

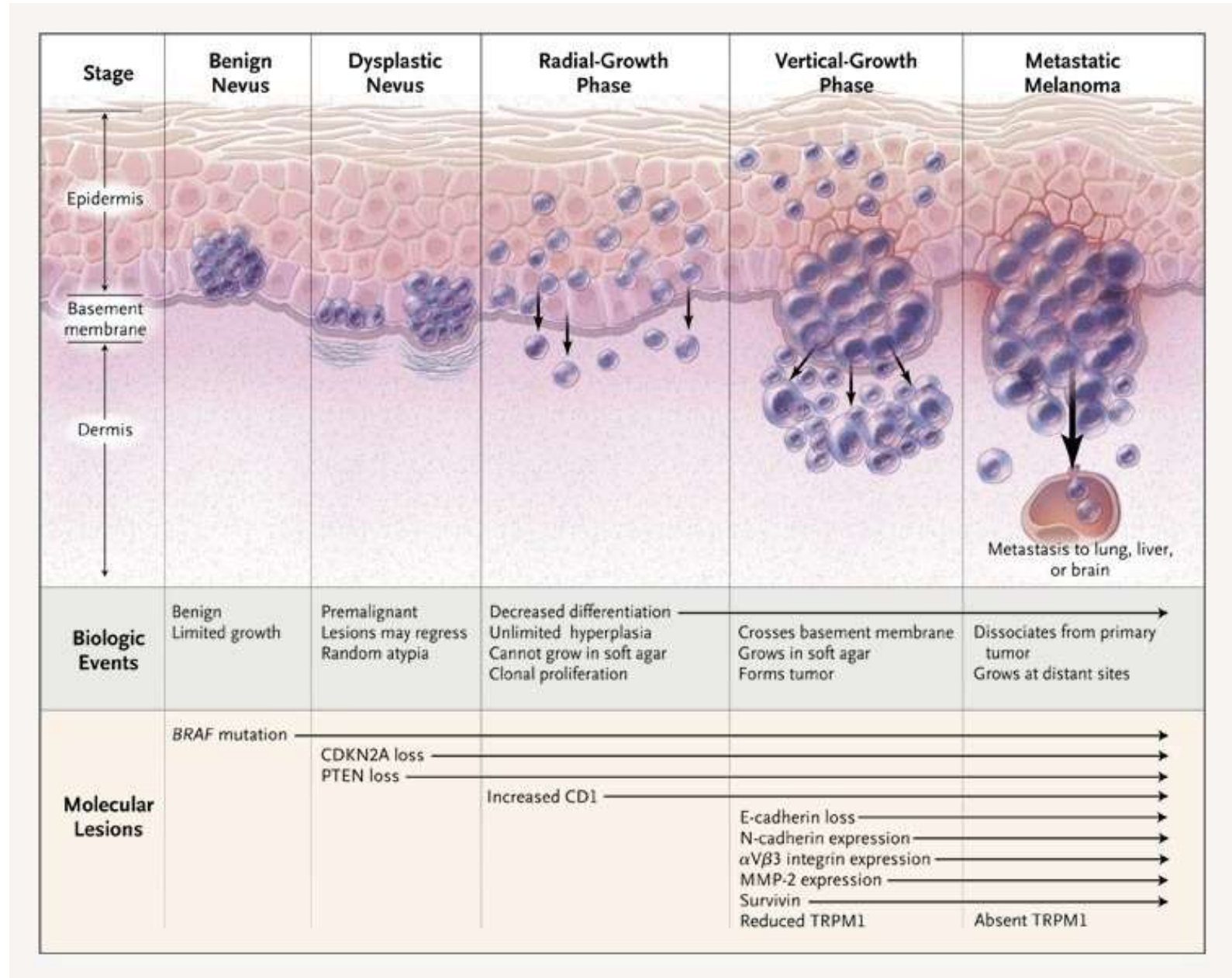
Melanoomi autoantikehade määramine MAGEA valkude näitel

Kristiina Kurg

3.a laborimediitsiini resident

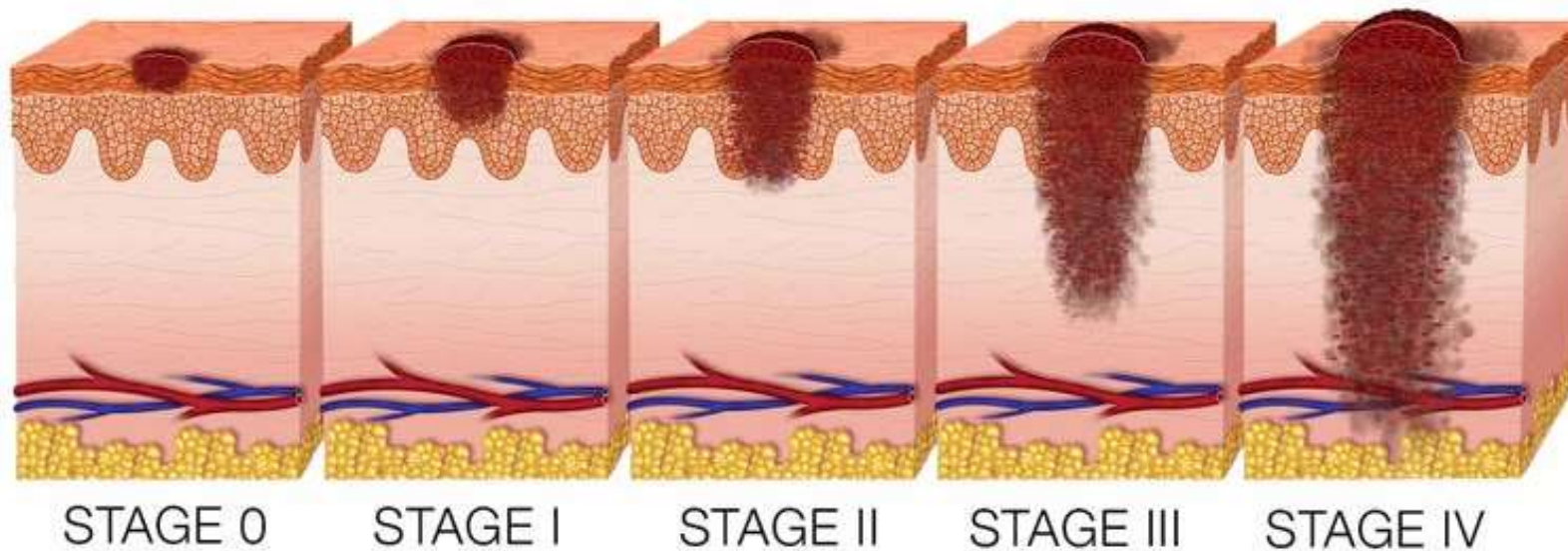
Melanoom

- Üks nahakasvaja tüüp
- Melanotsüütidest arenev pahaloomuline kasvaja



Melanoomi staadiumid

- Nagu kõiki kasvajaid, jaotatakse melanoomi kasv nelja (viite) staadiumi
 - St 0 – in situ
 - St I – läbi dermise
 - St II – subdermaalne kasv
 - St III – regionaalsetes lümfisõlmedes
 - St IV - kaugmetastaasid



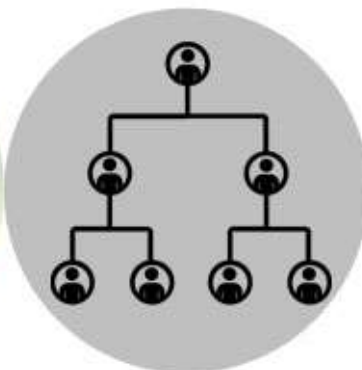
Melanoomi põhjused

Causes of Malignant Melanoma



Sunburn and
Ultra Violet
light exposure

© www.medindia.net



Family
history of
melanoma



People living
in geographic
regions



Eczema



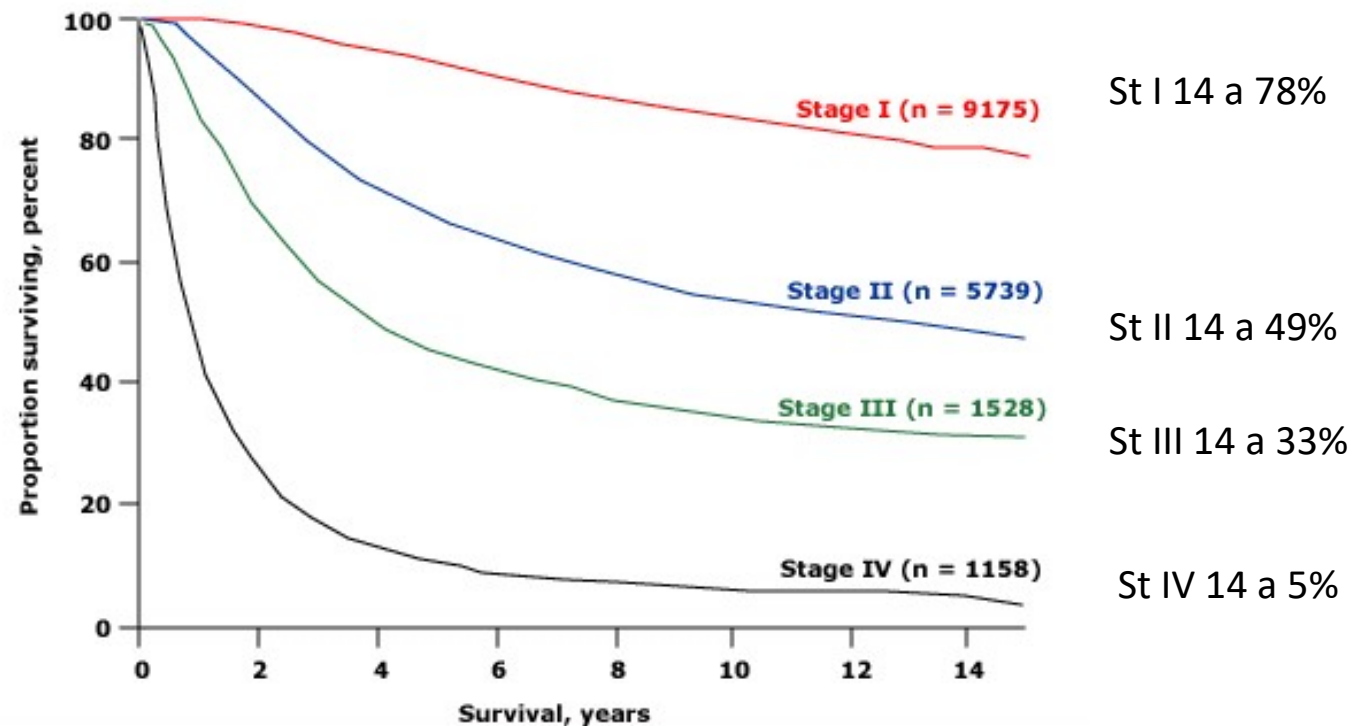
Overexposure
to certain
chemicals

Melanoomi probleemid?

- Aladiagnoositud või leitakse hilja
- Suur suremus

-> varase melanoomi diagnostika???

Fifteen-year survival curves for patients with stage I to IV melanoma, according to the new proposed stage groupings



These graphs compare the relative survival up to 15 years for patients with localized melanoma (stages II and I), regional metastases (stage III), and distant metastases (stage IV). The numbers in parentheses represent the number of patients from the AJCC melanoma staging database used to calculate the survival rates. The differences between the curves are significant ($p < .0001$). Data from:

Melanoomi diagnostika

- Klassika – dermatoskoopia ja ABCDE reegel
- Tuumori väljalõikamine ja immunhistokeemia (S100, ki67, NRAS, BRAF V600E jne)
- ...
- Head varajast diagnostika võimalust ei ole, leitakse liiga hilja



Melanoomi
diagnostika –
ABCDE reegel

The ABCDE's of melanoma

Benign



Malignant



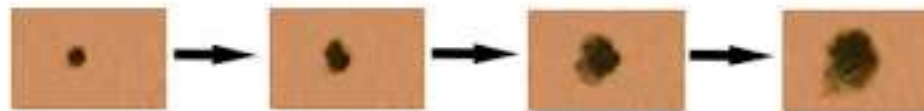
Asymmetry: One side is different from the other

Border is irregular, notched, or blurred

Color is mixed

Diameter is larger than 6 millimeters

Mole **E**volves over time



Autoantikehad? Kasvajate autoantikehad?

- Antikehad, mille antigeenideks on keha enda rakud ja koed
- Põhjustavad autoimmuunhaigusi
- Autoantikehad võivad tekkida kasvajakoes olevate valkude vastu
 - Muutunud oma valk? Uus valk? Taastekkinud valk?
- Vastuse mõõtmise võiks anda infot
 - Kasvaja olemasolu kohta?
 - Kasvaja kompositsiooni kohta???
 - Staadiumi kohta?

Melanome Associated antiGEn A = MAGE A

- CTA – cancer/testis antigene
 - Normaalne ekspresioon platsentas, testises, loote ovaariumis
 - Kasvajates neo-antigeenid ehk taasilmuvad kasvajakoes
 - **Tekitavad immunreaktsiooni**
- Onkogeenne funktsioon
 - Toetavad kasvu, ellujäämist ja metastaseerumist
 - Reguleerivad p53 rada
- Ekspressioon paljudes maliigsetes kasvajates
 - Põis, kops, nahk, rinnanääre, **melanoom**
 - Kasvajad invasiivsed, metastaseeruvad
 - Seotud halva prognoosiga

MAGEA perekond

- MAGE A CTA perekonna alagrupis 11 geeni
 - Xq28 regioonis
- **MAGEA4, MAGE10**
 - 50% sarnane aminohappeline järjestus
 - Suur hulk ristreaktsioone
 - Erinev suurus ja lokalisatsioon rakus
- Leidumine melanoomi rakkudes:
 - MAGE A4: primaarkasvajas 9%, metastaasides 44%
 - MAGE A10: 38% maliigsetes melanoomides
 - ...
 - MAGE A1: Primaarne melanoom 16%, metastaasides 48%

Meie töö 2014-2018

- 183 patsiendi seerumid PERHist
 - Kogutud 2013-2014
- 43 kontrolli Eesti verepangast
- 3 referentsproovi laboritöötajate hulgast

	Stage 0	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
Number	22	68	43	29	21
Gender					
Male (%)	4 (18.2%)	17 (25%)	14 (32.6%)	12 (41.4%)	9 (42.9%)
Female	18	51	29	17	12
Disease duration					
<5 years	22	46	29	20	18
≥5 years	2 (9%)	22 (47.8%)	14 (48.3%)	9 (45%)	3 (16.7%)
Mean (range)	2 (0-13) years	5 (0-26) years	4 (0-18) years	4 (0-19) years	3 (0-25) years
Median	1 years	2 years	3 years	3 years	1 years
Age					
Mean (range)	50.1 (18-85)	61.3 (28-87)	64.3 (33-90)	62.8 (43-82)	73.1 (35-92)
Median	46	65	66	65	78



ONCOLOGY LETTERS

SPANDIDOS PUBLICATIONS

Oncol Lett. 2018 Jul; 16(1): 211–218.

PMCID: PMC6006456

Published online 2018 May 10. doi: [10.3892/ol.2018.8684](https://doi.org/10.3892/ol.2018.8684)

PMID: [29928403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29928403/)

Antibody response against cancer-testis antigens MAGEA4 and MAGEA10 in patients with melanoma

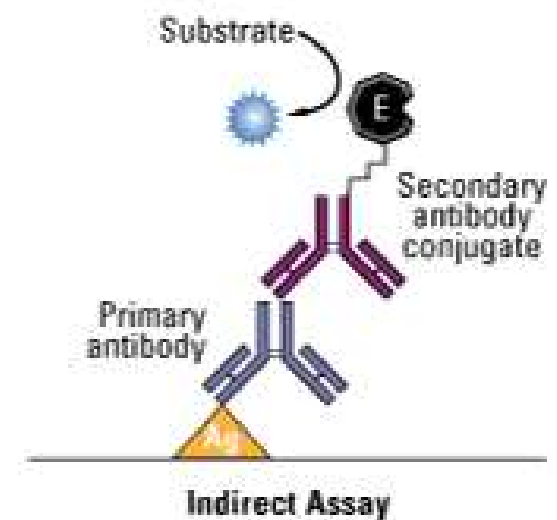
Kadri Õunap,^{1,*} Kristiina Kurg,^{1,*} Liisi Võsa,¹ Ülo Maiväli,¹ Marina Teras,² Anu Planken,² Mart Ustav,¹ and Reet Kurg¹

Indirektne ELISA

- ELISA

- Antigeen plaadi põhjas = MAGEA4 või MAGEA10
- Primaarne antikeha = Seerumite lahjendused
 - 1:200 kuni 1:800
- Sekundaarne antikeha = HRP – anti-humanIgG
- Ilmutamiseks Peroksidaasi reaktsioon
- 450 nm juures valguse neeldumine
 - OD – optical density

- Statistiline analüüs



Tulemused

- Hüpotees: varajases staadiumis melanoomi hoiab kontrolli all immuunsüsteem
- 8,2% patsientidest (17 183st)
 - olid autoantikehad kas MAGEA4 ja/või MAGEA10 vastu
- Grupeerides staadiumite kaupa
 - II staadiumi patsientidel olid 16,3% MAGEA10 vastased autoantikehad
- Hüpotees osutus tõseks

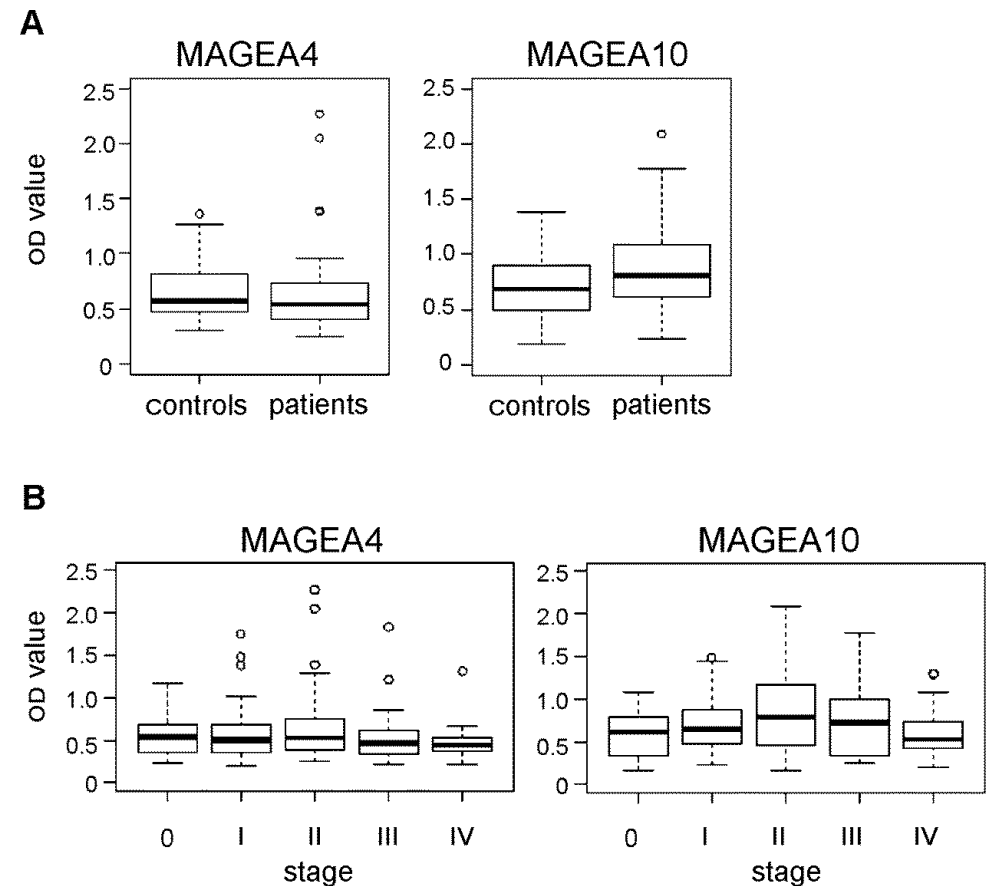


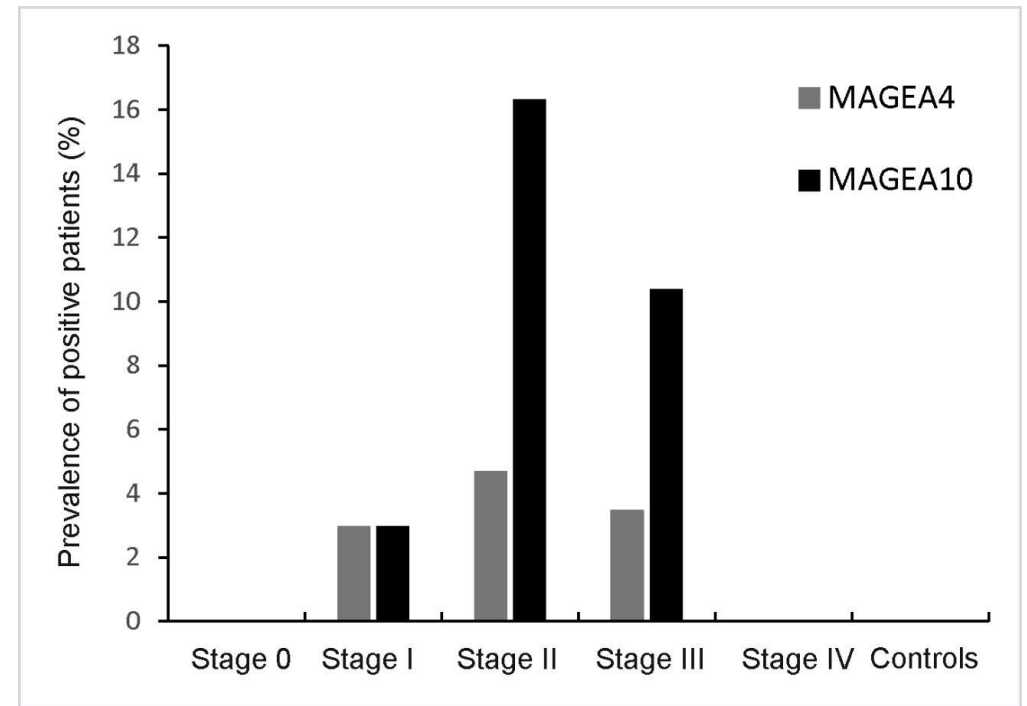
Figure 1

Lisaks...

- Uurisime soo ja vanuse mõju
 - Vanusega autoantikehaline vastus polnud seotud
 - Keskmise iga haigestumisel 67 a
 - Esmadiagnoos 0 kuni 18 a tagasi
 - Nõrk seos sooga
 - Naistel suurem autoantikehaline vastus
 - 9,3% naistel vs 5,6% meestel
- Naistel ongi autoimmuunhaigusi rohkem!

Positiivsed patsiendid

- 12 anti-MAGEA10 ja 5 anti-MAGEA4
 - Kokku 17 pt
- 2 pt-I mõlema antigeeni vastased autoantikehad
- MAGEA10 puhul
 - Staadium II 7 pt 43st 16,3%
 - Staadium III 3 pt 29st 10,3%
- MAGEA4 puhul
 - Kindlat korrelatsiooni ei olnud
- 0 ja IV staadiumi patsientidel autoantikehi ei leidnud



Natuke seletusi

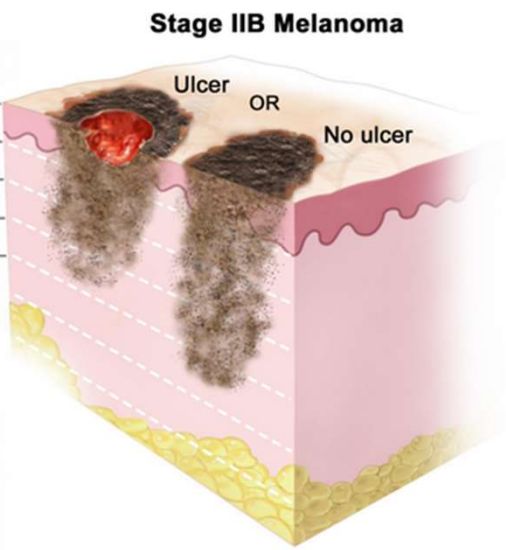
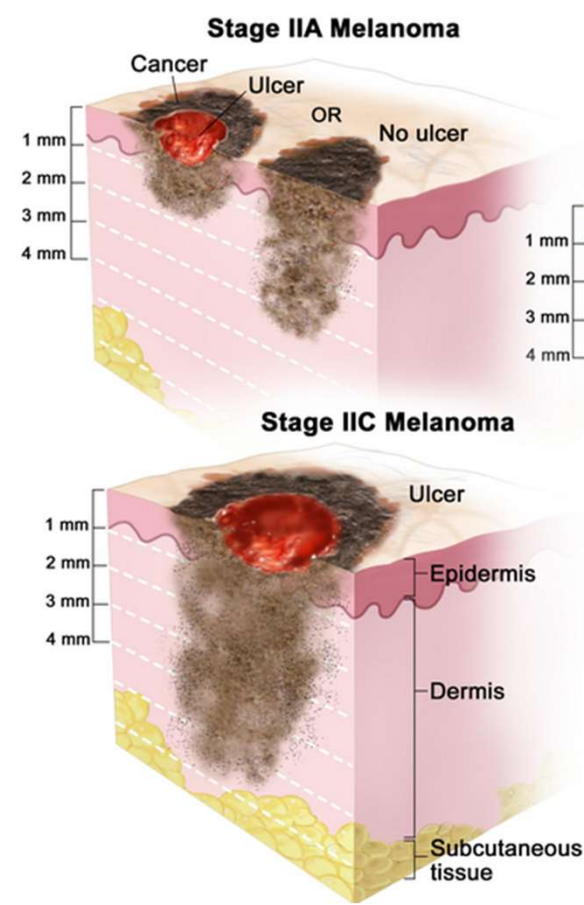
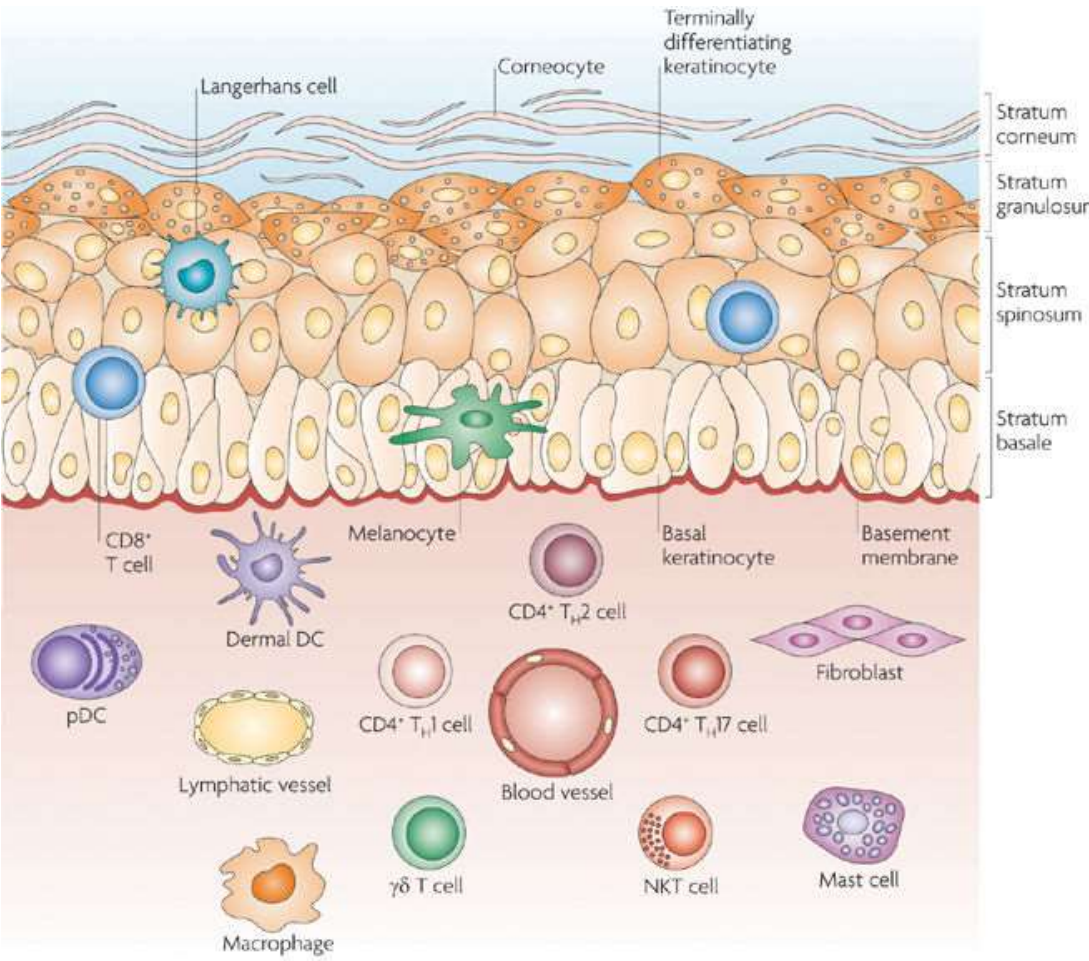
- MAGEA antigeenidel on erinev immunogeensus
 - MAGEA10 on parem antigeen kui A4
- Toetab eelnevaid töid, et
 - MAGEA10 on perekonna immunogeenseim liige
- Samas
 - On raske toota antikehi kindla MAGEA antigeeni vastu
 - Meie anti-MAGEA4/10 olid toodetud E.Coliga
 - Võib-olla oli vastus hoopis mõne teise vastu?
 - Perekonnas 11 antigeeni, 50% sarnasus valkude vahel

Järeldusi...

- II staadiumi patsientidel kõige parem immuunvastus
 - Levinud sügavale dermasse
 - (Esmane) kontakt lümfisõlmega
 - Esmakordsel antigeeniga kokupuutel autoantikehade teke kasvajakoe vastu

Kirjandusest...

- Immuunsüsteem on seotud melanoomi kontrollimisega
- Primaarse melanoomi regressioon on võimalik
- Metastaaside regressiooni ei toimu
- Hea varajane antikehaline vastus
 - Hoiab ära melanoomi levikut
 - Vähendab primaartuumori kasvu kiirust



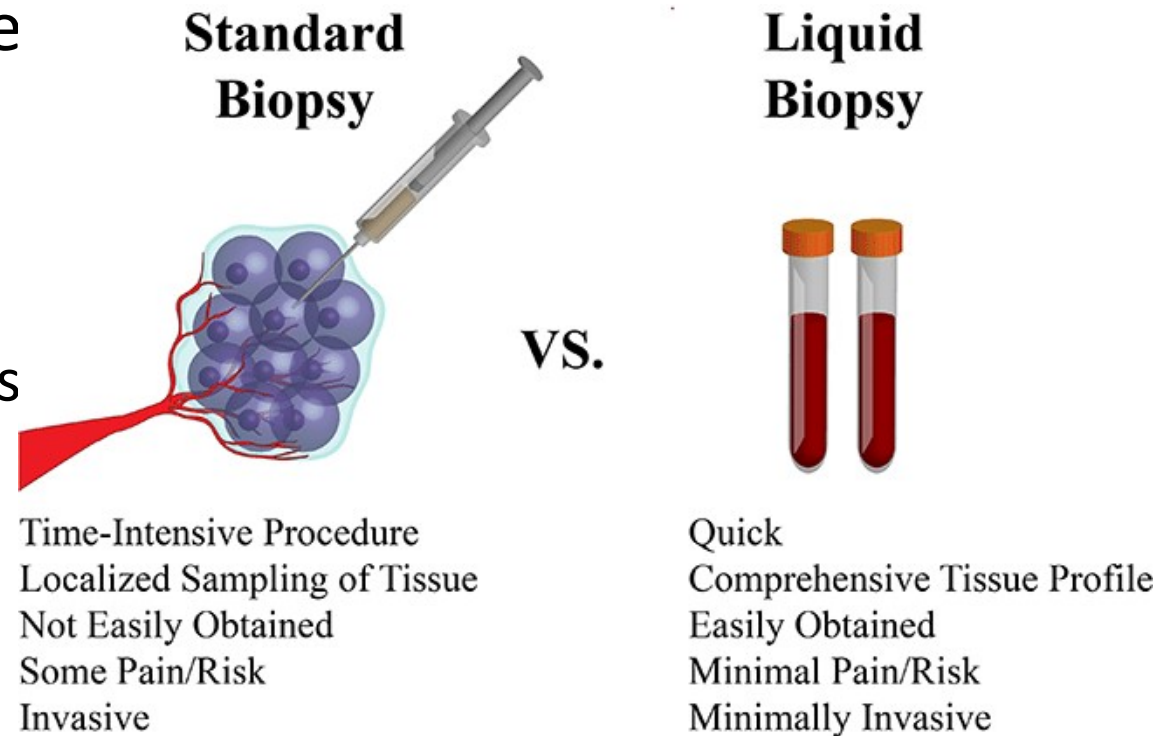
© 2008 Terese Winslow
U.S. Govt. has certain rights

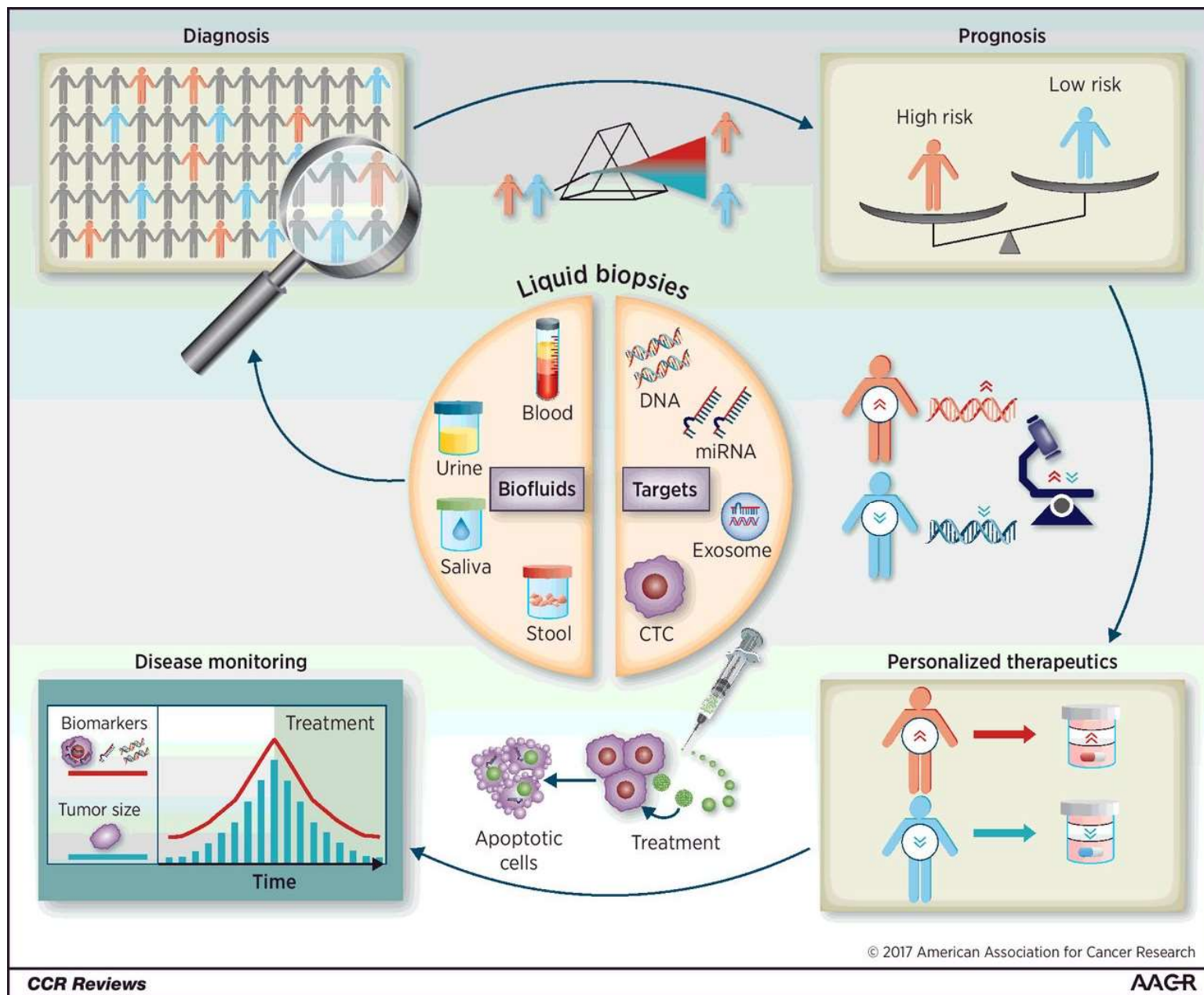
2017 aastal patsientide seisund

- 2 aasta jooksul on 17st patsiendist
 - 1 surnud
 - 1 melanoom edasi arenenud
 - 15-l progressiooni pole toimunud

Võimalused saadud andmete baasil...

- Immunoteraapiasse kaasatavate patsientide valimine
- Uute immunoteraapiate efektiivsuse hindamine
 - Ipilimumab ravi puhul MAGEA tas näitab ravi efektiivsust
- MAGEA antikehade detektsioon, kui
 - Haiguse staatuse hindamine
 - **‘Liquid biopsy’** ?





Melanoomi autoantikehade määramine MAGEA valkude näitel

Kristiina Kurg

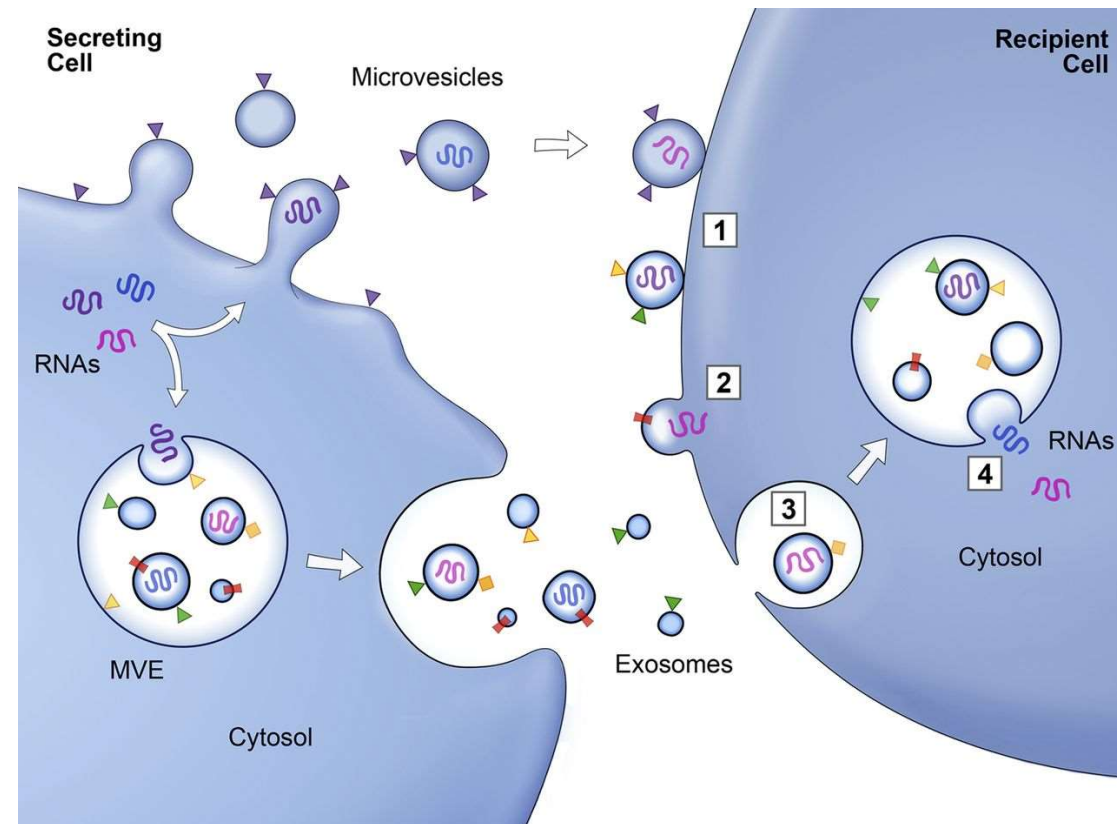
3.a laborimediitsiini resident

+

1.a doktorant TÜ Tehnoloogia Instituudis Tehnika ja tehnoloogia suunal
teemal „Diagnostikatestide arendamine melanoomi varajaseks
avastamiseks,, alates 1.september 2020

Edasine suund nr 1: EV

- Samad patsiendid, uus biomarker = seerumi ekstratsellulaarsed vesiiklid
 - Mida need sisaldavad?
 - Kas leiame MAGEA-sid eksosoomides?
 - Eri staadiumid = erinev hulk?
 - Eri staadium = erinev sisu?
 - Jne...
- 4 (5) melanoomi staadiumit, 2 erinevat puhastust, mitu erinevat metoodikat



Edasine suund nr 2: Hybrifree anti-MAGE A4, A10

- ‘Pöörasime asja ringi’

- Inimese keha toodab autoantikehi

- Järelikult on need valgud melanoomi patsientidel olemas



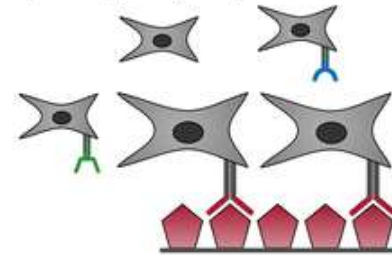
IC₅₀ SAGEN

- Aga mis oleks kui meie toodaksime ise antikehi MAGEA valkude vastu?

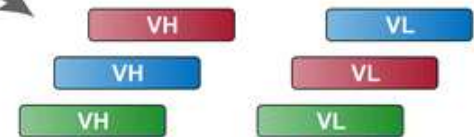
- Ja kasutaksime neid diagnostikas?või isegi ravis?

- Hybrifree meetod antikehade tootmiseks

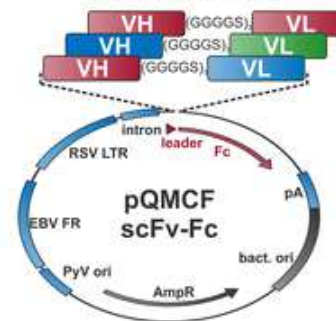
STEP 1: Capturing of source cells expressing antigen specific antibodies



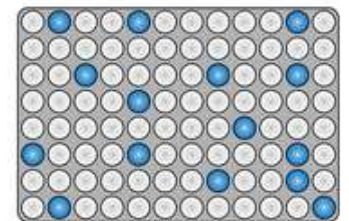
STEP 2: Amplification of VH and VL cDNA from captured cells



STEP 3: Construction of VH-VL combinatory library in mammalian expression vector



STEP 4: Determination of proper VH-VL combinations using mammalian screen



Ilusat algavat aastat ja kohtume märtsis 2021!



Tänan kuulamast ja kandke päikesekreemi!

