

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS UN BIOĶĪMIJAS KATEDRA

STREP-II-TAG SATUROŠU T7 FĀGA DISPLEJA  
VEKTORU UN KUŅĢA VĒŽA kDNS BIBLIOTĒKU  
KONSTRUĒŠANA

Kursa darbs

Autors: Edgars Endzeliņš  
Stud. apl. Nr. ee06006  
Darba vadītājs: Dr. biol. Aija Linē  
Katedras vadītājs: Prof., Dr. biol. Viesturs Baumanis  
Recenzents: Dr. biol Normunds Līcis

RĪGA 2008

## SATURS

KOPSAVILKUMS .....	4
SUMMARY .....	5
IEVADS .....	6
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	7
1.1 Karcinoģenēze un ļaundabīgo audzēju raksturīpašības .....	7
1.2. Ļaundabīgo audzēju imunoloģija .....	13
1.3. Ļaundabīgo audzēju antigēnu identificēšana .....	16
2. MATERIĀLI UN METODES .....	20
2.1. Materiāli .....	20
2.1.1 Reaktīvi un izejvielas .....	20
2.1.2 Reaģentu un izejvielu komplekti .....	20
2.1.3 Sintētiskie oligonukleotīdi .....	20
2.1.4 Buferšķīdumi .....	21
2.1.5. Barotnes .....	21
2.1.6. Baktēriju celmi .....	21
2.1.7. Serumi un audu paraugi .....	21
2.1.8. Aparatūra un aprīkojums .....	22
2.2. Metodes .....	22
2.2.1. Totālās RNS izdalīšana no izmantojot TRIzol™ reaģentu .....	22
2.2.2. Nukleīnskābju koncentrāciju mērīšana ar NanoDrop® ND-1000 spektrofotometru .....	23
2.2.3. RNS elektroforēze agarozes gēlā .....	24
2.2.4. Matricas RNS izdalīšana .....	25
2.2.5. Pirmās kDNS ķēdes reversa transkripcija uz mRNS bāzes .....	25
2.2.6. Otrās kDNS ķēdes sintēze .....	26
2.2.7. DNS attīrīšana ar illustra™ GFX, PCR, DNS un gēla attīrīšanas reaģentu komplektu .....	27
2.2.8. kDNS galu līdzināšana ar T4 DNS polimerāzi .....	27
2.2.9. <i>EcoR I/Hind III</i> linkeru liģēšana .....	28
2.2.10. kDNS restrikcija ar <i>EcoR I</i> un <i>Hind III</i> .....	28
2.2.11. T7Select10-3b vektora <i>Hind III / Not I</i> šķelšana .....	29
2.2.12. StrepII Tagu otrās ķēdes sintēze .....	29
2.2.13. StrepII Tagu liģēšana .....	30
2.2.14. Attīrīšana ar SpinClean™ PCR attīrīšanas reaģentu komplektu .....	31
2.2.15. StrepII Tagu restrikcija ar <i>HindIII</i> un <i>NotI</i> restriktāzēm .....	31
2.2.16. Vektora un StrepII Tagu sagatavošana liģēšanai .....	32
2.2.17. Vektora un StrepII Tagu liģēšana .....	32
2.2.18. Rekombinanto T7 fāgu pakošana .....	32
2.2.19. Rekombinanto fāgu titrēšana .....	33
2.2.20. Fāgu izolēšana .....	34
2.2.21. Polimerāzes ķēdes reakcija .....	34
2.2.22. DNS elektroforēze agarozes gēlā .....	35
2.2.23. Krāsas-terminatora DNS sekvenēšana .....	36
2.2.24. Sekvenču analīze .....	37
2.2.25. Fāgu amplificēšana (šķidrā lizāta metode) .....	37
2.2.26. T7 fāga DNS izolēšana ar Stratagene λ DNS attīrīšanas reaģentu komplektu .....	38
2.2.27. T7 StrepII Tag-vektoru restrikcija ar <i>HindIII</i> un <i>EcoRI</i> .....	39
2.2.28. StrepII Tag-vektoru un kDNS liģēšana .....	39
2.2.29. kDNS bibliotēkas amplificēšana (plašu lizāta metode) .....	39
2.2.30. Fāgu PEG attīrīšana .....	40
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	41

1. StrepII Tag saturošu T7 fāga displeja vektoru konstruēšana.....	41
2. Ar StrepII Tag iezīmētu kuņģa vēža kDNS ekspresijas bibliotēku konstruēšana .....	43
4. SECINĀJUMI .....	45
5. PATEICĪBAS .....	46
6. LITERATŪRAS SARAKSTS .....	47
Monogrāfijas.....	47
Raksti žurnālos .....	47
Interneta vietnes.....	51
Pielikums	

## KOPSAVILKUMS

Ļaundabīgo audzēju antigēnu identificēšanai ir nozīmīga loma jaunu audzēja diagnostikas un terapijas metožu izstrādē. Līdz šim projekta "Seroloģiska ļaundabīgo audzēju diagnostikas testa izstrādāšana" ietvaros ļaundabīgo audzēju antigēnu identificēšanai tika izmantota uz T7 fāga displeju balstīta SEREX metodes modifikācija, kuras galvenos trūkumus raksturo tas, ka tikai ~10% no atrastajiem, ar serumu reaģējošajiem T7 fāgu kloniem ekspresē pareizā fāzē translētus rekombinantus proteīnus un šo proteīnu īpatsvars fāga kapsīdā ir stipri variabls. Kurša darba mērķis bija izstrādāt risinājumu ar šo metodi saistītajām problēmām, konstruējot jaunus ar StrepII Tagiem 1, 2 un 3 iezīmētus T7 fāga displeja vektorus un iegūstot uz šiem vektoriem bāzētas kuņģa vēža kDNS ekspresijas bibliotēkas.

Kuņģa vēža kDNS ekspresijas bibliotēkas izstrādei tika izmantots proteīnus kodējošais ģenētiskais materiāls no pieciem kuņģa vēža audu paraugiem. 250-1000bp gari kDNS fragmenti tika ieliģēti īpaši šim mērķim konstruētos StrepII Tag-1, 2 un 3 saturošos T7 fāgu displeja vektoros. Titrēšanas rezultāti parādīja, ka vienīgi ar StrepII Tag-2 iezīmētās kuņģa vēža kDNS ekspresijas bibliotēkas apjoms –  $1,2 \cdot 10^6$  pfu – ir pietiekams, lai šī bibliotēka varētu tikt izmantota kuņģa vēža antigēnu sistemātiskai meklēšanai.

Kurša darbs tika izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā vēža molekulārās ģenētikas darba grupā, grupas vadītājas Dr. biol. Aijas Linē vadībā laikā no 2007. līdz 2008., 3. un 4. studiju semestrī.

Atslēgvārdi: kDNS bibliotēka, kuņģa vēzis, StrepII Tag, T7 vektori

## SUMMARY

Identification of tumor associated antigens has an important role in development of novel diagnostic and therapeutic approaches. Up to now within the framework of project „Development of the novel, non-invasive diagnostic test for the early detection of cancer” T7 phage display based SEREX approach was used for the identification of tumor associated antigens. Main disadvantages of this approach are that only ~10% of the discovered serum-reactive T7 phages express recombinant proteins translated in the natural reading frame and the copy number of recombinant proteins in T7 phage capsid is highly variable. The objective of this course paper was to develop novel StrepII Tagged T7 phage display vectors and to construct gastric cancer cDNA expression libraries using these vectors, which may offer the solution for these drawbacks of T7 phage display based SEREX approach.

mRNA pooled from five gastric cancer specimens was used for the development of the gastric cancer cDNA expression library. 250-1000bp long cDNA fragments were inserted into StrepII Tag-1, 2 and 3 containing T7 phage display vectors. The results of titrating showed that only on StrepII Tag-2 based gastric cancer expression cDNA library contains enough clones ( $1.2 \times 10^6$ ) and is suitable for the systematic searching of gastric cancer associated antigens.

The course paper was done in the Latvian Biomedical Research and Study Center, in the Laboratory of Molecular Genetics of Cancer under the supervision of Dr. biol. Aija Linē during the 2007 and 2008 year, during the 3rd and 4th semester.

Keywords: cDNA library, gastric cancer, StrepII Tag, T7 vectors.

## IEVADS

Vēzis, viens no mūsdienās izplatītākajiem nāves cēloņiem, ir plaša slimību grupa, kuru galvenā pazīme ir nekontrolēta šūnu augšana. Vēzis attīstās transformējoties normālām cilmes šūnām vai mātšūnām karcinoģenēzes procesā, kas ietver plašas pārmaiņas šūnas bioķīmiskajos ceļos. Šādas izmaiņas bieži ir saistītas ar normāliem audiem netipisku proteīnu ekspresiju, kas kalpo par antigēniem, nodrošinot specifisku imūno atbildi. Šādu antigēnu sistemātiskai meklēšanai un identificēšanai ir liela nozīme jaunu ļaundabīgo audzēju diagnostikas un terapijas metožu izstrādē.

Kursa darbs tika izstrādāts Valsts Pētījumu Programmas "Jaunas zāles un biokorekcijas līdzekļi: konstruēšana, transportformas un darbības mehānisms" projekta "Seroloģiska ļaundabīgo audzēju diagnostikas testa izstrādāšana" ietvaros, kura galvenie mērķi ir:

- Identificēt reprezentatīvu skaitu melanomas un kuņģa vēža antigēnu;
- Izgatavot antigēnu čipu un ar tā palīdzību salīdzināt autoantivielu repertuāru audzēju, iekaisuma un autoimūno slimību pacientu un veselu cilvēku serumā;
- Nosakot šo testu jutību un specifiskumu, izvērtēt iespējas pielietot autoantivielu noteikšanu vēža diagnostikā un/vai skrīningā.

Līdz šim projekta ietvaros tika izmantota uz T7 fāgu displeja balstīta SEREX metodika, kurai ir vairākas priekšrocības attiecībā uz klasisko SEREX metodiku, taču galvenās ar šo metodi saistītās problēmas ir:

- Tikai ~10% no atrastajiem, ar serumu reaģējošajiem T7 fāgu kloniem ekspresē pareizā fāzē translētus rekombinantus proteīnus, pārējie, visticamāk, ir mimotopi.
- Rekombinanto T7 fāga kapsīdas proteīnu īpatsvars stipri variē atkarībā no eksponētā proteīna garuma, konformācijas un bioķīmiskajām īpašībām.

Šī darba mērķis bija izstrādāt ar StrepII Tagiem 1, 2 un 3 iezīmētu kuņģa vēža ekspresijas kDNS bibliotēku, kas ļautu optimizēt uz T7 fāgu displeja balstītu SEREX metodes modifikāciju, ļaujot kDNS bibliotēku bagātināt ar pareizā fāzē translētiem kDNS insertiem, kā arī monitorēt rekombinanto T7 fāga kapsīdas proteīnu īpatsvaru.

Kursa darba uzdevumi:

- Izveidot StrepII Tag 1, 2 un 3 saturošus T7 fāga displeja vektorus;
- Izdalīt totālo RNS no kuņģa vēža audiem;
- Izveidot StrepII Tagiem 1, 2 un 3 iezīmētu kuņģa vēža kDNS ekspresijas bibliotēku.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1 Karcinogēze un ļaundabīgo audzēju raksturīpašības

Vēzis ir vairāk kā 100 dažādu slimību grupa, kuru galvenā kopīgā pazīme ir nekontrolēta šūnu augšana. Vēzis attīstās, transformējoties normālām organisma šūnām procesā, ko sauc par karcinogēzi (Cooper 1993). Karcinogēzi var inducēt gan ārēji (ķīmiskas vielas, jonizējoša radiācija, vīrusi), gan iekšēji (hormoni, imūnsistēmas stāvoklis, iedzimtas mutācijas) faktori. Šo faktoru kombinētas vai secīgas iedarbības rezultātā var tikt sekmēta vai ierosināta vēža formēšanās (ACS 2005). Karcinogēze ir komplikēts daudzpakāpju process, kas ietver ģenētisku un epiģenētisku izmaiņu akumulēšanos, kas ir priekšnosacījums tādām pārmaiņām šūnas bioķīmiskajos ceļos, kas izsauc sekojošas vēža šūnām raksturīgas pazīmes (1.attēls) (Hanahan et al. 2000):



1.attēls. Ļaundabīgo audzēju īpašības (Hanahan et al. 2000).

Figure 1. The hallmarks of cancer.

### 1. Neierobežots proliferācijas potenciāls

Replicējoties lineārām hromosomām, notiek hromosomu saīsināšanās, jo, degradējoties praimerim no atpaliekošās ķēdes 5' gala, DNS polimerāze 5' galā vairs nespēj pievienot jaunus nukleotīdus, jo nav vietas jaunam praimerim. Hromosomu no šādas degradācijas pasargā TTAGGG (cilvēkam<sup>1</sup>) heksanukleotīdu atkārtojumi hromosomu galos jeb telomēras, kuru garums nosaka šūnas proliferācijas potenciālu, kas normālām cilvēka šūnām nodrošina spēju dalīties aptuveni 50 reizes (Haiflika robeža) (Perkel 2002). Daļai cilmes šūnu eksistē enzīms telomerāze, kas spēj pagarināt telomēras, nodrošinot šīm šūnām neierobežotu proliferācijas potenciālu. Telomerāze raksturīga gandrīz visām vēža šūnām (Shay et. al 2001). Tomēr liela daļa vēža šūnu izmanto alternatīvo telomēru pagarināšanas mehānismu (ALT, alternative lengthening of telomeres), kas balstās uz telomēru apmaiņu starp māshromatīdām (Bryan et al. 1995).

<sup>1</sup> Citiem eikariotiem šī sekvenca var atšķirties

## 2. Izvairīšanās no apoptozes

Apoptoze ir viens no galvenajiem programmētās šūnu nāves veidiem, kas tiek palaists ārēju vai iekššūnas signālu ietekmē un ir raksturīgs praktiski visām normālām šūnām. Vēža šūnas ir nejutīgas pret apoptozi izsaucošiem faktoriem. Šādu nejutību pret apoptotiskiem signāliem vai apoptotisko signālu trūkumu var izsaukt dažādi mehānismi, piemēram:

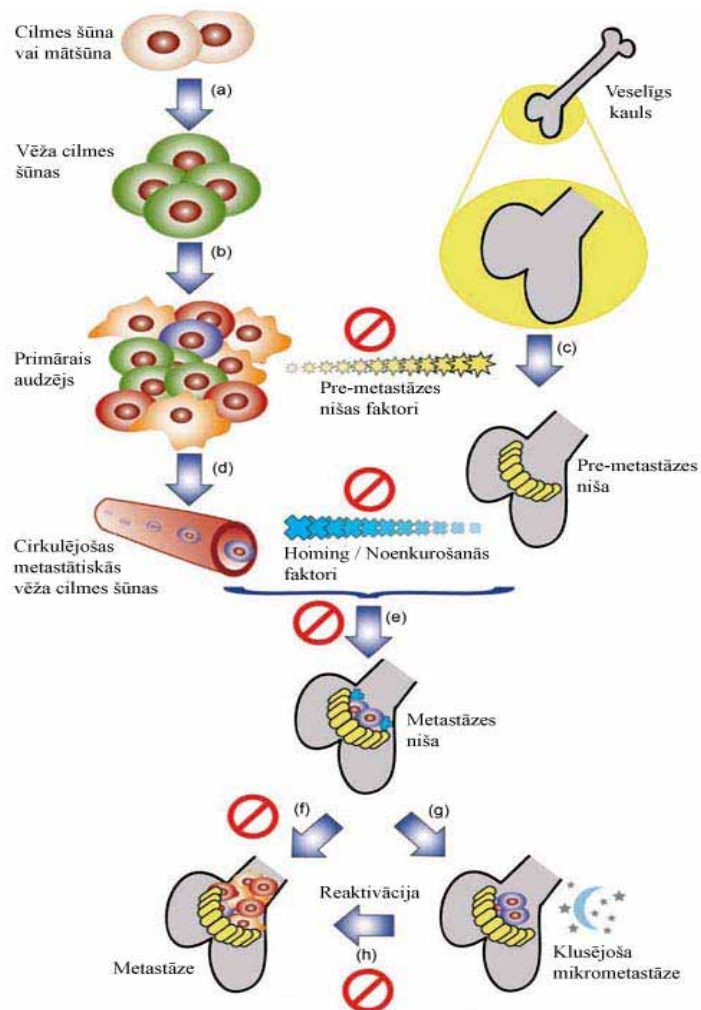
- **XIAP overekspresija** (raksturīga plaušu vēzim). XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) ir kaspāzes 3, kaspāzes 7 un kaspāzes 9 inhibītors. Kaspāzes aktivē mitohondriju citohroms C, izklūstot citosolā, kā rezultātā tiek palaists iekšējais apoptozes ceļš. Kaspāze 9 iesaistīta arī ārējā apoptozes ceļā. Šāda kaspāžu inaktivācija noved pie apoptotisko ceļu disfunkcijas (Yang et al. 2003).
- **Traucējumi p53 ceļā.** p53 ir audzējsupresorproteīns, kas uzkrājas DNS bojājumu gadījumā un apstādina šūnas ciklu G1 stadijā, dodot šūnai laiku DNS reparācijai, tomēr, ja bojājumi ir pārāk plaši vai reparācija nav sekmīga, p53 inducē apoptozi, stimulējot Bcl2 asociētā X proteīna (BAX) veidošanos, kurš inducē citohroma c izdali citoplazmā. p53 gēna transkripciju izsauc interferoni  $\alpha$  un  $\beta$ . Mutācijas p53 vai interferonu gēnos izsauc apoptozes traucējumus DNS bojājumu gadījumos (Takaoka et al. 2003; Hanahan et al. 2000).
- **Onkovīrusi.** Daudzi vīrusi kodē apoptozes inhibītorus (Teodoro et al. 1997), piemēram, BCL-2 homologus, kas spēj inhibēt tādus pro-apoptotiskos proteīnus kā BAX un BAK, kas ir nozīmīgs apoptozes iekšējā ceļā kā citohroma C relīzinga faktors (Polster et al. 2004). Virālo BCL-2 kodē, piemēram, Epšteina-Barra vīruss, kas var izraisīt Burkitta limfomu un aizdegunes karcinomu (Henderson et al 1993). Nereti vīrusi kodē arī kaspāžu un p53 inhibītorus vai attiecīgo gēnu represorus. Piemēram, cilvēka papilomas vīrusa (HPV) onkogēnu kodētais onkoproteīns E6 saistoties pie p53, izraisa tā degradāciju, savukārt HPV E7 proteīns saistās pie retinoblastomas audzējsupresorgēna produkta pRB (Münger et al. 1992).

## 3. Spēja metastazēt

Spēja metastazēt ir sarežģīts un līdz galam neizprasts process, kas raksturojas ar primārā audzēja šūnu izplatību pa limfātisko un asinsrites sistēmu, līdz tās sasniedz piemērotus orgānus, kuros veido sekundārus audzējus – metastāzes. Pētījumi liecina, ka metastāžu formēšana ir ļoti mazefektīvs process, jo tikai 0,01% asinsritē iekļuvušu vēža šūnu ir spējīgas metastazēt (Fidler 1970), turklāt pastāv sakarība starp primārā audzēja



lokalizāciju un metastāžu izplatību, piemēram, kolorektālais vēzis visbiežāk veido metastāzes aknās, bet priekšdziedzera vēzis – kaulos (Pantel 2004). Šāds metastāžu orgānu specifiskums sākotnēji tika skaidrots ar asinsrites sistēmas morfoloģiju, jo, tā kā vēža šūnas ir ievērojami lielākas par asinsķermenīšiem, tām vajadzētu tikt aizturētām



2 .attēls. Modelis, kas raksturo audu specifiskas metastāzes (Li et al. 2007)

Normālu cilmes šūnu vai mātšūnu transformācija vēža cilmes šūnās (a). Heterogēna primārā audzēja attīstība no vēža cilmes šūnām (b). Primārā audzēja sekretētu pre-metastāzes nišas faktoru izraisīta pre-metastāzes nišas formēšanās (c). Pre-metastāzes nišas izdalīti faktori darbojas kā hemoatraktanti attiecībā uz metastātiskām vēža cilmes šūnām, kas atdalījušās no primārā audzēja (d). Metastātiskās vēža cilmes šūnas formē metastāzes nišu, sasniedzot pre-metastāzes nišu (e). Lokālā mikrovide nosaka, vai Metastātiskās vēža cilmes šūnas proliferēs, formējot metastāzi (f), vai ieies neaktīvā miera stāvoklī, veidojot klusējošu mikrometastāzi (g), kas var tikt pārtraukts, metastātiskajām cilmes šūnām saņemot reaktivācijas signālus (h).

Figure 2. A model for tissue-specific metastasis.

Transformation of normal stem or progenitor cells into cancer stem cells (a). Development of heterogeneous primary tumor (b). Pre-metastasis-niche forming factors, secreted by primary tumor, initiate forming of pre-metastasis-niche (c). Factors, secreted by pre-metastasis niche, acts like chemoattractants for mCSCs which have been splitted of primary tumor (d). When reached pre-metastasis niche, mCSCs initiate forming of pre-metastasis-niche (e) and the local environment of niche helps to determine if the mCSCs will either proliferate into metastatic lesion directly (f) or will enter a quiescent period (g), which can be shortened by reactivation signals (h).

kapilāros, tiklīdz tās sasniegušas pirmo orgānu savā ceļā (Ewing 1928), taču šo ideju nopietni iedragāja Stefana Pegeta 1889. gadā izvirzītā „sēklas un augsnes” hipotēze, kas paredzēja, ka vēža šūnas spēj izdzīvot un proliferēt vienīgi noteiktos audos, kas nodrošina nepieciešamo mikrovidi un augšanas faktoros (Fidler 2001). Šobrīd pētījumi vedina uz domām, ka primārais audzējs izdala īpašus pre-metastāzes nišas faktoros, kuri noteiktos audos ierosina pre-metastāzes nišas formēšanos. Pre-metastāzes niša, savukārt, izdala migrēšanas (homing) un noenkurošanās (anchorage) faktoros, kas, darbojoties kā hemoatraktanti, pievilina vēža cilmes šūnas, kas atdalījušās no primārā audzēja. Kad vēža cilmes šūna sasniedz pre-metastāzes nišu, tā sāk formēt metastāzes nišu, no kuras tālāk var attīstīties metastāze vai neaktīva mikrometastāze (2.attēls). Metastāzes ir nāves cēlonis 90% vēža gadījumos (Li et al. 2007).

Pēdējos gados atzinību ir guvusi ideja, ka metastatiskajos procesos var tikt iesaistīti epiteliāli mezenhimālās tranzīcijas (EMT) mehānismi, kas pirmo reizi novēroti embrionālajā attīstībā kā epiteliālo šūnu konversija mezenhimālā fenotipā, zaudējot polaritāti un starpšūnu kontaktus, kā arī notiekot būtiskām izmaiņām citoskeleta struktūrā, kas rezultējas ar spēju ekspresēt mezenhimālos proteīnus un migrēt, šādi spēlējot nozīmīgu lomu embrija attīstībā (Thiery 2002). Domājams, ka epiteliālā audzēja gadījumā var tikt izmantoti EMT mehānismi, lai konvertētu diferencētas vēža šūnas dediferencētās šūnās ar palielinātu metastātisko potenciālu (Kang et al. 2004).

#### **4. Spēja inducēt angiogēnēzi**

Sakarā ar barības vielu un skābekļa trūkumu, nevaskularizēts audzējs parasti nepārsniedz 2mm<sup>3</sup> tilpumu, tādēļ ļoti būtisku lomu audzēja attīstībā spēlē audzēja šūnu spēja inducēt angiogēnēzi (Schmitt et al. 1999). Audzēja šūnu spēja inducēt angiogēnēzi balstās uz tādu augšanas faktoru produkciju un sekrēciju, kas veicina asinsvadu zarošanos un augšanu. No šādiem faktoriem visbiežāk sastopami VEGF (vaskulārā endotēlija augšanas faktors) un bFGF (galvenais fibroblastu augšanas faktors) (Eppenberger et al. 1998). Šobrīd zināms, ka audzēja šūnas nespēj producēt enzīmu PKG (cGMP atkarīgā proteīnkināze G). Normālās šūnās PKG ierobežo  $\beta$ -katenīnu, kas stimulē angiogēnēzi (Kwon et al. 2008).

#### **5. Nejutība pret ārējiem augšanu inhibējošiem faktoriem**

Normālos audos tiek uzturēta homeostāze ar augšanu inhibējošiem signāliem, kas darbojas pretī augšanas faktoru ietekmei, novirzot šūnu pārejošā miera stāvoklī vai postmitotiskā stāvoklī, kas saistīts ar šūnas diferencēšanos un proliferācijas potenciāla zudumu. Daudzi, iespējams, visi, antiproliferatīvie signāli tiek novadīti caur

retinoblastomas proteīnu pRb un diviem tā radiniekiem – p107 un p130. Traucējumi pRb ceļā ļauj vēža šūnai proliferēt arī augšanas inhibītoru klātbūtnē (Weinberg 1995).

## 6. Augšanas faktoru pašpietiekamība

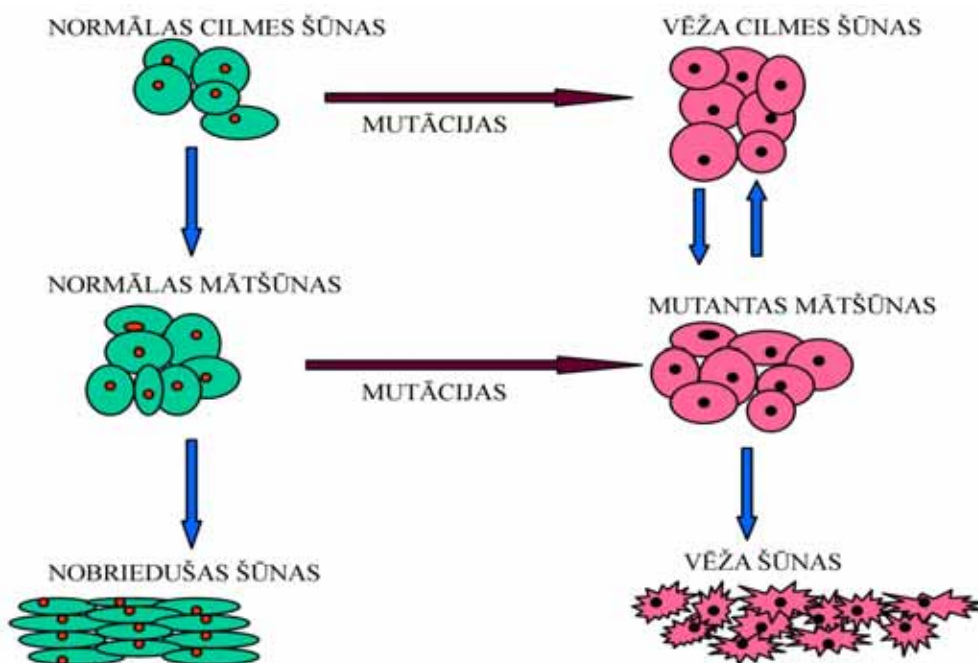
Lai šūna spētu proliferēt, tai jāsaņem ekstracelulāri augšanas faktori. Vēža šūnas spēj pašas sintezēt daļu no nepieciešamajiem augšanas faktoriem, uz kuriem arī pašas autokrīni atbild (Fedi et al 1997). Dažos gadījumos vēža šūnas pilnībā zaudējušas nepieciešamību pēc noteiktiem augšanas faktoriem, piemēram, RAS protoonkogēna mutācijas gadījumā var translēties hiperaktīvs RAS G-proteīns, kas ir aktīvs, pat ja pie atbilstoša membrānas receptora nesaistās augšanas faktors (Medema et al. 1993).

Šobrīd pastāv divi konkurējoši modeļi, kas mēģina izskaidrot audzēja attīstību (Reya et al. 2001):

1. **Stohastiskais modelis** – paredz, ka jebkura audzēja šūna ir tumorigēna un tās ieiešanu šūnas ciklā nosaka gadījuma rakstura notikumi.
2. **Hierarhijas modelis** – paredz, ka tikai neliela audzēja šūnu subpopulācija ir atbildīga par audzēja augšanu un metastāžu formēšanos. Šis modelis ir pamatā vēža cilmes šūnu hipotēzei.

Vēža cilmes šūnu eksistenci jau 1855. gadā paredzēja R. Virhovs, izvirzot hipotēzi, ka audzējs attīstās no šūnām, kas līdzinās embrionālām cilmes šūnām (Virchow 1855), taču tā laika tehnoloģijas nebija pietiekami attīstītas, lai sniegtu iespēju pārbaudīt šo hipotēzi, tādēļ pirmie taustāmie pierādījumi vēža cilmes šūnu pastāvēšanai tika iegūti tikai 1994. gadā, kad akūtā mieloīdā limfomā tika atrastas šūnas ar virsmas fenotipu  $CD34^{+}/CD38^{-}$ , kas ir raksturīgs šūnām ar cilmes šūnu īpašībām (Lapidot et al. 1994). Turpmākajos gados līdzīgas cilmes-veida šūnas tika atrastas arī virknē citu audzēju tipu. Noskaidrots, ka aizkuņģa dziedzerā, resnās zarnas un smadzeņu audzēju cilmes-veida šūnām raksturīgs cilmes šūnu virsmas glikoproteīns CD133. Injicējot resnās zarnas  $CD133^{+}$  šūnas pelēm ar novājinātu imūnsistēmu, daudzos gadījumos tās izrādīja spēju formēt metastāzes, turpretī neviena no  $10^4$  injicētām  $CD133^{-}$  šūnām šādu spēju neizrādīja (O'Brien et al. 2007). Turpinoties pētījumiem, iegūtie pierādījumi vēža cilmes šūnu pastāvēšanai bija neapstrīdami, tādēļ radās nepieciešamība precīzi definēt vēža cilmes šūnas. Šādu vēža cilmes šūnu definīciju 2006. gadā sniedz M. F. Klērks: „Vēža cilmes šūnas ir audzēja šūnas, kam piemīt spēja veidot heterogēnas vēža šūnu līnijas un pašatjaunoties” (Clarke et al. 2006), kur ar pašatjaunošanos būtu jāsaprot vēža cilmes šūnu spēju asimetriski daloties, ne tikai veidot heterogēnas diferencētu vēža šūnu populācijas, bet arī saglabāt vēža cilmes šūnu līniju.

Viens no vēža cilmes šūnu izpētes pamatjautājumiem ir šo šūnu neskaidrā izcelsme. Ja šādu šūnu avots ir nobriedušas, diferencētas šūnas, dediferenciācijā un pašatjaunošanās spēju nodrošināšanā galveno lomu spēlētu akumulētu onkogēnu mutāciju kopums, taču šī hipotēze ir maz ticama, jo diferencētu šūnu mūža ilgums vairumā gadījumu ir pārāk īss, lai tās spētu akumulēt visas nepieciešamās mutācijas, līdz ar to daudz ticamākas šķiet versijas, kas paredz vēža cilmes šūnu attīstību no normālām cilmes šūnām vai mātšūnām (3. attēls) (Allan et al.



3. attēls. Vienkāršots modelis, kas ilustrē hipotēzi par vēža cilmes šūnu izcelsmi (Sagar et al. 2007).

Figure 3. Simplified model of origin of the cancer stem cells.

2007), tomēr jauni pētījumi parāda, ka nepieciešama vienīgi Oct-4, c-Myc, Sox2 un klf4 ekspresija, lai nobriedušus fibroblastus pārvērstu par šūnām, kas morfoloģiski un fizioloģiski līdzinās embrionālām cilmes šūnām (Barnhart et al. 1007). Turpretī, ja vēža cilmes šūnas attīstās, transformējoties normālām cilmes šūnām, pašatjaunošanās spējas nodrošināšanai tās varētu izmantot jau eksistējošus regulatoros ceļus, taču, tā kā cilmes šūnas ir sastopamas ārkārtīgi reti, ticamāka ir versija par vēža cilmes šūnu izcelsmi no mātšūnām (progenitor cells) (Kucia 2006, Li 2007), ko apstiprina arī novērojumi, ka Bcl-2 un BCR/ABL (sastopams 90% hroniskas mieloīdas leikēmijas gadījumos) koekspresija mieloīdās mātšūnās ir pietiekama, lai izraisītu leikēmiju pelēm (Jaiswal et al. 2003).

Jauns modelis paredz vēža cilmes šūnu rašanos cilmes šūnu saplūšanas rezultātā. Konceptuāli, saplūšana starp cilmes šūnām un mutantām šūnām var novest pie pašatjaunošanās potenciāla atgūšanas. Neseni pētījumi parāda, ka kaulu smadzeņu BMDC šūnas ir spējīgas saplūst ar neoplastiskām epitēlija šūnām (Rizwi et al. 2006) Šāds šūnu saplūšanas modelis spētu izskaidrot audzēja šūnām bieži raksturīgo aneiploīdiju (Bjerkvig et

al. 2005). Par labu šai hipotēzei liecina arī daudziem vīrusiem piemītoša spēja sapludināt šūnas (Duelli et al. 2007).

Pretstatā klasiskajam gadījumam, kad vēzis ir piesaistīts konkrētam saimniekorganismam, no kura šūnas, tas ir attīstījies, zināmi arī divi kontagiozi vēža tipi – suņu seksuāli transmisīvais vēzis (CTVT, infekciozā sarkoma) un Tasmānijas velnsomaiņu sejas vēzis (DFTD). Sākotnēji tika domāts, ka abos gadījumos vēzi izraisa kāds vīruss, līdzīgi kā HPV var izsaukt dzemdes kakla vēzi, taču šobrīd ir zināms, ka pārnēsējaģents ir pati vēža šūna, kas pirmajā gadījumā izplatās seksuālu kontaktu ceļā suņu un citu *Canis* ģints sugu populācijās, bet otrajā gadījumā barošanās, savstarpējo cīņu un agresīvas pārošanās laikā Tasmānijas velnsomaiņu (*Sarcophilus harrisi*) populācijās (Murgia et al 2006).

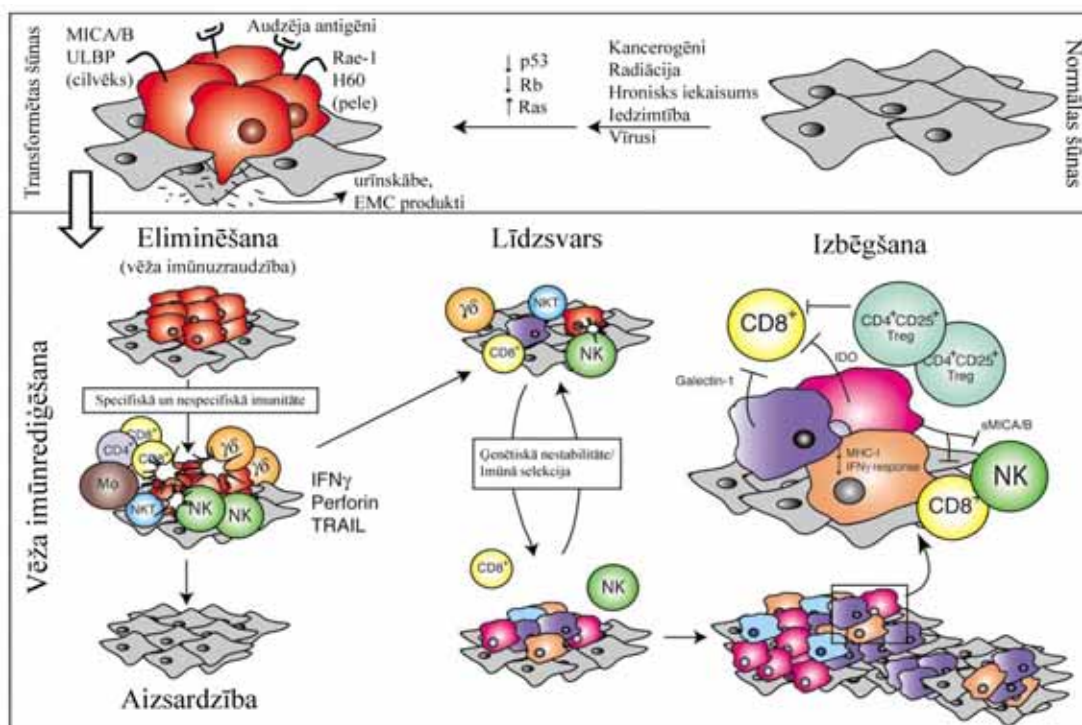
## 1.2. Ļaundabīgo audzēju imunoloģija

Daži pētnieki uzskata, ka imūnās sistēmas dabiskā funkcija ir meklēt un iznīcināt neoplastiskas šūnas un audus, kas ļauj vēža attīstību interpretēt kā imūnās sistēmas neveiksmīgas darbības rezultātu attiecībā uz abnormālu šūnu atpazīšanu vai eliminēšanu (Reiman et al. 2007). Imūnās sistēmas nespecifisko un specifisko mehānismu kopumu, kas nodrošina aizsardzību pret vēža attīstību, sauc par vēža imūnrediģēšanu. Vēža imūnrediģēšana norisinās trīs fāzēs – eliminēšanas fāzē, līdzsvara fāzē un izbēgšanas fāzē (Dunn et al. 2004<sup>b</sup>) (4. attēls):

### 1. Eliminēšanas fāze

Eliminēšanas fāze reprezentē vēža imūnuzraudzības koncepciju, ietverot nespecifiskās un specifiskās imunitātes mehānismu kompleksu darbību, lai eliminētu transformētas šūnas. Pilnīga imūnrediģēšanas procesa gadījumā vēža šūnas tiek eliminētas šajā fāzē, nesasniedzot līdzsvara un izbēgšanas fāzes. Eliminēšanas fāze tiek iedalīta četros soļos (Dunn et al. 2004<sup>b</sup>):

- 1) Audzēja šūnu izdalīti pre-iekaisuma faktori un hemokīni izsauc nespecifiskās imūnās sistēmas šūnu rekrutāciju uz audzēja saitū (Wrenshall et al. 1999). Sasniedzot audzēju, NKT,  $\gamma\delta$ T, NK šūnas un/vai makrofāgi spēj atpazīt tādas audzēja šūnām raksturīgas molekulas kā NKG2D ligandus (Benlagha et al. 2000). Šādai audzēja šūnām specifisku molekulu atpazīšanai ir kritiska loma turpmākā imūnās sistēmas pretvēža aktivitātē, kas raksturojas ar interferona  $\gamma$  producēšanu.



4. attēls. Vēža imūnrediģēšanas trīs fāzes (Dunn et al. 2004<sup>a</sup>).

Mutgēnu faktoru ietekmē transformējoties normālām šūnām (pelēkas), tās kļūst par vēža šūnām (sarkanās), kas pat agrās tumoriģenēzes stadijās ekspresē audzēja-specifiskus marķierus, kā arī ģenerē pre-iekaisuma signālus (urīnskābe u.c.), kas iniciē vēža imūnrediģēšanas procesu. Imūnrediģēšanas eliminācijas fāzē imūnuzraudzības tīkls, ko veido nespecifiskās un specifiskās imunitātes mehānismi, veic mērķtiecīgu audzēja šūnu elimināciju, tomēr, ja šis process cieš neveiksmi, audzēja šūnas var ieiet līdzsvara fāzē, ko raksturo imūnās sistēmas selektīva iedarbība un vēža šūnu diversitāti, līdz ar to, diverģējot vēža šūnām, izdzīvo tās, kas izrāda rezistenci imūnās sistēmas darbībai. Rezistenci ieguvušās šūnas ieiet izbēgšanas fāzē un turpina nekontrolēti proliferēt.

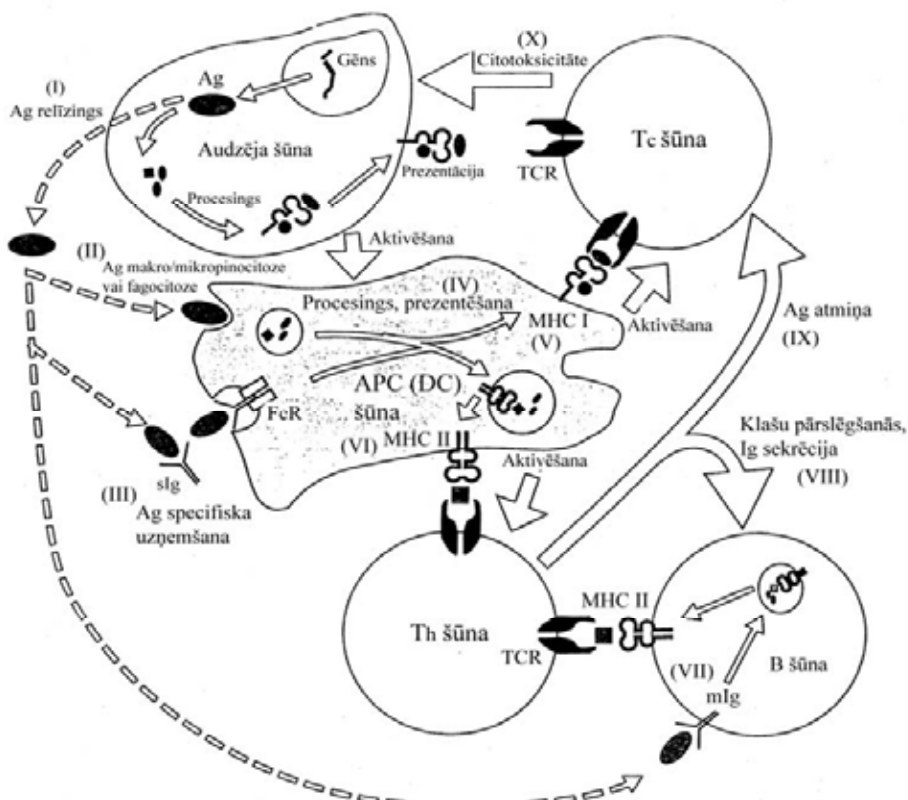
Figure 4. The three phases of the cancer immunoeediting process.

Normal cells (gray) subjected to oncogenic stimuli ultimately undergo transformation and become tumor cells (red), which even at early stages of tumorigenesis may express distinct tumor-specific markers and generate proinflammatory "danger" signals (uric acid etc.) that initiate the cancer immunoeediting process. In the elimination phase of immunoeediting, mechanisms of innate and adaptive immunity, which comprise the cancer immunosurveillance network, may eradicate the developing tumor, however, if this process is not successful, tumor cells may enter the equilibrium phase. In this phase the immune system can selectively affect the diversity of tumor cells resulting in the survival of only those cancer cells which resist to immune attack. Those cells may enter in the escape phase and proliferate unaffected by immune system.

- 2) Imūnās sistēmas šūnu atbrīvotais interferons- $\gamma$  izraisa lokālu hemokīnu sintēzi, izsaucot papildus imūnās sistēmas šūnu rekrutāciju uz audzēja saiti un ekstracelulārā matricisa remodelēšanas blakusprodukti stimulē audzējā infiltrējušos makrofāgus izdalīt nelielu daudzumu interleikīna-12 (Hodge-Dufour et al. 1997), kas, savukārt, liek audzējā infiltrējušām NK šūnām izdalīt nelielu daudzumu interferona  $\gamma$ , stimulējot makrofāgus izdalīt papildus interleikīnu-12, kā rezultātā, mijiedarbojoties makrofāgiem un NK šūnām, tiek izdalīts liels daudzums interferona  $\gamma$  (Bancroft et al. 1991), izsaucot virkni interferona  $\gamma$  atkarīgo procesu, tai skaitā antiproliferatīvos, pre-apoptotiskos un

angiostatiskos, kas izraisa daļas audzēja šūnu bojāeju un audzēja antigēnu izdalīšanos ekstracelulārajā telpā.

- 3) Nespecifiskās imūnās sistēmas darbības rezultātā iznīcināto audzēja šūnu antigēnus vai antigēnus saturošās atliekas endocitozes ceļā uzņem uz audzēja



5. attēls. Specifiskā imūnā atbilde uz audzēja antigēniem (Sahin et al 1997).

Specifiskajā imūnajā atbildē uz audzēja antigēniem iesaistītas CD4+ Th šūnas, CD8+ Tc šūnas un B šūnas, kuras aktivē profesionālas antigēnu prezentējošas šūnas (dendrītiskās šūnas). Sekrēcijas vai nespecifiskās imūnās atbildes izraisītas audzēja šūnu destrukcijas rezultātā atbrīvotos antigēnus (I) pinocitozes, fagocitozes (II) vai FcR mediētās endocitozes (III) ceļā uzņem antigēnus prezentējošas APC šūnas. Uzņemtie antigēni tiek procesēti (IV) un prezentēti kopā ar MHC I klases molekulām (V) Tc šūnām un kopā ar MHC II klases molekulām (VI) Th šūnām, izraisot attiecīgo šūnu aktivāciju. Audzēja antigēnu uzņem arī B šūnas, izmantojot membrānas Ig (VII) un prezentē tu kopā ar MHC II klases molekulu Th šūnām. Antigēnus prezentējošo šūnu un B šūnu antigēnu prezentācijai Th šūnām ir kritiska loma specifiskajā imūnajā atbildē, jo tā izsauc klašu pārslēgšanos un IgG/A antivielu sekrēciju B šūnām (VIII), kā arī ilgstošo T šūnu antigēnu atmiņu (IX). Tc šūnu aktivācija (V) ielēdz šo šūnu citotoksisko aktivitāti, kas izpaužas kā Tc izraisīta audzēja šūnu lizēšana (X).

*Figure 5. Specific immune responses to tumor antigens.*

*Specific immune responses to tumor antigens involve CD4+ Th, CD8+ Tc and B cells which are activated by professional antigen presenting cells (dendritic cells). Tumor antigens (I) released by secretion or innate immune response mediated tumor cell lysis are captured by antigen presenting cells, by either pinocytosis, phagocytosis (II) or FcR mediates endocytosis (III). Uptaken antigens are processed (IV) and presented by MHC I (V) to Tc cells and by MHC II (VI) to Th cells leading to the activation of these cells. Tumor antigens are captured also by B cells and this is driven by membrane Ig (VII) leading to MHC II antigen presentation to Th cells. Antigen presentation to Th cells by both antigen presenting cells and B cells is critical for the adaptive immune response as it induces class switching and the secretion of IgG/IgA by B cells (VIII) and also long lasting T cell memory responses (IX). Activation of Tc cells (V) triggers cytotoxic activity of Tc cells which induces tumor cell lysis (X).*



saitu rekrutētas dendrītiskās šūnas. Antigēnus nesošas nobriedušas dendrītiskās šūnas migrē uz limfmezgliem (Dunn et al. 2004<sup>b</sup>), kur tās kalpo kā starposms starp nespecifisko un specifisko imūno sistēmu, procesētus antigēnus kopā ar MHC II vai MHC I klases molekulām prezentējot attiecīgi CD4+ T<sub>h</sub> šūnām un CD8+ T<sub>c</sub> šūnām, kas izsauc attiecīgo šūnu aktivāciju. Antigēnus ar membrānas Ig starpniecību uzņem arī B šūnas, kas tos procesē un prezentē T<sub>h</sub> šūnām kopā ar MHC II klases molekulām. Dendrītisko APC šūnu un B šūnu antigēnu prezentācija T<sub>h</sub> šūnām ierosina klašu pārslēgšanos un Ig produkciju B šūnās, kā arī ilgstošu antigēnu atmiņu T šūnām (Sahin et al 1997) (5. attēls).

- 4) Šajā solī norisinās audzēja specifisku CD4+ T<sub>h</sub> un CD8+ T<sub>c</sub> šūnu rekrutācija uz audzēja saitu un pilnīga audzēja eliminēšana. Audzēja specifiskās CD8+ T<sub>c</sub> šūnas efektīvi atpazīst vēža šūnas un eliminē tās, izmantojot gan tiešus, gan netiešus mehānismus (Dunn et. al. 2004<sup>b</sup>).

## **2. Līdzsvara fāze**

Līdzsvara fāzē starp imūno sistēmu un audzēja šūnām iestājas dinamisks līdzsvars, kas raksturojas ar uz izdzīvojušām audzēja šūnām vērstu imūnās sistēmas darbības izraisītu selekcijas spiedienu, kā rezultātā audzēja augšana tiek ierobežota, to pilnībā neiznīcinot. (Dunn et al. 2004<sup>b</sup>). Šī fāze, iespējams, ir visgarākā no imūnrediģēšanas trīs fāzēm un var ilgt vairākus gadus (Loeb et al. 2003). Šajā periodā galvenie mehānismi, kas audzējam ļauj pārciest pastāvīgus imūnās sistēmas uzbrukumus, ir audzēja šūnu heterogenitāte un ģenētiskā nestabilitāte (Loeb 1991).

## **3. Izbēgšanas fāze**

Izbēgšanas fāzē uz audzēja šūnām vairs nedarbojas imūnās sistēmas spiediens, jo tās ieguvušas rezistenci pret imūnās sistēmas iedarbības mehānismiem, imūnsupresīvu aktivitāti un/vai īpašības, kas ļauj tām palikt „neredzamām” imūnās sistēmas šūnām. Šādas audzēja šūnu īpašības nosaka dažādi mehānismi, piemēram (Dunn et al. 2004<sup>b</sup>):

- Imūnsupresīvu citokīnu sintēze
- Antigēnu neekspresēšana
- Nejutība pret interferonu- $\gamma$

### **1.3. Ļaundabīgo audzēju antigēnu identificēšana**

Atšķirtībā no dzīvnieku modeļiem, cilvēka neoplastiskiem audiem specifisku antigēnu eksistence tika nepārprotami demonstrēta tikai 1991. gadā, kad T. Būna (Boon) grupa aprakstīja melanomas antigēnu MAGE-1 (van der Bruggen et al. 1991), taču, attīstoties



antigēnu identificēšanas metodikai, jau 2002. gadā zināmo audzēja antigēnu skaits pārsniedza 2,5 tūkstošus (Yuichi et al. 2005). Šādas zināšanas par audzēju antigēniem paver jaunas ļaundabīgo audzēju diagnostikas un terapijas iespējas.

Vairums identificēto audzēja antigēnu iespējams klasificēt pēc to ekspresijas rakstura, funkcijām vai izcelsmes, ierindojot tos kādā no sekojošām kategorijām (Jäger et al. 2000, Sahin et al 1997):

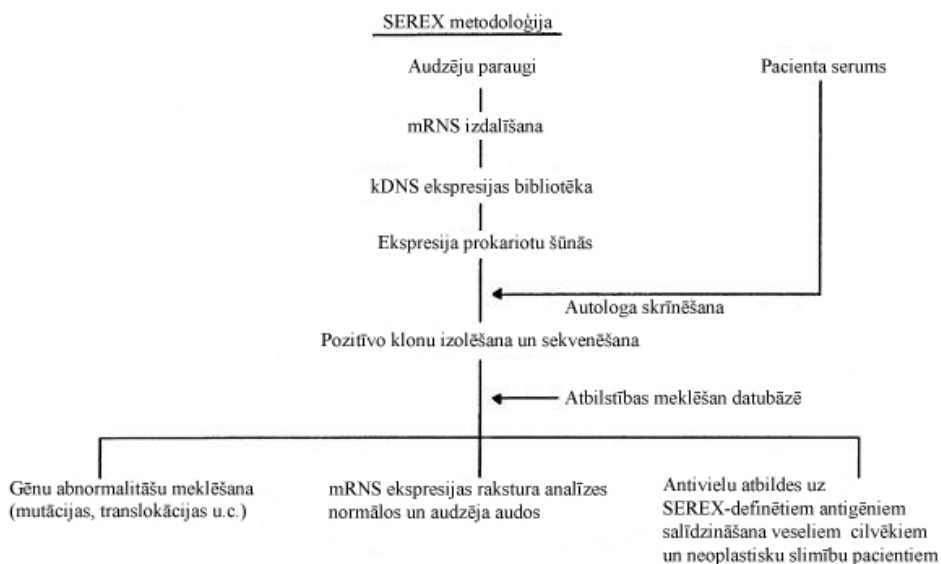
- 1. Vēža-sēklinieku (cancer-testis) antigēni** – antigēni, kuri raksturīgi audzēja šūnām, bet nav sastopami normālos ausos, izņemot sēkliniekus, kas ir imūn-privileģēts rajons. Pie šādiem antigēniem pieskaitāmi MAGE-1, MAGE-2, MAGE-4a, HOM-MEL-40, NY-SO-1 u.c.(De Plaen et al. 1994, Chen et al. 1997). NY-ESO-1 ir viens no visimunogēnākajiem audzēja antigēniem un izraisa imūno atbildi 40-50% pacientiem ar NY-SO-1<sup>+</sup> audzēju (Jäger et al. 2000).
- 2. Diferenciācijas antigēni** – antigēni, kas raksturīgi kādas noteiktas izcelsmes vēža šūnām, kā arī tādas pašas izcelsmes normālām šūnām. Pie šādiem antigēniem var pieskaitīt, piemēram, melanomai raksturīgu antigēnu - tirozināzi, kas sastopama arī normālos melanocītos (Coulie et al. 1994).
- 3. Mutantie antigēni** – antigēni, kas ekspresēti no mutējušiem gēniem. Šādi antigēni sastāda tikai nelielu daļu no visiem zināmajiem audzēju antigēniem (Sahin et al 1997). Pie šādiem antigēniem pieskaitāmi MUM-1, p53, CDK4 u.c. (Jäger et al. 2000).
- 4. Pārmērīgi ekspresētu gēnu produkti** – antigēni, kas sastopami gan audzēja šūnās, gan normālās šūnās, taču audzēja šūnās to ekspresijas apjoms var būt daudzkārt palielināts, pārsniedzot kritisko sliekšni, virs kura sāk izpausties imūnā atbilde (Viola et al. 1996). Pie šīs grupas pieskaitāmi HER2/neu, p53 u.c. (Jäger et al. 2000).
- 5. Alternatīvie splaisinga varianti** – ar audzēju asociēti splaisinga varianti, kam piemīt imunogēna aktivitāte, piemēram, Hodžkina limfomai (Hodgkin's lymphoma) raksturīgs antigēns restīns (Sahin et al. 1995).
- 6. Ar posttranslācijas modifikācijām saistītie** - Antigēni, kas tiek ekspresēti vienādos apjomos gan audzēja, gan normālos audos, taču imūno atbildi, pateicoties posttranslācijas modifikācijām, izraisa vienīgi audzēja pacientiem. Pie šīs grupas pieskaitāms, piemēram, HOM-MEL-2.4 (Skipper et al. 1996, Chen et al. 1996).
- 7. Virālie antigēni** – virālas izcelsmes antigēni, piemēram, HERV-K10 retrovīrusa env proteīns, kas sastopams nieru audzējos (Ono et al. 1986).

Audzēju antigēnu meklēšanai un identificēšanai ir izstrādātas vairākas metodes:

- 1. Autologā seroloģiskā antigēnu identificēšana** – metodi 20.gs. 70. gados attīstīja Loida J. Olda grupa un tā balstās uz autologa seruma antivielu spēju reaģēt ar audzēja

antigēniem. Metodē tika izmantotas kultivētas vēža šūnu līnijas un autologs serums, lai veicot izvērstus absorbcijas testus, noteiktu antigēnu-antivielu saistību. Metodes ierobežotais potenciāls ļauj identificēt tikai nelielu daļu audzēju antigēnu (Sahin et al. 1997, LICR 2007).

2. **T<sub>c</sub> šūnu epitopu klonēšana** – metode attīstīta 20. gs. 90. gadu sākumā un tā balstās uz audzēja kDNS bibliotēkas ieklonēšanu atbilstošu MHC-1 ekspresējošās mērķšūnās un sekojošas uz MHC-1 prezentēto antigēnu epitopu identificēšanas, izmantojot no audzēja infiltrāta izdalītas T<sub>c</sub> šūnu līnijas. Šī metode ir ļoti darbietilpīga, jo nepieciešamas T<sub>c</sub> šūnu līnijas un iemaņas klonēšanā (Yang et al. 2006, Yang et al. 2005).
3. **MHC-1 saistīto peptīdu eluēšana** – metode baltās uz peptīdu eluēšanu no audzēja šūnām vai attīrītām audzēja MHC-1 molekulām un uznešanas uz APC šūnām, kam seko attiecīgo APC reaktivitātes testi ar T<sub>c</sub> šūnām. Ar T<sub>c</sub> reaģējošie antigēni tālāk tiek attīrīti un sekvenēti. Šī metode prasa iemaņas proteīnu ķīmijā, proteīnu attīrīšanā, kā arī masspektrometrijā (Yang et al. 2005).
4. **Diferenciālās ekspresijas analīzes** – izmanto jaunākos tehnoloģiskos risinājumus, lai atklātu RNS un proteīnus, kas tiek atšķirīgi ekspresēti normālās un audzēja šūnās (LICR 2007).



6. attēls. SEREX pieeja cilvēka audēju antigēnu identificēšanā (Chen et al. 2004)

*Figure 6. SEREX approach to defining human tumor antigens.*

5. **SEREX** (serological analysis of recombinant cDNA expression libraries) – metodi 1995. gadā uz autologās seroloģiskās antigēnu identificēšanas metodes bāzes izstrādāja M. Freundšuh (Pfreundschuh). Īsi pēc metodes izstrādes tika aizsākta Starptautiskā SEREX Programma (International SEREX Program), kuras ietvaros Vēža

Imunoma Datubāze (Cancer Immunome Database), kas ir lielākā publiski pieejamā vēža antigēnu datubāze, papildināta jau par aptuveni 2000 antigēnu sekvencēm (LICR 2007).

Klasiskajā SEREX metodē (6. attēls) no svaigiem audzēja paraugiem, izmantojot  $\lambda$ -fāga vektoru, tiek konstruēta kDNS bibliotēka un ekspresēta *Escherichia coli* baktērijā. Rekombinantie  $\lambda$ -fāgi no plakiem tiek pārnesti uz nitrocelulozes membrānas un skrīnēti ar augsta titra IgG antivielām, kas pārstāvētas pacienta serumā. Izmantojot ar enzīmu konjugētas sekundārās antivielas pret cilvēka IgG, kā antigēni tiek identificēti ar seruma IgG reaģējošie  $\lambda$ -fāgu rekombinantie peptīdi un šādi pozitīvi kloni iegūti monoklonālā veidā, lai, veicot DNS sekvenēšanu, noteiktu insertētās DNS sekvenci (Sahin et al. 1997). Šādai metodei piemīt vairākas priekšrocības salīdzinājumā ar iepriekšminētajām, piemēram, svaigu audzēja audu izmantošana ļauj kDNS bibliotēkā iekļaut lielāko daļu audzēja šūnās ekspresēto proteīnus kodējošo gēnu un izvairīties no *in vitro* artefaktiem. Metode ļauj arī detektēt ne tikai šūnas virsmas, bet arī iekššūnas antigēnus (Túreci et al. 1997).

Lai gan SEREX koncepcija liekas vienkārša, veiksmīgai metodes pielietošanai nepieciešams apiet virkni tehnisku grūtību (Chen et al. 2004):

- 1) Cilvēka serumā raksturīgas antivielas, kas reaģē ar baktērijas vai fāga komponentiem. Šī problēma parasti tiek risināta, atkārtoti absorbējot atšķaidītu serumu ar baktēriju un fāgu lizātu (Chen et al. 2004)
- 2) IgG ekspresējošu B šūnu klātbūtne audzējā rezultējas ar IgG kodējošu sekvenču iekļaušanos kDNS bibliotēkā un imunoskrīningā dod viltus pozitīvus signālus. Šīs problēmas risināšanai tiek izmantots preskrīnings (Chen et al. 2004).
- 3) Daļa no seruma antivielām, kas reaģē ar kDNS bibliotēku, ir autoantivielas, kurām ir maza vai vispār nekāda saistība ar audzēju. Šī problēma tiek risināta, izslēdzot IgM un lietojot serumu atšķaidījumā no 1:100 līdz 1:1000, lai fokusētos vienīgi uz augsta titra IgG (Chen et al. 2004).

Šobrīd eksistē liels skaits dažādu SEREX metodes modifikāciju, kuras var iedalīt sekojošās grupās (Chen et al. 2004):

- 1) Variācijas kDNS bibliotēkas avota izvēlē;
- 2) Variācijas vektoru sistēmas izvēlē;
- 3) Variācijas antivielu avota izvēlē;
- 4) SEREX kombinācijā ar citām metodēm, piemēram, fāgu displeja tehnoloģijām vai sērījveida gēnu ekspresijas analīzēm (SAGE).

## 2. MATERIĀLI UN METODES

### 2.1. Materiāli

#### 2.1.1 Reaktīvi un izejvielas

Ražotājs	Reaktīvi un izejvielas
Ambion Inc. (Applied Biosystems kopš 2006. gada)	DEPC-apstrādāts ūdens; RNALater RNS stabilizācijas šķīdums; amonija acetāts
AMRESCO, Lietuva Fermentas, Lietuva	Tris bāze (2-amino-2-hidroksimetil-propān-1,3-diols) 100bp Leader DNS garuma marķieris; 6x DNA Loading Dye Solution; IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozīds); pUC19/MspI DNS garuma marķieris; 10x Tango™ buferis; R buferis; Klenow buferis; TOPvision™ LE-GQ agaroze; garneļu sārmainā fosfatāze (SAP); <i>Hind</i> III restrikcijas endonukleāze; Klenow enzīms; <i>Not</i> I restrikcijas endonukleāze
Invitrogen, ASV	LB pulveris (LB BROTH BASE); TRIzol reaģents; etīdija bromīds (10mg/ml)
Jaunpagasts Plus, SIA, Latvija MERCK (EMD)	Etanols Borskābe; EDTA (etilēn-diamīn-tetraacetāts); hlороforms; karbenicilīns; T4 polinukleotīd kināze
Premier Brands Ltd., Lielbritānija SIGMA, ASV	Marvel beztauku piena pulveris Tween deterģents; Izopropanols; LiCl; MgCl <sub>2</sub> ; PEG-8000 (polietilēn glikols 8000);
STANLAB, Polija	NaCl

#### 2.1.2 Reaģentu un izejvielu komplekti

Ražotājs	Komplekts
Ambion Inc. (Applied Biosystems kopš 2006. gada)	DNA-free™ reaģentu komplekts
Applied Biosystems, ASV Fermentas, Lietuva GE Healthcare, Lielbritānija	BigDye Terminator cikliskās sekvenēšanas reaģentu komplekts PCR reaģentu komplekts illustra GFX, PCR, DNS un gēla attīrīšanas reaģentu komplekts
Invitrogen, ASV MBiotech, Dienvidkoreja MERCK (EMD)	Dynal mRNS attīrīšanas reaģentu komplekts SpinClean™ PCR attīrīšanas reaģentu komplekts Novagen® T7 Select klonēšanas reaģentu komplekts; Novagen® OrientExpress random praimeru kDNS sintēzes reaģentu komplekts; Novagen® DNS ligēšanas reaģentu komplekts; Novagen® T7 Select pakošanas reaģentu komplekts; Novagen® EcoR I / <i>Hind</i> III galu modificēšanas reaģentu komplekts
Stratagene (An Agilent Technologies company kopš 2007. gada)	Stratagene λ DNS attīrīšanas reaģentu komplekts

#### 2.1.3 Sintētiskie oligonukleotīdi

Nosaukums	Sekvence	Izcelsme
Strep praimeris	5'-ATTGCGGCCGCTTA-3'	METABION, Vācija
StrepII Tag-1	5'TTAAGCTTAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTC GAAAAATAAGCGGCCGCA3'	METABION, Vācija
StrepII Tag-2	5'TTAAGCTTTAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTC GAAAAATAAGCGGCCGCA3'	METABION, Vācija
StrepII Tag-3	5'TTAAGCTTTAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTT CGAAAAATAAGCGGCCGCA3'	METABION, Vācija
T7 Down praimeris	5'AACCCCTCAAGACCCGTTTA3'	METABION, Vācija
T7 Up2 praimeris	5'CTTCGCCAGAAGCTGCA3'	METABION, Vācija

#### 2.1.4 Buferšķīdumi

<b>Buferšķīdums</b>	<b>Sastāvs</b>
10x M9 sāļi	1) 420mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2) 240mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3) 90mM NaCl 4) 190mM NH <sub>4</sub> Cl
10x TBE buferis	1) 0,89M Tris bāze 2) 0,89M H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (pH 8,3) 3) 20mM EDTA
10x TBS buferis	1) 1,35M NaCl 2) 0,25M Tris bāze 3) 0,25M Tris-HCl (pH 7,4)
2,5x sekvenēšanas buferis	1) 200mM Tris bāze 2) 5mM MgCl <sub>2</sub>
Buferis TE	1) 10mM Tris-HCl (pH 7,5) 2) 1mM EDTA
Precipitācijas šķīdums	1) 10mM CH <sub>3</sub> COONa (pH 4,6-5,2) 2) 77% etanols

#### 2.1.5. Barotnes

<b>Barotne</b>	<b>Sastāvs</b>
LB barotne	1) 2% LB pulveris 2) 98% ūdens
LB Top agars	1) 2% LB pulveris 2) 0,6% agaroze 3) 97,4% ūdens

#### 2.1.6. Baktēriju celmi

<b>Nosaukums</b>	<b>Izcelsme</b>
Novagen <sup>®</sup> BLT-5615 Glycerol Stock	MERCK (EMD)

#### 2.1.7. Serumi un audu paraugi

Visi serumi un audzēju audu paraugi ņemti no Latvijas Onkoloģijas Centra, kur tie ievākti no pacientiem, kuri iepriekš informēti par pētījuma mērķiem, norisi un iespējamiem riskiem, kā arī devuši rakstisku akceptu. Operāciju laikā ievāktie audzēju audu paraugi nekavējoties ievietoti RNALater RNS stabilizācijas šķīdumā. Atļauju pētījumiem devusi LR Centrālā Medicīnas ētikas komisija.

### 2.1.8. Aparatūra un aprīkojums

<b>Apraksts</b>	<b>Modelis</b>	<b>Ražotājs</b>
Aukstuma bloks	PCR-cooler	Eppendorf, Vācija
Automātiskais sekvenātors	ABI PRISM 3100	Applied Biosystems, ASV
Centrifūga	5415D	Eppendorf, Vācija
DNS amplifikātors	GeneAmp <sup>®</sup> PCR System 9700	Applied Biosystems, ASV
Horizontālās elektroforēzes iekārta	GNA-100	Pharmacia, Zviedrija
Inkubators	INFORS AG CH-4103	Novatron, Inc.
Kelvinātors	MDF-U53V	SANYO Electric Co., Ltd.
Krafitājs	HOT-SHAKER	SCIERA
Laminārs	DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR	Biosan Laboratories, Inc.
Ledusskapis	R-130	Snaige
Līdzstrāvas barošanas bloks	PowerPac Basic	Bio-Rad, Inc.
Magnētiskais daļiņu koncentrātors	Dynal MPC-S	Invitrogen, USA
Magnētiskais maisītājs	MAGNETIC LABMIXER	LABOTEK, Latvija
Maisītājs	Vortex - Genie 2	Scientific Industries, ASV
Maisītājs	Bio -Vortex V1	Biosan Laboratories, Inc.
Mikroviļņu krāsns	M1712NR	Samsung, Dienvidkoreja
pH-metrs	pH 510	Oakton Instruments, ASV
Spektrofotometrs	NanoDrop <sup>®</sup> ND-1000	Thermo Scientific, ASV
Svari	PLS 360-3 (360+/-0,001g)	KERN, Vācija
Termobloks	TDB-120	Biosan Laboratories, Inc.
Termostats	LKB Bromma 2219	Pharmacia
UV transiluminators	UVT-20M/W	Herolab, Vācija

## 2.2. Metodes

### 2.2.1. Totālās RNS izdalīšana no izmantojot TRIzol<sup>™</sup> reaģentu

Darbu veic laminārā un izmantotos materiālus, kā arī darba vidi apstrādā ar RNāzes inaktivējošu šķīdumu, lai izvairītos no RNāžu kontaminācijām, kas varētu nelabvēlīgi ietekmēt izdalītās RNS kvalitāti. RNS izdalīšanai izmanto TRIzol<sup>™</sup> reaģentu, kas ļauj no audu homogenizāta izolēt RNS, DNS un proteīnus. Kuņģa vēža un normālo audu paraugu dezintegrāciju veic, ar skalpeli sasmalcinātus paraugus iesaldējot šķidrā slāpekļī un saberžot porcelāna pietā. Aptuveni 50% no katra audu homogenizāta izmanto totālās RNS izdalīšanai, bet atlikušo daudzumu iepakoj 1,5ml stobriņos un uzglabā kelvinatorā pie -80 °C. RNS izdalīšanu veic pa sekojošiem soļiem:

1. Audu homogenizātam pievieno TRIzol<sup>™</sup> reaģentu (1ml uz katriem 100µl audu homogenizāta), samaisa invertējot un inkubē piecas minūtes istabas temperatūrā.
2. Pievieno 200µl hloroforma, samaisa invertējot, inkubē 2 minūtes istabas temperatūrā

3. Centrifugē 15 minūtes pie 13,2 kRMP un 4 °C. Maisījums sadalās trīs fāzēs – augšējā ūdens fāzē (aptuveni 60% tilpuma), kas satur RNS, blīvā DNS fāzē un apakšējā proteīnus saturošā fāzē.
4. Pārviesto augšējo, RNS saturošo ūdens fāzi jaunā 1,5ml stobriņā, taču saglabā arī vidējo, DNS saturošo fāzi (pie 4 °C) turpmākai DNS izdalīšanai.
5. RNS fāzei pievieno 0,5ml izopropanola, kas ļauj precipitēt RNS, inkubē desmit minūtes istabas temperatūrā
6. Centrifugē desmit minūtes pie 13'200 RMP un 4 °C, uzmanīgi nolej supernatantu
7. Mazgā RNS ar 1ml 75% etanolu divas reizes:
  - RNS nogulsni suspendē 1ml etanola
  - Vorteksē
  - Centrifugē piecas minūtes pie 13'200 RMP un 4 °C
  - Nolej supernatantu
8. Centrifugē, atsūc atlikušo supernatantu, izžāvē nogulsni, turot stobriņu atvērtu līdz iztvaiko etanola pilieni
9. Šķīdina nogulsni 100µl nukleāžu brīvā ūdenī
10. Pievieno 5µl (1/20 no tilpuma) 20x DNāzes buferi un 8u (1µl·8u/µl) DNāzi, lai atbrīvotos no DNS piemaisījumiem. Vorteksē. Centrifugē 30 sekundes
11. Inkubē 20 minūtes pie 37°C
12. Pievieno 21µl (20% no tilpuma) DNāzes inaktivācijas reaģentu, maisa divas minūtes, centrifugē.
13. Nomēra RNS koncentrāciju, izmantojot NanoDrop® ND-1000 spektrofotometru (2.2.2.)
14. Uzglabā kelvinatorā pie -80 °C.

#### 2.2.2. Nukleīnskābju koncentrāciju mērīšana ar NanoDrop® ND-1000 spektrofotometru

Nukleīnskābju koncentrāciju mērīšanai lieto NanoDrop® ND-1000 spektrofotometru, kurš, izmantojot sakarību starp nukleīnskābes koncentrāciju un elektromagnētiskā starojuma absorbcijas intensitāti pie konkrēta viļņa garuma, ļauj noteikt attiecīgās nukleīnskābes koncentrāciju šķīdumā, tomēr ND-1000 iespējams izmantot arī proteīnu, fluorescentu tagu un šūnu kultūru kvantitatīvām analīzēm. Par nukleīnskābes tīrību var spriest pēc 260nm/280nm, kā arī 260nm/230nm absorbcijas intensitāšu attiecībām. Nukleīnskābju koncentrāciju mērīšana tiek veikta pa sekojošiem soļiem:

1. Notīra spektrofotometra augšējo un apakšējo mērīšanas pjedestālu ar ūdenī samitrinātu salveti, ar pipeti uznes 1µl ūdens uz apakšējā mērīšanas pjedestāla, nolaiž parauga roku un inicializē mērīšanu, lietojot NanoDrop programmatūru.
2. Lauciņā „Sample type” izvēlas DNS-50 vai RNS-40, atbilstoši mērāmajai nukleīnskābei. Uznes uz apakšējā pjedestāla buferi, kurā šķīdināta nukleīnskābe un ar komandu „blank” veic references mērījumu.
3. Uz apakšējā pjedestāla uznes mērāmo paraugu, nolaiž parauga roku un ar komandu „measure” veic koncentrācijas mērījumu un nolasa rezultātu. Pirms katra mērījuma ar salveti notīra augšējo un apakšējo mērīšanas pjedestālu.

### 2.2.3. RNS elektroforēze agarozes gēlā

RNS elektroforēzi veic īpaši tai paredzētā elektroforēzes vanniņā uz 1,5% agarozes gēla pa sekojošiem etapiem:

1. Pagatavo TBE bufera atšķaidījumu līdz 1x (DEPC ūdenī).
2. Pagatavo 1,5% agarozes šķīdumu 1x TBE buferī
  - Nosver 0,75g agarozes, pārvieto koniskajā kolbā, uzpilda līdz 50ml atzīmei ar 1x TBE buferi.
  - Maisījumu karsē mikroviļņu krāsnī, līdz tas kļūst homogēns.
3. Agarozes šķīdumam pievieno 0,5µl etīdija bromīda (10mg/ml), kas spēj saistīties pie RNS dubultspiralizētajiem rajoniem un ir fluorescenti detektējams. Šķīdumu atdzesē līdz aptuveni 60 °C un iepilda elektroforēzes kariatē tā, lai ķemmītes zari iespiestos aptuveni 2-3mm dziļi. Karieti atstāj nekustīgu, līdz agarozes šķīdums pāriet gēla stāvoklī.
4. Elektroforēzes vanniņu uzpilda ar 1x TBE bufera ar aprēķinu, lai tas nedaudz pārsegtu agarozes gēlu. No elektroforēzes karietes izņem ķemmīti un karieti ar gēlu ievieto elektroforēzes vanniņā.
5. Uz aukstuma bloka 2µl RNS koloīdam pievieno 2µl 2x elektroforēzes krāsas šķīduma (Loading Dye Solution). Denaturē 5 minūtes pie 68 °C uz termobloka.
6. Denaturētos RNS paraugus ienes bedrītēs uz agarozes gēla. Vanniņu pieslēdz pie līdzstrāvas barošanas bloka (100V) un atstāj uz aptuveni 40 minūtēm.
7. Agarozes gēlu izņem no elektroforēzes karietes un aplūko UV transiluminatorā. Skaidri izšķiramas rRNS joslas liecina par zemu RNS degradācijas līmeni, turpretī, ja joslas ir vāji saskatāmas vai arī to nav un RNS sadalījums ir difūzs, tas liecina par augstu RNS degradācijas līmeni un šāda RNS nav piemērota tālākai izmantošanai.



#### 2.2.4. Matricas RNS izdalīšana

Lai no kopējā RNS maisījuma selektīvi atdalītu nepieciešamo mRNS, tika izmantots Dynal mRNS attīrīšanas reaģentu komplekts. mRNS attīrīšana tika veikta sekojoši:

1. Sagatavo superparamagnētiskās (magnetīts ( $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{FeO}$ ) polistirēna čaulā) lodītes (Dynabeads oligo(dT)<sub>25</sub>), kas ir pārklātas ar mRNS poliadenīna 3' galu saistošu oligo(dT)<sub>25</sub> un spēj reaģēt uz ārēju magnētisko lauku:
  - Sakrata lodīšu suspensiju un paņem 400µl 1,5ml stobriņā un ievieto Dynal MPC-S magnētiskajā daļiņu koncentratorā. Ar pipeti atsūc šķidrumu.
  - Mazgā ar 200µl saistīšanas bufera (Binding buffer), izmantojot magnētisko statīvu.
  - Resuspendē lodītes 1 tilpumā saistīšanas bufera.
2. Apvieno RNS paraugu un sagatavoto lodīšu suspensiju. Maisa 5 minūtes istabas temperatūrā.
3. Pārviesto reakciju uz Dynal MPC-S. Nesaistītās RNS koloīdu pārnes jaunā stobriņā. Lodītes divas reizes mazgā ar skalošanas buferi (Washing buffer), izmantojot Dynal MPC-S.
4. Resuspendē lodītes 15µl 10mM Tris-HCl un karsē 2 minūtes uz termobloka pie 70 °C.
5. Reakciju pārviesto uz Dynal MPC-S. Savāc RNS saturošo Tris-HCl šķīdumu. Lodītes saglabā.
6. Lodītes apvieno ar nesaistītās RNS koloīdu un atkārti 3.-5. punktu.
7. Nomēra abu mRNS paraugu koncentrācijas, izmantojot NanoDrop® ND-1000 spektrofotometru (2.2.2.).

#### 2.2.5. Pirmās kDNS ķēdes reversa transkripcija uz mRNS bāzes

(Adaptēts pēc OrientExpress™ kDNS sintēzes reaģentu komplekta protokola)

1. Pagatavo reakcijas maisījumu ar kopējo tilpumu 20µl sterilā 1,5ml mikrocentrifūgas stobriņā:
  - 4µg mRNS
  - 1µg HindIII random praimeru (NNN'NNN'TT)
  - x µl nukleāžu brīva ūdens
2. Karsē 10 minūtes uz termobloka pie 70 °C, lai, denaturējot RNS sekundārās struktūras palielinātu praimeru saistīšanās efektivitāti.
3. Atdzesē uz aukstuma bloka.

4. Centrifugē, lai savāktu reakcijas maisījumu stobriņa apakšā.
5. Pievieno atlikušos pirmās ķēdes sintēzes reakcijas komponentus (kopējais tilpums – 50µl, ieskaitot MMLV reverso transkriptāzi, kas tiks pievienota 7. solī):
  - 10µl 5x pirmās ķēdes buferis
  - 5µl 100mM ditiotreitols (DTT)
  - 2,5µl metilēto dNTP maisījums
  - x µl nukleāžu brīvs ūdens.
6. Pipetējot samaisa reakcijas komponentus, 1 minūti silda pie 37 °C.
7. Pievieno 800U MMLV reversās transkriptāzes, sapipetē un inkubē 60 minūtes pie 37 °C.
8. Inaktivē MMLV reverso transkriptāzi, karsējot paraugu 10 minūtes pie 70 °C uz termobloka. Atdzesē uz aukstuma bloka un centrifugē, lai savāktu saturu stobriņa apakšā.
9. Turpina ar otrās kDNS ķēdes sintēzi (2.2.6.)

#### 2.2.6. Otrās kDNS ķēdes sintēze

(Adaptēts pēc OrientExpress™ kDNS sintēzes reaģentu komplekta protokola)

1. Otrās ķēdes sintēzi sāk papildinot 50µl pirmās ķēdes reakcijas maisījuma ar sekojošiem reaģentiem līdz 250µl tilpumam (uz aukstuma bloka):
  - 50µl 5x otrās ķēdes bufera
  - 6µl 100mM DTT
  - 2µl 10x metilēto dNTP maisījums
  - x µl nukleāžu brīva ūdens
  - 50U DNS polimerāze I
  - 1,6U RNāze H
2. Samaisa un inkubē 90 minūtes pie 15° C
3. Pievieno 250µl hloroforma, vorteksē 30 sekundes un centrifugē pie 12 kRMP vienu minūti..
4. Pārvieta ūdens fāzi jaunā stobriņā. Attīra kDNS ar illustra GFX, PCR, DNS un gēla attīrīšanas reaģentu komplektu (2.2.7.). kDNS eluē 25µl ūdens. Nomēra DNS koncentrāciju ar NanoDrop ND-1000 spektrofotometru (2.2.2.).

2.2.7. DNS attīrīšana ar illustra<sup>TM</sup> GFX, PCR, DNS un gēla attīrīšanas reaģentu komplektu  
(Adaptēts pēc illustra<sup>TM</sup> GFX, PCR, DNS un gēla attīrīšanas reaģentu komplekta protokola)

1. Vienam tilpumam DNS parauga pievieno piecus tilpumus saistības bufera (Capture buffer). Samaisa.
2. Ievieto GFX kolonnu savākšanas stobriņā.
3. Pārviesto saistības bufera – DNS parauga maisījumu GFX kolonnā.
4. Centrifugē 30 sekundes pie 13 kRMP.
5. Iztukšo savākšanas stobriņu.
6. Uz GFX kolonnas uznes 500µl skalošanas bufera (Wash buffer).
7. Centrifugē 30 sekundes pie 13 kRMP.
8. Savākšanas stobriņu iztukšo un atkārti 6.-7. soli.
9. GFX kolonnu pārvieto jaunā 1,5ml mikrocentrifūgas stobriņā. Savākšanas kolonnu izmet.
10. Uz GFX kolonnas uznes eluēšanai nepieciešamo daudzumu ūdens. Inkubē istabas temperatūrā vienu minūti.
11. Centrifugē vienu minūti pie 13 kRMP.

2.2.8. kDNS galu līdzināšana ar T4 DNS polimerāzi

(Adaptēts pēc OrientExpress<sup>TM</sup> kDNS sintēzes reaģentu komplekta protokola)

1. Pagatavo reakcijas maisījumu ar kopējo tilpumu 30µl:
  - 20µl dubultspiralizēta kDNS
  - 3µl 10x Flush buferis
  - 1,5µl 100mM DTT
  - 3µl 1mM dNTPs
  - 1,5U T4 DNS polimerāze
  - x µl nukleāžu brīvs ūdens
2. Samaisa un inkubē 20 minūtes pie 11 °C.
3. Pievieno 100µl ūdens un vienu tilpumu (130µl) hloroforma.
4. Vorteksē 30 sekundes un centrifugē pie 12 kRMP vienu minūti..
5. Pārnes augšējo fāzi jaunā stobriņā.
6. Attīra DNS ar illustra<sup>TM</sup> GFX PCR DNS un gēla attīrīšanas reaģentu komplektu (2.2.7) un eluē 12µl ūdens.

### 2.2.9. *EcoR* I/*Hind* III linkeru liģēšana

(Adaptēts pēc OrientExpress™ kDNS sintēzes reaģentu komplekta protokola)

1. Pagatavo sekojošu reakcijas maisījumu ar kopējo tilpumu 20µl (iekļaujot T4 DNS ligāzi, kas tiks pievienota 3. solī):
  - 10µl kDNS ar nolīdzinātiem galiem
  - 2µl 10x liģēšanas buferis
  - 2µl 1mM ATP
  - 2µl 100mM DTT
  - 2µl (100pmol) *EcoR* I / *Hind* III linkeru
  - 5U T4 polinukleotīdķināze
  - x µl nukleāžu brīvs ūdens
2. Inkubē 5 minūtes pie 37 °C.
3. Stobriņu pārvieto uz aukstuma bloka un pievieno 8U T4 DNS ligāzi. Inkubē 6-20h pie 16 °C.

### 2.2.10. kDNS restrikcija ar *EcoR* I un *Hind* III

(Adaptēts pēc OrientExpress™ kDNS sintēzes reaģentu komplekta protokola)

1. Inaktivē ligāzi, karsējot linkeru liģēšanas reakcijas (2.2.9.) stobriņu 10 minūtes pie 70 °C. Ļauj atdzist līdz istabas temperatūrai.
2. Pievieno sekojošus reaģentus līdz 100µl tilpumam:
  - 10µl 10x *Hind* III bufera
  - x µl nukleāžu brīvs ūdens
  - 100U *Hind* III restrikcijas endonukleāze
3. Inkubē 2h pie 37°C.
4. Pievieno sekojošus reaģentus:
  - 10µl *EcoR* I pielāgošanas buferis (*EcoR* I Adjustment Buffer)
  - 100U *EcoR* I restrikcijas endonukleāze
5. Inkubē 4h pie 37°C.
6. Veic DNS elektroforēzi (2.2.22.) uz 1,5% agarozes gēla. Izgriež no gēla zonu, kas satur 250-1000bp garu DNS. Attīra ar illustra™ GFX PCR DNS un gēla attīrīšanas reaģentu komplektu (2.2.7.) un eluē 50µl ūdens.
7. Pievieno sekojošu reaģentus:
  - 1µl glikogēna (10mg/ml)
  - 50µl 4M amonija acetāta

- 300µl 96% etanola
8. Atstāj uz nakti pie -70°C.

#### 2.2.11. T7Select10-3b vektora *Hind* III / *Not* I šķelšana

1. Šķeļ T7 bakteriofāga DNS pa *Hind* III un *Not* I restrikcijas saitēm. Pagatavo sekojošu reakcijas maisījumu ar kopējo tilpumu 20µl:

- 2µl T7Select10-3b DNS (10,5 µg/µl)
- 2µl 10x R buferis
- 1,2µl *Hind* III restrikcijas endonukleāze (10U/µl)
- 2µl *Not* I restrikcijas endonukleāze (10U/µl)
- 12,8µl ūdens

Inkubē 3h pie 37 °C.

2. Pievieno 1µl 1U/µl garneļu sārmaino fosfatāzi (SAP), kas katalizē 3' un 5' fosfātgrupu atbrīvošanu no DNS molekulas. Inkubē 30 minūtes pie 37 °C.
3. Karsē 15 minūtes uz termobloka pie 80 °C, lai inaktivētu SAP.
4. Pievieno 90µl ūdens un 100µl hlороформа, samaisa, centrifugē 15 minūtes pie 13,4 kRMP.
5. Pārnes augšējo fāzi jaunā stobriņā
6. Pievieno sekojošu reaģentus:
- 1µl glikogēna (10mg/ml)
  - 100µl 4M amonija acetāta
  - 500µl 96% etanola
7. Atstāj uz nakti pie -70 °C.

#### 2.2.12. StrepIITagu otrās ķēdes sintēze

1. Sagatavo reakcijas maisījumu:
- 1µl StrepIITag (100µmol/µl)
  - 1µl Strep praimeris (100µmol/µl)
  - 1µl 10x Klenow buferis
  - 0,5µl 2mM dNTPs
  - 6µl ūdens
2. Denaturē StrepIITagu 3 minūtes pie 95 °C.
3. Hibridizē praimerus 2 minūtes pie 50 °C.
4. Pievieno 0,5µl Klenow enzīma (10U/µl).

5. Replicē StrepIITagu 15 minūtes pie 37 °C
6. Pārvieta uz aukstuma bloka. Pievieno 100µl hloroforma un 90µl ūdens.
7. Vorteksē, centrifugē 5 minūtes pie 13,2 kRMP. Pārnes augšējo fāzi jaunā stobriņā.
8. Pievieno sekojošu reaģentus:
  - 1µl glikogēna (10mg/ml)
  - 100µl 4M amonija acetāta
  - 500µl 96% etanola
9. Atstāj uz nakti precipitēties pie -70 °C.
10. Centrifugē 15 minūtes pie 13,2 kRMP.
11. Nolej supernatantu. DNS nogulsni skalo ar 70% etanolu:
  - 1) Nogulsni suspendē 500µl 70% etanola
  - 2) Centrifugē 5 minūtes pie 13,2 kRMP
  - 3) Nolej supernatantu
12. Veic atkārtotu DNS skalošanu. Atsūc supernatantu un izžāvē nogulsni, stobriņu turot atvērtu.
13. Šķīdina nogulsni 17µl ūdens.

#### 2.2.13. StrepIITagu liģēšana

1. Pagatavo sekojošu reakcijas maisījumu ar kopējo tilpumu 25µl:
  - 17µl StrepIITag
  - 2,5µl 10x liģēšanas bufera
  - 2,5µl 1mM ATP
  - 2,5µl 100mM DTT
  - 0,5µl 10U/µl polinukleotīdkināze
2. Silda 15 minūtes pie 37 °C.
3. Pievieno 0,5µl T4 DNS ligāzi (4U/µl).
4. Liģē 1-2h istabas temperatūrā.
5. Attīra ar SpinClean PCR attīrīšanas reaģentu komplektu (2.2.14.). Eluē 25µl TE buferī. Nomēra DNS koncentrāciju ar NanoDrop ND-1000 spektrofotometru (2.2.2.).

#### 2.2.14. Attīrīšana ar SpinClean™ PCR attīrīšanas reaģentu komplektu

(Adaptēts pēc SpinClean™ PCR Purification Kit User Manual)

1. PCR produkta sagatavošana
  - PCR produktam pievieno 5 tilpumus PCR attīrīšanas bufera (PCR Purification buffer), samaisa.
2. DNS imobilizēšana
  - SpinClean™ kolonnu ievieto savākšanas stobriņā.
  - Pārnes sagatavotu PCR produktu SpinClean™ kolonnā
  - Centrifugē 1 minūti pie 13,2 kRMP, iztukšo savākšanas stobriņu.
3. DNS skalošana
  - SpinClean™ kolonnā ienes 750µl kolonnas skalošanas bufera ar etanola piedevu
  - Centrifugē 1 minūti pie 13,2 kRMP, iztukšo savākšanas stobriņu
  - Atkārtoti centrifugē 1 minūti pie 13,2 kRMP
4. DNS eluēšana
  - Pārvieto SpinClean™ kolonnu jaunā 1,5ml mikrocentrifūgas stobriņā
  - SpinClean™ kolonnā ienes 30-50µl eluēšanas bufera vai nukleāžu brīva ūdens. Inkubē 1 minūti istabas temperatūrā.
  - Centrifugē 1 minūti pie 13,2 kRMP.
  - SpinClean™ kolonnu izmet. DNS uzglabā pie -20 °C vai zemākā temperatūrā.

#### 2.2.15. StrepIITagu restrikcija ar *HindIII* un *NotI* restriktāzēm

1. Sagatavo reakcijas maisījumu ar kopējo tilpumu 30µl:
  - 25µl StrepIITag (self-ligated)
  - 3µl 10x R bufera
  - 1µl *HindIII* restriktāze (2U/µl)
  - 1µl *NotI* restriktāze (2U/µl)
2. Inkubē 1h pie 37°C, pārnes 15µl reakcijas maisījuma jaunā stobriņā un uzglabā pie 4°C (lai izvairītos no iespējamās nespecifiskas restrikcijas sekām), atlikušo reakcijas maisījumu turpina inkubēt pie 37°C vēl 1h. Abus reakcijas maisījumus apvieno.
3. Reakcijas maisījumam pievieno 70µl ūdens un 100µl hloroforma, samaisa, centrifugē 15 minūtes pie 13,2 kRMP. Pārnes augšējo fāzi jaunā stobriņā.
4. Pievieno sekojošus reaģentus:
  - 100µl 4M amonija acetāta

- 1µl glikogēna (10mg/ml)
  - 500µl 96% etanola
5. Precipitē 2h pie -70°C.

#### 2.2.16. Vektora un StrepIITagu sagatavošana liģēšanai

1. Vektoru (2.2.11) un StrepIITagus (2.2.15) centrifugē 20 minūtes pie 4°C un 13,2 kRMP, supernatantu nolej. Nogulsnes mazgā divas reizes 75% etanolā, izžāvē, turot stobriņu atvērtu.
2. Šķīdina nogulsnes ūdenī:
  - Vektoru – 3µl ūdens (1,5µl uz katru liģēšanas reakciju)
  - StrepIITagus – 5µl ūdens. Nomēra koncentrāciju ar NanoDrop® ND-1000 spektrofotometru (2.2.2.). Atšķaida ar ūdeni līdz 5ng/µl koncentrācijai.

#### 2.2.17. Vektora un StrepIITagu liģēšana

1. Sagatavo reakcijas maisījumu:
  - 0,5µl 10x liģēšanas buferis
  - 0,5µl 10mM ATP
  - 0,5µl 100mM DTT
  - 1µl 4U/µl T4 DNS ligāze
  - 1,5µl šķelts vektors
  - 1µl StrepIITag (5ng/µl)
2. Samaisa pipetējot un inkubē 14h pie 16°C
3. Uzglabā pie 4°C

#### 2.2.18. Rekombinanto T7 fāgu pakošana

1. Uz ledus bloka atkausē T7 pakošanas ekstraktu (T7Select® Packaging Extract)
2. 25µl T7 pakošanas ekstrakta tilpumam (25µl pakojums var tikt sadalīts mazākos reakcijas tilpumos, šādā gadījumā jālieto arī proporcionāli mazāki pārējo reaģentu tilpumi) pievieno 5µl liģēšanas reakcijas vai 0,5µg kontroles DNS. Maisa pipetējot (nevorteksēt!).
3. Inkubē reakciju istabas temperatūrā (22 °C) 2 stundas.



- Pārtrauc reakciju, pievienojot 270µl sterila LB. Ja reakciju paredzēts uzglabāt ilgāk par 24h, pievieno 20µl hloroforma un samaisa invertējot. Uzglabā pie 4 °C līdz 1 nedēļai bez būtiskiem titra zudumiem.

### 2.2.19. Rekombinanto fāgu titrēšana

- Sagatavo *E.coli* šūnas titrēšanai. Laminārā pagatavo sekojošu maisījumu:

- 10ml LB barotne
- 1ml 10x M9 sāļi
- 100µl 40% glikoze
- 10µl 1M MgSO<sub>4</sub>
- 10µl karbemicīna (100µg/ml)
- 100µl *E.coli* BLT-5615 naktskultūras

Inkubē 90-120 minūtes kratītājā (160RMP) pie 37 °C. Pievieno 1/1000 tilpuma IPTG. Turpina inkubāciju vēl 30 minūtes. Uzglabā pie 4 °C līdz 48 stundām.

- Izkausē LB TOP agaru, iepilda stobriņos (materiālu daudzumi doti 1. tabulā) un ievieto termostatā pie 50 °C.

1. tabula.

Izejvielu daudzumi atkarībā no izmantotajām platītēm

Table 1

*Amounts of ingredients depending of used plates*

Platīte	Top agars	BLT-5615 kultūra (OD <sub>600</sub> ≈1.0)	Karbemicīns, 100µg/ml	IPTG, 1M
60mm	1,5 ml	100 µl	1,5 µl	1,5 µl
100mm	3,0 ml	250 µl	3,0 µl	3,0 µl
150mm	10,0 ml	800 µl	10,0 µl	10,0 µl
10x10cm	5,0 ml	450 µl	5,0 µl	5,0 µl

- Pagatavo fāgu atšķaidījumu sēriju fāgu ekstrakcijas buferī (1/10<sup>0</sup>-1/10<sup>4</sup> – rekombinantam fāgam un līdz 1/10<sup>5</sup>, ja izmantota T7 pakošanas kontroles DNS (T7Select® Packaging Control DNA).
- 1µl no katra atšķaidījuma pievieno *E.coli* BLT-5615 kultūrai, maisījumu pievieno pie izkausētā LB TOP agara. Pievieno karbomicīnu un IPTG, invertē, uzlej uz sasildītas platītes ar LB TOP agaru un atstāj līdz sacietē. Inkubē termostatā pie 37 °C 1-1,5h līdz skaidri saskatāmi plaki.
- Saskaita plakus un aprēķina bibliotēkas titru pēc formulas:  $n_0 = n \cdot x \cdot V_0$ , kur  $n_0$  – bibliotēkas kopējais apjoms,  $n$  – plaku skaits uz platītes,  $x$  – atšķaidījuma reižu skaits,  $V_0$  – bibliotēkas kopējais tilpums (µl).

### 2.2.20. Fāgu izolēšana

1. Izmantojot pipeti, no Petri plates izolē atsevišķus plakus.
2. Katru plaku suspendē 100µl fāgu ekstrakcijas bufera. Vorteksē. Centrifugē, lai savāktu suspensiju stobriņa apakšā.
3. Uzglabā pie 4°C.

### 2.2.21. Polimerāzes ķēdes reakcija

PCR jeb polimerāzes ķēdes reakcija ir *in vitro* DNS amplificēšanas metode, kas balstās uz DNS polimerāzes darbību. PCR reakcijā parasti tiek lietota termoizturīga DNS polimerāze, piemēram, *Taq* polimerāze, kas izolēta no termoizturīgas *Thermus aquaticus* baktērijas, ļaujot automatizēt PCR reakciju, jo pēc katra cikla vairs nav jāpievieno jauna DNS polimerāze. Tā kā DNS polimerāze nespēj sintezēt jaunu DNS ķēdi, bet tikai pagarināt esošo, PCR reakcijā tiek izmantoti DNS praimeru – īsi oligonukleotīdi, kas ir komplementāri kādam amplificējamās DNS reģionam. PCR veic sekojoši:

1. Sagatavo PCR reakcijas maisījumu ar kopējo tilpumu 20µl (uz aukstuma bloka):
  - 2µl 10x PCR bufera
  - 2µl 25mM MgCl<sub>2</sub>
  - 2µl 2mM dNTPs
  - 11,85µl. ūdens
  - 0,15µl 5U/µl Taq DNS polimerāze
  - 0,5µl 10pmol/l T7 Up2 praimera
  - 0,5µl 10pmol/l T7 Down praimera
  - 1µl T7 fāga suspensijas
2. Amplificē DNS, veicot PCR sekojošos apstākļos:

	Temperatūra	Ilgums	
Sākotnējā DNS denaturācija	94°C	4 min	
DNS denaturācija	94°C	30 s	
Praimeru hibridizācija	50°C	30 s	35 cikli
DNS sintēze	72°C	45 s	
Noslēdzošā fāze	72°C	10 min	
Uzglabāšana	4°C	∞	

3. Veic PCR produkta attīrīšanu ar SpinClean™ PCR attīrīšanas reaģentu komplektu (2.2.14) un nomēra koncentrāciju ar NanoDrop® ND-1000 spektrofotometru (2.2.2.).

### 2.2.22. DNS elektroforēze agarozes gēlā

Lai raksturotu DNS garumu, tīrības pakāpi vai arī izdalītu noteikta garuma DNS frakciju, veic elektroforēzi, kura balstās uz DNS molekulas spēju pārvietoties elektriskajā laukā. Lai ierobežotu molekulas kustību atkarībā no tās izmēra, izmanto nesējus. DNS elektroforēzi visbiežāk veic 0,6-2,0% agarozes gēlā. Tā kā, palielinot agarozes koncentrāciju,

Agarozes gēla koncentrācijas izvēle atkarībā no analizējamās DNS garuma

2.tabula

Table 2

*Concentrations of the agarose gel depending of analysable DNA's length*

DNS garums, kb	0,1-3,0	0,2-4,0	0,4-6,0	0,5-7,0	0,8-10	1,0-20
Agarozes, %	2,0	1,5	1,2	0,9	0,7	0,6

samazinās poru izmērs agarozes gēlā, gēla koncentrāciju izvēlas atbilstoši analizējamās DNS koncentrācijai (2. tabula).

Ja DNS garums ir mazāks par 0,1kb, kā nesēju izmanto poliakrilamīda gēlu, savukārt, ja DNS garums pārsniedz 20kb, izmanto pulsējošā lauka elektroforēzi mainīga virziena elektriskajā laukā (īpašas markas agarozes gēlā), jo DNS fragmenti, kas pārsniedz 23kb, nemainīga virziena elektriskajā laukā kustas ar vienādu ātrumu, savukārt pulsējošā laukā, pateicoties DNS molekulas orientācijas maiņai, iespējams analizēt līdz pat 10Mb garus DNS fragmentus. DNS elektroforēzi veic sekojoši:

1. Pagatavo nepieciešamās koncentrācijas agarozes šķīdumu atbilstoši analizējamās DNS prognozējamajam garumam (2. tabula).
  - Nosver nepieciešamo daudzumu agarozes, izšķīdina 0,5x TBE buferī, karsējot mikroviļņu krāsnī.
  - Pievieno 10mg/ml etīdija bromīdu (1µl uz 100ml agarozes gēla), kas spēj saistīties pie dubultspiralizētas DNS un ir fluorescenti detektējams.
2. Šķīdumu atdzesē līdz aptuveni 60 °C un iepilda elektroforēzes kariatē tā, lai ķemmītes zari iespiestos aptuveni 2-3mm dziļi gēlā. Karieti atstāj nekustīgu, līdz agarozes šķīdums pāriet gēla stāvoklī.
3. Elektroforēzes vanniņu uzpilda ar 0,5x TBE bufera ar aprēķinu, lai tas nedaudz pārsegtu agarozes gēlu. No elektroforēzes kariatē izņem ķemmīti un karieti ar gēlu ievieto elektroforēzes vanniņā.
4. Sagatavo DNS paraugus uznešanai uz gēla.
  - 2µl DNS suspensijai pievieno 1µl 2x uznešanas krāsas šķīduma (Loading Dye Solution).
5. DNS paraugus ienes bedrītēs uz agarozes gēla. Vanniņu pieslēdz pie līdzstrāvas barošanas bloka (100V) un atstāj uz aptuveni 40 minūtēm (atkarībā no DNS garuma)..
6. Agarozes gēlu izņem no elektroforēzes kariatē un aplūko UV transiluminatorā.

### 2.2.23. Krāsas-terminatora DNS sekvenēšana

Krāsas-terminatora sekvenēšana ir klasiskās Sangeras jeb ķēdes-terminācijas metodes modifikācija, kas, pateicoties ar augstas jutības pie atšķirīgiem viļņa garumiem fluorescentām krāsvielām iezīmētiem terminējošiem didezoksiribonukleotīdiem, ļauj veikt visu četru nukleotīdu sekvenēšanu vienā reakcijā. Sekvenēšanas reakcijai izmanto jau gatavu BigDye® maisījumu, kas satur fluorescenti iezīmētus terminējošos ddNTPs, dNTPs un termiski izturīgu AmpliTaq® DNS polimerāzi. Sekvenēšanu veic pēc sekojošas shēmas:

1. Ar PCR attīrīšanas reaģentu komplektu attīrītai DNS (2.2.14.) nomēra koncentrāciju (2.2.2.). DNS daudzumu sekvenēšanas reakcijai izvēlas atkarībā no sekvenējamās DNS garuma (3. tabula), ko nosaka, veicot DNS elektroforēzi (2.2.22.).

3. tabula

DNS daudzuma izvēle sekvenēšanai

Table 3

*Selection of DNA quantity for sequencing*

DNS garums, bp	100-200	200-500	500-1000	1000-2000	>2000	pDNS
DNS sekvenēšanai, ng	1-3	3-10	5-20	10-40	40-100	200-500

2. Sagatavo reakcijas maisījumu ar kopējo tilpumu 10µl (uz aukstuma bloka):

- x µl DNS paraugs
- y µl ūdens
- 3µl 2,5x sekvenēšanas buferis
- 1µl 2,5pmol/µl T7 Up2 (vai 2,5pmol/µl T7 Down) praimeris
- 1µl BigDye®

3. Amplificē DNS, veicot PCR sekojošos apstākļos:

	Temperatūra	Ilgums	
Sākotnējā DNS denaturācija	94°C	3 min	
DNS denaturācija	94°C	30 s	
Praimeru hibridizācija	57°C	15 s	25 cikli
DNS sintēze	60°C	4 min	
Noslēdzošā fāze	60°C	10 min	
Uzglabāšana	4°C	∞	

4. Veic sekvenēšanas reakcijas attīrīšanu:

- 10µl sekvenēšanas reakcijas maisījumam pievieno 130µl precipitācijas šķīduma, pārnes 1,5ml stobriņā, savorteksē.
- Precipitē DNS 15 minūtes pie 4°C.
- Centrifugē 10 minūtes pie 13,2 kRMP 4°C temperatūrā, aizvāc supernatantu.

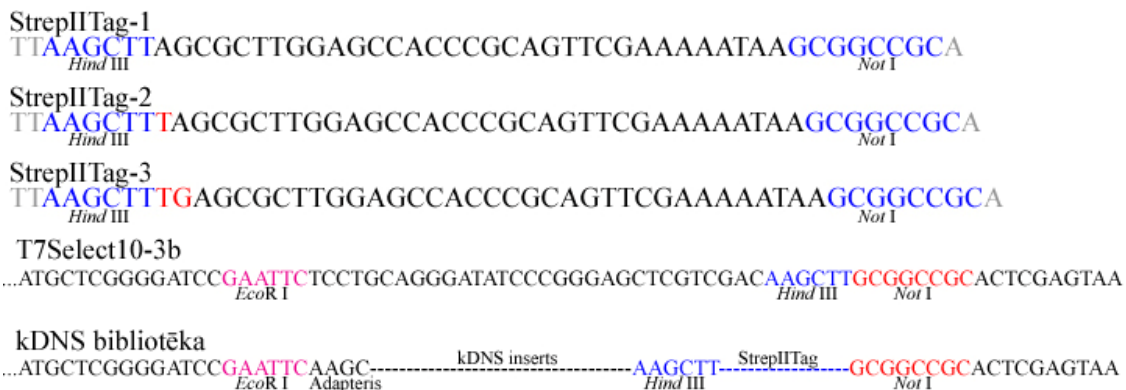
- Pievieno 1ml 70-75% etanolu, invertē, centrifugē 5 minūtes pie 13,2 kRMP istabas temperatūrā, aizvāc supernatantu.
- Atkārti iepriekšējo darbību.
- Centrifugē, lai savāktu atlikušo supernatantu stobriņa apakšā, aizvāc to ar mikropipeti.
- Stobriņus žāvē atvērtā veidā, līdz tie pilnībā izžuvuši.

5. Veic kapilāro elektroforēzi un sekvenču nolasīšanu ar ABI Prism Genetic Analyzer 3100.

#### 2.2.24. Sekvenču analīze

DNS sekvenču analīzei izmanto Contig Express datorprogrammu. Analizējot hromatogrammu, pārbauda::

- Vai StrepII Tag oligonukleotīds korekti ieliģējies T7select10-3b vektorā pa *Hind* III (AAGCTT) un *Not* I (GCGGCCGC) restrikcijas saitēm (7. attēls).
- Vai kDNS inserts korekti ieliģējies StepII Tag – T7 vektorā pa *Eco*R I (GAATTC) un *Hind* III saitēm (7. attēls). Aiz *Eco*R I saita jāseko adapterim ((TC)AAGC)



7. attēls. StrepII Tag oligonukleotīdu, T7Select10-3b vektora un kDNS bibliotēkas sekvenču

*Figure 7. Sequences of StrepII Tag oligonucleotides, T7Select10-3b vector and cDNA library*

#### 2.2.25. Fāgu amplifikācija (šķidrā lizāta metode)

1. Sagatavo *E.coli* šūnas fāgu amplifikācijai: Gaisa plūsmas laminārā pagatavo sekojošu maisījumu

- 10ml LB barotne
- 1ml 10x M9 sāļi
- 100µl 40% glikoze
- 10µl 1M MgSO<sub>4</sub>
- 10µl karbomicīna (100µg/ml)
- 100µl *E.coli* BLT-5615 kultūras

Inkubē 2,5h kratītājā (160RMP) pie 37 °C. Pievieno 1/1000 tilpuma 1M IPTG.

Turpina inkubāciju vēl 30 minūtes. Uzglabā pie 4 °C līdz 48 stundām

2. Inficē šūnas ar 20µl fāga suspensijas ( $5 \cdot 10^6$  pfu/µl), inkubē 1-1,5h, līdz šūnas tiek lizētas.
3. Centrifugē 5 minūtes pie 15 kRMP, supernatantu pārnes jaunā stobriņā.
4. Pievieno ¼ tilp. 20% PEG-8000 / 2,5M NaCl.
5. Samaisa invertējot (100x).
6. Atstāj uz nakti precipitēties (pie 4°C).
7. Izolē DNS ar Stratagene λ DNS attīrīšanas reaģentu komplektu (2.2.26.).

#### 2.2.26. T7 fāga DNS izolēšana ar Stratagene λ DNS attīrīšanas reaģentu komplektu

1. Centrifugē amplificēto fāgu (2.2.25.) 30 minūtes pie maksimālas jaudas (4°C).
2. Aizvāc supernatantu.
3. Resuspendē nogulsni 3ml PEB, vorteksējot 10-20 sekundes.
4. Centrifugē 10 minūtes pie maksimālas jaudas, pārnes supernatantu jaunā stobriņā.
5. 1ml supernatanta pievieno:
  - 1µl DNase I (20mg/ml)
  - 4µl RNase A (2mg/ml)
6. Inkubē 15 minūtes istabas temperatūrā.
7. Centrifugē 5 minūtes pie 14 kRMP (istabas temperatūrā), pārnes supernatantu jaunā stobriņā.
8. Pievieno 500µl 80% DEAE celulozi un inkubē 10 minūtes istabas temperatūrā, ik pa 2 minūtēm maisot.
9. Centrifugē 1 minūti istabas temperatūrā, pārnes supernatantu jaunā stobriņā.
10. Pievieno 40µl 0,5M EDTA.
11. Pievieno 15,4µl pronāzi (50mg/ml).
12. Inkubē 15 minūtes pie 37°C.
13. Pievieno 30µl 5% CTAB.
14. Inkubē 3 minūtes pie 65°C.
15. Dzesē 5 minūtes uz aukstuma bloka.
16. Centrifugē 10 minūtes pie 14 kRMP, aizvāc supernatantu.
17. Resuspendē nogulsni 200µl 1,2M NaCl (nevorteksēt).
18. Pievieno 500µl 97% etanola un samaisa invertējot.
19. Centrifugē 10 minūtes pie 14 kRMP istabas temperatūrā, aizvāc supernatantu.
20. Mazgā nogulsni 70% etanolā (divas reizes).
21. Izžāvē nogulsni un resuspendē 30µl TE buferī.

22. Inkubē 10 minūtes pie 37°C.
23. Centrifugē, pārnes supernatantu jaunā stobriņā.
24. Nomēra DNS koncentrāciju ar NanoDrop® ND-1000 spektrofotometru (2.2.2.).

#### 2.2.27. T7 StrepIIITag-vektoru restrikcija ar *Hind*III un *Eco*RI

1. Atsevišķos stobriņos pagatavo reakcijas maisījumus katram StrepIIITag-vektoram ar tilpumu 30µl:
  - 2µg T7 StrepIIITag-vektora
  - 6µl 2x Tango bufera
  - 0,7µl 10U/µl *Eco*R I restriktāze
  - 1µl 10U/µl *Hind* III restriktāze
  - 2,5µl ūdens
2. Atstāj uz nakti pie 37°C
3. Pievieno 2U garneļu sārmaino fosfatāzi, inkubē 30 minūtes pie 37°C, inaktivē 10 minūtes pie 70°C
4. Pievieno 70µl ūdens
5. Hloroformē
6. Pievieno 20µl 4M LiCl un 300µl 70% etanola
7. Skalo ar 70% etanolu (2 reizes)
8. Suspendē 5µl TE bufera.

#### 2.2.28. StrepIIITag-vektoru un kDNS ligēšana

1. Sterilā 0,5ml stobriņā sagatavo ligēšanas reakcijas maisījumu ar kopējo tilpumu 5µl (katram StrepIIITag-vektoram atsevišķi):
  - 200ng kDNS
  - 0,5µg StrepIIITag-vektors
  - 0,5µl ligāzes buferis
  - 0,5µl 10mM ATP
  - 0,5µl 100mM DTT
  - 0,4-0,6U T4 DNS ligāze
2. Samaisa pipetējot un inkubē 3-16h pie 16°C
3. Uzglabā pie 4°C, pako (2.2.18.), titrē (2.2.19.)

#### 2.2.29. kDNS bibliotēkas amplificēšana (plašu lizāta metode)

1. Sagatavo *E.coli* šūnas kDNS bibliotēkas amplificēšanai: Gaisa plūsmas laminārā pagatavo sekojošu maisījumu

- 10ml LB barotne
- 1ml 10x M9 sāļi
- 100µl 40% glikoze
- 10µl 1M MgSO<sub>4</sub>
- 10µl karbomicīna (100µg/ml)
- 100µl *E.coli* BLT-5615 naktskultūras

Inkubē 2h kratītājā (160RMP) pie 37 °C. Pievieno 1/1000 tilpuma IPTG. Turpina inkubāciju vēl 30 minūtes. Uzglabā pie 4 °C līdz 48 stundām

2. Izkausē LB TOP agaru, iepilda stobriņos (7ml uz 150mm platīti) un ievieto termostatā pie 50 °C.
3. 700µl *E.coli* šūnām pievieno līdz  $1 \cdot 10^5$  pfu kDNS bibliotēkas. Maisījumu pievieno 7ml izkausētajam LB TOP agaram, pievieno 7µl IPTG un 7µl karbomicīna. Samaisa invertējot, tā saturu uzlej uz 150mm LB TOP agara platītes, atstāj līdz sacietē, tad pārvieto termostatā pie 37°C uz 1,5h.
4. Eluē fāgus, uznesot uz katras platītes 8ml fāgu ekstrakcijas bufera un atstājot uz nakti kratītājā pie 4°C.
5. Ar pipeti savāc no platītēm eluātu sterilā stobriņā, pievieno 0,5ml hloroforma un samaisa invertējot. Centrifugē 5 minūtes pie 3000xg un pārnēs supernatantu sterilā stobriņā.
6. Nosaka bibliotēkas titru, veicot titrēšanu (2.2.19.).
7. Amplificēta bibliotēka var tikt uzglabāta vairākus mēnešus pie 4°C bez titra zudumiem. Ilgstošai bibliotēkas uzglabāšanai (pie -70°C) jāpievieno 0,1 tilpums 80% glicerīna

### 2.2.30. Fāgu PEG attīrīšana.

Lai attīrītu un sakoncentrētu fāgus, sekojoši tiek veikta fāgu precipitācija ar PEG-8000:

1. 30ml fāgu suspensijai pievieno 7,5 ml 20% PEG-8000 / 2,5M NaCl (50ml stobriņā).
2. Samaisa invertējot (100x) un inkubē vismaz 4h pie 4°C.
3. Centrifugē 30 minūtes pie vismaz 5,5kRMP, aizvāc supernatantu.
4. Atkārtoti centrifugē 1 minūti un aizvāc atlikušo supernatantu.
5. Resuspendē nogulsni 900µl fāgu ekstrakcijas bufera.
6. Centrifugē 10 minūtes pie 14kRMP, pārnēs supernatantu jaunā stobriņā.
7. Pievieno 100µl glicerīna un uzglabā pie -70°C.

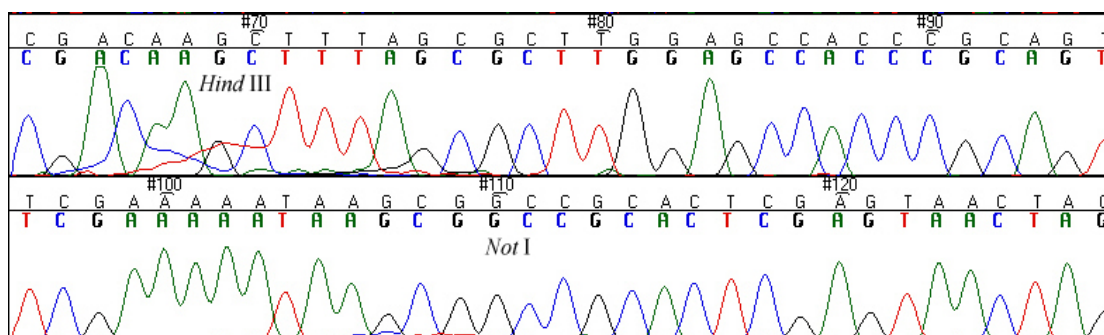


### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 1. StrepII Tag saturošu T7 fāga displeja vektoru konstruēšana

Mūsu laboratorijā pašlaik tiek veikts pētījums, kura mērķis ir identificēt reprezentatīvu skaitu melanomas un kuņģa vēžu antigēnu, izgatavot antigēnu mikročipu, ar tā palīdzību noteikt autoantivielu repertuāru vēža pacientu un veselu cilvēkā serumā, un novērtēt iespējas izstrādāt uz autoantivielu noteikšanu balstītu neinvazīvu diagnostikas testu. Šajā darbā antigēnu identificēšanai tiek izmantota uz T7 fāgu displeju balstīta SEREX metodika. Šai metodei ir virkne priekšrocību, salīdzinot ar klasisko SEREX. Izmantojot fāgu displeja kDNS bibliotēkas, rekombinantie proteīni tiek ekspresēti kā hibrīdie proteīni ar fāga virsmas proteīnu 10B un eksponēti uz fāgu daļiņu virsmas, kas dod iespēju bagātināt fāgu bibliotēku ar kloniem, kas ekspresē antigēnus pret kuriem serumā ir antivielas procesā, ko sauc par *biopanning*. Tas aizvieto laika un darba-ietilpīgo imunoskrīningu klasiskajā SEREX metodikā, kā rezultātā šī metode ir ievērojami ātrāka, kā arī dod iespēju vienlaikus analizēt vairākas kDNS bibliotēkas. Taču identificēto antigēnu sekvenču analīze parādīja, ka tikai ~10% gadījumu uz fāga virsmas tiek eksponēti pareizajā (dabiskajā) fāzē translēti proteīni, bet pārējos gadījumos tiek ekspresēti peptīdi, kas iegūti translējot genomiskās DNS fragmentus, mRNS 5' vai 3' UTR vai kDNS fragmentus alternatīvā translācijas fāzē. Visticamāk, šie nedabiskie peptīdi ir strukturāli līdzīgi citu antigēnu epitopiem (mimotopi), taču nav zināms kuru reālo antigēnu mimotopi tie ir – tie var būt audzēju antigēnu mimotopi un līdz ar to noderīgi biomarkēri, bet tie var būt arī ar audzējiem nesaistītu antigēnu vai infekciozu aģentu mimotopi (Kalniņa et al, 2008). Līdzīgu metodiku antigēnu identificēšanai ir izmantojuši arī Chatrejee et al. (2006), un arī viņu iegūtie rezultāti ir līdzīgi. Tādēļ mūsu laboratorijā tika iesākts darbs pie jaunu T7 fāga displeja vektoru konstruēšanas, kas dotu iespēju bagātināt kDNS bibliotēkas ar fāgiem, kas ekspresē pareizajā fāzē translētus proteīnus. Lai to panāktu, T7 fāga displeja vektorā 3'virzienā no kDNS insercijas vietas tika insertēts Strep II Tag – 8 aa sekvenca, kas strukturāli atgādina biotīnu un ar tādu pašu afinitāti kā biotīns saistās ar streptavidīnu. Strep II Tag tiek eksponēts uz fāga virsmas tikai tad, ja insertētā kDNS nesatur Stop kodonu. Tas dod iespēju, izmantojot ar streptavidīnu pārklātas paramagnētiskās lodītes, no fāgu bibliotēkas izolēt tos klonus, kas ekspresē Strep II Tag un līdz ar to, visticamāk, arī pareizā fāzē translētu kDNS. I. Meistera savā maģistra darbā parādīja, ka šāda pieeja principā ir iespējama un, ka Strep II Tag netraucē fāga daļiņas savākšanos, neietekmē pfu skaitu plakā un rekombinanto proteīnu kopiju skaitu.

Viens no šī darba galvenajiem uzdevumiem ir uzkonstruēt divus StrepII Tag saturošus T7 fāga displeja vektorus, kuros Strep II Tag translācijas fāze ir nobīdīta par vienu vai par diviem nukleotīdiem attiecībā pret insertēto kDNS. Tas nepieciešams, lai palielinātu identificējamo antigēnu klāstu, jo, liģējot identisku kDNS molekulu trīs dažādos Strep II Tag saturošos vektorus, kur Strep II Tag translācijas fāze atšķiras par vienu nukleotīdu, vismaz vienā gadījumā kDNS inserta un Strep II Tag translācijas fāzes sakrītīs. Vektoru konstruēšanai tika izmantots T7Select10-3b vektors, kā arī Strep II Tag-2 un Strep II Tag-3 oligonukleotīdi (7. attēls). Strep II Tagi tika liģēti vektorā pa *Hind* III un *Not* I restrikcijas saitēm un pakoti, izmantojot T7 pakošanas ekstraktu, rezultātā iegūstot  $23 \times 10^3$  pfu Strep II Tag-2 saturošus un  $9 \cdot 10^3$  pfu Strep II Tag-3 saturošus T7 fāgus. Lai atlasītu tos fāgu klonus, kuros ieklonēti Strep II Tag, tika izolēti ~90 atsevišķi plaki un to polilinkera rajoni amplificēti, izmantojot PCR ar praimeriem, kas atrodas abpus klonēšanas saitēm. Veicot PCR produktu elektroforēzi, iegūtie rezultāti liecināja, ka insertus satur vienīgi 7% vektoru, kuros liģēts StrepII Tag-2 un 8% vektoru, kuros liģēts StrepII Tag-3. No vektoriem ar korekti ieliģētu StrepII Tag tika izvēlēts viens StrepII Tag-2 (8. attēls) un viens StrepII Tag-3 vektors, kā arī ņemts jau iepriekš sagatavots StrepII Tag-1 vektors, kuri tālāk tika amplificēti, izmantojot šķidrā lizāta metodi un attīrīti ar Stratagene  $\lambda$  DNS attīrīšanas reaģentu komplektu, iegūstot 18,2  $\mu$ g StrepII Tag-1, 6,7  $\mu$ g StrepII Tag-2 un 37,4  $\mu$ g StrepII Tag-3 saturoša T7 fāga displeja vektora DNS.



8. attēls. Sekvenēšanas rezultāti: T7 vektorā ieliģēts Strep II Tag – 2.

*Figure 8. Sequencing results: Strep II Tag - 2 ligated in T7 vector.*

## 2. Ar StrepII Tag iezīmētu kuņģa vēža kDNS ekspresijas bibliotēku konstruēšana

Totālās RNS izdalīšanai tika izmantoti kuņģa vēža un blakus esošu audu paraugi, kas ievākti operāciju laikā no kuņģa vēža pacientiem, saņemot viņu rakstisku piekrišanu. RNS tika izdalīta no homogenizētiem audu paraugiem, izmantojot TRIzol™ reaģentu un tās kvalitāte tika novērtēta, veicot elektroforēzi 1,5% agarozes gēlā, nedegradētai RNS raksturīgas izteiktas rRNS joslas. Izdalītās RNS daudzumi apkopoti 4. tabulā.

### Izolētās RNS daudzumi

4. tabula

Table 4

#### *Amounts of the isolated RNA*

	Parauga Nr.	RNS daudzums, µg
Kuņģa vēža RNS	460T	121
	464T	131
	465T	230
Normālu audu RNS	460N	268
	464N	191
	465N	179

Kuņģa vēža kDNS ekspresijas bibliotēkas konstruēšanai tika ņemti 305µg RNS no pieciem audzēja paraugiem un apvienoti vienā paraugā ar 262µl tilpumu (5. tabula). Matricas RNS izdalīšanai tika izmantots Dynal mRNS attīrīšanas reaģentu komplekts, kā rezultātā tika iegūti 4,2µg mRNS, kas sastāda 1,4% no totālās un ir pietiekami, lai izdalīto mRNS varētu izmantot kDNS sintēzei.

kDNS sintēzei tika izmantoti komerciāli pieejami reaģentu komplekti un 4µg izdalītās mRNS. Iegūtajai dubultspiralizētajai kDNS tika veikta *EcoR* I / *Hind* III linkeru ligēšana un šķelšana pa attiecīgiem *EcoR* I un *Hind* III restrikcijas saitēm. Veicot elektroforētisku kDNS frakcionēšanu, tika izdalītas un attīrītas zonas ar 250-1000bp kDNS, jo īsāki kDNS inserti apgrūtinātu kDNS bibliotēkas bagātināšanu ar insertu pareizā translācijas fāzē ekspresējošiem

5. tabula

### Totālās RNS daudzumi kDNS bibliotēkas konstruēšanai

Table 5

#### *Amounts of the total RNA for constructing cDNA library*

Nr.	RNS daudzums, µg	Koncentrācija, µg/µl	Tilpums, µl
454T	25	0,47	53,2
469T	70	1,04	67,3
460T	70	1,21	57,9
464T	70	1,31	53,4
465T	70	2,30	30,4
Kopā:	305	1,27	262,2

kloniem. Pēc attīrīšanas tika iegūti ~700ng kDNS, kas tālāk tika izmantota kuņģa vēža kDNS ekspresijas bibliotēkas konstruēšanai.

Lai konstruētu kDNS bibliotēku (metožu secība 1. pielikumā), trīs atsevišķos stobriņos tika liģēti 0,5µg no katra StrepII Tag (StrepII Tag-1, 2 un 3) saturošā vektora (šķelts pa *EcoR* I un *Hind* III restrikcijas saitēm) un ~200ng kDNS. Pakojot rekombinantās T7 DNS paraugus, tika iegūtas kuņģa vēža kDNS ekspresijas bibliotēkas, no kurām vienīgi ar StrepII Tag-2 iezīmētā bibliotēka ( $1,2 \cdot 10^6$  pfu) ir izmantojama sistemātiskai antigēnu meklēšanai, jo optimālais bibliotēkas apjoms ir vismaz  $1 \cdot 10^6$  un ar StrepII Tag-1 un 3 iezīmētās bibliotēkas



9. attēls. StrepII Tag-1 (1.x.), 2 (2.x.) un 3 (3.x.) saturošu kuņģa vēža kDNS ekspresijas bibliotēku fāgu PCR fragmentu analīze agarozes gēla elektroforēzē.

*Figure 9. StrepII Tag-1 (1.x.), 2 (2.x.) and 3 (3.x.) labeled gastric cancer cDNA library PCR fragment analysis on agarose gel electrophoresis*

neatbilst šim kritērijam.

Lai novērtētu kDNS bibliotēku kvalitāti, no katras bibliotēkas tika izdalīti astoņi rekombinantie fāgi, un amplificēti kDNS insertu saturošie polilinkera rajoni, izmantojot PCR ar praimeriem, kas hibridizējas abpus klonēšanas saitēm. Elektroforēzes dati (9. attēls) parādīja, ka StrepII Tag-1 saturošās kDNS bibliotēkas fāgu polilinkera rajonu vidējais garums ir 490bp, StrepII Tag-2 – 538bp un StrepII Tag-3 – attiecīgi 256bp, turklāt ~75% StrepII Tag-3 saturošās kDNS bibliotēkas un ~13% StrepII Tag-2 saturošās kDNS bibliotēkas fāgu, pēc amplificēto polilinkera rajonu garuma spriežot (~200bp), kDNS insertu nesatur. Sekvenēšanai tika ņemti septiņi StrepII Tag-1, visi StrepII Tag-2 un divi Strep II Tag-3 saturošās kDNS bibliotēkas fāgu amplificētie polilinkera rajoni. Sekvenēšanas rezultāti parādīja, ka pieci (71%) no septiņiem sekvencētajiem StrepII Tag-1 saturošās kDNS bibliotēkas fāgu polilinkera rajoniem satur pareizi ieliģētu kDNS insertu, bet pārējos divos gadījumos polilinkera rajons vai nu insertu nesatur, vai arī sekvenču nav nolasāma. Strep II Tag-2 bibliotēkas gadījumā pareizi ieliģētu kDNS insertu satur vismaz septiņi (88%) no astoņiem kloniem, astotā T7 fāga polilinkera rajona sekvenču nebija nolasāma. kDNS insertu vidējie garumi pēc sekvenēšanas datiem ir 317bp ar StrepII Tag-1 iezīmētajai kDNS bibliotēkai un 310bp ar StrepII Tag-2 iezīmētajai kDNS bibliotēkai. Savukārt, iegūtie dati par Strep II Tag-3 saturošo kDNS bibliotēku nav reprezentatīvi, jo sekvenēšanai tika ņemti tikai divi kloni, no kuriem pareizi ieliģētu kDNS insertu saturēja tikai viens. Pilnas sekvenču piemērs aplūkojams 2. pielikumā.

#### 4. SECINĀJUMI

1. Tika izveidoti StrepII Tag-1, 2 un 3 saturoši T7 fāga displeja vektori.
2. Tika izstrādāta sistemātiskai antigēnu meklēšanai izmantojama ar StrepII Tag-2 iezīmēta kuņģa vēža kDNS ekspresijas bibliotēka.

## 5. PATEICĪBAS

Izsaku pateicību Aijai Linē un Zanei Kalniņai par ieguldījumu šī darba tapšanā

## 6. LITERATŪRAS SARAKSTS

### Monogrāfijas

Cooper G. M. 1993. The cancer book: a guide to understanding the causes, prevention, and treatment of cancer. Boston: Jones & Bartlett Publishers, 236 pp.

Ewing J. 1928. A treatise on tumors. In: Neoplastic diseases. London: WB Saunders Co, 77-89 pp.

### Raksti žurnālos

Allan A. L., Vantyghem S. A., Tuck A. B., Chambers A. F. 2007. Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. *Breast Dis.*, 26: 87-98.

Bancroft G. J., Schreiber R. D., Unanue E. R. 1991. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol. Rev.*, 124: 5-24.

Barnhart B. C., Simon M. C. 2007. Metastasis and stem cell pathways. *Cancer Metastasis Rev.*, 26: 261-271.

Benlagha K., Bendelac A. 2000. CD1d restricted mouse V $\alpha$ 14 T cells: lymphocytes of innate immunity. *Semin. Immunol.*, 12: 537-542.

Bjerkvig R., Tysnes B. B., Aboody K. S., Najbauer J., Terzis A. J. 2005. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer*, 5: 899-904

Bryan T.M., Englezou A., Gupta J., Bacchetti S., Reddel R.R. 1995. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*, 14(17): 4240–4248.

Chatterjee M., Mohapatra S., Ionan A., Bawa G., Ali-Fehmi R., Wang X., Nowak J., Ye B., Nahhas F. A., Lu K., Witkin S. S., Fishman D., Munkarah A., Morris R., Levin N. K., Shirley N. N., Tromp G., Abrams J., Draghici S., Tainsky M. A. 2006. Diagnostic Markers of Ovarian Cancer by High-Throughput Antigen Cloning and Detection on Arrays. *Cancer Research*, 66: 1181-1190.

Chen W., Ede N. J., Jackson D. C., McClukey J., Purcell A. W. 1996. CTL recognition of an altered peptide associated with asparagine bond rearrangement. Implications for immunity and vaccine design. *J Immunol*, 157: 1000-1005.

Chen T., Scanln J., Sahin U., Türeci Ö., Gure A. O., Tsang S., Williamson S., Stockert E., Pfreundschuh M., Old L. J. 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 1914-1918.

Clarke M. F., Dick J. E., Dirks P. B., Eaves C. J., Jamieson C. H., Jones D. L., Visvader J., Weissman I. L., Wahi G. M. 2006. Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.*, 66: 9339-9344.

Coulie P. G., Brichard V., Van Pel A., Wölfel T., Schneider J., Traversari C., De Plaen E., Lurquin C., Raunald C. J., Boon T. 1994. A new gene coding for a differentiation antigen

recognized by autologous cytolytic T-lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*, 180: 36-42.

De Plaen E., Arden K., Traversari C., Gaforio J. J., Szikora J. P., De Smet C., Brasseur F., van der Bruggen P., Lethe B., Lurquin C. 1994. Structure, chromosomal localisation, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 40:360-369.

Duelli D., Lazebnik Y. 2007. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7: 968-976.

Dunn G. P., Old L. J., Schreiber R. D. 2004<sup>a</sup>. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21: 137-148.

Dunn G. P., Old L. J., Schreiber R. D. 2004<sup>b</sup>. The three es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22: 329-360.

Eppenberger U., Kueng W., Schlaeppli J. M., Roesel J. L., Benz C., Mueller H., Matter A., Zuber M., Luescher K., Litschgi M., Schmitt M., Foekens J. A., Eppenberger-Castori S. 1998. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 16: 3129-3136.

Fedi P., Tronick S. R., Aaronson S. A. 1997. Growth factors in cancer medicine. *Williams & Wilkins*, 41-64.

Fidler I. J. 1970. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with <sup>125</sup>I-5iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl Cancer Inst*, 45: 773-782.

Fidler I. J. 2001. Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis. *Surg Oncol Clin N Am*, 10: 257-269.

Hanahan D., Weinberg R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.

Henderson S., Huen D., Rowe M., Dawson C., Johnson G., Rickinson A. 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(18): 8479-8483.

Hodge-Dufour J., Noble P. W., Horton M. R., Bao C., Wysoka M. 1997. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J. Immunol*, 159: 2492-2500.

Jäger E., Gnjatic S., Nagata Y., Stockert E., Jäger D., Karbach J., Neumann A., Rieckenberg J., Chen Y., Ritter G., Hoffman E., Arand M., Old L. J., Knuth A. 2000. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *PNAS*, 97(22):12198-12203.

Jaiswal S., Traver D., Miyamoto T. 2003. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 10002-10007.

Kalniņa Z., Siliņa Z., Meistere I., Zaykin P., Rivosh A., Ābols A., Leja M., Minenkova O., Schadendorf D., Linē A. 2008. Evaluation of T7 and lambda phage display systems for survey of autoantibody profiles in cancer patients. *Journal of Immunological Methods* 334: 37-50.



- Kang Y., Massague J. 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 118: 277-279.
- Kucia M., Ratajczak M. Z. 2006. Stem cells as two edged sword – from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol*, 57: 5-16.
- Kwon I. K., Schoenlein P. V., Delk J., Liu K., Thangaraju M., Dulin N. O., Ganapathy V., Berger F. G., Browning D. D. 2008. Expression of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in metastatic colon carcinoma cells blocks tumor angiogenesis. *Cancer*, 112(7): 1462-1470.
- Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Careras-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuris M. A., Dick J. E. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367: 645-648.
- Li F., Tiede B., Massagu J., Kang Y. 2007. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Research*, 17: 3-14.
- Loeb L. A. 1991. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.*, 51: 3075-3079.
- Loeb L. A., Loeb K. R., Anderson J. P. 2003. Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 776-781.
- Medema R. H., Bos J. L. 1993. The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog*, 4: 615-661.
- Münger K., Scheffner M., Huibregtse J. M., Howley P. M. 1992. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv*, 12: 197-217.
- Murgia C., Pritchard J. K., Kim S. Y., Fassati A., Weiss R. A. 2006. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell.*, 126(3): 477-487.
- O'Brien C. A., Pollet A., Gallinger S., Dick J. E. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumor growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445: 106-110.
- Ono M., Yasunaga T., Miyata T., Ushikubo H. 1986. Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol*, 60: 589-598.
- Pantel K., Brakenhoff R. H. 2004. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, 4: 448-456
- Perkel J. M. 2002. Telomeres as the key to cancer. *The Scientist*, 16: 1111, 38-40.
- Polster B. M., Pevsner J., Hardwick J. M. 2004. Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1644: 211-227.
- Reiman J. M., Kmiecik M., Manjili M. H., Knutson K. L. 2007. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Seminars in Cancer Biology*, 17(4): 275-287.

- Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Welssman I. L. 2001. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*, 414: 105-111.
- Rizvi A. Z., Swain J. R., Davies P. S. 2006. Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 6321-6325.
- Sagar J., Chaib B., Sales K., Winslet M., Seifalian A. 2007. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review - *Cancer Cell International*, 7: 9.
- Sahin U., Türeci Ö., Pfreundschuh M. 1997. Serological identification of human tumor antigens. *Current Opinion in Immunology*, 9(5): 709-716.
- Sahin U., Türeci Ö., Schmitt H., Cochlovius B., Johannes T., Schmits R., Stenner F., Lup G., Schobert I., Pfreundschuh M. 1995. Human neoplasms elicit multiple immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 11810-11813.
- Schmitt F. C., Soares R. 1999. TGF- $\alpha$  and Angiogenesis. *The American Journal of Surgical Pathology*, 23(3): 358-359.
- Shay J. W., Zou Y., Hiyama E., Wright W. E. 2001. Telomerase and cancer. *Human Molecular Genetics*, 7: 677-685.
- Skipper J. C. A., Hendrickson R. C., Gulden P. H., Brichard V., Van Pel A., Chen Y., Shabanowitz J., Wölfel T., Slingluf C. L. J. R., Boon T. 1996. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med*, 183: 527-534.
- Takaoka A., Hayakawa S., Yanai H., Stoiber D., Negishi H., Kikuchi H., Sasaki S., Imai K., Shibue T., Honda K., Taniguchi T. 2003. Integration of interferon- $\alpha/\beta$  signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*, 424(6948): 516-523.
- Teodoro J. G., Branton P. E. 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol*. 71(3): 1739-1746.
- Thiery J. P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer*, 2: 442-454.
- Türeci O., Sahin U., Pfreundschuh M. 1997. Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Molecular Medicine Today*, 3(8):342-349.
- van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P., Lurquin C., De Plaen E., van der Eynde B., Knuth A., Boon T. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254: 1643-1647.
- Viola A., Lanzavecchia A. 1996. T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*, 273: 104-106.
- Virchow R. 1855. Editorial. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*, 3: 23.
- Weinberg R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81: 323-330.

Wrenshall L. E., Stevens R. B., Cerra F. B., Platt J. L. 1999. Modulation of macrophage B and cell function by glycosaminoglycans. *J. Leukoc. Biol.*, 66: 391-400.

Yang F., Chen I. H., Xiong Z., Yan Y., Wang H., Yang X. F. 2006. Model of stimulation-responsive splicing and strategies in identification of immunogenic isoforms of tumor antigens and autoantigens. *Clin Immunol*, 121(2): 121-33.

Yang F., Yang X. F. 2005. New concepts in tumor antigens: their significance in future immunotherapies for tumors. *Cell Mol Immunol*, 2(5):331-41

Yang L., Mashima T., Sato S., Mochizuki M., Sakamoto H., Yamori T., Oh-Hara T., Tsuruo T. 2003. Predominant Suppression of Apoptosome by Inhibitor of Apoptosis Protein in Non-Small Cell Lung Cancer H460 Cells. *Cancer Research*, 63: 831-837.

Yuichi O., Kohei T., Masahiro Y., Hiromi T., Toshitada Y. 2002. Immunogenic Gene Products in Cancer Patients Identified by SEREX. *Biotherapy*, 16(5): 433-440.

### **Interneta vietnes**

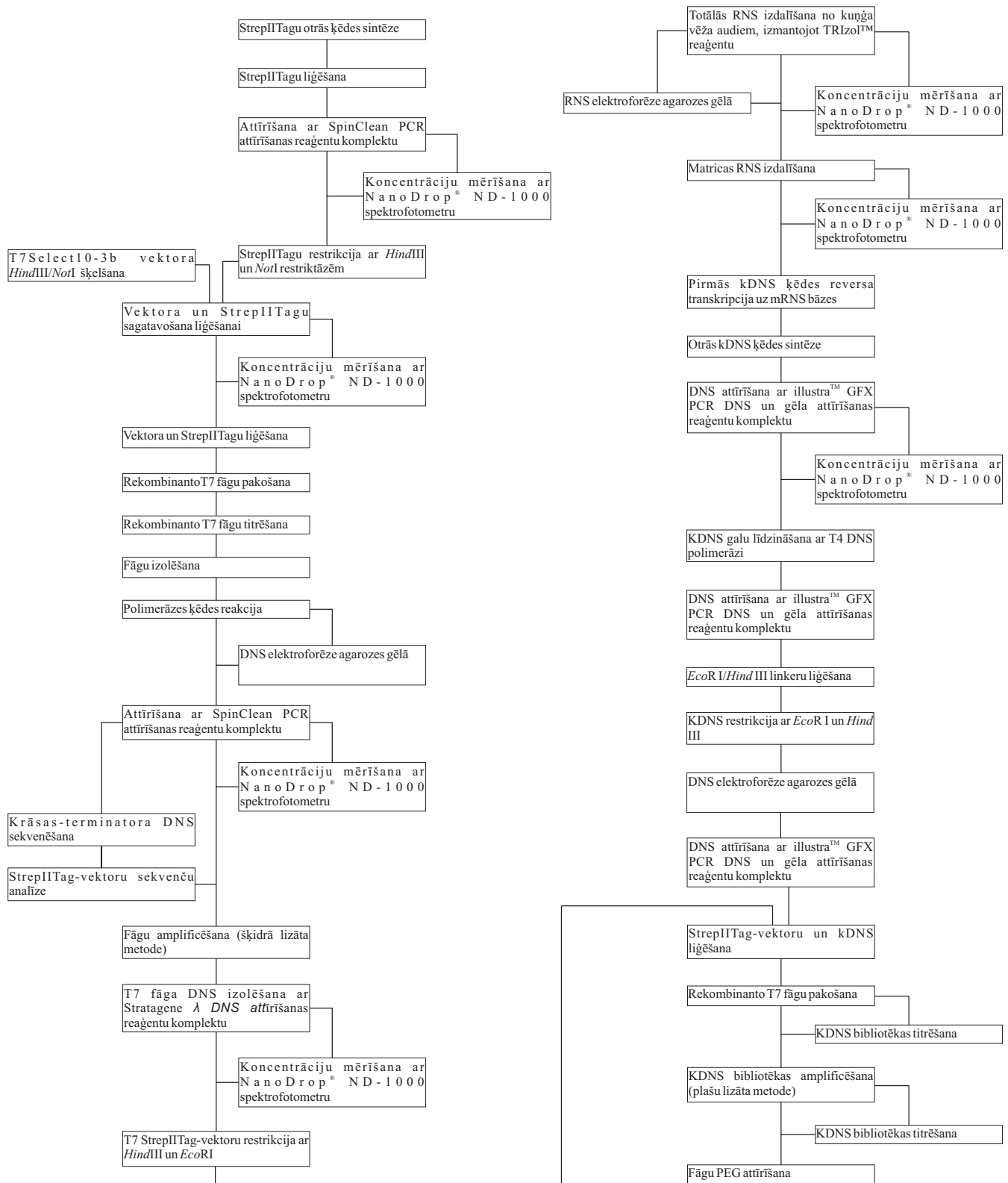
American cancer society 2005. Cancer explained. <http://www.nasmedical.com/page?id=1423>

Chen Y. T., Scanlan M. J., Obata Y., Old L. J. 2004. Identification of Human Tumor Antigens by Serological Expression Cloning: An Online Review on SEREX. <http://www.cancerimmunity.org/SEREX/index.htm>

Ludwig Institute For Cancer Research 2007. Cancer Antigen Identification. [http://www.licr.org/D\\_programs/d4a1.php](http://www.licr.org/D_programs/d4a1.php)

# **PIELIKUMS**

1. Pielikums. Kuņģa vēža ekspresijas kDNS bibliotēkas konstruēšanas shēma  
 Appendix 1. The scheme of constructing the gastric cancer's cDNA library



2. pielikums. Ar Strep II Tag – 2 iezīmētās kuņģa vēža kDNS bibliotēkas kDNS satorošā polilinkera rajona sekvences piemērs

Appendix 2. Example of cDNA containing polylinker Region of the Strep II Tag-2 labeled gastric cancer cDNA library

