose ląstelėse vyksta klasių mainų ir somatinių hipermutacijų procesai Ig V genų regione, po to jos migruoja į šviesiąją zoną, kur sutinka antigeną pateikiančias folikulinės dendritinės ląstelės ir  $T_{FH}$ . Tik tos B ląstelės, kurių giminingumas antigenui didžiausias išgyvena ir diferencijuoja į antikūnus sekretuojančias plazmines ląsteles ir atminties B ląsteles (Abbas et al., 2014).

Aukšto giminingumo antikūnai susidaro tik tais atvejais, kai aktyvinta B ląstelė sulaukia pagalbos iš folikulinės T pagalbininkės ( $T_{FH}$ , angl. *T follicular helper cell*), kuri taip pat atpažįsta tą patį antigeną. Sąveika su  $T_{FH}$  ir jos sekretuojamais citokiniais įjungia B ląstelėse somatinių hipermutacijų ir antikūnų klasių perjungimo mechanizmus. Antikūnų klasių perjungimas vyksta rekombinacijos būdu, kai dalis DNR yra iškerpama ir prijungiamos tolimesnės sunkiąją grandinę koduojančios DNR sekos. Klasių susidarymas priklauso nuo citokinių, kuriuos sekretuoja  $T_{FH}$  reaguodama į patogeno prigimtį, pavyzdžiui, interferonas- $\gamma$  indukuoja IgG klasės imunoglobulinų susidarymą, kurie padeda kovoti su virusais ar bakterijomis. Tokiu būdu



humoralinis imuninis atsakas yra optimizuojamas pagal patogeną (Abbas et al., 2014; Schroeder et al., 2010).

Somatinių hipermutacijų metu vyksta vadinamoji giminingumo branda (angl. *affinity maturation*) ir gaunami aukšto giminingumo antikūnus sekretuojančių B ląstelių klonai. Procesui svarbus citidino deaminazės fermentas (angl. *cytidine deaminase*), kuris vykdo taškinės mutacijas V genų regione. Vėliau išgyvena tie B ląstelių klonai, kurių giminingumas antigenui yra didžiausias. Šie klonai diferencijuoja į plazmines ląsteles, sekretuojančias aukšto giminingumo antikūnus (Dunn-Walters et al., 2018).

Visi šie procesai paaiškina, kaip susiformuoja aukšto giminingumo antikūnų, galinčių atpažinti beveik neribotą skaičių įvairių antigenų, repertuaras. Žinios apie natūralius procesus, vykstančius žinduolių organizme, buvo pritaikytos siekiant gauti specifiskas molekules – MAk, kurie dabar taikomi įvairiose srityse – nuo laboratorinių tyrimų iki imunoterapijos.

### 1.1.5. Monokloniniai antikūnai ir jų kūrimas

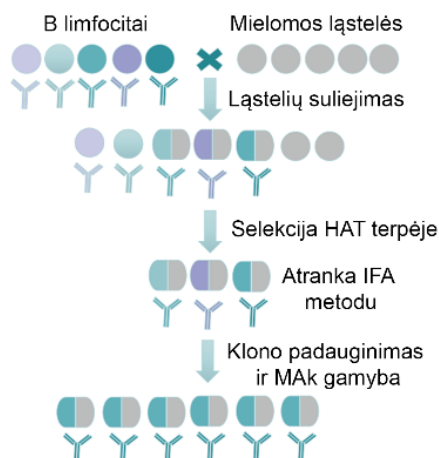
Antikūnai, susidarę organizme ir cirkuliuojantys kraujyje, yra įvairaus specifiškumo ir giminingumo baltymų mišinys. Jie dar vadinami polikloniniais antikūnais (PAk) ir gali būti gaunami iš kraujo serumo po gyvūno imunizacijos antigenu. Nors PAk yra labai dažnai naudojami įvairiems tyrimams, kadangi yra greitai ir lengvai pagaminami, tačiau dėl didelio heterogeniškumo ir galimų savybių neatitikimų tarp skirtingų pagaminimo serijų, jų taikymas yra ribotas. Skirtingų gyvūnų PAk gali skirtis specifiškumu, giminingumu antigenui, gali duoti skirtingas nespecifines reakcijas, todėl rezultatus gali būti sunku atkartoti (Lipman et al., 2005).

Kuriant hibridomų technologiją pagrindinis tikslas buvo gauti stabilias ląstelių kultūras, kurios sintetintų žinomo specifiškumo MAk. Ši technologija leidžia sukurti antikūnus prieš bet kokį antigeną, MAk populiacija būna homogeniška, pasižymi vienodomis savybėmis jungtis su antigenu, MAk galima gauti beveik neribotais kiekiais. Taip pat sumažėja nespecifinių reakcijų tikimybė, o rezultatus atkartoti yra kur kas lengviau, net jei naudojami skirtingų pagaminimo serijų MAk (Siddiqui, 2010).

MAk jungiasi prie to paties epitopo ir yra gaminami hibridomos, kilusios iš vieno B limfocito klonu. Hibridomų gavimas prasideda nuo laboratorinių gyvūnų, dažniausiai linijinių pelių, imunizacijos pasirinktu antigenu. Imunizacijos atliekamos kas 4–12 savaitių 2–3 kartus, naudojant adjuvantus, kurie sustiprina imuninį atsaką, arba be jų. Imunizuotų pelių kraujas tikrinamas netiesioginės imunofermentinės analizės (IFA, angl. *Enzyme-*

*Linked ImmunoSorbent Assay*) metodu, siekiant nustatyti susidariusių antigenui specifinių antikūnų kiekį (Hanack et al., 2016).

Hibridizacijai yra naudojama imunizuoto gyvūno blužnis, nes būtent blužnyje yra didelis aukšto giminingumo antikūnus sintetinančių B ląstelių kiekis. Blužnies B ląstelės yra suliejamos su neribotą dalijimosi potencialą turinčiomis pelės vėžinėmis mielomos ląstelėmis (8 pav.). Šis suliejimo partneris yra ypatingas tuo, kad neturi hipoksantino-guanino-fosforibozil transferazę (HGPRT, angl. *hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase*) koduojančio geno, bei nesintetina imunoglobulinų. Suliejimui naudojamas polietileno glikolis (PEG) – sintetinis junginys, kuris sujungia ląstelių plazmines membranas. Susidaro ląstelės, turinčios du ir daugiau branduolių, kurie susijungia tik vykstant mitozei (Greenfield, 2018; Little et al., 2000).



**8 pav.** Hibridomų technologija. B limfocitai ir mielomos ląstelės suliejamos. Hibridomų atranka vyksta selekcinėje HAT terpėje, kurioje gali augti tik hibridinės ląstelės. Netiesioginės IFA metodu atrenkamos tos hibridomos, kurios sekretuoja antigenui specifinius antikūnus. Tinkami ląstelių klonai yra reklonuojami, padauginami ir naudojami MAK gamybai (Hanack et al., 2016).

Po suliejimo gaunamas ląstelių mišinys, kuriame yra nesusiliejusių ląstelių, homokariotinių hibridų tik iš B ląstelių ar mielomos ląstelių, heterokariotinių hibridomų, kurios sintetina įvairaus specifiškumo antikūnus arba jų visai nesintetina. Visas ląstelių mišinys yra auginamas selekcinėje HAT (hipoksantinas-aminopterinas-timidinas) terpėje. Aminopterinas, esantis terpėje, blokuoja *de novo* nukleotidų biosintezę, todėl išgyvena tik tos ląstelės, kurios turi aktyvų HGPRT geną, atsakingą už nukleotidų sintezę alternatyviu keliu. Mielomos ir mielomų homokariotiniai hibridai šio geno neturi, todėl

negali sintetinti nukleorūgščių HAT terpėje ir greitai žūsta. B limfocitai ir jų homokariotiniai hibridai turi HGPRT geną, tačiau jų gyvavimo laikas yra trumpas ir jie terpėje taip pat žūsta. Vienintelės ląstelės, kurios gali išgyventi selekcinėje terpėje yra hibridomos, nes paveldi B ląstelių turimą HGPRT geną bei mielomos savybę neribotai dalintis (Zhang, 2012).

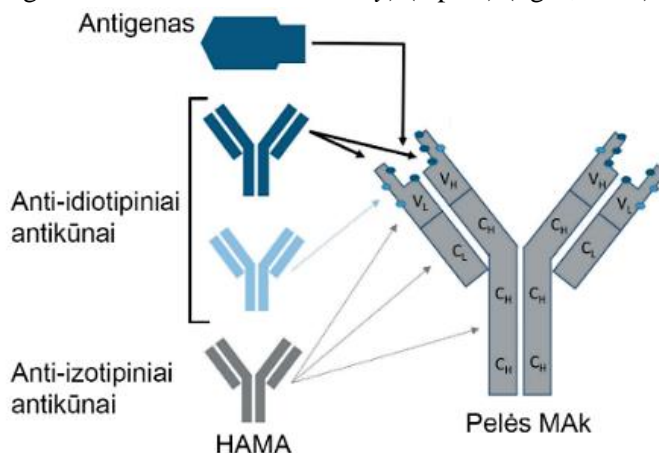
Suliejus ląsteles gaunama tokių hibridomų, kurios sekretuoja antigenui specifiskus arba nespecifiskus antikūnus, arba jų visai nesintetina. Pirmiausia, po suliejimo ląstelės praskiedžiamos ir išsėjamos taip, kad vėliau šulinėlyje būtų susiformavusi viena ląstelių kolonija. Vėliau visi šulinėliai testuojami netiesioginės IFA metodu, t. y. atrenkamos antigenui specifiskus antikūnus sekretuojančios hibridomos. Teigiamą reakciją parodžiusios hibridomos yra reklonuojamos ir papildomai testuojamos, kol hibridomų linija tampa monokloniška ir stabili. Tokios hibridomos gali būti šaldomos ir saugomos ilgą laiką skystame azote arba auginamos ląstelių kultūrose, norint gauti reikiamą MAK kiekį (Liu, 2014).

Ne mažiau svarbus etapas yra MAK apibūdinimas – jo metu ištiriamos MAK molekulių savybės, tokios kaip: Ig klasė ir poklasis, ar nustatomos unikalios MAK VL ir VH ar. sekos. Be to, įvertinamos ir funkcinės MAK savybės, pavyzdžiui, giminingumo konstanta, kryžminis specifiskumas, epitopo, kurį atpažįsta MAK, būseną (linijinis ar konformacinis) ir jo ar. seka. MAK sąveika su antigenu turi būti ištirta kuo įvairesniais metodais, norint įvertinti MAK potencialą diagnostikai ar terapijai (Wang et al., 2018).

Diagnostikos tikslais MAK yra naudojami analizei, kurios metu tiriamasis objektas kokybiškai nustatomas analizuojamame mėginyje arba kiekybiškai įvertinamas jo kiekis ar koncentracija. Dažniausiai naudojami tokie klinikinėse laboratorijoje lengvai pritaikomi metodai kaip: IFA, imunoblotingas (IB) ar radioimuninė analizė (angl., *radioimmunoassay*). Šiais metodais, naudojant MAK, tiriami įvairūs hormonai, vėžiniai žymenys, infekcinių ligų sukėlėjai. Kitas labai svarbus MAK pritaikymas diagnostikai yra vizualizavimas, pavyzdžiui, imunoscintigrafijos metodu, kai naudojami radionuklidais pažymėti MAK. Šis tyrimas taikomas vėžio, miokardo infarkto, venų trombozės diagnostikai (Saeed et al., 2017).

Pastaruju metu MAK daugiausiai dėmesio sulaukia dėl savo reikšmingo indėlio imunoterapijos srityje. Praėjus dešimtmečiui po hibridomų technologijos sukūrimo, pirmasis pelės MAK OKT3 (Muromonab-CD3) buvo patvirtintas JAV maisto ir vaistų administracijos (FDA, angl. *USA Food and Drug Administration*), kaip terapinis agentas, kuris buvo naudojamas sumažinti inkstų transplantatų atmetimo riziką (Liu, 2014). Deja, labai greitai paaiškėjo, kad pelių MAK naudojimas terapijoje gali būti ribotas, kadangi

žmogaus organizme susidarydavo antikūnai prieš pelės imunoglobulinus (HAMA, angl. *human anti-mouse antibody*) (9 pav.) (Sgro, 1995).



**9 pav.** HAMA susidaro prieš pelės MAK ir gali sąveikauti su skirtingomis jo vietomis. Anti-idiotipiniai HAMA gali jungtis prie vietų, kurios atsakingos už sąveiką su antigenu (tamsiai mėlyna spalva) arba jungiasi prie vietų, kurios nėra svarbios antikūno-antigeno sąveikai (šviesiai mėlyna). Anti-izotipiniai HAMA sąveikauja su konservatyviomis MAK sekomis (pritaikyta iš Schelpe *et al.*, 2019).

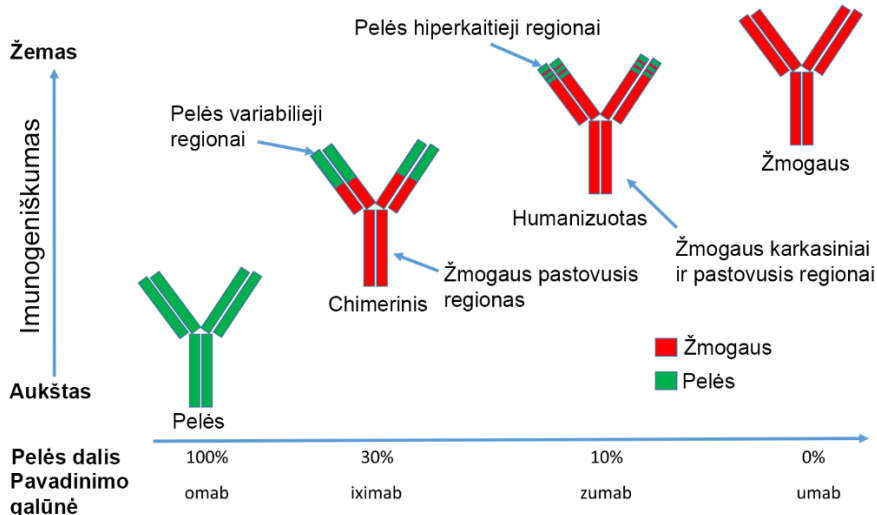
HAMA yra kelių tipų, kurie skiriami pagal MAK vietas, su kuriomis sąveikauja HAMA. Anti-idiotipiniai HAMA susidaro prieš imunoglobulino variabilųjį regioną, kuris dar vadinamas idiotipu. Tokie HAMA, prisijungę prie MAK, gali blokuoti sąveiką su antigenu ir taip neutralizuoti terapinio MAK poveikį. Anti-izotipiniai HAMA susidaro prieš konservatyviuosius regionus, o prisijungę prie pelės MAK jį opsonizuoja bei pažymi kaip svetimkūnį, kurį sunaikina kiti imuninės sistemos komponentai (Klee, 2000).

Taigi, MAK gavimas yra sudėtingas procesas, kurio metu labai svarbu pasirinkti tinkamą antigeną, sukurtus MAK visapusiškai apibūdinti ir įvertinti jų taikymo galimybes. Moksliniai tyrimai ir diagnostika yra sritys, kur MAK yra naudojami plačiausiai. MAK taikymas imunoterapijai susidūrė su imunogeniškumo problema, tačiau ji buvo išspręsta genų inžinerijos ir molekulinės biologijos metodais, modifikavus MAK ir sukūrus pirmuosius rekombinantinius antikūnus (RAK).

### 1.1.6. Rekombinantiniai antikūnai ir jų taikymas

RAK yra genų inžinerijos metodais sukurti rekombinantiniai baltymai. Pirmaisiais RAK yra laikomi chimeriniai ir humanizuoti antikūnai, kurių gavimo technologijų kūrimas ir tyrimai vyko panašiu metu. Chimeriniai antikūnai yra sudaryti iš žmogaus Ig pastoviųjų fragmentų ir pelės MAK

variabiliųjų fragmentų (10 pav.). Taip pelės sekų procentas sumažinamas iki ~30 % ir gaunamos mažesnio imunogeniškumo molekulės (Singh et al., 2018a). FDA pirmąjį chimerinį antikūną žmogaus gydymui patvirtino 1997 metais. *Rituximab* buvo skirtas agresyvios formos ne Hodžkino limfomos gydymui, o jo taikynys yra B limfocitų paviršiaus baltymas CD20 (Mohammed et al., 2019). Visgi žmogaus organizme gali susidaryti anti-chimeriniai antikūnai (HACA angl., *human anti-chimeric antibodies*). Pavyzdžiui, naudojant chimerinį antikūną *Infliximab*, kuris sąveikauja su citokinu TNF- $\alpha$  ir yra skirtas Krono ligos gydymui, 3–15 % pacientų susidaro HACA, o 5 % išsivysto alerginės reakcijos (Drewe and Powell, 2002).



**10 pav.** Pelės MAk humanizavimas, siekiant sumažinti imunogeniškumą (Singh et al., 2018a).

Antikūnus humanizuojant, sukonstruojama Ig molekulė, sudaryta iš žmogaus Ig pastoviųjų regionų ir karkasinių sekų, tarp kurių yra įterpti hiperkaitieji regionai, gauti iš pelės MAk. Pirmasis humanizuotas antikūnas *Daclizumab*, kurio taikynys CD25 (interleukino-2 receptorius) FDA patvirtintas 1997 metais. Imunogeniškumas buvo sumažintas reikšmingai ir nors tokios rekombinantinės molekulės vis tiek gali būti imunogeniškos, bet jų naudojimas imunoterapijai žymiai išaugo (Mayrhofer and Kunert, 2019).

Norint sukurti bet kokio formato RAK, vienas svarbiausių etapų yra Ig molekulės VL ir VH sričių nustatymas. Šios sekos apsprendžia antikūno specifiškumą antigenui ir yra atsakingos už sąveiką su juo. Dėl to variabiliosios sekos labai skiriasi tarp skirtingų antikūnų, o ypač skiriasi hiperkaitieji fragmentai. Sekų nustatymas vyksta DNR sekoskaitos metodu,

prieš tai PGR padauginus reikiamas variabiliąsias sritis. Kaip matrica PGR reakcijai gali būti naudojama kopijinė DNR (kDNR), susintetinta nuo iRNR, kuri buvo išskirta iš hibridomos, sintetinančios MAk, arba žmogaus/pelės B ląstelių (Khantasup et al., 2015).

Siekiant PGR metodu padauginti reikiamus variabiliuosius fragmentus, yra konstruojami specialūs pradmenys. Tai sudėtinga užduotis, kadangi tikslas yra padauginti sekas, kurios labai skiriasi tarp antikūnų. Viena tyrėjų grupė sukūrė stipriai degeneruotus 5'-galo pradmenis, kurie jungiasi didesniu konservatyvumu pasižyminčiame FR1 regione, esančiame pelės V geno lokuse, o 3'-galo pradmenys buvo komplementarūs pastoviam regionui ir specifiški Ig izotipui. Pradmenys buvo sukurti išanalizavus Kabat duomenų bazėje esančias MAk ar. sekas, jas palyginus tarpusavyje ir parinkus tinkamą nukleotidų kompoziciją, kuri leido sėkmingai padauginti ir nustatyti daugiau nei 100 MAk VL ir VH regionų ar. sekas (Wang et al., 2000). Dabar yra sukurta dar daugiau įvairių pradmenų porų ir PGR sistemų (Rohatgi et al., 2008).

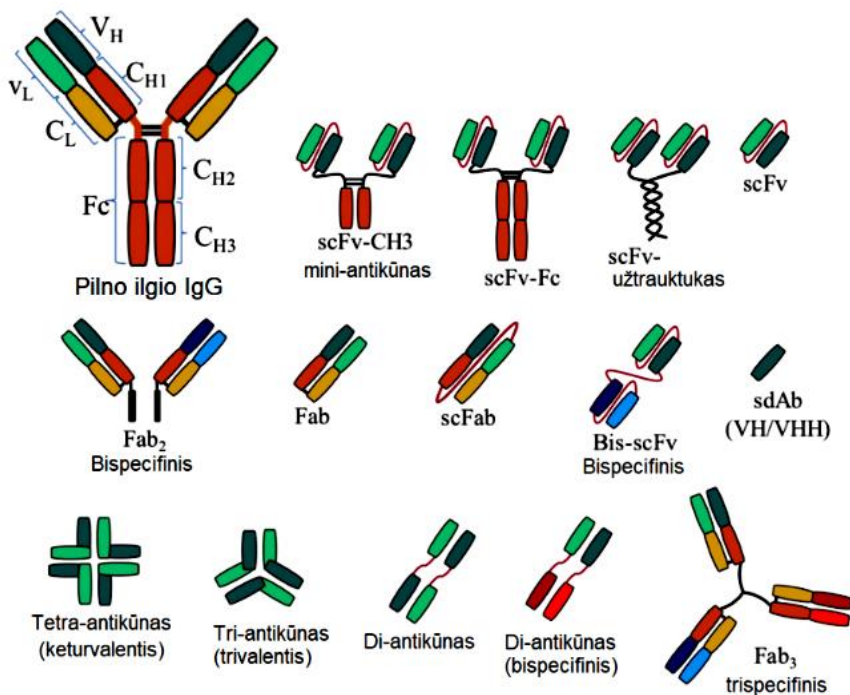
Tačiau dėl poliploidinės hibridomų prigimties, genetinio variabiliųjų regionų heterogeniškumo ir degeneruotų pradmenų naudojimo galima gauti netipiškus transkriptus, kurie yra tik panašūs į Ig. Panaudojus tokių transkriptų sekas galima gauti nefunkcionalius RAk (Babrak et al., 2017). Tokios nustatytos sekos dar yra vadinamos pseudosekomis. Manoma, kad nefunkcionalūs variabiliųjų regionų transkriptai gali atsirasti iš hibridizacijai naudojamo suliejimo partnerio – mielomos ląstelių. Nors šios ląstelės nesekretuoja antikūnų, tačiau jose yra daug netipiškų κ grandinės transkriptų, turinčių skaitymo rėmelio poslinkį J regiono pradžioje. Taip pat galimas variantas, kad neteisingi transkriptai susidaro pačiose B ląstelėse ar hibridomose dėl genų pertvarkos, ypač jas ilgai kultivuojant *in vitro*. Taigi, nustačius VL ir VH fragmentus, reikalingas funkcinis patikrinimas, pavyzdžiui, sukonstravus viengrandį antikūno fragmentą (scFv, angl. *single-chain fragment variable*) (Ding et al., 2010).

Patobulėjus technologijoms, buvo sukurti pilnai žmogaus antikūnai, kurie gaunami iš žmogaus Ig koduojančių genų sekų. Viena iš naujų technologijų yra fagų ekspozicijos bibliotekos. Tai bakteriofagų *in vitro* susintetinti antikūnų variabilieji fragmentai, kurie atspindi natūralų B limfocitų repertuarą to individo, iš kurio buvo gauta genetinė medžiaga. Tokie bakteriofagai testuojami naudojant norimą antigeną ir, jeigu aptinkama tinkamų kandidatų, yra nustatomos veikiančio antikūno variabiliųjų fragmentų sekos. Tuomet genų inžinerijos metodais klonuojamos pilno ilgio žmogaus antikūnų molekulės, kurios sintetamos pasirinktoje žinduolių raiškos sistemoje,

pavyzdžiui, kininio žiurkėno kiaušidžių (CHO, angl. *Chinese hamster ovary cells*) ar žmogaus embrioninėse inkstų ląstelėse (HEK-293, angl. *Human embryonic kidney 293 cells*) (Kunert and Reinhart, 2016; Lonberg, 2008).

Kita technologija, skirta pilnai žmogaus MAk gavimui, yra paremta transgeninių pelių naudojimu. Šios pelės buvo genetiškai modifikuotos ir jų Ig koduojantys genai buvo pakeisti žmogaus Ig genų repertuaru. Tokios transgeninės pelės imunizuojamos pasirinktu antigenu, o vėliau, panaudojus pelės B ląsteles, yra kuriami žmogaus MAk, taikant įprastą hibridomų technologiją (Steinitz, 2014). Pirmasis pilnai žmogaus MAk, gautas fagų ekspozicijos metodu, žmogaus imunoterapijai patvirtintas 2002 metais (*Humira*), o transgeninių pelių technologija gautas antikūnas *Panitumumab* patvirtintas 2006 metais (Harding et al., 2010; Nelson et al., 2010).

Be jau paminėtų yra kuriami ir kitokių formatų RAK (11 pav.). Mažesni antikūnų fragmentai, tokie kaip vieno domeno antikūnai (angl. *single-domain antibody*) ar scFv yra mažesnės molekulinės masės baltymai, kurie gali būti sintetiniai tradiciškai, pavyzdžiui, *E. coli* bakterijose. Tokie RAK išlaiko antikūnų savybes jungtis su antigenu ir gali būti naudojami tiek analizei, tiek terapijai. Mažesni fragmentai gali efektyviau prasiskverbti į audinį ar naviką, lyginant su pilno ilgio Ig molekule (Frenzel et al., 2013; Saeed et al., 2017).



**11 pav.** RAK formatų įvairovė lyginant su pilno ilgio imunoglobulinu (Bustamante-Córdova et al., 2018).

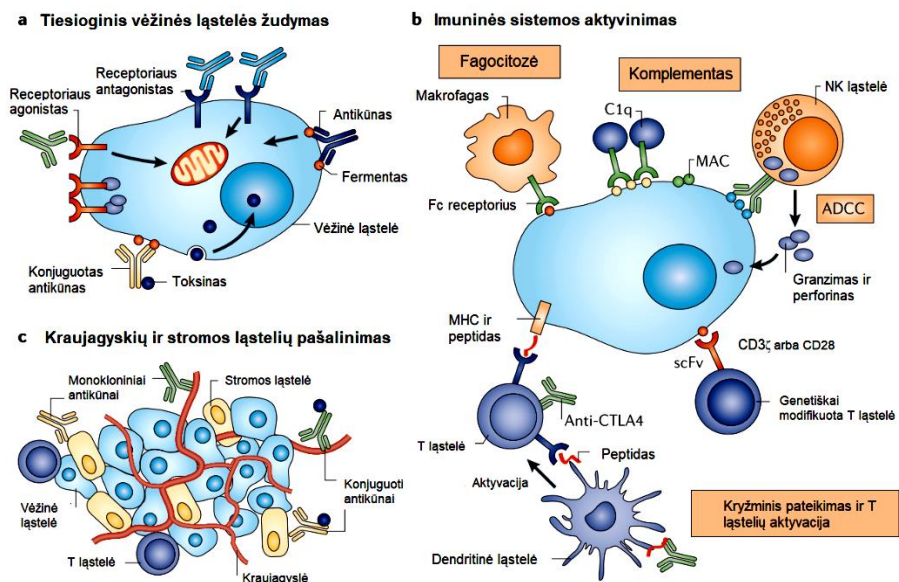
Antikūnų fragmentai gali būti perdaromi į multivalentinius (di-, tri-, keturvalenčius), kurie pasižymi didesniu stabilumu, ar multispecifinius (bi-, trispecifinius), kurie gali jungtis su keliais antigenais, ir taip pagerinti terapinį efektą (Holliger and Hudson, 2005). Kuriant dar kitus RAK formatus, buvo išlaikytas panašumas su pilno ilgio Ig molekule, pavyzdžiui, scFv sujungti su pastoviuoju fragmentu Fc. Tokie RAK išlaiko IgG savybes, tokias kaip: bivalentiškumas, galimybė juos nustatyti tradiciškai naudojamais antriniais antikūnais, bet svarbiausia – išlieka efektorinės funkcijos, kurioms būtinas Fc fragmentas (Jäger et al., 2013).

*In vivo* diagnostikoje mažesni antikūnų fragmentai laikomi pranašesniais už didesnes pilno ilgio Ig molekules. Pavyzdžiui, scFv išlaiko specifiskumą antigenui, yra greitai pašalinamas iš kraujo per inkstus, lengviau prasiskverbia į audinius, todėl pagerinamas signalo kontrastas, sumažėja radiacijos poveikis organizmui, kai naudojami scFv-radioizotopų konjugatai. Kadangi scFv neturi Fc fragmento, jie yra laikomi biologiškai neaktyviais, t. y. neaktyvina imuninės sistemos komponentų per Fc receptorius, todėl sumažėja pašalinių reakcijų tikimybė (Freise and Wu, 2015).

RAK taikymas imunoterapijai turi daugybę būdų ir mechanizmų. Ypač plačiai yra analizuojamas jų panaudojimas vėžio gydymui (12 pav.). RAK gali būti naudojami kaip vaistų (toksinų ar radioizotopų) nešikliai. RAK gali sąveikauti su vėžinei ląstelei svarbiais receptoriais ar fermentais, kurie yra blokuojami ar aktyvinami ir taip sukeliama vėžinės ląstelės žūtis. Pavyzdžiui, RAK gali veikti kaip agonistai, kurie prisijungę prie receptoriaus jį aktyvina ir sukelia ląstelės apoptozę. Prisijungę prie fermento, RAK gali jį neutralizuoti ir taip sutrikdyti ląstelės išgyvenimui svarbias funkcijas. Tokio pobūdžio terapijai nebūtina pilno ilgio Ig molekulė ir gali būti naudojami mažesnio formato RAK (Scott et al., 2012).

Kitas svarbus mechanizmas – naviko naikinimas pasitelkiant imuninės sistemos komponentus. RAK, turintys Fc fragmentą, gali būti kaip tarpininkai, kurie aktyvina imuninę sistemą kovoti su vėžinėmis ląstelėmis. Receptorius Fc fragmentui turi makrofagai, kurie fagocituoja RAK opsonizuotą vėžinę ląstelę, ar NK ląstelės, kurios naikina naviką, sekretuodamos perforinus ir granzimus, ir tai vadinama antikūnų nulemtu ląsteliu citotoksiškumu (ADCC, angl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*). Gali būti aktyvuojama komplemento sistema. Taip pat RAK gali atstatyti T ląstelių citotoksinį poveikį vėžinėms ląstelėms, kai sąveikauja su jų aktyvumą blokuojančiais receptoriais, pavyzdžiui, CTLA4 (angl. *T lymphocyte-associated antigen 4*) ar PD-1 (angl. *programmed cell death protein 1*) (Chen and Mellman, 2013; Wang et al., 2015).





**12 pav.** Vėžio terapijos mechanizmai, naudojant RAK. a) tiesioginis naviko naikinimas; b) Antikūnais aktyvinami imuninės sistemos komponentai; c) Naviko kraujagyslių bei stromos ląstelių naikinimas ir to sąlygota naviko žūtis. MAC – membraną atakuojantis kompleksas; MHC – didysis audinių dermės kompleksas (Scott et al., 2012).

Naujausias FDA patvirtintas imunoterapijos būdas yra modifikuotos T ląstelės, vadinamos CAR-T (angl., *chimeric antigen receptor T cell*), kurios paviršiuje sintetina chimerinį receptorių, specifiskai atpažįstantį vėžinį antigeną. Už sąveiką su antigenu atsakingas scFv formato RAK, kuris yra sujungtas su molekulėmis (CD3 ar CD28), aktyvinančiomis T ląsteles. T ląstelės yra paaimamos iš paciento, aktyvinamos, modifikuojamos, įterpiančios chimerinio antigeno receptoriaus geną, padauginamos ir suleidžiamos atgal pacientui. Organizme šios ląstelės veikia vėžines ląsteles, kurios sintetina scFv antigeną (Fan et al., 2017; Mullard, 2017).

Visgi, imunoterapija ir RAK panaudojimas yra įmanomas, tik jei yra žinomos su vėžiu ar kitomis ligomis susijusios molekulės, kurios yra tinkami taikiniai RAK. Idealus baltymas-taikinys, tinkantis imunoterapijai, turėtų būti ląstelės paviršiuje, kad RAK galėtų prie jo prisijungti, būtų sintetinas tik ligos atveju, pavyzdžiui, tik vėžiniame audinyje, todėl sumažėtų pašalinių reiškinų rizika. Taip pat antigenas turėtų būti svarbus ligos susidarymui, progresavimui ar plitimui, tuomet prisijungę RAK galėtų neutralizuoti jo poveikį ir sukeltų patogeniškų ląstelių žūtį (Even-Desrumeaux et al., 2011).

Vieni tokių baltymų yra karboanhidrazių šeimos IX ir XII izoformos, kurios yra transmembraniniai baltymai su kataliziniu domenu, nukreiptu į ląstelės išorę, jų raiška padidėjusi vėžiniuose audiniuose, jie svarbūs vėžinių ląstelių išgyvenimui ir prisitaikymui, esant hipoksijai, kai sumažėja deguonies kiekis aplinkoje. Šios izoformos pastaraisiais metais dėmesio sulaukia ir kitų ligų atvejais, pavyzdžiui, esant uždegimui. Mokslininkų bendruomenė aktyviai tiria abu baltymus, jų svarbą patogenezėje ir potencialų terapinį pritaikymą (Mboge et al., 2018; Singh et al., 2018b).

## 1.2. Karboanhidrazės, jų savybės ir sąsajos su ligomis

Karboanhidrazės (EC 4.2.1.1, CA, angl. carbonic anhydrase) – fermentai, katalizuojantys grįžtamąją CO<sub>2</sub> hidratacijos reakciją (G. P. Moss, 1992). Šiuo metu yra žinomos šešios atskirai evoliucionavusios CA šeimos  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ - ir  $\eta$ -, aptinkamos įvairiuose organizmuose.  $\alpha$ -CA labiausiai paplitusios stuburiniuose gyvūnuose,  $\beta$ -CA randamos bakterijose, dumbliuose, augaluose, daugelyje grybų,  $\gamma$ -CA aptiktos archėjose, cianobakterijose,  $\delta$ - ir  $\zeta$ -CA nustatyta titnagdumbliuose, o naujausia CA šeima –  $\eta$ -CA – atrasta pirmuonyse (Del Prete et al., 2014; Supuran, 2016). CA šeimos atskiriamos pagal metalo joną koordinuojančių trijų histidino ar. liekanų išsidėstymą baltymo sekoje, tiksliau tariant, skirtingose šeimose histidino liekanos yra nevienodai nutolusios viena nuo kitos. Dažniausiai histidino liekanos koordinuoja cinko joną, tačiau  $\gamma$ -CA šeimos baltymų aktyviajame centre aptinkamas geležies (II) jonas, o kadmio (II) jonas gali būti  $\zeta$ -CA aktyviajame centre (Del Prete et al., 2014).

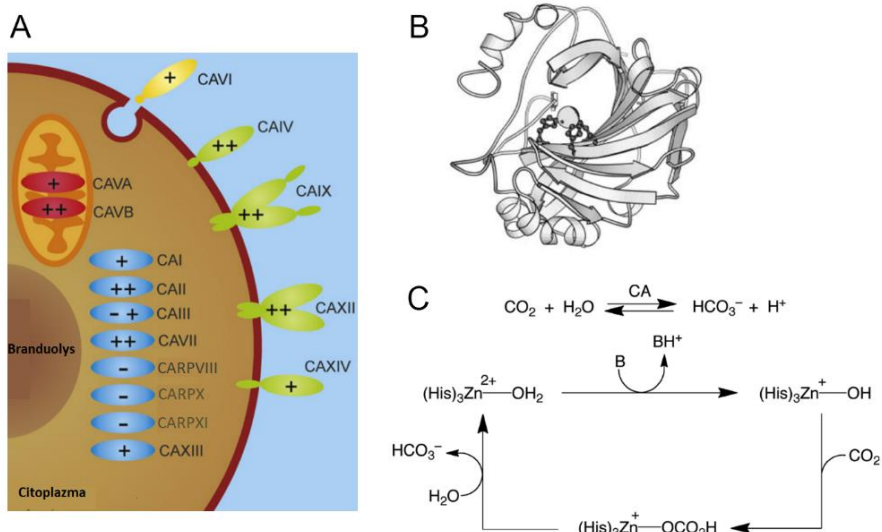
### 1.2.1. $\alpha$ -karboanhidrazės

Nors CO<sub>2</sub> hidrolizė vyksta ir be katalizės, jos greičio, esant fiziologiniam pH, nepakanka patenkinti organizmo metabolinius poreikius, kadangi reakcijos substratai ir produktai dalyvauja kvėpavimo, elektrolitų sekrecijos, gliukoneogenezės, lipogenezės, kaulų rezorbcijos ir kalcifikacijos procesuose. CA yra atsakingos už CO<sub>2</sub> hidrolizės reakcijos katalizę ir pH homeostazę, todėl yra gyvybiškai svarbios, tačiau kelios izoformos yra siejamos ir su patologiniais organizmo pakitimais, atsirandančiais vystantis navikui ar esant kitiems susirgimams (Pastorekova et al., 2004).

Žinduolių organizme nustatyta 16  $\alpha$ -CA šeimos baltymų izoformų, iš kurių 15 yra sintetinama žmogaus organizme įvairiuose organuose (2 lentelė). Didžioji dalis CA izoformų yra aktyvios ir atlieka plataus spektro funkcijas, tačiau 3 citozolinės izoformos – VIII, X ir XI, vadinamos su CA siejamais

baltymais (CARP, angl. *Carbonic Anhydrase Related Protein*), yra funkciškai neaktyvios, kadangi joms trūksta vienos ar kelių histidino liekanų aktyviajame centre. Tiksliai šių baltymų funkcija yra iki šiol nežinoma (Aspatwar et al., 2013; Scozzafava et al., 2006).

Aktyvios CA izoformos yra skirstomos pagal lokalizaciją ląstelėje (13 pav., A): 1) citozolinės (CA I, II, III, VII ir XIII); 2) membraninės (CA IX, XII, IV ir XIV), 3) mitochondrinės (CA VA ir VB) ir 4) sekretuojama CA VI (Scozzafava et al., 2006). Citozolyje esančios CA hidratuoja per membraną difundavusį audiniuose susidariusį CO<sub>2</sub> iki bikarbonato ir vandenilio jonų, kurie pernešami per membraną jonų transporterių į ląstelės išorę. Atvirkštinis procesas vyksta dujų mainų organuose, kur CA dehidratuoja HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iki CO<sub>2</sub> ir šis difuzijos būdu yra pašalinamas iš organizmo (Frost et al., 2014).



**13 pav.** A – CA izoformų lokalizacija ląstelėje. CA I, II, III, VII, ir XIII bei CARP VIII, X, XI yra citozolyje; CA IX, XII, IV ir XIV yra membraniniai baltymai; CA VA ir VB yra mitochondrijose, CA VI yra sekretuojama (pritaikyta pagal Truppo et al. 2012). B – Žmogaus CA II struktūra; cinkas aktyviame centre koordinuojamas trimis imidazolais (Fierke and Thompson, 2001). C – Schema, vaizduojanti CA katalizuojamos reakcijos mechanizmą (Sattler and Parkin, 2012).

Mitochondrinės CA yra atsakingos už bikarbonato jono pateikimą kitiems mitochondrijų fermentams, todėl dalyvauja šlapimo ir gliukozės susidarymo procese (Ghandour et al., 2002). Vienintelė sekretuojama  $\alpha$ -CA izoforma CA VI randama seilėse yra reikalinga palaikant tinkamą pH burnos ertmėje. Manoma, kad motinos piene esanti CA VI yra labai svarbi kūdikio virškinamojo trakto formavimuisi (Frost et al., 2014; Karhumaa et al., 2001).

**2 lentelė.** Žmogaus  $\alpha$ -CA fermentai, pagrindinės funkcijos ir paplitimas audiniuose (Imtaiyaz Hassan et al., 2013).

<b>Izoforma</b>	<b>Funkcija</b>	<b>Paplitimas organizme</b>
CA I	Antirefliuksinis poveikis, dujų mainai ir jonų transportas	Eritrocitai, virškinimo traktas
CA II	Antirefliuksinis poveikis, kaulų rezorbcija, akies vandeningos terpės produkcija, spermatozoidų judrumas, šlapimo parūgštinimas, cerebrospinalinio skysčio sekrecija, dujų mainai	Beveik visos ląstelės
CA III	Sočiųjų rūgščių metabolizmas, akies skysčio transportas ir homeostazė	Stuburo styga ir skeleto raumenys embrione, skeleto raumenys
CA IV	Nosies cheminis jautrumas CO <sub>2</sub> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> reabsorbcija, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> produkcija, pH reguliacija, akies skysčio produkcija, dujų mainai ir smegenų kraujotaka	Virškinimo traktas, inkstai, endotelis, kasa, seilių liaukos, širdies raumuo, akys, gaubtinė žarna
CA VA	Bikarbonatu aprūpina piruvato karboksilazę, biosintezės reakcijos	Kepenys, inkstai, kasos salelės ir beta ląstelės
CA VB	Biosintezės reakcijos, amonio detoksikacija	Kasa, inkstai, seilių liaukos ir stuburo smegenys, širdies ir skeleto raumenys, virškinamojo trakto gleivinė. Nėra kepenyse
CA VI	pH reguliacija, antirefliuksinis poveikis, apsauga prieš kancerogenus, skonio funkcija	Sekretuojama į seiles, ašaras, pieną. Nosies, ašarų, von Ebnerio seilių ir pieno liaukos
CA VII	Cerebrospinalinio skysčio gamyba	Centrinė nervų sistema (CNS)
CARP VIII	Nefunkcionalus	Smegenėlių Purkinjė ląstelės
CA IX	pH reguliacija, ląstelių adhezija, ląstelių proliferacija ir diferenciacija, jonų transportas. Sėklidžių skysčio koncentravimas ir parūgštinimas	Virškinamasis traktas, keletas navikų, vyrų lytinės liaukos
CARP X	Nefunkcionalus	Smegenyse ir CNS, mielino dangalas, gaubtinės žarnos augliai ir paviršiaus gaureliai
CARP XI	Nefunkcionalus	Galvos ir nugaros smegenys, skydliaukė, CNS
CA XII	pH reguliacija, akies vandeningos terpės produkcija, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> absorbcija, H <sup>+</sup> sekrecija, sėklidžių skysčio koncentravimas ir parūgštinimas	Gaubtinė žarna, inkstai, prostata, žarnynas, aktyvuoti limfocitai, tam tikri navikai, krūtinė, plaučiai, akys, vyrų lytinės liaukos, reprodukcinų organų epitelis
CA XIII	Rūgščių šarmų balanso palaikymas ir pH reguliavimas	Užkrūčio liauka, plonoji žarna, blužnis, prostata, kiaušidės, gaubtinė žarna, sėklidės
CA XIV	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> absorbcija ir neuronų signalo perdavimo moduliavimas	Dalyje CNS, kepenys, širdis, plonoji žarna, gaubtinė žarna, inkstai, šlapimo pūslė, skeleto raumenys ir smegenys

Membraniniai fermentai vykdo grįžtamąją CO<sub>2</sub> hidrataciją užląstelinėje erdvėje ir prisideda prie tokių procesų kaip šlapimo rūgštinimas, bikarbonato rezorbcija, pH homeostazė. Kelios izoformos yra siejamos su vėžiniais pokyčiais (Frost et al., 2014).

Trijų dimensijų struktūrinė analizė parodė, kad  $\alpha$ -CA fermentai tarpusavyje yra labai panašūs. Tipiškai CA molekulė yra sudaryta iš sferą formuojančių paralelinių ir antiparalelinių  $\beta$ -klosčių, kurios apsupa cinko joną, būtiną kataliziniam aktyvumui (13 pav., B). Aktyvusis centras yra kūgio formos ertmė su cinko jonu jos dugne (Imtaiyaz Hassan et al., 2013; Lindskog, 1997), kuri koordinuoja trys histidino liekanos savo imidazolo žiedais ir tirpiklio (vandens) molekulė. Cinko ligandai susieti vandeniliniiais ryšiais su kitomis baltymo ar. liekanomis, dar vadinamomis netiesioginiais ligandais, ir yra apsupti hidrofobinėmis ar. (Fierke and Thompson, 2001; Lindskog, 1997).

$\alpha$ -CA kaip ir kitų CA šeimų baltymų pagrindinė funkcija yra katalizuoti grįžtamą CO<sub>2</sub> hidratacijos reakciją, kuri vyksta dviem stadijomis pagal „ping-pong“ mechanizmą (13 pav., C) (Gilmour, 2010; Supuran, 2018).

### 1.3. Su vėžiu susijusios membraninės karboanhidrazės

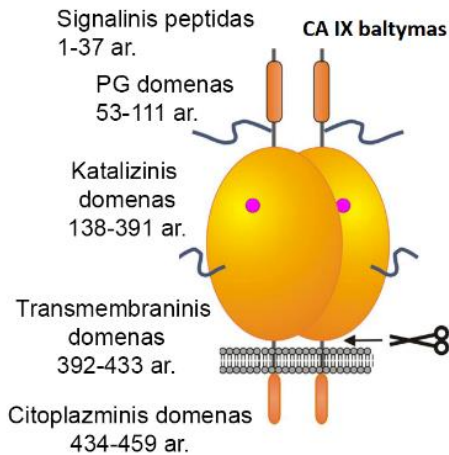
Nors CA yra labai svarbios dalyvaujant daugelyje metabolizmo procesų, tačiau šie fermentai prisideda ir prie patologinių reakcijų, todėl CA yra laikomos tinkamais terapiniais taikiniiais glaukomos, epilepsijos priepuolių, aukščio ligos, nutukimo, skausmo gydymui (Mboge et al., 2018). Dvi membraninės CA izoformos – IX ir XII – yra siejamos su vėžiniais pakitimais. Šiuo metu ypač intensyviai tiriama jų paplitimas normaliuose ir pakitusiuose audiniuose, siekiant įvertinti diagnostinį, prognostinį ir terapinį potencialą. Gilinamasi į mechanizmus, vykstančius vėžinėse ląstelėse, su tikslu išsiaiškinti abiejų izoformų svarbą vėžio vystymuisi, išgyvenimui ir plitimui. Atlikti tyrimai parodė, kad CA IX ir XII yra svarbios kancerogenezeje, kadangi yra esminiai vėžio mikroaplinkos pH reguliatoriai, prisidedantys prie vėžio augimo ir ląstelių migracijos (Chiche et al., 2010a).

#### 1.3.1. Žmogaus karboanhidrazės IX apibūdinimas

Pirmasis CA IX pavadinimas buvo MN baltymas, aptiktas žmogaus gimdos kaklelio karcinomos ląstelių linijoje (HeLa, angl. *human cervical carcinoma cell line*) (Pastorekova et al., 1992), kuris kiek vėliau buvo priskirtas CA šeimai. Jau pirmuosiuose tyrimuose buvo pastebėta tendencija, kad CA IX raiška yra didesnė įvairių karcinomų atvejais, lyginant su to paties

organo normaliu audiniu, todėl ši izoforma buvo siejama su vėžiniais pakitimais (Pastorek et al., 1994).

Žmogaus *CA9* geno lokusas išsidėstęs 9 chromosomoje (9p12-13) ir yra sudarytas iš 11 egzonų, koduojančių skirtingus baltymo domenus (14 pav.). Pirmasis egzonas koduoja signalinį peptidą ir proteoglikaninį domeną (PG, angl. *proteoglycan-like domain*), 2-8 egzonai koduoja katalizinį domeną, 9 egzonas atsakingas už ar. seką, esančią prieš 10 egzono koduojamą transmembraninį domeną, o 11 egzone – užkoduoja citoplazminės dalies ar. seką (Opavský et al., 1996). *CA9* geno iRNR dėl alternatyvaus brandinimo turi ir trumpesnę formą, kurioje nėra 8 ir 9 egzonų, todėl nuo tokios iRNR transliuojamas baltymas neturi transmembraninio regiono, citoplazminės uodegos ir katalizinio domeno C-galo dalies. Trumpesnis baltymas pasižymi mažesniu aktyvumu bei konkuruoja su pilno ilgio baltymu dėl sąveikos su CA inhibitoriais. Tyrėjai analizuoja alternatyvios CA IX formos įtaką vėžinėms ląstelėms ir jos paplitimą normaliuose ir vėžiniuose audiniuose (Malentacchi et al., 2009).



**14 pav.** CA IX baltymo domeninės struktūros iliustracija. Žirklių simbolis parodo užląstelinio domeno nuskėlimo vietą (Pastorek and Pastorekova, 2015).

CA IX yra homodimerinis 459 ar. transmembraninis  $\alpha$ -CA šeimos cinko metalofermentas. CA IX dimerinę struktūrą apsprendžia disulfidinis tiltelis tarp dviejų monomerų cisteinų Cys41 liekanų. Monomero molekulinė masė yra 49,5 kDa, tačiau elektroforezėje denatūruojančiomis sąlygomis migruoja dviem juostelėmis ties 54 ir 58 kDa žyma, kadangi potransliacinių modifikacijų metu yra glikozilinami asparagino Asn-309 azoto ir treonino Thr-78 deguonies atomai (Pastorek and Pastorekova, 2015; Singh et al., 2018b).

Tiriant inkstų ląstelių karcinoma (RCC, angl. *renal cell carcinoma*) sergančių pacientų kraujo plazmos ir šlapimo mėginius buvo aptikta tirpi (angl. *soluble*) CA IX forma, kurios molekulinė masė 50 ir 54 kDa (Závada et al., 2003). Tikslus ektodomeno susidarymo mechanizmas ir biologinė reikšmė nėra žinomi, tačiau yra nustatyta, kad procesas priklauso nuo metaloproteazių ir yra reguliuojamas TACE/ADAM17 (angl., *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme*) fermento. Manoma, kad šis procesas yra vėžinių ląstelių atsakas į ląstelės baltymų sąstato ir mikroaplinkos pokyčius (Zatovicova et al., 2005). Įvairios tyrėjų grupės analizuoja kraujo ir šlapimo mėginius, esant įvairiems vėžiniams pakitimams, norėdami išsiaiškinti tirpios CA IX formos pritaikymo galimybes vėžiu sergančių pacientų diagnostikai, gydymo strategijos parinkimui ir stebėsenai (Papworth et al., 2010; Woelber et al., 2011).

Sveiko žmogaus organizme didesnis CA IX kiekis aptinkamas kepenyse, skrandyje, dvylikapirštėje ir gaubtinėje žarnoje, tulžies pūslėje; nedidelė raiška nustatyta kiaušidžių, inkstų, seilių liaukų, sėklidžių ir CNS normaliaame audinyje. Kituose audiniuose CA IX baltymas nenustatytas (Luong-Player et al., 2014; Thiry et al., 2006). Įdomu tai, kad šios CA izoformos raiška padidėja esant vėžiniams pakitimams, net jeigu to organo normaliaame audinyje CA IX nesintetinama. Kepenų, inkstų, gimdos kaklelio, kasos, plaučių, skrandžio, endometriumo, gaubtinės žarnos, gimdos, stemplės, šlapimo sistemos, skydliaukės, kiaušidžių, krūties vėžio atvejais CA IX raiška žymiai padidėja ir kai kuriais atvejais yra laikoma diagnostiniu ir prognostiniu žymeniu (Luong-Player et al., 2014).

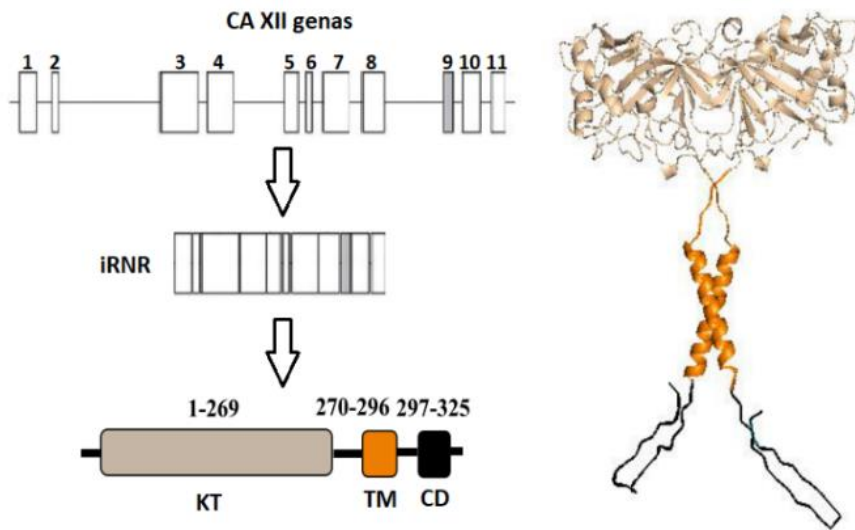
### 1.3.2. Žmogaus karboanhidrazės XII apibūdinimas

CA XII atradimas yra siejamas su naujų vėžinių antigenų paieška. Analizuojant iš vėžinių audinių išskirtą iRNR, fagų ekspozicijos metodu buvo nustatyta, kad vienas iš atrastų vėžinių antigenų yra CA XII baltymas, aptiktas inkstų naviko atveju (Türeci et al., 1998).

CA12 genas, esantis 15 chromosomoje (15q22), yra sudarytas iš 11 egzonų, koduojančių 354 ar. baltymą, kurio molekulinė masė 39,4 kDa. CA XII yra bitopinis membraninis baltymas, kurį sudaro signalinis peptidas (29 ar.), katalizinis domenas (261 ar.), hidrofobinis transmembraninis domenas (26 ar.) ir hidrofilišnis C-galo citoplazminis domenas (15 pav.) (Ivanov et al., 1998; Türeci et al., 1998).

CA XII baltymas yra N-glikozilinas (asparagino Asn-52 ir Asn-136 liekanos), todėl denatūruojančiomis sąlygomis vykdant elektroforezę yra stebimos dvi 43 ir 44 kDa dydžio juostelės (Türeci et al., 1998). Tyrėjai

parodė, kad rekombinantinis ekstraląstelinis CA XII domenas tirpale yra dimerinės formos ir tai buvo patvirtinta gavus baltymo kristalinę struktūrą. Tuo metu CA XII buvo vienintelė žinoma CA izoforma, formuojanti dimerą. Vėliau buvo nustatyta, kad ir CA IX ląstelės paviršiuje yra dimerinės struktūros (Alterio et al., 2009). Skirtingai nuo CA IX izoformos, kur tarp monomerų susidaro disulfidinis tiltelis, CA XII dimerinę struktūrą palaiko tik vandeniliniai ryšiai. Stabilizuojant dimerą, iš viso susiformuoja 19 vandenilinių ryšių, daugiausiai tarp CA XII baltymui unikalių ar. liekanų ir tik viena labai konservatyvi glutamino Gln-249 liekana dalyvauja sudarant du iš šių ryšių (Whittington et al. 2001). Transmembraninė CA XII dalis turi GXXXG ir GXXXS ar. motyvus, kurie yra laikomi transmembraninių  $\alpha$ -spiralių dimerizacijos karkasu (Russ and Engelman, 2000; Whittington et al., 2001). Manoma, kad viduląstelinis C-galo domenas taip pat suformuoja dimerą, taip išlaikant bitopinio membraninio baltymo simetriją. Šiame domene yra potencialios fosforilinimo vietos, kurios siejamos tiek su baltymo tretine ir ketvirtine struktūra, tiek su funkcija ar signalo perdavimu. Nėra atlikta pakankamai bandymų CA XII atveju, norint patvirtinti šias prielaidas, tačiau CA IX izoformos tyrimai parodė didelę fosforilinimo svarbą baltymo funkcijai (Ditte et al., 2011).



**15 pav.** Schemos, vaizduojančios *CA12* geną (egzonai – stačiakampiai, intronai – linija; pilkas stačiakampis – 9 egzonas, kuris yra pašalinamas alternatyvaus brandinimo metu), iRNR ir CA XII baltymą (kairėje) bei dimerinės CA XII struktūros modelis (dešinėje). KT – katalizinis domenas, TM – transmembraninis motyvas, CD – C-galo citoplazminis domenas (pritaikyta pagal Lee et al. 2016; Singh et al. 2018).



Be pilno ilgio baltymo yra ir trumpesnę aminorūgščių grandinę turinti CA XII forma, kuri yra sintetinama nuo alternatyviai subbrandintos iRNR. Dažniausiai aptinkama alternatyvi CA12 izoforma neturi 9 egzono, sudaryto iš 33 nukleotidų, todėl yra išlaikomas tas pats skaitymo rėmelis. Baltymas, sintetinamas nuo tokio transkripto, neturi 11 ar., tarp kurių yra ir kelios priklausančios dimerizacijos motyvui GXXXG, todėl tai gali daryti įtaką alternatyvaus baltymo ketvirtinės struktūros pokyčiams, fermento funkcijai ir viduląstelinio signalo perdavimui (Haapasalo et al., 2008). Šis baltymo variantas yra sintetinamas smegenų vėžio atveju, o alternatyviai subbrandinta iRNR buvo nustatyta inkstų vėžinėse ląstelėse ir keliuose kituose audiniuose, tačiau kokią įtaką patologiniams procesams daro alternatyvaus baltymo egzistavimas, nėra visiškai aišku (Haapasalo et al., 2008; Lee et al., 2016).

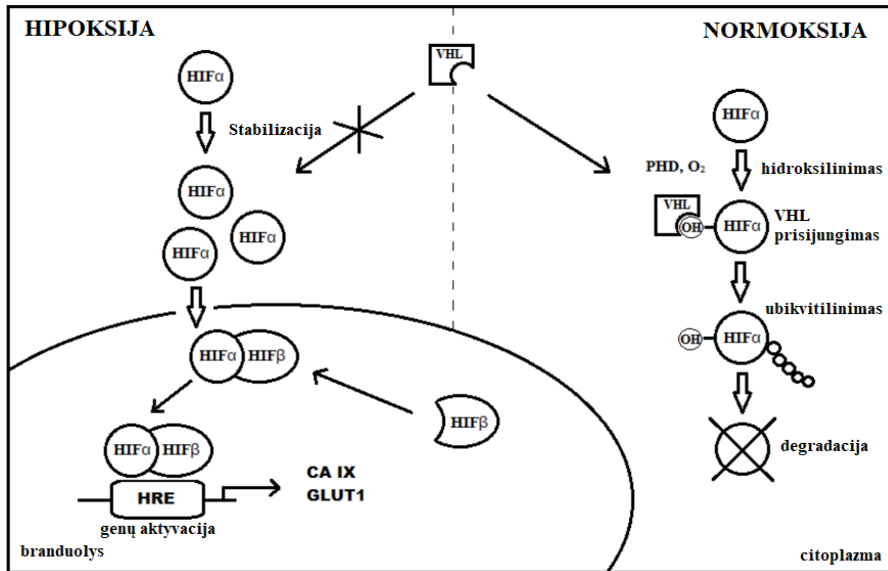
Nors CA XII yra sintetinama įvairiuose normaliuose organuose (2 lentelė), tačiau jos raiška žymiai padidėja esant vėžiniams pakitimams. CA XII aptinkama net 75 % atvejų krūties karcinomos subtipo, kuriame yra sintetinamas estrogeno receptorius, tačiau nėra epidermio augimo veiksnio receptoriaus (angl. *epidermal growth factor receptor*), ir yra siejama su geromis prognozėmis (Barnett et al., 2008). CA XII randama ir inkstų vėžiniame audinyje, tačiau, palyginus su CA IX, jos raiška nėra didelė. Maždaug 10 % RCC sergančių pacientų turi CA XII, o CA IX raiškos lygis šios ligos atveju yra beveik visada aukštas ir vienodas, todėl CA IX yra laikoma potencialiu diagnostiniu ir terapiniu taikiniu (Frost et al., 2014). CA XII taip pat yra sintetinama nesmulkių ląstelių plaučių karcinomos (angl., *non-small cell lung cancer*), gimdos kaklelio, kasos, storosios žarnos, skrandžio gleivinės ir įvairių smegenų navikų atvejais. Svarbu paminėti, kad CA XII diagnostinis, prognostinis ar terapinis potencialas yra vertinamas kiekvieno vėžio tipo atveju, kadangi tyrimų rezultatai dažnai yra prieštaringi (Ochi et al., 2015; Singh et al., 2018b).

### 1.3.3. Su vėžiu siejamų karboanhidrazių IX ir XII raiškos reguliavimas

Membraninių CA IX ir CA XII izoformų raiškos kontrolė įvairiuose epiteliniuose vėžio tipuose labai priklauso nuo deguonies kiekio. Išsamūs šių baltymų aktyvacijos tyrimai parodė, kad CA9 geno promotoriuje yra hipoksijos atsako elementas (HRE, angl. *hypoxia response element*), kurį atpažįsta hipoksijos indukuojamas veiksnys 1 (HIF-1, angl. *hypoxia inducible factor 1*). HIF-1 yra svarbiausias CA9 ir CA12 genų transkripcijos aktyvatorius (16 pav.) (Wykoff et al., 2000).

HIF-1 transkripcijos veiksnys yra pagrindinis molekulinis kelias, susijusių su hipoksija vėžio mikroaplinkoje, reguliatorius, prisidedantis prie maždaug

100 genų transkripcijos reguliavimo. Šių genų koduojamų baltymų savybės ir funkcijos yra labai skirtingos ir jie dalyvauja įvairiuose procesuose, pavyzdžiui, angiogenezeje, glikolizės reakcijose, jonų transporte ir pH reguliacijoje, užląstelinio matrkso pertvarkyme, ląstelių adhezijoje, migracijoje, proliferacijoje ir išgyvenime, atsparume vaistams ir hipoksijos tolerancijoje (Harris, 2002).



**16 pav.** Nuo hipoksijos priklausomų genų aktyvacija. Esant normoksijai, HIF-1 $\alpha$  yra suskaidomas ubikvitino proteosomoje, hipoksijoje šis subvienetas yra stabilizuojamas, patenka į branduolį, kur susijungia su HIF-1 $\beta$  subvienetu ir suformuoja aktyvų transkripcijos veiksni. Pradedama genų, turinčių HRE sekas, pavyzdžiui, *CA9*, *GLUT1* raiška (pritaikyta iš Nordfors et al. 2013).

HIF-1 yra heterodimeras sudarytas ir dviejų subvienetų – pastoviai sintetinio HIF-1 $\beta$  ir HIF-1 $\alpha$ , kurio stabilumas ir aktyvumas yra reguliuojamas per potransliacines modifikacijas ir priklauso nuo deguonies koncentracijos. Esant normaliam deguonies lygiui, nuo deguonies priklausoma deoksigenazė prolil-4-hidroksilazė (PHD angl. *prolyl-4-hydroxylase*) hidroksilina HIF-1 $\alpha$ , taip paskatindama šio baltymo ubikvitilinimą, kurį vykdo von Hippel-Lindau (VHL) baltymas. Prijungus ubikvitinus, HIF-1 $\alpha$  yra suskaidomas 26S proteosomoje (Ruas et al., 2005). Sumažėjus deguonies koncentracijai, PHD netenka aktyvumo ir HIF-1 $\alpha$  nėra suskaldomas. Stabilizuoto subvieneto translokacijoje į branduolį dalyvauja citoskeleto judinamasis baltymas dineinas (angl., *dynein*), prisijungdamas prie lokalizacijos branduolyje sekos (angl. *nuclear localization sequence*), kai HIF-1 $\alpha$  asocijuoja su mikrovamdzeliais (Koyasu et al., 2018). Branduolyje

HIF-1 $\alpha$  susijungia su HIF-1 $\beta$  subvienetu ir suformuoja aktyvų HIF-1 transkripcijos veiksnį. Kartu su koaktyvatorių kompleksu p300/CBP, HIF-1 jungiasi su genų, pavyzdžiui, *CA9* ir *CA12*, promotoriuose esančia HRE seka ir pritraukia RNR polimerazę II (Koyasu et al., 2018; Semenza, 2001).

CA IX indukcija yra stipriai priklausoma nuo HIF-1 ir yra pastoviai sintetinama ląstelėse, neturinčiose VHL baltymo. CA XII sintezė taip pat padidėja, kai yra VHL baltymo defektas, pavyzdžiui, inkstų vėžio atveju ar esant hipoksijai. CA IX ir HIF-1 sintezė koreliuoja su prastesniu pacientų išgyvenamumu, o CA XII svarba yra mažiau akivaizdi (Chiche et al., 2009).

#### 1.3.4. Karboanhidrazių IX ir XII sąsajos su vėžiniais pakitimais

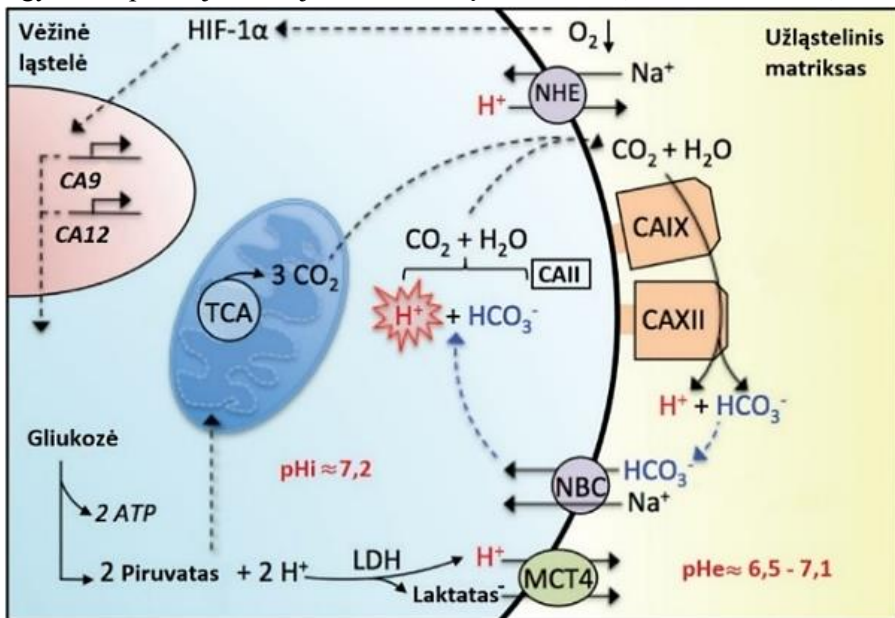
Vėžiui vystantis ir progresuojant, dėl nekontroliuojamos vėžinių ląstelių proliferacijos ir nepakankamos bei neefektyvios kraujagyslių sistemos atsiranda hipoksija. Kadangi vėžinės ląstelės dalijasi itin greitai, navikas netrukus išsekvoja maistines medžiagas ir deguonį, todėl atsiranda sričių, kuriose laikinai ar visam laikui trūksta deguonies (Eales et al., 2016). Hipoksija pakeičia vėžinių ląstelių metabolizmą, sužadindama sudėtingus signalo perdavimo kelius ląstelėje, tarp kurių ir anksčiau minėtas HIF-1 transkripcijos veiksnio aktyvinimas (Muz et al., 2015).

Vienas iš vėžinių ląstelių prisitaikymo prie deguonies trūkumo būdų yra gliukozės metabolizmo pasikeitimas iš oksidacinio fosforilavimo į glikolizę. Tokiu atveju ląstelėje susidaro didelis protonų kiekis, kuris turi būti pašalintas, norint išlaikyti pastovų viduląstelinį pH ( $pH_i$ ). Normalių ląstelių  $pH_i$  yra apie 7,2, o užląstelinėje erdvėje ( $pH_e$ ) yra palaikomas šiek tiek bazinis  $pH \geq 7,3$ . Toks balansas padeda palaikyti tinkamus transporto, metabolinius ir reguliacinius procesus. Net nežymus pH pokytis, pavyzdžiui, per 0,1 vieneto, gali sutrikdyti daugelį biologinių funkcijų – ATP ir baltymų sintezę, ląstelės proliferaciją, migraciją ar apoptozę. (Mboge et al., 2018; Parks et al., 2011; Webb et al., 2011).

Vėžinių ląstelių aplinkoje atsiradus hipoksijai ir prasidėjus glikolizei, į užląstelinę erdvę išskiriama daug protonų, kadangi vėžinės ląstelės siekia išlaikyti kuo stabilesnį  $pH_i$ . Todėl  $pH_e$  nukrenta iki 6,5–7,1, o  $pH_i$  kinta nežymiai – iki  $\geq 7,2$  (Mboge et al., 2018; Webb et al., 2011). Taigi deguonies lygis ir protonų kiekis aplinkoje yra atvirkščiai proporcingas – kuo mažesnis deguonies kiekis, tuo protonų susidaro daugiau (Chiche et al., 2010b; Vaupel, 2004).

Adaptacijos prie hipoksijos metu vėžinės ląstelės sukuria efektyvią membraninio transportavimo sistemą, kurios dėka pertekliniai  $H^+$  jonai yra pašalinami iš ląstelės per  $Na^+/H^+$  nešiklius arba yra neutralizuojami  $HCO_3^-$

jonais, kurie į ląstelę patenka  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  kotransporterių ar  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  nešiklių pagalba (Hulikova et al., 2011; Parks et al., 2011). Manoma, kad CA IX ir CA XII, kurių raiška vėžinėse ląstelėse padidėja dėl hipoksijos, katalizuodamos  $\text{CO}_2$  hidrataciją aktyviai prisideda prie greito lokalaus užląstelinio  $\text{HCO}_3^-$  susidarymo. Be to, tos pačios reakcijos metu susidaro protonai, kurie lieka ląstelės išorėje ir taip palaiko acidozę (17 pav.) (Sedlakova et al., 2014). CA IX ir CA XII per pastaruosius dešimtmečius pripažintos svarbiais vėžinės ląstelės pH mediatoriais, nes prisideda prie vėžinių ląstelių išgyvenimo ir proliferacijos (Mboge et al., 2018). Laikui bėgant vėžinės ląstelės tampa atsparios padidėjusiai acidozei, todėl jos gali išgyventi aplinkoje, kurioje normalios ląstelės žūsta (Parks et al., 2011).



**17 pav.** Molekuliniai mechanizmai susiję su pH reguliavimu ir jonų transportu vėžinėje ląstelėje – CA IX ir CA XII vaidmuo bikarbonato apykaitoje. TCA – trikarboksirūgštis (angl., *tricarboxylic acid*); NHE –  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  nešiklis (angl., *sodium/hydrogen exchanger*); NBC –  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  kotransporteris (angl., *sodium bicarbonate cotransporter*); MCT4 – laktato transporteris (angl., *lactate transporters MCT4*); LDH – laktato dehidrogenazė (angl., *lactate dehydrogenase*) (pritaikyta ir modifikuota iš Silagi et al. 2018; Thiry et al. 2006).

Tinkama pH kontrolė yra būtina ląstelių migracijai ir invaziškumui, kurie laikomi pradiniais metastazinės vėžinių ląstelių kaskados žingsniais. Migruojančių ląstelių plazminės membranos ataugos – lamilipodijos – pasižymi mitochondrijų trūkumu, energijos gamyba glikolizės būdu ir intensyviu jonų transportu, panašiai kaip ir hipoksiją patiriančių ląstelių

atveju. Tokiose išsikišusiose srityse aptinkama padidėjusi CA IX raiška, kur ji dalyvauja užląstelinėje bikarbonato jonų sintezėje, kuris savo ruožtu svarbus palaikant tinkamą pH. CA IX slopinimas ar jos katalizinio domeno pašalinimas sumažina vėžinių ląstelių invaziškumą ir migraciją (Pastorek and Pastorekova, 2015).

Be viso to, CA IX prisideda ir prie kitų vėžio formavimuisi, diferenciacijai ir plitimui svarbių procesų. Pavyzdžiui, hipoksija ir užląstelinė acidozė prisideda prie vėžinių ląstelių diferenciacijos į kamieninių ląstelių fenotipą. Vėžio kamieninės ląstelės yra identifikuotos daugelyje kietųjų navikų, kur atlieka kamieninių ląstelių funkciją ir gali atkurti auglį, dalyvauja metastazių formavime, yra siejamos su atsparumu chemoterapijai (Tirino et al., 2013). Tyrimais parodyta, kad kamieninių ląstelių fenotipo palaikymui yra reikalingas pH reguliavimas, kurį atlieka būtent CA IX (Lock et al., 2013). Kita mokslininkų grupė parodė, kad CA IX turi įtakos vėžio metastazinio fenotipo susidarymui. CA IX sąveikaudama su  $\beta$ -kateninu, atskiria E-kadheriną nuo citoskeleto inkaro, o tai prisideda prie vėžinių ląstelių atsiskyrimui nuo vėžinio audinio (Pastorek and Pastorekova, 2015; Švastová et al., 2003).

Tiriant krūties vėžio ląstelių liniją MDA-MB-231 gauti rezultatai parodė, kad CA XII taip pat skatina vėžinių ląstelių invaziškumą ir migraciją, nes reguliuoja metaloproteazių MMP-2 ir MMP-9 raišką. Šios metaloproteazės yra vienos svarbiausių degraduojant užląstelinį matriksą ir yra siejamos su agresyvaus fenotipo metastazuojančiais navikais (Hsieh et al., 2010).

### 1.3.5. Karboanhidrazių IX ir XII tyrimai ir jų reikšmė vėžio diagnostikai

Vėžio diagnostika vis dar daugiausiai remiasi histologine analize, vertinant morfologines ląstelių savybes. Prognozuojant vėžio eigą, taip pat nustatomas histologinių pokyčių laipsnis, kai mikroskopu stebimos naviko ląstelės lyginamos su sveikomis ląstelėmis ir vertinami jų skirtumai. Daugeliu atveju tai pakankamai patikimas diagnostikos būdas, tačiau priklauso nuo individualių vertintojo savybių. Tiksliai histologinė stadija įvardijama tik 20-30 % mėginių, o likusių mėginių diferenciacija nėra aiškiai nustatoma, todėl tolimesnė ligos eiga yra sunkiai prognozuojama (Buonaguro et al., 2014; Yoo et al., 2010).

Platesnis molekulinis vėžinio audinio charakterizavimas galėtų prisidėti prie tikslesnės vėžio stadijos ar agresyvaus fenotipo nustatymo, taip pat padėtų numatyti galimą terapijos rezultatą. Baltymų ir iRNR raiškos profilių nustatymas gali tapti nepakeičiamu įrankiu medicinos darbuotojams (Buonaguro et al., 2014). Dėl savo svarbos vėžio vystymuisi ir progresavimui

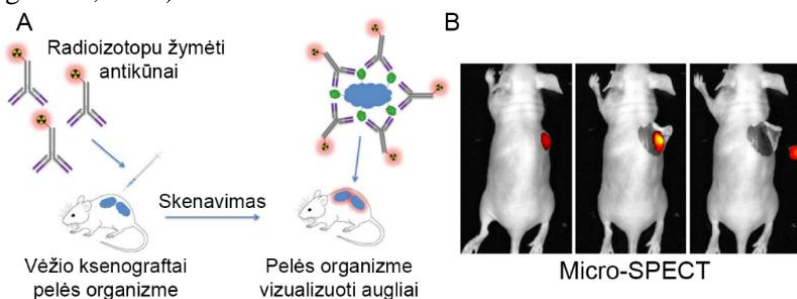
CA IX ir CA XII yra laikomos perspektyviais biožymenimis, todėl jų diagnostinė ir prognostinė vertė yra intensyviai tyrinėjama (Kobayashi et al., 2012; Tostain et al., 2010).

Biožymenų tyrimams ir diagnostikai naudojama daugybė metodų. Vieni plačiausiai naudojamų remiasi specifine antikūnų sąveika su taikiniu antigenu, pavyzdžiui, IFA, imunohistocheminė analizė (IHC), imunofluorescencinė analizė (IF), tėkmės citometrija (TC), kuriais analizuojami audinių ar skysčių mėginiai (Nimse et al., 2016). Didelę vertę turi *in vivo* vėžio tyrimai, kuriais galima identifikuoti ir vizualizuoti vėžinius darinius, taip palengvinant ne tik diagnostiką, bet ir chirurginį gydymą (Warram et al., 2014). Antikūnai žymėti radioizotopais yra sėkmingai naudojami pozitronų emisijos tomografijoje (PET, angl., *immuno-positron emission tomography*), taip pat intensyviai tiriami fluoroforų-antikūnų junginiai, nes pastarieji yra saugesni ir pigesni nei radioaktyvios žymės (Knowles and Wu, 2012; Mitsunaga et al., 2013).

Vėžinių biožymenų tyrimai RNR lygmenyje taip pat yra ne mažiau vertingi, kadangi RNR yra ne tik pagrindinis genetinės informacijos nešėjas, bet dažnai ir transkripcijos bei potranskripcinių įvykių reguliuotojas. Didžiausias iššūkis – RNR stabilumas, tačiau naudojant labai jautrius metodus galima aptikti ypač mažus RNR kiekius įvairiuose biologiniuose mėginiuose, o tai ypač aktualu pačioje ligos pradžioje (Xi et al., 2017). Vienas tokių metodų – tikro laiko (arba kiekybinė) atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija (AT-kPGR), yra naudojama ne tik moksliniams tyrimams, bet ir klinikinėje praktikoje. Šiuo metodu dažniausiai lyginami sveikų ir sergančių asmenų biologiniai pavyzdžiai, norint išvelgti iRNR raiškos skirtumus ir nustatyti su vėžiniais pakitimais siejamus genus (Narrandes and Xu, 2018). Tiek antikūnais paremti baltymų tyrimai, tiek iRNR analizė, taikant AT-kPGR metodą, yra naudojami vėžio biožymenų CA IX ir CA XII vertinimui ir jų panaudojimui vėžio diagnostikai, ligos eigos ar gydymo prognozavimui (Tostain et al., 2010; Waheed and Sly, 2017).

Tiriant CA IX ir CA XII raišką, MAk naudojami šių fermentų nustatymui skirtinguose biologiniuose mėginiuose ar žmogaus organizme *in vivo* įvairiais imunocheminiais metodais (Mboge et al., 2018). Pirmasis MAk G250, specifiskai sąveikaujantis su CA IX, buvo sukurtas dar 1986 metais, po to kai pelės buvo imunizuotos RCC ląstelių lizatais (Oosterwijk et al., 1986). Šis MAk jungiasi prie fermento katalizinio domeno, tačiau jo aktyvumo neužblokuoja (Zatovicova et al., 2014). Pelės antikūno pastoviąją sritį pakeitus analogišku fragmentu iš žmogaus antikūno, buvo sukurta ir chimerinė G250 (cG250) forma (Steffens et al., 1997).

MAk G250 ir cG250, konjuguoti su radioizotopais, buvo tiriami imunoscintigrafijos ar imuno-PET metodais *in vivo*, naudojant pelių modelius su indukuotais vėžiniais dariniais ksenograftais (18 pav.) ar suleidžiant inkstų vėžiu sergantiems pacientams. Tai ypač svarbu norint vizualizuoti CA IX sintetinančius navikus, taip palengvinant vėžio diagnostiką bei chirurgiją (Steffens et al., 1997, 1999a; Stillebroer et al., 2013). Šie eksperimentai atvėrė kelią ne vienam klinikiniam tyrimui (Lau et al., 2017). Vienas didžiausių III fazės tyrimų REDECT, kuriame dalyvavo 195 kriterijus atitinkantys RCC pacientai, buvo skirtas charakterizuoti inkstų audinį, naudojant  $^{124}\text{I}$  izotopu žymėtą cG250 (komercinis pavadinimas *Girentuximab*) PET metodu. Vidutinis jautrumas siekė 86,2 %, o specifiškumas – 85,9 %, ir tai rodo aukštą tikslumą bei didelį potencialą, taikant šį antikūną inkstų naviko diagnostikai (Divgi et al., 2013).

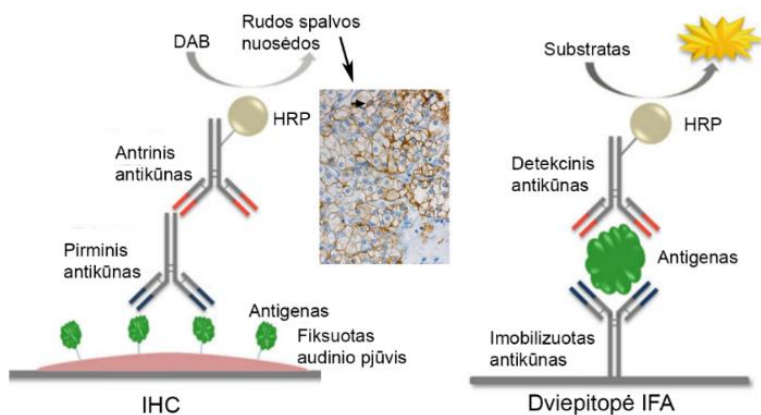


**18 pav.** A – Schematiškai pavaizduotas imuno-PET veikimo principas. Pelei su indukuotu auglio ksenograftu (mėlyna spalva) suleidžiami antikūnai, pažymėti radioizotopu. Jie specifiskai jungiasi prie vėžinio markerio, esančio ląstelių paviršiuje (žalia spalva). Specialiu skeneriu nuskenavus pelę, vėžys yra vizualizuojamas (raudona spalva) dėl radioaktyvios žymės, prijungtos prie antikūno (Matulis, 2019). B – PET technologijos variantas Micro-SPECT (angl. *Micro Single Photon Emission Computed Tomography*), panaudotas vizualizuoti RCC auglio ksenograftą pelės organizme su  $^{125}\text{I}$ -girentuximab-IRDye800CW. Auglys buvo pašalintas fluorescencinės vaizdinės chirurgijos būdu (Muselaers et al., 2014).

Kitas plačiai diagnostikai naudojamas MAk M75 buvo sukurtas 1992 metais, pelių imunizacijai panaudojus HeLa ląsteles (Pastorekova et al., 1992). MAk M75 jungiasi su PG domenu (Závada et al., 2000) ir gali sąveikauti su CA IX, o sąveika gali būti nustatoma įvairiais imunocheminiais metodais. Vienas pagrindinių – IHC, kurio principas remiasi vėžinio antigeno kolorimetrine vizualizacija audinio biopsijos mėginyje, imobilizuotame ant stikliuko (19 pav.) (Frost et al., 2014).

IHC ir IB metodais naudojant MAk M75 buvo parodyta, kad CA IX yra patikimas hipoksiją patiriančių navikų biožymuo, kadangi jos raiška statistiskai patikimai siejasi su HIF-1 $\alpha$ . Šio tyrimo metu nustatyta teigiama

CA IX koreliacija su prostatos vėžio klasifikacija ir stadija, o tai galėtų būti vertinga prognozuojant prostatos vėžio eigą (Ambrosio et al., 2016). Kitame tyrime, naudojant MAK M75 ir IHC, buvo nustatyta didesnė CA IX raiška gimdos kaklelio vėžiniame audinyje nei esant cervikalinei intraepitelinei neoplazijai ar normaliam audiniui (Kim et al., 2013). Net 81,8 % plaučių vėžiu sergančių pacientų buvo nustatyta CA IX raiška, tiriant pakitusius audinius IHC su MAK M75. CA IX raiška koreliavo su vėžio naviko nekrozės mastu (Swinson et al., 2003). Daugybėje kitų tyrimų šis MAK buvo pagrindinis įrankis, tiriant CA IX raišką. 2016 metais atliktoje 147 mokslinių publikacijų meta-analizėje net 46,3 % studijų buvo naudotas MAK M75. Atlikta meta-analizė parodė, kad pacientai, kurių augliuose nustatyta didelė CA IX raiška, turi didesnę riziką ligos progresavimui, metastazių atsiradimui ar auglio lokaliai atsinaujinimui nepriklausomai nuo vėžio tipo ar lokalizacijos (van Kuijk et al., 2016).



**19 pav.** IHC ir dviepitopės IFA schemas. IHC audinio mėginio pjūvis imobilizuotas ant stiklėlio yra inkubuojamas su pirminiais MAK specifiskai sąveikaujančiais su antigenu. Antriniai antikūnai atpažįstantys MAK pastoviąją sritį yra pažymėti fermentu, pavyzdžiui, krienų peroksidaze (HRP, angl. *horseradish peroxidase*). Fermentinės reakcijos metu pridėjus substrato, pavyzdžiui, 3,3-o-diaminobenzidino tetrahydrochlorido (angl. *3,3-o-diaminobenzidine tetrahydrochloride*), antigeno lokalizacijos vietose susidaro spalvotos nuosėdos, kurias galima stebėti mikroskopu. Dviepitopė IFA atliekama plokštelėse, kurių šulinėlių dugne imobilizuojami MAK, kurie gali sąveikauti su mėginyje esančiu antigenu-taikiniu. Po praplovimo pridodamas detekcinis MAK su prijungtu HRP fermentu ir, pridėjus fermento substrato bei chromogeninio junginio, pavyzdžiui, TMB, yra stebima spalvinė reakcija. Imobilizuotas ir detekcinis antikūnai jungiasi prie skirtingų antigeno epitopų (Matulis, 2019; Sedlakova et al., 2014)

Daug dėmesio sulaukė ir CA IX ektodomenas, kuris nuskeliamas nuo ląstelių paviršiaus metaloproteazėmis ir gali būti nustatytas įvairiuose organizmo skysčiuose, pavyzdžiui, kraujyje ar šlapime, naudojant dviepitopę



IFA (19 pav.). Pirmą kartą ektodomenas nustatytas 2003 metais, panaudojus MAk M75 ir naujai sukurtą MAk V-10. Šie antikūnai jungiasi prie skirtingų baltymo vietų: MAk M75 atpažįsta epitopą PG domene, o V-10 – sąveikauja su kataliziniu domenu, todėl jie gali sugauti tirpią CA IX, cirkuliuojančią įvairiuose kūno skysčiuose (Závada et al., 2003). Kaip standartas, IFA naudojamas išgrynintas rekombinantinis CA IX baltymas, kuris leidžia kiekybiškai įvertinti CA IX lygį tiriamuosiuose mėginiuose (Zhou et al., 2010).

Kol kas patvirtinti, kokią nors tirpios CA IX formos diagnostinę vertę, yra sunku, kadangi atlikti tyrimai nėra vienareikšmiai. Didesnis tirpios formos CA IX kiekis buvo nustatytas inkstų šviesiųjų ląstelių karcinoma sergančių pacientų kraujyje (~126,1 pg/mL), lyginant su kitų tipų inkstų vėžiu (ne šviesiųjų ląstelių inkstų karcinoma (~2,9 pg/mL), gerybinis inkstų auglys (~1,7 pg/mL)), o tai galėtų palengvinti vėžio diferencijavimą. Tačiau šio tyrimo metu IFA gauti rezultatai nekoreliavo su tų pačių pacientų audinių dažymu IHC metodu (Zhou et al., 2010). Manoma, kad tirpios formos nustatymas kraujo mėginiuose gali būti patikimesnis prognozuojant blogiausią bendrą išgyvenamumą pacientams, kuriems nustatyta ankstyvos stadijos ne šviesiųjų ląstelių inkstų karcinoma (İlie et al., 2010).

Buvo tirtos ir kitų organų navikų bei CA IX kiekio kraujyje sąajos. Kiaušidžių vėžio atveju nebuvo nustatyta statistiškai patikimų pokyčių, tiriant tirpios CA IX kiekį kraujyje prieš pradinę terapiją ir po jos ar chemoterapijos metu (Woelber et al., 2010). Kitame tyrime ištyrus 140 pacienčių, sergančių krūties vėžiu, kraujo mėginius, surinktus prieš operaciją, nebuvo nustatyta reikšmingų skirtumų, lyginant su sveikų moterų grupe (n = 48). Koreliacijos nebuvo ir lyginant tirpios CA IX kiekį su klinikiniais ar histologiniais parametrais, įskaitant amžių, vėžio stadiją, histologinį tipą, klasifikaciją ir hormonų receptorių būklę (Schütze et al., 2013). Prospektyviame tyrime buvo vertinami 48 pacientai, kuriems buvo diagnozuotos lokaliai išplitusios galvos ir kaklo plokštelių ląstelių karcinomos, gydomi radioterapija arba chemoterapija. Tirpios CA IX formos koncentracija pacientų kraujyje neturėjo reikšmingo ryšio, prognozuojant radioterapijos efektyvumą. Tačiau aukšta CA IX koncentracija kraujyje buvo statistiškai patikimai susijusi su trumpesniu bendru išgyvenamumu (Rosenberg, 2016). Matant tokius rezultatus, dar reikia atlikti daug tyrimų, norint patvirtinti tirpios CA IX tinkamumą diagnozuojant vėžį ar prognozuojant gydymo efektyvumą ir pacientų išgyvenamumą (van Kuijk et al., 2016; Singh et al., 2018b).

Kitaip nei CA IX, CA XII pirmieji tyrimai rėmėsi PAK naudojimu daugiausiai IHC ir imunoblotingo metodais. Pirmieji aprašyti PAK buvo gauti

1998 metais prieš rekombinantinį CA XII baltymą (Türeci et al., 1998). Vėliau šie PAK buvo plačiai pritaikyti, tiriant CA XII paplitimą tiek normaliuose, tiek vėžiniuose žmogaus audiniuose, pavyzdžiui, normaliaame endometriumo epitelyje (Karhumaa et al., 2000). Naudojant PAK buvo pademonstruota CA XII lokalizacija inkstuose, kur, manoma, šis fermentas yra svarbus normaliai inkstų fiziologijai ir dalyvauja reguliuojant vandens homeostazę. CA XII buvo aptikta ir inkstų vėžiniame audinyje bei yra siejama su kancerogeneze (Parkkila et al., 2000a).

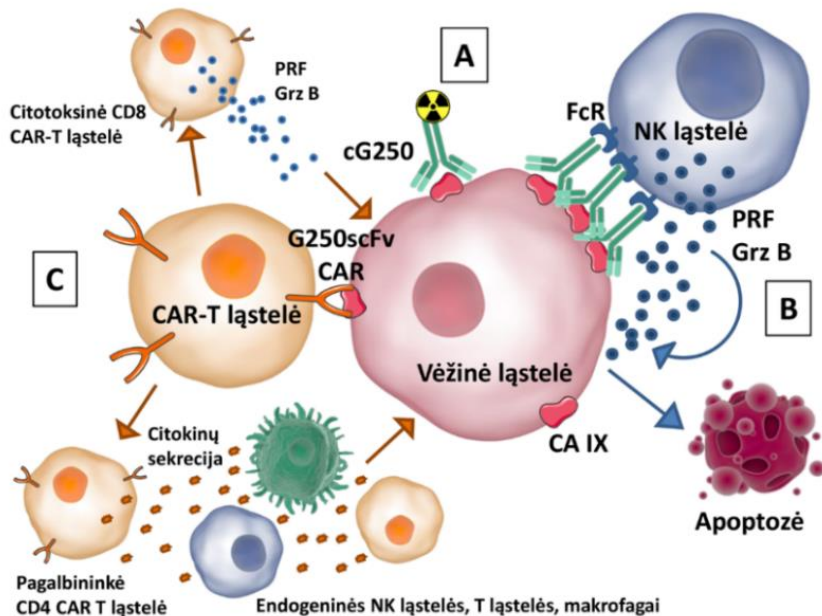
Vėliau atsirado komerciniai PAK ir MAk, kurie buvo panaudoti tiriant CA XII raišką ir jos sąsajas su vėžiniais procesais, įvairiais klinikiniais veiksniais, siekiant įvertinti CA XII tinkamumą onkologinių ligų diagnostikai, prognostikai, pacientų išgyvenamumui vertinti. Net 70 % ištirtų burnos plokščiųjų ląstelių karcinomos biopsijos mėginių (n = 264) buvo nustatyta CA XII raiška ir ji buvo statistiškai patikimai susijusi su labiau pažengusia vėžio stadija, naviko dydžiu ir pooperacinio atsinaujinimo tikimybe. CA XII raiška koreliavo su prastesnėmis pacientų išgyvenamumo prognozėmis, todėl tai būtų tinkamas žymuo prognozuojant burnos plokščiųjų ląstelių karcinomos progresavimą (Chien et al., 2012). CA XII, kaip biožymens, perspektyvos buvo ištirtos smegenų navikų atveju, kadangi agresyvios formos smegenų vėžio diagnostika ir prognostika yra labai sudėtinga. CA XII padidėjusi raiška nustatyta 11 % (n = 39) mėginių, o jos pasiskirstymas auglių viduje buvo labiausiai homogeniškas, lyginant su kitų izoformų CA. Šio tyrimo metu nebuvo statistiškai patvirtinta CA XII prognostinė vertė, bet CA XII raiška koreliavo su meduloblastoma sergančių pacientų išgyvenamumu (Nordfors et al., 2010).

### 1.3.6. Karboanhidrazės IX ir XII – vėžinės terapijos taikiniai

CA laikomos tinkamais taikinais terapijai, esant įvairiems sutrikimams, pavyzdžiui, sergant glaukoma, osteoporoze neurologiniais sutrikimais ar vėžiu (Supuran and Scozzafava, 2002). Pastaruoju metu būtent vėžio terapija, nukreipta prieš CA IX ir CA XII izoformas, sulaukė itin daug dėmesio. Buvo sukurta daugybė cheminių mažamolekulinių slopiklių, kurie specifiškai jungtųsi su CA IX/CA XII, slopintų jų fermentinį aktyvumą ir turėtų poveikį vėžinėms ląstelėms, tačiau tik neseniai vienas iš jų (SLC-0111) buvo įtrauktas į klinikinius tyrimus (Supuran, 2017).

Pirmieji klinikiniai tyrimai su MAk prieš CA IX prasidėjo daugiau kaip prieš 20 metų. Daugiausia buvo tiriami inkstų vėžiu sergantys pacientai, naudojant MAk G250 ir RAK cG250. Pirmasis I/II fazių radioimunoterapijos tyrimas žlugo, kadangi pacientų organizme jau po pirmos dozės susidarė

HAMA prieš pelės MAk G250 ir nebuvo pastebėta jokie teigiamo rezultato (Divgi et al., 1998). Vėlesniuose klinikiniuose bandymuose buvo naudojamas cG250 (Girentuximab) ir jo konjugatai su radioizotopais (20 pav., A dalis). Apibendrinant atliktus tyrimus su cG250-radioizotopų konjugatais ( $^{131}\text{I}$ -cG250,  $^{177}\text{Lu}$ -cG250), du pacientai buvo iš dalies išgydyti, keliems liga buvo stabilizuota, tačiau daugumai liga progresavo ir nebuvo pasiekta visiškos remisijos. Taip pat radiacija sukėlė nemažai pavojingų pašalinių reiškinių (Brouwers et al., 2005; Divgi et al., 2004; Muselaers et al., 2016; Steffens et al., 1999b; Stillebroer et al., 2012).



**20 pav.** CA IX-teigiamos vėžinės ląstelės naikinimo mechanizmai naudojant G250 RAK. A – Radioizotopai, konjuguoti su cG250 gali pažeisti vėžinės ląstelės DNR, ko pasėkoje ji žūsta. B – cG250 aktyvina imuninės sistemos komponentus, pavyzdžiui, NK ląsteles. Perforinai (PRF) ir granzimai (Grz B) sekretuojami NK ląstelių sukelia vėžinės ląstelės apoptozę. C – Iš paciento išskirtos T ląstelės gali būti aktyvintos *ex vivo* ir modifikuojamos sintetinti chimerinį receptorių, kurio pagrindas –scFv, sukurtas pagal MAk G250. Tokios ląstelės suleidžiamos atgal pacientui, kur nukeliauja iki CA IX sintetinančio naviko. Viengrandžio scFv sąveika su CA IX aktyvina CAR-T ląstelę ir ji tiesiogiai žudo vėžines ląsteles (CD8), arba dėl citokinių sekrecijos (CD4) pritraukia ir aktyvina kitas endogenines paciento imunines ląsteles (NK ląsteles, T ląsteles, makrofagus), kurias naikina naviką (Matulis, 2019).

Chimerinio cG250 monoterapija ar kombinuota terapija su citokiniais davė daugiau žadančių rezultatų. Chimerinis cG250 aktyvina imuninės sistemos komponentus ir inicijuoja vėžinių ląstelių žudymą per ADCC mechanizmą (20

pav.). Prie vėžinės ląstelės, kuri savo paviršiuje sintetina CA IX, prisijungia cG250, o jį atpažįsta NK ląstelės, turinčios Fc receptorius, ir, sekretuodamos perforinus ir granzimus, sukelia vėžinės ląstelės žūtį (Oosterwijk-Wakka et al., 2013). Terapijos metu papildomai suleidžiami citokinai (interleukinas-2, interferonas- $\alpha$ 2b) gali sustiprinti imuninės sistemos poveikį vėžinėms ląstelėms, bet tuo pačiu gali atsirasti daugiau pašalinių reiškinių (Bleumer et al., 2006).

Chimerinio cG250 monoterapija nesukėlė rimtų pašalinių reiškinių ir buvo gerai toleruojama, lyginant su radioimunoterapija. I/II stadijos klinikiniuose tyrimuose pavyko pasiekti du pilnos remisijos atvejus, vieną dalinę remisiją ir nemažai daliai pacientų liga buvo stabilizuota (Bleumer et al., 2004; Davis et al., 2007). Buvo atliktas ir III lygio dvigubai aklas klinikinis tyrimas su 864 pacientais, sergančiais aukštos rizikos inkstų vėžiu, kurio metu buvo naudota cG250 monoterapija. Nors statistiškai reikšmingo skirtumo tarp placebo ir vaisto grupių nebuvo nustatyta, tačiau pacientams, kurių CA IX raiška navike buvo didesnė, pailgėjo gyvenimo be ligos periodas (Belldegrun et al., 2013; Chamie et al., 2017).

Dar naujesnė terapijos forma, kurioje pritaikyti MAk G250 prieš CA IX, yra CAR-T ląstelių technologija (20 pav.). Šios technologijos principas yra genų inžinerijos metodais modifikuoti paciento T ląsteles, kad jos specifiskai atpažintų norimą naviko antigeną, šiuo atveju CA IX, ir tuomet tokį naviką sunaikintų. Tokioms modifikuotoms T ląstelėms nebereikalinga kostaumuliacija, kad virstų efektorinėmis – jų aktyvacijai nebereikia antigeną pateikiančių ląstelių ir T ląstelių receptoriaus sąveikos su MHC-peptido molekule. Chimerinis receptorių sukurtas taip, kad viename gale turi scFv G250, kuris atpažįsta CA IX, o kitame gale yra ląstelės aktyvacijai reikalingos molekulės – CD3 $\zeta$  grandinė arba CD28. Ši terapija jau buvo išmėginta klinikiniuose tyrimuose, tačiau laukto efekto gauti nepavyko. Buvo susidurta su ryškiais šalutiniais reiškiniais, todėl šiuo metu toliau tiriama ir bandoma sukurti naujos kartos CAR-T ląsteles (Lamers et al., 2006; Suarez et al., 2016).

CA XII kaip terapinis taikynys tyrinėta mažiau, kadangi jos raiška yra nustatyta ir normaliam audinyje, todėl labiau tikėtini pašaliniai reiškiniai terapijos metu. Tyrimai rodo, kad šio fermento slopinimas būtų naudingas kai kurių navikų atveju. Pavyzdžiui, tiriant žmogaus auglių ksenograftus pelių organizme pastebėta, kad, nutildžius abi su vėžiu siejamas izoformas CA IX ir CA XII, naviko tūris sumažėjo 85 %, o nutildžius tik CA IX – tūris sumažėjo 40 % (Chiche et al., 2009; Parks et al., 2011). CA XII slopintojai yra efektyvūs chemiam gydymui atsparių vėžinių ląstelių sensibilizatoriai. Manoma, kad slopinantį poveikį turintys junginiai ar antikūnai gali būti įtraukti į

kombinuotos terapijos protokolus, kai gydomi navikai, atsparūs daugeliui vaistų (Kopecka et al., 2016).

CA XII terapija yra mažiau pažengusi dar ir todėl, kad pirmasis MAK prieš CA XII aprašytas tik 2011 metais. LOU žiurkes imunizuojant su plaučių vėžio ląstelėmis (A549), tyrėjams pavyko gauti MAK 6A10, kurio specifiškumas CA XII buvo patvirtintas TC metodu. Tuo metu tai buvo vienintelis MAK, kuris slopino CA XII fermentinį aktyvumą. Terapinis MAK 6A10 potencialas pastebėtas naudojant trijų dimensijų kultūrų auginimo technologiją (sferoidus) (Battke et al., 2011). Vėliau, suleidus MAK 6A10 pelei su žmogaus vėžio ksenograftu, buvo stebimas reikšmingas naviko augimo sulėtėjimas (Gondi et al., 2013). Kitame tyrime parodyta, kad MAK 6A10 kartu su doksorubicinu reikšmingai sumažino metastazes plaučiuose, naudojant pelių ortotopinį krūties vėžio ksenografto modelį (Neubeck et al., 2018).

Naujausiame tyrime buvo tiriami glioblastomos auglių ksenograftai pelėse. Glioblastomos yra agresyvūs smegenų navikai, kurie po chirurginio pašalinimo yra linkę atsinaujinti. Tyrėjai mėgino intrakavitarinės radioimunoterapijos technologiją, kurios metu terapinis agentas būtų tiesiogiai suleidžiamas į rezekcijos ertmę. Kadangi gliomos pasižymi aukšta CA XII raiška, buvo pasirinktas su CA XII specifiškai sąveikaujantis MAK 6A10 ir pagal jį CHO ląstelėse buvo sukurtas rekombinantinis antigeną surišantis Fab fragmentas. Tyrėjų tikslas buvo gauti mažesnės molekulinės masės baltymą, kuris lengviau difunduotų į gilesnius audinio sluoksnius, kur gali būti migravusių vėžinių ląstelių ir kurias sunkiau pasiektų pilno ilgio Ig molekulė. Fab fragmentas buvo konjuguotas su radioizotopu  $^{177}\text{Lu}$ . Tyrėjams pavyko parodyti, kad  $^{177}\text{Lu}$ -Fab6A10 konjugatas buvo stabilus ir kaupėsi naviko audinyje, todėl tokia terapijos forma galėtų būti perspektyvi gydant smegenų auglius (Fiedler et al., 2018).

Aprašyti tyrimai parodo, kad CA IX ir CA XII yra svarbūs naviko vystymuisi, todėl terapija, nukreipta prieš šiuos fermentus, gali būti perspektyvi. Šiuo metu kuriami ir tiriami įvairūs terapiniai reagentai, tarp kurių MAK ir jų dariniai RAK, kurie specifiškai jungiasi su CA IX ir CA XII izoformomis. RAK turi itin plačias pritaikymo galimybes – nuo vaistų nešiklių iki imuninės sistemos mediatorių. Išsprendus tokias problemas, kaip pašaliniai reiškiniai, RAK prieš CA IX ir CA XII galėtų pagerinti vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumą, palengvintų chirurginį naviko pašalinimą ar sumažintų ligos atsinaujinimo tikimybę. Todėl naujų MAK ir RAK, kurie sąveikautų su CA IX ir CA XII, poreikis auga, o tyrimų, susijusių su šia tema, sparčiai daugėja.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

Jeigu nenurodyta kitaip, reagentai buvo įsigyti iš Carl Roth (Vokietija) arba Merck (Sigma-Aldrich, Millipore) Group (Vokietija, JAV) gamintojų.

Čia gali būti nepaminėta dalis darbe naudotų reagentų, kurie buvo įtraukti į publikacijas disertacijos tema (Dekaminaviciute et al., 2014b, 2014a; Stravinskiene et al., 2019).

#### 2.1.1. Tirpalai ir terpės

##### 2.1.1.1. Darbai su žinduolių ląstelėmis

200 mM L-glutamino tirpalas.

50 mg/mL gentamicino tirpalas.

Ląstelių lizės tirpalas: 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 %  $C_{24}H_{39}NaO_4$ , 0,1 % natrio dodecilsulfato (SDS), 50 mM Tris-HCl, proteazių slopiklis „Pierce Protease Inhibitor Tablets“ (Thermo Fisher Scientific) – 1 tabletė tirpinama 10 mL tirpalo.

Šaldymo terpė: fetalinis veršiuko serumas (FBS, angl. *fetal bovine serum*) su 10 % dimetilsulfoksido.

Terpė be serumo: *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė (DMEM), 2 mM L-glutamino, 300 µg/mL gentamicino.

Ląstelių linijoms tinkama augimo terpė: DMEM, 2 mM L-glutamino, 200 µg/mL gentamicino, 10 % FBS inaktyvintas karščiui.

Hibridomų augimo terpė: DMEM, 2 mM L-glutamino, 200 µg/mL gentamicino, 15 % FBS.

CHO ląstelių augimo terpė: HamF12 (angl. *Ham's F-12 Nutrient Mix*) (Thermo Fisher Scientific) sumaišoma su DMEM santykiu 1:1, 2 mM L-glutamino, 200 µg/mL gentamicino, 10 % FBS.

HAT terpė: Hibridomų augimo terpė su HAT priedu (1 mM hipoksantino, 0,4 µM aminopterino, 16 µM timidino).

##### 2.1.1.2. Darbai su bakterijomis

100 mg/mL ampicilinas (AppliChem, JAV).

100 mg/mL kanamicinas.

100 mg/mL zeocinas (InvivoGen).

Bakterijų transformacijos NaCl tirpalas: 5mM Tris-HCl (pH 7,4–8,0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl.

Bakterijų transformacijos CaCl<sub>2</sub> tirpalas: 5 mM Tris-HCl (pH 7,4–8,0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM CaCl<sub>2</sub>.

Baltymų sintezės indukcijai: 100 mM izopropil-β-D-tiogalaktopiranozido (IPTG) tirpalas.

1 M Tris-HCl tirpalas.

0,5 M etilendiamintetraacto rūgšties (EDTA) tirpalas.

10 % surfaktanto *Triton X-100* tirpalas.

100 mM fenilmetilsulfonil fluorido (PMSF) tirpalas.

2 M ditionitretolio (DTT) tirpalas.

Bakterijų ardymo buferinis tirpalas, pH 7,0: 0,1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0,1 % *Triton X-100*; 1 mM PMSF; 20 mM DTT.

*E. coli* augimo Luria-Bertani (LB) terpė.

*E. coli* agarizuota augimo terpė LB.

### 2.1.1.3. Darbui su antikūnais

10 % FBS tirpalas.

10 % surfaktanto *Tween-20* tirpalas.

Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS): 137 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4.

3,9 M sotus amonio sulfato tirpalas.

IFA imobilizacijos buferinis tirpalas: 0,05 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,5.

IFA blokavimo tirpalas: PBS su 2 % jaučio serumo albumino (BSA, angl. *bovine serum albumin*) (PAA Laboratories GmbH, Austrija) arba 1 x „*Roti-Block*“.

PBST: PBS su 0,1 % *Tween-20*.

3,6 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tirpalas.

30 % vandenilio peroksidas.

Chlornaftolio tirpalas: 10 mL PBS sumaišyta su 2 mL chlornaftolio metanolyje (1 tabletė 4-chlor-1-naftolio tirpinama 10 mL metanolio) ir pridėta vandenilio peroksido iki 0,1 % koncentracijos.

MAk gryninimo užnešimo/praplovimo buferinis tirpalas: 1,5 M glicino, 3 M NaCl, pH 8,9.

MAk eliucijos buferinis tirpalas: 100 mM glicino, pH 3,0.

4 mg/mL NaBH<sub>4</sub> tirpalas.

Karbonatinis tirpalas antikūnų žymėjimui su HRP: 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

#### 2.1.1.4. Baltymų elektroforezė ir pernešimas ant membranos

Akrilamido-bisakrilamido tirpalas: 30 % akrilamido, 0,8 % N,N'-metilenbisakrilamido.

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8.

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8.

10 % SDS tirpalas.

10 % amonio peroksosulfato (APS) tirpalas.

4 % koncentruojantis gelis: 4 % akrilamido-bisakrilamido tirpalo, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 25 µL 0,1 % SDS, 0,05 % APS, N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamino (TEMED) skiesto santykiu 1:1000. Pridedama dejonizuoto vandens iki reikiamo tūrio.

12 % skiriamasis gelis: 12 % akrilamido-bisakrilamido, 0,4 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, TEMED skiesto santykiu 1:2000. Pridedama dejonizuoto vandens iki reikiamo tūrio.

Baltymų elektroforezės buferinis tirpalas: 25 mM Tris-HCl, 0,2 M glicino, 3,5 mM SDS.

Baltymų pernešimo buferinis tirpalas: 0,01 M Tris-HCl, 57 mM glicino, 10 % metanolio.

#### 2.1.2. Antriniai antikūnai

Ožkos antikūnai prieš pelės IgG, konjuguoti su fluoresceino izotiocianatu (FITC, angl. *Fluorescein isothiocyanate*) (BD Biosciences, JAV); triušio antikūnai prieš pelės IgG, konjuguoti su FITC (Life Technologies, JAV); ožkos antikūnai prieš pelės IgG, konjuguoti su HRP (Bio-Rad, JAV); ožkos antikūnai prieš pelės IgG, konjuguoti su Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific); ožkos antikūnai prieš žmogaus IgG, konjuguoti su HRP (Thermo Fisher Scientific); triušio PAK prieš žmogaus IgG, konjuguoti su HRP (Dako).

#### 2.1.3. Rinkiniai

RNR gryninimo rinkinys „GeneJet RNA Purification Kit“; kDNR sintezės rinkiniai: „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR“ ir „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“; DNR gryninimo iš agarozės rinkinys „GeneJET Gel Extraction Kit“; PGR produkto klonavimo į plazmidę rinkiniai: „InsTAclone PCR Cloning Kit“ ir „CloneJET PCR Cloning Kit“; DNR fragmentų klonavimo į vektorių rinkinys „Rapid DNA ligation Kit“; plazmidinės DNR gryninimo iš bakterijų rinkiniai: „GeneJet Plasmid Miniprep Kit“ ir „GeneJET Plasmid Maxiprep Kit“; transkripcijos in



*vitro* rinkinys „*Transcript AID™ T7 High Yield Transcription Kit*“ (Thermo Fisher Scientific).

Pelės MAk klasės ir poklasio nustatymo rinkinys „*Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit*“ (BD Biosciences, JAV).

IHC rinkinys „*Power Vision+ Poly-HRP Immunohistochemistry kit*“ (ImmunoVision Technologies, JAV).

#### 2.1.4. Restrikcijos endonukleazės

Visos restrikcijos endonukleazės (RE) įsigytos iš Thermo Fisher Scientific ir naudotos pagal gamintojo rekomendacijas: BamHI; EcoRV; NcoI; NdeI; NheI; Sall; SapI (LglI); XbaI.

#### 2.1.5. Klinikiniai mėginiai

Formaline fiksuoti ir parafinizuoti gaubtinės žarnos karcinomos ir adenomos, normalios gaubtinės žarnos, normalaus ir vėžinio inkstų audinių mėginiai buvo surinkti Oulu universitetinėje ligoninėje (*Oulu University Hospital*) (Kivela et al., 2005) ir gauti iš prof. Seppo Parkkila (Tampėrės universitetas).

Žmogaus krūties, plaučių ir inkstų navikiniai ir perinavikiniai mėginiai prospektyviai surinkti iš 106 pacientų, gydytų Vilniaus universiteto Onkologijos institute, vykdant projektą LIG-09/2012. Iš visų pacientų gautas informuoto asmens sutikimas prieš pradėdant tyrimą. Šiam tyrimui atlikti buvo gautas Lietuvos Bioetikos komiteto leidimas (2013-02-12, Nr. 158200-13-564-180). Mėginiai buvo fiksuoti 10 % formaline ir parafinizuoti. Iš jų pagamintos mėginių mikrogardelės, kuriose buvo nuo 30 iki 60 mėginių; mėginio skersmuo – 1 mm. Mėginio storis – 2 µm.

Vykdant projektą SEN-04/2015 buvo surinkti 37 moterų, kurioms nustatyti įvairaus laipsnio intraepiteliniai pakitimai, gimdos kaklelio biopsijos mėginiai. Mėginiai buvo fiksuoti 10 % formaline ir parafinizuoti. Taip pat buvo surinkti 47 sveikų moterų ir 48 moterų su nustatytais įvairaus laipsnio gimdos kaklelio intraepiteliniais pakitimais kraujo mėginiai. Kraujo mėginiai buvo renkami į vakuuminius mėgintuvėlius. Gautas mėginys centrifuguojamas 10 min 1000 × g greičiu. Kraujo plazma nusiurbama dirbant steriliomis sąlygomis ir supilama į naują mėgintuvėlį, kuris centrifuguojamas 15 min 2000 × g greičiu. Supernatantas surenkamas ir išpilstomas lygiomis dalimis į tris 1,5 mL mėgintuvėlius. Mėginiai laikomi -70 °C temperatūroje. Iš visų pacientų gautas informuoto asmens sutikimas. Mėginių rinkimui ir tyrimams buvo gautas Lietuvos Bioetikos komiteto leidimas Nr. L-16-02/1.

## 2.1.6. Izotipinės kontrolės

Kaip izotipinė kontrolė TC, IF ar IHC eksperimentuose buvo panaudoti kito specifiškumo anksčiau Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje (VU GMC BTI ILBS) sukurti IgG1, IgG2a arba IgG2b poklasių MAK prieš kiaulių parvovirusą (KPV, angl. *porcine parvovirus*) (Tamošiūnas et al., 2014).

## 2.1.7. Antigenai

Pelių imunizavimui ir hibridomų atrankai IFA metodu naudoti rekombinantiniai antigenai CA IX<sup>-PG</sup>, CA IX<sup>+PG</sup>, CA12<sup>HEK</sup> ir CA12<sup>DE3</sup> aprašyti rezultatų skyriuje (Dekaminaviciute et al., 2014b, 2014a; Dudutienė et al., 2014; Jogaitė et al., 2012; Linkuvienė et al., 2016; Stravinskiene et al., 2019).

MAK kryžminis specifiškumas tikrintas naudojant rekombinantines CA I, II, IV, VB, VI, VII, XII, XIII ir XIV (Dekaminaviciute et al., 2014b; Dudutienė et al., 2014; Stravinskiene et al., 2019).

Rekombinantiniai baltymai buvo susintetinti ir išgryninti ir gauti iš VU GMC BTI Biotermodynamikos ir vaistų tyrimų skyriuje (BVTS).

## 2.1.8. Eksperimentiniai gyvūnai

Eksperimentams buvo naudojamos linijinės BALB/c pelių patelės arba patinėliai, kurios buvo veisiamos ir auginamos VMTI Inovatyvios medicinos centro Imunologijos institute (Vilnius) arba VU GMC Biochemijos instituto Biologinių modelių skyriaus vivariume (Vilnius). Pelės buvo sveikos, neužkrėstos virusinėmis ar bakterinėmis infekcijomis. Eksperimentus su laboratoriniais gyvūnais atliko VU GMC BTI ILBS darbuotojai (dr. I. Kučinskaitė-Kodžė, I. Dalgėdienė, R. Lasickienė, A. Vaitiekaitė, A. Imbrasaitė), turintys VU Gamtos mokslų fakulteto išduodą pažymėjimą, suteikiantį teisę darbui su laboratoriniais gyvūnais Lietuvos Respublikoje.

## 2.1.9. Ląstelių linijos

Hibridomų kūrimui naudota pelės mielomos Sp2/0 ląstelių linija, kuri naudota suliejimui su pelės blužnies ląstelėmis. Sp2/0 ląstelės negamina imunoglobulinų, o dėl timidinkinazės ir HGFET genų mutacijų neauga selektyvioje HAT terpėje. Ląstelės auginamos 9 % FBS turinčioje DMEM terpėje, papildytoje 2 mM L-glutamino ir 200 µg/mL gentamicino, 75 cm<sup>2</sup> flakonuose.

Ląstelių linijos (3 lentelė) buvo panaudotos įvairiuose darbo etapuose CA IX ir CA XII tyrimams (MAK specifiškumo ir AT-kPGR sistemų

optimizavimui bei tikrinimui). Ląstelės buvo auginamos ląstelių linijoms tinkamoje augimo terpėje 75 cm<sup>2</sup> flakonuose.

CHO ląstelės panaudotos RAK scFv-Fc raiškiai. Ląstelės buvo auginamos CHO ląstelių augimo terpėje plokštelėse arba 75 cm<sup>2</sup> flakonuose.

Hibridomos buvo kultivuojamos hibridomų augimo terpėje, 12, 24 arba 96 šulinėlių plokštelėse bei 25 ar 75 cm<sup>2</sup> paviršiaus ploto plastikiniuose induose.

**3 lentelė.** Ląstelių linijos, tyrimų metodai.

Ląstelių linijos	Kilmė	CA IX	CA XII
A549	Plaučių karcinoma	TC, IP, IFA, AT-kPGR	TC, IF, AT-kPGR
U-87	Glioblastoma	TC, IP, IFA, AT-kPGR	TC, AT-kPGR
A498	Inkstų karcinoma	TC, IP, IFA	TC, AT-kPGR
HeLa	Gimdos kaklelio vėžys	TC, IP, IF, IFA	TC
A431	Odos plokščialąstelinė karcinoma	TC, IP	TC, AT-kPGR
Jurkat	Ūmi T ląstelių leukemija	TC, IP, IFA, AT-kPGR	TC, AT-kPGR
MDA-MB-231	Krūties adenokarcinoma	IF, AT-kPGR	TC, AT-kPGR
CaSki	Gimdos kaklelio plokščialąstelinė karcinoma	TC, IP, IFA	TC
COLO	Gaubtinės žarnos karcinoma		TC, AT-kPGR
MCF-7	Krūties karcinoma	TC, IP, IFA	
Huh 7	Kepenų karcinoma	AT-kPGR	TC, AT-kPGR
HEK-293	Inkstų embrioninės ląstelės	TC	
CHO	Kininio žiurkėno kiaušidžių ląstelės		TC
K-562	Lėtinė mielogeninė leukemija		TC, AT-kPGR
HUT	Limfoma ( <i>Sezary</i> sindromas)	AT-kPGR	TC, AT-kPGR
H9	Limfoma		TC, AT-kPGR
CEM	Ūminė limfogeninė leukemija	AT-kPGR	TC, AT-kPGR
HCT	Gaubtinės žarnos karcinoma	AT-kPGR	TC, AT-kPGR

Visos ląstelės buvo kultivuojamos inkubatoriuje, atmosferoje esant 5 % CO<sub>2</sub>, 98 % drėgnumui ir 37 °C temperatūrai (normoksijos sąlygomis). Dalis ląstelių taip pat buvo auginamos hipoksijos inkubatoriuje (hipoksijos sąlygomis) esant 37 °C temperatūrai, 1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 94 % N<sub>2</sub>. Eksperimentams buvo naudotos ląstelės, suformavusios 70–90 % monosluoksnių. Ląstelės buvo deponuotos VU GMC BTI ILBS ląstelių banke. Jeigu nepaminėta kitaip, gyvos ląstelės buvo nusodinamos centrifuguojant 5 min, esant 200 × g.

## 2.1.10. Bakterijų kamienai

*E. coli* DH10B kamienas buvo naudojamas kuriant *CA12*, *CA9*, *ACTB*, *TBP* ir *GAPDH* RNR standartus, taip pat kuriant CA XII persiklojančius fragmentus, nustatant MAk 14D6 VL ir VH sekas, konstruojant RAK scFv ir scFv-Fc.

*E. coli Tuner* kamienas buvo panaudotas CA XII persiklojančių fragmentų ir scFv sintezei.

Bakterijos buvo auginamos ant agarizuota LB terpės arba skystoje LB augimo terpėje 37 °C temperatūroje. Pagal eksperimento sąlygas buvo naudojami atitinkami antibiotikai.

## 2.1.11. Pradmenys

Oligonukleotidiniai pradmenys ir zondai buvo susintetinti *Metabion International AG* (Vokietija).

### 2.1.11.1. Pradmenys, skirti AT-kPGR sistemoms

*CA12*, *CA9*, *ACTB*, *TBP* ir *GAPDH* genų fragmentų pagausinimui ir kPGR produkto nustatymui skirtų pradmenų ir zondu sekos pateikiamos 4 lentelėje.

**4 lentelė.** Pradmenų ir zondu sekos.

Genas	Pradmuo/ zondas	Pradmens/zondo seka (5'→3')
<i>CA12</i>	Tiesioginis	<u>AATAAATCATAAGCCATTCAGTGAAGCTGAACC</u>
	Atvirkštinis	<u>AATAAATCATAAATGGACAATGTGCAGCTCGG</u>
	Zondas	JOE-ACATCCAGGGCCTCCAGTCT-BHQ1
<i>CA9</i>	Tiesioginis	TTTCCCTGCCGAGATCCACG
	Atvirkštinis	CTGAGCCTTCCTCAGCGATT
	Zondas	6-FAM-AGGCCTGGCCGTGTTGGCC-BHQ1
<i>ACTB</i>	Tiesioginis	TGACCCAGGACTCTCTTC
	Atvirkštinis	CACTCCAAGGCCGTTTA CA
	Zondas	Cy5-TAACACTGGCTCGTGTGACAAGGC-BHQ2
<i>TBP</i>	Tiesioginis	<u>AATAAATCATAATAATCCCAAGCGGTTTGCTG</u>
	Atvirkštinis	<u>AATAAATCATAACTGTTCTTCACTCTTGGCTCCT</u>
	Zondas	6-FAM-CACGAACCACGGCACTGATT-BHQ1
<i>GAPDH</i>	Tiesioginis	<u>AATAAATCATAAAGCCTCAAGATCATCAGCAATG</u>
	Atvirkštinis	<u>AATAAATCATAAATGGACTGTGGTCATGATCCTT</u>
	Zondas	JOE-CCAACCTGCTTAGCACCCCTGGCC-BHQ1

PGR signalą sustiprinanti FLAP seka pabraukta (Afonina et al., 2007). Fluorescencijos signalo slopikliai BHQ-1 arba BHQ-2 (angl. *Black Hole Quencher*); reporteriniai dažai: Cy5 (angl. *Cyanine-5*), JOE (angl. *dichlorodimethoxyfluorescein*) ir 6-FAM (angl. *6-carboxyfluorescein*).

### 2.1.11.2. Pradmenys, skirti CA XII persiklojančių fragmentų pagausinimui

Pradmenys CA XII fragmentų pagausinimui buvo sukurti su RE hidrolizės sritimis, kurios skirtos fragmento įterpimui į pET16b raiškos vektorių (5 lentelė). Pradmenys, skirti 1–4 fragmentų pagausinimui, turėjo RE NdeI hidrolizės sritį, o 5–8 fragmentų – NdeI tiesioginiame ir BamHI atvirkštiniame pradmenyje.

**5 lentelė.** Pradmenys, naudoti CA XII fragmentų kūrimui.

<b>Pradmens pavadinimas</b>	<b>Pradmens seka</b>
CAXII_1frag_F	5'- ATACATATGTTACCCCAAGTGCAGGTG
CAXII_1frag_R	5'- ATGCATATGGTGAACGGTTCCAAGTG
CAXII_2frag_F	5'- ATTCATATGTTAGAATGCTTCCTGGCCCTTGTG
CAXII_2frag_R	5'- TTTCATATGTATGACGCCAGCCTCACG
CAXII_3frag_F	5'- GCCCATATGTTAGGAGAAGGAGGTGTAT
CAXII_3frag_R	5'- GACCATATGCATGTAAGTACAAAGGCCA
CAXII_4frag_F	5'- TTTCATATGTTAGGAGAAGGAGGTGTAT
CAXII_4frag_R	5'- ATTCATATGCCCTCGGACATGCACA
CAXII_5frag_F	5'- AGTCATATGTTTGGTCTGATGGGGAGAA
CAXII_5frag_R	5'- AGGATCCTTAGCGGTAATATTCAGCGGTCC
CAXII_6frag_F	5'- GGACATATGTGGTCCAAGAAGTACCCGTC
CAXII_6frag_R	5'- AGGATCCTTACTCTTCAATGTTGAATCCCG
CAXII_7frag_F	5'- ACATATGTGTGGGGCCTGCTGC
CAXII_7frag_R	5'- AGGATCCTTAGGGGTTGCAAGGGGGT
CAXII_8frag_F	5'- ATTCATATGGACCTGCACAGTGACATCCT
CAXII_8frag_R	5'- TTGGATCCTTAGTAGCGGTAATATTCAGCGG

Pabraukta seka – atitinkamos RE hidrolizės sritis.

### 2.1.11.3. Pradmenys, komplementarūs vektoriams

Pradmenys (6 lentelė) naudoti fragmentų klonavimo į vektorių įvertinimui PGR metodu ir įklonuotų fragmentų sekoskaitai.

**6 lentelė.** Klonavimo vektoriams komplementarūs pradmenys.

<b>Pradmens pavadinimas</b>	<b>Pradmens seka</b>
pJET1.2_F	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2_R	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
M13/pUC_F	5'-GTAAAACGACGGCCAGT
M13/pUC_R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC

### 2.1.11.4. Pradmenys, skirti MAk VL ir VH sekų pagausinimui

Pradmenys buvo parinkti VU GMC BTI ILBS (dr. M. Plečkaitytė), remiantis literatūros duomenimis (Krebber et al., 1997; Orlandi et al., 1989; Wang et al., 2000) (7 lentelė).

**7 lentelė.** Pradmenys, naudoti VL ir VH fragmentų sekų nustatymui.

<b>Pradmuo</b>	<b>Pradmens seka</b>
<b>VL nustatymui naudotų pradmenų sekos</b>	
Kc	5'-TTAGGATACAGTTGGTGCAGCATC
Mk	5'-CATATGGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA
VK2FOR	5'-GTTATTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
VK1BACK	5'-GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCA
LB6	5'-CATATGATTMAGATRAMCCAGTC
LB10	5'-CATATGATTGWGCTSACCCAATC
LB11	5'-CATATGATTSTRATGACCCARTC
LB12	5'-CATATGRTTKTGATGACCCARAC
LB16	5'-CATATGATTGTGATGACACAACC
LB17	5'-CATATGATTTTGCTGACTCAGTC
<b>VH nustatymui naudotos pradmenų sekos</b>	
IgG1	5'-TTAATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTGGC
MH1	5'-CATATGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC
VH1FOR	5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTGGCCCCAG
VHIBACK	5'-AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG

2.1.11.5. Pradmenys, skirti VH ir VL fragmentų sujungimui ir klonavimui į vektorius

Pradmenys sukurti pagal nustatytas MAk 14D6 VL ir VH sekas. Buvo įterpiamos RE hidrolizės sekos ir polipeptidinę jungtį koduojantys nukleotidai (8 lentelė). Viengrandį scFv VL-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VH koduojanti DNR seka įklonuota į pET28a(+) raiškos vektorių ties NheI ir SalI RE hidrolizės sritimis, o į pFUSE-hIgG1-Fc2 vektorių – ties EcoRV ir NcoI, tokiu būdu siekiant gauti RAk scFv-Fc.

**8 lentelė.** Pradmenys, naudoti VL ir VH fragmentų sekų nustatymui.

<b>Pradmuo</b>	<b>Pradmens seka</b>
<b>VL ir VH sujungimui per jungtuką, scFv klonavimas į pET28a(+) vektorių</b>	
NheI-VL-F	5'-AGCTAGCGATATTGTGATGACACAGACTACA
BamHI-VL-R	5'-TGGATCCACCGCCTCCCCGTTTGATCTCCAATTGGTCCC
BamHI-VH-F	5'-AGGATCCGGCGGTGGCGGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGG TGGCGGCGGCTCTCAAGTACAGCTGGAGCAGTCT
SalI-VH-R	5'-TGTCGACTTACGAGGAGACGGTGACGGAGGTTCC
<b>scFv klonavimas į pFUSE-hIgG1-Fc2 vektorių</b>	
EcoRV-scFv-F	5'-AGATATCAGATATTGTGATGACACAGACT
NcoI-scFv-R	5'-ACCATGGTCGAGGAGACGGTGACGGAGGTTCC

Pabraukta seka – RE hidrolizės sritys.

## 2.1.12. Vektoriai

Vektoriai pJET1.2/blunt ir pTZ57R/T, skirti klonavimui ir DNR sekoskaitai, turi atsparumo ampicilinui geną (Thermo Fisher Scientific).

Vektoriai, skirti baltymų sintezei *E. coli* bakterijose – pET16b (atsparumo ampicilinui genas) ir pET28a(+) (atsparumo kanamicinui genas), buvo gauti iš VU GMC BTI Eukariotų genų inžinerijos skyriaus ir dr. M. Plečkaitytės.

Vektorius pFUSE-IgG1-Fc2 yra skirtas baltymų sintezei žinduolių ląstelėse. Vektoriuje koduojamos sekrecijos signalo ir žmogaus Fc fragmento sekos. Turi atsparumo zeocinui geną (InvivoGen). Vektorius gautas iš dr. M. Plečkaitytės.

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Metodai, skirti darbui su žinduolių ląstelių kultūromis

#### 2.2.1.1. Ląstelių skaičiavimas ir gyvybingumas

Ląstelės skaičiuojamos naudojant *Bürker* skaičiavimo kamerą (skaičiuojamas 1 mažas kvadratis (0,25 × 0,25 mm) iš 16, kurie sudaro centrinį didelį kvadratą (1 × 1 mm)). Norint atskirti gyvas ir negyvas ląsteles mėginys skiedžiamas tripano mėlio (Thermo Fisher Scientific) dažu santykiu 1:1 ir iš karto analizuojamas šviesiniu mikroskopu. Ląstelių gyvybingumas parodo, kiek procentų gyvų ląstelių yra mėginyje.

Ląstelių kiekis skaičiuojamas pagal formulę (1).

$$X = A \times D \times V \times 10^4 \quad (1)$$

čia:

*X* – ląstelių kiekis (iš viso);

*A* – suskaičiuotų ląstelių skaičius skaičiavimo kameros mažame langelyje;

*D* – ląstelių praskiedimas, kartais;

*V* – terpės tūris, kuriame suspenduotos ląstelės, mL.

#### 2.2.1.2. Suspensinių ląstelių persėjimas

Ląstelės švelniai suspenduojamos augimo inde ir gali būti persėjamos į naują indą su šviežia augimo terpe santykiu 1:2–1:8. Jei reikia, ląstelės skaičiuojamos ar sukonzentruojamos centrifuguojant. Sėjant ląstelių tankis turi būti apie (1–2)·10<sup>5</sup> ląst./mL, ląstelės persėjamos, kai tankis pasiekia (1–3)·10<sup>6</sup> ląst./mL. Šviežios terpės tūris priklauso nuo indo tipo ir dydžio.

#### 2.2.1.3. Adhezinių ląstelių persėjimas

Augimo terpė nupilama, ląstelės praplaunamos 1–5 mL terpės be serumo. Ant ląstelių užpilama 2–5 mL 1 x tripsino tirpalo ir inkubuojama inkubatoriuje

3–5 min. Kai ląstelės atkimba, suspensija išsiurbiamą į sterilų mėgintuvėlį ir praskiedžiama su šviežia augimo terpe su serumu santykiu 1:1–1:2. Ląstelės centrifuguojamos, supernatantas nusiurbiamas. Taip paruoštos ląstelės skaičiuojamos, persėjamos arba šaldomos. Sėjant ląstelės skiedžiamos taip, kad jų tankis būtų 240–330 ląst./mm<sup>2</sup>. Šviežios terpės tūris priklauso nuo indo tipo ir dydžio.

#### 2.2.1.4. Ląstelių šaldymas ir saugojimas

Ląstelių suspensija, surinkta iš augimo indų, centrifuguojama, supernatantas nupilamas, ląstelės suskaičiuojamos ir suspenduojamos 4 °C temperatūros šaldymo terpėje. Ląstelių suspensija išpilstoma į plastikines šaldymo ampules po 600–800 μL ((2–5)·10<sup>6</sup> ląst./mL) ir dedamos į specialias dėžutes, kurios parą laikomos -70 °C temperatūros šaldiklyje. Po paros ampulės perkeliama į skystą azotą ilgesniam saugojimui.

#### 2.2.1.5. Ląstelių atšildymas

Užšaldytos ląstelės atplaunamos nuo šaldymo terpės jas suspenduojant terpėje be serumo (10 mL). Ląstelės nucentrifuguojamos, suskaičiuojamos, jei reikia įvertinamas jų gyvybingumas ir pasėjamos į reikiamo dydžio plastikinius indus ar plokšteles.

#### 2.2.1.6. Ląstelių lizatų paruošimas

Ląstelės auginamos 75 cm<sup>2</sup> auginimo induose. Ląstelėms pasiekus 70–95 % konfluentiškumą jos praplaunamos 10 mL PBS ir, užpylus 800 μL ląstelių lizės buferinio tirpalo, švelniai papurtant 30 min inkubuojamos 4 °C temperatūroje. Ląstelių lizatas surenkamas į mėgintuvėlį ir centrifuguojamas 15 min 20 000 × g greičiu. Supernatantas saugomas -20 °C temperatūroje arba naudojamas IB ar imunoprecipitacijos (IP) eksperimentuose.

### 2.2.2. Hibridomų kūrimas

Detali hibridomų kūrimo metodika pateikiama publikacijose, kuriose aprašytas MAk prieš CA IX rekombinantinius variantus CA IX<sup>-PG</sup> ir CA IX<sup>+PG</sup> (Stravinskiene et al., 2019), prieš CA XII rekombinantinį bakterijose susintetintą antigeną CA12<sup>DE3</sup> (Dekaminaviciute et al., 2014b) ir sintetinį peptidą CA12-KLH (Dekaminaviciute et al., 2014a) sukūrimas. MAk prieš



CA XII, susintetintą žinduolių ląstelėse CA12<sup>HEK</sup>, buvo sukurti analogiškai, kaip prieš CA12<sup>DE3</sup> antigeną. Žemiau pateikiama kai kurios protokolo detalės.

#### 2.2.2.1. Antikūnų titro nustatymas

Prieš pirmą imunizaciją ir po kiekvienos imunizacijos praėjus 2 savaitėms surenkamas pelių kraujas iš uodegos venos antikūnų titrui nustatyti (8  $\mu$ L kraujo skiedžiama 25 kartus su PBS). Titras – kraujo mėginio, ar kito antikūnus turinčios skysčio, skiedimas, kuriame dar sąveikauja antigenas ir antikūnas. Netiesioginės IFA metodu antikūnų titras suskaičiuojamas iš optinio tankio (OT) priklausomybės nuo mėginio praskiedimo kreivės. 96 šulinėlių plokštelėse yra imobilizuojami antigenai, kurie buvo naudoti imunizacijoms (sintetinio peptido atveju CA12-KLH papildomai naudotas CA12<sup>DE3</sup> antigenas).

#### 2.2.2.2. Kraujo serumo surinkimas (PAk gavimas)

Kraujas iš imunizuotų pelių krūtinės ląstos ertmės surenkamas automatinio dozatoriumi jį praplaunant 2 mL PBS tirpalo. Kraujo ląstelės atskiriamos centrifuguojant. Supernatantas nusiurbiamas sumaišomas su sočiu amonio sulfato tirpalu santykiu 1:1. Laikoma 4 °C temperatūroje per naktį. Susidariusios nuosėdos (išsodinti imunoglobulinai) centrifuguojami 5 min 9000  $\times$  g greičiu. Supernatantas nupilamas, o nuosėdos ištirpinamos PBS ir vėl įpilama sotaus amonio sulfato tirpalo santykiu 1:1. Taip išsodinti PAk saugomi 4 °C temperatūroje.

#### 2.2.2.3. Ląstelių suliejimas

Sp2/0 mielomos ir blužnies ląstelės sumaišomos santykiu 1:4–1:6 ir nusodinamos centrifuguojant. Ant ląstelių lėtai per minutę lašinama 0,7–1,2 mL (priklausomai nuo ląstelių kiekio) ląstelių suliejimo agento PEG-4000. Per kitas 3 minutes ląstelės inkubuojamos ir lėtai pridedama 10 mL terpės be serumo.

#### 2.2.2.4. Makrofagų surinkimas

Makrofagai surenkami iš pelės pilvo ertmės, pradūrus peritoniumą ir į pelės pilvo ertmę suleidus 5–10 mL terpės be serumo, suspenduojant ir išsiurbiant. Paimti makrofagai nucentrifuguojami, suskaičiuojami ir išsėjami

į plokšteles hibridomų augimo terpėje. Sėjant ląstelių tankis priklauso nuo indo tipo ir dydžio ir turėtų būti 1000–4000 ląst./cm<sup>2</sup>.

#### 2.2.2.5. Hibridomų užsėjimas

Ląstelių mišinys išsėjamas į 96 šulinėlių plokšteles, skirtas ląstelių kultūrų auginimui, naudojama selekcinė terpė su HAT priedu. Sėjant ląstelių tankis turi būti apie  $0,15 \cdot 10^6$  ląst./šul., makrofagų 1000 ląst./šul. Po hibridizacijos 2–3 kartus kas 5–7 dienas keičiama ląstelių augimo terpė šviežia hibridomų augimo terpe, kuri papildyta hipoksantino ir timidino priedu.

#### 2.2.2.6. Hibridomų atranka

Gyvybingų ląstelių klonai tikrinami netiesioginės IFA metodu, naudojant imobilizuotą antigeną, kuriuo buvo imunizuotos pelės. Atrankamos tos ląstelės, kurių augimo terpę tikrinant nustatomas didžiausias OT. Kaip teigiama kontrolė naudojami PAK paimti hibridizacijos dieną ir skiesti su PBST santykiu 1:200, o neigiama kontrolė – terpė iš šulinėlio, kuriame nėra ląstelių.

### 2.2.3. Metodai, skirti rekombinantinių baltymų tyrimams ir monokloninių antikūnų apibūdinimui

#### 2.2.3.1. Netiesioginė IFA

Antigenas imobilizuojamas 96 šul. plokštelėje imobilizacijos buferiniame tirpale (50 μL/šul., 5 μg/mL galutinė koncentracija). Inkubuojama per naktį 4 °C temperatūroje. Kitą dieną tirpalas iškratomas ir pripilama 200 μL/šul. blokavimo tirpalo. Inkubuojama 1 valandą (h) kambario temperatūroje (KT) ant purtyklės (300 rpm). Blokavimo tirpalas iškratomas, šulinėliai 2 kartus praplaunami distiliuotu vandeniu ir iškratomi. Pripilama 50–200 μL/šul. PBST skiesto mėginio. Skirtingų mėginių skiedimai pateikiami 9 lentelėje. Mėginiai gali būti skiedžiami serijinių skiedimų metodu, naudojant skiedimo faktorių 2 arba 3, priklausomai nuo eksperimento sąlygų. Plokštelė su tiriamuoju mėginiu inkubuojama 1 h KT. Po inkubacijos plokštelė iškratoma ir šulinėliai praplaunami 4 kartus su PBST. Priklausomai nuo mėginio tipo naudojami antriniai antikūnai, žymėti HRP (9 lentelė), kurie skiedžiami PBST, inkubuojama 1 h KT. Po inkubacijos plokštelė iškratoma ir praplaunama 5 kartus PBST ir 2 kartus su distiliuotu vandeniu. Pridedama

HRP substrato su TMB chromogenu (Clinical Science Products Inc., JAV) (50 µL/šul.) ir inkubuojama 5–10 min, kol atsiranda intensyvi mėlyna spalva. Reakcija stabdoma, pridedant 25 µL/šul. 3,6 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tirpalo. OT matuojamas spektrofotometru „Multiskan GO“ (Thermo Fisher Scientific), esant 450 nm bangos ilgiui, o rezultatai analizuojami, naudojant „SkanIt“ (Thermo Fisher Scientific) kompiuterinę programą.

**9 lentelė.** Mėginių ir antrinių antikūnų skiedimas netiesioginės IFA ir IB metuose

<b>Antriniai antikūnai</b>	<b>Metodas (skiedimas)</b>	<b>Mėginys</b>	<b>Mėginio skiedimas</b>
<b>Ožkos prieš pelės IgG</b> „Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate“	IFA (5000 x); IB (4000 x)	Pelės kraujas	100–300 x
		Hibridomų	Neskiesta,
		augimo terpė	iki 50 x
		PAK	200 x
		Valyti MAK	1–10 µg/mL
<b>Triušio prieš žmogaus IgG</b> „Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP“	IFA (2000 x); IB (1000 x)	RAk scFv-Fc	5–15 µg/mL
<b>Prieš His žymę</b> „6x-His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8), HRP“	IFA (3000 x); IB (1000 x)	Bakterijų	–
		lizatai	
		RAk scFv	5–15 µg/mL
<b>Prieš GST</b> „GST Tag Polyclonal Antibody HRP“	IB (2000 x)	Bakterijų	–
		lizatai	

Tariamoji MAK giminingumo konstanta ( $K_d$ ) buvo nustatyta netiesioginės IFA metodu. IFA metodu nustatyta  $K_d$  yra lygi tokiai MAK koncentracijai, kuriai esant OT<sub>450</sub> sumažėja perpus.  $K_d$  matavimams buvo naudojami rekombinantiniai antigenai (5 µg/mL), imobilizuoti 96 šulinėlių plokštelėje. Antikūnai buvo skiedžiami serijinių skiedimų būdu (titruojami) nuo 5 µg/mL ( $3,3 \cdot 10^{-8}$  mol/L) iki galutinės koncentracijos  $2,8 \cdot 10^{-5}$  µg/mL ( $1,9 \cdot 10^{-13}$  mol/L). Buvo gautas OT<sub>450</sub> priklausomybės nuo MAK koncentracijos grafikas. Eksperimentas buvo kartojamas tris kartus.

#### 2.2.3.2. Tiesioginė IFA

Antigeno imobilizavimo, blokavimo ir praplovimo žingsniai atlikti analogiškai, kaip aprašyta 2.2.3.1 skyriuje. Plokštelę praplovus po blokavimo į šulinėlius įpilama MAK, konjuguotų su HRP, tirpalai (50–200 µL/šul.), skiesti santykiu 1:100 ir atliekamas serijinis skiedimas (faktorius 2 arba 3). Inkubuojama 1 h KT ant purtyklės, po to praplaunama 5 kartus PBST ir 2 kartus su distiliuotu vandeniu. Plokštelės ryškinamos analogiškai, kaip parašyta 2.2.3.1 skyriuje.

### 2.2.3.3. MAk H7 epitopo nustatymas netiesioginės IFA metodu.

Padidintos sorbcijos (MaxiSorb) 96 šul. plokštelėje imobilizuojamas avidinas (5 µg/mL vandenyje, 50 µL/šul.) (Thermo Fisher Scientific). laikoma per naktį 37 °C termostate, kad išgaruotų skystis. Kitą dieną plokštelė blokuojama blokavimo tirpalu (200 µL/šul.) 1 h, KT. Plokštelė praplaunama PBST ir įpilamas peptidas, prijungtas prie biotino (10 µg/mL PBST, 50 µL/šul.) (Pepscan, Olandija, 10 lentelė), inkubuojama 1 h KT ant purtyklės. Praplaunama ir įpilama neskiesta hibridomų augimo terpė, inkubuojama 1 h KT ant purtyklės. Inkubacija su antriniais antikūnais ir plokštelės ryškinimas aprašytas 2.2.3.1 skyriuje.

**10 lentelė.** Peptidų, skirtų MAk H7 epitopo nustatymui, ar. sekos.

<b>Peptido nr.</b>	<b>Peptido seka</b>
#1	Biotinas-SGSGLVVHPQRLPRMQED-OH
#2	Biotinas-SGSGPQRLPRMQEDSPLGG-OH
#3	Biotinas-SGSGRMQEDSPLGGSSGE-OH
#4	Biotinas-SGSGSPLGGSSGEDDPLG-OH
#5	Biotinas-SGSGSSGEDDPLGEED-OH
#6	Biotinas-SGSGDDPLGEEDLPSEEDS-OH
#7	Biotinas-SGSGSEEDLPSEEDSPREED-OH
#8	Biotinas-SGSGSEEDSPREEDPPGEE-OH
#9	Biotinas-SGSGPREEDPPGEEDLPGE-OH
#10	Biotinas-SGSGPPGEEDLPGEEDLPG-OH
#11	Biotinas-SGSGDLPGEEDLPGEED-OH
#12	Biotinas-SGSGEDLPGEEDLPEVKPK-OH
#13	Biotinas-SGSGSEEDLPEVKPKSEEEG-OH
#14	Biotinas-SGSGEVKPKSEEEGSLKLED-OH
#15	Biotinas-SGSGSEEEGSLKLEDLPTV-OH.
#16	Biotinas-SGSGLGSSGEDD-OH
#17	Biotinas-SGSGSSGEDDPL-OH
#18	Biotinas-SGSGSSGEDDPLGE-OH
#19	Biotinas-SGSGGEDDPLGEED-OH
#20	Biotinas-SGSGDDPLGEEDLP-OH
#21	Biotinas-SGSGPLGEEDLPSE-OH
#22	Biotinas-SGSGEEDLPSEED-OH
#23	Biotinas-SGSGEDLPSEEDSP-OH
#24	Biotinas-SGSGLPSEEDSPRE-OH
#25	Biotinas-SGSGDDPLGEED-OH
#26	Biotinas-SGSGDDPLGEE-OH
#27	Biotinas-SGSGDDPLGE-OH
#28	Biotinas-SGSGGEDDPLG-OH

### 2.2.3.4. Konkurencinė IFA

Metodas, skirtas nustatyti MAk, konkuruojančius dėl prisijungimo prie antigeno. Antigeno imobilizavimo, blokavimo ir praplovimo žingsniai atliekami analogiškai, kaip aprašyta 2.2.3.1 skyriuje. Po blokavimo ir

praplovimo plokštelės inkubuojamos su neskiesta hibridomų augimo terpe (50  $\mu\text{L}/\text{šul.}$ ) 1 h KT ant purtyklės, po to pridedama MAk, konjuguoti su HRP (50  $\mu\text{L}/\text{šul.}$ , skiedimas parenkamas pagal tiesioginės IFA rezultatus), ir inkubuojama 1 h KT ant purtyklės. Plokštelė praplaunama 5 kartus PBST ir 2 kartus dejonizuotu vandeniu. Plokštelės ryškinamos analogiškai kaip parašyta 2.2.3.1 skyriuje.

#### 2.2.3.5. Antikūnų klasių ir poklasių nustatymas

Antikūnų klasėms ir poklasiams nustatyti naudojamas pelės antikūnų klasių ir poklasių nustatymo rinkinys „*Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit*“ (BD Biosciences). Nustatymas atliekamas netiesioginės IFA metodu pagal gamintojo rekomendacijas.

#### 2.2.3.6. Dviepitopė IFA

Metodas skirtas antigeno nustatymui, naudojant MAk, kurie jungiasi skirtingose baltymo vietose. Dviepitopės IFA sistemos, skirtos CA IX nustatymui, optimizavimas pateikiamas rezultatų skyriuje 3.1.5. Detalus protokolas pateiktas publikacijoje (Stravinskiene et al., 2019). IFA sistemos jautrumas buvo nustatytas remiantis anksčiau aprašyta metodika (Armbruster and Pry, 2008).

#### 2.2.3.7. Elektrofrezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis

Baltymų elektrofrezė vykdoma baltymų elektrofrezėi skirtu prietaisu (Biometra) poliakrilamidiniame gelyje, sudarytame iš baltymus koncentruojančio viršutinio gelio ir skiriamą apatinio gelio, baltymų elektrofrezės buferiniame tirpale. Į paruošto poliakrilamidinio gelio takelį įnešama 1  $\mu\text{g}$  išgryninto baltymo arba 30  $\mu\text{g}$  ląstelių lizato, taip pat baltymų molekulinės masės standartas (nuo 10 iki 180 kDa, Thermo Fisher Scientific). Prieš elektrofrezę baltymų arba ląstelių lizato mėginiai sumaišomi su 5 x redukuojančio arba neredukuojančio baltymų denatūravimo/užnešimo buferinio tirpalu (Thermo Fisher Scientific) ir verdami vandens vonelėje 5–10 min. Elektrofrezėi pasibaigus gelis fiksuojamas ir dažomas gelio dažymo tirpale (*Coomassie blue R-250*, Thermo Fisher Scientific) per naktį. Gelis plaunamas vandeniu ir skenuojamas skeneriu.

### 2.2.3.8. Baltymų pernaša ant membranos

Po elektroforezės baltymai pernešami iš gelio ant polivinildifluorido membranos pusiau sausos pernašos aparatu (Biometra). Prieš pernašą skiriamasis gelis ir reikiamo dydžio filtrinio popieriaus lakštai įmerkiami į baltymų pernešimo buferinį tirpalą, o membrana suvilgoma metanoliu ir taip pat merkiama į baltymų pernašos buferinį tirpalą, inkubuojama 10 min. Ant baltymų pernešimo aparato katodinio pado padedamas išmirkytas filtrinio popieriaus lakštas, ant jo membrana, tada gelis ir ant viršaus vėl filtrinis popierius. Prislegiama anodiniu aparato viršumi. Po pernašos membrana blokuojama PBS su 2 % pieno miltelių ir laikoma nuo 1 h KT iki paros 4 °C temperatūroje.

### 2.2.3.9. Imunoblotingas

Visos IB reakcijos vykdomos KT, praplovimams naudojamas PBST tirpalas, skiedimui – PBS su 2 % pieno miltelių ir 0,1 % *Tween-20*. Po blokavimo membrana plaunama ir inkubuojama su mėginiu (9 lentelė) 1 h. Po inkubacijos membrana plaunama 4 kartus ir inkubuojama su praskiestais HRP žymėtais antriniais antikūnais (9 lentelė) 1 h. Po inkubacijos membrana plaunama 6–7 kartus, kelis kartus skalaujama vandeniu ir ryškinama TMB substratu, skirtu IB (Thermo Fisher Scientific) (2–10 min), arba laikoma chlornaftolio tirpale iki 40 min. Reakcija stabdoma vandeniu. Membrana nusausinama ir nuskenuojama.

### 2.2.3.10. Antikūnų gryninimas iš ląstelių augimo terpės

MAK ir RAK gryninami giminingumo chromatografijos metodu, naudojant sefarozę su baltymu A „*rProtein A Sepharose Fast Flow*“ (GE Healthcare, JAV), pagal gamintojo rekomendacijas. Kolonėlė kalibruojama, užpylus 10 kolonėlės tūrių užnešimo/praplovimo buferinio tirpalo. Hibridomų arba CHO augimo terpė prieš pilant ant kolonėlės centrifuguojama 1000 × g greičiu ir filtruojama naudojant 0,2 μm filtrą, siekiant pašalinti ląstelių nuolaužas. Augimo terpė skiedžiama užnešimo/plovimo buferiniu tirpalu santykiu 1:2 ir užnešama ant kolonėlės. Terpei pratekėjus, kolonėlė plaunama 20 kolonėlės tūrių užnešimo/plovimo buferinio tirpalo ir vykdoma eliacija 5–10 kolonėlės tūrių eliacijos buferinio tirpalo. Į surinktus mėginius įpilama po 1/10 tūrio 0,1 M Tris-HCl, viskas išmaišoma ir pamatuojama baltymo koncentracija spektrofotometru „*NanoDrop*“ (Thermo Fisher Scientific). Mėginiai

dializuojami PBS 4 °C temperatūroje per naktį, naudojant specialias dializavimo žarnes arba mėgintuvėlius. Išgryninti MAk arba RAk steriliai filtruojami, pamatuojama jų koncentracija spektrofotometru „Nanodrop“ atsižvelgiant į jų molekulinę masę ir ekstincijos koeficientą. Jie gali būti saugomi 4 °C arba -70 °C temperatūroje, vengiant pakartotinio užšaldymo.

#### 2.2.3.11. MAk konjugavimas su krienų peroksidaze

Konjugavimui naudojami išgryninti MAk, kurie dializės būdu pervedami į natrio karbonatinį tirpalą (pH 9,5). HRP aktyvinama naudojant 0,2 M natrio perodato tirpalą, 20 min inkubuojant KT, maišant tamsoje, po to nudruskinama, naudojant specialią kolonėlę *Sephadex G-25* (GE Healthcare), kuri prieš tai praplauta 1 mM natrio acetatinu tirpalu. Aktyvinta ir nudruskinta HRP sumaišoma su MAk santykiu 1:1 (pagal masę) ir įpilama 1/10 tūrio 0,2 M natrio karbonato buferinio tirpalo, inkubuojama 2 h KT ant purtyklės (mišinio pH turi būti apie 9,5). Po inkubacijos į tirpalą įpilama NaBH<sub>4</sub> iki galutinės koncentracijos 0,2–0,4 mg/mL ir inkubuojama 2 h 4 °C temperatūroje, vėliau mišinys dializuojamas PBS 4 °C temperatūroje per naktį. MAk ir HRP konjugatas saugomas įpylus 50 % glicerolio ir 2 % BSA -20 °C temperatūroje.

#### 2.2.4. Metodai, skirti nustatyti monokloninių antikūnų sąveikai su ląstelių baltymais

##### 2.2.4.1. Tėkmės citometrija

Vienam mėginiui reikia apie  $(0,5-1) \cdot 10^6$  ląstelių, kurios žymimos pirminiais ir antriniais antikūnais. Prieš žymėjimą ląstelės nusodinamos centrifuguojant. Ląstelės gali būti žymimos jas fiksuojant ir permeabilizuojant, kaip aprašyta publikacijoje (Dekaminaviciute et al., 2014b). Jei žymimos gyvos ląstelės, jos praplaunamos PBS ir iš karto inkubuojamos su neskiesta hibridomų augimo terpe (200 µL), kurioje yra MAk (Stravinskiene et al., 2019). Praplovimams ir antrinių antikūnų „*Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488*“ (Thermo Fisher Scientific) skiedimui (iki 10 µg/mL galutinės koncentracijos) naudojamas PBS su 1 % FBS ir 0,1 % NaN<sub>3</sub>. Po inkubacijos ir praplovimo ląstelės fiksuojamos įpilant 250 µL „*BD Cytotfix Fixation Buffer*“ (BD Bioscience, JAV), vėl praplaunamos, suspenduojamos praplovimo tirpale ir analizuojamos *CyFlowRspace*

tėkmės citometru ir *FloMax 2.7* programine įranga (Partec), surenkama ne mažiau kaip 20 000 atvejų. Duomenys analizuojami *FlowJo* analizės programa.

#### 2.2.4.2. Imunofluorescencinė analizė

IF protokolas naudotas CA IX MAK apibūdinimui detaliai aprašytas publikacijoje (Stravinskiene et al., 2019).

MAK prieš CA XII buvo tiriami naudojant adhezinės ląsteles, kurios buvo auginamos ant sterilių dengiamųjų stikliukų, skirtų mikroskopijai. Visi praplovimai buvo atliekami su PBS. Nusiurbus augimo terpę ir praplovus stikliukus su ląstelėmis, ląstelės buvo fiksuojamos „*BD Cytofix*“ (BD Bioscience, JAV) tirpalu. Po 30 min inkubacijos 4 °C temperatūroje stikliukai su ląstelėmis buvo plaunami ir blokuojami blokavimo tirpalu 30 min KT. Po to ant ląstelių buvo užpilama hibridomų augimo terpė. Po 1 h inkubacijos KT ląstelės 3 kartus plaunamos ir inkubuojamos (1 h, KT) su blokavimo tirpalu skiestais antriniais antikūnais turinčiais FITC žymę „*ZyMax™ Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) FITC Conjugate*“ (1:200, Life Technologies, JAV). Praplovus ląsteles, ant jų užlašinamas „*ProLong*“ reagentas su DAPI (Life Technologies), kuris nudažo ląstelių branduolius, tuomet dengiamieji stikliukai priglaudžiami prie objektinio stiklelio. Ląstelių fluorescencija buvo stebima su fluorescenciniu mikroskopu *Olympus* (Japonija), naudojant 60 x didinantį objektyvą ir imersinį aliejų. Duomenų analizavimui naudojama „*ImagePro*“ (Media Cybernetics, JAV) programinė įranga.

#### 2.2.4.3. Imunohistocheminė analizė

Tiriant CA XII MAK kolekciją prieš CA12<sup>DE3</sup> baltymą, darbai buvo atlikti stažuojantis prof. Seppo Parkkila grupėje Tampere universitete, Suomijoje (angl. *Faculty of Medicine and Health Technology, Tampere University*). IHC naudojami 5 μm storio parafinizuotų audinių pjūviai, imobilizuoti ant objektinio stikliuko. Prieš dažant, pjūviai deparafinizuojami, stikliukus mirkant ksilene, propanolyje ir etanolyje (2 kartus po 5 min). Dažymas atliekamas automatizuota IHC preparatų dažymo sistema „*Lab Vision Autostainer 480*“ (LabVision Corporation, JAV), naudojant rinkinį „*Power Vision+ Poly-HRP Immunohistochemistry kit*“, pagal gamintojo rekomendacijas KT. Po dažymo stikliukai analizuojami mikroskopu.

Kita dalis audinių buvo nudažyta Valstybiniame patologijos centre (VPC) naudojant MAK prieš CA12-KLH, CA12<sup>DE3</sup>, CA12<sup>HEK</sup>, CA IX<sup>-PG</sup> ir CA IX<sup>+PG</sup>.



Detalus protokolai pateikiamas publikacijose (Dekaminaviciute et al., 2014a; Stravinskiene et al., 2019).

#### 2.2.4.4. Imunoprecipitacija

IP buvo naudota CA IX tyrimams ląstelių lizatuose. Jos protokolai detaliai aprašyti publikacijose (Stravinskiene et al., 2019). CA IX iš lizatų buvo išsodinama naudojant sefarozę su baltymu A (*rProtein A Sepharose Fast Flow*) ir MAk H7 kompleksą. Teigiama kontrole buvo naudojamas rekombinantinis baltymas CA IX<sup>+PG</sup>. Po inkubacijos su ląstelių lizatu sefarozė ir prie jos prisijungęs baltymų kompleksas centrifuguojami 3000 × g greičiu, nuosėdos suspenduojamos 60 μL PBS ir analizuojamos baltymų elektroforezės ir IB metodais.

### 2.2.5. Molekulinės biologijos ir genų inžinerijos metodai

#### 2.2.5.1. RNR gryninimas iš ląstelių

RNR iš ląstelių buvo gryninama naudojantis „GeneJet RNA Purification Kit“ rinkiniu pagal gamintojo rekomendacijas. Gryninimui naudojama apie 5·10<sup>6</sup> ląstelių. Po išskyrimo pridedama 1 U/μL ribonukleazų slopiklio „RiboLock“ (Thermo Fisher Scientific). RNR saugojama -70 °C temperatūroje. Išgryninta RNR naudojama kDNR sintezei.

#### 2.2.5.2. RNR elektroforezė

Buferinių tirpalų ruošimui naudotas vanduo be nukleazų. Visi prietaisai ir įrankiai praplaunami distiliuotu vandeniu, indų plovikliu, 10 min mirkomi 0,2 M NaOH tirpale ir praplaunami distiliuotu vandeniu.

RNR elektroforezė vykdoma 1 % agarozės gelyje, turinčiame 0,1–0,2 μg/mL etidžio bromido. Agarozė (Thermo Fisher Scientific) užpilama 1 x TAE buferiniu tirpalu (Thermo Fisher Scientific) ir tirpinama virinant. Paruoštas tirpalas ataušinamas iki 50–60 °C temperatūros ir supilamas į paruoštus gelio rėmelius, įstatomos reikiamo dydžio šulinėlius formuojančios šukutės. 100 ng RNR tirpalo sumaišoma su RNR dažu 2 x „RNA Loading Dye“ (Thermo Fisher Scientific) santykiu 1:1 ir 10 min inkubuojama 70 °C, po to 1–2 min šaldoma lede. Analogiškai paruošiamas RNR molekulinės masės standartas „RiboRuler High Range RNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific). Mėginiai suleidžiami į gelio šulinėlius. Gelis analizuojamas UV

transiliuminatoriumi „MiniBis Pro“ (DNR Bio-Imaging Systems Ltd, Izraelis).

#### 2.2.5.3. RNR ir DNR koncentracijos nustatymas

RNR ir DNR koncentracija ir grynumas buvo matuojamas spektrofotometru *NanoDrop* ir atitinkama kompiuterine programa. Kontrolei ir prietaiso inicijavimui naudojamas sterilus vanduo be nukleazių (Thermo Fischer Scientific). Kalibravimui naudojamas tirpalas, kuriame tirpinama DNR arba RNR. Ant kiuvetės užlašinama 3  $\mu\text{L}$  mėginio, matuojamas sugerties intensyvumas esant 260 ir 280 nm bangos ilgiams. Programa pateikia RNR ir DNR koncentraciją ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) bei sugerties intensyvumo santykį esant 260 ir 280 nm bangos ilgiams. Išgrynintos RNR 260/280 santykis yra  $\geq 1,9$ , o DNR  $\geq 1,7$ .

#### 2.2.5.4. Kopijinės DNR sintezė

AT-kPGR analizei kDNR susintetinta naudojant „*Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR*“.

Siekiant nustatyti MAK VL ir VH fragmentų sekas, susintetinta viengrandinė kDNR, naudojant „*RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*“.

kDNR sintezė nuo bendros RNR atliekama pagal gamintojo rekomendacijas, į sintezės mišinį nešamas 0,5–1  $\mu\text{g}$  RNR.

Susintetinta kDNR naudojama PGR arba AT-kPGR mišinyje kaip matrica. Ji saugoma  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje.

#### 2.2.5.5. DNR elektroforezė

DNR elektroforezė vykdoma 1–2 % agarozės gelyje, turinčiame 0,1–0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  etidžio bromido. Agarozės paruošimas aprašytas 2.2.5.2 skyriuje. Į gelio šulinėlius įnešama po 10–20  $\mu\text{L}$  PGR reakcijos produkto ar vektoriaus hidrolizės mišinio, sumaišyto su DNR dažu „*6X Orange Loading Dye Solution*“ arba „*6X Loading Dye*“ (Thermo Fisher Scientific). PGR fragmentų analizei naudojami DNR ilgio standartai – „*O'GeneRuler 50 bp DNA*“, „*GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*“, „*GeneRuler 1kb DNA Ladder Plus*“, „*O'GeneRuler DNA Ladder, Low Range*“ (Thermo Fisher Scientific). Po elektroforezės gelis 10 min plaunamas vandens vonelėje ir analizuojamas UV transiliuminatoriumi „MiniBis Pro“.

### 2.2.5.6. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Pateiktas PGR protokolai buvo naudojami kuriant RNR transkriptus AT-kPGR sistemoms, CA XII fragmentų konstravimui ir konstruojant RAK scFv ir scFv-Fc: pradmenų patikrinimui, RE hidrolizės sekų ir polipeptidinę jungtį koduojančių sekų pridėjimui, klonavimui skirtų PGR produktų pagausinimui, transformuotų bakterijų atrankai.

Reakcijai naudojama 2 µL kDNR mėginio, vektoriaus su įklonuotu fragmentu arba įnešamas nedidelis kiekis transformuotų bakterijų. Reakcijos komponentai ir temperatūrinis režimas pateikiami 11 lentelėje. Reakcija vykdoma „Applied Biosystems” DNR amplifikatoriuje. Mišinio komponentai įsigyti iš Thermo Fisher Scientific.

**11 lentelė.** PGR mišinio komponentai (25 µL reakcijos tūris).

PGR komponentas	Galutinė komponento koncentracija
H <sub>2</sub> O, be nukleazių	Iki 23 µl
10 x buferinis tirpalas „Dream Taq Green buffer“	1 x
2 mM dNTP	0,2 mM
Tiesioginis pradmuo, 10 µM	0,2 µM
Atvirkštinis pradmuo, 10 µM	0,2 µM
DreamTaq polimerazė, 5 v/µl	0,02 v/µl
Temperatūrinis režimas	1. 95 °C – 7 min; 2. 95 °C – 30 s; 3. 50 °C – 30 s; 4. 72 °C – 30 s; 5. 72 °C – 10 min. } 30 ciklų

### 2.2.5.7. DNR gryninimas iš agarozės

DNR gryninimas iš agarozės atliekamas rinkiniu „GeneJET Gel Extraction Kit“ pagal gamintojo rekomendacijas. Išgryninta DNR saugoma -20 °C arba naudojama klonavimo reakcijoje.

### 2.2.5.8. PGR produkto/DNR fragmento klonavimas į vektorius

PGR produktų įterpimas į vektorius buvo atliekamas „InsTAclone PCR Cloning Kit“ rinkiniu, kurio sudėtyje yra vektorius pTZ57R/T, arba „CloneJET PCR Cloning Kit“ rinkiniu, kuriame naudojamas vektorius pJET1.2/blunt, pagal gamintojo rekomendacijas.

RE hidrolizuoti DNR fragmentai įterpti į vektorius naudojant „Rapid DNA ligation Kit“ rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas.

Ligavimo reakcijos mišiniai naudoti kompetentinių *E. coli* ląstelių transformacijai.

#### 2.2.5.9. Transformacija CaCl<sub>2</sub> metodu

Kompetentinių ląstelių paruošimui naudojamos *E. coli* DH10B arba Tuner kamienų bakterijos.

Į 5 mL sterilios LB terpės užsėjama bakterijų kolonija, kuri inkubuojama per naktį 37 °C temperatūroje purtant (220 rpm). Po 16–18 h 50 µL naktinės kultūros perkeliama į naują sterilų mėgintuvėlį su 5 mL LB terpės ir auginama, kol ląstelės pasiekia eksponentinę augimo fazę (2–2,5 h), tada centrifuguojama 10 min, 5000 × *g* greičiu 4 °C temperatūroje. Ląstelės praplaunamos atšaldytu NaCl tirpalu ir vėl centrifuguojamos. Ląstelės užpilamos 2,5 mL šalto CaCl<sub>2</sub> tirpalo, švelniai sumaišoma ir 30 min laikoma lede, po to centrifuguojamos. Supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos likusiame tirpalo laše. Kompetentinės ląstelės visada laikomos lede, transformacija atliekama per artimiausias 24 h.

Transformuojant bakterijas 50 µL kompetentinių *E. coli* ląstelių sumaišoma su 1–3 µL paruošto ligavimo reakcijos mišinio (2.2.5.8 skyrius). Mišinys 30 min laikomas lede, tada 2 min 42 °C temperatūroje termostate ir 1–2 min atšaldomas lede. Po to užpilama 1 mL LB terpės ir inkubuojamas 2 h 37 °C temperatūroje inkubatoriuje. Mišinys centrifuguojamas 2 min, 10 000 × *g* greičiu, supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos likusiame terpės laše ir išsėjama ant agarizuotos LB terpės su antibiotiku (ampicilino, kanamicino arba zeocino galutinė koncentracija 0,1–0,5 mg/mL). Ląstelės laikomos per naktį 37 °C temperatūroje inkubatoriuje ir kitą dieną perkeliama į 4 °C. Užaugusios 3–6 transformuotų ląstelių kolonijos persėjamos į naują lėkštelę ant agarizuotos LB terpės su antibiotiku ir analizuojamos PGR. Ląstelės laikomos per naktį 37 °C temperatūroje. Kitą dieną lėkštelės išimamos ir bakterijos naudojamos vektorių grynimui arba saugomos 4 °C temperatūroje.

#### 2.2.5.10. Plazmidinės DNR grynimasis iš bakterijų

Plazmidinė DNR iš bakterijų gryninama naudojant „GeneJet Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas. Taip paruoštas vektorius tinkamas hidrolizei RE, DNR sekoskaitai ar bakterijų transformacijai.

Jeigu reikia paruošti vektorių, kuris būtų tinkamas žinduolių ląstelių transfekcijai, tuomet naudojamas „GeneJET Plasmid Maxiprep Kit“, kurio metu yra pašalinami endotoksinai ir gaunamas didelės koncentracijos plazmidinės DNR tirpalas. Gryninimas atliekamas pagal gamintojo rekomendacijas.

Išgryninti vektoriai saugomi -20 °C temperatūroje.

#### 2.2.5.11. Vektorių hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

Išgryninti vektoriai hidrolizuojami naudojant įprastas arba greitai veikiančias „FastDigest“ RE (Thermo Fisher Scientific). Kiekviena RE turi optimizuotus buferinius tirpalus ir reakcijos sąlygas, kurios pateikiamos gamintojo. Vykdamas hidrolizę, naudojamas vektoriaus ir RE santykis yra 1:0,5–1:1. Po hidrolizės fermentas inaktyvuojamas pagal gamintojo rekomendacijas. Mišinys analizuojamas DNR elektroforezės metodu, naudojamas kitiems klonavimo darbams arba vektorius išsodinamas iš mišinio (2.2.5.12 skyrius) siekiant jį naudoti RNR transkriptų sintezei (2.2.5.13 skyrius).

Jei po hidrolizės RE į vektorių norima įterpti fragmentą, vektorius yra defosforilinamas, naudojant termiškai stabilią šarminę fosfatazę „FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase“ (Thermo Fisher Scientific), pagal gamintojo rekomendacijas.

Iš vektoriaus RE hidrolizuoti produktai išskirti iš gelio, prieš klonavimą į vektorių yra fosforilinami, naudojant T4 kinazę „T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μL)“ (Thermo Fisher Scientific), pagal gamintojo rekomendacijas.

#### 2.2.5.12. Plazmidinės DNR arba RNR transkripto išsodinimas fenoliu/chloroformu

RE hidrolizuotas ir linearizuotas vektorius arba RNR transkriptas iš reakcijos mišinio išsodinamas įpilant lygų tūrį fenolio ir chloroformo mišinio (pH 7,5–8,0 DNR atveju, pH 4,5–5,0 RNR atveju). Centrifuguojama 5 min 5000 × g greičiu. Viršutinė vandens frakcija nusiurbama, perkeliama į naują mėgintuvėlį ir įpilamas lygus tūris chloroformo. Centrifuguojama 5 min 5000 × g greičiu. Viršutinė vandens frakcija nusiurbama ir perkeliama į naują mėgintuvėlį, įpilama 1/10 tūrio 3 M natrio acetato (pH 5,5) (Thermo Fisher Scientific) ir du tūriai šalto 96 % etanolio. Laikoma per naktį -20 °C temperatūroje. Kitą dieną vektorius nusodinamas centrifuguojant 20 min, 4 °C temperatūroje, 12 000 × g greičiu. Supernatantas nusiurbiamas, o

nuosėdos praplaunamos 70 % etanoliu, kartojamas centrifugavimas. Nupylus supernatantą būtina palaukti, kol išgaruos etanolis ir tuomet DNR/RNR nuosėdos tirpinamos DEPC veiktime vandenyje (Thermo Fisher Scientific), pridedama 1 µL „RiboLock“.

### 2.2.5.13. Transkripcija *in vitro*

Kai linijinis vektorius išsodinamas fenoliu/chloroformu, toliau jis naudojama RNR transkripcijai *in vitro*. Transkripcija atliekama naudojant „*Transcript AID™ T7 High Yield Transcription Kit*“ rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas. Transkripcijai reikia 1 µg vektoriaus.

Po transkripcijos būtina pašalinti vektorius, todėl į reakcijos mišinį pridedama 2 µL deoksiribonukleazės DNazės I (Thermo Fisher Scientific), sumaišoma, inkubuojama 15 min 37 °C temperatūroje. DNazė I inaktyvuojama pridedant 2 µL 0,5 M EDTA (pH 8,0) (Thermo Fisher Scientific), inkubuojama 10 min, 65 °C temperatūroje. Po to RNR transkriptai turi būti dar kartą gryninami, kaip aprašyta 2.2.5.1 skyriuje, arba išsodinami su fenoliu/chloroformu (2.2.5.12 skyriuje).

### 2.2.5.14. Kiekybinė (tikro laiko) PGR

AT-kPGR metodu buvo analizuota RNR, išskirta iš vėžinių ląstelių linijų. Prieš tai buvo susintetinta kDNR. Standartų skiedimas, optimali pradmenų prilydymo temperatūra, galutinės pradmenų ir zondų koncentracijos buvo nustatytos eksperimentiškai ir yra pateiktos rezultatų aptarimo skyriuje. Reakcija vykdoma naudojant *Rotor-Gene 6000* (Corbett Research) amplifikatorių ir atitinkamą programą. Reagentai (12 lentelė) įsigyti iš Thermo Fisher Scientific.

**12 lentelė.** AT-kPGR mišinio komponentai (20 µL reakcijos tūris).

PGR komponentas	Galutinė komponento koncentracija
H <sub>2</sub> O, be nukleazių	Iki 18 µl
kPGR reakcijos mišinys „ <i>2X Maxima Probe qPCR MasterMix</i> “	1 x
Tiesioginis pradmuo, 10 µM	0,3–0,4 µM
Atvirkštinis pradmuo, 10 µM	0,3–0,4 µM
Zondas, 10 µM	0,1–0,2 µM
Temperatūrinis režimas	1. 95 °C – 10 min; 2. 95 °C – 30 s; 3. 55–65 °C – 30 s; 4. 72 °C – 30 s; 5. 72 °C – 10 min.

### 2.2.5.15. RNR transkripto kopijų paskaičiavimas

Norint RNR transkriptus panaudoti kaip AT-kPGR standartus kalibracinei kreivei sudaryti, suskaičiuojamas transkriptų kopijų skaičius 1 µg RNR pagal formulę (2) (Dhanasekaran et al., 2010):

$$RNR \text{ kopijų skaičius} = \frac{1 \mu\text{g} \times 6,02 \times 10^{23} (\text{mol}^{-1})}{RNR \text{ transkripto ilgis (nt)} \times 10^6 \times 333 \text{ Da}} \quad (2)$$

Čia:

$6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  – Avogadro konstanta;

333 Da – vidutinė vieno ribonukleotido molekulinė masė.

### 2.2.6. Rekombinantinių baltymų sintezė ir gryninimas

#### 2.2.6.1. Rekombinantinių baltymų sintezė *E. coli* Tuner kamieno bakterijose

Po visų klonavimo etapų buvo gauti baltymų sintezei skirti vektoriai. Į vektorių pET16b buvo įterptos CA XII fragmentus, kurie buvo skirti epitopų nustatymui, koduojančios DNR sekos. Į vektorių pET28a(+) buvo įterptos 14D6 scFv koduojančios sekos. Vektoriais buvo transformuotos *E. coli* Tuner kamieno bakterijos, skirtos rekombinantinių baltymų sintezei.

Transformuotų bakterijų kolonija auginama 5 mL skystos LB terpės su antibiotiku (galutinė koncentracija 10 µg/mL) 2,5–3 h 37 °C temperatūroje purtant (220 rpm). Baltymo sintezės indukcijai naudojama 0,1 mM IPTG. Indukcija vykdoma 2–2,5 h 37 °C temperatūroje purtant. Prieš indukciją ir po indukcijos paimami 0,5 mL mėginiai. Paimti mėginiai centrifuguojami 3 min 5000 × g greičiu ir ruošiami baltymų elektroforezei – nuosėdos suspenduojamos 40 µL PBS su 2 % SDS, verdama vandens vonelėje 10 min, įpilama 5 x redukuojančio baltymų denatūravimo/užnešimo buferinio tirpalo ir vėl verdama 10 min vandens vonelėje.

Didesnis biomasės kiekis auginamas 1–4 L skystos LB terpės. Iš vakaro yra auginama naktinė kultūra, kuri vėliau skiedžiama 30 kartų. Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje purtant, kol OD (600 nm) bus ~1, tuomet pridama IPTG analogiškai, kaip aprašyta anksčiau. Po 2–2,5 h ląstelės centrifuguojamos ir ardamos baltymų išskyrimui, arba biomasė saugoma -20 °C temperatūroje.

#### 2.2.6.2. Bakterijų ardymas ultragarsiniu dezintegratoriumi

RAK scFv sintetinančios bakterijos ardamos ultragarsiniu dezintegratoriumi (*Bandelin Sonoplus*, Vokietija). Biomasė laikoma lede ir

suspenduojama bakterijų ardymo buferiniame tirpale (1 g biomasės – 10 mL tirpalo). Pagal bakterijų biomasės kiekį pasirenkama optimali ardymo programa, laikas ir antgalis. Mažiams kiekiams naudojamas MS73 ultragarsinio dezintegratoriaus antgalis, programą sudaro pasikartojantys ciklai: 10 s ardymas, 10 s pauzė. Ardoma 5 min esant 35 % amplitudei. Didesnis biomasės kiekis ardomas VS70T antgalis, programą sudaro pasikartojantys ciklai: 60 s ardymas, 60 s pauzė. Ardoma 10–15 min, esant 70 % amplitudei.

#### 2.2.6.3. Intarpinių kūnelių išskyrimas

RAk scFv formuoja intarpinius kūnelius, kurie skiriami iš bakterijų biomasės, jas suardžius ultragarsiniu dezintegratoriumi. Po ardymo ląstelės centrifuguojamos 25 min  $20\,000 \times g$  greičiu,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Nuosėdos užpilamos praplovimo tirpalu (1 M NaCl su 0,1 % *Tween-80*) ir suspenduojamos stikliniu homogenizatoriumi, centrifuguojama. Kartojamas praplovimas ir centrifugavimas, po kurio biomasė plaunama distiliuotu vandeniu ir vėl centrifuguojama. Išskirti intarpiniai kūneliai užšaldomi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje arba naudojami tolesniame baltymų gryninime.

#### 2.2.6.4. Rekombinantinio baltymo struktūros išardymas ir atstatymas

Intarpiniai kūneliai tirpinami atšaldytame 7 M guanidino hidrochlorido (GuHCl), 10 mM Tris-HCl (pH 7,0) buferiniame tirpale (1 g biomasės – 10 mL buferinio tirpalo). Intarpiniai kūneliai homogenizuojami ir lėtai maišomi ant maišyklės per naktį  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, po to centrifuguojami 25 min  $20\,000 \times g$   $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Supernatantas nusiurbiamas ir baltymų koncentracija jame pamatuojama *Bradford* metodu. Supernatantas skiedžiamas 6 M GuHCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,0) buferiniu tirpalu iki 1 mg/mL baltymų galutinės koncentracijos.

Baltymų struktūra atstatoma į gautą mišinį pridėjus 20 mM  $\text{CuSO}_4$  iki galutinės 20  $\mu\text{M}$  koncentracijos. Mėginys inkubuojamas lėtai maišant 2 h KT, reakcija stabdoma įpilant 0,5 M EDTA iki galutinės 10 mM koncentracijos. Baltymų tirpalas centrifuguojamas 25 min  $15\,000 \times g$  greičiu,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Supernatantas supilamas į dializės žarnelę ir dializuojamas laipsniškos dializės metodu, mažinant GuHCl koncentraciją tirpale (250 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,0). Pirmą parą GuHCl koncentracija mažinama nuo 6 M iki 3,5 M, antrą parą – iki 2 M, trečią parą – iki 1M ir pridėdama L-arginino iki 400 mM, ketvirtą parą – iki 0,5 M, L-arginino koncentracija 400



mM. Po dializės baltymai centrifuguojami 25 min  $15\ 000 \times g$  greičiu, 4 °C temperatūroje. Tirpus baltymas lieka supernatante.

#### 2.2.6.5. Baltymo koncentracijos matavimas Bradford metodu

Kalibracinė kreivė sudaroma pagal BSA standarto (2 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific) skiedimų seriją 1, 0,75, 0,5, 0,2, 0,1 ir 0 mg/mL. Į 96 šulinėlių plokštelę įnešama po 5 µL tiriamųjų baltymų ir skiesti standarto tirpalai. Mėginių ir standarto tirpalų skiedimui naudojamas 0,15 M NaCl tirpalas. Įpilama 250 µL *Bradford* reagento (Thermo Fisher Scientific), suspenduojama. Inkubuojama 5 min, OT matuojamas plokštelių spektrofotometru esant 595 nm bangos ilgiui. Nubraižoma kalibracinė kreivė. Mėginiai gali būti skiedžiami 2, 4 ar daugiau kartų. Baltymo koncentracija skaičiuojama iš tiesinės lygties formulės.

#### 2.2.6.6. Baltymų gryninimas metalų chelatinės chromatografijos metodu

Pirmiausia paruošiama baltymų gryninimo kolonėlė, į kurią pilamas sorbentas – sefarozė „*Chelating Sepharose Fast Flow*“ (1–5 mL) (GE Healthcare). Kolonėlė praplaunama 5 kolonėlės tūriais distiliuoto vandens. Į kolonėlę užnešamas 0,2 M NiCl<sub>2</sub> tirpalas (2–4 kolonėlės tūriai) ir vėl praplaunama. Leidžiamas baltymų tirpalas, pratekėjusi frakcija surenkama į mėgintuvėlį. Kolonėlė praplaunama 5 kolonėlės tūriais 25 mM Tris-HCl, 20 mM imidazolo (pH 7,4) buferiniu tirpalu. Eliucija vykdoma laipsniškai didinant imidazolo koncentraciją nuo 50 mM iki 500 mM (25 mM Tris-HCl (pH 7,0)). Surenkamos pratekėjusios frakcijos, matuojama baltymo koncentracija spektrofotometru „*Nanodrop*“ atsižvelgiant į baltymo molekulinę masę ir ekstincijos koeficientą. Frakcijos, turinčios tikslinį baltymą, apjungiamos ir dializuojamos PBS per naktį 4 °C temperatūroje.

#### 2.2.6.7. CHO ląstelių transfekcija

RAK scFv-Fc buvo sintetinami CHO ląstelėse. RAK konstrukcija buvo įterpta į pFUSE-hIgG1-Fc2 vektorių, kuris turi atsparumo zeocinui geną.

Pirmiausia buvo atliekama ląstelių transfekcija. Į 24 šul. plokštelę užsėjama CHO ląstelių kultūra po  $0,65 \cdot 10^5$  ląst./šul. CHO ląstelių augimo terpėje (900 µL/šul.) ir auginama per naktį. Kitą dieną pasiruošiamas DNR mėginys (vienam šulinėliui): į 100 µL CHO ląstelių augimo terpės be serumo įpilama 2 µg vektoriaus ir 4 µL „*TurboFect*“ transfekcijos reagento (Thermo Fisher Scientific), supurtoma ir mišinys inkubuojamas 20 min KT. Nuo

ląstelių nupilama augimo terpė ir užpilama 900 µL terpės be serumo. Po inkubacijos mišinys supilamas į šulinėlius su ląstelėmis. Plokštelė inkubuojama 24 h inkubatoriuje.

Stabili CHO ląstelių linija gaunama, naudojant atranką antibiotiku zeocinu. Naudojama 250 µg/mL galutinė zeocino koncentracija, kuri yra toksiška atsparumo neturinčioms ląstelėms. Ląstelės kultivuojamos 1–2 savaites, keičiant terpę ir persėjant. Ląstelių augimo terpė analizuojama netiesioginės IFA metodu. RAK gryninami pagal 2.2.3.10 protokolą.

## 2.2.7. Bioinformatikos metodai

### 2.2.7.1. Duomenų bazės ir programiniai įrankiai

Žmogaus ir pelės CA IX ir CA XII bei kitų CA izoformų ar. sekos ir informacija gauta iš *UniProt* duomenų bazės (<https://www.uniprot.org/>).

Europos bioinformatikos instituto *EMBL-EBI* duomenų bazės *MUSCLE* įrankiu (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) buvo atliktas ar. sekų palyginimas. Baltymų fragmentų identiškumas nustatytas *EMBOSS Needle* įrankiu ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)), skirtu tarpusavyje palyginti dvi sekas.

Pradmenų kūrimui naudotas „*Primer BLAST*“ įrankis iš *NCBI* duomenų bazės (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), pradmenys analizuoti „*Multiple Primer Analyzer*“ įrankiu, kuris leidžia įvertinti teorinę prilydymo temperatūrą, GC bazių sudėtį, parodo pradmenų dimerizaciją (<https://www.thermofisher.com/>).

Vektorių analizė ir klonavimo strategija parinkta naudojantis programomis *pDRAW32* ir *SnapGene*. Rekombinantinių baltymų teorinė sintezė buvo tikrinama naudojantis internetinės analizės platforma „*ExPaSy*“ „*Translate*“ įrankiu (<https://web.expasy.org/translate/>).

CA XII struktūra vizualizuota pagal baltymų duomenų banko (*The Protein Data Bank*) (<https://www.rcsb.org/>) pateiktus duomenis. Modelių vizualizavimui buvo naudojama *RasMol* (versija 2.7.5.2) programinė įranga.

MAK variabilijų sekų identifikavimas ir analizė buvo atlikta naudojantis *KabatMan* duomenų baze (<http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>) bei *NCBI* duomenų bazės bioinformatikos įrankiu *IgBlast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>).

### 2.2.7.2. Statistiniai metodai

Statistinė analizė buvo atlikta naudojantis *Microsoft Office Professional Plus 2016* operacinės sistemos *Excel* programą ir duomenų apdorojimo, vaizdavimo bei statistinės analizės programą *OriginPro 9.1*.

Mėginių grupės buvo lyginamos naudojant  $\chi^2$ , *Stjudent*, *Kruskal-Wallis* ir *Wilcoxon* testais, atsižvelgiant į duomenų pasiskirstymo normalumą, atliktų pakartojimų skaičių ar mėginių imties dydį. Koreliacija buvo vertinama skaičiuojant *Pearson* arba *Spearman* koreliacijos koeficientus.

Naudotas reikšmingumo lygmuo  $p < 0,05$ .

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Monokloniniai ir rekombinantiniai antikūnai (MAk ir RAK) itin specifiškai jungiasi su antigenais ir yra plačiai taikomi moksliniams tyrimams, diagnostikai ir gydymui. Jų taikiniai gali būti vėžinėms ląstelėms būdingi baltymai. Su vėžiu susijusios karboanhidrazės IX ir XII (CA IX ir CA XII) yra laikomi perspektyviais vėžiniais biožymenimis, kadangi šie fermentai prisideda prie naviko vystymosi, padeda vėžinėms ląstelėms prisitaikyti prie hipoksijos ir išgyventi esant nepalankioms aplinkos sąlygoms. Įvairiais imunocheminiais metodais, naudojant MAk ar polikloninius antikūnus, buvo patvirtintas šių baltymų raiškos padidėjimas inkstų, plaučių, smegenų ir kitų organų navikiniame audinyje lyginant su nepakitusiu audiniu. CA IX ir CA XII raiškos analizė klinikiniuose mėginiuose gali prisidėti prie tikslesnės vėžio diagnostikos ar tinkamesnio gydymo parinkimo pacientams. CA IX ir CA XII yra lokalizuotos ląstelės membranoje, todėl yra prieinamos imunoterapijoms RAK, kurie pasižymi ne tik aukštu specifiškumu antigenui, bet ir mažesniu imunogenišku žmogui. CA IX atpažįstantys RAK jau yra klinikinių tyrimų stadijoje. Buvo tirti RAK-radioizotopų junginiai, ar taikyta RAK monoterapija, nes jie gali aktyvinti imuninės sistemos komponentus kovoti su vėžinėmis ląstelėmis. Su CA XII sąveikaujantys RAK yra ankstyvoje kūrimo stadijoje.

Šio tyrimo metu buvo sukurtos naujos MAk kolekcijos, skirtos CA IX ir CA XII tyrimams įvairiais imunocheminiais metodais biologiniuose mėginiuose. MAk buvo visapusiškai apibūdinti, aprašant jų specifiškumą ir giminingumą antigenui, sąveikos su antigenu vietą ar įtaką fermentiniam aktyvumui. Buvo įvertintas MAk tinkamumas aptikti CA IX ir CA XII tėkmės citometrijos, imunohistochemijos, imunofermentinės analizės, imunoblotingo metodais, kurie leidžia nustatyti tiek denatūruotus, tiek natyvius baltymus ir yra plačiai taikomi eksperimentiniuose ir klinikiniuose tyrimuose. Buvo atrinktas terapinį potencialą turintis MAk prieš CA XII, kuris ne tik sąveikavo su natyviu baltymu gyvų ląstelių paviršiuje, bet ir turėjo fermentinį aktyvumą slopinančių savybių. Šio MAk pagrindu buvo sukurti įvairių formatų RAK ir parodyta jų sąveika su rekombinantiniu CA XII baltymu. Siekiant įvertinti CA IX ir CA XII kaip potencialių vėžinių biožymenų vertę buvo iširta jų raiška iRNR ir baltymo lygmenyje vėžinių ląstelių linijose ir klinikiniuose mėginiuose, panaudojus naujai sukurtas ir optimizuotas atvirkštinės transkripcijos kiekybines PGR sistemas ir išsamiai apibūdintus MAk.

### 3.1. Monokloninių antikūnų prieš karboanhidrazę IX kūrimas, apibūdinimas ir taikymas

MAk prieš CA IX kūrimui hibridomų technologijos metodu buvo panaudoti rekombinantiniai CA IX baltymai. Jų biosintezė buvo atlikta VU GMC BTI BVTS, naudojant HEK-293 raiškos sistemą. Visi pelių imunizacijoms naudoti rekombinantiniai CA IX baltymai išvardinti 13 lentelėje.

**13 lentelė.** CA IX antigenai ir jų aprašymas.

Antigeno pavadinimas ir apibūdinimas	Molekulinė masė	Raiškos sistema
<b>CA IX<sup>-PG</sup></b> CA IX katalizinis domenas (nuo 138 iki 390 ar.) be PG domeno	~30 kDa	FreeStyle Max 293 raiškos sistema (Invitrogen, JAV)
<b>CA IX<sup>+PG</sup></b> CA IX katalizinis domenas (nuo 38 iki 414 ar.) su PG domenu	~54 kDa	

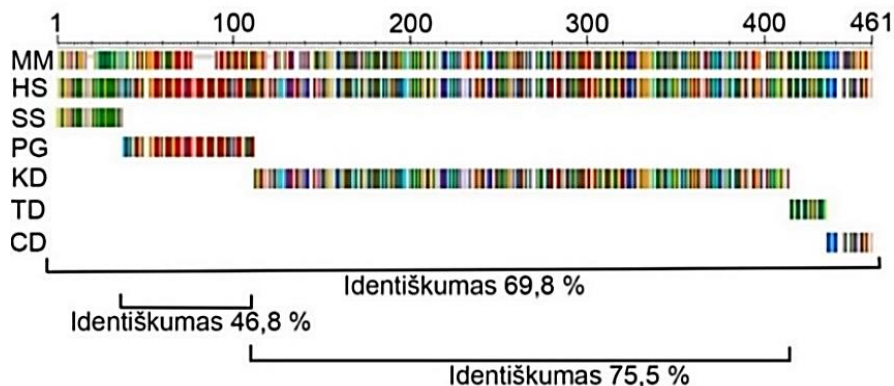
#### 3.1.1. Monokloninių antikūnų prieš karboanhidrazę IX sukūrimas

CA IX yra glikozilintas baltymas, todėl siekiant gauti natyvų baltymą atpažįstančius MAk, rekombinantinių antigenų raiškai buvo pasirinktos HEK-293 ląstelės. Tikėtasi gauti rekombinantinius baltymus, turinčius panašias potransliacines modifikacijas kaip ir žmogaus organizme. Abu antigenai CA IX<sup>-PG</sup> ir CA IX<sup>+PG</sup> atitinka žmogaus CA IX baltymo katalizinio domeno ar. seką, tačiau neturi signalinio peptido, transmembraninio ir citoplazminio domenų. Rekombinantinis CA IX<sup>-PG</sup> buvo susintetintas be PG domeno. Skirtingi antigenų variantai pasirinkti norint gauti kuo įvairesnėmis savybėmis pasižyminčius MAk, kurie sąveikautų su skirtingais CA IX domenais.

Kadangi pelių organizme taip pat sintetinama CA IX, buvo patikrintas žmogaus ir pelės CA IX ar. sekų identiškumas, kuris viso ilgio baltymo atveju siekė apie 70 % (21 pav.). Jau anksčiau buvo pastebėta, kad PG domenas yra labiau imunogeniškas nei kitos baltymo sritys (Zatovicova et al., 2003), kadangi pelės ir žmogaus PG domenų identiškumas yra tik 46,8 %. Todėl didesnė tikimybė, kad MAk susidarys būtent prieš šią sritį. Katalizinių domenų identiškumas yra 75,5 % ir tai apsunkina MAk gavimą.

Po standartinės pelių imunizacijos procedūros rekombinantiniais CA IX antigenais buvo patikrintas specifinių antikūnų titras pelių kraujyje netiesioginės IFA metodu. Abiejų baltymų atveju titras buvo žemas ir siekė 1:600 (CAIX<sup>-PG</sup>) ir 1:1900 (CAIX<sup>+PG</sup>). Nepaisant žemo specifinių antikūnų titro hibridizacijos buvo atliktos, o antikūnus sekretuojančių hibridinių ląstelių

atranka buvo vykdyta robotizuota sistema *ClonePix 2* (Molecular devices, JAV), atsižvelgiant į ląstelių kolonijos dydį, formą ir fluorescencijos intensyvumą.



**21 pav.** Pelės ir žmogaus CA IX pilno ilgio baltymų bei fragmentų ar. sekų palyginimas. MM – pelės CA IX (lot. *Mus musculus*); HS – žmogaus CA IX (lot. *Homo sapiens*), SS – signalinė seka; PG – proteoglikaninis domenas; KD – katalizinis domenas; TD – transmembraninis domenas; CD – citoplazminis domenas. Sekų palyginimas atliktas *EMBL-EBI* duomenų bazės sekų palyginimo ir analizės įrankiais „*EMBOSS Needle*“ ir „*MUSCLE*“.

Po kelių serijinio skiedimo ciklų, siekiant gauti monokloniškas – iš vienos ląstelės kilusias – hibridomų populiacijas, buvo sukurta 13 stabilių hibridinių ląstelių linijų, sekretuojančių MAk specifiskus CA IX. Aštuoni iš jų buvo gauti peles imunizuojant CA IX<sup>-PG</sup> antigenu, o 5 buvo gauti prieš CA IX<sup>+PG</sup> rekombinantinį baltymą.

### 3.1.2. Monokloninių antikūnų apibūdinimas

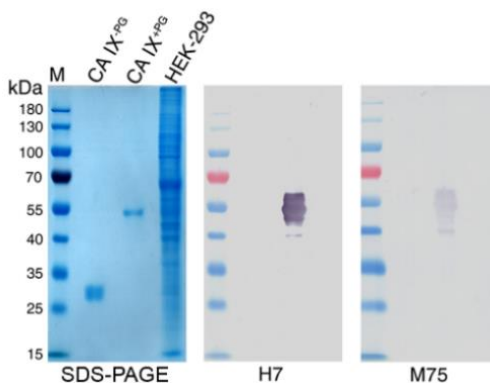
Naujai sukurti MAk buvo visapusiškai charakterizuoti, naudojant įvairius imunologinius metodus, kuriais nustatyta antikūnų klasė ir poklasis bei jungimosi su antigenu tariamoji giminingumo konstanta ( $K_d$ ), parodanti sąveikos stiprumą (14 lentelė). Imunoblotingo metodu po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis buvo parodyta, kad iš visos kolekcijos vienintelis MAk H7 atpažįsta linijinį epitopą, esantį PG domene, o kitų MAk epitopai yra konformaciniai (14 lentelė, 22 pav.). Šios analizės metu teigiama kontrole buvo panaudotas komercinis MAk M75 prieš CA IX, kurio linijinis epitopas, esantis PG domene, buvo nustatytas kitų tyrėjų (Závada et al., 2000). Jo sąveika su rekombinantiniu CA IX<sup>+PG</sup> baltymu patvirtino, kad imunizacijoms naudotas antigenas buvo susintetintas tinkamai ir išlaikė natyvią konformaciją. Rekombinantinių antigenų sintezei pasirinktų HEK-293 ląstelių lizatas buvo panaudotas neigiama kontrole. Svarbu įsitikinti, ar

MAk nėra susidarę prieš HEK-293 ląstelių linijos baltymus, kurie gali likti baltymų gryninimo metu. MAk H7 nereagavo su ląstelių lizato baltymais ir tai patvirtino jo specifiskumą antigeniui.

**14 lentelė.** MAk prieš CA IX savybės. IFA – imunofermentinė analizė; IB – imunoblotingas;

MAk klonas	Poklasis	Tiriamoji $K_a$ , mol/L	Sąveika su antigenais			
			CA IX <sup>-PG</sup>		CA IX <sup>+PG</sup>	
			IFA	IB	IFA	IB
A3		$1,3 \cdot 10^{-10}$	+	-	+	-
F12		$5,1 \cdot 10^{-10}$	+	-	+	-
F8		$3,3 \cdot 10^{-10}$	+	-	+	-
F7		$1,4 \cdot 10^{-10}$	+	-	+	-
F4		$6,5 \cdot 10^{-10}$	+	-	+	-
D8		$6,2 \cdot 10^{-10}$	+	-	+	-
C9	IgG1	$2,5 \cdot 10^{-10}$	+	-	+	-
G8		$2,1 \cdot 10^{-10}$	+	-	+	-
H7		$8,9 \cdot 10^{-10}$	-	-	+	+
E3		$1,8 \cdot 10^{-10}$	±	-	+	-
A10		$1,8 \cdot 10^{-10}$	±	-	+	-
H11		$1,7 \cdot 10^{-10}$	±	-	+	-
D3		$2,2 \cdot 10^{-10}$	±	-	+	-

+ stipri sąveika (OT>1); ± vidutiniška sąveika (OT<1); - sąveikos nėra.



**22 pav.** MAk H7 ir M75 reaktyvumas su denatūruotais rekombinantiniais CA IX<sup>-PG</sup> ir CA IX<sup>+PG</sup> baltymais. Kairėje – baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis, dešinėje – imunoblotingas su MAk H7 ir M75. M – baltymų molekulinės masės standartas (nuo 10 iki 180 kDa, Thermo Fisher Scientific).

Kitų CA izoformų pirminės baltymo struktūros panašumas su CA IX siekia nuo 27 iki 44 % (Pinard et al., 2015), todėl MAk gali atpažinti tarpusavyje panašias sekas ir reaguoti su kitais šios šeimos baltymais. Norint MAk taikyti biologinių mėginių analizei, kuriuose gali būti ne tik tiriamoji izoforma bet ir kitos CA izoformos, reikia įsitikinti MAk specifiskumu taikiniui. Kryžminis

naujai sukurtų MAK specifiškumas buvo patikrintas netiesioginės IFA ir imunoblotingo metodais, naudojant rekombinantinius kitų CA izoformų baltymus (CA I, II, IV, VB, VI, VII, XII, XIII ir XIV), kurie buvo susintetinti VU GMC BTI BVTS. Teigiamų reakcijų su kitomis izoformomis neparodė nė vienas MAK, todėl buvo patvirtintas jų specifiškumas CA IX izoformai.

Netiesioginės IFA metodu buvo nustatytos MAK tariamosios  $K_d$ , kurios kiekybiškai parodo, koku stiprumu MAK jungiasi su savo antigenu. Kuo mažesnė konstantos vertė, tuo didesnis antikūno giminingumas antigenui. Didelio giminingumo MAK laikomi tie, kurių  $K_d$  vertė yra intervale nuo  $1 \cdot 10^{-9}$  mol/L iki  $1 \cdot 10^{-12}$  mol/L (Harlow and Lane, 1988). Naujai sukurtų MAK nustatytos  $K_d$  (14 lentelė) pateko į pateiktą intervalą, todėl galima teigti, kad visų MAK giminingumas antigenui yra labai aukštas.

Antikūnai gali susidaryti prieš vieną imunodominuojančią sritį ar prieš kelias baltymo vietas. Pastarieji MAK yra labai vertingi, norint juos taikyti detekcijai, pavyzdžiui, dviepitopės IFA sistemoje, kuriai reikalingi du MAK sąveikaujantys su skirtingomis baltymo vietomis. Netiesioginės IFA metodu (14 lentelė) buvo nustatytos trys MAK grupės, atsižvelgiant į jų sąveiką su abiem rekombinantiniais CA IX baltymais, ir nustatytos trys skirtingos MAK jungimosi su baltymu vietos (23 pav.): tik katalizinis domenas (A3, F12, F8, F7, F4, D8, C9 ir G8 klonai), katalizinis ir PG domenas (E3, A10, H11 ir D3 klonai), tik PG domenas (H7 klonas).

	Nežymėti MAK											Grupės	Epitopo lokalizacija			
	A3	F8	F7	F4	D8	C9	G8	F12	A10	E3	D3			H11	H7	
MAK žymėti HRP	A3	■													I grupė	Katalizinis domenas
	F8	■	■	■	■	■	■	■							II grupė	
	F7	■	■	■	■	■	■	■								
	F4	■	■	■	■	■	■	■								
	D8	■	■	■	■	■	■	■								
	C9	■	■	■	■	■	■	■								
	G8	■	■	■	■	■	■	■								
	F12	■													III grupė	
	A10	■							■	■	■	■	■	■	IV grupė	Katalizinis ir PG domenai
	E3								■	■	■	■	■	■		
	D3								■	■	■	■	■	■		
	H11									■	■	■	■	■	V grupė	PG domenas
	H7												■			

**23 pav.** Apibendrinti konkurencinės IFA rezultatai ir MAK skirstymas į grupes pagal persidengiančius arba unikalius epitopus bei sąveiką su CA IX domenais. Baltas langelis – konkurencijos nėra, juodas – konkuruojantys MAK.

Tiesioginės konkurencinės IFA metodu galima įvertinti, ar MAK konkuruoja dėl prisijungimo prie antigeno, t. y. jungiasi toje pačioje vietoje, ar MAK nekonkuruoja ir jungiasi skirtingose baltymo vietose. Pirmiausia



imobilizuotas antigenas inkubuojamas su nežymėtu MAk, o vėliau pridodama MAk žymėto krienų peroksidazės (HRP) fermentu. Signalas stebimas tik tuo atveju, jeigu tiek nežymėtas, tiek žymėtas MAk jungiasi skirtingose baltymo vietose. Jei abu antikūnai jungiasi toje pačioje vietoje, tai pirmas prisijungęs nežymėtas MAk neleis prisijungti žymėtam MAk ir signalas nebus stebimas.

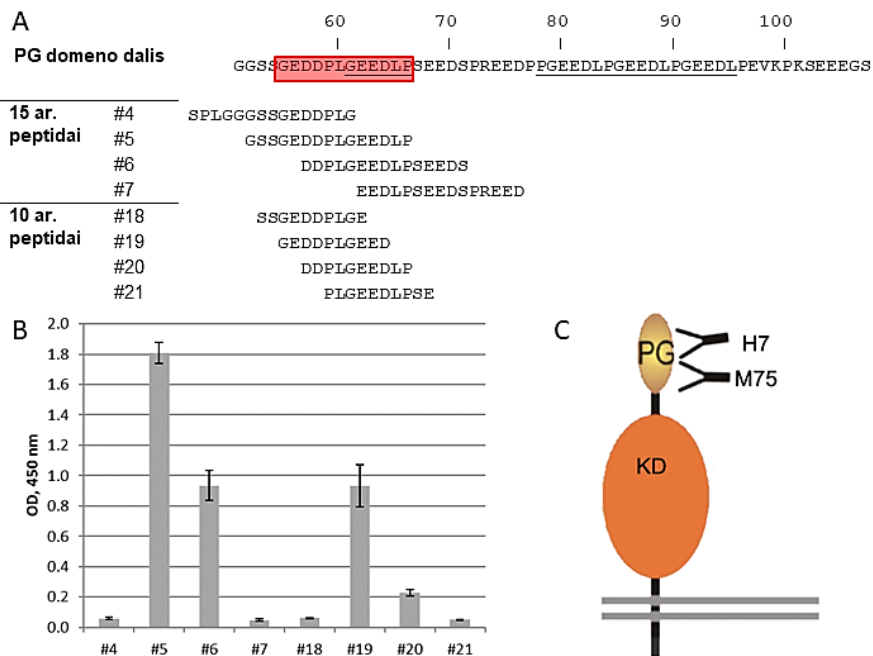
Buvo patikrintos visos įmanomos nežymėtų ir HRP pažymėtų MAk porų kombinacijos. Išanalizavus eksperimentinius duomenis MAk suskirstyti į penkias grupes pagal persidengiančius ir nepersidengiančius epitopus (23 pav.). I grupėje MAk A3 ir V grupėje MAk H7 turi unikalų epitopą, kadangi nekonkuravo su kitais MAk. II grupėje esantys MAk F8, F7, F4, D8, C9, G8 ir F12 turi tą pačią sąveikos su antigenu vietą. III grupės MAk A10 ir IV grupės MAk E3, D3 ir H11 epitopai greičiausiai yra persidengiantys arba šalia vienas kito, bet nėra vienodi. Taigi, sukurtieji MAk sąveikauja su 5 skirtingomis baltymo vietomis, jungiasi su skirtingais CA IX domenais, todėl jie gali būti taikomi diagnostinių sistemų kūrimui ar baltymo struktūrinėms savybėms tirti.

Kadangi imunoblotingo metodu buvo parodyta, kad vienintelio MAk H7 epitopas yra linijinis, tik jam buvo įmanoma nustatyti tikslią epitopo ar. seką. Šiam tikslui buvo susintetinta 15 persiklojančių sintetinių peptidų prijungtų prie biotino per jungtuką, apimančių PG domeno seką (38–112 ar.) (10 lentelė, 2.2.3.3 skyrius, #1–15 peptidai). MAk H7 atpažino #5 ir #6 peptidus, tačiau stipresnė sąveika buvo stebima su #5 peptidu (24 pav., B). Abiem peptidams bendra persidengianti seka tarp 57 ir 66 ar. (DDPLGEEDLP) apibrėžė galimą MAk H7 epitopą.

Palyginimui peptidai buvo patikrinti su komerciniu MAk M75, kurio peptido seka buvo nustatyta anksčiau (Závada et al., 2000). Tai GEEDLP ar. motyvas PG domene pasikartojantis 6 kartus (24 pav., A). MAk M75 reagavo su visais peptidais, kuriuose buvo minėta ar. seka, tarp jų ir su #6 peptidu, bet nereagavo su #5 peptidu (duomenys nepateikiami). Akivaizdu, kad nors abiejų MAk epitopai iš dalies persikloja, tačiau jie yra skirtingi (24 pav., C).

Siekiant patikslinti MAk H7 epitopo ar. seką buvo panaudoti 9 papildomi sintetiniai 10 ar. peptidai, persiklojantys kas 2 ar. (10 lentelė, 2.2.3.3 skyrius, #16–24 peptidai) ir apimantys ar. nuo 46 iki 76, tarp kurių yra pirmajame etape nustatyta galima epitopo seka. MAk H7 vidutiniškai stipriai reagavo su #19 peptidu ir silpnai su #20 peptidu (24 pav., B dalis), todėl buvo galima daryti prielaidą, kad šis MAk stipriai sąveikavo su ilgesniais peptidais. Greičiausiai epitopas apima 12 ar. seką 55-GEDDPLGEEDLP-66. Iš eksperimentinių duomenų matyti, kad MAk H7 ir peptidų sąveika susilpnėja, kai N-gale trūksta glicino ir glutamo rūgšties liekanų. MAk H7 taip pat nereagavo ir su peptidais,

kurių C-galas buvo trumpesnis (10 lentelė, 2.2.3.3 skyrius, #25–28 peptidai), o tai patvirtina, kad MAK H7 ir baltymo sąveikai reikia daugiau ar.



**24 pav.** A – MAK H7 nustatyto epitopo (raudonas stačiakampis) ir MAK M75 epitopo (pabraukta) vieta PG domene, bei sintetinių peptidų persiklojimo pavyzdys. B – MAK H7 reaktyvumas su peptidais. Pateikiamas nustatytas OD ties 450 nm bandos ilgiu. C – Schematiškai pavaizduota MAK H7 ir M75 sąveika su CA IX PG domenu, rodanti greta esančius, bet skirtingus epitopus.

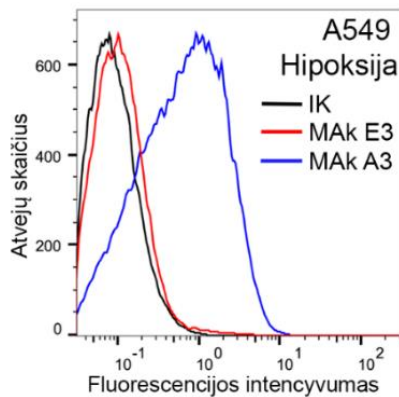
Nustačius H7 epitopą galima patvirtinti, kad tai yra unikalus MAK, kuris skiriasi nuo kitų antikūnų, naudojamų CA IX tyrimams. Žinant tikslią epitopo ar. seką, MAK galima panaudoti įvairiems tyrimams, pavyzdžiui, analizuojant struktūrines baltymo savybes ar PG domeno svarbą ląstelių tarpusavio sąveikai ar adhezijai (Csaderova et al., 2013).

### 3.1.3. Monokloninių antikūnų sąveika su karboanhidraze IX biologiniuose mėginiuose

Peles imunizuojant rekombinantiniais baltymais gali būti sukuriami tik tokie MAK, kurie sąveikauja su rekombinantiniu antigenu, bet neatpažįsta natyvaus baltymo ląstelėse. Tai nustatyti ypač svarbu, norint MAK taikyti klinikinių mėginių tyrimams, diagnostikai, ar juos panaudoti terapiniais tikslais. Todėl naujai sukurtieji MAK prieš CA IX buvo iširti įvairiais imunocheminiais metodais, skirtais baltymų analizei ląstelėse ar audiniuose,

pavyzdžiui, tėkmės citometrija, imunoprecipitacija, imunofluorescencija ir imunohistochemija. Pirmiausia MAK ir CA IX sąveika buvo tiriama vėžinių ląstelių linijose, kadangi tai viena populiariausių vėžio modelių sistemų (Gillet et al., 2013), vėliau su MAK buvo tiriami ir klinikiniai mėginiai.

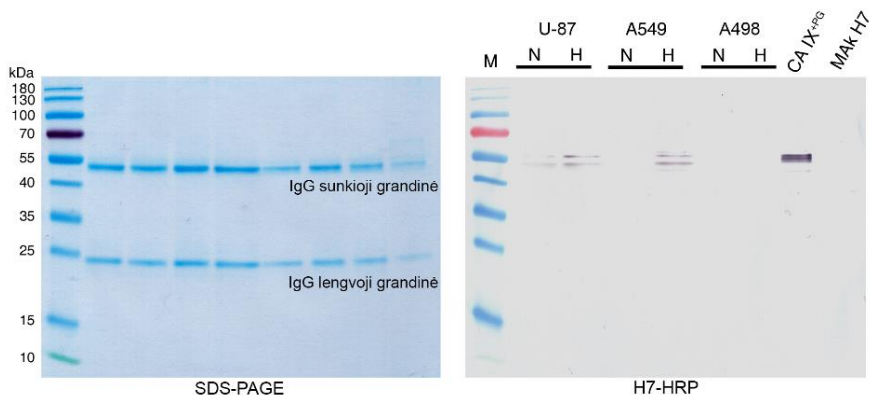
Tėkmės citometrijos metodu, panaudojant MAK ir fluorescuojančias žymes, galima nustatyti natyvius baltymus, esančius gyvų ląstelių paviršiuje (Millán and Brunet, 2015). Nauji MAK, sukurti prieš rekombinantinius CA IX baltymus, pirmiausia buvo patikrinti su A549 ląstelėmis, kuriose jau anksčiau nustatyta padidėjusi CA IX raiška esant hipoksijai (Swinson et al., 2003). Hipoksijos sąlygomis augintos gyvos A549 ląstelės buvo inkubuojamos su MAK, kurie vėliau buvo nustatomi naudojant antrinius antikūnus su fluorescuojančia žyme. Padidėjęs fluorescencijos intensyvumas, lyginant su izotipinės kontrolės fluorescencija, buvo stebimas su 8 MAK gautais prieš CA IX<sup>-PG</sup> (F12, G8, F7, F4, D8, C9, A3 ir F8) bei CA IX<sup>+PG</sup>-specifišku MAK H7 (25 pav.). Kiti MAK neregavo su natyviu CA IX baltymu ląstelių paviršiuje (15 lentelė).



**25 pav.** MAK tyrimas tėkmės citometrijos metodu su hipoksijoje augintomis A549 ląstelėmis. Pateikiamos teigiamo MAK A3 ir neigiamo MAK E3 fluorescencijos intensyvumo histogramos. IK – IgG1 poklasio MAK prieš KPV (izotipinė kontrolė). Antriniai antikūnai: ožkos antikūnai prieš pelės imunoglobulinus, konjuguoti su Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific).

Imunoprecipitacijos metodu galima išskirti tiriamąjį baltymą iš ląstelių lizato. Vienintelis MAK H7, atpažįstantis linijinį CA IX epitopą denatūruojančiomis sąlygomis, buvo tinkamas vėžinių ląstelių linijų ir jose esančios CA IX analizei imunoprecipitacijos metodu. Pirmiausia lizatas buvo inkubuojamas su MAK H7, baltymo A ir sefarozės kompleksu. Izoliuotas iš lizato CA IX baltymas buvo frakcionuojamas baltymų elektroforezėje ir nustatomas IB metodu, naudojant MAK H7 pažymėtą HRP (26 pav.).

Analizuojant elektroforezės vaizdą, ryškiausiai buvo matomos MAK H7 sunkiosios ir lengvosios grandinės, o CA IX baltymo nebuvo galima atskirti. Sunkioji antikūno grandinė yra panašaus dydžio kaip ir CA IX baltymas (~54 kDa). Tik pernešus baltymus ant membranos, kuri buvo inkubuojama su MAK H7 žymėtu HRP, pavyko vizualizuoti CA IX U-87 ir A549 ląstelių lizatuose. Taigi, tėkmės citometrijos ir imunoprecipitacijos metodais buvo patvirtintas naujai sukurtų MAK specifiskumas tiek natyviame CA IX baltymui vėžinių ląstelių paviršiuje, tiek esančiam ląstelių lizate.



**26 pav.** CA IX precipitacija iš normoksijos (N) ir hipoksijos (H) sąlygomis augintų U-87, A549 ir A498 ląstelių lizatų, naudojant MAK H7. Imunoblotingo membranoje matoma CA IX (54 ir 58 kDa). M – baltymų molekulinio svorio standartas (nuo 10 iki 180 kDa). Rekombinantinis CA IX<sup>PG</sup> – teigiama kontrolė (precipituotas vienodomis sąlygomis), MAK H7 – neigiama kontrolė.

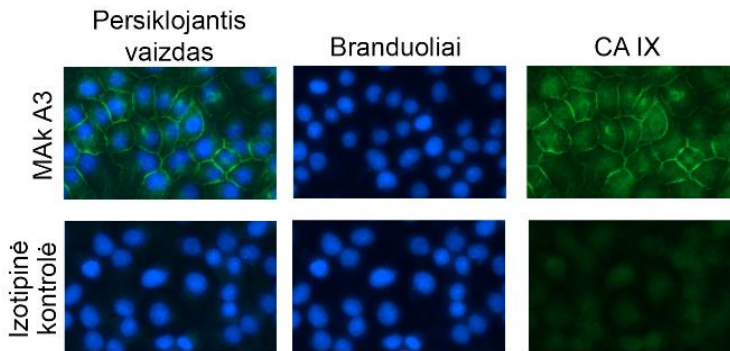
**15 lentelė.** Apibendrintas MAK reaktyvumas su CA IX įvairiais imunocheminiais metodais biologiniuose mėginiuose.

MAK klonas	TC	IF	IP	IHC
A3	+	+	-	-
F12	+	+	-	-
F8	+	+	-	-
F7	+	+	-	-
F4	+	+	-	-
D8	+	+	-	-
C9	+	+	-	-
G8	+	±	-	-
H7	+	+	+	+
E3	-	±	-	-
A10	-	+	-	-
H11	-	±	-	-
D3	-	±	-	-

+ stipri reakcija; ± silpna/vidutinė reakcija; - reakcijos nėra.

Vėžinių ląstelių vizualizavimas yra labai svarbus, norint tyrinėti įvairius vėžinius procesus, pavyzdžiui, vėžinių ląstelių migraciją. MAk pagrindu sukurtos vizualizacijų technikos, tokios kaip imunofluorescencija ar imunohistochemija yra plačiai paplitusios vėžio tyrimų ir diagnostikos srityse (Zhang et al., 2014).

Visi naujai sukurti MAk buvo patikrinti imunofluorescencijos metodu, tiriant hipoksijos sąlygomis auginamas HeLa ląsteles (dr. J Matulienė, VU GMC BTI BVTs). Po fiksacijos metanoliumi ir rehidracijos PBS ląstelės buvo inkubuojamos su MAk ir antriniais antikūnais žymėtais Alexa Fluor 488 fluorescuojančiu dažu. MAk G8, E3, H11 ir D3 pasižymėjo silpna sąveika, o dauguma MAk (A3, F12, F8, F7, F4, D8, C9, H7 ir A10) su CA IX HeLa ląstelėse sąveikavo stipriai (15 lentelė). Buvo stebima MAk sąveika su membranoje esančia CA IX, kuri ypač matoma ląstelių sąlyčio vietoje (27 pav.).



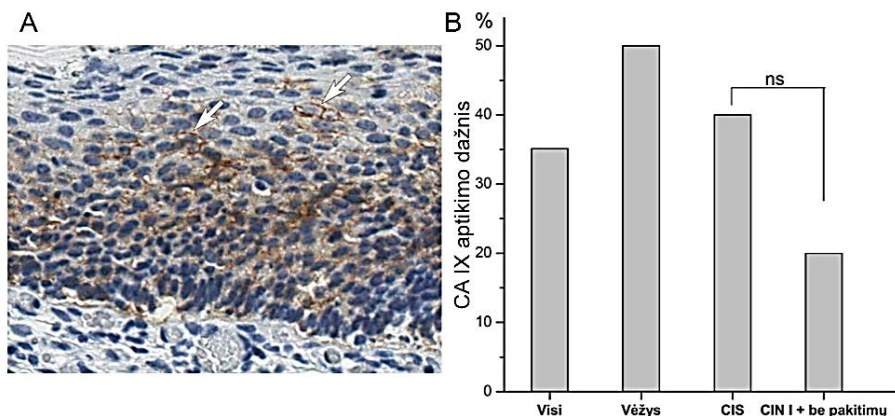
**27 pav.** CA IX vizualizacija HeLa ląstelėse auginuose hipoksijoje imunofluorescencijos metodu su MAk A3 ir antriniais fluorescuojančia žyme žymėtais antikūnais. Branduoliai dažyti su DAPI. Fluorescuojančios mikroskopijos nuotraukos padarytos esant x 20 padidimui (dr. J. Matulienė).

IHC metodas yra vienas dažniausiai naudojamų metodų vėžio tyrimams ar diagnostikai. Antikūnai sąveikauja su audinyje esančiu antigenu, vėliau reakcija vizualizuojama, ir mėginys analizuojamas mikroskopu. IHC metodu galima matyti antigeno lokalizaciją audinyje ir ląstelėje, taip pat pagal dažymosi intensyvumą galima spręsti apie antigeno sąlyginį kiekį audinyje (Matos et al., 2010).

Visi MAk susintetinti prieš CA IX rekombinantinius baltymus buvo patikrinti imunohistochemijos metodu, naudojant gimdos kaklelio karcinomos *in situ* (CIS) biopsijos mėginius, kurie buvo fiksuoti formalinu ir įterpti į parafiną. Dažymas buvo atliktas VPC. CA IX raiška audinyje pirmiausia buvo patvirtinta naudojant VPC turimus komercinius antikūnus

prieš CA IX (klonas EP161), o vėliau audinio pjūviai analizuoti su naujaisiais MAK.

Ryškus ir aiškus audinio dažymasis buvo stebimas tik su vieninteliu MAK H7, o su kitais MAK rezultatai buvo neigiami (15 lentelė). Tai koreliuoja su imunoblotingo rezultatais, kadangi MAK H7 vienintelis reaguoja su denatūruotu CA IX baltymu. Fiksuojant audinius, dėl poveikio formalinu ir antigeno išgavimo procedūrų, yra paveikiama baltymo struktūra, todėl linijinius epitopus atpažįstantys MAK dažnai yra efektyviausi ir tinkamiausi imunohistochemijos metodui. Membraninio karcinomos ląstelių dažymo pavyzdys pateikiamas 28 pav., A (pažymėta baltomis rodyklėmis), o tai atitinka CA IX lokalizaciją. Jokių nespecifinio ląstelių dažymo požymių nebuvo pastebėta ir tai patvirtinta MAK H7 specifiškumą ir tinkamumą, nustatant CA IX vėžiniuose audiniuose.



**28 pav.** A – CA IX nustatymas gimdos kaklelio CIS audinio fragmente imunohistochemijos metodu, naudojant MAK H7. Membraninio dažymo pavyzdžiai pažymėti baltomis rodyklėmis. Padidinimas x 40. B – CA IX-teigiamų mėginių procentas visuose mėginiuose ir skirtingose grupėse, suskirstytose pagal gimdos kaklelio pakitimų diagnozę. Tarp grupių statistškai reikšmingo skirtumo nenustatyta (ns kai  $p > 0,05$ , remiantis  $\chi^2$  testu).

Patvirtinus MAK H7 specifiškumą ląstelėje esančiai CA IX, IHC metodu buvo ištirti 37 pacienčių, kurioms nustatyti įvairaus laipsnio intraepiteliniai pakitimai, gimdos kaklelio biopsijos mėginiai. Mėginiai ištirti VPC naudojant MAK H7. Didžiąją dalį pacienčių ( $n=25$ ) buvo nustatyta CIS, kitoms diagnozuotas gimdos kaklelio vėžys ( $n=2$ ), lengva displazija ( $n=1$ ), lėtinis cervicitas ( $n=7$ ) arba audinys buvo be displazijos ( $n=2$ ). Imunohistochemijos metodu gautus rezultatus įvertino VPC patologas.

Analizuojant visus mėginius 35,1 % ( $n=13$ ) buvo CA IX-teigiami, o 64,9 % ( $n=24$ ) mėginių CA IX raiška nenustatyta. Nusidažiusio audinio plotas

sudarė nuo 5 iki 70 % (vidurkis – 20 % audinio). Pagal dažymosi intensyvumą, kuris parodo CA IX raiškos stiprumą, mėginiai pasiskirstė tolygiai: 4 mėginiuose reakcija buvo silpna, 4 – vidutinė, 5 – stipri. Sąsajų tarp pacienčių diagnozės ir audinio dažymosi ploto bei dažymosi intensyvumo nebuvo pastebėta.

Atsižvelgiant į diagnozes, pacientės buvo suskirstytos į tris grupes:

1) moterys, kurioms diagnozuotas vėžys (n=2);

2) moterys, kurioms diagnozuotas CIS (n=25);

3) moterys, kurioms nustatyta lengva displazija, lėtinis cervicitas arba pakitimai nenustatyti (n=10).

Daugiausiai CA IX-teigiamų mėginių (50 %) buvo nustatyta pirmoje grupėje (28 pav., B), tačiau šios grupės imtis per maža, norint ją lyginti su kitomis grupėmis, ar daryti kokias nors išvadas apie CA IX ir vėžinių pokyčių ryšį. Antroje grupėje CA IX baltymas buvo nustatytas 40 % mėginių ir tai buvo daugiau lyginant su trečiaja grupe (20 % teigiamų mėginių). Tačiau statistiškai šis skirtumas nebuvo patikimas (remiantis  $\chi^2$  testu p=0,26). Nors tendencija matoma, kad CA IX dažniau aptinkama mėginiuose, kuriuose yra didesnio laipsnio gimdos kaklelio pakitimai, tačiau sąsajoms patvirtinti reikėtų didesnės mėginių imties.

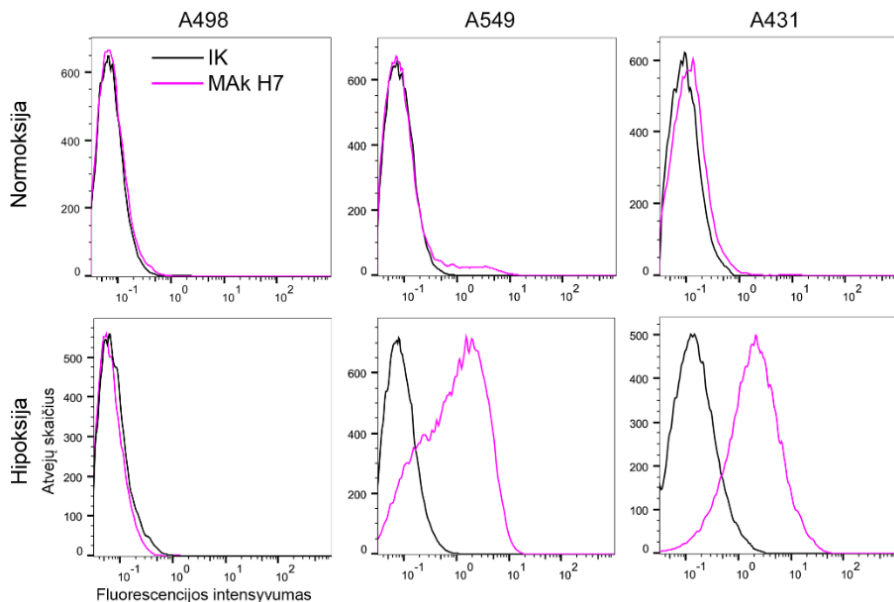
Apibendrinant, naujai sukurti MAk buvo patikrinti įvairiais metodais, skirtais biologinių mėginių analizei. CA IX buvo aptikta nepriklausomai nuo jos formos – tiek natyvi, tiek denatūruota. Ypač plačiomis taikymo galimybėmis pasižymi MAk H7, kuris sąveikavo su CA IX visais 4 taikytais metodais (15 lentelė). Tai potencialus įrankis CA IX nustatymui ne tik moksliniais, bet ir diagnostiniais tikslais. MAk H7 buvo panaudotas analizuojant gimdos kaklelio biopsijos audinius, tačiau dėl mažos mėginių imties, nebuvo galima įvertinti CA IX kaip gimdos kaklelio vėžinių pakitimų biožymens potencialo.

#### 3.1.4. Karboanhidrazės IX raiškos tyrimas vėžinėse ląstelių linijose

Vėžinės ląstelių linijos dažnai naudojamos kaip modelis vėžinių procesų analizei, iki klinikiniuose tyrimuose, ar ieškant vėžiui specifiskų biožymenų (Gillet et al., 2013). CA IX raiška buvo ištirta keliose vėžinių ląstelių linijose (3 lentelė, 2.1.9 skyrius), jas auginant normoksijos ir hipoksijos sąlygomis. Tyrimu norėta parodyti, kokiose vėžinėse ląstelėse yra sintetina CA IX ir CA IX raiškos priklausomybę nuo deguonies koncentracijos. CA IX baltymas buvo tiriamas tėkmės citometrijos ir imunoprecipitacijos metodais su naujai sukurtu ir charakterizuotu MAk H7, kuris sąveikavo su ląsteline CA IX. Papildomai buvo analizuojama CA9 iRNR AT-kPGR metodu, kuris leidžia

labai jautriai ir kiekybiškai įvertinti CA9 raišką ir jos pokyčius iRNR lygmenyje. Šis metodas buvo panaudotas siekiant patvirtinti CA IX raišką vėžinėse ląstelėse.

CA IX baltymas buvo tiriamas A549, U-87, A498, MCF-7, A431, CaSki, HeLa, Jurkat ir HEK-293 ląstelėse. Tėkmės citometrijos metodu buvo tiriamos gyvos ląstelės pažymėtos MAk H7 (29 pav.), tuo tarpu imunoprecipitacijos metodu, naudojant MAk H7, CA IX baltymas buvo išskiriamas iš ląstelių lizato ir analizuojamas baltymų elektroforezės ir imunoblotingo metodais (26 pav.).



**29 pav.** CA IX raiška A498, A549 ir A431 ląstelėse auginant normoksijos ir hipoksijos sąlygomis, nustatyta naudojant MAk H7. IK – IgG1 poklasio MAk prieš KPV (izotipinė kontrolė).

Abiem metodais buvo gauti tie patys CA IX raiškos ląstelėse rezultatai (16 lentelė). Keturių ląstelių linijos (A549, HeLa, A431 ir MCF-7) nesintetino CA IX esant normaliai deguonies koncentracijai, tačiau jas auginant hipoksijoje CA IX raiška išaugo ir buvo detektuota su MAk H7. U-87 ir CaSki ląstelėse normoksijos sąlygomis nustatytas fluorescencijos padidėjimas, lyginant su izotipine kontrole, rodo pastovią CA IX raišką. Šie rezultatai sutapo su ankstesniais ląstelių linijų tyrimais (Said et al., 2006; Yang et al., 2017).

CA IX raiška nebuvo aptikta Jurkat ir A498 ląstelėse nepriklausomai nuo skirtingo deguonies kiekio auginant ląsteles. Literatūroje buvo pateiktos



išvados, kad CA IX sintezė A498 ląstelėse yra nežymi (Závada et al., 2003). Naudojant naujuosius MAk parodyta, kad nevėžinės HEK-293 ląstelės taip pat buvo CA IX-neigiamos. Tai labai svarbu, kadangi HEK-293 yra ląstelių linija dažnai naudojama sintetinant rekombinantinius CA IX baltymus ar kaip modelis atliekant įvairius tyrimus (Buanne et al., 2013).

**16 lentelė.** CA IX raiškos baltymo ir iRNR lygmenyje pokyčių vėžinėse ląstelėse, jas auginant normoksijoje ir hipoksijoje, palyginimas skirtingais metodais.

Ląstelių linija	TC		IP/IB		AT-kPGR	
	N	H	N	H	N	H
A549	–	+	–	+	–	+
U-87	+	+	+	+	+	+
A498	–	–	–	–	n	n
Jurkat	–	–	–	–	–	±
HeLa	–	+	–	+	n	n
A431	–	+	–	+	n	n
CaSki	+	+	+	+	n	n
MCF-7	–	+	–	+	n	n
HCT	n	n	n	n	–	±
HUT	n	n	n	n	–	–
CEM	n	n	n	n	–	+
MDA-MB-231	–	+	–	+	–	±
Huh 7	–	–	–	–	–	–

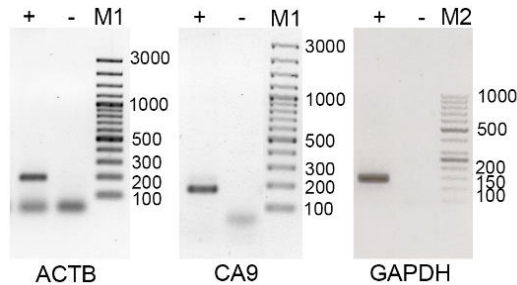
N – normoksija, H – hipoksija, n – testuota nebuvo.

Siekiant įsitikinti, kad MAk veikia specifiskai ir norint papildomai įvertinti CA IX raišką kitu metodu, buvo sukurta ir optimizuota AT-kPGR sistema, skirta CA9 iRNR raiškai nustatyti. Prieš vėžinių ląstelių analizę buvo parinkti visi reikalingi AT-kPGR metodo komponentai ir nustatyta optimali reakcijos mišinio sudėtis bei optimalios reakcijos sąlygos.

Trumpai aprašant optimizacijos procesą, pirmiausia buvo sumodeliuotos pradmenų poros skirtos CA9 bei normalizavimo genų  $\beta$ -aktino (*ACTB*) (Tamulyte, 2017) ir glicerolio aldehido 3-fosfato dehidrogenazės (*GAPDH*) (Dekaminaviciute, 2012) fragmentų padauginimui („Primer BLAST“ įrankis, NCBI duomenų bazė). Normalizavimui naudojami visose ląstelėse esantys ir stabilia raiškia pasižymintys genai. Parinktų pradmenų sekos pateiktos 2.1.11.1 skyriuje, 4 lentelėje. Su šiais pradmenimis buvo gauti reikiamo dydžio PGR produktai, nebuvo matyti nespecifinių juostelių, todėl jie buvo tinkami tolimesniems darbams (30 pav.).

Norint kiekybiškai nustatyti iRNR kiekį mėginyje, buvo reikalingas RNR standartas, kuris būtų panaudotas kalibracinei kreivei gauti. RNR standartas yra žinomo ilgio RNR transkriptas su nustatytu jo kopijų skaičiumi. Standartas reikalingas kiekvienam tiriamajam genui, todėl buvo susintetinti CA9, *ACTB*

ir *GAPDH* RNR transkriptai, atitinkantys iRNR fragmentą, kuris yra padauginamas parinktais pradmenimis. RNR standartai (17 lentelė) buvo gauti atliekant DNR transkripciją *in vitro*, panaudojus vektorius su įterptais *CA9*, *ACTB* ir *GAPDH* PGR produktais.



**30 pav.** Parinktų pradmenų, skirtų *CA9*, *ACTB* ir *GAPDH* fragmentų padauginimui, analizė PGR ir DNR elektroforezės metodais. Fragmentai buvo padauginami naudojant kDNR (+), kuri buvo susintetinta nuo RNR išskirtos iš HeLa ir U-87 ląstelių. Neigiama kontrolė – vanduo be nukleazų (–); DNR molekulinės masės standartai: M1 – *O'Gene Ruler 100 bp Plus* (Thermo Fisher Scientific); M2 – *GeneRuler 50bp DNA Ladder Plus* (Thermo Fisher Scientific).

**17 lentelė.** *CA9*, *ACTB* ir *GAPDH* RNR transkriptų koncentracija, ilgiai ir paskaičiuotas kopijų skaičius.

Transkriptas	Nukleotidų skaičius	Koncentracija ng/μL	Kopijų skaičius 1 μg RNR
<i>CA9</i>	2828	171,7	$6,3 \cdot 10^{-11}$
<i>ACTB</i>	2841	227	$6,2 \cdot 10^{-11}$
<i>GAPDH</i>	2743	100,7	$6,5 \cdot 10^{-11}$

Optimizuojant pradmenų ir zondų koncentracijas PGR reakcijos metu buvo analizuojama kDNR, susintetinta nuo skirtingo praskiedimo RNR transkriptų ( $10^5$ –1 kopijos/reakcijoje galutinė koncentracija, skiedimo koeficientas 10).

Optimalūs AT-kPGR parametrai buvo parinkti atsižvelgiant į:

1) reakcijos efektyvumą E, kuris esant optimalioms AT-kPGR sąlygoms, turi būti lygus 100 % ( $\pm 10$  %). Šis rodiklis parodo, jog kiekvieno AT-kPGR ciklo metu produkto kiekis padvigubėja.

2) kalibracinės kreivės nuokrypis M, kuris esant optimalioms AT-kPGR sąlygoms, turi būti lygus  $-3,32 (\pm 0,25)$ .

2) koreliacijos koeficientą  $R^2$ , kuris nustatomas iš kalibracinės kreivės ir turėtų būti  $> 0,99$ .

3) standartų variacijos koeficientus (CV, %), kurie parodo skirtumą tarp teoriškai paskaičiuotų standartų kopijų skaičiaus reakcijoje ir gautų eksperimentiškai. Idealiu atveju CV turėtų būti kuo mažesnis ir neturėtų

viršyti 10 %, tačiau priimtina riba yra 25 % (Kralik and Ricchi, 2017; Kuang et al., 2018).

4) reakcijos jautrumą, t. y. mažiausią aptinkamų transkriptų kopijų skaičių.

Kiekvieno AT-kPGR metu buvo naudojamos kelios kontrolės, kurios leidžia įvertinti sistemos specifiškumą ir švarumą:

1) Kontrolė be matricos (angl. *no template control*) – PGR mišinyje vietoj matricos (kDNR) dedamas vanduo. Ši kontrolė parodo, ar reakcijoje naudojami reagentai ir priemonės neturi genominės ar pašalinės DNR.

2) Kontrolė be atvirkštinės transkriptazės – PGR reakcijoje analizuojamas kDNR sintezės mišinys su  $10^7$  RNR transkripto kopijų, kuriame nėra atvirkštinės transkriptazės. Parodo, ar RNR transkriptai nėra užteršti vektoriaus DNR.

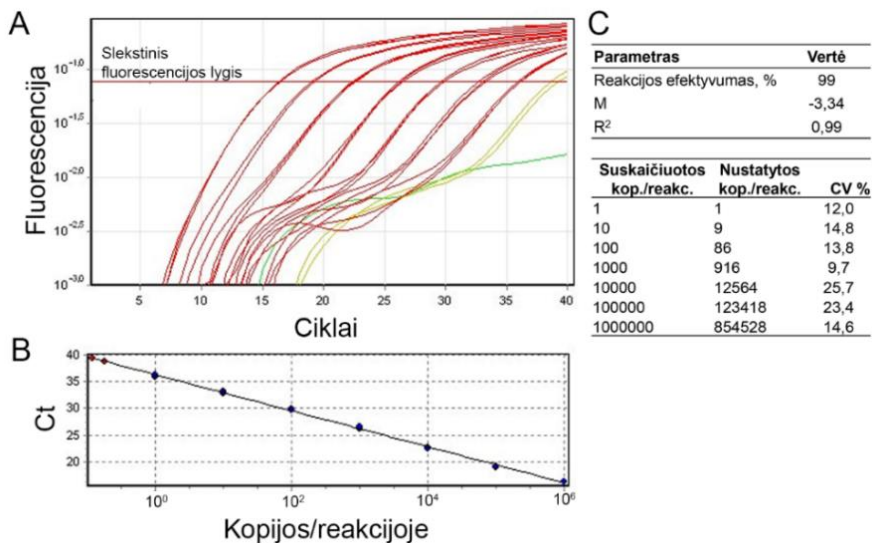
Atlikus visus optimizavimo eksperimentus buvo nustatytos tinkamiausios pradmenų prilydymo temperatūros, pradmenų ir zondų koncentracijos (18 lentelė), kurias naudojant vertinimo kriterijai buvo artimi reikalavimams. Sistemų jautrumas siekė 1–10 kopijų reakcijoje ir nebuvo stebimos nespecifinės reakcijos kontroliniuose mėginiuose. Optimizuotos CA9 nustatymui skirtos AT-kPGR sistemos veikimo pavyzdys pateikiamas 31 pav.

**18 lentelė.** Optimalių sąlygų parinkimas AT-kPGR sistemoms ir gautos vertinimo kriterijų vertės

	<i>CA9</i>	<i>ACTB</i>	<i>GAPDH</i>
<b>Optimizuojami parametrai</b>			
Pradmenų prilydymo temperatūra	55 °C	55 °C	58 °C
Pradmenų koncentracija	0,2 μM	0,2 μM	0,3 μM
Zondo koncentracija	0,1 μM	0,1 μM	0,25 μM
<b>Vertinimo kriterijai gauti su optimalia sistema</b>			
E, % (M)	93–101 (–3,49)	97–101 (–3,29)	107 (–3,17)
R <sup>2</sup>	>0,99	>0,99	>0,99
CV %, vidurkis ± SD, [intervalas]	9 ± 7, [0,8–20,4]	8 ± 6, [0,4–17,7]	10 ± 8, [1,2–22]
Jautrumas (reakcijoje)	1 kopija	1 kopija	10 kopijų

Vėžinių ląstelių tyrimams RNR buvo skiriama iš įvairaus kiekio ląstelių, o kDNR sintezei buvo naudojama 2 μL RNR. Gautas CA9 kopijų reakcijoje skaičius buvo dalinamas iš ACTB ir GAPDH kopijų reakcijoje, taip normalizuojant CA9 iRNR raiškos lygį. Kadangi ACTB ir GAPDH iRNR raiškos lygis yra daug didesnis nei CA9, todėl norint suvienodinti skaitinės vertės išraišką, gauta CA9 santykinė raiška buvo dauginama iš pasirinkto koeficiento: 100 ACTB atveju ir 10 000 GAPDH atveju.

Abu atskaitos genai buvo nustatyti visuose analizuotuose ląstelių mėginiuose ir pagal juos normalizuota *CA9* raiška. Įvertinus abiem atskaitos genais gautą santykinę *CA9* raišką visuose mėginiuose, buvo nustatyta statistiškai patikima stipri koreliacija (*Spearman* koreliacijos koeficientas  $r_s = 0,92$ ,  $p = 0$ ) (32 pav., A), todėl tiek *ACTB*, tiek *GAPDH* genai tiko analizuoti vėžines ląstelių linijas ir vertinti *CA9* raiškos pokyčius esant skirtingoms deguonies sąlygoms.

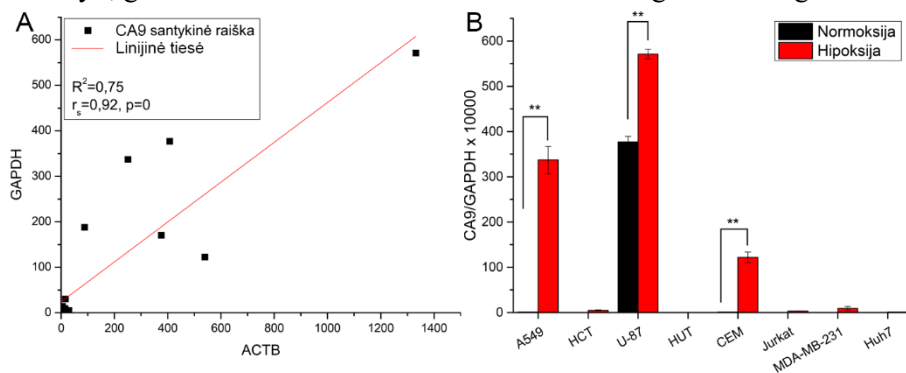


**31 pav.** Optimali *CA9* AT-kPCR sistema. A – fluorescencijos lygio priklausomybės nuo AT-kPCR ciklo kreivės. Raudona spalva – *CA9* RNR transkriptų standartas skiestas nuo  $10^6$  iki 1 kopijos reakcijoje, geltona – kontrolė be atvirkštinės transkriptazės, žalia – vandens kontrolės. B – kalibracinė kreivė, sudaryta pagal *CA9* standarto rezultatus, skirta nustatyti *CA9* RNR kopijų skaičių reakcijoje. C – amplifikatoriaus kompiuterinės programos pateikiami reakcijos parametrai ir skirtumas tarp teoriškai paskaičiuotų ir eksperimentiškai nustatytų standarto kopijų reakcijoje (CV %).

Ląsteles auginant normoksijos sąlygomis tik U-87 ląstelių linija pasižymėjo stipria *CA9* raiška (3151 kopijų reakcijoje, santykinė raiška pagal *GAPDH* buvo 337 vienetų) (32 pav., B; 16 lentelė). Tiriant kitas linijas (A549 ir CEM) buvo aptinkama iki 15 kopijų/reakcijoje, o normalizavus pagal atskaitos genus, didžiausia santykinė *CA9* raiška siekė 1 vienetą. *CA9* raiška nebuvo aptikta HCT, HUT, Jurkat, MDA-MB-231 ir Huh7 ląstelėse.

Hipoksijos sąlygomis A549, U-87 ir CEM ląstelėse buvo stebimas statistiškai reikšmingas *CA9* raiškos padidėjimas, kuris siekė nuo 1,5 karto U-87 ląstelėse iki 340 kartų A549 ląstelėse. Dėl hipoksijos yra aktyvinami transkripcijos veiksniai atsakingi už *CA9* genų raišką. Labai silpna *CA9* raiška

buvo stebima hipoksijos sąlygomis auginuose HCT, Jurkat ir MDA-MB-231 ląstelėse, tačiau šis pokytis nebuvo statistiškai reikšmingas. HUT ir Huh7 ląstelių atveju *CA9* nėra sintetinama nei normoksijos, nei hipoksijos sąlygomis. Šie vėžinių ląstelių tyrimai parodė, kad naujai sukurtos ir optimizuotos AT-kPGR sistemos, skirtos *CA9*, *ACTB* ir *GAPDH* iRNR raiškai nustatyti, gali būti taikomos *CA9* raiškos analizei biologiniuose mėginiuose.



**32 pav.** *CA9* raiškos tyrimai vėžinėse ląstelių linijose. A – *CA9* santykinės raiškos, gautos normalizavus atskaitos genai *ACTB* ir *GAPDH*, koreliacija analizuojant visus tirtus ląstelių linijų mėginius. B – Santykinė *CA9* raiška normalizuota *GAPDH* genu įvairiose vėžinių ląstelių linijose ir raiškos pokytis jas auginant normoksijoje ir hipoksijoje. \*\* $p \leq 0,001$ , remiantis *Student t* testu.

Palyginus CA IX raišką baltymo ir iRNR lygmenyje buvo gauti koreliuojantys rezultatai. Tose ląstelėse, kuriose CA IX nebuvo nustatyta MAk H7, nebuvo ir aptikta iRNR AT-kPGR metodu (16 lentelė). Gauti duomenys taip pat atitinka ir anksčiau publikuotus rezultatus, naudojant šias ląsteles CA IX raiškos tyrimams. Pavyzdžiui, A549 ląstelių branduolio ir citoplazmos ekstraktuose, naudojant MAk M75 imunoblotingo metodu, buvo stebimas CA IX raiškos padidėjimas esant hipoksijai, kai normoksijos sąlygomis CA IX neaptikta (Swinson et al., 2003). Tiriant vėžinių hemopoetinių ląstelių linijas, tarp jų ir Jurkat ląsteles, nebuvo nustatyta CA IX raiška (Leppilampi et al., 2002), o tai koreliuoja su šiame tyrime gautais rezultatais. Taigi, tiek naujai sukurtieji MAk, tiek ir sukurtasis AT-kPGR metodas yra specifiški įrankiai, tinkantys CA IX nustatymui biologiniuose mėginiuose, pavyzdžiui, tiriant CA IX raišką klinikiniuose mėginiuose.

### 3.1.5. Dviepitopės imunofermentinės analizės sistema, skirta tirpios karboanhidrazės IX nustatymui

CA IX organizme aptinkama ląstelių membranose, tačiau taip pat aptinkama ir vadinamoji tirpi forma (ektodomenas), kuri susidaro dėl sklėlimo

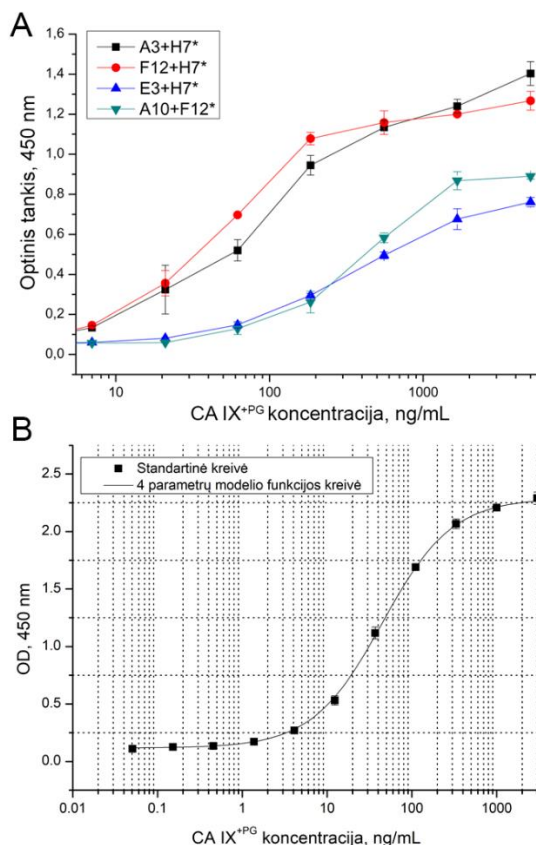
metaloproteazėmis (Vidlickova et al., 2016). Tirpios CA IX formos klinikinė vertė ar jos biologinė funkcija yra vis dar ne iki galo suprasta, todėl jos tyrimams reikalingos patikimos analizės sistemos. Dviepitopė IFA yra skirta kiekybiškai nustatyti tiriamąjį objektą analizuojamame mėginyje, panaudojant du MAK, reaguojančius su skirtingomis baltymo vietomis. Imobilizuotas MAK atpažįsta ir suriša antigeną, o MAK, konjuguotas su fermentine žyme, yra reikalingas signalui gauti.

Kadangi pavyko sukurti didelę MAK kolekciją, kurioje buvo antikūnų, sąveikaujančių su skirtingomis baltymo vietomis, buvo įmanoma sukurti dviepitopę IFA sistemą, skirtą tirpios CA IX formos nustatymui biologiniuose mėginiuose. Sistemos kūrimo ir optimizavimo etapai apėmė tinkamos MAK poros atranką ir jų optimalios koncentracijos parinkimą, tinkamų inkubacijos sąlygų ir laiko nustatymą bei sistemos jautrumo ir specifiskumo analizę (Imbrasaite, 2018).

Pagal gautus konkurencinės IFA rezultatus buvo parinktos MAK, sąveikaujančių su skirtingomis baltymo vietomis, poros ir dviepitopės IFA metodu įvertinta jų galimybė nustatyti tirpale esantį rekombinantinį CA IX<sup>PG</sup> baltymą. Iš viso buvo išbandyti 33 skirtingi porų deriniai, MAK buvo bandomi skirtingose pozicijose – imobilizuoti arba konjuguoti su HRP. Tik keli MAK deriniai pasirodė veiksmingi ir galėjo aptikti rekombinantinį baltymą (33 pav., A), o didžiausiu jautrumu pasižymėjusios poros A3/H7-HRP ir F12/H7-HRP buvo pasirinktos tolimesniems optimizavimo etapams. Iš pasirinktų porų matyti, kad MAK H7 buvo būtinas CA IX nustatymui ir analizės sistema geriausiai veikė, kai jis buvo ne imobilizuotas, o naudojamas kaip HRP žymėtas antikūnas.

Abi atrinktos poros buvo panaudotos dviepitopės IFA sistemos optimizavimui siekiant pagerinti jos jautrumą. Optimalios eksperimento sąlygos buvo tikrinamos pagal keletą parametrų ir parinkti tie, kurie pagerina jautrumą (19 lentelė). Taip pat buvo tikrinami ir kiti sistemos jautrumui įtakos turintys parametrai, tokie kaip MAK imobilizacijos trukmė ir temperatūra, CA IX<sup>PG</sup> skiedimo buferinis tirpalas ir inkubacijos trukmė bei temperatūrinis režimas visuose inkubacijos etapuose. Pagal tai buvo parinkta tinkamesnė MAK pora (MAK A3 ir MAK H7-HRP) ir sudarytas optimalus protokolai (Stravinskiene et al., 2019).

Po optimizavimo etapo buvo įvertintas sistemos jautrumas ir jis siekė  $0,11 \pm 0,05$  ng/mL (30 eksperimentų). Dviepitopės IFA kalibracinės kreivės pavyzdys pateikiamas 33 pav. B, mėginių analizei naudojamas 4 parametrų logistinės kreivės modelis ir „SoftMax Pro“ programinė įranga.



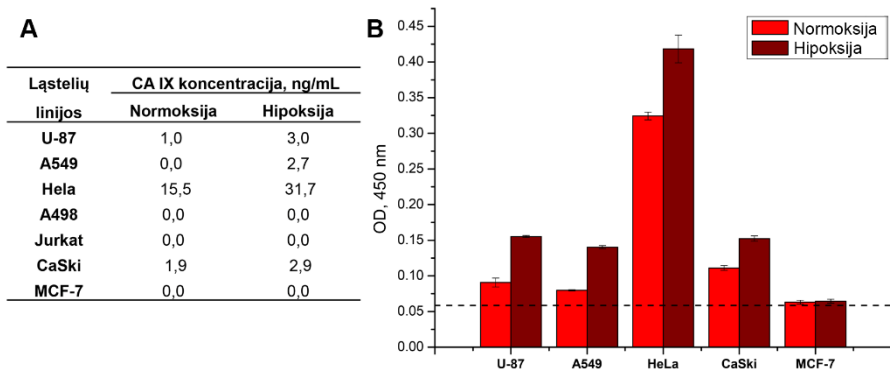
**33 pav.** A – MAk porų atranka dviepitopės IFA metodo kūrimui. \* pažymėtas MAk su prijungta HRP. B – Optimizuotos dviepitopės IFA metodo kalibracinė kreivė naudojant MAk A3 ir H7-HRP.

**19 lentelė.** Optimalių sąlygų, pagal pateiktus parametrus, parinkimas.

Optimizuojamas parametras	Išbandyti variantai	Parinktas optimalus variantas
IFA plokštelė (pagal baltymo surišimo galimybes)	1) 250 ng/cm <sup>2</sup> ( <i>Nerbe plus</i> , Vokietija); 2) 600–650 ng/cm <sup>2</sup> ( <i>Nunc</i> , Danija).	600–650 ng/cm <sup>2</sup> ( <i>Nunc</i> , Danija)
Imobilizacijos buferinis tirpalas	1) PBS 2) imobilizacijos buferinis tirpalas	PBS
Blokavimo buferinis tirpalas	1) PBS su 2 % BSA 2) paruoštas naudojimui „Roti®-Block“ (Roth, Vokietija)	„Roti®-Block“
Imobilizuoto MAk koncentracija	1) 3 µg/mL 2) 5 µg/mL 3) 10 µg/mL	5 µg/mL
Konjuguoto MAk skiedimas	1) 100 x 2) 500 x 3) 1000 x 4) 2000 x	1000 x

Prieš taikant IFA sistemą klinikinių mėginių analizei, optimizuotas metodas buvo panaudotas tiriant vėžinių ląstelių augimo terpes. CA IX nuskėlimas nuo ląstelės paviršiaus vyksta ir vėžinių ląstelių linijų atveju, tuomet CA IX ektodomenas atpalaiduojamas į ląstelių augimo terpę, kur gali būti nustatyta jo tirpi forma. Pirmą kartą tirpi CA IX aptikta normoksijos sąlygomis augintų HT29 (žarnyno vėžio) ląstelių augimo terpėje (Závada et al., 2003), o vėliau nustatyta, kad CaSki, SiHa (gimdos kaklelio karcinomos), ACHN (inkstų ląstelių karcinomos), HeLa ląstelių atveju CA IX kiekis terpėje padidėja esant hipoksijai, ir tai buvo siejama su bendru baltymo raiškos padidėjimu (Zatovicova et al., 2005). A498 ląstelių atveju CA IX terpėje nebuvo nustatyta, kadangi šios ląstelės CA IX nesintetina (Závada et al., 2003).

Naujai optimizuota sistema buvo panaudota tiriant U-87, A549, HeLa, CaSki, A498, MCF-7 ir Jurkat ląstelių linijų augimo terpes, kai ląstelės buvo auginamos normoksijos ir hipoksijos sąlygomis (34 pav., B). Nustatytos koncentracijos pateikiamos 34 pav., A. Gauti rezultatai koreliavo su minėtais ankstesniais tyrimais A498, HeLa ir CaSki ląstelių atveju, o A549 ir U-87 ląstelėse buvo gauti nauji duomenys apie padidėjusį CA IX nuskėlimą hipoksijos sąlygomis. Anksčiau nebuvo tirtos ir Jurkat bei MCF-7 ląstelių linijos, kuriose tirpi CA IX forma nenustatyta. Atlikti bandymai parodo, kad naujai sukurta sistema yra tinkama aptikti natyvų tirpų CA IX baltymą biologiniame mėginyje, naudojant MAk gautus prieš rekombinantinius antigenus.



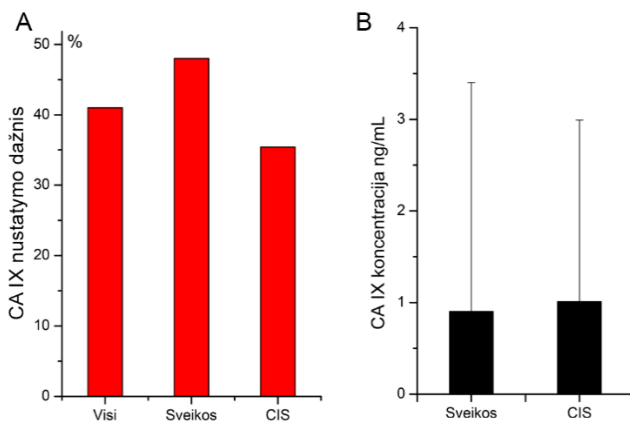
**34 pav.** Dviepitopės IFA taikymas tirpios CA IX nustatymui ląstelių augimo terpėje ląsteles auginant normoksijoje ir hipoksijoje. A – nustatytos CA IX koncentracijos ląstelių augimo terpėje. B – Dviepitopės IFA metodu gautos OD vertės. Punktyrinė linija – fono lygis.

Kitame etape sistema buvo panaudota tiriant žmogaus kraujo plazmos mėginius gautus, vykdant LMT finansuotą SEN-04/2015 projektą. Projekte



buvo tiriami sveikų moterų (n=47) ir moterų, kurioms nustatyti įvairaus laipsnio gimdos kaklelio intraepiteliniai pakitimai (CIS, n=48) mėginiai. Analizuojant visus mėginius (n=95) gauta 40 % CA IX-teigiamų mėginių. Tai rodo, kad naujai sukurta dviepitopės IFA sistema gali nustatyti tirpią natyvią CA IX kraujo plazmos mėginiuose.

Suskirsčius moteris į tiriamąsias grupes, sveikų moterų atveju buvo nustatyta 44,7 % CA IX-teigiamų mėginių, o CIS grupės atveju CA IX aptikta 35,4 % mėginių (35 pav.). Sveikų moterų grupėje nustatyta tirpios CA IX koncentracija kraujo plazmos mėginiuose svyravo intervale nuo 0 iki 14,6 ng/mL (vidurkis 0,9 ng/mL) o CIS grupėje – nuo 0 iki 8 ng/mL (vidurkis, 1,01 ng/mL).



**35 pav.** Tirpios CA IX nustatymas dviepitope IFA kraujo plazmos mėginiuose. A – CA IX-teigiamų mėginių procentas visuose mėginiuose, sveikų moterų ir CIS grupėse. Tarp grupių statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta ( $p > 0,05$  remiantis  $\chi^2$  testu). B – Nustatytas CA IX koncentracijos vidurkis (su standartiniu nuokrypiu) sveikų moterų ir CIS grupėse. Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp grupių nenustatyta ( $p > 0,05$  remiantis *Kruskal-Wallis* testu).

Gauti rezultatai neparodė statistiškai reikšmingo skirtumo tarp tiriamųjų grupių, todėl tirpios CA IX nustatymas kraujo mėginiuose greičiausiai nėra tinkamas vertinant gimdos kaklelio pokyčius. Galimas ir nepakankamas sistemos jautrumas, kuris gali turėti įtakos gautam rezultatui. Nepaisant to, sukurta sistema gali būti naudojama kaip prototipas, kuriant didesnio jautrumo metodus tirpiajai CA IX formai aptikti įvairiuose mėginiuose, siekiant įvertinti šio fermento nuskėlimo biologinę prasmę, klinikinę vertę ar diagnostinį potencialą.

### 3.2. Monokloninių antikūnų prieš karboanhidrazę XII kūrimas, apibūdinimas ir taikymas

Kitas šiame darbe pasirinktas tyrimo objektas buvo CA XII, kurios sąsajos su vėžiniais pakitimais yra mažiau tyrinėtos ir aiškios. Rekombinantiniai CA XII baltymai, susintetinti ir gauti iš VU GMC BTI BVTS, ir sintetinis peptidas, prijungtas prie didelės masės (~390 kDa) baltymo nešiklio moliusko hemocianino (KLH, angl. *Keyhole limpet hemocyanin*), buvo panaudoti kaip antigenai MAK prieš CA XII kūrimui hibridomų technologijos metodu. Antigenų sąrašas pateiktas 20 lentelėje. Didelis antigenų variantų skaičius buvo pasirinktas, norint gauti skirtingomis savybėmis ir galimybėmis pasižyminčius MAK, kuriuos būtų galima taikyti įvairiems imunocheminiams tyrimams.

20 lentelė. CA XII antigenai ir jų aprašymas.

Antigeno pavadinimas ir apibūdinimas	Molekulinė masė	Raiškos sistema/gamintojas
<b>CA12<sup>DE3</sup></b> CA XII katalizinis domenas (nuo 30 iki 291 ar.)	~31 kDa	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)
<b>CA12<sup>HEK</sup></b> CA XII katalizinis domenas (nuo 30 iki 291 ar.)	~35 kDa	FreeStyle Max 293 raiškos sistema (Invitrogen, JAV)
<b>CA12-KLH</b> 167-VKYKGQEA FVPGF-180	~1,5 kDa + ~390 kDa	Mimotopes (Australija)

#### 3.2.1. Monokloniniai antikūnai prieš rekombinantinę bakterijose susintetintą karboanhidrazę XII

##### 3.2.1.1. MAK gavimas

MAK prieš CA XII gavimui buvo panaudotas rekombinantinis CA XII baltymas, susintetintas *E. coli* Rosetta DE3 kamiene (CA12<sup>DE3</sup>). Tai užląstelinis CA XII domenas, neturintis signalinės, transmembraninės ir citoplazminės sekų. Žmogaus ir pelės CA XII baltymo sekų identiškumas yra didelis ir siekia 81,7 %, todėl imunizuojant peles rekombinantiniu žmogaus CA XII baltymu galima susidurti su mažu imunogeniškumo problema. Visgi, bakterijose susintetintas CA12<sup>DE3</sup> skiriasi nuo natyvaus baltymo, kadangi yra neglikozilintas.

Rekombinantinio CA12<sup>DE3</sup> baltymo imunogeniškumas buvo įvertintas netiesioginės IFA metodu, analizuojant 3 kartus imunizuotų pelių kraujo

mėginius su plokštelėje imobilizuotu CA12<sup>DE3</sup> antigenu. Baltymui specifinių antikūnų titras kraujo mėginiuose buvo gana aukštas ir siekė nuo 1:9000 iki 1:21 000, o tai rodo, kad rekombinantinis baltymas buvo imunogeniškas.

Didžiausią CA XII-specifinių antikūnų titrą turinčios pelės blužnies ląstelės buvo panaudotos suliejimui su pelės Sp2/0 mielomos ląstelėmis. Po atrankos selekcinėje terpėje išlikusios hibridinės ląstelės buvo rankiniu būdu testuojamos netiesioginės IFA metodu, naudojant imobilizuotą CA12<sup>DE3</sup> baltymą, ir buvo atrinkti klonai, sekretuojantys specifinius MAK. Iš viso pavyko gauti 7 stabilias hibridomų linijas, kurių sekretuojami MAK buvo pilnai apibūdinti tolimesniuose etapuose.

### 3.2.1.2. MAK apibūdinimas

Fizikinės-cheminės ir imunologinės MAK savybės buvo tiriamos netiesioginės IFA ir imunoblotingo metodais. Pirmiausia buvo nustatytas MAK poklasis bei reakcija su rekombinantiniais baltymais. Iš 7 MAK dauguma buvo IgG1 poklasio ir vienas MAK (klonas 15A4) – IgG2a poklasio (21 lentelė).

**21 lentelė.** Antikūnų prieš CA XII fizikinės-cheminės ir imunologinės savybės.

MAK klonas	Poklasis	Tiriamoji Ka, M	Sąveika su CA XII					
			CA12 <sup>DE3</sup>		CA12 <sup>HEK</sup>		Ląstelinė	
			IFA	IB	IFA	IB	TC	IHC
<b>1D5</b>	IgG1	2,1·10 <sup>-10</sup>	+	+	-	-	-	-
<b>4A6</b>	IgG1	1,1·10 <sup>-9</sup>	+	+	+	+	-	±
<b>5D2</b>	IgG1	5,5·10 <sup>-10</sup>	+	+	-	-	-	-
<b>8C9</b>	IgG1	1,9·10 <sup>-10</sup>	+	+	±	+	-	-
<b>9A8</b>	IgG1	6,2·10 <sup>-10</sup>	+	+	+	+	-	-
<b>13F5</b>	IgG1	1,1·10 <sup>-10</sup>	+	+	±	+	-	-
<b>15A4</b>	IgG2a	2,0·10 <sup>-10</sup>	+	+	+	+	+	+

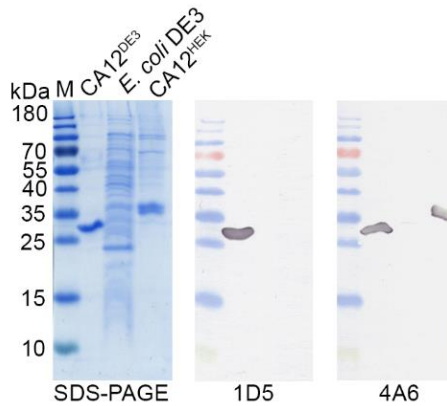
TC – tėkmės citometrija; IHC – imunohistochemija; IB – imunoblotingas; + stipri reakcija; ± silpna/vidutiniška reakcija; – reakcijos nėra.

Visi MAK reagavo tiek su nedematūruotu, tiek su demetatūruotu imunizacijoms naudotu CA12<sup>DE3</sup> baltymu, atitinkamai netiesioginės IFA ir imunoblotingo metodais. Tai rodo, kad MAK sąveikauja su linijiniais CA XII epitopais. MAK buvo specifiški tiksliniam antigenui ir neregavo su *E. coli Rosetta DE3* bakterijų lizato baltymais (21 lentelė, 36 pav.).

*E. coli* bakterijose susintetinti baltymai modifikuojami kitaip nei žinduolių ląstelėse, todėl buvo svarbu išsiaiškinti, ar gautieji MAK gali atpažinti glikozilintą CA XII baltymą. Žmogaus organizme CA XII turi dvi glikozilimo vietas – asparaginą 80 ir 162 (numeracija pagal *Uniprot*

duomenų bazę) (Whittington et al., 2001). Tam tikslui buvo panaudotas CA XII baltymas susintetintas žmogaus HEK-293 ląstelėse (CA12<sup>HEK</sup>), kuriose atliekamos potransliacinės modifikacijos gali būtų panašios į natyvaus baltymo glikozilinimą. MAK 1D5 ir 5D2 neatpažino CA12<sup>HEK</sup> baltymo IFA ir imunoblotingo metodais, o likę MAK jungėsi ir prie glikozilinto CA XII varianto (21 lentelė, 36 pav.).

Kryžminis MAK specifiskumas kitoms CA izoformoms (CA I, II, VII ir XIII) buvo patikrintas IFA ir imunoblotingo metodais, naudojant rekombinantinius baltymus. Dauguma MAK buvo specifiški tik CA XII izoformai, o MAK 13F5 kryžmiškai reagavo su CA II ir CA VII izoformomis IFA metodu, tačiau sąveika buvo silpna. Imunoblotingu sąveikos nebuvo nustatytos. Kryžmiškai aktyvūs MAK gali būti panaudoti, tiriant daugiau nei vieną izoformą, tačiau mažesnis specifiskumas gali įtakoti rezultatų patikimumą.

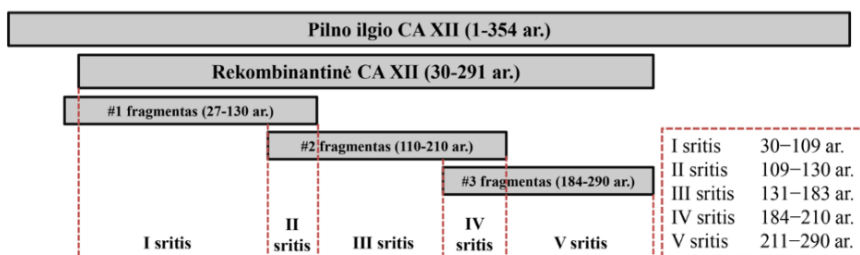


**36 pav.** MAK prieš CA XII sąveika su rekombinantiniais CA12<sup>DE3</sup> ir CA12<sup>HEK</sup> baltymais denatūruojančiomis sąlygomis, pateikiama MAK 1D5 ir 4A6 pavyzdžiai. Kairėje – baltymų elektroforezė (SDS-PAGE), dešinėje imunoblotingo membranos. M – baltymų molekulinės masės standartas (nuo 10 iki 180 kDa), neigiama kontrolė naudotas *E. coli Rosetta DE3* kamieno bakterijų lizatas.

Kadangi visi MAK atpažino linijinius epitopus, buvo įmanoma nustatyti jų sąveikos su baltymu vietą, naudojant persiklojančius baltymo fragmentus. Siekiant nustatyti MAK epitopus, *E. coli* bakterijose buvo susintetinti 3 persiklojantys baltymo fragmentai (37 pav.) (dr. V. Juozapaitienė, VU GMC BTI BVTS) ir juos sintetinančių bakterijų lizatai buvo analizuojami imunoblotingo metodu, naudojant MAK. Fragmentai buvo prijunti prie GST baltymo, kurį galima aptikti komerciniais anti-GST antikūnais, ir patvirtinti fragmentų sintezę bakterijose. Visi fragmentai buvo efektyviai sintetinami

(rezultatai nepateikiami), todėl buvo tinkami tolimesnei analizei su sukurtais MAK prieš CA XII.

Visi MAK reagavo su vienu arba dviem CA XII fragmentais (22 lentelė). Dėl fragmentų persiklojimo galima išskirti 5 ar. sritis: jei MAK reaguoja su vienu fragmentu, tai epitopas apima ar., kurios nėra fragmentų persiklojime, jei MAK reaguoja su dviem fragmentais, tai jo epitopas yra fragmentų persiklojimo srityje. MAK 1D5, 4A6 ir 5D2 atpažino #1 fragmentą, kuris atitinka CA XII baltymo N-galo regioną, ir nesąveikavo su #2 fragmentu, todėl jų epitopai lokalizuoti tarp CA XII baltymo 30 ir 109 ar.



**37 pav.** Schematiškai pavaizduotas su GST sulietų CA XII fragmentų, panaudotų MAK epitopų nustatymui, išsidėstymas pilno ilgio ir rekombinantinio CA XII baltymo atžvilgiu. Dėl fragmentų persiklojimo susidarė 5 sritis (I-V), su kuriomis gali reaguoti MAK.

**22 lentelė.** MAK sąveika su CA XII fragmentais ir galimų epitopų ar. sekų lokalizacija.

MAK klonas	CA XII fragmentai			MAK epitopo lokalizacija
	#1 (27-130 ar.)	#2 (111-210 ar.)	#3 (184-290 ar.)	
1D5	+	-	-	30-109 ar.
4A6	+	-	-	30-109 ar.
5D2	+	-	-	30-109 ar.
8C9	-	-	+	211-290 ar.
9A8	-	+	+	184-210 ar.
13F5	-	-	+	211-290 ar.
15A4	-	+	+	184-210 ar.

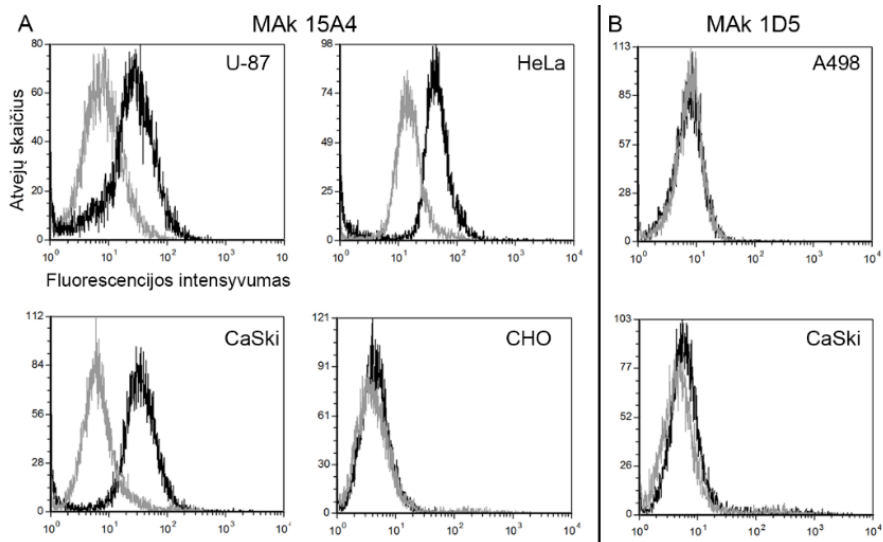
MAK 8C9 ir 13F5 reagavo tik su #3 fragmentu, kuris atitinka baltymo C-galo regioną, todėl jų epitopai lokalizuoti tarp 211 ir 290 ar. MAK 9A8 ir 15A4 atpažino du fragmentus – #2 ir #3, todėl jų epitopai greičiausiai yra šių fragmentų persiklojime, kuris apima 184-210 ar. sritį. Reikėtų atkreipti dėmesį, kad nors vienai sričiai galima priskirti kelis MAK, tačiau tai nereiškia, kad jų epitopo seka sutampa. MAK gali sąveikauti su vidutiniškai 8-20 ar.

ilgio epitopais (Wang et al., 2011), bet epitopai gali būti ir trumpesni (Kucinskaite-Kodze et al., 2016).

### 3.2.1.3. MAk sąveika su CA XII biologiniuose mėginiuose

MAk sąveika su ląsteline CA XII buvo patikrinta tėkmės citometrijos metodu, naudojant vėžinių ląstelių linijas, ir imunohistochemijos metodu formalinu fiksuotuose bei parafinizuotuose audiniuose.

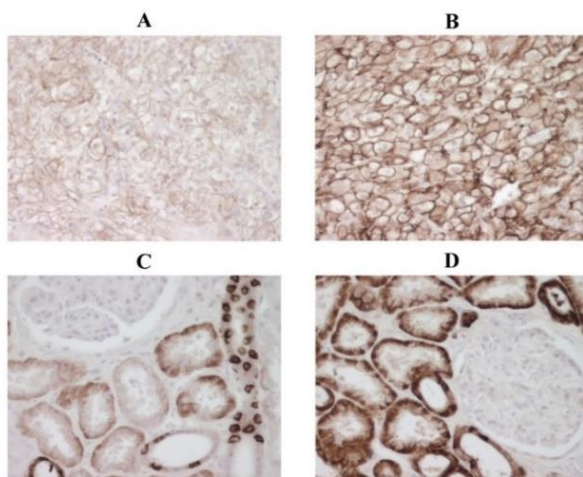
Tėkmės citometrijoje buvo analizuotos normoksijos sąlygomis augintos A498, U-87, A549 ir HeLa ląstelės, kuriose anksčiau buvo nustatyta įvairaus lygio CA XII raiška baltymo ar iRNR lygmenyje (Haapasalo et al., 2008; Ivanov et al., 2001; Kobayashi et al., 2012), bei CaSki ląstelės, kuriose CA XII raiška anksčiau nebuvo analizuota. Neigiamą kontrolę buvo panaudotos CHO ląstelės.



**38 pav.** U-87, HeLa, CaSki, A498 ir CHO ląstelių analizė tėkmės citometrijos metodu, naudojant MAk: A – 15A4 (IgG2a poklasis, juoda linija), B – 1D5 (IgG1 poklasis, juoda linija). Pilka linija – izotipinė kontrolė (nesusiję atitinkamo poklasio MAk prieš KPV).

Vienintelis MAk 15A4 sąveikavo su ląsteline CA XII fiksuotose ir permeabilizuotose A498, U-87, A549 ir HeLa ląstelėse ir nereagavo su CHO ląstelių baltymais. Tai patvirtino MAk specifiškumą CA XII baltymui. Nauji duomenys buvo gauti CaSki ląstelių linijos atveju, kai naudojant MAk 15A4, buvo aptikta CA XII raiška (38 pav., A). Šiuo metodu MAk 1D5, 4A6, 5D2 ir 9A8 buvo neaktyvūs (38 pav., B). Du MAk 8C9 ir 13F5 parodė nespecifinį dažymą, nes reagavo su CHO ląstelėmis (rezultatai nepateikiami).

Imunohistochemijos metodas buvo pasitelktas, siekiant patikrinti MAk sąveiką su audinyje esančia CA XII, ir įvertinti MAk potencialą klinikinių mėginių tyrimuose (39 pav.). Eksperimentai buvo atlikti mano stažuotės metu prof. Seppo Parkkila grupėje Biomedicinos Technologijų Institute, Tampere universitete, Suomijoje. Imunohistocheminė reakcija buvo atlikta, naudojant įvairius formaline fiksuotus ir parafinizuotus gaubtinės žarnos karcinomos ir adenomos, normalios gaubtinės žarnos, normalaus ir vėžinio inkstų audinių mėginius. CA XII raiška mėginiuose buvo patvirtinta, naudojant polikloninius antikūnus, kurie buvo anksčiau gauti ir naudoti minėtoje laboratorijoje. Izotipinė kontrolė buvo naudoti atitinkamo izotipo MAk prieš KPv.



**39 pav.** MAk prieš CA XII baltymą specifiskumo tyrimas IHC metodu, naudojant inkstų vėžinio (A, B) ir normalaus inkstų (C, D) audinio mėginius. Tyrimams naudota MAk sekretuojančių hibridomų augimo terpė: MAk 4A6 (A, C) – skiedimas 1:10, MAk 15A4 (B, D) – skiedimas 1:100. Naudotas padidinimas 40 x.

Teigiamą specifinę reakciją parodė MAk 4A6 ir 15A4 (39 pav.), MAk 8C9 ir 13F5 veikė nespecifiškai, o likę MAk visai nereagavo (duomenys nepateikiami). MAk 4A6 buvo specifiskas, tačiau pasižymėjo kur kas silpnesne reakcija, todėl analizei reikėjo didesnio jo kiekio, o MAk 15A4 veikė ne tik specifiskai, bet ir labai stipriai. Tai gali būti paaiškinta skirtingomis šių MAk tariamosiomis  $K_d$  (21 lentelė), kurios skyrėsi apie 20 kartų. Būtent pastarasis MAk 15A4 turi didžiausią potencialą jį taikyti klinikinių mėginių tyrimams, nes yra itin specifiskas ir pasižymi dideliu giminingumu CA XII baltymui.

Įsitikinus, kad MAk 15A4 yra itin specifiskas ląstelinei CA XII audiniuose, jis buvo panaudotas klinikinių mėginių tyrimams imunohistochemijos metodu. Mėginiai buvo prospektyviai surinkti, vykdant LMT projektą LIG-

09/2012, iš ištirti VPC. Naudojant mikrogardelių principą, su MAk 15A4 buvo ištirti 106 pacientų navikiniai ir perinavikiniai (nepakitęs, tačiau greta naviko esantis audinys) krūties (n=59), plaučių (n=34) ir inkstų (n=13) audinių mėginiai (po du pakartojimus).

Imunohistochemijos tyrimo rezultatai buvo vertinami trijų tyrėjų pusiau kiekybiškai visame mėginio plote, remiantis dažymosi intensyvumu ir dažymosi plotu pagal nustatytus kriterijus (23 lentelė). Dažymosi bendras įvertis buvos skaičiuojamas, sudauginant nusidažiusio ploto ir intensyvumo verčių vidurkius, išvestus iš dviejų audinio pakartojimų ir visų tyrėjų vertinimo. Minimali dažymosi bendro įverčio vertė 0, maksimali – 9. Statistinė duomenų analizė buvo atlikta dr. V. Petrikaitės.

**23 lentelė.** Audinių dažymo imunohistochemijos metodu vertinimo kriterijai.

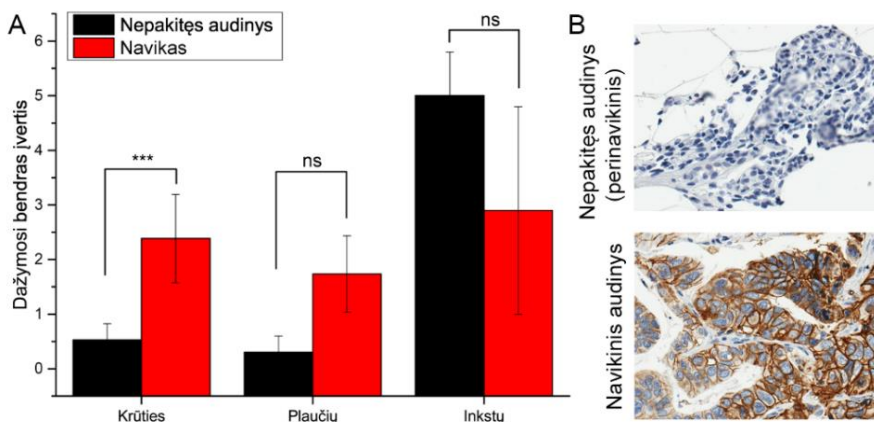
Dažymosi plotas	Įvertinimas	Dažymosi intensyvumas	Įvertinimas
Nesidažo	0	Nesidažo	0
1–10 %	1	Silpnas	1
11–50 %	2	Vidutinis	2
51–100 %	3	Stiprus	3

Naudojant MAk 15A4, buvo stebimas dažnesnis ir intensyvesnis navikinio audinio dažymas, lyginant su perinavikiniais tų pačių pacientų audiniais. Nustatyta, kad CA XII raiška krūties vėžiniuose mėginiuose yra statistiškai patikimai didesnė nei sveikuose audiniuose ( $p = 0,00045$ , remiantis *Wilcoxon* testu) (40 pav., A). Plaučių vėžio atveju tendencijos buvo panašios – perinavikiame audinyje buvo stebima mažesnė CA XII raiška, nes dažymasis buvo mažiau intensyvus, o vėžinių audinių mėginiai dažėsi ryškiau (40 pav., B), tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo nustatyti nepavyko ( $p=0,117$ , remiantis *Wilcoxon* testu). Inkstų vėžio atveju pastebėta priešinga tendencija, nes perinavikiniai audiniai dažėsi labiau nei navikiniai, tačiau skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas ( $p=0,168$ , remiantis *Wilcoxon* testu) (40 pav., A).

Gauti klinikinių mėginių duomenys atitinka anksčiau literatūroje aprašytus rezultatus. CA XII yra sintetinama normaliame inkstų audinyje, ypač distalinių kanalėlių, kylančiosios Henlės kilpos atkarpos ir surenkamųjų kanalėlių epitelinėse ląstelėse, todėl CA XII yra svarbi normaliai inkstų funkcijai. Ši izoforma nustatyta ir inkstų vėžiniame audinyje (Parkkila et al., 2000a). CA XII raiška normaliame krūties audinyje yra lokali ir nestipri, o plaučių atveju CA XII normaliame audinyje nebuvo aptikta. Tačiau esant vėžiniams pakitimams, CA XII aptinkama dažniau ir ji daug intensyvesnė (Ilie et al., 2013, 2011; Watson et al., 2003). Taigi naujieji MAk 15A4, gali būti



labai vertingas įrankis, tiriant CA XII raišką audiniuose, bei siekiant įvertinti ne tik jos fiziologinę svarbą, bet ir dalyvavimą patologiniuose procesuose vystantis vėžiui.



**40 pav.** A – Imunohistocheminis CA XII raiškos vertinimas krūties, plaučių ir inkstų perinavikiniuose ir navikiniuose audiniuose, naudojant MAK 15A4. Pateikiamos dažymosi bendro įverčio vidurkinės vertės su pasikliauties intervalais. \*\*\*  $p < 0,001$ , ns – statistiškai nereikšminga, remiantis *Wilcoxon* testu. B – Plaučių perinavikinio ir navikinio audinio mėginių imunohistocheminis dažymas, naudojant MAK 15A4. Optinis padidėjimas 40 x.

Nepaisant diagnostinio potencialo ir vertės laboratoriniams tyrimams, šie sukurti MAK prieš CA12<sup>DE3</sup> antigeną negali būti taikomi terapiniams tikslais, kadangi jie nesąveikavo su natyviu CA XII esančiu gyvų ląstelių paviršiuje tėkmės citometrijos metodu (duomenys nepateikiami). Jie taip pat neturėjo rekombinantinę CA XII slopinančių savybių, todėl buvo toliau kuriamos naujos MAK prieš CA XII kolekcijos, siekiant gauti ne tik diagnostinį, bet ir terapinį potencialą turinčius MAK ir juos pritaikyti RAK kūrimui.

### 3.2.2. Monokloniniai antikūnai prieš karboanhidrazės XII fragmentą

#### 3.2.2.1. MAK gavimas

Pasirinktą baltymo seką atitinkantys sintetiniai peptidai, naudojami imunizacijai, norit tikslingai gauti MAK prieš tam tikras baltymo dalis. Dėl mažo dydžio, peptidai yra mažai imunogeniški, todėl yra prijungiami prie didelės molekulinės masės imunogeniško baltymo nešiklio, pavyzdžiui, KLH. Vienas tikslų, kuriant MAK prieš CA XII, buvo gauti fermentinį aktyvumą slopinančius MAK, kurie sąveikautų su natyviu CA XII baltymu. Norint gauti aktyvumą slopinančius MAK, nukreiptus prieš CA XII katalizinį domeną,

pirmiausia buvo atlikta bioinformatinė baltymo sekų analizė (dr. V. Kairys, VU GMC BTI Bioinformatikos skyrius).

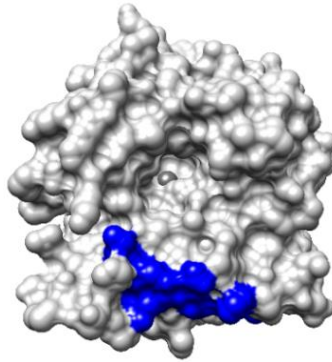
Sekos parinktos vadovaujantis keliais kriterijais:

1) sekų lokalizacija baltymo paviršiuje netoli aktyvaus centro, siekiant gauti MAk reaguojančius su natyvia CA XII;

2) sekų unikalumas, lyginant su kitom CA izoformomis, siekiant sumažinti kryžmiškai veikiančių MAk susidarymo galimybę;

3) mažas sekų panašumas su pelės CA XII ar kitais baltymais, norint išvengti žemo imunogeniškumo.

Buvo sudarytas CA XII katalizinio domeno modelis, remiantis PDB duomenų bazės 1JD0 įrašu, ir, atsižvelgiant į išvardintus kriterijus, nustatytos baltymo paviršiuje esančios sekos, lokalizuotos arti katalizinio centro. Iš viso buvo atrinktos 5 potencialios sekos (ar. numeruotos pagal 1JD0): #1 (1–22 ar.), #2 (70–77 ar.), #3 (117–128 ar.), #4 (233–242 ar.) ir #5 (167–180 ar.). Kitame etape buvo atliktas pasirinktų sekų palyginimas su pelės baltymais, norint atmesti aukšto panašumo sekas, kurios galėtų nesukelti imuninio atsako pelių organizme. Peptidų #1–4 ar. sekų identiškumas su pelės baltymais, pavyzdžiui, su pelės CA XII, siekė 78–91 %. Peptido #5 ar. seka buvo panaši su pelės P2X purino receptoriu tik 60 %, todėl tikėtina, kad būtent šis peptidas bus imunogeniškas pelės organizme. Jis buvo pasirinktas tolimesniems darbams. Peptido #5 lokalizacija CA XII baltymo modelyje pateikta 41 pav.



**41 pav.** Žmogaus CA XII baltymo paviršius (PDB ID 1JD0) be ligando. Matomas aktyvus centras su jame esančiu cinko jonu viduryje (tamsiai pilka spalva). Peptido #5 lokalizacijos vieta parodyta mėlyna spalva (dr. V. Kairys).

Sintetinis peptidas #5 (167–180 ar.), konjuguotas su KLH baltymu nešikliu, pasižymėjo aukštu imunogeniškumu (CA XII-specifinių antikūnų titras 1:20 000), kaip buvo numatyta bioinformatinės analizės metodais. Po ląstelių hibridizacijos klonai buvo auginami standartinėmis sąlygomis.

Specifinius MAK sekretuojančios hibridomos atrinktos netiesioginės IFA metodu, naudojant rekombinantinį CA12<sup>DE3</sup> baltymą. Po kelių testavimo ir klonavimo ciklų pavyko gauti dvi stabilias hibridomų linijas, sekretuojančias MAK 1D8 ir MAK 3C8.

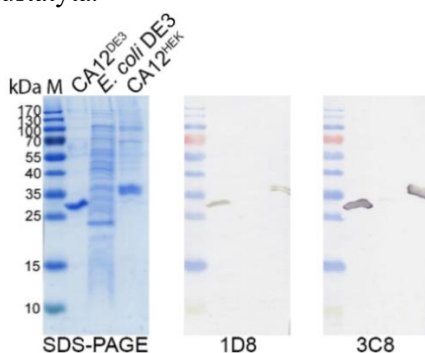
### 3.2.2.2. MAK apibūdinimas

Abu MAK buvo IgG1 izotipo ir pasižymėjo aukštu giminingumu rekombinantiniam CA12<sup>DE3</sup> baltymui netiesioginės IFA metodu (24 lentelė). MAK sąveika su šiuo baltymu denatūruojančiomis sąlygomis buvo patikrinta imunoblotingo metodu po baltymų elektroforezės. MAK specifiskai atpažino 31 kDa dydžio CA12<sup>DE3</sup> baltymą ir nereagavo su bakterijų lizato, kuriose buvo susintetintas rekombinantinis CA12<sup>DE3</sup>, baltymais (42 pav.). Taip pat MAK reagavo su glikozilintu CA12<sup>HEK</sup> baltymu (24 lentelė, 42 pav.).

**24 lentelė.** MAK prieš CA12-KLH peptidą savybės.

MAK klonas	Poklasis	Tariamoji K <sub>d</sub> , M	Sąveika su antigenais			
			CA12 <sup>DE3</sup>		CA12 <sup>HEK</sup>	
			IFA	IB	IFA	IB
<b>1D8</b>	IgG1	6,1·10 <sup>-9</sup>	+	+	+	+
<b>3C8</b>		1,2·10 <sup>-9</sup>	+	+	+	+

Naudojant rekombinantinius išgrynintus CA I, II, VII ir XIII baltymus, netiesioginės IFA ir imunoblotingo metodais buvo patikrintas gautų MAK kryžminis reaktyvumas. Jokių sąveikų nustatyta nebuvo, o tai rodo išskirtinį abiejų MAK specifiskumą CA XII izoformai. Palyginus peptido #5 ar. seką su kitų CA izoformų sekomis, buvo gautas nedidelis identiškumas arba panašumo nebuvo nustatyta.



**42 pav.** MAK 1D8 ir 3C8 sąveika su rekombinantiniais CA12<sup>DE3</sup> ir CA12<sup>HEK</sup> baltymais denatūruojančiomis sąlygomis. Pateikiama baltymų elektroforezė (kairėje) ir IB membranos. M – baltymų molekulinės masės standartas (nuo 10 iki 180 kDa), kaip neigiama kontrolė naudotas *E. coli* DE3 kamieno bakterijų lizatas.

Svarbu nustatyti, ar šie MAk gali slopinti CA XII fermentinį aktyvumą. Tai buvo ištirta sustabdytos srovės (tėkmės) (angl. *stopped-flow*) CO<sub>2</sub> hidratacijos metodu, bendradarbiaujant su Florencijos universiteto (Italija) tyrėjų grupe. Tyrimui buvo naudojami rekombinantiniai CA XII ir CA II (kontrolinis) baltymai, susintetinti Florencijos universitete. Šiuo metodu patikrintos įvairios MAk 1D8 ir 3C8 koncentracijos intervale nuo 0,001 nM iki 10 μM. Prieš testą MAk buvo inkubuojami su baltymais, leidžiant susiformuoti antikūno-antigeno kompleksui. Slopinimo konstanta (IC<sub>50</sub>) buvo nustatyta nelinijiniu mažiausių kvadratų metodu iš trijų pakartojimų (25 lentelė).

**25 lentelė.** MAk 1D8 ir 3C8 slopinimo konstantos (IC<sub>50</sub>).

Antikūno klonas	IC <sub>50</sub> (nM)	
	CA XII	CA II
1D8	49,2	> 100 000
3C8	6,6	> 100 000

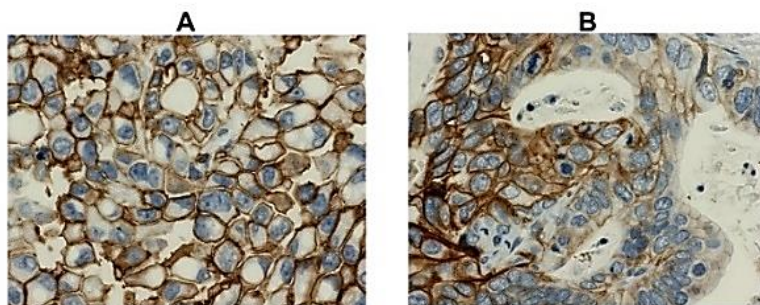
Buvo nustatyta, kad abu MAk yra stiprūs CA XII slopikliai ir jų IC<sub>50</sub> siekia 49,2 nM (1D8) ir 6,6 nM (3C8), o CA II slopinimas nenustatytas. Nors abiejų MAk epitopas yra vienodas, tačiau IC<sub>50</sub> šiek tiek skiriasi, o tai gali būti paaiškinta skirtingomis tariamosiomis K<sub>d</sub>. Didesnio giminingumo MAk 3C8 yra stipresnis CA XII slopiklis. Jo IC<sub>50</sub> yra artima anksčiau publikuotam anti-CA XII MAk 6A10 (3,1 nM), kuris buvo gautas žiurkėse prieš ląstelinę CA XII (Battke et al., 2011).

### 3.2.2.3. MAk sąveika su CA XII biologiniuose mėginiuose

MAk 1D8 ir 3C8 sąveika su ląsteline CA XII buvo patikrinta imunohistochemijos metodu, naudojant formalinu fiksuotus ir parafinizuotus žmogaus krūties ir plaučių vėžio audinių mėginius (43 pav.). Mėginiai buvo surinkti Nacionaliniame vėžio institute (Vilnius, Lietuva) ir ištirti VPC. CA XII raiška šiuose audiniuose buvo patvirtinta, naudojant MAk 15A4, kuris buvo gautas prieš CA12<sup>DE3</sup> baltymą. Izotipine kontrole buvo panaudoti anksčiau laboratorijoje sukurti IgG1 izotipo MAk prieš KPV. MAk 3D8 stipriai ir specifiskai reagavo su CA XII audinyje (43 pav.), o MAk 1D8, naudojant vienodą koncentraciją, nereagavo.

Gautieji MAk 1D8 ir 3C8 yra sėkmingas tikslinio antikūnų kūrimo pavyzdys, siekiant sukurti MAk prieš tam tikras baltymo sritis. Labai svarbu parinkti tinkamas ar. sekas, kurios gali būti ne tik svarbios keliamais

tikslams įgyvendinti, pavyzdžiui, prisijungęs MAk slopintų fermentinį baltymo aktyvumą, bet ir būtų imunogeniškos pelių organizme.



**43 pav.** Imunohistocheminis žmogaus invazinės krūties karcinomos (A) ir žmogaus plaučių adenokarcinomos (B) mėginių dažymas. Teigiamą reakciją su CA XII audinyje parodė MAk 3C8. Hibridomų augimo terpė skiesta 1:10, padidinimas 40 x.

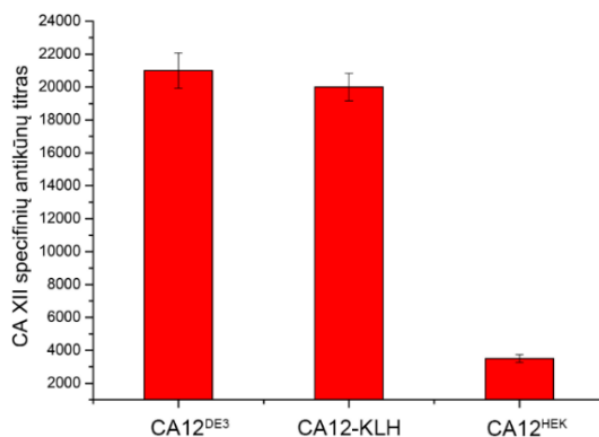
Deja, gautieji MAk netenkino visų keliamų tikslų – jie neatpažino CA XII baltymo gyvų ląstelių paviršiuje (tėkmės citometrijos metodu, buvo tirtos A549 ląstelės augintos hipoksijos sąlygomis, rezultatai nepateikiami), todėl buvo kuriami nauji MAk, tikintis gauti MAk slopinančius CA XII fermentinį aktyvumą ir sąveikaujančius su natyviu baltymu gyvų ląstelių paviršiuje.

### 3.2.3. Monokloniniai antikūnai prieš rekombinantinę žmogaus ląstelėse susintetintą karboanhidrazę XII

#### 3.2.3.1. MAk kūrimas

Naujas antigenas – žmogaus ląstelėse susintetintas rekombinantinis CA XII baltymas (CA12<sup>HEK</sup>) – buvo pasirinktas, norint gauti MAk, atpažįstančius natyvią CA XII formą gyvose ląstelėse ir turinčius baltymą slopinančių savybių. Tai aktualu, siekiant gauti terapinį potencialą turinčius MAk ir RAK. Baltymai susintetinti HEK-293 ląstelėse, turi didesnę tikimybę būti tinkamai glikozilinti po transliacijos, todėl gali turėti panašią į natyvios CA XII struktūrą (Bandaranayake and Almo, 2014).

Naudojant tokį rekombinantinį baltymą pelių imunizacijoms, buvo didelė tikimybė, kad dėl baltymo panašumo su pelės CA XII, gali nesusidaryti imuninis atsakas. Po 3 imunizacijų netiesioginės IFA metodu patikrinus pelių kraujo mėginius, buvo nustatytas žemas CA XII-specifinių MAk titras, kuris siekė 1:3500. Palyginus titrus, nustatytus po pelių imunizacijų su bakterijose susintetintu rekombinantiniu baltymu CA12<sup>DE3</sup> ir sintetiniu peptidu CA12-KLH, tapo aišku, kad CA12<sup>HEK</sup> baltymas buvo mažiausiai imunogeniškas (44 pav.).



**44 pav.** CA XII specifinių antikūnų titras pelių kraujyje po imunizacijų skirtingais antigenais: CA12<sup>DE3</sup>, CA12-KLH, CA12<sup>HEK</sup>. Titras nustatytas naudojant CA12<sup>DE3</sup> baltymą netiesioginės IFA metodu.

Dėl mažo specifškų MAK kiekio pelių kraujyje ir siekiant gauti kuo didesnį MAK skaičių, buvo atliktos dvi hibridizacijos, naudojant dviejų pelių su didžiausiu antikūnų titru blužnies ląsteles. Turint didelę MAK kolekciją, didėja tikimybė gauti norimų savybių MAK. Hibridomų selekcija buvo atliekama įprastomis sąlygomis, o CA XII-specifiški MAK buvo atrinkti netiesioginės IFA metodu, naudojant CA12<sup>HEK</sup> antigeną.

Po visų atrankos etapų, hibridinių ląstelių monokloniškumo ir stabilumo tyrimų, buvo gautos 24 stabilios hibridomų linijos, kurių sekretuojami MAK buvo visapusiškai apibūdinti įvairiais imunocheminiais metodais.

### 3.2.3.2. MAK apibūdinimas

Pavykus gauti didelę naujų MAK prieš CA XII kolekciją, jie buvo išsamiai apibūdinti. Buvo nustatyti visų MAK poklasiai: dauguma MAK buvo IgG1 subtipo (18 iš 24), bet pavyko gauti po du IgG2a ir IgG2b subtipų MAK (26 lentelė). Skirtingų subtipų MAK pasižymi skirtingomis savybėmis juos gryninant. Pagal MAK subtipą parenkamos optimalios gryninimo sąlygos, siekiant gauti maksimalią išgryninto antikūno išėigą. Skirtingų izotipų antikūnams taip pat reikia pritaikyti ir atitinkamo izotipo neigiamą kontrolę. Skirtingų poklasių MAK gal savitai jungtis su atsitiktiniais ląstelių baltymais, o tai gali nulemti nespecifinį signalą, pavyzdžiui, tėkmės citometrijos metu.

Visi MAK atpažino linijinius epitopus, kadangi reagavo su rekombinantiniu CA12<sup>HEK</sup> baltymu imunoblotingo metodu po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis. Tačiau 3 iš jų (MAK 9B9, 13G2

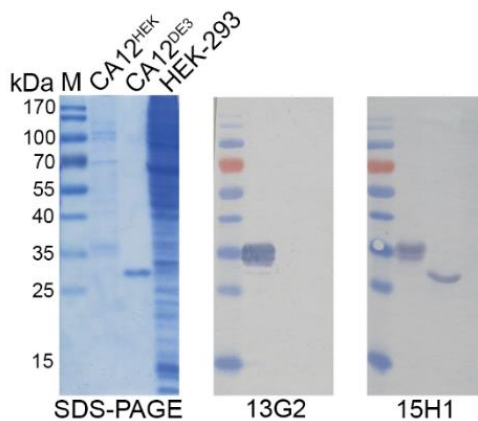
ir 20C4) imunoblotingo metodu nereagavo su CA12<sup>DE3</sup> (45 pav.), kuris dėl sintezės bakterijose buvo neglikozilintas. Tai leidžia manyti, kad šie MAK gali būti susidarę būtent prieš glikozilintas CA12<sup>HEK</sup> sritis. IFA metodu buvo gauti analogiški rezultatai.

Išgryninti rekombinantiniai kitų izoformų baltymai (CA I, II, III, IV, VA, VB, VI, VII, IX, XIII ir XIV) buvo panaudoti IFA ir imunoblotingo tyrimams, siekiant įvertinti naujai sukurtų MAK kryžminį specifiškumą (26 lentelė). Keli MAK sąveikavo su CA I, CA II, CA VI ir CA XIII baltymais, tačiau sąveika buvo silpna, beveik neigiamos kontrolės lygio. MAK 9B9, 13G2 ir 20C4 labai stipriai sąveikavo su CA IV ir CA IX (CA IX<sup>PG</sup>) rekombinantiniais baltymais, kurie buvo susintetinti HEK-293 ląstelėse, kaip ir CA12<sup>HEK</sup> antigenas, naudotas imunizacijoms. Tai patvirtina ankstesnę prielaidą, kad šių MAK atpažįstamas epitopas yra glikozilinimo metu susidarę angliavandeniai, o ne pats baltymas.

**26 lentelė.** Apibendrinti MAK charakterizavimo rezultatai.

MAK klonas	Poklasis	IFA, IB			TC	Tariamoji K <sub>d</sub> , mol/L
		CA12 <sup>HEK</sup>	CA12 <sup>DE3</sup>	Kitos CA izoformos		
<b>1B10</b>	IgG1	+	+	–	+	2,4·10 <sup>-10</sup>
<b>1E7</b>	IgG2b	+	+	CA XIII	+	1,4·10 <sup>-9</sup>
<b>2G10</b>	IgG2b	+	+	CA XIII	+	5,3·10 <sup>-10</sup>
<b>6D12</b>	IgG1	+	+	–	+	1,1·10 <sup>-9</sup>
<b>6G5</b>	IgG2a	+	+	CA I, CA II	–	*
<b>6G10</b>	IgG1	+	+	–	+	1,2·10 <sup>-9</sup>
<b>6H2</b>	IgG1	+	+	–	+	1,7·10 <sup>-8</sup>
<b>9B9</b>	IgG1	+	–	CA IV, CA IX	–	*
<b>9D6</b>	IgG1	+	+	–	+	2,3·10 <sup>-10</sup>
<b>10C7</b>	IgG1	+	+	–	+	2,4·10 <sup>-9</sup>
<b>11A12</b>	IgG2a	+	+	–	+	1,4·10 <sup>-8</sup>
<b>11C5</b>	IgG1	+	+	–	+	2,5·10 <sup>-10</sup>
<b>12H2</b>	IgG1	+	+	–	–	*
<b>13G2</b>	IgG1	+	–	CA IV, CA IX	–	*
<b>14D6</b>	IgG1	+	+	CA II	+	2,0·10 <sup>-9</sup>
<b>15B4</b>	IgG1	+	+	–	+	7,3·10 <sup>-9</sup>
<b>15H1</b>	IgG1	+	+	–	+	3,3·10 <sup>-9</sup>
<b>16A8</b>	IgG1	+	+	–	+	7,7·10 <sup>-10</sup>
<b>17E9</b>	IgG1	+	+	–	+	1,5·10 <sup>-9</sup>
<b>17A3</b>	IgG1	+	+	–	+	1,8·10 <sup>-9</sup>
<b>20C3</b>	IgG1	+	+	–	+	1,6·10 <sup>-9</sup>
<b>20C4</b>	IgG1	+	–	CA IV, CA IX	–	*
<b>20G7</b>	IgG2b	+	+	CA II, CA VI	–	*
<b>22A2</b>	IgG2b	+	+	–	+	1,2·10 <sup>-9</sup>

\* K<sub>d</sub> nebuvo nustatyta tiems MAK, kurie nereagavo tėkmės citometrijos metodu.



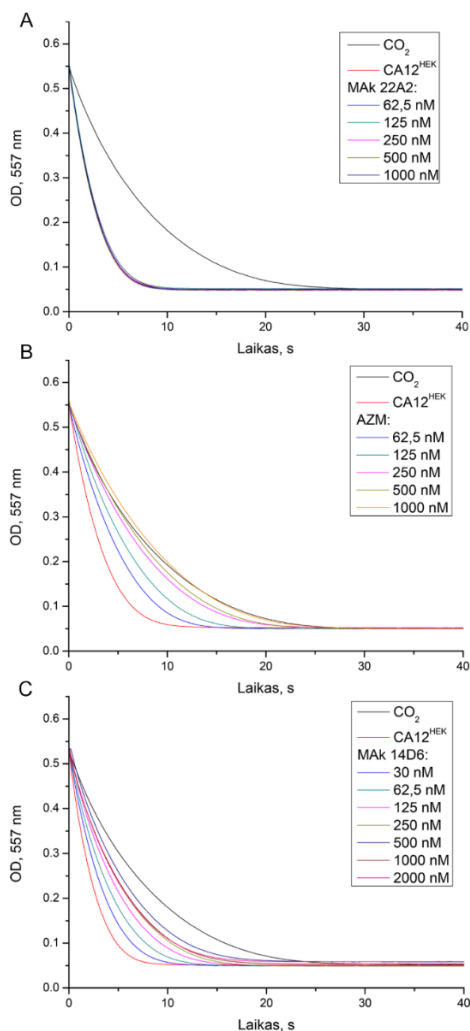
**45 pav.** MAK 13G2 ir 15H1 sąveika su denatūruotais CA12<sup>HEK</sup> ir CA12<sup>DE3</sup> baltymais imunoblotingo metodu. Kairėje – SDS-PAGE nuotrauka, dešinėje – imunoblotingo membranos analizuotos su MAK. M – baltymų molekulinio svorio standartas (nuo 10 iki 170 kDa), kaip neigiama kontrolė naudotas HEK-293 ląstelių lizatas.

Kitame charakterizavimo etape buvo patikrinta MAK įtaka rekombinantinio CA12<sup>HEK</sup> baltymo fermentiniam aktyvumui (Dr. L. Baranauskienė, VU GMC BTI BVTS). CA XII CO<sub>2</sub> hidratacinis aktyvumas buvo matuotas sustabdytos tėkmės metodu (46 pav.) (Khalifah, 1971).

Buvo patikrinti skirtingi MAK arba mažamolekulinio slopiklio acetazolamido (AZM) kiekiai nuo 0 iki 2 μM. Katalizuojamos reakcijos greitis buvo lyginamas su savaiminės CO<sub>2</sub> hidratacijos reakcijos greičiu. Disociacijos konstantos suskaičiuotos, taikant *Morrison* lygtį. Vienintelis MAK 14D6 turėjo slopinantį poveikį CA12<sup>HEK</sup>. Nustatyta IC<sub>50</sub> (~42 nM) buvo artima klasikinio CA slopiklio AZM IC<sub>50</sub> (~37,5 nM). Toks MAK gali turėti terapinį potencialą, o tai itin svarbu siekiant parinkti MAK, iš kurio bus sintetinami RAK.

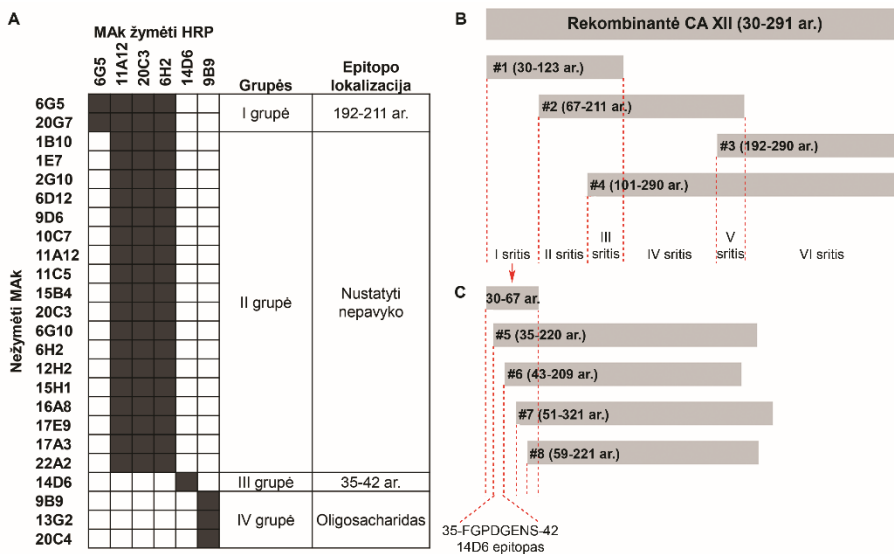
Šeši MAK, atsižvelgiant į anksčiau nustatytas jų savybes, buvo pažymėti HRP, ir gauti konjugatai buvo panaudoti konkurencinėje IFA, tiriant MAK epitopų lokalizaciją bei grupuojant MAK į tarpusavyje konkuruojančius arba nekonkuruojančius dėl prisijungimo prie CA XII vietas. Visi galimi nežymėtų ir žymėtų MAK variantai buvo išbandyti ir po analizės konkurencinės IFA metodu, MAK buvo suskirstyti į 4 tarpusavyje nekonkuruojančias grupes, kurių MAK sąveikavo su skirtingomis baltymo vietomis (47 pav., A). MAK esantys vienoje grupėje tarpusavyje konkuravo, o tai rodo, kad jie reaguoja su tuo pačiu epitopu.





**46 pav.** MAk 22A2 (A) ir 14D6 (C) bei AZM (B) slopinantis poveikis rekombinantinei CA XII. Pateiktos pirminės eksperimentinės kreivės, vaizduojančios indikatoriaus sugerties pokyčius laike didėjant MAk arba AZM koncentracijai. Juoda linija pažymėta savaiminė CO<sub>2</sub> hidratacijos reakcija, raudona linija – CA12<sup>HEK</sup> katalizuojama reakcija, kitų spalvų linijos – skirtingos MAk arba AZM koncentracijos. MAk 22A2 pateikiamas kaip pavyzdys, kuris neturi slopinančių CA XII savybių.

Siekiant nustatyti MAk epitopų lokalizaciją ir galimą ar. seką buvo sukonstruoti 4 persiklojantys CA XII fragmentai (#1 V27-G123 ar., #2 Y67-F211 ar., #3 H192-S290 ar., #4 P101-S290 ar., 47 pav., B) su 6 histidinių žyme. Dėl persiklojimo fragmentai suskirstė baltymo seką į 6 sritis. Priklausomai nuo to, su kiek (1, 2 ar 3) ir su kuriais fragmentais MAk sąveikavo, buvo galima nustatyti ar., reikalingas MAk sąveikai su baltymu.



**47 pav.** A – Konkurencinės IFA apibendrinti rezultatai ir sudarytos MAK grupės, pagal tai, ar jie konkuruoja (juodas langelis), ar nekonkuruoja (baltas langelis) dėl sąveikos su CA XII. Epitopų lokalizacija nustatyta naudojant persiklojančius CA XII fragmentus. B – Schematiškai pavaizduotas CA XII fragmentų, skirtų MAK epitopų nustatymui, išdėstymas. Persiklojantys fragmentai #1, #2, #3 ir #4 suskirstė rekombinantinę CA XII į 6 sritis, pagal kurias galima nusakyti MAK epitopo lokalizaciją. C – MAK 14D6 epitopui nustatyti sukurti papildomi fragmentai #5, #6, #7 ir #8, kurie I sritį (30–67 ar.) suskirstė į smulkesnes sekas.

Fragmentų sintezė *E. coli Tuner* bakterijose buvo patvirtinta SDS-PAGE, analizuojant bakterijų lizatus prieš ir po indukcijos, bei imunoblotingu metodu tiriant lizatus su anti-His MAK (duomenys nepateikiami). Fragmentus sintetinančių bakterijų lizatai buvo panaudoti, tiriant MAK imunoblotingu metodu. Tik 3 MAK (6G5, 14D6 ir 20G7) reagavo su fragmentais (duomenys nepateikiami), todėl jų epitopų lokalizaciją pavyko nustatyti (47 pav., A).

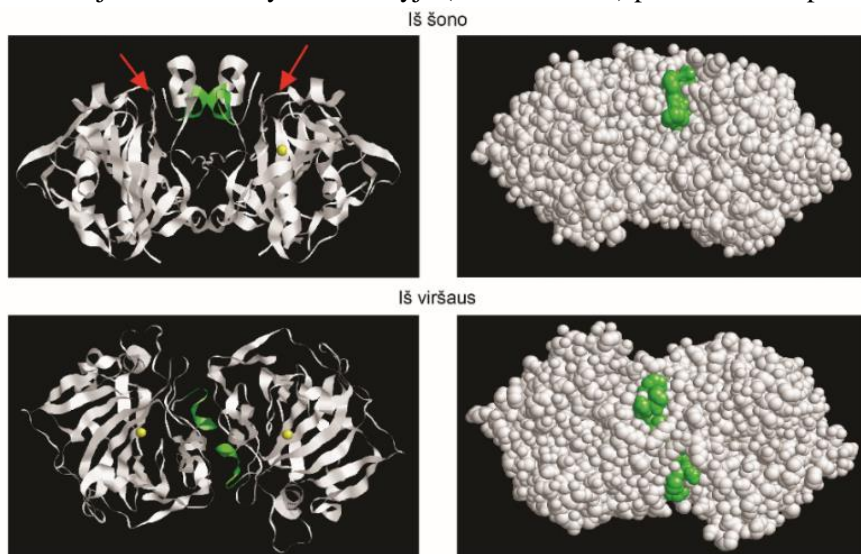
MAK 6G5 ir 20G7 IB metodu reagavo su trimis fragmentais #2, #3 ir #4, todėl jų epitopą apibrėžianti ar. seka yra visų trijų fragmentų persiklojime nuo 192 iki 211 ar. Po konkurencinės IFA jie abu buvo priskirti I grupei. II grupėje buvo net 18 tarpusavyje konkuruojančių MAK, kurie imunoblotingu metodu nereagavo su CA XII fragmentu, nors su pilno ilgio baltymu denatūruojančiomis sąlygomis jie reagavo. Greičiausiai, jų epitopas yra pusiau linijinis, ir MAK sąveikai būtina pilna CA XII molekulė. (47 pav.).

IV grupei buvo priskirti trys MAK klonai (9B9, 13G2 ir 20C4), kurie tarpusavyje konkuravo dėl sąveikos su CA XII baltymu. Tai MAK, kurių epitopas greičiausiai yra ne baltymas, o sacharidas, prijungtas potransliacinių modifikacijų metu. Šie MAK nereagavo su bakterijose susintetintais

persiklojančiais fragmentais, kadangi bakterijose potransliacinio glikozilimo nėra.

Išanalizavus konkurencinės IFA ir imunoblotingo metodais gautus rezultatus, buvo padaryta išvada, kad MAK 14D6 turi unikalią sąveiką su CA XII vieta. Šis MAK nekonkuravo su kitais MAK ir vienintelis jungėsi su #1 fragmentu. Nustatyta, kad jo epitopas yra tarp 30 ir 67 ar., tačiau tai yra pakankamai ilgas baltymo fragmentas, o epitopai būna trumpesni. Kadangi MAK 14D6 vienintelis pasižymėjo rekombinantinį baltymą slopinančiomis savybėmis, todėl buvo sukurti papildomi persiklojantys CA XII fragmentai, siekiant patikslinti jo epitopo ar. seką.

Papildomi 4 persiklojantys CA XII fragmentai (#5 F35-R220 ar., #6 W43-E209 ar., #7 G51-N231 ar., #8 D59-Y221 ar., 47 pav., C) su His žyme suskirstė 30–67 ar. regioną į 5 sritis sudarytas iš 4–8 ar. sekų. Šie fragmentai buvo susintetinti *E. coli* bakterijose, o jų raiška buvo patvirtinta su anti-His MAK. MAK 14D6 imunoblotingo metodu reagavo tik su fragmentu #5 ir tai rodo, kad jo epitopas yra ar. seka nuo 35 iki 42 (FGPDGENS). Epitopo lokalizacija CA XII baltymo modelyje (PDB ID 1JD0) pateikiama 48 pav.



**48 pav.** Žmogaus CA XII baltymo dimero modelis (PDB ID: 1JD0, RasMol versija 2.7.5.2) su pavaizduotu MAK 14D6 linijiniu epitopu (žalia spalva). Pateikiamas beta klosčių ir alfa spiralių (kairėje) bei molekulės paviršiaus (dešinėje) vaizdas iš viršaus ir iš šono. Geltona spalva – aktyvaus centro cinko atomas, raudonos rodyklės – substrato patekimo į aktyvų centrą vieta (remiantis Whittington *et al.*, 2001).

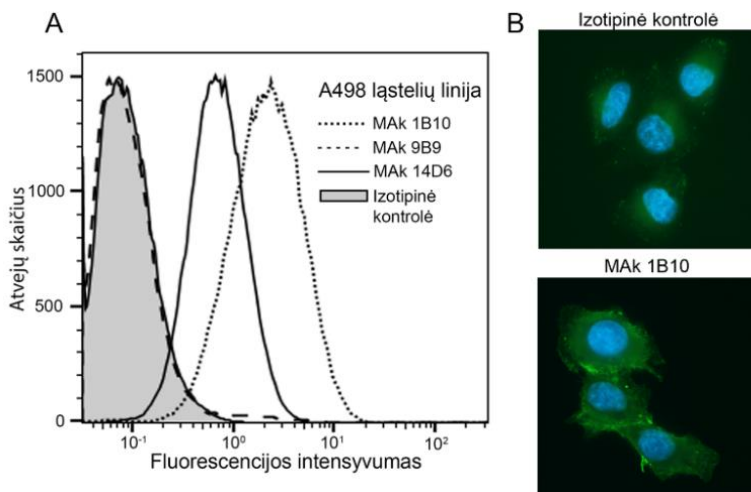
Iš modelio matoma, kad MAK 14D6 epitopas yra baltymo paviršiuje netoli CA XII aktyvaus centro. MAK, prisijungęs prie CA XII gali blokuoti CO<sub>2</sub>

patekimą į aktyvų centrą, ar iškreipti baltymo struktūrą taip, kad šis taptų neaktyvus. Kadangi epitopas lokalizuotas baltymo paviršiuje, buvo nemaža tikimybė, kad MAK 14D6 sąveikaus su natyvia CA XII.

### 3.2.3.3. MAK sąveika su CA XII biologiniuose mėginiuose

Pirmiausia, tėkmės citometrijos metodu buvo įvertinta visų MAK sąveika su natyvia CA XII, esančia gyvų vėžinių ląstelių paviršiuje. A549 ir A498 ląstelės buvo parinktos analizei, nes jose anksčiau buvo parodyta CA XII raiška (Chiche et al., 2009; Parkkila et al., 2000b). Visi MAK, išskyrus 6G5, 9B9, 13G2, 20C4 ir 20G7 klonus, specifiskai atpažino natyvų baltymą, esantį A549 ir A498 ląstelių paviršiuje (49 pav., A), ir nereagavo su Jurkat ir CHO ląstelėmis, kurios naudotos neigiamą kontrolę.

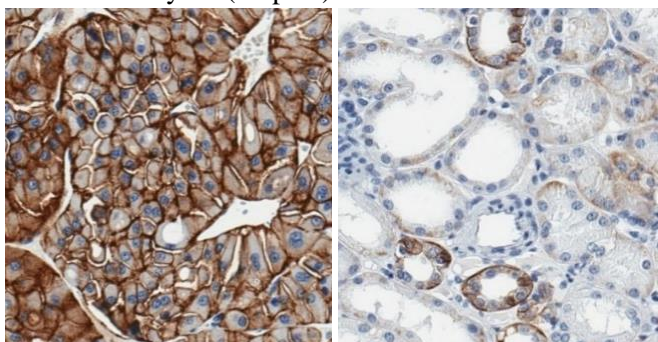
Tėkmės citometrijos eksperimentuose nereaguojantys MAK, ankstesnių tyrimų metu buvo priskirti I ir IV grupėms. IV grupės MAK 9B9, 13G2 ir 20C4 sekretuojami antikūnai galimai atpažįsta glikozilinto CA12<sup>HEK</sup> baltymo polisacharidinę dalį. Kadangi šie MAK neatpažino natyvaus baltymo tėkmės citometrijos metodu, galima manyti, kad natyvaus ir rekombinantinio baltymo glikozilinimas skiriasi. II ir III grupės MAK sąveikavo su natyvia ląsteline CA XII, o tai turi reikšmę, kuriant terapinį potencialą turinčius MAK ir RAK. Ypač daug perspektyvų turi MAK 14D6, kuris ne tik atpažino natyvią CA XII, bet ir turi baltymą slopinančių savybių.



**49 pav.** A – MAK sąveika su natyvia CA XII A498 ląstelių paviršiuje, nustatyta tėkmės citometrijos metodu. Pateiktos stipriai reaguojančio MAK 1B10, vidutiniškai reaguojančio MAK 14D6 ir nereaguojančio MAK 9B9 fluorescencijos intensyvumo histogramos. B – MAK (žalia spalva) sąveika su CA XII imunofluorescencijos metodu A549 ląstelėse. Mėlyna spalva – ląstelių branduoliai. Optinis padidinimas 40 x.

MAk sąveika su CA XII ląstelių paviršiuje buvo įvertinta imunofluorescencijos metodu, kuris tinkamas vėžinių ląstelių vizualizacijai. Be to, šis metodas, priešingai nei tėkmės citometrija, nereikalauja fermentinio ar mechaninio adhezinių ląstelių atkabinimo nuo jų augimo paviršiaus, todėl ląstelių membranos ir jų paviršiaus žymenys išlieka mažiau pažeisti. Tyrimui buvo panaudotos A549 ląstelės (49 pav., B). Gauti rezultatai atkartojo tėkmės citometrijos rezultatus.

MAk 14D6 specifiskumas ląstelėse esančiai CA XII buvo patikrintas imunohistochemijos metodu, naudojant formalinu fiksuotus ir parafinizuotus žmogaus krūties audinius. Imunohistocheminis audinių dažymas buvo atliktas VPC. CA XII buvimas audiniuose buvo patvirtintas, naudojant anksčiau sukurtą MAk 15A4. MAk 14D6 itin stipriai ir specifiskai jungėsi su membraniniu CA XII baltymu (50 pav.).



**50 pav.** Krūties mėginių IHC dažymas naudojant MAk 14D6: navikinis (kairėje) ir sveikas (dešinėje) audinys.

MAk, sukurti prieš HEK-293 ląstelėse susintetintą rekombinantinį CA XII baltymą, pasižymėjo įvairiomis savybėmis ir skirtingai sąveikavo su CA XII, esančia biologiniuose audiniuose. MAk 14D6 išsiskyrė ne tik savo galimybėmis jungtis su natyvia CA XII ląstelių paviršiuje, bet ir turėjo baltymą slopinančių savybių. Todėl jo terapinis potencialas yra didžiausias iš visų šios ir ankstesnių kolekcijų MAk. MAk 14D6 buvo pasirinktas pagrindu, kuriant RAK prieš CA XII.

#### 3.2.3.4. CA XII raiškos tyrimas vėžinėse ląstelėse

CA XII raiškos tyrimai vėžinėse ląstelių linijose yra taip pat svarbūs kaip ir CA IX izoformos analizė, kadangi abu fermentai dalyvauja kancerogenezeje. Ypač naudinga žinoti, kokiose linijose vyksta abiejų fermentų raišką, o kokiose sintetinamas vienas iš šių fermentų. Tai, pavyzdžiui, aktualu tiriant CA slopiklius. Tyrėjai anksčiau parodė, kad,

nutildžius CA IX, išauga CA XII raiška, kuri gali kompensuoti CA IX trūkumą (Chiche et al., 2009), ir dėl to gali išsikreipti ląstelių gyvybingumo tyrimo rezultatai.

Šiame tyrime buvo pasirinkta keletas ląstelių linijų (3 lentelė, 2.1.9 skyrius), kuriose CA XII raiška įvertinta tiek baltymo, tiek iRNR lygmenyje. Tėkmės citometrijos metodui naudotas MAk 1B10, sukurtas prieš CA12<sup>HEK</sup>, taip pat sukurta nauja AT-kPGR sistema CA12 iRNR nustatymui. Ląstelės buvo auginamos normoksijos ir hipoksijos sąlygomis, siekiant ištirti CA XII raiškos pokyčius. Apibendrinti rezultatai pateikiami 27 lentelėje.

Net šešios ląstelių linijos (A549, A498, U-87, Huh7 ir MDA-MB-231) sintetino CA XII, esant normaliam deguonies kiekiui. Šias ląsteles auginant hipoksijos sąlygomis, CA XII raiška išaugo nežymiai. Colo ląstelėse normoksijos sąlygomis CA XII baltymas neaptiktas, tačiau jo raiška atsiranda trūkstant deguonies. Šešios ląstelių linijos (Jurkat, K-526, HUT, H9, CEM, A-431) nesintetino CA XII nei normoksijos, nei hipoksijos sąlygomis, kadangi MAk 1B10 sąveika su šiomis ląstelėmis nenustatyta.

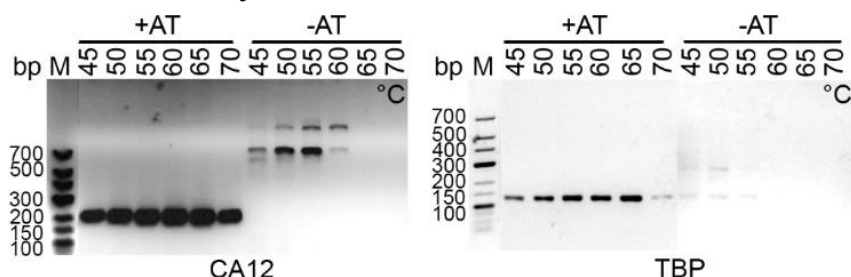
**27 lentelė.** CA XII raiška normoksijoje ir hipoksijoje baltymo ir iRNR lygmenyje.

Ląstelių linija	TC		AT-kPGR	
	Normoksija	Hipoksija	Normoksija	Hipoksija
A549	+	+	+	+
A498	+	+	+	+
U-87	+	+	+	+
Jurkat	–	–	–	–
K-562	–	–	–	–
HUT	–	–	–	–
H9	–	–	–	–
CEM	–	–	–	–
A-431	–	–	–	–
Huh7	±	±	±	±
HCT	±	±	±	±
Colo	–	+	–	–
MDA-MB-231	±	±	±	±

+ stipri sąveika, ± silpna sąveika, – sąveikos nėra.

Norint ištirti CA12 iRNR raišką ląstelėse, pirmiausia reikėjo sukurti ir optimizuoti AT-kPGR sistemą. Visas optimizavimo procesas buvo analogiškas CA9 iRNR sistemos kūrimui ir optimizavimui, aprašytam 3.1.4. skyriuje. Šiuo atveju buvo sukurti nauji pradmenys, skirti kDNR, susintetintos nuo CA12 iRNR, padauginimui, o raiškos normalizavimui buvo pasirinktas naujas transkripcijos veiksnio, besijungiančio su TATA seka (TBP, angl., *TATA-binding protein*), genas. (Dekaminavičiute, 2012; Vaitiekaite, 2013).

Naujai sukurti *CA12* ir *TBP* fragmentų padauginimui skirti pradmenys buvo patikrinti, naudojant RNR išskirtą iš U-87 ląstelių, ir atlikus gradientinį PGR (51 pav.). Optimali pradmenų prilydymo temperatūra buvo parinkta, atsižvelgiant į didesnę susidariusio PGR produkto kiekį ir nespecifinių produktų susidarymą, pavyzdžiui, nuo likusios genomines DNR. Esant per žemai pradmenų prilydymo temperatūrai, yra didesnė rizika, kad vyks nespecifinė pradmenų sąveika su matrica, o esant per aukštai temperatūrai, gali susidaryti mažiau tikslinio produkto. Visi nustatyti optimalūs parametrai apibendrinti 28 lentelėje.



**51 pav.** *CA 12* ir *TBP* pradmenų optimalios temperatūros nustatymas gradientinės PGR metodu. Temperatūrų intervalas nuo 45 iki 70 °C, +AT – kDNR sintezės mišinys naudojant atvirkštinę transkriptazę, –AT – kDNR sintezės mišinys be atvirkštinės transkriptazės (neigiama kontrolė). M – DNR molekulinės masės standartas „*O'GeneRuler™ DNA Ladder, Low Range*“ (Thermo Fisher Scientific).

**28 lentelė.** Optimalių sąlygų parinkimas AT-kPGR sistemoms ir gautos vertinimo kriterijų vertės

	<i>CA12</i>	<i>TBP</i>
<b>Optimizuojami parametrai</b>		
Pradmenų prilydymo temperatūra	65 °C	65 °C
Pradmenų koncentracija	0,3 μM	0,3 μM
Zondo koncentracija	0,1 μM	0,1 μM
<b>Vertinimo kriterijai gauti su optimalia sistema</b>		
E, % (M)	98–102 (–3,34)	95–100 (–3,32)
R <sup>2</sup>	>0,99	>0,99
CV %, vidurkis ± SD, [intervalas]	10 ± 6, [3,0–27,1]	12 ± 8, [0,3–19,1]
Jautrumas (reakcijoje)	10 kopijų	10 kopijų

Turint tinkamai veikiančius pradmenis, kuriais buvo padauginti reikiamo dydžio fragmentai, toliau buvo kuriami *CA12* ir *TBP* RNR standartai, reikalingi AT-kPGR sistemos optimizavimui ir kalibracinei kreivei nubrėžti. Atlikus visas reikiamas procedūras, pavyko sukurti naujus tinkamo dydžio ir koncentracijos *CA12* ir *TBP* RNR standartus (29 lentelė). Šie standartai buvo

skiedžiami nuo  $10^5$  iki 1 kopijos (galutinė koncentracija PGR reakcijoje) ir nuo jų buvo susintetinta kDNR.

**29 lentelė.** CA12 ir TBP RNR transkriptų koncentracija, ilgai ir paskaičiuotas kopijų skaičius.

Transkriptas	Nukleotidų skaičius	Koncentracija ng/ $\mu$ L	Kopijų skaičius 1 $\mu$ g RNR
CA12	3087	310,4	$6,4 \cdot 10^{-11}$
TBP	3022	234,1	$6,5 \cdot 10^{-11}$

Tikro laiko PGR leidžia sekti produkto susidarymą, naudojant zondus su reporteriniais dažais (4 lentelė, 2.1.11.1 skyrius). Kaip ir CA9 atveju, buvo optimizuojama pradmenų ir zondų koncentracija, bei įvertintas sistemos jautrumas (28 lentelė), kuris po optimizavimo siekė iki 10 kopijų/reakcijoje tiek CA12, tiek TBP genams.

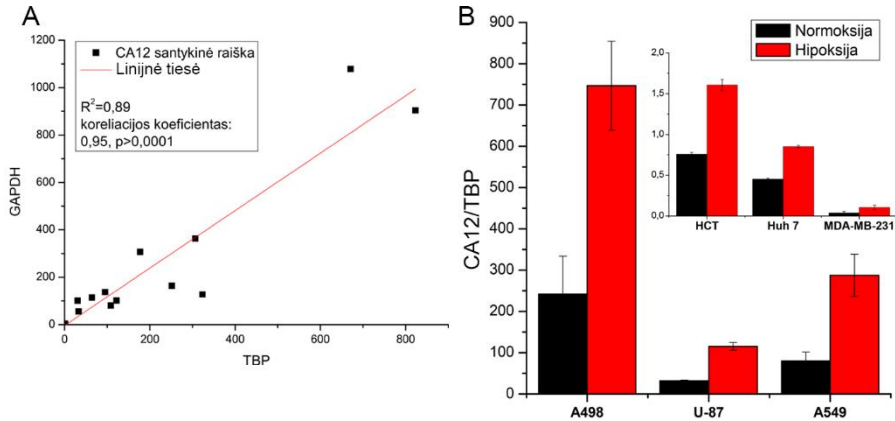
Sukurtos ir optimizuotos CA12 ir TBP sistemos, o taip pat anksčiau aprašyta GAPDH sistema, buvo panaudotos tiriant CA12 iRNR raišką vėžinėse ląstelėse. Tai jautrus metodas, leidžiantis įvertinti genų raiškos pokyčius ląstelėse, jas auginant skirtingomis sąlygomis. Naudojant AT-kPGR metodą, buvo papildomai patvirtintas sukurtų MAk prieš CA XII specifiškumas.

Buvo tiriamos tos pačios vėžinių ląstelių linijos, kaip ir tėkmės citometrijos metodu. Pirmiausia, buvo įvertintas atskaitos genų tinkamumas šiam eksperimentui. Buvo palyginta CA12 santykinė raiška, ją normalizavus pagal TBP (santykis tarp CA12 ir TBP nustatytų kopijų/reakcijoje) ir GAPDH (santykis tarp CA12 ir GAPDH nustatytų kopijų/reakcijoje padaugintas iš pasirinkto koeficiento 1000). Buvo gauta statistiškai patikima koreliacija tarp minėtais genais normalizuotos CA12 raiškos, todėl abu genai buvo tinkami tolimesnei mėginių analizei (52 pav., A). Analizuojant CA12 iRNR raišką vėžinėse ląstelėse, ir jos pokyčius kintant deguonies koncentracijai (52 pav., B), buvo gauti rezultatai, koreliuojantys su gautais tėkmės citometrijos metodu (27 lentelė). Tai ne tik parodo, kad koreliuoja CA XII baltymo ir iRNR raiška, bet ir patvirtina MAk specifiškumą CA XII baltymui.

Šiame tyrime didžiausia CA XII raiška buvo nustatyta A549, A498 ir U-87 ląstelėse. Šie rezultatai atitinka anksčiau publikuotus kitų tyrėjų duomenis (Haapasalo et al., 2008; Ivanov et al., 2001; Kallio et al., 2010; Kobayashi et al., 2012). Rezultatai taip pat koreliuoja ir su anksčiau šiame darbe aprašytais klinikinių mėginių tyrimais, kuriuose CA XII aptikta inkstų ir plaučių vėžiniame audinyje imunohistochemijos metodu su MAk 15A4 (3.2.1.3 skyrius, 41 pav.). HCT, Huh7 ir MDA-MB-231 ląstelėse CA XII raiška buvo



silpna tiek tiriant tėkmės citometrijos, tiek AT-kPGR metodais. Nedidelė CA XII raiška MDA-MB-231 ląstelėse aprašoma ir literatūroje (Wykoff et al., 2001). Kraujo vėžio ląstelių linijose (Jurkat, K-562, HUT, H9 ir CEM) CA XII raiška nenustatyta. Literatūroje yra duomenų, jog CA XII nėra sintetinama leukemijos ląstelėse (Ivanov et al., 2001).



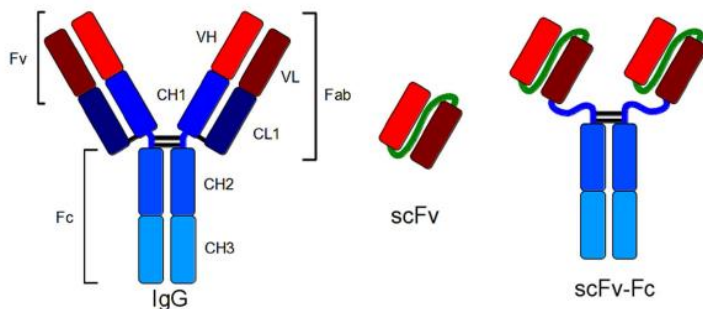
**52 pav.** CA12 raiškos tyrimai vėžinėse ląstelių linijose. A – CA12 santykinės raiškos, gautos normalizavus atskaitos genai *TBP* ir *GAPDH*, koreliacija, analizuojant visus tirtus ląstelių linijų mėginius. *Pearson* koreliacijos koeficientas lygus 0,95 rodo stiprią koreliaciją tarp abiejų atskaitos genų. B – Santykinė CA12 raiška, normalizuota *TBP* genu, įvairiose vėžinių ląstelių linijose ir raiškos pokytis, jas auginant normoksijoje ir hipoksijoje. Pateikiamos vidurkinės vertės su standartinė paklaida. Remiantis *Student t* testu reikšmingų CA12 raiškos skirtumų ląsteles auginant skirtingomis sąlygomis nenustatyta.

Apibendrinant, buvo sukurti įrankiai ir analizės sistemos, skirtos CA XII raiškos tyrimams biologiniuose mėginiuose. Vėžinių ląstelių linijų svarbūs, norit įvertinti CA XII, kaip vėžinio biožymens, potencialą. MAK, gauti prieš CA XII, yra aukšto specifiskumo, lengvai pritaikomi įvairiems metodams, o AT-kPGR sistema suteikia galimybę aptikti net ir menkiausius CA12 raiškos pokyčius iRNR lygmenyje.

### 3.3. Rekombinantinių antikūnų prieš karboanhidrazę XII kūrimas

RAK buvo kuriami genų inžinerijos metodais, o kaip tėvinis antikūnas buvo pasirinktas MAK 14D6, atpažįstantis CA XII. Jo pasirinkimą nulėmė keletas priežasčių: 1) MAK 14D6 slopino rekombinantinės CA XII (CA12<sup>HEK</sup>) fermentinį aktyvumą; 2) MAK 14D6 sąveikavo su natyvia CA XII, esančia gyvų žmogaus vėžinių ląstelių paviršiuje.

Buvo kuriami 2 RAK variantai: scFv ir scFv-Fc (53 pav.). Kadangi scFv sudarančios ar. sekos yra klonuojamos iš hibridomų, ši rekombinantinio antikūno dalis yra visiškai identiška MAK sekai. Taip gaunamos rekombinantinės molekulės išlaiko specifiškumą, neutralizuojantį aktyvumą, sąveiką su ląstelėmis ir kitas savybes, būdingas tėviniam MAK. Biofarmaciniu požiūriu scFv gali slopinti antigeno biologinę funkciją tiesiogiai arba gali būti biologiškai aktyvių medžiagų nešikliais, specifiškai jas nukreipiantys link taikinio (Zhang et al., 2014). RAK variantas scFv-Fc yra sudarytas iš pelės scFv ir žmogaus imunoglobulino Fc fragmento, todėl ne tik išlaiko tėvinio pelės MAK specifiškumą antigenui, bet ir gali sąveikauti su žmogaus Fc receptoriais, esančiais fagocitų ar kitų ląstelių paviršiuje. Jis gali atlikti efektorines funkcijas, aktyvinant imuninę sistemą: per Fc dalį yra sukliamas ADCC ar komplemento nulemtas citotoksiškumas (angl. *complement-dependent cytotoxicity*) (Frenzel et al., 2013).



**53 pav.** Pilno ilgio IgG ir RAK (scFv ir scFv-Fc) schematinė struktūra (pritaikyta iš Frenzel *et al.*, 2013).

RAK kūrimas buvo atliekamas keliais etapais:

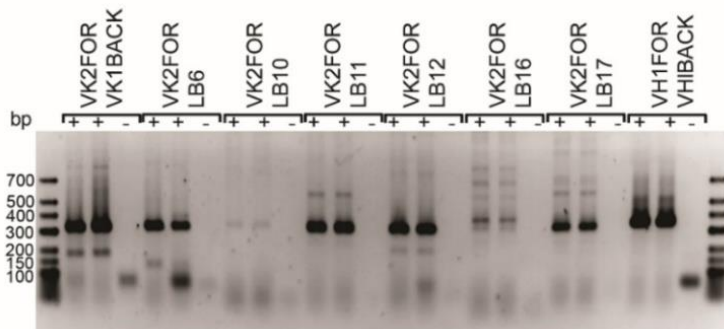
1. MAK VL ir VH sričių bei CDR sekų identifikavimas, naudojant MAK 14D6 sekretuojančių hibridomų genetinę medžiagą.
2. scFv koduojančio geno klonavimas, sintezė bakterijose, gryninimas ir specifiškumo analizė imunocheminiais metodais.
3. scFv-Fc koduojančio geno klonavimas, sintezė žinduolių ląstelėse, gryninimas ir specifiškumo analizė imunocheminiais metodais.

### 3.3.1. Monokloninio antikūno 14D6 kaičiųjų sričių identifikavimas

Pirmajame darbo etape buvo identifikuotos MAK 14D6 kaičiųjų sričių ar. ir jas koduojančių nukleotidų sekos, kurios buvo panaudotos RAK variantų scFv ir scFv-Fc kūrimui. Sekos buvo klonuojamos iš hibridomų, sekretuojančių MAK 14D6. Prieš tai MAK 14D6 sintetinančios hibridomos buvo reklonuotos serijinių skiedimų metodu, siekiant gauti stabilus reklonus,

kilusius iš vienos ląstelės. Reklonavimas buvo pakartotas kelis kartus. Visi reklonai buvo patikrinti netiesioginės IFA metodu, naudojant plokštelėje imobilizuotą CA12<sup>HEK</sup>. Hibridoma 14D6 buvo stabili (gauta 100 % teigiamų reklonų) ir tinkama tolimesniems darbo etapams.

Bendra RNR buvo išskirta iš hibridomų ląstelių, įvertinta jos kokybė RNR elektroforezės metodu ir susintetinta pirmoji kDNR grandinė. PGR metodu, naudojant gautą kDNR ir pradmenis, specifinius pelių Ig sunkiosios ir lengvosios grandinių variabiliesiems domenams (7 lentelė, 2.1.11.4 skyrius), buvo gauti atitinkamo bazių porų dydžio PGR produktai (54 pav.).



**54 pav.** MAk 14D6 VH ir VL fragmentų padauginimas PGR metodu, naudojant genetinę medžiagą iš hibridomų ir specifinius pradmenis. PGR produktai vizualizuoti 1 % agarozės gelyje. Viršuje išvardintos naudotos pradmenų poros. Reakcijos mišinyje naudota kDNR (+) arba vanduo be nukleazių (-). DNR fragmentų ilgio standartas – *O'GeneRuler Low Range DNA Ladder 25-700 bp* (Thermo Fisher Scientific).

Klonuojant Ig variabiliąsias sekas, buvo išbandyti įvairūs pradmenų porų variantai. Kai kurie jų nebuvo produktyvūs, nes genų segmentai, koduojantys variabiliuosius fragmentus, yra labai heterogeniški tarp skirtingų B ląstelių, o tuo pačiu ir hibridomų. Ig genų lokusai, bręstant B ląstelėms, yra atsitiktinai sujungiami somatinės rekombinacijos metu, todėl susidaro daug naujų sekų, kurios nekoduojamos gemalinėje DNR. Sudėtinga sukurti universalius pradmenis, tinkančius visų Ig genams. Vienas iš pradmenų jungiasi prie FR1 (variabiliojo) fragmento, o kitas – prie pastoviosios srities. Šiuose fragmentuose yra daugiau konservatyvių sekų, tinkančių pradmenų prisilydymui.

Sunkiosios grandinės VH fragmentai buvo padauginami PGR metodu, naudojant IgG1/MH1 ir VH1FOR/VH1BACK pradmenų poras, o VL fragmentas padauginamas Kc/Mk, VK2FOR/VK1BACK, VK2FOR/LB6, VK2FOR/LB11, VK2FOR/LB12 ir VK2FOR/LB17 pradmenų poromis (54 pav.). Gautieji PGR produktai buvo įterpti į pJET1.2 vektorių ir DNR

sekoskaitos metodu nustatyta nukleotidų seka, kuri transliuota į pirminę ar seką (internetinė analizės platforma „ExPaSy“, „Translate“ įrankis).

Sekos, kuriose buvo nustatyti skaitymo rėmelio poslinkiai, stop kodonai, delecijos ar netipiškos ar., buvo pašalintos iš tolimesnės analizės. Raudona spalva 55 pav. paryškintos teoriškai teisingos MAk 14D6 VH ir VL sekos, o juoda spalva – neteisingos ar. sekos. Tik funkciškai patikrinus gautą baltymą galima tvirtinti, kad tai teisingos (ne pseudo) sekos. Pseudosekos gali atitikti visus funkcionalių sekų kriterijus, tačiau tokias sekas panaudojus RAK sintezei, galima gauti funkciškai neaktyvų baltymą (Bradbury et al., 2018).

Lengvoji grandinė	FR1		CDR1	FR2		CDR2
	10	20	30	40	50	
LB12	MVVMQTSSLSASLGDVRTINCRAS	↓	QDI---NN---Y	LNWYQQRPDGTVKLLIY		YTS
VK1BACK	DIQLTQSPASLAVSLGQRATISYRAS		KSVSTSGYS--Y	MHWNQKQKPGQPPRLLIY		LVS
LB17	MILLTQSPASLAVSLGQRATISYRAS		KSVSTSGYS--Y	MHWNQKQKPGQPPRLLIY		LVS
LB11	MIVMTQSPSSMYASLGERVILTCKAS		QDI---KS---Y	FTWYQWKPWRSPKTLIS		CAT
LB6	MIKMTQSPSSMYASLGERVILTCKAS		QDI---KS---Y	FTWYQWKPWRSPKTLIS		CAT
FR3						
	60	70	80	90	100	110
LB12	KLHSGVPSRFSGSGSGTNYSLTISNLDQEDIATYFC		↓	QQGNTLPFT	FGSGTKLEIK	
VK1BACK	NLESQVPAFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC			QHIRELTRS	EGGSPWSRNN	
LB17	NLESQVPAFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC			QHIRELTRS	EGGSPWSRNN	
LB11	SLADGVPLRFSGSGSQDYSLAISLESDDTTTYC			LHLGESPHV	RQWDQAGDQI	
LB6	SLADGVPLRFSGSGSQDYSLAISLESDDTTTYC			LHLGESPHV	RQWDQAGDQI	

Sunkioji grandinė	FR1		CDR1	FR2		CDR2
	10	20	30	40	50	
VH-IgG1/MH1	QVKLEQSGGGLVQPGGSRKLSCAAS	↓	GFTFSDYG	MAWVRQAPGKGPWITF		ISNLAYRI
VH1BACK	-VQLQESGAELARLARGASVKMSCKAS		GYTFTSYT	IHWVKQRPGQGLEWIGY		INPSSLYI
FR3						
	60	70	80	90	100	110
VH-IgG1/MH1	FYADTVTGRFTVSRENAKNTLYLEMSSLRSEDATYYC		↓	VR-ATEYA	LDYWQGGTSVTVSSAK	
VH1BACK	NLNQKFKDKVTMTAEKSSNTAYMHLSSLTSEDCAVYFC			TRKEVRPW	FAYWQGGTIVTVSSIF	

55 pav. MAk 14D6 VL ir VH kaičiųjų regionų sekų, gautų naudojant skirtingas pradmenų poras, palyginimas ir analizė. Teoriškai teisingos VL ir VH ar. sekos, gautos naudojant VK2FOR/LB12 ir IgG1/MH1 pradmenų poras paryškintos raudonai. Neteisingos ar. sekos gautos su VK2FOR/VK1BACK, VK2FOR/LB6, VK2FOR/LB11, VK2FOR/LB17 ir VH1FOR/VH1BACK pradmenimis. Žalia rodyklė – konservatyvių cisteinų pozicijos. Žydra spalva pažymėti papildomi neteisingi cisteinai. Pateikiamos hiperkaičiųjų sričių (CDR1–3) ir jas supančių karkasinių regionų (FR1–4) ar. sekos.

Sekų analizė atliekama, naudojant kelias duomenų bazes (*KabatMan* duomenų bazė, *NCBI* duomenų bazės bioinformatinis įrankis *IgBlast*), kurios naujai gautas VL ir VH sekas palygina su duomenų bazėse esančiomis kitų MAk sekomis, ir nustato hiperkaičiųjų sričių (CDR1–3) ir jas supančių karkasinių regionų (FR1–4) ar. sekas. Taip pat įvertinamas gautų sekų panašumas su gemalinėje DNR koduojamomis sekomis.

Viena svariausių ar. VL ir VH regionuose yra cisteinas. Tai itin konservatyvi ar., kurios pozicijos ar. sekose yra pastovios. Tiek VL, tiek VH sekose yra po 2 cisteinus, kurie visada būna prieš CDR1 ir CDR3, ir dalyvauja tretinės struktūros suformavime, sudarydami disulfidinius tiltelius (Janeway, 2001). Jei toje vietoje cisteino nėra, tikėtina, kad nesusiformuos funkciškai aktyvus antikūnas (55 pav., žalia rodyklė). Taip pat svarbu, kad variabiliuosiuose regionuose nebūtų papildomų cisteinų (55 pav., žydra spalva), kurie taip pat iškreiptų struktūrą ir paveiktų antikūno funkciją.

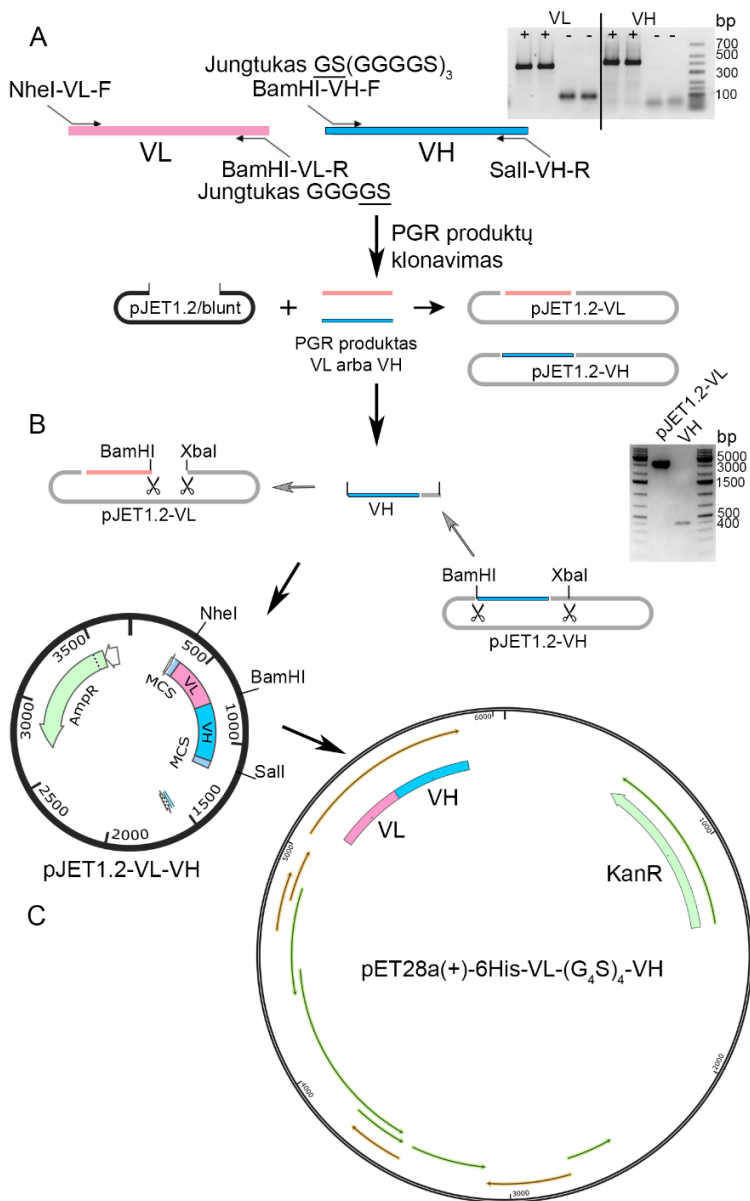
Taigi, gautos teoriškai teisingos MAk 14D6 VL ir VH sekos turėjo po 2 cisteinus ir jie buvo tinkamose pozicijose. Taip pat buvo nustatytos CDR1–3 sekos, o jos yra labai svarbios hibridomos unikalumui patvirtinti. Šios sekos užtikrina MAk specifiškumą antigenui, todėl RAK konstravimo metu jose negali būti daromi ar. pokyčiai, negali atsirasti mutacijų. Nustatytų variabiliųjų regionų sekų pagrindu toliau buvo konstruojami RAK.

### 3.3.2. Viengrandžių antikūnų fragmentų konstravimas ir raiška

Viengrandžiai scFv yra rekombinantiniai baltymai, kuriuos koduojantis genas yra sudarytas iš Ig sunkiosios grandinės kaičiojo fragmento VL ir sunkiosios grandinės kaičiojo fragmento VH. Šiose regionuose yra svarbiausios ar. sekos, atsakingos už MAk sąveiką su antigenu. Nors scFv yra tik nedidelė MAk dalis, tačiau jis išlaiko specifiškumą antigenui.

VH ir VL fragmentai yra sujungiami jungtuku – tai lanksti polipeptidinė grandinė, kuri netrukdo susiformuoti tinkamai scFv struktūrai bei neveikia jo stabilumo ar funkcinio aktyvumo (Yusakul et al., 2016). Šiame darbe buvo panaudotas daug glicinų turintis jungtukas (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>, o VL ir VH sujunti dviem galimomis orientacijomis VL-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VH ir VH-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VL. Abi orientacijos yra naudojamos, bet ne visada abi yra aktyvios, todėl būtina išbandyti abu variantus (Ahmad et al., 2012). Genetinė konstrukcija buvo kuriama, naudojant įvairius molekulinės biologijos ir genų inžinerijos metodus, ir apėmė daug etapų (56 pav.) (pateikiami etapai ir 56 pav. aprašo VL-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VH konstrukcijos kūrimą; tokiais pat būdais buvo konstruojamas ir VH-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VL variantas).

Pirmiausia, pagal turimas VL ir VH nukleotidų sekas buvo sukurti pradmenys, skirti 3' ir 5'-galuose įvesti klonavimui reikalingų restrikcijos endonukleazių (RE) atpažinimo sekas ir jungtuką koduojančius nukleotidus (8 lentelė, 2.1.11.5 skyrius). Naudojant šiuos pradmenis, fragmentai buvo padauginėti PGR metodu ir klonuoti į pJET1.2/blunt vektorių, tada tikrinami DNR sekoskaita (56 pav.).



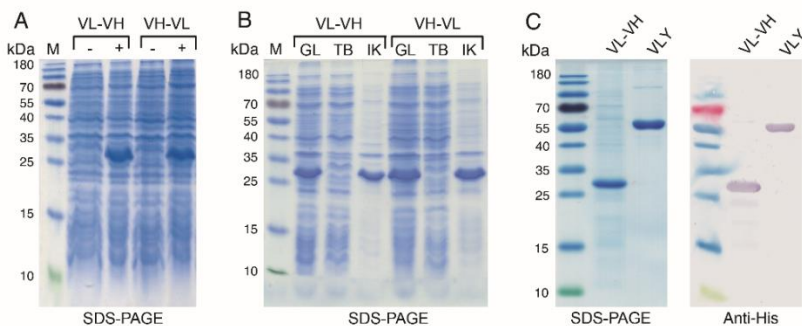
**56 pav.** MAK 14D6 VL ir VH fragmentų sujungimo ir klonavimo schema. A – PGR metu naudojant specialius pradmenis įvedamos RE hidrolizės sekos ir jungtuką koduojantys nukleotidai. Nauji fragmentai įterpiami į pJET1.2/blunt vektorių. B – VH fragmentas įterpiamas į pJET1.2-VL vektorių per RE hidrolizės vietas, gautas naujas vektorius pJET1.2-VL-VH. C – sujungtas VL-VH fragmentas perkliamas į scFv raiškai skirtą vektorių pET28a(+).

Naujieji pJET1.2-VL ir pJET1.2-VH vektoriai buvo padauginėti ir paruošti fragmentų sujungimui. pJET1.2-VL vektorius buvo hidrolizuojamas BamHI

ir XbaI RE. Tos pačios RE buvo panaudotos VH fragmento iškirpimui iš pJET1.2-VH vektoriaus (56 pav., B). Iškirptas VH fragmentas buvo įterptas į linijinį pJET1.2-VL per RE paliktas komplementarias sekas ir sukonstruotas naujas vektorius pJET1.2-VL-VH, koduojantis VL-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VH seką. Seka buvo patikrinta DNR sekoskaita.

Geno konstrukcija, koduojanti VL-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VH seką, RE NheI ir Sall iškirpta ir perkelta į raiškos vektorių pET28a(+) (56 pav., C). Nukleotidai buvo įterpti taip, kad susintetintas baltymas N-gale turėtų 6 histidinių seką, skirtą grynimui metalų chelatinės chromatografijos metodu. Nauja raiškos plazmidė pET28a(+)-6His-VL-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VH buvo patikrinta DNR sekoskaitos metodu.

Viengrandžiai scFv yra nedidelės molekulinės masės (~25 kDa) neglikozilinti baltymai, todėl jie gali būti sintetinami bakterijose. Gavus tinkamas scFv genetines konstrukcijas, jų raiška buvo atliekama *E. coli Tuner* kamieno bakterijose. Bakterijų mėginiai (lizatai) prieš ir po indukcijos buvo analizuojami SDS-PAGE metodu. Lizatuose po indukcijos buvo matomos fragmentų juostelės, atitinkančios VL-VH ir VH-VL baltymo molekulinę masę (~30 kDa) (57 pav., A).



**57 pav.** scFv fragmentų sintezė *E. coli* bakterijose. A – VL-VH ir VH-VL fragmentų raiškos indukcijos tyrimai SDS-PAGE metodu analizuojant bakterijų lizatus prieš (-) ir po indukcijos (+). B – scFv sintezės metu agreguojasi į netirpius intarpinius kūnelius (IK); GL – grubus lizatas, TB – tirpių baltymų frakcija. C – Išgrynintas atstatytos struktūros scFv VL-VH baltymas analizuotas baltymų elektroforezės metodu ir IB su MAk prieš histidinių žymę. Vaginolizino baltymas (VLY) turintis histidinių žymę naudotas teigiama kontrole (Zvirbliene et al., 2010). M – baltymų molekulinės masės standartas (nuo 10 iki 180 kDa).

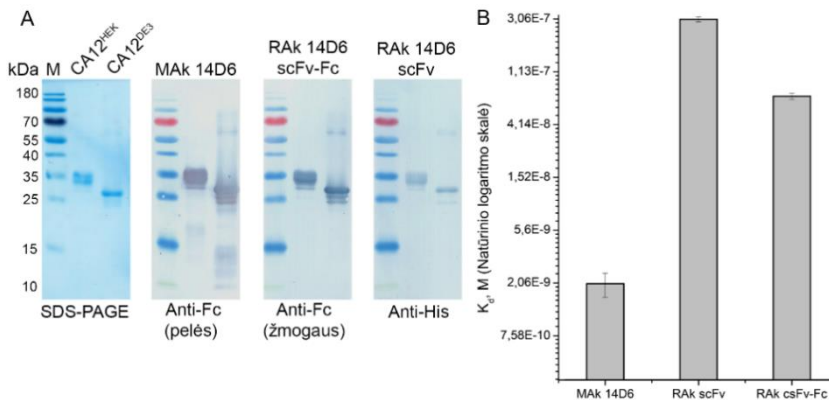
*E. coli Tuner* bakterijose scFv buvo aptikti netirpioje ląstelių lizato frakcijoje – intarpiniuose kūneliuose (angl. *inclusion bodies*) (57 pav., B). Šie kūneliai, prieš gryninant, buvo tirpinami 7 M GuHCl tirpale, po to atliktas natyvios baltymo struktūros atstatymas vario sulfatu. Baltymo struktūros atstatymo procesas vyko laipsniškos dializės metodu, naudojant buferinius



tirpalus su mažėjančia GuHCl koncentracija, ir pridėdant L-arginino. Žinoma, kad L-argininas pagerina baltymo struktūros atsistatymą (angl. *refolding*), mažindamas baltymo agregaciją, bei padidindamas proceso išėigą (Arakawa and Ejima, 2014). Po natyvos struktūros atstatymo, scFv buvo gryninami metalų chelatinės chromatografijos metodu. Išgrynintų baltymų grynumas buvo patikrintas SDS-PAGE metodu. Imunoblotingo metodu, naudojant anti-His antikūnus, buvo patvirtinta, kad baltymai turi His inkarinę seką (57 pav., C).

Nors VL-VH ir VH-VL sintezės lygis bakterijose buvo panašus, tačiau jų natyvos struktūros atstatymo ir gryninimo procedūros vyko nevienodai efektyviai. VH-VL atveju buvo stebima daug didesnė baltymo agregacija, ir šio baltymo išgryninti nepavyko. VL-VH atveju taip pat vyko agregacija, tačiau apie 3,5–5 % baltymo pavyko gauti tirpaus. Taip pat buvo nustatyta, kad VL-VH baltymas buvo linkęs agreguoti ir kristi į nuosėdas, jei jo koncentracija tirpale viršydavo 0,2 mg/mL. Taigi, sukurtasis scFv buvo nestabilus, o jo struktūros atstatymo ir gryninimo procesas buvo ilgas, sudėtingas ir nelabai efektyvus.

Gautas nedidelis baltymo kiekis buvo panaudotas jo imunologinių savybių ištyrimui netiesioginės IFA ir imunoblotingo metodais. Viengrandis scFv atpažino SDS denatūruotus CA XII rekombinantinius antigenus CA12<sup>HEK</sup> ir CA12<sup>DE3</sup> kaip ir tėvinis MAk 14D6 (58 pav., A), todėl galima teigti, kad jo specifiškumas nepakito.



**58 pav.** A – MAk 14D6 bei pagal jį sukurtų RAK scFv ir scFv-Fc sąveika su rekombinantiniais CA XII baltymais CA12<sup>HEK</sup> ir CA12<sup>DE3</sup> imunoblotingo metodu po denatūruojančios elektroforezės. Antriniai antikūnai žymėti HRP jungėsi su pelės arba žmogaus Fc fragmentais, arba su His žyme. M – baltymų molekulinės masės standartas (nuo 10 iki 180 kDa). B – MAk 14D6 bei RAK scFv ir scFv-Fc tariamųjų K<sub>d</sub>, nustatytų netiesioginės IFA metodu, palyginimas. MAk 14D6 buvo 150 kartų giminingesnis už RAK scFv. RAK scFv-Fc giminingumas CA XII buvo 4 kartus didesnis nei scFv baltymo.



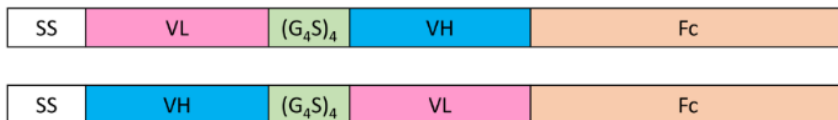
Netiesioginės IFA metodu buvo nustatyta scFv tariamoji  $K_d$ , kuri siekė  $3,0 \cdot 10^{-7} \pm 0,1 \cdot 10^{-7}$  M, ir buvo 150 kartų mažesnė nei tėvinio MAk 14D6 (58 pav., B). Kadangi gautasis scFv yra mažiau giminingas CA XII, imunologiniams tyrimams reikėtų naudoti gana didelį jo kiekį.

Nors pavyko gauti rekombinantinį scFv, kuris buvo tokio pat specifškumo kaip ir MAk 14D6, tačiau jo stabilumas buvo menkas, o gryninimo procesas sudėtingas. Todėl buvo pasirinktas kitas RAK formatas – scFv buvo sujungtas su žmogaus imunoglobulino pastoviuoju fragmentu Fc.

### 3.3.3. Viengrandžių antikūnų fragmentų su žmogaus IgG1 pastoviuoju regionu konstravimas ir raiška

Naujas RAK variantas, susidedantis iš pelės scFv ir žmogaus IgG1 poklasio pastoviojo fragmento Fc, buvo gautas, į vektorių pFUSE-hIgG1-Fc2 įterpant scFv seką koduojančius nukleotidus. Šis vektorius patrauklus tuo, kad jame iš karto yra įterptas Fc fragmentas ir yra interleukino-2 sekrecijos signalas, todėl naujai susintetintas baltymas sekretuojamas į ląstelių augimo terpę. Buvo išbandyti abiejų orientacijų VL-(G4S)4-VH ir VH-(G4S)4-VL rekombinantiniai variantai (59 pav.). Jų įterpimui į vektorių buvo sukurti nauji pradmenys su papildomais nukleotidais, skirtais RE hidrolizei (8 lentelė, 2.1.11.5 skyrius). Matrica panaudoti pET28a(+) vektoriai su įterptais scFv fragmentais.

Rekombinantiniai scFv-Fc yra didesni baltymai (~56 kDa) nei scFv, o jų Fc dalis yra glikozilinta, todėl jų raiškai buvo naudojamos žinduolių CHO ląstelės. Šios ląstelės yra vieni dažniausiai naudojamų producentų terapinės paskirties rekombinantiniams baltymams gauti (Laffly and Sodoyer, 2005).



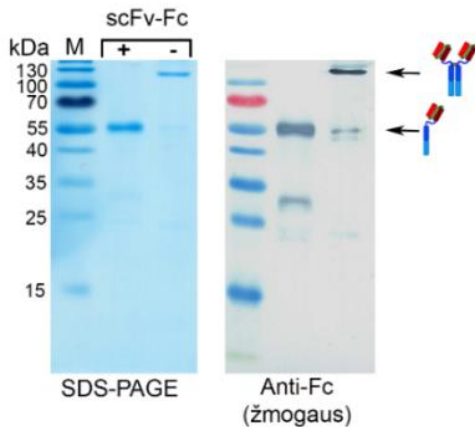
**59 pav.** RAK scFv-Fc variantų schemas. SS – sekrecijos signalinė seka.

CHO ląstelės buvo transfekuotos pFUSE vektoriais su įterptais scFv-Fc fragmentais ir po transfekcijos augintos selektyvioje terpėje su antibiotiku zeocinu, kurio atsparumo genas yra pFUSE vektoriuje. Buvo gautos stabilios transfekuotų CHO ląstelių linijos. RAK sekretuojantys CHO klonai buvo nustatomi netiesioginės IFA metodu, tikrinant ląstelių augimo terpę. Tuo tikslu buvo naudojami antriniai antikūnai, sąveikaujantys su žmogaus Fc fragmentu ir CA XII rekombinantiniai baltymai.

RAk iš ląstelių augimo terpės buvo išgryninti, naudojant sefarozę su baltymu A, kuris turi didelį giminingumą žmogaus Fc fragmentui. Gryninimo procesas buvo toks pats, kaip ir išskiriant MAK iš ląstelių augimo terpės. Nors scFv-Fc raiška buvo nedidelė (siekė 3-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tačiau baltymas pasižymėjo didesniu stabilumu, lyginant su bakterijose susintetintu scFv. Pavyko gauti išgrynintą baltymą, atitinkantį variantą VL-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VH. Tikėtina, kad VH ir VL dalių orientacija konstrukcijoje VH-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VL buvo nestabili ir netinkama gryninimui.

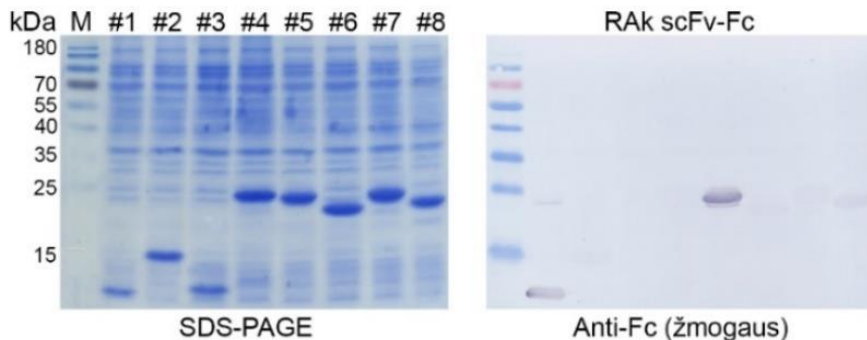
Po gryninimo RAK buvo analizuotas SDS-PAGE ir imunoblotingo metodais, naudojant antrinius antikūnus prieš žmogaus Fc fragmentą. RAK scFv-Fc prieš analizę buvo redukuojamas DTT (60 pav.) siekiant įvertinti, ar susintetintos atskiros RAK scFv-Fc grandinės dimerizuojasi, suformuodamos pilnos ketvirtinės struktūros baltymą. Baltymą paveikus reduktoriumi, SDS-PAGE buvo matoma ~56 kDa dydžio juostelė, kuri atitinka baltymo teoriškai apskaičiuotą molekulinę masę. Jei baltymas nebuvo paveiktas reduktoriumi, tuomet baltymų elektroforezėje buvo matyti baltymo dimeras (~112 kDa). Su šiais baltymais reagavo antriniai antikūnai prieš žmogaus Fc, kurie gali būti naudojami scFv-Fc detekcijai ir kituose eksperimentuose.

Išgryninto scFv-Fc sąveika su CA XII buvo tikrinta imunoblotingo ir netiesioginės IFA metodais. RAK specifiskai atpažino rekombinantinius CA XII baltymus abiem metodais (58 pav.), taip pat buvo nustatyta tariamoji K<sub>d</sub> ( $7,1 \times 10^{-8} \pm 0,4 \times 10^{-8}$  M). RAK scFv-Fc silpniau sąveikavo su CA XII, palyginus su MAK 14D6, tačiau veikė stipriau nei scFv baltymas.



**60 pav.** RAK scFv-Fc baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis ir IB naudojant antrinius antikūnus prieš žmogaus Fc. RAK scFv-Fc išgrynintas mėginys buvo redukuotas (+) arba ne (-). Šalia IB membranos nuotraukos (dešinėje) schematiškai pavaizduotos redukuoto ir neredukuoto RAK scFv-Fc struktūros. M – baltymų molekulinės masės standartas (nuo 10 iki 180 kDa).

Norint įsitikinti, kad RAK scFv-Fc specifškumas CA XII nepasikeitė, buvo patikrinta jo sąveika su persiklojančiais CA XII baltymo fragmentais, kurie buvo skirti MAK 14D6 epitopo nustatymui. Imunoblotingo metodu buvo parodyta, kad šis RAK sąveikavo su tais pačiais fragmentais (#1 ir #5, 61 pav.) kaip ir MAK 14D6, o tai rodo, kad jie atpažįsta tą patį epitopą.



**61 pav.** RAK scFv-Fc sąveika su persiklojančiais CA XII fragmentais, skirtais epitopui nustatyti SDS-PAGE (kairėje) ir imunoblotingo (dešinėje) metodais. RAK scFv-Fc reagavo su fragmentu #1 ir #5, analogiškai kaip ir tėvinis MAK 14D6. M – baltymų molekulinės masės standartas (nuo 10 iki 180 kDa).

Taigi, šiame darbe pavyko gauti specifiskus RAK prieš CA XII, kuri yra laikoma potencialiu priešvėžiniu taikiniu. Galimybės laboratorijoje susintetintus RAK taikyti platesnio masto tyrimams yra ribotos, kadangi reikalinga daug papildomų išteklių, įrangos ir eksperimentinių sąlygų optimizavimo, siekiant gauti pakankamus baltymo kiekius, bei norint pagerinti jo stabilumą ar giminingumą antigenui. Tačiau atlikti darbai patvirtino, kad nustatyta MAK variabiliųjų regionų seka yra teisinga ir funkcionali, o pati RAK formato idėja yra perspektyvi ir gali būti pritaikoma tolesniems tyrimams.

## DISKUSIJA

Monokloniniai (MAk) ir rekombinantiniai (RAk) antikūnai yra plačiai taikomi onkologijoje. Šie baltymai ir jų pagrindu sukurti biologiniai preparatai sukėlė tikrą perversmą ne tik vėžio gydymo srityje, bet ir pagerino ankstyvą vėžio diagnostiką, palengvino vėžinių susirgimų diferencinę diagnostiką ir klasifikavimą, tapo nepakeičiamais įrankiais prognozuojant ligos eigą ar gydymo efektyvumą, vizualizuojant vėžinius darinius ar ląsteles (Pillay et al., 2011). MAk pagrindu sukurti imunocheminiai metodai, diagnostikos sistemos ar vaizdinimo technologijos padeda tiksliai, kokybiškai ir kiekybiškai aptikti ir nustatyti antigenus, kuriuos sintetina vėžinės ląstelės (Zhang et al., 2014). Vėžio gydymui gali būti taikoma MAk/RAk monoterapija, kuri remiasi tiesioginiu antikūnų poveikiu antigenui arba imuninių ląstelių aktyvinimu ir dėl to sąlygota vėžinių ląstelių žūtimi. Be to, antikūnai gali būti toksiškų vėžinėms ląstelėms junginių nešikliai, jas tikslingai nukreipiantys į navikinį darinį. Kombinuotai terapijai papildomai naudojamos kiti preparatai, pavyzdžiui, citokinai (Wold et al., 2016).

Šiame darbe MAk kūrimui buvo pasirinktos su vėžiu siejamos karboanhidrazės IX ir XII (CA IX ir CA XII). Tai membraniniai fermentai, kurių aktyvusis centras nukreiptas į ląstelės išorę, dalyvaujantys įvairiuose vėžiniuose procesuose. Šiuos fermentus aktyvina hipoksija, kuri atsiranda dėl nepilnavertiško kraujagyslių tinklo sparčiai augančiame navike, o jie, savo ruožtu, padeda vėžinėms ląstelėms išgyventi nepalankioje aplinkoje. (Chiche et al., 2010b). Dėl savo lokalizacijos ląstelėje, padidėjusios raiškos navikiniame audinyje, didelės svarbos kancerogenezei bei vėžinių ląstelių išgyvenimui hipoksijos sąlygomis, daugelyje pasaulio laboratorijų intensyviai tiriamas CA IX ir CA XII diagnostinis ir terapinis potencialas (Mboge et al., 2015). Svarbu tirti šių CA izoformų vaidmenį ir kitų ligų atveju, todėl naujų reagentų poreikis CA IX ir CA XII tyrimams yra labai didelis.

Pagrindinis šio darbo tikslas buvo sukurti MAk, specifiskai atpažįstančius CA IX ir CA XII, juos apibūdinti ir įvertinti jų tinkamumą šių fermentų tyrimams. Taip pat buvo siekiama sukurti RAk prieš CA XII, potencialiai turinčius terapinį pritaikymą.

Hibridomų technologija, suliejant blužnies ląsteles iš imunizuotos pelės su mielomos ląstelėmis, yra gerai žinomas metodas, skirtas MAk kūrimui. Nors yra sukurtų alternatyvių technologijų, tokių kaip antikūnų eksponavimas faguose, tačiau hibridomų technologija išlieka nepakeičiama, kuriant pilno ilgio antigenams specifiskas imunoglobulinų molekules (Hnasko and Stanker, 2015). Itin svarbūs etapai, siekiant sukurti MAk, yra tinkamo antigeno

parinkimas ir MAk atranka, nes būtent antigenas nulemia būsimų MAk savybes, o tinkama atranka leidžia išgauti vertingiausias hibridomų klonus (Hanack et al., 2016).

CA IX yra plačiai tyrinėjamas vėžinės transformacijos žymuo, todėl yra aprašyta nemažai MAk, sukurtų prieš CA IX, kurie taikomi įvairiems tikslams. Pradėti diagnostikos *in vivo* bei imunoterapijos klinikiniai tyrimai, naudojant chimerinį antikūną cG250 (Kazokaitė et al., 2017). Tačiau mokslininkų bendruomenė susiduria su nemaža problema atkartojant ir interpretuojant eksperimentus, vykdytus su vienais ar kitais MAk (Weller, 2016). Pavyzdžiui, palyginus du komercinius dviepitopės IFA metodu veikiančius rinkinius, skirtus tirpiai CA IX nustatymui kraujo mėginiuose, vienas iš jų netiko nustatyti CA IX koncentracijai to paties paciento kraujyje, kuris buvo paimtas skirtingais būdais. Pasirodo, kad tame rinkinyje naudotas žymėtas MAk buvo jautrus mėginio paruošimui reikalingai EDTA, kuri turi įtakos CA IX struktūros pokyčiams ir tuo pačiu paveikia MAk sąveiką su CA IX (Wind et al., 2011). Todėl kuriant MAk labai svarbus visapusiškas jų apibūdinimas ir patikrinimas įvairiomis sąlygomis (Voskuil, 2017).

Kuriant naujus MAk prieš CA IX, buvo siekiama juos išsamiai charakterizuoti, o viena iš užduočių buvo gauti MAk, reaguojančius su skirtingomis baltymo vietomis, kuriuos būtų galima panaudoti dviepitopės IFA sistemos kūrimui ir taikymui mėginių tyrimuose. Todėl imunizacijoms buvo pasirinkti du rekombinantiniai baltymai, besiskiriantys domenine sandara. Vienas jų buvo sudarytas iš pilno ilgio užląstelinės dalies su PG domenu, o kitas buvo be PG domeno. PG domenas pasižymi didesniu imunogeniškumu, kadangi ar. sekų skirtumai tarp pelės ir žmogaus CA IX PG domenų yra didesni nei kataliziniame domene. Todėl, naudojant rekombinantinius baltymus su ir be PG domenų, tikėtasi gauti MAk, reaguojančius su skirtingomis baltymo dalimis.

Abu rekombinantiniai baltymai buvo susintetinti žmogaus HEK-293 ląstelėse, kuriose vyksta žinduoliams būdingas glikozilinimas, ir yra tinkamai suformuojama baltymo tretinė struktūra (Thomas and Smart, 2005). Kadangi žmogaus ir pelės CA IX baltymų sekos yra 70 % identiškios, rekombinantinių baltymų imunogeniškumas pelių organizme buvo labai nedidelis (specifinių antikūnų pelės kraujyje titras siekė iki 1:1900). Siekiant atrinkti stipriausius klonus, hibridinių ląstelių atranka buvo atlikta robotizuotu būdu. Po visų atrankos etapų pavyko gauti 5 MAk prieš pilno ilgio rekombinantinį CA IX baltymą ir 8 MAk prieš baltymą be PG domeno.

Antikūnų apibūdinimas yra labai svarbus jų tolesniam taikymui, todėl visi MAk buvo tikrinti įvairiais metodais, taip pat buvo nustatytos jų specifškumą

ir giminingumą nusakančios savybės. Nepakankamas MAk apibūdinimas lemia nepatikimus rezultatus, nespecifines reakcijas ir sunkiai interpretuojamus duomenis (Bordeaux et al., 2010). Naujai sukurtieji MAk prieš CA IX buvo charakterizuoti, nustatant imunoglobulinų klasę ir poklasius, tariamąją  $K_d$ , epitopo tipą (linijinis ar konformacinis). Taip pat sudarytos MAk grupės, kurios sąveikauja su skirtingais baltymo domenais, įvertinta, kurie MAk konkuruoja dėl prisijungimo prie baltymo ir turi vienodus ar skirtingus epitopus. MAk kryžminis specifiskumas nustatytas, panaudojus nedematūruotus ir dematūruotus rekombinantinius CA IX ir kitų CA izoformų baltymus. Taip pat buvo analizuota jų sąveika su natūraliu CA IX baltymu. Įvairiais imunocheminiais metodais buvo patvirtinta, kad MAk atpažįsta ląstelėje esančią CA IX ir tam netrukdo skirtingi mėginių paruošimo būdai.

Išskirtinėmis savybėmis pasižymėjo MAk H7, kuris sąveikavo su natyvia gyvų ląstelių paviršiuje esančia CA IX, ląsteles tiriant tėkmės citometrijos metodu. Šis MAk buvo panaudotas išskirti CA IX iš ląstelių lizatų, taikant imunoprecipitacijos metodą. MAk H7 sąveika su fiksuotomis ląstelėmis buvo nustatyta imunofluorescencijos metodu. Šis antikūnas vienintelis atpažino ląstelėse esančią CA IX formalinu fiksuotuose ir parafinizuotuose mėginiuose. Tiriant visais minėtais metodais, nebuvo stebimos nepageidaujamos nespecifinės reakcijos. Iš visos MAk kolekcijos tik MAk H7 atpažino linijinį epitopą ir dematūruotą CA IX imunoblotingo metodu.

MAk H7 poroje su MAk A3 buvo panaudotas, kuriant ir optimizuojant dviepitopės IFA sistemą, skirtą tirpiai CA IX nustatyti. Panaudojus šią sistemą, buvo ištirtos vėžinių ląstelių augimo terpės, siekiant aptikti CA IX ektodomeną, nuskeltą nuo ląstelių paviršiaus. Buvo pastebėta, kad tirpios CA IX kiekis terpėje padidėjo, ląsteles auginant hipoksijos sąlygomis, o tai atitiko ankstesnius kitų mokslininkų atliktus tyrimus (Vidlickova et al., 2016). Ši sistema buvo panaudota, tiriant žmogaus kraujo mėginius. Tirpi CA IX forma buvo nustatyta 40 % tirtų mėginių (n=95). Sukurtą IFA sistemą galima laikyti prototipu, kurį reikėtų optimizuoti, norint taikyti platesnio masto tyrimams.

Siekiant išsamiai apibūdinti MAk H7 ir įsitikinti jo unikalumu, buvo nustatyta tiksli epitopo ar. seka, kuri palyginta su kitais CA IX tyrimams naudojamais MAk, pavyzdžiui, M75 ar G250 (Závada et al., 2000). MAk H7 skyrėsi nuo MAk G250, nes pastarasis sąveikauja su konformaciniu epitopu, esančiu kataliziniame domene (Zatovicova et al., 2014). Antikūno M75 epitopas yra linijinis ir lokalizuotas PG domene. Jo ar. seka buvo nustatyta

anksčiau, todėl ją buvo galima palyginti su MAk H7 seka (Závada et al., 2000).

MAk H7 atpažįstamos ar. sekos nustatymui buvo panaudoti persiklojantys trumpi sintetiniai peptidai, apimantys PG domeną. Palyginus MAk M75 ir H7 sąveiką su peptidais, buvo pastebėtas akivaizdus skirtumas: MAk M75 epitopas yra sudarytas iš 6 ar. sekos GEEDLP, kuri PG domene pasikartoja keletą kartų (Závada et al., 2000), todėl MAk M75 reagavo su peptidais, turinčiais šią seką. MAk H7 reagavo tik su dviem peptidais, iš kurių vienas peptidas buvo atpažintas abiejų antikūnų, o tai rodo, jog jų epitopai persikloja. Detali analizė parodė, kad MAk H7 sąveikai su baltymu reikalingas 12 ar. epitopas GEDDPLGEEDLP. Motyvas GEEDLP yra bendras abiem MAk, tačiau jo neužtenka MAk H7 sąveikai su baltymu. Ši analizė patvirtino, kaip svarbu yra nustatyti MAk epitopus, norint juos apibūdinti ir palyginti tarpusavyje.

Kitas mūsų pasirinktas baltymas buvo CA XII. Šiuo atveju buvo išmėginti net trys skirtingi antigenai: rekombinantiniai baltymai, atitinkantys užląstelinį CA XII domeną, susintetinti bakterijose ir žmogaus HEK-293 ląstelėse; bei bioinformatiniais metodais parinktas sintetinis peptidas, konjuguotas su baltymu nešikliu KLH. Iš viso buvo sukurtos 33 hibridomų linijos, kurios sekretavo didelio giminingumo ir specifiškumo MAk prieš CA XII. Didelė MAk kolekcija prieš tam tikrą antigeną padidina tikimybę atrinkti tokį MAk, kuris pasižymėtų unikaliomis savybėmis ir būtų tinkamas užsibrėžtiems tikslams pasiekti.

Naudojant bakterijose susintetintą antigeną, pavyko gauti perspektyvų MAk 15A4, kurio diagnostinis potencialas buvo patvirtintas imunohistochemijos metodu, tiriant klinikinius įvairių navikų mėginius. Sintetinis peptidas buvo panaudotas, siekiant gauti CA XII fermentinį aktyvumą slopinančius MAk. Atlikus bioinformatinę analizę buvo parinkta CA XII ar. seka, esanti netoli baltymo aktyvaus centro. Ši ar. seka buvo nepanaši į kitų pelės baltymų sekas, todėl tikėjomės išvengti mažo imunogeniškumo dėl imuninės tolerancijos. Prieš peptidą buvo gauti du MAk ir abu slopino CA XII katalizuojamą CO<sub>2</sub> hidratacijos reakciją. Tačiau minėtieji MAk neatitiko visų iškeltų tikslų, kadangi nesąveikavo su natyviu baltymu gyvų ląstelių paviršiuje, o tai yra pagrindinė sąlyga norint MAk ar pagal juos sukurtus RAK taikyti diagnostikai ar terapijai.

Didžiausia dalis MAk prieš CA XII kolekcijos buvo sukurta, imunizacijai naudojant antigeną susintetintą HEK-293 ląstelėse, nors jo imunogeniškumas buvo mažiausias. Šie MAk, kaip ir CA IX atveju, buvo detalčiai apibūdinti. Pavyko gauti daug MAk, kurie sąveikavo ne tik su rekombinantiniais CA XII

baltymais, taikant IFA ir imunoblotingo metodus, bet ir atpažino natyvų CA XII baltymą gyvų vėžinių ląstelių paviršiuje, tiriant tėkmės citometrijos metodu.

Šioje kolekcijoje buvo unikalus antikūnas 14D6. Sustabdytos tėkmės CO<sub>2</sub> hidratacijos metodu buvo parodytas MAk 14D6 slopinantis poveikis CA XII fermentiniam aktyvumui. Tokia savybė itin aktuali, norint MAk/RAk taikyti terapijai, nes tiesioginis baltymo funkcijos blokavimas gali turėti didesnę poveikį vėžinių ląstelių išgyvenimui.

MAk 14D6 epitopas buvo nustatytas, naudojant rekombinantinius CA XII persiklojančius fragmentus, ir buvo parodyta, kad MAk 14D6 jungiasi prie baltymo N-gale esančios 8 ar. sekos FGPDGENS. Sudarius CA XII baltymo struktūros modelį, buvo nustatyta šios sekos lokalizacija. Pasirodo, ši seka yra netoli aktyvaus centro kišenės, todėl tikėtina, kad prisijungęs MAk gali užstoti substrato patekimą į aktyvų centrą arba gali iškreipti baltymo struktūrą taip, kad šis taptų neaktyvus. MAk 14D6 dėl savo sąveikos su natyviu baltymu ir gebėjimo slopinti CA XII fermentinį aktyvumą buvo pasirinktas kaip tėvinis antikūnas RAK kūrimui.

Žvelgiant istoriškai į antikūnų terapinį taikymą, poreikis kurti RAK atsirado dėl rimtos priežasties – MAk imunogeniškumo. Pirmieji imunoterapijos bandymai, naudojant MAk, atskleidė jų imunogeniškumo problemą. Pelės MAk, suleisti į žmogaus organizmą, imuninės sistemos buvo atpažįstami kaip svetimės molekulės, ir greitai susiformuodavo žmogaus antikūnai prieš pelės imunoglobulinius. Tai nulemdavo ne tik sunkesnius pašalinius gydymo reiškinius, bet ir greitą terapijai panaudoto MAk neutralizavimą ir pašalinimą. Toks gydymas buvo neefektyvus, nes galėjo būti naudojama tik vienkartinė terapinio MAk dozė (Modjtahedi et al., 2012).

Vystantis technologijoms, atsirado galimybė modifikuoti MAk genų inžinerijos metodais, siekiant sumažinti jų imunogeniškumą, ir netrukus buvo sukurti pirmieji chimeriniai bei humanizuoti RAK. Šiuo metu sukurta daug įvairių RAK formatų, o jų potencialus taikymas įvairių ligų, ypač vėžinių susirgimų, diagnostikai ir imunoterapijai yra intensyviai tyrinėjamas (Cuesta et al., 2010).

Šiame darbe buvo pasirinkti du RAK formatai – scFv ir scFv-Fc. Viengrandžiai scFv yra sudaryti iš variabiliųjų lengvosios ir sunkiosios MAk grandinių fragmentų. Fragmentai tarpusavyje sujungiami jungtuku (polipeptidine grandine) genų inžinerijos metodais. Šie rekombinantiniai baltymai yra mažos molekulinės masės (25-30 kDa), gali būti sintetinami bakterijose, kadangi yra neglikozilinti, ir išlaiko tėvinio MAk specifiskumą antigeniui. Lyginant farmakokinetines scFv ir MAk savybes, mažesni scFv



žymiai lengviau prasiskverbia į audinius, tačiau yra ir greičiau pašalinami iš kraujo (Saeed et al., 2017). Kitas formatas – scFv-Fc – turi prijungtą žmogaus IgG1 Fc fragmentą. Tokios molekulės gali ne tik specifiskai sąveikauti su antigenu-taikiniu, bet papildomai atlieka ir efektorinę funkciją. Pastovusis Fc fragmentas yra Fc receptorių, esančių ant imuninių ląstelių, ligandas, todėl fagocitai ar NK ląstelės yra aktyvinamos ir sukelia vėžinių ląstelių žūtį. Svarbu paminėti, kad šis baltymas yra glikozilinamas bei homodimerizuojasi (molekulinė homodimero masė siekia 105-120 kDa), todėl jo sintezei reikia rinktis žinduolių ląsteles, kurios užtikrina tinkamas potransliacines modifikacijas ir padeda susiformuoti ketvirtinei struktūrai (Ha et al., 2016).

RAk konstravimas vyko keliais etapais. Pirmiausia buvo nustatyta MAk 14D6 lengvosios ir sunkiosios grandinių variabiliųjų fragmentų ar. ir jas koduojančių nukleotidų sekos. Panaudojant gautas sekas, buvo sukonstruotas genas, skirtas scFv baltymo sintezei *E. coli* bakterijose. Nauja genetinė scFv konstrukcija buvo įkelta į žinduolių raiškos vektorius, kuriame buvo sekrecijos signalas bei žmogaus IgG1 Fc fragmentas. scFv-Fc sintezei buvo pasirinktos CHO ląstelės. Susintetinti baltymai buvo gryninami ir tiriami imunofermentiniais metodais, siekiant patikrinti jų specifiskumą antigenui, t. y., CA XII baltymui.

MAk variabiliųjų sekų identifikavimas yra sudėtingas procesas, kadangi būtent šie MAk regionai labiausiai skiriasi tarp skirtingų imunoglobulinų molekulių. Variabiliųjų fragmentų ar. sekos yra klonuojamos iš hibridomų atvirkštinės transkripcijos PGR metodu, naudojant specifinius pradmenis, kurie jungiasi prie konservatyvių sekų. Tokie pradmenys dažniausiai yra stipriai degeneruoti ir pasižymi mažesniu specifiskumu, todėl labai dažnai gauti PGR produktai nesusidaro arba visiškai neatitinka tėvinio MAk variabiliųjų fragmentų sekų (Rohatgi et al., 2008).

Išbandžius kelių autorių siūlomus pradmenų komplektus, buvo gauti 6 lengvosios grandinės ir 2 sunkiosios grandinės variabiliuosius fragmentus koduojančių nukleotidų sekų variantai. Atlikus detalią analizę, pavyko identifikuoti neteisingas sekas, kuriose nustatyti skaitymo rėmelio poslinkiai, stop kodonai, delecijos ar netipiškas ar. sąstatas. Ypač svarbi cisteinų pozicija ir jų skaičius, kadangi tai itin konservatyvi ar., nuo kurios priklauso variabiliojo fragmento struktūra. Atmetus netinkamas sekas, pavyko gauti teoriškai teisingas nukleotidų sekas, kurios kodavo MAk 14D6 lengvosios ir sunkiosios grandinių variabiliuosius fragmentus. Tačiau net ir tokia atranka negarantuoja, kad bus gautas funkciškai aktyvus RAk. Atrinktos sekos gali būti neteisingos (pseudosekos), kurios teoriškai atitinka visus reikalavimus ir nesiskiria nuo imunoglobulinų variabiliųjų fragmentų (Babrak et al., 2017).

Vienintelis būdas įsitikinti, kad nustatytos sekos koduoja tikrąsias MAk 14D6 variabiliųjų fragmentų sekas, yra susintetinti rekombinantinius baltymus ir juos funkciškai patikrinti.

Sekose buvo nustatyti hiperkaitieji CDR ir karkasiniai FR fragmentai, kurie formuoja sąveikos vietas su antigenu. CDR sekos yra ypač svarbios MAk ir juos sekretuojančių hibridomų identifikavimui, nes kiekvienas imunoglobulinas turi unikalias CDR sekas.

Konstruojant scFv rekombinantinio baltymo sintezei reikalingą raiškos vektorių, buvo atlikta daug manipuliacijų, pavyzdžiui, VH ir VL fragmentai buvo sujungti skirtingomis orientacijomis (VL-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VH ir VH-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VL) bei pridėti nukleotidai, koduojantys (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> polipeptidinę jungtį. Ši jungtis leidžia tinkamai susiformuoti aktyviam scFv ir nepaveikia jo specifiškumo antigenui (Yusakul et al., 2016). Po visų klonavimo etapų, galutiniame vektoriuje esanti nukleotidų seka buvo patikrinta DNR sekoskaitos metodu.

Rekombinantinių scFv sintezei buvo panaudotos *E. coli* bakterijos, tačiau scFv buvo linę agreguoti ir formuoti netirpius intarpinius kūnelius. Intarpinių kūnelių formavimasis yra didelė kliūtis, kuriant ir gryninant rekombinantinius baltymus. Norint tinkamai išgryninti ir gauti aktyvų scFv, pirmiausia reikėjo išskirti intarpinius kūnelius, juos ištirpinti didelės koncentracijos denatūrantu GuHCl tirpale, atstatyti struktūrą (angl. *refolding*) ir išgryninti metalų chelatinės chromatografijos metodu. Deja, šis procesas buvo mažai efektyvus, nes GuHCl suardo antrinę baltymo struktūrą ir bandant ją atstatyti vyksta intensyvi baltymų agregacija (Singh et al., 2015). Po visų išvardintų etapų pavyko gauti tik vieną scFv variantą VL-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VH, o kitos orientacijos scFv, mėginant atstatyti jo natyvią struktūrą, agreguodavo ir iškrisdavo į nuosėdas. Gautas išgrynintas scFv baltymas taip pat buvo gana nestabilus – didesnėse koncentracijose iškrisdavo į nuosėdas, todėl išeiga po gryninimo buvo nedidelė. Patikrinus IFA ir imunoblotingo metodais, šis RAK sugebėjo atpažinti rekombinantinį CA XII baltymą, o tai rodo, kad gautas scFv išlaikė tėvinio MAk 14D6 specifiškumą antigenui, o nustatytos VL ir VH sekos yra tinkamos ir formuoja aktyvų baltymą.

Kitas RAK formatas, scFv-Fc, buvo susintetintas CHO ląstelėse, kurios rekombinantinį baltymą sekretavo į augimo terpę. Tai itin patogus rekombinantinių baltymų sintezės būdas, kadangi sekretuojamus baltymus nesudėtinga gryninti. Be to, CHO ląstelės vyksta potransliacinės modifikacijos, jose yra reikalingi baltymai, padedantys susiformuoti tinkamai baltymo struktūrai. Šiuo atveju taip pat pavyko gauti tik vieną variantą VL-(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>-VH-Fc, kuris pasižymėjo didesniu stabilumu nei scFv baltymas, ir buvo tinkamos homodimerinės struktūros. Išanalizavus jo sąveiką su

rekombinantine CA XII imunoblotingo metodu, gauti tokie pat rezultatai, kaip ir su tėviniu MAk ar RAK scFv. Be to, RAK scFv-Fc atpažino tuos pačius fragmentus, skirtus epitopų nustatymui, kaip ir MAk 14D6, todėl galima teigti, kad specifiškumas antigenui nepakito ir RAK sąveikauja su tuo pačiu epitopu. Palyginus visų trijų antikūnų variantų tariamąsias  $K_d$  netiesioginės IFA metodu, buvo nustatyta, kad su CA XII antigenu RAK sąveikauja silpniau nei tėvinis MAk 14D6, tačiau RAK scFv-Fc buvo 4 kartus giminingesnis antigenui nei viengrandis scFv.

Sukurtieji RAK patvirtina koncepciją, kad žinant MAk variabiliąsias sekas, atsakingas už sąveiką su antigenu, galima sukurti įvairių formatų antikūnų molekules, išlaikiusias specifiškumą antigenui. Pavyzdžiui, daugiau nei prieš 30 metų sukurtas MAk G250, sąveikaujantis su CA IX, buvo sėkmingai modifikuotas į chimerinį antikūną cG250, kuris buvo išbandytas klinikinių bandymų stadijoje inkstų vėžio vizualizavimui *in vivo*, bei pacientų atrankai imunoterapijai (Matulis, 2019; Oosterwijk et al., 1986; Surfus et al., 1996). Šiuo metu bandomas ir kitas imunoterapijos modelis – chimerinį antigeno receptorių sintetinančios T ląstelės CAR-T, kurios neseniai buvo patvirtintos FDA leukemijos gydymui (Mullard, 2017). CAR-T, kurios atakuoja CA IX sintetinančias vėžines ląsteles, dar tik įžengė į klinikinių bandymų stadiją. Tokių CAR-T chimerinių receptorių vienas iš komponentų yra viengrandis scFv, kuris sukonstruotas pagal minėtą MAk G250, ir yra atsakingas už specifinę CAR-T sąveiką su CA IX turinčiais taikiniai. Nors atlikus pirmuosius klinikinius bandymus buvo susidurta su gana sunkiais pašaliniais reiškiniais, tačiau tyrėjai intensyviai kuria ir naujesnės kartos CAR-T ląsteles, tikėdamiesi geresnio efekto ateityje (Lamers et al., 2006; Suarez et al., 2016).

Šiame kontekste svarbu paminėti, kad iki šiol nebuvo atlikta klinikinių tyrimų, kuriose būtų įvertinti RAK, sąveikaujantys su CA XII. Tačiau laboratoriniai ir iki klinikiniai tyrimai rodo, kad CA XII gali būti perspektyvus terapijos taikyns. Pavyzdžiui, CA12 geno nutildymas arba baltymo slopinimas cheminiais junginiais, tokiais kaip acetazolamidas, sensibilizuoja chemoterapijai atsparias storosios žarnos vėžio ląsteles (Kopecka et al., 2015) arba sumažina krūties vėžinių ląstelių migraciją ir invaziškumą (Hsieh et al., 2010). Nauja terapijos strategija galėtų būti kombinuotas CA IX ir CA XII slopinimas. Viena tyrėjų grupė parodė, kad CA9 geno nutildymas vėžio ksenografto tūrį sumažino 40 %, tačiau CA12 iRNR raiškos lygis žymiai padidėjo, taip kompensuojant CA IX funkciją, o nutildžius abi izoformas, ksenografto tūris sumažėjo net 85 % (Chiche et al., 2009).

Prieš taikant terapiją, nukreiptą prieš CA IX ir CA XII izoformas, pirmiausia reikėtų įvertinti, kokuose navikuose vyksta abiejų CA IX ir CA

XII raiška. Šiame darbe, taikant sukurtus MAk prieš CA IX ir CA XII, tėkmės citometrijos metodu bei naudojant AT-kPGR sistemas, skirtas CA9 ir CA12 iRNR raiškai nustatyti, buvo parodyta, kad plaučių vėžio A549, glioblastomos U-87 bei krūties vėžio MDA-MB-231 ląstelėse yra sintetamos abi CA izoformos, tačiau inkstų vėžio A498 ląstelėse nustatyta tik CA XII, o odos karcinomos A431 ląstelėse – tik CA IX. Akivaizdu, kad tokie tyrimai yra būtini, norint atlikti kokybiškus CA IX ir CA XII slopinimo tyrimus, ir jų rezultatus vėliau pritaikyti klinikinėje praktikoje.

Apibendrinant, šiame darbe buvo sukurtos dvi didelės MAk prieš CA IX ir CA XII kolekcijos. MAk buvo visapusiškai apibūdinti, aprašytos jų fizikinės-cheminės ir imunologinės savybės. Prieš abi CA izoformas pavyko gauti unikalius MAk H7 (prieš CA IX) ir MAk 14D6 (prieš CA XII), kurie gali būti taikomi CA IX ir CA XII tyrimams įvairiais metodais tiek fundamentiniais, tiek taikomaisiais tikslais, pavyzdžiui, vėžinių ląstelių ar klinikinių mėginių analizei. Buvo sėkmingai sukurtos dvi RAk formos (scFv ir scFv-Fc) prieš CA XII, panaudojus MAk 14D6 sekretuojančių hibridomų genetinę medžiagą. Atlikti tyrimai ir jų metu sukurtieji MAk gali būti pritaikyti tolesniems CA IX ir CA XII raiškos tyrimams ir šių fermentų kaip vėžinių ląstelių žymenų potencialo įvertinimui, bei kuriant naujas vėžio terapijos strategijas, pavyzdžiui, kombinuotą CA IX ir CA XII slopinimą.

## IŠVADOS

1. Imunizacijai naudojant rekombinantinius antigenus, sukurtos naujos stabilios hibridomų linijos, sekretuojančios aukšto giminingumo IgG klasės MAk prieš CA IX (13 MAk kolekcija) ir CA XII (33 MAk kolekcija).

2. Ištyrus MAk kryžminį specifiškumą, nustatyta, kad dauguma MAk yra specifiški tik tai CA izoformai, prieš kurią buvo sukurti. Abi kolekcijas sudarantys MAk sąveikauja su linijiniais arba konformaciniais epitopais, jungiasi su skirtingomis baltymų sritimis ir yra tinkami CA IX ir CA XII tyrimams įvairiais imunocheminiais metodais.

3. MAk 15A4 prieš CA XII ir MAk H7 prieš CA IX turi potencialią diagnostinę vertę, nes specifiškai sąveikauja su ląstelėse lokalizuotomis CA XII ir CA IX žmogaus audinių mėginiuose. Šiuos MAk panaudojus klinikinių mėginių tyrimams IHC metodu nustatyta, kad vėžiniame audinyje CA IX ir CA XII aptinkamos dažniau nei sveikame audinyje.

4. Atlikus CA XII ir CA IX raiškos tyrimus ląstelėse tėkmės citometrijos metodu, nustatyta, kad A549, U-87 bei MDA-MB-231 ląstelėse sintetinos abi izoformos, A498 ląstelėse sintetinama tik CA XII, o A431 ląstelėse – tik CA IX. Abiejų CA izoformų raiška ląstelėse padidėja hipoksijos sąlygomis.

5. MAk 14D6 prieš CA XII gali turėti potencialią vertę taikinių terapijai, nes slopina CA XII fermentinį aktyvumą ir reaguoja su natyvia CA XII gyvų vėžinių ląstelių paviršiuje.

6. Nustatytos MAk 14D6 variabiliąsias sritis koduojančios DNR sekos ir sukonstruoti du rekombinantinių antikūnų variantai – scFv ir scFv-Fc, specifiškai sąveikaujantys su rekombinantine CA XII.

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. **Stravinskienė D**, Imbrasaitė A, Petrikaitė V, Matulis D, Matulienė J, Žvirblienė A, New Monoclonal Antibodies for a Selective Detection of Membrane-Associated and Soluble Forms of Carbonic Anhydrase IX in Human Cell Lines and Biological Samples. *Biomolecules*. 2019 Jul 25;9(8). pii: E304. doi: 10.3390/biom9080304.

2. **Dekaminavičiūtė D**, Lasickienė R, Parkkila S, Jogaitė V, Matulienė J, Matulis D, Žvirblienė A, Development and characterization of new monoclonal antibodies against human recombinant CA XII. *Biomed Res Int*. 2014;2014:309307. doi: 10.1155/2014/309307.

3. **Dekaminavičiūtė D**, Kairys V, Zilnytė M, Petrikaitė V, Jogaitė V, Matulienė J, Gudlevičienė Ž, Vullo D, Supuran CT, Žvirblienė A, Monoclonal antibodies raised against 167-180 aa sequence of human carbonic anhydrase XII inhibit its enzymatic activity. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2014 29(6): 804–810. doi: 10.3109/14756366.2013.856424.

## PATENTAI

**Dekaminavičiūtė D**, Plečkaitytė M, Matulis D, Žvirblienė A, Naujas rekombinantinis antikūnas prieš žmogaus karboanhidrazę XII. Paraiška Nr. 2014 140, LT patentas Nr. 6331 B (2016).

## SKYRIAI KNYGOSE

1. **Stravinskienė D**, Žvirblienė A (2019) Development of Therapeutic Antibodies Against Carbonic Anhydrases. In: Matulis D. (ed.) Carbonic Anhydrase as Drug Target. *Springer*, pp 305-322.

2. Imbrasaitė A, **Stravinskienė D**, Žvirblienė A (2019) Detection of Carbonic Anhydrases. In: Matulis D. (ed.) Carbonic Anhydrase as Drug Target. *Springer*. pp 323-333.

## PUBLIKACIJOS NESUSIJĘ SU DISERTACIJOS TEMA

1. Simanavičienė V, Gudlevičienė Ž, Pependikytė V, **Dekaminavičiūtė D**, Stumbrytė A, Rubinaitė V, Žvirblienė A, Studies on the prevalence of oncogenic HPV types among Lithuanian women with cervical pathology. *J Med Virol*. 2014 Sep 7. doi: 10.1002/jmv.24073.

2. Lasickienė R, Gedvilaite A, Norkiene M, Simanaviciene V, I.Sezaite, **Dekaminaviciute D**, Shikova E, Žvirblienė A, The use of recombinant pseudotype virus-like particles harbouring inserted target antigen to generate antibodies against cellular marker p16<sup>INK4A</sup>. *TheScientificWorld J*. 2011, ID 263737, doi:10.1100/2012/263737

## PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

1. **Dekaminavičiūtė D**, Lasickienė R, Zilnytė M, Michailovienė V, Jogaitė V, Matulis D, Parkkila S, Žvirblienė A, Nauji monokloniniai antikūnai prieš žmogaus karboanhidrazę XII ir jų diagnostinio potencialo įvertinimas. Žodinis pranešimas LBD konferencijoje 2012 m., Tolieja, Lietuva.

2. **Dekaminavičiūtė D**, Lasickienė R, Zilnytė M, Michailovienė V, Jogaitė V, Parkkila S, Matulis D, Žvirbliene A, Immunodetection of human carbonic anhydrase XII as a new potential biomarker of tumor cells. Stendinis pranešimas Europos imunologų kongrese (ECI) 2012, Glazgas, Didžioji britanija.

3. **Dekaminavičiūtė D**, Lasickienė R, Zilnytė M, Michailovienė V, Jogaitė V, Parkkila S, Matulis D, Žvirblienė A, Immunodetection of human CA XII as a new potential biomarker of tumor cells, Main Symposia And Workshops. *FEBS Journal*, 280: 3–617. Stendinis pranešimas (FEBS Congress, Sankt Peterburgas, Rusija, 2013).

4. **Dekaminavičiūtė D**, Lasickienė R, Zilnytė M, Michailovienė V, Jogaitė V, Parkkila S, Matulis D, Žvirblienė A; „Novel monoclonal antibodies against human Carbonic Anhydrase XII, a potential biomarker of tumor cells“. Stendinis pranešimas tarpautiniame imunologų kongrese (ICI) 2013, Milanas, Italija.

5. **Dekaminavičiūtė D**, Kairys V, Petrikaitė V, Jogaitė V, Matulienė J, Supuran CT, and Žvirblienė A, Novel inhibitory monoclonal antibodies against tumour-associated carbonic anhydrase XII, Stendinis pranešimas (FEBS Congress, Paryžius, 2014).

6. **Dekaminavičiūtė D**, Kairys V, Petrikaitė V, Jogaitė V, Matulienė J, Supuran CT, and Žvirblienė A, Novel inhibitory monoclonal antibodies against tumour-associated carbonic anhydrase XII, Žodinis pranešimas tarptautinėje LBD konferencijoje, jaunųjų mokslininkų simpoziume 2014 m., Birštonas, Lietuva.

7. **Dekaminavičiūtė D**, Lasickiene R, Vaitiekaitė A, Andrejauskas P, Petrikaite V, Matulis D, Žvirblienė A, Immunodetection and quantitative evaluation of tumor-associated carbonic anhydrase XII expression in cancer cells. Stendinis pranešimas 10-oje tarptautinėje Karboanhidrazių konferencijoje, Maastrichte, Olandijoje (2015 m.).

8. **Dekaminavičiūtė D**, Lasickiene R, Vaitiekaitė A, Andrejauskas P, Petrikaite V, Matulis D, Žvirblienė A, Investigation of tumor-associated carbonic anhydrase XII expression in cancer cells. Pristatytas stendinis pranešimas 4-oje tarptautinėje Europos Imunologų konferencijoje, Vienoje, Austrijoje (2015 m.). *Stendinis pranešimas buvo išrinktas geriausiu savo tematikoje („Vėžio markeriai“, angl., „Tumormarkers“) ir buvo pasiūlytas kandidatu į geriausių stendinių pranešimų apdovanojimą.*

9. **Dekaminavičiūtė D**, Vaitiekaitė A, Matulis D, Žvirblienė A, Karboanhidrazės XII raiškos tyrimai vėžinėse ląstelėse imunologiniais ir molekulinės biologijos metodais. Pristatytas žodinis pranešimas LMA Biologijos, medicinos ir geomokslų skyriaus jaunųjų mokslininkų konferencijoje „BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“ (2015 m.), Vilnius, Lietuva. *Laimėta 1 vieta ir prizas už geriausių pranešimą.*

10. **Stravinskienė D**, Žvirblienė A. Determination of antibody-binding region of monoclonal antibody targeting carbonic anhydrase XII for the development of recombinant antibodies of potential therapeutic relevance. Pristatytas stendinis pranešimas 4-tajame tarptautiniame gyvybės mokslų forume Life Sciences Baltics 2018, Vilnius, Lietuva.



## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2014). Cellular and molecular immunology (Saunders).
2. Afonina, I., Ankoudinova, I., Mills, A., et al. (2007). Primers with 5' flaps improve real-time PCR. *Biotechniques* 43, 770–774.
3. Ahmad, Z.A., Yeap, S.K., Ali, A.M., et al. (2012). ScFv antibody: Principles and clinical application. *Clin. Dev. Immunol.* 2012.
4. Alterio, V., Hilvo, M., Di Fiore, A., et al. (2009). Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16233–16238.
5. Ambrosio, M.R., Di Serio, C., Danza, G., et al. (2016). Carbonic anhydrase IX is a marker of hypoxia and correlates with higher Gleason scores and ISUP grading in prostate cancer. *Diagn. Pathol.* 11, 45.
6. Arakawa, T., and Ejima, D. (2014). Refolding Technologies for Antibody Fragments. *Antibodies* 3, 232–241.
7. Armbruster, D.A., and Pry, T. (2008). Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* 29, S49–S52.
8. Aspatwar, A., Tolvanen, M.E.E., and Parkkila, S. (2013). An update on carbonic anhydrase-related proteins VIII, X and XI. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 28, 1129–1142.
9. Babrak, L., McGarvey, J.A., Stanker, L.H., et al. (2017). Identification and verification of hybridoma-derived monoclonal antibody variable region sequences using recombinant DNA technology and mass spectrometry. *Mol. Immunol.* 90, 287–294.
10. Bandaranayake, A.D., and Almo, S.C. (2014). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Lett.* 588, 253–260.
11. Barnett, D.H., Sheng, S., Charn, T.H., et al. (2008). Estrogen receptor regulation of carbonic anhydrase XII through a distal enhancer in breast cancer. *Cancer Res.* 68, 3505–3515.
12. Battke, C., Kremmer, E., Mysliwicz, J., et al. (2011). Generation and characterization of the first inhibitory antibody targeting tumour-associated carbonic anhydrase XII. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 649–658.
13. Bednarski, J.J., and Sleckman, B.P. (2019). At the intersection of DNA damage and immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 231–242.
14. Belldegrun, A.S., Chamie, K., Kloepfer, P., et al. (2013). ARISER: A randomized double blind phase III study to evaluate adjuvant cG250 treatment versus placebo in patients with high-risk ccRCC—Results and implications for adjuvant clinical trials. *J. Clin. Oncol.* 31, 4507.
15. Bentley, G.A. (1994). Twenty years of antibody structure. *Res. Immunol.* 145, 31–33.
16. Bleumer, I., Knuth, A., Oosterwijk, E., et al. (2004). A phase II trial of chimeric monoclonal antibody G250 for advanced renal cell carcinoma patients. *Br. J. Cancer* 90, 985–990.
17. Bleumer, I., Oosterwijk, E., Oosterwijk-Wakka, J.C., et al. (2006). A Clinical Trial With Chimeric Monoclonal Antibody WX-G250 and Low Dose Interleukin-2 Pulsing Scheme for Advanced Renal Cell Carcinoma. *J. Urol.* 175, 57–62.
18. Bordeaux, J., Welsh, A., Agarwal, S., et al. (2010). Antibody validation.

Biotechniques 48, 197–209.

19. Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R., et al. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15, 1–14.

20. Bradbury, A.R.M., Trinklein, N.D., Thie, H., et al. (2018). When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions. *MABs* 10, 539–546.

21. Brouwers, A.H., Buijs, W.C.A.M., Mulders, P.F.A., et al. (2005). Radioimmunotherapy with [131I]cG250 in patients with metastasized renal cell cancer: Dosimetric analysis and immunologic response. *Clin. Cancer Res.* 11, 2729–2739.

22. Buanne, P., Renzone, G., Monteleone, F., et al. (2013). Characterization of Carbonic Anhydrase IX Interactome Reveals Proteins Assisting Its Nuclear Localization in Hypoxic Cells. *J. Proteome Res.* 12, 282–292.

23. Buonaguro, F.M., Pauza, D., Tornesello, M.L., et al. (2014). Cancer diagnostic and predictive biomarkers. *Biomed Res. Int.* 2014, 980163.

24. Bustamante-Córdova, L., Melgoza-González, E.A., and Hernández, J. (2018). Recombinant Antibodies in Veterinary Medicine: An Update. *Front. Vet. Sci.* 5.

25. Chamie, K., Donin, N.M., Klöpfer, P., et al. (2017). Adjuvant Weekly Girentuximab Following Nephrectomy for High-Risk Renal Cell Carcinoma. *JAMA Oncol.* 3, 913.

26. Chaplin, D.D. (2010). Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S3–23.

27. Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 39, 1–10.

28. Chiche, J., Ilc, K., Laferrière, J., et al. (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res.* 69, 358–368.

29. Chiche, J., Ilc, K., Brahimi-Horn, M.C., et al. (2010a). Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration. *Adv. Enzyme Regul.* 50, 20–33.

30. Chiche, J., Brahimi-Horn, M.C., and Pouysségur, J. (2010b). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: A common feature in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 771–794.

31. Chien, M.-H., Ying, T.-H., Hsieh, Y.-H., et al. (2012). Tumor-associated carbonic anhydrase XII is linked to the growth of primary oral squamous cell carcinoma and its poor prognosis. *Oral Oncol.* 48, 417–423.

32. Csaderova, L., Debreova, M., Radvak, P., et al. (2013). The effect of carbonic anhydrase IX on focal contacts during cell spreading and migration. *Front. Physiol.* 4 OCT, 1–12.

33. Cuesta, Á.M., Sainz-Pastor, N., Bonet, J., et al. (2010). Multivalent antibodies: When design surpasses evolution. *Trends Biotechnol.* 28, 355–362.

34. Davis, I.D., Wiseman, G.A., Lee, F.-T., et al. (2007). A phase I multiple dose, dose escalation study of cG250 monoclonal antibody in patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immun.* 7.

35. Deisenhofer, J. (1981). Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* 20, 2361–2370.

36. Dekaminaviciute, D. (2012). Karboanhidrazēs XII raiškos vėžinėse ląstelėse

tyrimai. Vilniaus Univ.

37. Dekaminaviciute, D., Kairys, V., Zilnyte, M., et al. (2014a). Monoclonal antibodies raised against 167-180 aa sequence of human carbonic anhydrase XII inhibit its enzymatic activity. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*

38. Dekaminaviciute, D., Lasickiene, R., Parkkila, S., et al. (2014b). Development and characterization of new monoclonal antibodies against human recombinant CA XII. *Biomed Res. Int.* 2014, 309307.

39. Dhanasekaran, S., Doherty, T.M., and Kenneth, J. (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J. Immunol. Methods* 354, 34–39.

40. Ding, G., Chen, X., Zhu, J., et al. (2010). Identification of two aberrant transcripts derived from a hybridoma with amplification of functional immunoglobulin variable genes. *Cell. Mol. Immunol.* 7, 349–354.

41. Ditte, P., Dequiedt, F., Svastova, E., et al. (2011). Phosphorylation of carbonic anhydrase IX controls its ability to mediate extracellular acidification in hypoxic tumors. *Cancer Res.* 71, 7558–7567.

42. Divgi, C.R., Bander, N.H., Scott, A.M., et al. (1998). Phase I/II radioimmunotherapy trial with iodine-131-labeled monoclonal antibody G250 in metastatic renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 4, 2729–2739.

43. Divgi, C.R., O'Donoghue, J.A., Welt, S., et al. (2004). Phase I clinical trial with fractionated radioimmunotherapy using 131I-labeled chimeric G250 in metastatic renal cancer. *J. Nucl. Med.* 45, 1412–1421.

44. Divgi, C.R., Uzzo, R.G., Gatsonis, C., et al. (2013). Positron emission tomography/computed tomography identification of clear cell renal cell carcinoma: results from the REDECT trial. *J. Clin. Oncol.* 31, 187–194.

45. Drewe, E., and Powell, R.J. (2002). Clinically useful monoclonal antibodies in treatment. *J. Clin. Pathol.* 55, 81–85.

46. Dudutienė, V., Matulienė, J., Smirnov, A., et al. (2014). Discovery and Characterization of Novel Selective Inhibitors of Carbonic Anhydrase IX. *J. Med. Chem.* 57, 9435–9446.

47. Dunn-Walters, D., Townsend, C., Sinclair, E., et al. (2018). Immunoglobulin gene analysis as a tool for investigating human immune responses. *Immunol. Rev.* 284, 132.

48. Eales, K.L., Hollinshead, K.E.R., and Tennant, D.A. (2016). Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* 5, e190.

49. Even-Desrumeaux, K., Baty, D., and Chames, P. (2011). State of the art in tumor antigen and biomarker discovery. *Cancers (Basel)*. 3, 2554–2596.

50. Evensen, Ø. (2016). Immunization Strategies against *Piscirickettsia salmonis* Infections: Review of Vaccination Approaches and Modalities and Their Associated Immune Response Profiles. *Front. Immunol.* 7, 482.

51. Fan, M., Li, M., Gao, L., et al. (2017). Chimeric antigen receptors for adoptive T cell therapy in acute myeloid leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 10, 151.

52. Fiedler, L., Kellner, M., Gosewisch, A., et al. (2018). Evaluation of <sup>177</sup>Lu[Lu]-CHX-A''-DTPA-6A10 Fab as a radioimmunotherapy agent targeting carbonic anhydrase XII. *Nucl. Med. Biol.* 60, 55–62.

53. Fierke, C.A., and Thompson, R.B. (2001). *BioMetals*. (Rapid Science Publishers).

54. Freise, A.C., and Wu, A.M. (2015). In vivo imaging with antibodies and engineered fragments. *Mol. Immunol.* 67, 142–152.

55. Frenzel, A., Hust, M., and Schirrmann, T. (2013). Expression of recombinant antibodies. *Front. Immunol.* *4*, 1–20.
56. Frost, S.C., McKenna, R., and Manuscript, A. (2014). Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications.
57. G. P. Moss (1992). IUBMB Enzyme Nomenclature. Recommendations.
58. Ghandour, M.S., Parkkila, A.-K., Parkkila, S., et al. (2002). Mitochondrial Carbonic Anhydrase in the Nervous System. *J. Neurochem.* *75*, 2212–2220.
59. Gillet, J.-P., Varma, S., and Gottesman, M.M. (2013). The clinical relevance of cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* *105*, 452–458.
60. Gilmour, K.M. (2010). Perspectives on carbonic anhydrase. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* *157*, 193–197.
61. Gondi, G., Mysliwicz, J., Hulikova, A., et al. (2013). Antitumor efficacy of a monoclonal antibody that inhibits the activity of cancer-associated carbonic anhydrase XII. *Cancer Res.* *73*, 6494–6503.
62. Greenfield, E.A. (2018). Polyethylene Glycol Fusion for Hybridoma Production. *Cold Spring Harb. Protoc.* *2018*, pdb.prot103176.
63. Ha, J.-H., Kim, J.-E., and Kim, Y.-S. (2016). Immunoglobulin Fc Heterodimer Platform Technology: From Design to Applications in Therapeutic Antibodies and Proteins. *Front. Immunol.* *7*, 394.
64. Haapasalo, J., Hilvo, M., Nordfors, K., et al. (2008). Identification of an alternatively spliced isoform of carbonic anhydrase XII in diffusely infiltrating astrocytic gliomas. *Neuro. Oncol.* *10*, 131–138.
65. Hanack, K., Messerschmidt, K., and Listek, M. (2016). Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. (Springer, Cham), pp. 11–22.
66. Harding, F.A., Stickler, M.M., Razo, J., et al. (2010). The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs* *2*, 256–265.
67. Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies : a laboratory manual* (NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
68. Harris, A.L. (2002). Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 38–47.
69. Hnasko, R.M., and Stanker, L.H. (2015). Hybridoma Technology. In *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), pp. 15–28.
70. Hoffman, W., Lakkis, F.G., and Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* *11*, 137–154.
71. Holliger, P., and Hudson, P.J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* *23*, 1126–1136.
72. Hsieh, M.-J., Chen, K.-S., Chiou, H.-L., et al. (2010). Carbonic anhydrase XII promotes invasion and migration ability of MDA-MB-231 breast cancer cells through the p38 MAPK signaling pathway. *Eur. J. Cell Biol.* *89*, 598–606.
73. Hulikova, A., Vaughan-Jones, R.D., and Swietach, P. (2011). Dual role of CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>(-)</sup> buffer in the regulation of intracellular pH of three-dimensional tumor growths. *J. Biol. Chem.* *286*, 13815–13826.
74. Ilie, M., Hofman, V., Zangari, J., et al. (2013). Response of CAIX and CAXII to in vitro re-oxygenation and clinical significance of the combined expression in NSCLC patients. *Lung Cancer* *82*, 16–23.
75. Ilie, M.I., Hofman, V., Ortholan, C., et al. (2011). Overexpression of carbonic anhydrase XII in tissues from resectable non-small cell lung cancers is a biomarker of good prognosis. *Int. J. Cancer* *128*, 1614–1623.

76. İlie, M., Mazure, N.M., Hofman, V., et al. (2010). High levels of carbonic anhydrase IX in tumour tissue and plasma are biomarkers of poor prognostic in patients with non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* *102*, 1627–1635.
77. Imbrasaitė, A. (2018). Monokloninių antikūnų prieš žmogaus karboanhidrazę IX sukūrimas, apibūdinimas ir taikymas klinikinių mėginių tyrimams. Vilniaus Univ.
78. Imtaiyaz Hassan, M., Shajee, B., Waheed, A., et al. (2013). Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic Med. Chem.* *21*, 1570–1582.
79. Ivanov, S., Liao, S.Y., Ivanova, a, et al. (2001). Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am. J. Pathol.* *158*, 905–919.
80. Ivanov, S. V, Kuzmin, I., Wei, M.H., et al. (1998). Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 12596–12601.
81. Jäger, V., Büssow, K., Wagner, A., et al. (2013). High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* *13*, 52.
82. Janeway, C. (2001). *Immunobiology 5: the immune system in health and disease* (Garland Pub).
83. Jogaitė, V., Zubrienė, A., Michailovienė, V., et al. (2012). Characterization of Human Carbonic Anhydrase XII Stability and Inhibitor Binding. *Bioorg. Med. Chem.* 1–6.
84. Jung, D., and Alt, F.W. (2004). Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* *116*, 299–311.
85. Kallio, H., Martinez, A.R., Hilvo, M., et al. (2010). Cancer-Associated Carbonic Anhydrases IX and XII: Effect of Growth Factors on Gene Expression in Human Cancer Cell Lines. 73–78.
86. Karhumaa, P., Parkkila, S., Türeci, O., et al. (2000). Identification of carbonic anhydrase XII as the membrane isozyme expressed in the normal human endometrial epithelium. *Mol. Hum. Reprod.* *6*, 68–74.
87. Karhumaa, P., Leinonen, J., Parkkila, S., et al. (2001). The identification of secreted carbonic anhydrase VI as a constitutive glycoprotein of human and rat milk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 11604–11608.
88. Kazokaitė, J., Aspatwar, A., Parkkila, S., et al. (2017). An update on anticancer drug development and delivery targeting carbonic anhydrase IX. *PeerJ* *5*, e4068.
89. Khalifah, R.G. (1971). The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *J. Biol. Chem.* *246*, 2561–2573.
90. Khantasup, K., Chantima, W., Sangma, C., et al. (2015). Design and Generation of Humanized Single-chain Fv Derived from Mouse Hybridoma for Potential Targeting Application. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* *34*, 404–417.
91. Kim, B., Cho, H., Chung, J.-Y., et al. (2013). Prognostic assessment of hypoxia and metabolic markers in cervical cancer using automated digital image analysis of immunohistochemistry. *J. Transl. Med.* *11*, 185.
92. Kivela, A.-J., Parkkila, S., Saarnio, J., et al. (2005). Expression of von Hippel-Lindau tumor suppressor and tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII in normal and neoplastic colorectal mucosa. *World J. Gastroenterol.* *11*, 2616–2625.
93. Klee, G.G. (2000). Human anti-mouse antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*

124, 921–923.

94. Knowles, S.M., and Wu, A.M. (2012). Advances in immuno-positron emission tomography: antibodies for molecular imaging in oncology. *J. Clin. Oncol.* *30*, 3884–3892.

95. Kobayashi, M., Matsumoto, T., Ryuge, S., et al. (2012). CAXII is a sero-diagnostic marker for lung cancer. *PLoS One* *7*, 1–9.

96. Kopecka, J., Campia, I., Jacobs, A., et al. (2015). Carbonic anhydrase XII is a new therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer cells. *Oncotarget* *6*, 6776–6793.

97. Kopecka, J., Rankin, G.M., Salaroglio, I.C., et al. (2016). P-glycoprotein-mediated chemoresistance is reversed by carbonic anhydrase XII inhibitors. *Oncotarget* *7*, 85861–85875.

98. Kovaltsuk, A., Krawczyk, K., Galson, J.D., et al. (2017). How B-Cell Receptor Repertoire Sequencing Can Be Enriched with Structural Antibody Data. *Front. Immunol.* *8*, 1753.

99. Koyasu, S., Kobayashi, M., Goto, Y., et al. (2018). Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Sci.* *109*, 560–571.

100. Kralik, P., and Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front. Microbiol.* *8*, 108.

101. Krangel, M.S. (2003). Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nat. Immunol.* *4*, 624–630.

102. Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., et al. (1997). Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J. Immunol. Methods* *201*, 35–55.

103. Kuang, J., Yan, X., Genders, A.J., et al. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS One* *13*, e0196438.

104. Kucinskaite-Kodze, I., Pleckaityte, M., Bremer, C.M., et al. (2016). New broadly reactive neutralizing antibodies against hepatitis B virus surface antigen. *Virus Res.* *211*, 209–221.

105. van Kuijk, S.J.A., Yaromina, A., Houben, R., et al. (2016). Prognostic Significance of Carbonic Anhydrase IX Expression in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Front. Oncol.* *6*, 69.

106. Kunert, R., and Reinhart, D. (2016). Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *100*, 3451–3461.

107. Laffly, E., and Sodoyer, R. (2005). Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after ... *Hum. Antibodies* *14*, 33–55.

108. Lamers, C.H.J., Sleijfer, S., Vulto, A.G., et al. (2006). Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J. Clin. Oncol.* *24*, e20-2.

109. Lanier, L.L., and Sun, J.C. (2009). Do the terms innate and adaptive immunity create conceptual barriers? *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 302–303.

110. Lau, J., Lin, K.-S., and Bénard, F. (2017). Past, Present, and Future: Development of Theranostic Agents Targeting Carbonic Anhydrase IX. *Theranostics* *7*, 4322–4339.

111. Lee, M., Vecchio-Pagán, B., Sharma, N., et al. (2016). Loss of carbonic anhydrase XII function in individuals with elevated sweat chloride concentration and

pulmonary airway disease. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1923–1933.

112. Leppilampi, M., Koistinen, P., Savolainen, E.-R., et al. (2002). The expression of carbonic anhydrase II in hematological malignancies. *Clin. Cancer Res.* 8, 2240–2245.

113. Lindskog, S. (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.* 74, 1–20.

114. Linkuvienė, V., Matulienė, J., Juozapaitienė, V., et al. (2016). Intrinsic thermodynamics of inhibitor binding to human carbonic anhydrase IX. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1860, 708–718.

115. Lipman, N.S., Jackson, L.R., Trudel, L.J., et al. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J.* 46, 258–268.

116. Little, M., Kipriyanov, S., Le Gall, F., et al. (2000). Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol. Today* 21, 364–370.

117. Liu, J.K.H. (2014). The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann. Med. Surg.* 3, 113–116.

118. Lock, F.E., McDonald, P.C., Lou, Y., et al. (2013). Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche. *Oncogene* 32, 5210–5219.

119. Lonberg, N. (2008). Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 450–459.

120. Luning Prak, E.T., Monestier, M., and Eisenberg, R.A. (2011). B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1217, 96–121.

121. Luong-Player, A., Liu, H., Wang, H.L., et al. (2014). Immunohistochemical reevaluation of carbonic anhydrase IX (CA IX) expression in tumors and normal tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* 141, 219–225.

122. Malentacchi, F., Simi, L., Nannelli, C., et al. (2009). Alternative splicing variants of carbonic anhydrase IX in human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 64, 271–276.

123. Marshall, J.S., Warrington, R., Watson, W., et al. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma. Clin. Immunol.* 14, 49.

124. Matos, L.L. de, Trufelli, D.C., de Matos, M.G.L., et al. (2010). Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark. Insights* 5, 9–20.

125. Matulis, D. (2019). *Carbonic Anhydrase as Drug Target* (Cham: Springer International Publishing).

126. Mayrhofer, P., and Kunert, R. (2019). Nomenclature of humanized mAbs: Early concepts, current challenges and future perspectives. *Hum. Antibodies* 27, 37.

127. Mboge, M.Y., McKenna, R., and Frost, S.C. (2015). Advances in Anti-Cancer Drug Development Targeting Carbonic Anhydrase IX and XII. *Top. Anti-Cancer Res.* 5, 3–42.

128. Mboge, M.Y., Mahon, B.P., McKenna, R., et al. (2018). Carbonic Anhydrases: Role in pH Control and Cancer. *Metabolites* 8.

129. Millán, O., and Brunet, M. (2015). *Flow Cytometry as Platform for Biomarker Discovery and Clinical Validation*. (Springer, Dordrecht), pp. 141–164.

130. Mitsunaga, M., Tajiri, H., Choyke, P.L., et al. (2013). Monoclonal antibody–fluorescent probe conjugates for in vivo target-specific cancer imaging: toward clinical translation. *Ther. Deliv.* 4, 523–525.

131. Modjtahedi, H., Ali, S., and Essapen, S. (2012). Therapeutic application of

monoclonal antibodies in cancer: Advances and challenges. *Br. Med. Bull.* 104, 41–59.

132. Mohammed, R., Milne, A., Kayani, K., et al. (2019). How the discovery of rituximab impacted the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J. Blood Med.* 10, 71–84.

133. Mullard, A. (2017). FDA approves first CAR T therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 669–669.

134. Muselaers, C.H.J., Stillebroer, A.B., Rijpkema, M., et al. (2014). Optical Imaging of Renal Cell Carcinoma with Anti-Carbonic Anhydrase IX Monoclonal Antibody Girentuximab. *J. Nucl. Med.* 55, 1035–1040.

135. Muselaers, C.H.J., Boers-Sonderen, M.J., Van Oostenbrugge, T.J., et al. (2016). Phase 2 Study of Lutetium 177-Labeled Anti-Carbonic Anhydrase IX Monoclonal Antibody Girentuximab in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma. *Eur. Urol.* 69, 767–770.

136. Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., et al. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckland, N.Z.)* 3, 83–92.

137. Narrandes, S., and Xu, W. (2018). Gene Expression Detection Assay for Cancer Clinical Use. *J. Cancer* 9, 2249–2265.

138. Nelson, A.L., Dhimolea, E., and Reichert, J.M. (2010). Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 767–774.

139. Neubeck, B. von, Gondi, G., Riganti, C., et al. (2018). An inhibitory antibody targeting Carbonic Anhydrase XII abrogates chemoresistance and significantly reduces lung metastases in an orthotopic breast cancer model in vivo. *Int. J. Cancer.*

140. Nimse, S.B., Sonawane, M.D., Song, K.-S., et al. (2016). Biomarker detection technologies and future directions. *Analyst* 141, 740–755.

141. Nordfors, K., Haapasalo, J., Korja, M., et al. (2010). The tumour-associated carbonic anhydrases CA II, CA IX and CA XII in a group of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumours: an association of CA IX with poor prognosis. *BMC Cancer* 10, 148.

142. Nordfors, K., Haapasalo, J., Haapasalo, H., et al. (2013). Carbonic Anhydrase IX in Adult and Pediatric Brain Tumors. In *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications*, (InTech), p.

143. Ochi, F., Shiozaki, A., Ichikawa, D., et al. (2015). Carbonic Anhydrase XII as an Independent Prognostic Factor in Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J. Cancer* 6, 922–929.

144. Oosterwijk-Wakka, J.C., Boerman, O.C., Mulders, P.F. a M., et al. (2013). Application of monoclonal antibody G250 recognizing carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11402–11423.

145. Oosterwijk, E., Ruiter, D.J., Hoedemaeker, P.J., et al. (1986). Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *Int. J. Cancer* 38, 489–494.

146. Opavský, R., Pastoreková, S., Zelník, V., et al. (1996). Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* 33, 480–487.

147. Orlandi, R., Güssow, D.H., Jones, P.T., et al. (1989). Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 3833–3837.

148. Papworth, K., Sandlund, J., Grankvist, K., et al. (2010). Soluble carbonic



anhydrase IX is not an independent prognostic factor in human renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 30, 2953–2957.

149. Parkkila, S., Parkkila, a K., Saarnio, J., et al. (2000a). Expression of the membrane-associated carbonic anhydrase isozyme XII in the human kidney and renal tumors. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 1601–1608.

150. Parkkila, S., Rajaniemi, H., Parkkila, a K., et al. (2000b). Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2220–2224.

151. Parks, S.K., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2011). pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J. Cell. Physiol.* 226, 299–308.

152. Pastorek, J., and Pastorekova, S. (2015). Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: From biology to clinical use. *Semin. Cancer Biol.* 31, 52–64.

153. Pastorek, J., Pastoreková, S., Callebaut, I., et al. (1994). Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene* 9, 2877–2888.

154. Pastorekova, S., Zavadova, Z., Kostal, M., et al. (1992). A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology* 187, 620–626.

155. Pastorekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., et al. (2004). Carbonic anhydrases: Current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 19, 199–229.

156. Pillay, V., Gan, H.K., and Scott, A.M. (2011). Antibodies in oncology. *N. Biotechnol.* 28, 518–529.

157. Pinard, M.A., Mahon, B., and McKenna, R. (2015). Probing the Surface of Human Carbonic Anhydrase for Clues towards the Design of Isoform Specific Inhibitors. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–15.

158. Poljak, R.J., Amzel, L.M., Avey, H.P., et al. (1973). Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2,8-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 3305–3310.

159. Del Prete, S., Vullo, D., Fisher, G.M., et al. (2014). Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*—The  $\eta$ -carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 4389–4396.

160. Ratajczak, W., Niedźwiedzka-Rystwej, P., Tokarz-Deptuła, B., et al. (2018). Immunological memory cells. *Cent. J. Immunol.* 43, 194–203.

161. Rohatgi, S., Ganju, P., and Sehgal, D. (2008). Systematic design and testing of nested (RT-)PCR primers for specific amplification of mouse rearranged/expressed immunoglobulin variable region genes from small number of B cells. *J. Immunol. Methods* 339, 205–219.

162. Rosenberg, V. (2016). CLINICAL STUDY High serum carbonic anhydrase IX predicts shorter survival in head and neck cancer. *Sci. Cit. Index Expand. J. Cit. Reports/Science Ed. Bratisl Med J* 117, 201–204.

163. Roth, D.B. (2014). V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiol. Spectr.* 2.

164. Ruas, J.L., Poellinger, L., and Pereira, T. (2005). Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J. Cell Sci.* 118, 301–311.

165. Russ, W.P., and Engelman, D.M. (2000). The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.* 296, 911–919.

166. Saeed, A.F.U.H., Wang, R., Ling, S., et al. (2017). Antibody Engineering for

Pursuing a Healthier Future. *Front. Microbiol.* 8, 495.

167. Said, H.M., Staab, A., Hagemann, C., et al. (2006). Distinct patterns of hypoxic expression of carbonic anhydrase IX (CA IX) in human malignant glioma cell lines. *J. Neurooncol.* 81, 27–38.

168. Sattler, W., and Parkin, G. (2012). Structural characterization of zinc bicarbonate compounds relevant to the mechanism of action of carbonic anhydrase. *Chem. Sci.* 3, 2015.

169. Schatz, D.G., and Swanson, P.C. (2011). V(D)J Recombination: Mechanisms of Initiation. *Annu. Rev. Genet.* 45, 167–202.

170. Schelpe, A.-S., Roose, E., Joly, B.S., et al. (2019). Generation of anti-idiotypic antibodies to detect anti-spacer antibody idiotopes in acute thrombotic thrombocytopenic purpura patients. *Haematologica* 104, 1268–1276.

171. Schroeder, H.W., Cavacini, L., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41-52.

172. Schütze, D., Milde-Langosch, K., Witzel, I., et al. (2013). Relevance of cellular and serum carbonic anhydrase IX in primary breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 139, 747–754.

173. Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 278–287.

174. Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., and Supuran, C.T. (2006). Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. *Expert Opin. Ther. Pat.* 16, 1627–1664.

175. Sedlakova, O., Svastova, E., Takacova, M., et al. (2014). Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Front. Physiol.* 4 JAN, 1–14.

176. Semenza, G.L. (2001). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 167–171.

177. Sgro, C. (1995). Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology* 105, 23–29.

178. Shishido, S.N., Varahan, S., Yuan, K., et al. (2012). Humoral innate immune response and disease. *Clin. Immunol.* 144, 142–158.

179. Siddiqui, M. (2010). Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal. *Indian J. Pharm. Sci.* 72, 12.

180. Silagi, E.S., Schoepflin, Z.R., Seifert, E.L., et al. (2018). Bicarbonate Recycling by HIF-1-Dependent Carbonic Anhydrase Isoforms 9 and 12 Is Critical in Maintaining Intracellular pH and Viability of Nucleus Pulposus Cells. *J. Bone Miner. Res.* 33, 338–355.

181. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A.K., et al. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb. Cell Fact.* 14, 41.

182. Singh, S., Kumar, N.K., Dwiwedi, P., et al. (2018a). Monoclonal Antibodies: A Review. *Curr. Clin. Pharmacol.* 13, 85–99.

183. Singh, S., Lomelino, C., Mboge, M., et al. (2018b). Cancer Drug Development of Carbonic Anhydrase Inhibitors beyond the Active Site. *Molecules* 23, 1045.

184. Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2014). Ig heavy chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J. Immunol.* 193, 5370.

185. Steffens, M.G., Boerman, O.C., Oosterwijk-Wakka, J.C., et al. (1997). Targeting of renal cell carcinoma with iodine-131-labeled chimeric monoclonal

antibody G250. *J. Clin. Oncol.* *15*, 1529–1537.

186. Steffens, M.G., Oosterwijk, E., Kranenburg, M.H., et al. (1999a). In vivo and in vitro characterizations of three <sup>99m</sup>Tc-labeled monoclonal antibody G250 preparations. *J. Nucl. Med.* *40*, 829–836.

187. Steffens, M.G., Boerman, O.C., de Mulder, P.H., et al. (1999b). Phase I radioimmunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with <sup>131</sup>I-labeled chimeric monoclonal antibody G250. *Clin. Cancer Res.* *5*, 3268s-3274s.

188. Steinitz, M. (2014). *Human Monoclonal Antibodies*.

189. Stillebroer, A.B., Zegers, C.M.L., Boerman, O.C., et al. (2012). Dosimetric analysis of <sup>177</sup>Lu-cG250 radioimmunotherapy in renal cell carcinoma patients: correlation with myelotoxicity and pretherapeutic absorbed dose predictions based on <sup>111</sup>In-cG250 imaging. *J. Nucl. Med.* *53*, 82–89.

190. Stillebroer, A.B., Franssen, G.M., Mulders, P.F.A., et al. (2013). ImmunoPET imaging of renal cell carcinoma with (<sup>124</sup>I)- and (<sup>89</sup>Zr)-labeled anti-CAIX monoclonal antibody cG250 in mice. *Cancer Biother. Radiopharm.* *28*, 510–515.

191. Stravinskiene, D., Imbrasaitė, A., Petrikaite, V., et al. (2019). New Monoclonal Antibodies for a Selective Detection of Membrane-Associated and Soluble Forms of Carbonic Anhydrase IX in Human Cell Lines and Biological Samples. *Biomolecules* *9*, 304.

192. Suarez, E.R., Chang, D.-K., Sun, J., et al. (2016). Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model. *Oncotarget* *7*, 34341–34355.

193. Supuran, C.T. (2016). Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem. J.* *473*, 2023–2032.

194. Supuran, C.T. (2017). Carbonic Anhydrase Inhibition and the Management of Hypoxic Tumors. *Metabolites* *7*, 48.

195. Supuran, C.T. (2018). Carbonic anhydrase activators. *Future Med. Chem.* *10*, 561–573.

196. Supuran, C.T., and Scozzafava, A. (2002). Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Expert Opin. Ther. Pat.* *12*, 217–242.

197. Surfus, J.E., Hank, J.A., Oosterwijk, E., et al. (1996). Anti-Renal-Cell Carcinoma Chimeric Antibody G250 Facilitates Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity with In Vitro and In Vivo Interleukin-2-Activated Effectors. *J. Immunother.* *19*, 184–191.

198. Švastová, E., Žilka, N., Zat'ovičová, M., et al. (2003). Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with  $\beta$ -catenin. *Exp. Cell Res.* *290*, 332–345.

199. Swinson, D.E.B., Jones, J.L., Richardson, D., et al. (2003). Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* *21*, 473–482.

200. Tamošiūnas, P.L., Petraitytė-Burkeikienė, R., Lasickienė, R., et al. (2014). Generation of recombinant porcine parvovirus virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae* and development of virus-specific monoclonal antibodies. *J. Immunol. Res.* *2014*, 573531.

201. Tamošiūnas, V.A., Dubakienė, R., and Žvirblienė, A. (2012). *Aiškinamasis imunologijos ir alergologijos terminų žodynas* (Vilnius: Mokslo ir enciklopedijų leidybos centras).

202. Tamulyte, J. (2017). Sąsajų tarp karboanhidrazės IX iRNR raiškos ir žmogaus

papilomos viruso infekcijos tyrimas klinikiniuose mėginiuose. Vilniaus Univ.

203. Thiry, A., Dogné, J.M., Masereel, B., et al. (2006). Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 566–573.

204. Thomas, P., and Smart, T.G. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 51, 187–200.

205. Thomas, M.D., Srivastava, B., and Allman, D. (2006). Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell. Immunol.* 239, 92–102.

206. Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., et al. (2013). Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J.* 27, 13–24.

207. Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581.

208. Tostain, J., Li, G., Gentil-Perret, A., et al. (2010). Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: A marker for diagnosis, prognosis and treatment. *Eur. J. Cancer* 46, 3141–3148.

209. Truppo, E., Supuran, C.T., Sandomenico, A., et al. (2012). Carbonic anhydrase VII is S-glutathionylated without loss of catalytic activity and affinity for sulfonamide inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1560–1564.

210. Türeci, O., Sahin, U., Vollmar, E., et al. (1998). Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7608–7613.

211. Vaitiekaitė, A. (2013). Kiekybinio polimerazės grandininės reakcijos metodo, skirto karboanhidrazės XII iRNR nustatymui, optimizavimas. Vilniaus Univ.

212. Vaupel, P. (2004). Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin. Radiat. Oncol.* 14, 198–206.

213. Vidlickova, I., Dequiedt, F., Jelenska, L., et al. (2016). Apoptosis-induced ectodomain shedding of hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX from tumor cells: A double-edged response to chemotherapy. *BMC Cancer* 16, 239.

214. Voskuil, J.L.A. (2017). The challenges with the validation of research antibodies. *F1000Research* 6, 161.

215. Waheed, A., and Sly, W.S. (2017). Carbonic anhydrase XII functions in health and disease. *Gene* 623, 33–40.

216. Wang, H.-W., Lin, Y.-C., Pai, T.-W., et al. (2011). Prediction of B-cell linear epitopes with a combination of support vector machine classification and amino acid propensity identification. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 432830.

217. Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., et al. (2015). NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 6, 368.

218. Wang, X., An, Z., Luo, W., et al. (2018). Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development. *Protein Cell* 9, 74–85.

219. Wang, Z., Raifu, M., Howard, M., et al. (2000). Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J. Immunol. Methods* 233, 167–177.

220. Warram, J.M., de Boer, E., Sorace, A.G., et al. (2014). Antibody-based imaging strategies for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 33, 809–822.

221. Watson, P.H., Chia, S.K., Wykoff, C.C., et al. (2003). Carbonic anhydrase

XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma. *Br. J. Cancer* 88, 1065–1070.

222. Webb, B.A., Chimenti, M., Jacobson, M.P., et al. (2011). Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 11, 671–677.

223. Weller, M.G. (2016). Quality Issues of Research Antibodies. *Anal. Chem. Insights* 11, 21–27.

224. Whittington, D. a, Waheed, a, Ulmasov, B., et al. (2001). Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9545–9550.

225. Wind, T.C., Messenger, M.P., Thompson, D., et al. (2011). Measuring carbonic anhydrase IX as a hypoxia biomarker: Differences in concentrations in serum and plasma using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay due to influences of metal ions. *Ann. Clin. Biochem.* 48, 112–120.

226. Woelber, L., Mueller, V., Eulenburg, C., et al. (2010). Serum carbonic anhydrase IX during first-line therapy of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 117, 183–188.

227. Woelber, L., Kress, K., Kersten, J.F., et al. (2011). Carbonic anhydrase IX in tumor tissue and sera of patients with primary cervical cancer. *BMC Cancer* 11, 12.

228. Wold, E.D., Smider, V. V, and Felding, B.H. (2016). Antibody Therapeutics in Oncology. *Immunother. (Los Angeles, Calif.)* 2.

229. Wykoff, C.C., Beasley, N.J., Watson, P.H., et al. (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60, 7075–7083.

230. Wykoff, C.C., Beasley, N., Watson, P.H., et al. (2001). Expression of the hypoxia-inducible and tumor-associated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am. J. Pathol.* 158, 1011–1019.

231. Xi, X., Li, T., Huang, Y., et al. (2017). RNA Biomarkers: Frontier of Precision Medicine for Cancer. *Non-Coding RNA* 3.

232. Yam-Puc, J.C., Zhang, L., Zhang, Y., et al. (2018). Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation. *F1000Research* 7, 429.

233. Yamauchi, T., Moroishi, T., Yamauchi, T., et al. (2019). Hippo Pathway in Mammalian Adaptive Immune System. *Cells* 8, 398.

234. Yang, S.-F., Liu, Y.-F., Cheng, C.-W., et al. (2017). Impact of microRNA-34a and polymorphism of its target gene *CA9* on susceptibility to uterine cervical cancer. *Oncotarget* 8, 77860–77871.

235. Yap, E.-H., Rosche, T., Almo, S., et al. (2014). Functional clustering of immunoglobulin superfamily proteins with protein-protein interaction information calibrated hidden Markov model sequence profiles. *J. Mol. Biol.* 426, 945–961.

236. Yoo, C.W., Nam, B.-H., Kim, J.-Y., et al. (2010). Carbonic anhydrase XII expression is associated with histologic grade of cervical cancer and superior radiotherapy outcome. *Radiat. Oncol.* 5, 101.

237. Yusakul, G., Sakamoto, S., Pongkitwitoon, B., et al. (2016). Effect of linker length between variable domains of single chain variable fragment antibody against daidzin on its reactivity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 1306–1312.

238. Zatovicova, M., Tarábková, K., Švastová, E., et al. (2003). Monoclonal antibodies generated in carbonic anhydrase IX-deficient mice recognize different domains of tumour-associated hypoxia-induced carbonic anhydrase IX. *J. Immunol. Methods* 282, 117–134.

239. Zatovicova, M., Sedlakova, O., Svastova, E., et al. (2005). Ectodomain

shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br. J. Cancer* 93, 1267–1276.

240. Zátovicová, M., Jelenská, L., Hulíková, A., et al. (2014). Monoclonal antibody G250 targeting CA IX: Binding specificity, internalization and therapeutic effects in a non-renal cancer model. *Int. J. Oncol.* 45, 2455–2467.

241. Závada, J., Závadová, Z., Pastorek, J., et al. (2000). Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Br. J. Cancer* 82, 1808–1813.

242. Závada, J., Závadová, Z., Zát'ovičová, M., et al. (2003). Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br. J. Cancer* 89, 1067–1071.

243. Zhang, C. (2012). *Hybridoma Technology for the Generation of Monoclonal Antibodies*. (Humana Press, Totowa, NJ), pp. 117–135.

244. Zhang, X., Soori, G., Dobleman, T.J., et al. (2014). The application of monoclonal antibodies in cancer diagnosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 14, 97–106.

245. Zhou, G.X., Ireland, J., Rayman, P., et al. (2010). Quantification of Carbonic Anhydrase IX Expression in Serum and Tissue of Renal Cell Carcinoma Patients Using Enzyme-linked Immunosorbent Assay: Prognostic and Diagnostic Potentials. *Urology* 75, 257–261.

246. Zvirbliene, A., Pleckaityte, M., Lasickiene, R., et al. (2010). Production and characterization of monoclonal antibodies against vaginolysin: Mapping of a region critical for its cytolytic activity. *Toxicon* 56, 19–28.

## CURRICULUM VITAE

<b>Vardas, pavardė</b>	<b>DOVILĖ STRAVINSKIENĖ (DEKAMINAVIČIŪTĖ)</b>
<b>Gimimo data, vieta</b>	1988-02-19, Alytus, Lietuva
<b>Darbo adresas</b>	Vilniaus Universitetas (VU), Gyvybės mokslų centras (GMC), Biotechnologijos institutas (BTI), Imunologijos ir ląstelės biologijos skyrius (ILBS) Saulėtekio al. 7, Vilnius. V227 kab.
<b>Telefonas, el. paštas</b>	8 (5) 2234374, <i>dovile.stavinskiene@gmc.vu.lt</i>
<b>Išsilavinimas</b>	
2006–2010	Vilniaus Gedimino Technikos Universitetas, Bioinžinerijos bakalauro laipsnis
2010–2012	VU, Biochemijos magistro laipsnis
2012–2018	Chemijos inžinerijos doktorantūros studijos VU GMC BTI ILBS
<b>Darbo patirtis</b>	
2009–2010	BTI Imunologijos ir ląstelės biologijos laboratorijos laborantė
2010–2012	VU BTI ILBS laborantė
2012–2017	VU (GMC) BTI ILBS biologė tyrėja
Nuo 2017 m.	VU GMC BTI ILBS jaunesnioji mokslo darbuotoja
Nuo 2018 m.	VU Medicinos fakultetas, Patologijos, teismo medicinos ir farmakologijos katedra, jaunesnioji asistentė
<b>Stazuotės ir praktikos</b>	
2011.05.08–13;	Suomija, Tamperės universitetas, dr. S. Parkkila grupė.
2013.10.06–11	Bendrų mokslinių darbų vykdymas.
2010.07.01–08.31	LMT finansuojama papildoma studentų praktika
2012.01.27–05.18	ES struktūrinių fondų finansuojama papildoma studentų praktika
<b>Mokslinės veiklos pripažinimo ženklai</b>	
2012 m.	Lietuvos mokslų akademijos pagyrimo raštas jaunųjų mokslininkų mokslinių darbų konkurse.
2015 m.	Laimėta 1 vieta ir prizas LMA Biologijos, medicinos ir geomokslų skyriaus jaunųjų mokslininkų konferencijoje „BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“ už geriausią žodinį pranešimą.

## PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei Aurelijai Žvirblienei už pasitikėjimą ir suteiktą galimybę atlikti šį darbą, už nuolatinį skatinimą ir įkvėpimą bei pagalbą rašant, visus patarimus ir pamokymus. Dėkoju VU GMC Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriaus buvusiems ir esamiems darbuotojams: Indrei Kučinskaitei-Kodzei, Indrei Dalgėdienei, Martynui Simanavičiui, Ritai Lasickienei, Vaidai Simanavičienei, Mildai Zilnytei, Karolinai Juškaitei, Vytautui Rudokui ir kt. už pamokas ir pagalbą dirbant, diskusijas, už gerą ir draugišką atmosferą. Dėkoju visiems studentams, kuriems teko vadovauti doktorantūros metu: Aistei Imbrasaitei, Aušrai Vaitiekaitei, Jovitai Tamulytei, Pijui Andrejauskui, Dmitrij Plotnikov, Enrikai Leiputei, Vaivai Žvirblytei už indėlį į šį darbą ir galimybę tobulėti kartu.

Dėkoju dr. Mildai Plečkaitytei už vertingas žinias, pamokymus, pagalbą ir suteiktas priemones, kuriant rekombinantinius antikūnus. Dėkoju už pastabas ir pataisymus, rašant disertaciją.

Dėkoju dr. Arvydui Kanopkai ir jo grupės darbuotojams: Eglei Jakubauskienei, Laurynui Viliui ir Ingai Pečiulienei už galimybę naudotis hipoksijos inkubatoriumi ir naudingas diskusijas.

Dėkoju dr. Daumantui Matuliui ir dr. Jurgitai Matulienei už galimybę dalyvauti jų vadovaujamoose projektuose ir įtraukimą į karboanhidrazių tematiką. Dėkoju VU GMC Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriaus darbuotojams: Vilmai Michailovienei, Vilmai Petrikaitei, Linai Baranauskienei, Vaidai Juozapaitienei ir kt. už antigenų sintezę ir gryninimą, antikūnų neutralizuojančio aktyvumo tyrimus, klinikinių mėginių rinkimą ir analizę.

Dėkoju prof. dr. Seppo Parkkila iš Tamperės universiteto už galimybę stažuoti jo vadovaujamoje laboratorijoje ir vertingas imunohistochemijos metodikos ir analizės žinias.

Dėkoju LMT už suteiktą LIG-16/2010, LIG-09/2012, MIP-37/2012 ir SEN-04/2015 projektų ir studentų praktikų finansavimą, už finansinę paramą dalyvaujant tarptautinėse konferencijose bei suteiktas doktoranto stipendijas.

*Ypatingai dėkoju savo mylimiems tėveliams Aušrai ir Pranui už suteiktą galimybę siekti svajonių ir neįkainojamą pagalbą rašant disertaciją. Dėkoju savo brangiam vyrui Giedriui, nuostabiam sūnui Taduui ir visiems artimiesiems už palaikymą, supratimą ir buvimą kartu.*



# UŽRAŠAMS





Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt).  
[www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 15 egz.