

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

**DOKSORUBICĪNA UN 5-FLUORURACILA PRETVĒŽA
DARBĪBAS AKTIVITĀTES NOTEIKŠANA KOMBINĀCIJĀ
AR ONKOLĪTISKIEM ALFAVĪRUSU VEKTORIEM**

Bakalaura darbs

Autors: Baiba Ķūrēna

Stud. apl. Nr. bk11020

Darba vadītāja: Maģ. biol. Jeļena Vasiļevska

RĪGA 2014

Satura rādītājs

Satura rādītājs	2
Kopsavilkums	4
Summary	5
Ievads	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	8
1.1. Alfavīrusu vektoru potenciāls pretvēža gēnu terapijā	8
1.1.1. Alfavīrusu struktūra un izplatība	8
1.1.2. Alfavīrusu ekspresijas vektoru daudzveidība	11
1.1.3. Rekombinanto alfavīrusu vektoru pielietojums onkoterapijā.....	13
1.1.4. Rekombinanto alfavīrusu vektoru pielietojums melanomas terapijā	14
1.2. Ķīmijterapija kombinācijā ar viroterapiju	15
1.2.1. Ķīmijterapijas potenciāls alfavīrusu onkolītiskās aktivitātes paaugstināšanā	15
1.2.2. Pētījumā izmantotā ķīmijpreperāta 5-fluorouracila raksturojums	16
1.2.3. Pētījumā izmantotā ķīmijpreperāta doksorubicīna raksturojums	16
1.3. RFP (red fluorescent protein) gēna izmantošana gēnu terapijas vektoru aktivitātes noteikšanā	17
2. MATERIĀLI UN METODEDES	18
2.1. Rekombinantā alfavīrusa rekSFV1/dsRed iegūšana	18
2.1.1. DNS transformācija un E.coli šūnu savairošana	18
2.1.2. pDNS izdalīšana no baktēriju šūnām	20
2.1.3. Plazmīdu restrikcija	22
2.1.4. DNS koncentrēšana un attīrīšana pēc plasmīdu restrikcijas	24
2.1.5. rekSFV1/dsRed un rekSFV1/Helper1 RNS transkripcija in vitro.....	24
2.1.6. RNS attīrīšana pēc transkripcijas.....	25
2.1.7. BHK-21 šūnu elektroporācija ar rekombinantām RNS un vīrusu daļiņu savākšana/sasaldēšana	26
2.2. RekSFV1/dsRed vīrusa titra noteikšana	27
2.3. RekSFV1/dsRed inficētspējas pārbaude BHK-21 un B16-F10 šūnu kultūrās	28
2.4. B16-F10 šūnu elektroporācija ar SFV1/dsRed RNS	29
2.5. MTT proliferācijas testa metode	30
2.5.1. RekSFV1/dsRed vīrusa citopātiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnu kultūrā in vitro	32

2.5.2. Ķīmijpreparātu 5Fu un DOX dažādu koncentrāciju citotoksiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās in vitro	32
2.5.3. RekSFV1/dsRed vīrusa un ķīmijpreparātu DOX un 5Fu terapeitiskās kombinācijas efektivitātes pārbaude B16-F10 šūnās in vitro	33
2.6. RekSFV1/dsRed vīrusa inficētspējas un citopātiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās pēc iedarbības ar DOX, 5Fu un rek SFV1/dsRed, izmantojot plūsmas citometriju	34
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	36
3.1. RekSFV1/dsRed vīrusa titra noteikšana	36
3.2. RekSFV1/dsRed vīrusa inficētspējas pārbaude BHK-21 un B16-F10 šūnu kultūrās.....	37
3.3. B16-F10 šūnu elektroporācija ar SFV1/dsRed RNS	39
3.4. Ķīmijpreparātu 5Fu un DOX dažādu koncentrāciju citotoksiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās in vitro.....	40
3.5. rekSFV1/dsRed vīrusa un ķīmijpreparāta DOX terapeitiskās kombinācijas citotoksiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās in vitro.....	42
3.6. rekSFV1/dsRed vīrusa un ķīmijpreparāta 5Fu terapeitiskās kombinācijas citotoksiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās in vitro.....	44
3.7. RekSFV1/dsRed vīrusa inficētspējas un citopātiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās pēc iedarbības ar DOX, 5Fu un rek SFV1/dsRed, izmantojot plūsmas citometriju	46
3.7.1. RekSFV un 5-FU kombinētas apstrādes efektivitātes analīze.....	47
3.7.2. rekSFV un DOX kombinētas apstrādes efektivitātes analīze.....	49
4. Secinājumi	53
5. Pateicības	54
6. Literatūras saraksts	55
Pielikumi	

Kopsavilkums

Onkolītiskā viroterapija ir daudzsološa gēnu terapijas forma vēža ārstēšanā. Šajā darbā tika pētīts onkolītiskā alfavīrusu pārstāvja Semliki meža vīrusa potenciāls vēža terapijā. Tā kā Semliki meža vīrusam nav izstrādāts specifisks pielietojums peļu melanomas audzēja šūnās B16-F10, alfavīrusa iedarbība tika pētīta šajā šūnu kultūrā. Šī darba mērķis bija pārbaudīt uz Semliki meža vīrusa (SFV) replikona pamata izveidota rekombinanta alfavīrusa vektora rekSFV1/dsRed terapeitisko iedarbību peļu melanomas šūnu līnijā B16-F10 *in vitro* kombinācijā ar 5Fu (5-fluoruracils) un DOX (doksorubicīns) ķīmijpreparātiem. Tika iegūts rekSFV1/dsRed vīruss ar augstu vīrusa daļiņu titru. Tika mikroskopiski pierādīta rekSFV spēja replicēties B16-F10 šūnās pēc to elektroporācijas ar rekSFV1/dsRed RNS, bet parādīta samazināta rekSFV inficētspēja B16-F10 šūnās. Tika pārbaudīta šūnu proliferācija, izmantojot MTT metodi piecu dienu garumā pēc rekSFV kombinētas iedarbības uz B16-F10 šūnām ar dažādu koncentrāciju ķīmijpreparātiem DOX un 5Fu, lai noteiktu kombinācijterapijas citopātisko efektu. RekSFV sinerģija ar ķīmijpreparātiem bija novērojama abos gadījumos. RekSFV kombinācijā ar DOX uzrādīja zemu citopātiskā efekta potenciālu, bet augstu B16-F10 šūnu inficētspēju. Kombinācijā ar 5Fu rekSFV uzrādīja augstu citopātiskā efekta potenciālu, bet zemu inficētspēju B16-F10 šūnās. Lai pārliecinātos par transdukcijas efektivitāti B16-F10 šūnās pēc to apstrādes ar ķīmijpreparātiem, tika veikta FACS analīze. Secinājām, ka rekSFV ir augsts citopātiskais potenciāls peļu melanomas šūnās, bet nepieciešama specifiskas stratēģijas izveide rekSFV vektora izmantojumam B16-F10 šūnu kultūrā.

Atslēgas vārdi: onkolītiski vīrusi, rekSFV vektors, ķīmijterapija, pretvēža terapija.

Summary

Oncolytic virotherapy is a promising strategy of gene therapy in curing cancer. In this study the potential of oncolytic alphavirus representative Semliki Forest virus (SFV) was studied. There is not any specific applications for Semliki Forest virus in B16-F10 cells. The aim of this study was to examine the therapeutic application of alphavirus vector SFV1/dsRed that has been created on the base of Semliki forest virus replicon, on mouse melanoma B16-F10 cell line *in vitro* in combination with chemotherapeutical agents 5Fu (5-fluorouracil) and DOX (doxorubicin). RekSFV1/dsRed with high titre was obtained. It was proved that RNA of rekSFV1/dsRed is asble to replicate in B16-F10 cells after electroporation but rekSFV infectivity in B16-F10 cells was low. MTT method was used for five days to determine cell proliferation after combined application of rekSFV and chemotherapeutic agents DOX and 5Fu on B16-F10 cells. In this way it was possible to detect the cytophatic effect of combined therapy. Synergism between both chemotherapeutic agents and rekSFV was observed. RekSFV showed low potential cytopatic effect in combination with DOX, as well as high infectivity in B16-F10 cells. High potential cytophatic effect was shown after combined therapy with 5Fu and rekSFV but virus infectivity in this case was low. In order to determine the effectivity of transduction in B16-F10 cells after treatment with chemotherapeutics, FACS analysis was carried out. We concluded that rekSFV is of a high cytophatic potential but new strategic applications for the use of rekSFV in B16-F10 cell culture are needed.

Key words: oncolytic viruses, recSFV vectors, chemotherapy, cancer therapy.

Ievads

Statistikas rādītāji liecina, ka mūsdienās vēzis ir viena no izplatītākajām slimībām pasaulē. 2012. gadā ar šo slimību tika diagnosticēti 14,1 miljons pieaugušo pasaulē (3,45 miljoni Eiropā, bet 8,2 miljoniem cilvēku (1,75 miljoni Eiropā) vēzis bija nāves cēlonis. Pasaulē visvairāk cilvēku slimo tieši ar plaušu (13%), krūts (12%), zarnu (10%) un prostatas (8%) vēzi (10, 16). Tiek meklētas arvien jaunas vēža terapijas stratēģijas.

Līdz ar modernās biotehnoloģijas attīstību un gēnu terapijas konceptu 20.gs. pēdējā dekādē pieauga interese par vīrusu izmantošanu vēža terapijā. Mūsdienās viroterapija ir tikpat izmantojama metode vēža ārstēšanā kā ķirurģiska iejaukšanās, ķīmijterapija un radiācijas terapija. Īpaši onkolītiskā viroterapija ir daudzsološa gēnu terapijas forma vēža ārstēšanā, izmantojot dabas dotos aģentus, lai atrastu un iznīcinātu audzēja šūnas. (30)

Viens no onkolītisko vīrusu pārstāvjiem ir alfavīruss, kas pieder *Alphavirus* ģintij, *Togaviridae* dzimtai (7). Alfavīrusu vektoriem piemīt vairākas priekšrocības to izmantošanai vektoru sistēmu izveidē un gēnu terapijā, tai skaitā liela vektora kapacitāte, plašs tropisms, spēja inficēt dažādas zīdītāju šūnu līnijas gan *in vitro*, gan *in vivo*, spēja izraisīt *TP53* gēna neatkarīgo apoptozi (31), replikācijas defektīvu vektoru īslaicīga ekspresija, augsts transgēna produkcijas līmenis, iespēja iegūt augstu vīrusa titru *in vitro* (10^7 - 10^8 v.d./mL), kā arī alfavīrusu vektoru ir biodroši cilvēkiem (34;38).

Viroterapijas efektivitāte ir atkarīga no specifiska tropisma un augstas vīrusa replikācijas spējas. Kombinējot viroterapiju ar ķīmijterapiju, ir iespējams novērot pozitīvu citotoksiskā vīrusa un ķīmijpreparātu sinerģismu (18;28;22). Ķīmijpreparātu iedarbība uz alfavīrusu inficētspēju nav tikusi detalizēti pētīta, bet dažādos pētījumos ticis parādīts daudzsološs alfavīrusu terapeitiskais potenciāls kombinācijā ar ķīmijpreparātiem (35;37). Kombinētai ķīmijterapijas un viroterapijas stratēģiju izpētei ir liels potenciāls medicīnā nākotnē.

Darba mērķis:

Pārbaudīt uz Semliki meža vīrusa (SFV) replikona pamata izveidota rekombinanta alfavīrusa vektora rekSFV1/dsRed terapeitisko iedarbību peļu melanomas šūnu līnijā B16-F10 *in vitro* kombinācijā ar 5Fu (5-Fluorouracil) un DOX (Doxorubicin) ķīmijpreparātiem.

Darba uzdevumi:

1. Rekombinanta, replikācijas defektīva alfavīrusa vektora rekSFV1/dsRed iegūšana, titra noteikšana un inficētspējas pārbaude BHK-21 šūnu kultūrā *in vitro*.
2. RekSFV1/dsRed inficētspējas un citopātiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnu kultūrā *in vitro*.
3. Ķīmijpreparātu 5Fu un DOX dažādu koncentrāciju citotoksiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās *in vitro* un koncentrāciju optimizācija.
4. RekSFV/red un ķīmijpreparātu DOX un 5Fu terapeitiskās kombinācijas efektivitātes pārbaude uz B16-F10 šūnām *in vitro*.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Alfavīrusu vektoru potenciāls pretvēža gēnu terapijā

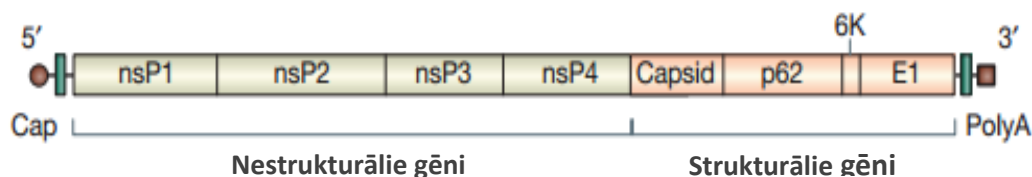
1.1.1. Alfavīrusu struktūra un izplatība

Alfavīrusi ģints *Alphavirus* pieder *Togaviridae* dzimtai. To genoms sastāv no pozitīvas vienpavediena RNS, kas apņemta ar apvalku. Zīdītāju alfavīrusi tiek pārnesti kā starpsaimniekus izmantojot moskītas, bet kā saimnieku izmanto gan moskītu, gan cilvēka organismu. Visvairāk izpētītie alfavīrusu pārstāvji, kas mūsdienās tiek izmantoti vīrusu vektoru izveidei ir Semliki meža vīruss (SFV – *Semliki Forest virus*), Sindbis vīruss (SIN – *Sindbis virus*) un Venecuēlas zirga encefālīta vīruss (VEE – *Venezuelan equine encephalitis virus*). SFV pirmo reizi no moskītiem tika izolēts 1948. gadā Ugandā, un tas ir pirmais vīruss, kurš izmantots alfavīrusu vektoru sistēmas radīšanai (7).

Tāpat kā citi alfavīrusi, darbā izmantotais pārstāvis SFV ir mazs, apvalkots vīruss ar diametru 70nm (7). SFV genoms ir 11,2 kb gara (+) ssRNS molekula, kas 5' galā satur *cap* struktūru, bet 3' galā ir poliadenilēta. Genomā ir divi atvērtās lasīšanas rāmji (ORF – *open reading frames*). ORF, kas atrodas tuvāk 5' galam (nsP1-4) kodē četrus alfavīrusa nestrukturālos proteīnus, kas veido replikāzes kompleksu, bet otrs ORF kodē strukturālos proteīnus: kapsīda proteīnus, membrānas izauguma proteīnus E1-3, kā arī virionā dažādos daudzumos sastopamo daudz mazāko proteīnu 6K (*skat. 1.attēlu*) (6).

42S RNS genoms ir iepakots kapsīdā, kas sastāv no 240 viena un tā paša kapsīda proteīna (C) kopijām, veidojot ikosaedrālu T=4 simetriju. Kapsīds ir apņemts ar lipīdu dubultslāni, kas iegūts vīrusam atdaloties no šūnas membrānas un satur arī membrānai raksturīgus izaugumus – glikoproteīnus E1-3 (7).

Mīnus-ķēdes RNS sintēzi un *cap* struktūru veidošanos vīrusa RNS ierosina nsP1 gēns, savukārt nsP2 atbild par proteāžu un helikāžu aktivitāti. Gēns nsP4 satur vīrusa RNS polimerāzes katalītisko subvienību. Precīza nsP3 funkcija nav zināma, tomēr aprakstīts, ka tas, iespējams, ir fosfoproteīns, kas iesaistīts RNS replikācijā (20).



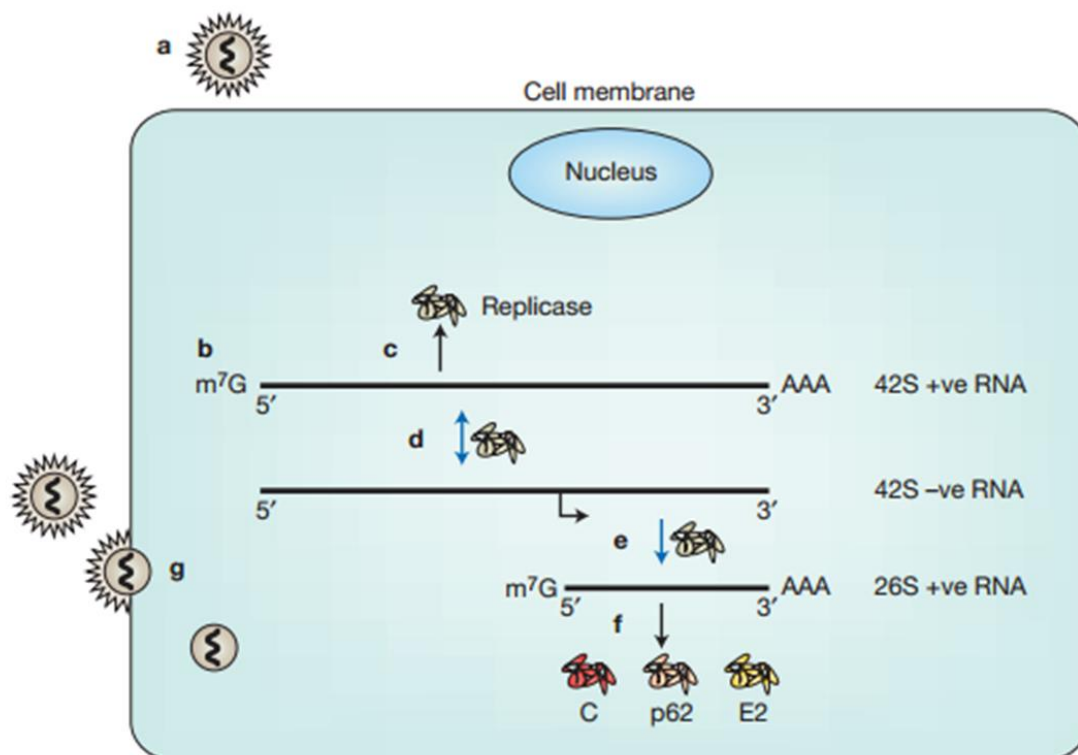
1. attēls. Semliki meža vīrusa (+)RNS genoma uzbūve. 11,2 kb garā SFV (+)RNS satur Cap struktūru 5' galā (5' brūnais aplis) un ir poliadenilēta 3' galā (3' brūns kvadrāts). Zaļie taisnstūri apzīmē 5' un 3' netranslētos reģionus. Nestrukturālie gēni nsP1-4 kodē četrus nestrukturālos (ns) proteīnus, kuri veido RNS polimerāzes kompleksu; strukturālie gēni kodē vīrusa kapsīda proteīnus (Capsid) un apvalka proteīnus E1-3 un 6K; p62 ir E2-3 priekštecis (6).

Figure 1: The (+) RNA genome of Semliki Forest virus. Positive strand RNA genome of 11,2 kb in length that contains Cap structure at 5' end (5' brown circle) and is polyadenylated at the 3' end (3' brown square). Green rectangle indicates 5' and 3' nontranslatable regions. The non-structural genes nsP1-4 encode four non-structural proteins (ns), that form RNA polymerase complex; structural genes encode capsid proteins and envelop proteins E1-3 and 6K; p62 is precursor of E2-3. (2)

Alfavīrusu saimnieku lokā ir gan insektu, abinieku, rāpuļu, gan putnu un zīdītāju šūnas. Infekcija notiek, atpazīstot šūnas virsmas proteīnus, lai gan tie alfavīrusiem līdz šim nav pilnībā aprakstīti. Kā zināmākais daudzu šūnu receptors, pie kā saistās alfavīrusi ir laminīna receptori. Alfavīrusu cikla (*skat.2.attēlu*) sākumā vīruss atpazīst šūnu, tad vīrusa apvalka membrāna saplūst ar mērķšūnas membrānu vai arī vīrusa daļiņas tiek endocitētas atkarībā no šūnas tipa. Vīrusa genoma (+)RNS tiek izmantota, lai kopētu (-)RNS ķēdi, kura tālāk tiek izmantota par matricu daudzu jaunu (+)RNS ķēžu sintēzei. Pilna garuma 42S RNS un subgenomiskā 26S RNS, kas kodē strukturālos gēnus tiek sintezētas šūnā (20). Strukturālie proteīni tiek sintezēti par matrici izmantojot subgenomisko 26S RNS, kura tiek transkribēta no (-)RNS ķēdes no subgenomiskā promotera 26S. Tieši šī sintēze tiek izmantota alfavīrusu vektoru konstruēšanā. Strukturālo proteīnu ORF vietā 26S reģionā iespējams ievietot MCS (*Multiple cloning site*) rajonu, kas dod iespēju klonēšanai un augstai heterologo gēnu ekspresijai, kuri tiek ekspresēti no 26S promotera (6).

Vīrusa nukleokapsīds tiek veidots no kapsīda proteīniem un vīrusa ssRNS un tiek transportēts uz šūnas plazmatisko membrānu. Vienlaicīgi no šūnas endoplazmatiskā tīkla ar Goldži aparāta palīdzību tiek transportēti jaunsintezētie vīrusa apvalka proteīni līdz šūnas membrānai, kas apņem vīrusa nukleokapsīdu, ļaujot nobriedušām vīrusa daļiņām atstāt šūnu.

Šis process ir ļoti efektīvs, un tiek sintezētas vīrusu daļiņas ar augstu titru no $10^9 - 10^{10}$ vīrusa daļiņām/mL 24 stundu laikā (20).



2. attēls: Alfavīrusu replikācijas cikls. Attēlā norādīti SFV replikācijas un ekspresijas soļi zīdītāju šūnā. A) Vīrusa adsorbēcija un penetrācija (cell membrane – šūnas membrāna; nucleus - kodols). B) Pilna garuma 42S (+)RNS ķēde tiek atbrīvota šūnas citoplazmā. C) Vīrusa replikācija sākas ar pirmā ORF translāciju, kā rezultātā tiek izveidots vīrusa replikāzes komplekss (Replicase). D) Replikāze katalizē gan 42S (-)RNS, gan 42 (+)RNS ķēdes veidošanos. E) Replikāze katalizē arī transkripciju sākot no 26S promotera uz 42S (-) RNS ķēdes, lai veidotu subgenomisko 26S (+)RNS, kas F) kodē SFV strukturālos proteīnus. Jaunsintezētā genomiskā RNS un kapsīda proteīni citosolā formē nukleokapsīdu un asociējas ar glikoproteīniem pie šūnas membrānas, kur G) vīrusa daļiņas atstāj šūnu.

Figure 2: Alphavirus replication cycle. The picture demonstrates SFV replication and expression steps in mammalian cells. A) The virus adsorption and penetration. B) Full-length 42S (+) RNA chain is released in the cytoplasm of the cell. C) Virus replication begins with the first ORF translation, resulting in the virus replicase complex formation (Replicase). D) Replicase catalyzes formation of both 42S (-) RNA and 42 (+) RNA chains. E) Replicase catalyzes the transcription starting from the promoter 26S on 42S (-) RNA chain to form subgenomic 26S (+) RNA, that F) encodes the SFV structural proteins. Newly synthesized genomic RNA and capsid proteins form a nucleocapsid in the cytosol and associate with the cell membrane glycoproteins, where G) virus particles leave the cell.

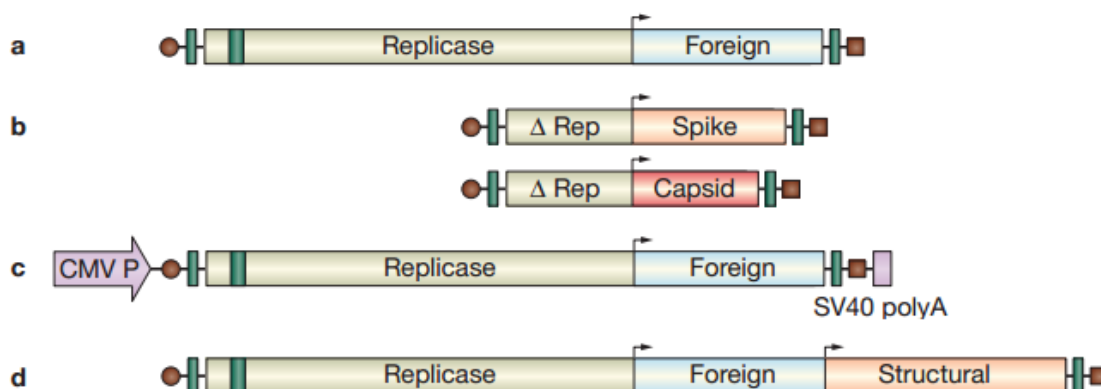
1.1.2. Alfavīrusu ekspresijas vektoru daudzveidība

Alfavīrusu vektori ir augstas ekspresijas, īslaicīgas noturības vektori, kas izmantojami terapeitiskam un profilaktiskam mērķim. Alfavīrusu vektori tiek galvenokārt izmantoti vakcīnu konstrukcijai, centrālās nervu sistēmas slimību terapijā un pretvēža terapijā (29). Šie pozitīvas ķēdes RNS vektori, kas iegūti no SFV, SIN un VEE replicējas un ekspresējas lielākajā daļā mugurkaulnieku šūnu, ieskaitot cilvēka šūnas. Daļa no vīrusa genoma, kas kodē strukturālos proteīnus un tiek amplificēts normālas infekcijas laikā tiek aizstāta ar transgēnu (30).

Alfavīrusu ekspresijas vektori tiek iedalīti trīs grupās:

- 1) Vīrusveidīgās daļiņas vai replikācijas defektīvā sistēma (VLPs – *virus like particles*). Pirmo reizi replikācijas defektīvs alfavīruss tika konstruēts 1989. gadā, izveidojot Sindbis (SIN) vīrusa ģenētisko konstrukciju. To var uzskatīt par alfavīrusu vektoru izmantošanas sākumu (41). Vīrusveidīgās daļiņas tiek iegūtas no šūnām ko-transfekcijas ceļā ar *in vitro* transkribētu replikona RNS, kurā alfavīrusu genoma daļa, kas kodē strukturālos proteīnus, tikusi aizstāta ar interesējošo gēnu un palīg-RNS (*helper RNA*), kas kodē strukturālos proteīnus (skat. 3.(a) un 3.(b) att.). Ar vīrusveidīgām daļiņām inficētās šūnās novērojama augsta interesējošā gēna ekspresivitāte, un tajā pašā laikā sistēma ir arī sevi limitējoša, jo palīg-RNS nav iekapsidēta (30). Tātad vīrusveidīgās daļiņas satur replikona RNS, kas ir defektīva, jo strukturālos proteīnus kodējošo gēnu vietā satur transgēnu, tāpēc spēj iziet tikai vienu replikācijas ciklu (30).
- 2) Replikācijas kompetenti vektori. 1991. gadā tika izveidota pašreplīcējoša (replikācijas kompetenta) rekombinantu alfavīrusu vektoru sistēma. Šīs sistēmas vektori satur gan strukturālos proteīnus kodējošos gēnus, gan transgēnu (skat. 3.(f) att.) (6). Replikācijas kompetenti alfavīrusu vektori var iziet vairākus replikācijas ciklus šūnu kultūrā vai saimnieka organismā. Šo vektoru iegūšanai tiek izmantotas vairākas stratēģijas. Pirmkārt, svešais gēns vai gēni var tikt ievietoti nestrukturāla poliproteīna izvēlētās vietās tā, ka tie tiek ekspresēti ar dažiem alfavīrusa nestrukturālajiem proteīniem saistītā formā. Šādi vektori svešo proteīnu ekspresē infekcijas agrās fāzēs. Otrkārt, proteīns var tikt ekspresēts arī kā alfavīrusa kodētā strukturālā vai ns-proteīna daļa. Treškārt, ekspresijas vienību skaits vektorā var tikt paaugstināts, ievietojot SG promotera kopijas alfavīrusu genomā vai nu 3'-gala netranslētajā reģionā (UTR – *untranslated region*) vai SIR (*short intergenic region*) reģionā starp nestrukturālos un strukturālos proteīnus kodējošajiem reģioniem (30; 24).
- 3) DNS vektoru sistēma. Šajā gadījumā SP6 RNS polimerāzes promotēris ir aizvietots ar CMV (citomegalovīrusa) promotēri. Pēc vektora nonākšanas šūnās, RNS polimerāze II nodrošina alfavīrusa replikona transkripciju. DNS vektoru sistēma var tikt izmantota

vīrusveidīgu daļiņu iegūšanai, tomēr visbiežāk tā tiek izmantota alfavīrusu replikonu transkripcijai un sekojošai proteīna ekspresijai šūnās, kas pakļautas transfekcijai (13).



3.attēls: Alfavīrusu vektoru daudzveidība. (a)Vīrusveidīgās daļiņas vektors. Vektors satur četrus gēnus, kas kodē replikāzes kompleksu (nsP1-4), bet nesatur strukturālos proteīnus kodējošos gēnus (C, p62, 6K, E1). Strukturālie gēni ir aizstāti ar MCS (multiple cloning site) reģionu, kurā var tikt ievietoti sveši gēni. (b) Kapsīda un apvalka proteīnu palīgvektori. Šie vektori satur gēnus, kas kodē strukturālos proteīnus, bet replikāzes reģionā, kas ietver arī RNS-iepakojšanas signālu, ir vērojama delēcija (Δ Rep – deleted replicase). (c) DNS-RNS vektoru sistēma. SFV replikons ir novietots zem citomegalovīrusa nekavējoties-agrā promotera (CMV P - cytomegalovirus immediate-early promoter), kuru atpazīst RNS polimerāze II. SV40 transkripcijas terminācijas reģions ir novietots replikona 3' galā. (d) Replikācijas kompetents SFV vektors. Otrs subgenomiskais promoteris un MCS (multiple cloning site) reģions ir novietots starp nestrukturālos un strukturālos proteīnus kodējošajiem gēniem (6).

Figure 3: Alphavirus expression vectors. (a) Virus-like particle vector. The backbone vector carries four genes coding for the replicase complex (nsP1 –4), but does not contain the structural genes (C, p62, 6K,E1). The structural genes are replaced with a multiple cloning site into which foreign genes can be inserted. (b) Capsid and spike helper vectors. These vectors carry the genes coding for the structural proteins but have a deletion in the replicase region that includes the RNA-packaging signal. (c) DNA –RNA layered vector. The SFV replicon is placed under the control of a cytomegalovirus immediate-early promoter (recognised by RNA polymerase II). An SV40 transcription termination region is placed at the 3' end of the replicon. (d) Replication- competent SFV vector. A second subgenomic promoter and multiple cloning site is placed between the nonstructural genes and the genes coding for the structural proteins (6).

1.1.3. Rekombinanto alfavīrusu vektoru pielietojums onkoterapijā

Alfavīrusu vektoriem piemīt vairākas priekšrocības to izmantošanai vektoru sistēmu izveidē un gēnu terapijā. Kā pirmā minama alfavīrusu plašais tropisms; tie spēj inficēt daudz zīdītāju šūnu līnijas gan *in vitro*, gan *in vivo*. RNS replikona klātesamība rada augstu RNS ekspresiju inficētajās šūnās, kas ir pamatā ļoti augstai heterologu gēnu ekspresijai. Replikācijas defektīvu vektoru pielietojums dod iespēju īslaicīgai ekspresijai, kas ir nozīmīgi vēža gēnu terapijā (34; 38).

Otrā alfavīrusu nozīmīga priekšrocība ir *p53* neatkarīgas apoptozes indukcijas spēja (31). Ir zināms, ka dalīšanās cikla traucējumus izraisošas mutācijas šūnas genomā noved pie neierobežoti dalīties spējīgu vēža šūnu attīstības, kā rezultātā veidojas audzējis. Audzēju šūnās supresoru gēni zaudē savas funkcijas. Viens no tiem ir arī *TP53*, kurš regulē šūnas dalīšanās ciklu, kontrolē šūnas dzīvi un nāvi. *p53* ir nozīmīgs faktors daudzu apoptozes un anti-apoptozes gēnu transkripcijā. Aptuveni 50% cilvēka vēža šūnu ir mutācijas *TP53* gēnā, turklāt, *TP53* gēna mutāciju izraisītās onkoloģiskās saslimšanas ir daudz agresīvākas un biežāk beidzas ar pacienta nāvi (1). Kā jau minēts, viena no svarīgākajām alfavīrusu īpašībām ir to izraisītais citopātiskais efekts šūnās. Adenovīrusiem un retrovīrusiem, lai izraisītu vēža šūnas nāvi, ir nepieciešama mijiedarbība ar šūnas *TP53* gēna produktu. Tāpēc, ja ir notikusi šī gēna mutācija un šūnas paliek par *TP53* gēna defektīvām šūnām, adenovīrusi un retrovīrusi nav spējīgi izraisīt šādu šūnu apoptozi (26). Turpretī, alfavīrusu inducēta apoptoze nav atkarīga no *TP53* gēna aktivitātes. Pats alfavīrusu izraisītās apoptozes mehānisms vēl nav pilnīgi skaidrs. Pētījumos ir pierādīts, ka alfavīrusu replikācijas rezultātā citoplazmā veidojas dubultspiralizētas RNS produkti, kas aktivē proteīnkināzi R (PKR). Šis enzīms, savukārt, fosforilē translācijas elongācijas faktoru (*eIF2alpha*), līdz ar to tiek traucēta šūnas proteīnu sintēze (*shut down*). No otras puses, PKR aktivē JNK proteīnkināzi (*c-Jun N-terminal kinase* no MAP kināžu grupas), kas noved pie Bad proteīna translokācijas mitohondrijos, izraisot mitohondriālā Bcl-x1 un Bak kompleksa sabrukšanu un Bak proteīna oligomerizāciju. Šo procesu rezultātā no mitohondrijiem atbrīvojas citohroms C (apoptozes centrālais proteīns), kas inducē kaspāzes kaskāžu darbību (casp9, casp8, casp3) un šūnas apoptozi (23; 39).

Onkolītiskā viroterapija ir daudzsološa gēnu terapijas forma vēža ārstēšanā, izmantojot dabas dotos aģentus, lai atrastu un iznīcinātu audzēja šūnas. Līdz ar modernās biotehnoloģijas attīstību un gēnu terapijas konceptu 20.gs. pēdējā dekadē interese par vīrusu izmantošanu vēža terapijā pieauga. Mūsdienās viroterapija ir tikpat izmantojama metode vēža ārstēšanā kā ķirurģiska iejaukšanās, ķīmijterapija un radiācijas terapija (37). Pateicoties augstākminētajām īpašībām, SFV var uzskatīt par perspektīvu vektoru sistēmu

onkoterapijā, ar kuras palīdzību organismā ir iespējams ekspresēt vajadzīgos transgēnus, veicināt proteīnu sintēzi augstā koncentrācijā un īsā laikā, kā arī inducēt vēža šūnu apoptozi. Līdz ar to, alfavīrusi var tikt izmantoti arī kā vakcīnu vektori profilaktiskos un terapeitiskos nolūkos, demonstrējot daudzsoļus rezultātus dažādos peļu audzēju modeļos (29).

Neskatoties uz plašu alfavīrusu izmantošanu pretvēža terapijā, tā iekļūšanas mehānisms šūnās nav zināms, bet spēja inficēt dažādas dabas šūnas liecina par to, ka alfavīrusi inficēšanas procesā izmanto augsti konservatīvu šūnu virsmas receptoru, kas ir raksturīgs dažādiem šūnu tipiem. Ir zināms, ka paaugstināto alfavīrusa inficētspēju audzēja šūnās nodrošina 67 kDa laminīna receptora augstā ekspresija malignās šūnās (37). Ne tikai receptori, bet arī citu faktoru ekspresija var ietekmēt alfavīrusu inficētspēju, tā piemēram, līdzīgi kā daudzi citi RNS vīrusi, arī alfavīrusi ir ļoti jutīgi pret I-tipa interferonu antivirālo iedarbību, tāpēc defekti IFN-signalizācijā ļauj efektīvāk inficēt tieši audzēja šūnas. Tātad normālās šūnās vīrusu replikācija ir samazināta, bet audzēja šūnas ir uzņēmīgas pret vīrusiem, jo nespēj atbildēt uz IFN signalizāciju (19; 37).

1.1.4. Rekombinanto alfavīrusu vektoru pielietojums melanomas terapijā

Melanoma ir viena no agresīvākajām ādas vēža formām. Alfavīrusu terapijas izstrāde šim vēža tipam izraisa īpašu interesi, jo melanomas šūnu līnijas parāda daudz pretrunīgus terapeitiskus datus. B16 šūnu līnija ir tumorgena ādas šūnu kultūra, kura ir galvenā kultūra melanomas peļu audzēju modeļu veidošanā. Šīs šūnu kultūras C57BL/6J līnijas šūnas ir adherentas, vārpstveida un epitēlijveida formas. Darbam ar šo šūnu kultūru piešķirts biodrošības līmenis 1. Šūnu kultūra jāuzskata par biobīstamu vismaz 1. drošības līmeņa aspektā. Nav informācijas, ka šī šūnu kultūra varētu izraisīt slimības veselos pieaugušajos (5).

Dažādas alfavīrusu pielietošanas stratēģijas tikušas pārbaudītas uz B16 peļu audzēju modeļiem, tā piemēram, pēc intatumorālas injekcijas ar SFV-LacZ vīrusu, ievērojama audzēju apjoma samazināšanās nebija novērojama. Savukārt līdzīga terapijas stratēģija ar SFV, kas ekspresēja citokīnu IL-12, izraisīja B16 audzēju apjoma samazināšanos par 70-90%, bet ar laiku šie audzēji atjaunojās un pilnu regresiju sasniegt neizdevās (4). Lai paaugstinātu anti-melanomas ārstēšanas efektivitāti, SFV-IL12 infekcija un sistemātiska stimulācija ar agonistu anti-CD137 tika kombinētas, parādot specifisku sinerģisku ietekmi. Salīdzinot ar nepietiekamu terapeitisko efektu, sasniegtu pēc terapijas, izmantojot tikai SFV-IL12, CD137 mAb un rekombinanta vīrusa kombinācija parādīja pilnīgu audzēju samazināšanos 75% peļu audzēju modeļu (29).

Strādājot ar B16 šūnu kultūru, 2007. gadā Rodrigues-Madoz ar kolēģiem pirmo reizi parādīja interesantu fenomenu, demonstrējot SFV vīrusa nespēju inficēt B16-F10 šūnu kultūru *in vitro*, savukārt, *in vivo* eksperimenti parādīja neievērojamu SFV transdukcijas spēju B16-F10 peļu melanomas modelī (32). Rezultāti liecināja par vairākiem faktoriem, kas piedalās alfavīrusu infekcijas un alfavīrusu RNS replikācijas procesā. Būtu nepieciešami tālāki pētījumi un dažādas manipulācijas ar vēža šūnu mikrovides faktoriem, lai saprastu alfavīrusu darbības principus un paaugstinātu onkoterapijas efektivitāti.

1.2. Ķīmijterapija kombinācijā ar viroterapiju

1.2.1. Ķīmijterapijas potenciāls alfavīrusu onkolītiskās aktivitātes paaugstināšanā

Viroterapijas efektivitāte ir atkarīga no specifiska tropisma (primāras audzēju inficētspējas) un augsta vīrusa replikācijas līmeņa. Pētījumos ticis parādīts, ka klasiskie pretvēža ķīmijpreparāti, piemēram, 5-fluoruracils (5-FU) un gemcitabīns kombinācijā ar onkolītiskiem herpes vīrusiem vai adenovīrusiem ir spējīgi paaugstināt vīrusa infekciju un replikāciju, tādējādi paaugstinot vīrusa vektora terapeitisko efektu, bet aktivācijas mehānisms, kas noved pie vīrusa transgēna produkcijas paaugstināšanas šajos pētījumos aprakstīts netika (9; 14). Kombinējot viroterapiju ar ķīmijterapiju, ir iespējams novērot pozitīvu citotoksiskā vīrusa un ķīmijpreparātu sinerģismu. Tā piemēram, dažādos pētījumos tika novērots, ka minimāla 5-FU doza, lietota kopā ar rekombinantiem adenovīrusiem, rada sinerģisku onkoterapeitisku efektu dažādās šūnu līnijās un peļu audzēju modeļos *in vivo* (18; 28; 22).

Ķīmijpreparātu iedarbība uz alfavīrusu inficētspēju nav tikusi detalizēti pētīta, bet dažādos pētījumos ticis parādīts daudzsološs alfavīrusu terapeitiskais potenciāls kombinācijā ar ķīmijpreparātiem. Tā piemēram, veicot ķīmijterapiju ar 5 mg/kg doksorubicīna dozu pirms viroterapijas pielietošanas, tika ievērojami paaugstināts Sindbis-Her2/neu vektora immunoterapeitiskais efekts, kas noveda pie krūts audzēja progresijas kavēšanas peļu audzēju modeļos. Savukārt, neskatoties uz to, ka doksorubicīns ir standarta ķīmijpreparāts, kuru izmanto krūts vēža terapijā, doksorubicīns, lietots bez SIN-balstītas vakcīnas, neparādīja audzēju samazināšanos. Protams, ne visas alfavīrusu un pretvēža preparātu kombinācijas ir efektīvas, kā arī to efektivitāte ir atkarīga no terapeitiskās stratēģijas. Tā piemēram, pielietojot SIN-Her2/neu immūnterapeitisko vakcīnu kombinācijā ar 25 mg/kg paklitaksela peļu krūts audzēja modeļos *in vivo*, pretvēža efekts parādīts netika (15), bet, pateicoties paklitaksela īpašībām inhibēt audzēju angiogēnēzi un paaugstināt asinsvadu caurlaidību, peļu ārstēšana ar 16 mg/kg taksola ievērojami paaugstināja rekSIN vīrusa citotoksiskās īpašības, rezultātā parādot audzēju attīstības kavēšanu un vidējas dzīvildzes pagarināšanu (35). Līdzīgi rezultāti

tika aprakstīti arī pētījumā, kur onkolītisks SIN vektors kombinācijā ar topoizomerāzes inhibitoru irinotekānu izraisīja ilgstošu olnīcas audzēju SCID peļu izdzīvošanu (17).

1.2.2. Pētījumā izmantotā ķīmijpreperāta 5-fluorouracila raksturojums

Uracila fluorinētais analogs 5-fluorouracils (5-FU) ir antimetabolīts, kas ir aktīvs pret dažādiem solīdiem audzējiem. Atšķirībā no uracila, 5-FU pirimidīna gredzena piektā oglekļa pozīcijā ūdeņraža atoms ir aizvietots ar fluora atomu. Lai gan precīzs fluorouracila darbības mehānisms nav izskaidrots, tā galvenā iedarbība ir iejaukšanās DNS sintēzē un mRNS translācijā. Tomēr pacientiem, kuri ārstēti ar 5-FU, ir novērojamas dažādas nevēlamas blakusparādības, jo ķīmijpreperāts nav specifiski citotoksisks tikai audzēja šūnām. Ir veiktas dažādas 5-FU struktūras modifikācijas, lai pārvarētu šādus medikamenta trūkumus. Līdzīgi citiem ķīmijpreperātiem arī 5-FU efektivitāte pretvēža terapijā balstās uz vēža šūnu augsto replikācijas līmeni un traucējumiem bioķīmiskās sintēzes procesā. Lai vai kā, lielākā daļa ķīmijpreperātu nav vēža šūnu specifiski, tāpēc arī visa ķermeņa normālu šūnu augšana tiek negatīvi ietekmēta. Turklāt ķīmijpreperātu lokalizācija tiek ierobežota, organismam tos koncentrējot aknās un nierēs, kur tie tiek pārstrādāti, un tas rezultējas šo orgānu bojājumos (2).

5-FU metabolisms ir plaši pētīts, un vairāki bioķīmiskie ceļi ir tikuši raksturoti. Anaboliskajā ceļā (citotoksiskais mehānisms) 5-FU tiek pārvērsts nukleozīdos 5-fluorouridīns (5-FUrd) un 5-fluoro-2'-dezoksiuridīns (5-FdUrd) un pēc tam vienā no trim aktīviem nukleotīdiem: 5-fluorodezoksiuridīna monofosfāts (FdUMP), 5-fluorodezoksiuridīna trifosfāts (FdUTP) vai 5-fluorouridīna trifosfāts (FUTP). FUTP un FdUTP tiek inkorporēti RNS un DNS, attiecīgi vājinot gēnu spēju kodēt informāciju un galu galā aizkavējot DNS sintēzi. Kataboliskajā ceļā enzīms dihidropirimidīna dehidrogenāze (DPD) metabolizē 5-Fu līdz tā neaktīvai formai 5-fluoro-dihidrouracilam (5-FUH₂). Nozīmīgi, ka DPD daudzums indivīdos noteikts ģenētiski un var variēt, tāpēc arī 5-Fu metabolizēšanas efektivitāte var variēt no 15-80 %. Vienas „standarta” dozas pielietojums var novest pie smagas toksicitātes un pat nāves indivīdos, kuriem ir DPD deficīts (2).

1.2.3. Pētījumā izmantotā ķīmijpreperāta doksorubicīna raksturojums

Doksorubicīns (DOX) ir citotoksiska antraciklīna grupas antibiotika ar glikozīda struktūru, ko iegūst no sēnēm *Streptomyces peucetius* vai *caesius*. Doksorubicīnam piemīt antimitotiskas un antiproliferatīvas īpašības. Tā darbības precīzs mehānisms nav pilnībā noskaidrots, tomēr, eksperimentu dati liecina, ka tas spēj saistīties ar DNS, veidot brīvos radikāļus un tieši iedarboties uz šūnu membrānu. Šūnas ir īpaši jutīgas pret preparātu S un G2 fāzē (3).

Doksorubicīns ir viens no visefektīvākajiem pretvēža medikamentiem ar plašu darbības spektru, tajā skaitā arī limfoblastisku leukēmiju, krūts vēža, olnīcu vēža, un aknu karcinomas ārstēšanā. Tomēr tā klīniskā pielietošana ir ierobežota ķīmijpreparāta izraisīto kaitīgo blakusparādību dēļ, no kā visnozīmīgākā ir doksorubicīna kardiotoksicitāte, kas var novest pie kardiomiopātijas un sirds mazspējas (43).

1.3. RFP (*red fluorescent protein*) gēna izmantošana gēnu terapijas vektoru aktivitātes noteikšanā

Tā kā marķiergēni ir tādi gēni, kuru produkti var tikt vizuāli identificēti, un to atrašanās vieta var tikt noteikta, šī metode ļauj ātri identificēt transformētus audus. Gēniem, kuri atbild par fluorescentu proteīnu sintēzi ir priekšrocības pār citiem marķiergēniem, jo tie var tikt vizuāli detektēti dzīvās šūnās, nepielietojot invazīvas procedūras. Gēnu ekspresija šūnās var tikt noteikta jau īsi pēc šūnu transformācijas ar šādu gēnu (27).

Gēnu terapijas pētījumos vektora tropisma un piegādātā gēna ekspresijas efektivitātes noteikšanai bieži izmanto dažādus viegli detektējamus proteīnus kodējošus marķiera gēnus. Viens no tiem ir sarkano fluorescējošo proteīnu (dsRed – red fluorescent protein) kodējošais gēns Red, kas pirmoreiz tika atrasts korallim *Discosoma sp.* jeb jūras anemone. Šajā organismā proteīnam ir loma korāļa simbiotisko mikroaļģu fotosistēmu aizsardzībā no augsta gaismas līmeņa, kas var izraisīt fotosistēmu fotoinhibāciju. Gēna kodējošā proteīna pilnais nosaukums ir Red fluorescent protein drFP583. Proteīna peptīdu sekvenču pilns garums ir 225AA (aminoskābes). Proteīna absorbcijas maksimums (ierosināšanas spektrs) ir 558nm, bet emisijas maksimums pie 583nm (36). Rekombinantā dsRed proteīna molekulārā masa ir 27.6 kad (8).

Fluorescences mikroskopijā darbam ar dsRed nepieciešams lietot specifisku ierosināšanas filtru, kas laiž cauri tikai tos gaismas viļņus, kuri efektīvi ierosina konkrēto krāsojumu. Filtri ir apvienoti filtru blokos, kuru nosaukumi doti, vadoties pēc to ierosināšanas filtra. RFP gadījumā jāizmanto G filtrbloks, kas ierosina dsRed ekspresiju zaļās (G - green) gaismas spektrā (12).

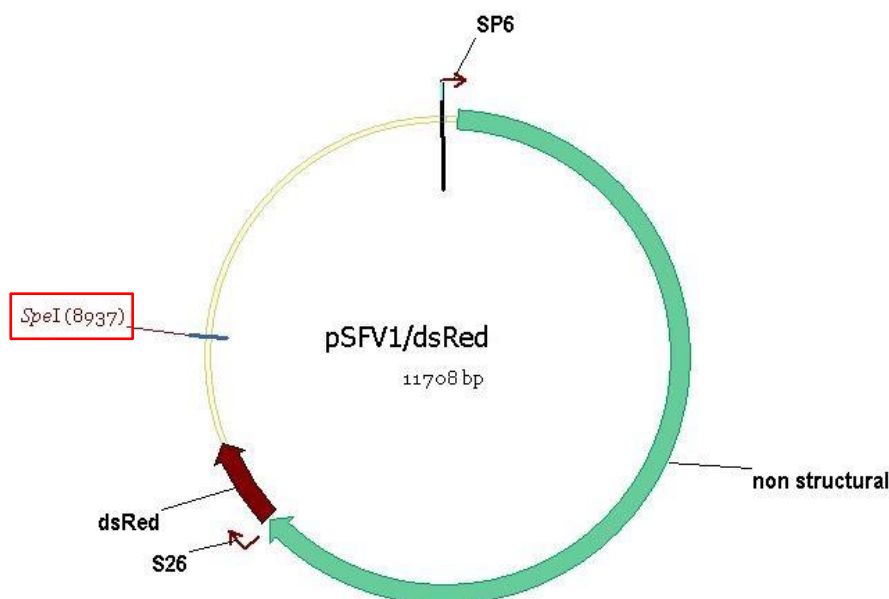
2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Rekombinantā alfavīrusa rekSFV1/dsRed iegūšana

2.1.1. DNS transformācija un E.coli šūnu savairošana

Darbā tika izmantotas sekojošas plazmīdas:

- pSFV1/*Helper1* plazmīda¹ – (8194 bp). Kodē SFV strukturālos gēnus (att. 4).
- pSFV1/dsRed plazmīda² – (11708 bp). Kodē RFP (red fluorescent protein) gēnu un SFV nestrukturālos gēnus (att.5).

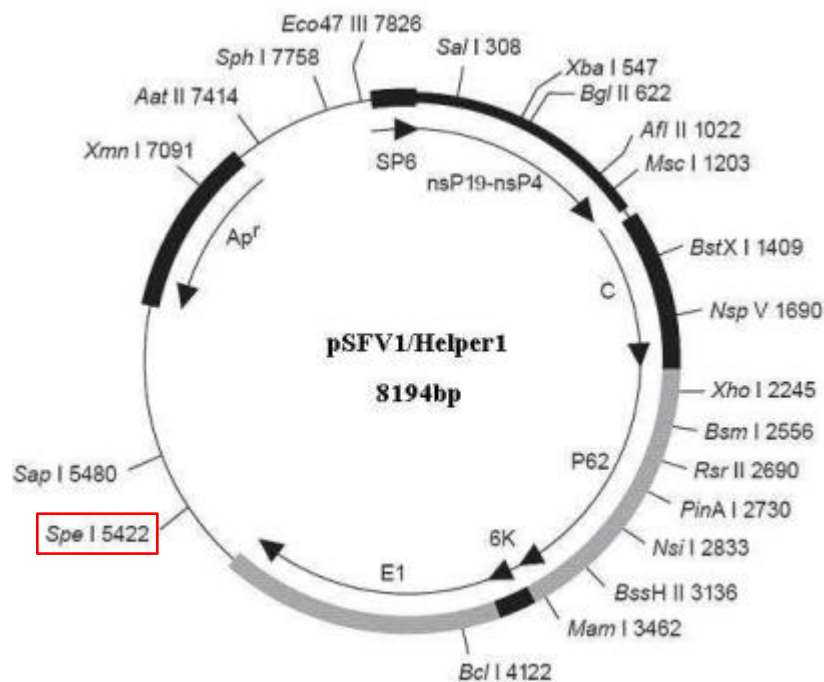


4. attēls. pSFV1/dsRed plazmīdas restrikcijas karte: *non structural* - SFV nestrukturālo proteīnu (NsP1-4) gēni; SP6 - RNS polimerāzes promoteris *in vitro* transkripcijai; 26S - RNS subgenoma promoteris, dsRed – RFP (*red fluorescent protein*) kodējošais gēns, *SpeI* – plazmīdas DNS linearizācijas saits.

Figure 4. pSFV1/dsRed plasmid restriction map: *non structural* – SFV nonstructural protein (Ns1-4) genes, SP6 – RNA polymerase promoter for transcription *in vitro*, 26S - RNA subgenomic promoter, dsRed – RFP (red fluorescent protein) gene, *SpeI* restriction and plasmid DNA linearization site.

¹ Prof. H. Garofa dāvinājums (*Karolinska institute, Sweden*)

² Dr. A. Zajakina (*Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs*)



5. attēls. pSFV1/Helper1 plazmīdas restrikcijas karte: SFV strukturālo proteīnu gēni (C, P62, 6K, E1); SP6 - RNS polimerāzes promoteris *in vitro* transkripcijai; *SpeI* plazmīdas DNS linearizācijas saits.

Figure 5. pSFV1/Helper1 plasmid restriction map: genes of SFV structural proteins (C, P62, 6K, E1); SP6 - RNA polymerase promoter for transcription *in vitro*; *SpeI* restriction and plasmid DNA linearization site.

Transformācija tika veikta, lai savairotu vīrusa transkripcijai nepieciešamo pDNS. Viens μL (100 - 500 ng DNs) pSFV1/red plazmīdas tika pievienots (iemiesīts) ledū atsaldētām 100 μL DH5 α šūnām (*Echerichia coli* celms), un turēts 10 – 15 minūtes ledū. Šūnas tika pakļautas karstuma šokam (*heat-shock*) 35 sekundes 42°C, tā veicinot plazmīdas iekļūšanu šūnās. Pēc karstuma šoka izraisīšanas maisījums tika inkubēts ledū divas minūtes. Šūnu suspensijai tika pievienoti 0,9 mL LB barotnes bez ampicilīna, un maisījums vienu stundu tika inkubēts 37°C kratītājā, lai šūnas vairotos. Tā kā plazmīdās bija ieklonēts arī ampicilīna rezistences gēns, par notikušo transformāciju varēja pārliecināties, uzsējot 200 μL šūnu suspensijas uz Petri platēm ar LB agarozes barotni, kurai pievienots ampicilīns (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Atsevišķas kolonijas tika atlasītas un pārsētas uz 2Ty šķidro barotni, kurai pievienots ampicilīns (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), un savairotas, inkubējot 24h +37°C.

Lai transformētās baktēriju šūnas atdalītu no augšanas barotnes un sekojoši varētu veikt pDNS izdalīšanu no *E. coli* šūnām, savairotā šūnu suspensija tika centrifugēta 10 – 15 minūtes pie 2500 apgr./min. Supernatants tika noliets no šūnu nogulsnēm. Nogulsnes tika skalotas ar 0,9% NaCl šķīdumu, un šūnu suspensija tika centrifugēta 5 minūtes pie 5000

apgr./min. Supernatants tika noliets, un baktēriju nogulsnes tālāk tika izmantotas, lai izdalītu no tām pDNS. Pēc šādas metodes tika veikta arī *E.coli* šūnu transformācija ar pSFV1/Helper1.

2.1.2. pDNS izdalīšana no baktēriju šūnām

pDNS no baktēriju šūnām tika izdalīta, izmantojot komplektu plazmīdu izdalīšanai „USB Corporation PrepEase™ Maxi Plasmid Kit” (USB corporation, USA). Plazmīdas DNS izdalīšana tika veikta atbilstoši ražotāja instrukcijām.

Darba gaitā tika izmantoti sekojoši buferšķīdumi:

S1 buferšķīdums: 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

S2 buferšķīdums: 200mM NaOH, 1% SDS

S3 buferšķīdums: 2.8M KOAc, pH 5.1

N2 buferšķīdums: 100mM Tris, pH 6.3, 15% ethanol, 900mM KCl, 0.15% TritonX-100

N3 buferšķīdums: 100mM Tris, pH 6.3, 15% ethanol, 1.15M KCl

N5 buferšķīdums: 100mM Tris, pH 8.5, 15% ethanol, 1M KCl

Lai transformētās *E.coli* baktēriju šūnas lizētu, baktēriju nogulsnes tika resuspendētas 12 mL RNase A-S1 buferšķīdumā, kurā esošais EDTA (etilēndiamīna tetraacetāts) sagrauj šūnu sienīgas, saistot divvērtīgos katjonus (Mg^{2+} , Ca^{2+}), kas nepieciešami šūnu membrānas stabilitātei, un inhibē DNS degradējošus enzīmus, bet buferšķīduma sastāvā esošā ribonukleāze degradē RNS molekulas līdz ribonukleotīdiem. Suspensijai tika pievienoti 12 mL S2-EF buferšķīduma, kurā esošais SDS (nātrija dodecilsulfāts) šķīdina šūnu membrānu fosfolipīdus un proteīnus, tā sagraujot šūnu membrānas. S2-EF buferšķīdumā esošais nātrija hidroksīds denaturē hromosomālo un plazmīdu DNS vienpavedienu ķēdēs. Mēģenes tika maigi kratītas 6 – 8 reizes, pēc tam tās tika inkubētas istabas temperatūrā 2 – 3 minūtes. Suspensijai tika pievienoti 24 mL pirms tam atdzesēta S3-EF buferšķīduma, kurā esošais kālija acetāts neitralizē šķīduma pH un veido nešķīstošu SDS/ lipīdu/ proteīnu precipitātu, kuram tiek piesaistīta genomiskā DNS. Mēģenes tika invertētas 6 – 8 reizes. Suspensija tika inkubēta 5 minūtes uz ledus, pēc tam centrifugēta 15 minūtes pie 11000 apgr./min. N tipa buferi, kas saturēja etanolu, tika izmantoti plazmīdas DNS precipitācijai no šķīduma KCl klātbūtnē. PrepEase™ – EF kolonna tika līdzsvarota ar 5 mL N2-EF bufera, filtrāts tika izliets. Šūnu suspensija tika centrifugēta pie 11000 apgr./min. Kolonna divas reizes tika mazgāta ar 24 mL N3-EF buferi un sekojoši divas reizes ar 12 mL N5-EF buferi. Šūnu lizāts tika filtrēts cauri kolonnai, filtrāts tika noliets. Kolonna tika mazgāta ar N3-EF buferi un N5-EF buferi. N5-EF buferis pirms tam tika sildīts pie 50°C, un plazmīda tika izmazgāta no

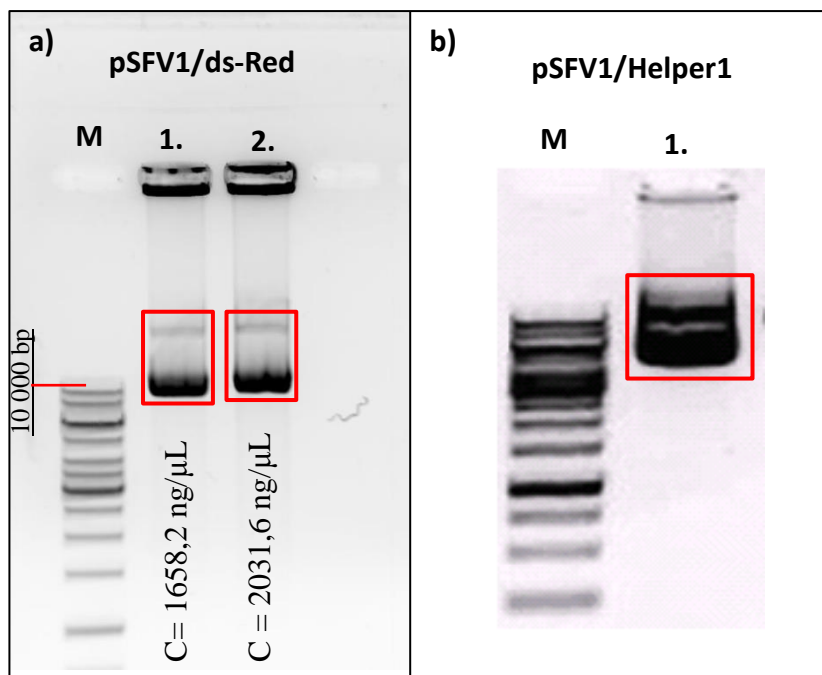
kolonnas ar 15 mL šī bufera, paraugu savācot tīrā, no nukleāzēm brīvā mēģenē. Lai izgulsnētu DNS, paraugam tika pievienoti 11 mL izopropanola istabas temperatūrā. Paraugšs tika maigi samaisīts un 30 minūtes centrifugēts pie 15 000 x g 12°C. Supernatants tika rūpīgi noliets. Lai nomazgātu DNS nogulsnes, tām tika pievienoti 5 mL 70% etanola. Paraugšs tika vorteksēts un 10 minūtes centrifugēts pie 11000 apgr./min. 20 līdz 25°C. Etanols tika rūpīgi noliets, un DNS nogulsnes žāvētas pie vakuumsūkņa. Plazmīda tika šķīdināta 300 µL H₂O, un glabāta – 20°C.

Pēc šādas metodes no transformētajām E.coli šūnām tika veikta arī pSFV1/Helper1 izdalīšana.

Izdalīto plazmīdu pSFV1/dsRed un pSFV1/Helper1 kvalitāte tika novērtēta, veicot elektroforēzi 1% agarozes gēlā 1x TAE buferšķīdumā (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA), kam pievienots 5 µL etīdija bromīda uz 100 mL TAE bufera. Paraugi tika sagatavoti šādās attiecībās: 8 µL H₂O + 1 µL paraugs + 1 µL krāsa (6 x DNA Loading Dye, Fermentas, Lietuva). Savukārt 2 µL GeneRuler™ 1kb DNA Ladder marķiera tika sajaukts ar 8 µL H₂O. Elektroforēze tika veikta pie šādiem parametriem: 85 mA; 299 V. Elektroforēzes rezultāti tika fotografēti, izmantojot programmu *Launch Vision Works LS* (skat. 6. attēlu).

Izdalīto plazmīdu pSFV1/dsRed kvantitatīva pārbaude tika veikta, spektrofotometriski ar aparātu *NanoDrop 1000 (ThermoScientific, USA)* izmērot pDNS koncentrāciju (ng/µL). Datu apstrādei tika izmantota programma *ND-1000 V 3.1.2.* (skat. 6. attēlu).

Strādājot ar komplektu „*USB Corporation PrepEase™ Maxi Plasmid Kit*”, ir jāievēro darba drošība. Tālāk minētie komplekta buferšķīdumu sastāvā esošie savienojumi raksturoti kā kairinoši acīm, elpošanas sistēmai un ādai: nātrija dodecilsulfāts (SDS) – (S2 buferšķīdumā), nātrija hidroksīds (S2 buferšķīdumā), kālija acetāts (S3 buferšķīdumā), Tris (N2, N3 un N5 buferšķīdumos), kālija hlorīds (N2, N3 un N5 buferšķīdumos). SDS raksturots kā kaitīgs norīšanas gadījumā. Savukārt N2, N3 un N5 buferšķīdumos esošais etanols ir viegli uzliesmojošs, tāpēc jāizvairās no tā tuvas novietošanas viegli uzliesmojošiem objektiem, karstumam, dzirkstelēm un atvērtai liesmai, kā arī trauki jātur cieši aizvērti. Strādājot ar komplektu, jāievēro, lai neelpotu ķīmikāliju izgarojumus, jāizvairās no ķīmikāliju kontakta ar ādu un acīm, kā arī jāvalkā aizsargājošs laboratorijas halāts, brilles darbam ar ķīmikālijām un cimdi. Profesionālim jāizvērtē, vai darbā ar komplektu nepieciešams respirators. Ir jāizvairās no ķīmikāliju iekļūšanas acīs vai uz ādas (pēc „*USB Corporation PrepEase™ Maxi Plasmid Kit*” materiālu drošības lapas (*material safety sheet*)).



6.attēls. pSFV1/ds-Red un pSFV1/Helper1 plazmīdu kvalitatīva pārbaude ar elektroforēzi 1% agarozes gelā, un koncentrāciju spektrofotometriskie mērījumi. a) - pSFV1/dsRed. M - 1Kbp DNS marķieris, 1. – 2. pSFV1/dsRed plazmīdas paraugi un to koncentrācijas (ng/μL). b) - pSFV1/Helper1. M - 1Kbp DNS marķieris, 1. pSFV1/Helper1 paraugs.

Figure 6. The quality control of pSFV1/dsRed and pSFV1/Helper1 plasmids by electrophoresis in 1% agarose gel and results of measuring concentration of samples spectrophotometrically. a) - pSFV1/dsRed. M – 1Kbp DNA length marker, 1. – 2. stands for: samples of pSFV/dsRed plasmids with shown concentration (ng/μl). b) - pSFV1/Helper1. M - 1kB DNA length marker, 1. – Sample of pSFV1/Helper1.

2.1.3. Plazmīdu restrikcija

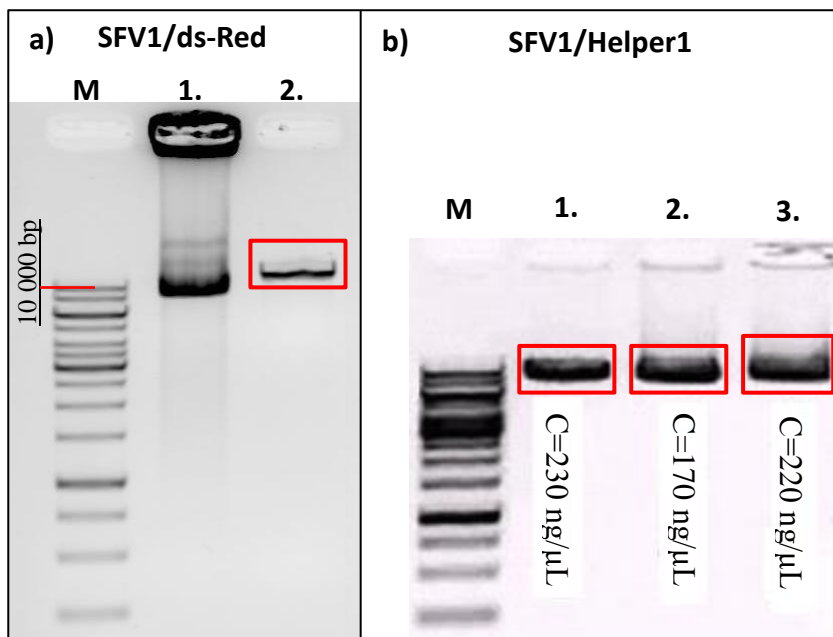
pSFV1/Helper1 un pSFV1/dsRed plazmīdu (att. 4., 5.) restrikcija (linearizācija) tika veikta, izmantojot *SpeI* (*BcuI*) restriktāzi (*Fermentas*, Lietuva). Par restrikcijas enzīma unikālo šķelšanas vietu var pārliecināties plazmīdu restrikcijas kartēs. Linearizācijas reakcija tika veikta atbilstoši ražotāja instrukcijām.

Reakcijas maisījuma kopējais tilpums bija 200 μl un sastāvs sekojošs:

- | | |
|-----------------------------|---------------|
| - DEPC H ₂ O | - līdz 200 μl |
| - SpeI (10 u/μl) | - 4 μl |
| - Yellow Tango buffer (x10) | - 20 μl |
| - pDNS | - 40 μg |

Vispirms tika aprēķināts, cik lielu tilpumu aizņem 40 µg noteiktās koncentrācijas pDNS. Ūdens tika pievienots pēc nepieciešamības atkarībā no pDNS koncentrācijas. Reaģentu maisījums tika inkubēts 3 stundas +37°C temperatūrā.

Linearizācijas rezultāti tika pārbaudīti, veicot elektroforēzi 1 % agarozes gēlā 1x TAE buferšķīdumā (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA). DNS identifikācijai tika izmantots *GeneRuler™ 1 kB DNA Ladder* marķieris (*Fermentas*, Lietuva). Elektroforēze tika veikta pie šādiem parametriem: 299V; 85 mA. Elektroforēzes rezultāti tika fotografēti, izmantojot programmu *Launch Vision Works LS* (skat. 7. att.).



7.attēls. SFV1/Helper1 DNS un SFV1/dsRed DNS kvalitatīva pārbaude ar elektroforēzi 1% agarozes gēlā un koncentrāciju spektrofotometriskie mērījumi pēc plazmīdu linearizācijas. a) - pSFV1/dsRed DNS restrikcija, izmantojot *SpeI* (*BcuI*) restriktāzi. M - 1Kbp DNS marķieris, 1. – nelinearizēta pSFV1/dsRed plazmīda, 2. – linearizēts SFV/dsRed DNS paraugs. b) - SFV1/Helper1 pDNS restrikcija, izmantojot *SpeI* (*BcuI*) restriktāzi. M - 1Kbp DNS marķieris, 1.- 3. apzīmē: linearizētie SFV1/Helper1 DNS paraugi un to koncentrācijas (ng/µL).

Figure 7. The quality control of SFV1/dsRed DNA and SFV1/Helper1 DNA by electrophoresis in 1% agaroses gel and results of measuring concentration of samples spectrophotometrically after linearisation of plasmids. a) *SpeI* (*BcuI*) restrictase was used for linearisation of pSFV1/dsRed. M – 1Kbp DNA length marker, 1. – non-linearised pSFV/dsRed plasmid, 2. – sample of linearised SFV/dsRed DNA. b) *SpeI* (*BcuI*) restrictase was used for linearisation of pSF1V/Helper1. M - 1kB DNA length marker, 1. - 3. stands for: DNA samples of linearised SFV1/Helper1 with shown concentration (ng/µl).

2.1.4. DNS koncentrēšana un attīrīšana pēc plamīdu restrikcijas

SFV1/Helper1 un SFV1/dsRed DNS tika koncentrētas, attīrītas no restriktāzes paliekām un buferšķīduma, izmantojot komplektu DNS attīrīšanai *PrepEase® DNA Clean-Up Kit (USB corporation, USA)*. DNS attīrīšana tika veikta atbilstoši ražotāja instrukcijām. DNS tika attīrīta, tai selektīvi saistoties ar silīcija dioksīda membrānu centrifugēšanas kolonnā haotropisku sāļu klātbūtnē. Pēc tam membrāna tika mazgāta ar komplektā iekļautajiem buferšķīdumiem, lai atdalītu sāļus un ūdenī šķīstošas makromolekulas.

Linearizētā DNS tika saistīta ar buferšķīdumu, sajaucot paraugu attiecībā 1:5 = paraugs:N2P buferšķīdums, un labi samaisot.

Lai paraugu ar SFV1/dsRed DNS piesaistītu pie kolonnas membrānas, kolonna tika ievietota komplektā pievienotajā ievākšanas mēģenē, paraugs tika pipetēts tieši kolonnas centrā, un tika veikta centrifugēšana vienu minūti pie 9000 apgr./min. Filtrāts tika izmests.

Kolonnas mazgāšana. Kolonnai tika pievienoti 600 µL NT3 buferšķīduma, kas satur etanolu, un tā tika centrifugēta vienu minūti pie 9000 apgr./min. Filtrāts tika izmests.

Lai kolonnu izžāvētu, tā tika centrifugēta divas minūtes pie 9000 apgr./min.

SFV1/dsRed DNS tika izmazgāta no kolonnas, tai pievienojot 50 µL DEPC H₂O un inkubējot istabas temperatūrā vienu minūti. Tika veikta centrifugēšana vienu minūti pie 9000 apgr./min.

Augstāk aprakstītie soļi tika veikti, lai koncentrētu un attīrītu arī SFV1/Helper1 DNS.

Linearizēto plazmīdu kvantitatīva analīze tika veikta, spektrofotometriski nosakot attīrītās, linearizētās DNS koncentrāciju (ng/µL). Datu apstrādei tika izmantota programma *ND-1000 V 3.1.2.* (skat. 7. att.).

Strādājot ar kitu, ir jāievēro darba drošība. Savienojums guanidīna hidrohlorīds (N2P buferšķīdumā) raksturots kā kaitīgs, ja to norij, kā arī acīm un ādai kairinošs, savukārt izopropanols (N2P buferšķīdumā) ir viegli uzliesmojošs, acīm kairinošs, tā izgarojumi var izraisīt nelabumu. Jāizvairās no darba ar uguni izopropanola uzglabāšanas vietā. Strādājot ar komplektu, jāizvairās no ķīmikāliju iekļūšanas acīs un kontakta ar ādu, kā arī jāvalkā aizsargājošs laboratorijas halāts, brilles darbam ar ķīmikālijām un laboratorijas cimdi (pēc *PrepEase DNA Clean-Up Kit* materiālu drošības datu lapām (*material safety data sheets*)).

2.1.5. rekSFV1/dsRed un rekSFV1/Helper1 RNS transkripcija *in vitro*

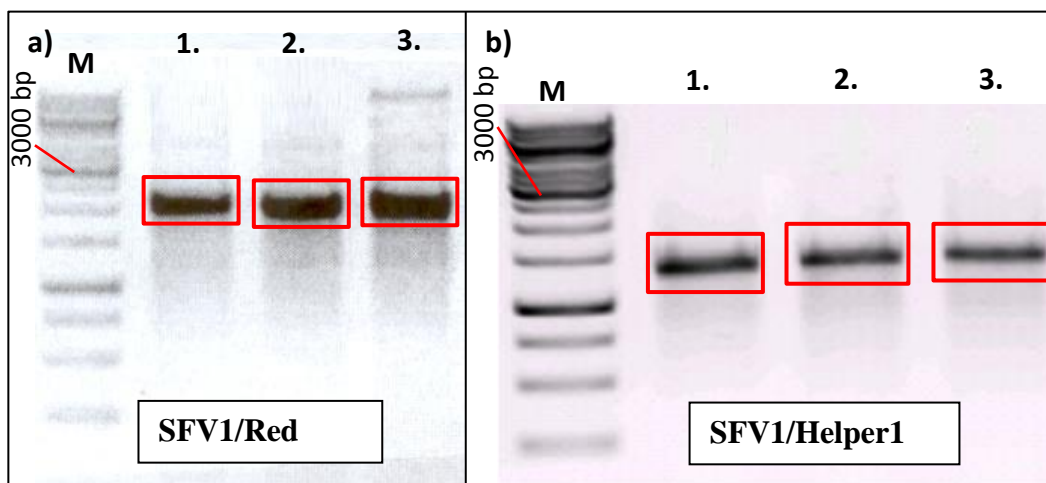
Pirms transkripcijas ir nepieciešams sterilizēt darba virsmu un pipetes ar 75% etanolu, kā arī izmantot sterilus, autoklavētus pipešu uzgaļus un endorforus, lai izvairītos no RNS degradācijas vides RNāžu ietekmē. Tā kā RNS ir salīdzinoši nestabila temperatūras ietekmē, nepieciešams reakcijas maisījumu ar RNS vienmēr turēt uz ledus.

Linearizētās rekombinantās SFV1/dsRed un SFV1/Helper1 DNS tālāk tika izmantotas RNS transkripcijai *in vitro*. Transkripcijas reakcijas maisījuma kopējais tilpums bija 50 μL . Reakcija tika veikta 10 μL transkripcijas buferšķīduma (40 mM Tris-Cl (pH 7.9), 6 mM MgCl_2 , 10mM ditiotritols, 10mM NaCl, 2mM spermidīns (*Fermentas*, Lietuva)). Transkripcijas buferšķīdumam tika pievienoti 5 μL (1mM) RNS *cap* struktūras analoga - 7mG(5')ppp(5'G) (*NewEngland Biolabs*, Lielbritānija), 10 μL (2mM) četru rNTF maisījums. Četru rNTF maisījums (20 μL ATP, 20 μL UTP, 20 μL CTP, 10 μL GTP, 130 μL H₂O) ar kopējo tilpumu 200 μL tika sagatavots iepriekš. Pēc atbilstoša daudzuma (līdz 50 μL) sterila DEPC ūdens (*Fermentas*, Lietuva) pievienošanas transkripcijas maisījumam, visi komponenti tika ar pipeti samaisīti, un atstāti uz piecām minūtēm istabas temperatūrā, lai buferī esošais spermidīns neizraisītu DNS nogulsnešanos. Reakcijas maisījumam kā nākamais tika pievienots 1 μg linearizētās SFV1/dsRed DNS, un maisījums tika samaisīts. Pēc šī soļa maisījumā tika pievienots 1 μL (20 vienības) SP6 RNS polimerāzes (*Fermentas*, Lietuva) un 3 μL (60 vienības) RNāžu inhibitora (RiboLock® RNase Inhibitor, *Fermentas*, Lietuva).

Reakcijas maisījums 1 stundu un 20 minūtes tika inkubēts +37°C temperatūrā. Pēc tādas pašas metodes tika sintezēta rekSFV1/Helper1 RNS. Jaunsintezēto RNS kvalitāte tika pārbaudīta, veicot elektroforēzi 1% agarozes gēlā 1x TAE buferī (skat.8.att.). RNS paraugi tika uzglabāti -80 °C temperatūrā.

2.1.6. RNS attīrīšana pēc transkripcijas

Jaunsintezētā RNS tika apstrādāta ar DNāzi, lai to attīrītu no DNS piemaisījumiem. RNS maisījumam tika pievienoti 2 μL DNāzes (koncentrācija – 5U/ μL , *Fermentas*, Lietuva) un 1,5 μL RNāzes inhibitora (koncentrācija – 40U/ μL , *Fermentas*, Lietuva). Reakcijas maisījums 30 minūtes tika inkubēts +37°C temperatūrā. Lai inaktivētu DNāzes enzimatisko darbību, pēc inkubācijas maisījumam tika pievienoti 2,5 μL 50 mM EDTA, un maisījums vienu minūti tika inkubēts istabas temperatūrā, pēc tam 8 – 10 minūtes 65°C temperatūrā. Attīrītas RNS kvalitāte tika pārbaudīta, veicot elektroforēzi 1% agarozes gēlā 1 x TAE buferī pie apstākļiem: 299V, 65mA(sk.8.att.).



8. attēls. rekSFV1/dsRed un rekSFV1/Helper1 RNS kvalitātes pārbaude ar elektroforēzi 1% agarozes gelā pēc transkripcijas *in vitro* un RNS attīrīšanas. a) – *in vitro* transkribēta rekSFV1/Red RNS, M – 1Kbp DNS marķieris, 1. – 2. apzīmē: no linearizētās SFV1/dsRed DNS sintezētās RNS, kas apstrādātas ar DNāzi, 3. – no linearizētās SFV1/dsRed DNS sintezēta RNS pirms apstrādāšanas ar DNāzi. b) – *in vitro* transkribēta rekSFV1/Helper1 RNS. M – 1Kbp DNS marķieris, 1. – 3. apzīmē: no linearizētās SFV1/Helper1 DNS sintezētās RNS pēc apstrādes ar DNāzi.

Figure 8. Electrophoretic testing (1% agarose gel) of *in vitro* transcribed rekSFV1/dsRed and rekSFV1/Helper1 RNA. a) *in vitro* transcribed recSFV1/dsRed RNA, M – 1Kbp DNA marker, 1. – 2. stands for: RNA synthesized in vitro from linearised SFV1/dsRed DNA and treated with DNase, 3. – recSFV1/dsRed RNA before treatment with RNase. b) *in vitro* transcribed rekSFV1/Helper1 RNA. M – 1Kbp DNA marker, 1. – 3. stands for: RNA synthesized in vitro from linearised SFV1/Helper1 after the treatment with DNase.

2.1.7. BHK-21 šūnu elektroporācija ar rekombinantām RNS un vīrusu daļiņu savākšana/sasaldēšana

BHK-21 šūnas tika sagatavotas 24 – 48 stundas pirms transfekcijas sākuma. Šūnas tika audzētas līdz vēlai log fāzei.

BHK-21 šūnas tika audzētas 75 cm² kultivēšanas matricā līdz 100% monoslāņa blīvumam BHK ++ barotnē. No šūnām tika aizvākta augšanas barotne, monoslānis tika divas reizes mazgāts ar 10 mL PBS-/- . Monoslānim tika pievienoti 2 mL 0,25% tripsīna šķīduma, un monoslānis tika inkubēts 5 min +37°C temperatūrā. Tripsīna šķīduma – šūnu suspensija tika maigi resuspendēta, lai neveidojas šūnu agregāti. Tripsīna darbība tika bloķēta, izmantojot BHK ++barotni: šūnas ar tripsīna šķīdumu tika maigi resuspendētas ar 8 mL barotnes, tika skalotas audzēšanas matricas sienīņās. Šūnu suspensija tika pārnesta 15 mL

mēģenē un centrifugēta 5 minūtes pie 1000 apg./min. Supernatants tika aizvākts. Šūnu nogulsnēm tika pievienoti seši līdz astoņi mL PBS -/-, un nogulsnes tika resuspendētas. Tika veikta šūnu skaitīšana, izmantojot automātisko šūnu skaitītāju *Countess® Automated Cell Counter*. Tika veikta atkārtota centrifugēšana, supernatants noliets, un šūnu nogulsnes tika resuspendētas aukstā PBS -/- buferī līdz 1×10^7 šūnu/700 μ L PBS -/-. 700 μ L šūnu suspensijas tika pārnestas elektroporācijas kivetē. Kivetē tika ienesti 50 μ g transkribētās rekSFV1/Red RNS un 40 μ g rekSFV1/Helper1 RNS, un suspensija tika samaisīta. Kopējam tilpumam elektroporācijas kivetē jābūt 750 - 800 μ L.

Elektroporācijas aparātam tika uzstādīti nepieciešamie parametri (850 V, 25 μ F), un šūnu-RNS suspensijai tika pievadīti 2 strāvas impulsi bez intervāla starp tiem. Laika konstantei pēc pulsa jābūt aptuveni 0,4. Šūnu suspensija no kivetes tika uzsēta uz 75 cm^2 šūnu kultivēšanas matricas 10 mL BHK+/+ barotnes. Šūnas tika inkubētas 16-18 stundas +37°C.

Rekombinanto rekSFV1/dsRed vīrusu saturošā šūnu barotne tika savākta mēģenē un centrifugēta piecas minūtes pie 1000 apgr./min., lai nogulsnētu no monoslāņa atdalījušās šūnas. Vīrusu saturošā barotne ar sekretēto vīrusu tika alikvotēta ependorfa stobriņos pa 0.5 - 1 mL un sasaldēta šķidrā slāpekļī. Iegūtais vīrusa preparāts tika uzglabāts -80°C temperatūrā.

2.2. RekSFV1/dsRed vīrusa titra noteikšana

RekSFV1/dsRed vīrusa titra noteikšana ir balstīta uz hipotēzi „viena vīrusa daļiņa – viena inficētā šūna”, jo daļiņas ir replikācijas defektīvas. Metode ir balstīta uz šūnu infekciju ar dažādiem vīrusa atšķaidījumiem un tiešu marķierģēna fluorescentā proteīna RFP – red fluorescent protein ekspresijas mikroskopisku novērtēšanu.

Vīrusa titrs tika noteikts BHK-21 šūnu kultūrā. Šūnas tika sagatavotas 24 – 48 stundas pirms infekcijas sākuma. No šūnām (75 cm^2 audzēšanas matricā) tika aizvākta augšanas barotne, šūnas tika divas reizes skalotas ar 8 mL PBS -/-. Tika pievienoti 2 mL 0,25% tripsīna šķīduma, un šūnu kultivēšanas matrica tika ievietota inkubatorā + 37°C aptuveni uz divām līdz piecām minūtēm, kamēr šūnu monoslānis atdalās no matricas. Jāievēro, ka pārāk ilga tripsinizēšana var nogalināt šūnas. Šūnu – tripsīna suspensija tika maigi resuspendēta, lai novērstu koloniju veidošanos. Tripsinizācijas process tika neutralizēts ar 8 mL BHK+/+ barotnes. Iegūtā šūnu suspensija tika pārnesta uz mēģeni un centrifugēta piecas minūtes pie 1000 apgr./min., lai atdalītu šūnas no augšanas barotnes. Supernatants tika noliets, un šūnas tika resuspendētas 8 mL PBS -/-. Šūnas tika skaitītas automātiskajā šūnu skaitītājā. Mēģene ar šūnu suspensiju tika centrifugēta iepriekš minētajos apstākļos, lai nogulsnētu šūnas. Supernatants tika noliets. Šūnas tika resuspendētas attiecīgā daudzumā BHK +/+ barotnes līdz

$0,7 \times 10^5$ šūnu vienā mililitrā. BHK-21 šūnas tika uzsētas uz 24 iedobju plates pa vienam mL šūnu suspensijas katrā lodziņā, un inkubētas 24 stundas $+37^\circ\text{C}$.

Infekcija tika veikta, kad BHK-21 šūnu monoslāņa blīvums iedobju platē bija sasniedzis 80%. RekSFV1/dsRed preparāts tika atkausēts istabas temperatūrā, un tika sagatavoti 12 vīrusa stoka divkārtējie atšķaidījumi (*2-Fold dilutions*) PBS+/+ (attiecībā vīrusa stoks:PBS+/+ sākot no 1:10 un beidzot ar 1:10240). Šūnas tika mazgātas divas reizes ar PBS +/+, lai izvairītos no šūnu augšanas barotnes piemaisījumiem. Iedobju plates katros divos lodziņos tika pievienoti 300 μL infekcijas šķīduma no katra atšķaidījuma. Šūnas tika inkubētas vienu stundu un 20 minūtes $+37^\circ\text{C}$, 5% CO_2 . Infekcijas šķīdums tika noņemts, un katrā lodziņā tika pievienots viens mL svaigas barotnes; šūnas tika inkubētas 16 – 18 stundas $+37^\circ\text{C}$, 5% CO_2 .

Pēc 16 – 18 stundu šūnu inkubācijas tika pārbaudīta marķiergēna ekspresija ar invertētu fluorescences mikroskopu, izmantojot G (green) filtru jeb ierosinot RFP (red fluorescence protein) emisiju redzamās gaismas viļņu zaļajā spektrā. Aplūkojot šūnas mikroskopiski, tika atrasts vīrusa stoka atšķaidījums, kur bija iespējams saskaitīt individuālas inficētās šūnas, piemēram, piecas šūnas vienā redzes laukā. Tika izmantots palielinājums 400x. Šūnas tika skaitītas astoņos redzes laukos, un vidējais šūnu skaits vienā redzes laukā tika aprēķināts.

Vīrusa titrs tika aprēķināts pēc sekojošas formulas:

$IF = N \cdot C \cdot D \cdot k$, kur

IF – vīrusa titrs, inficētspējīgās vīrusa daļiņas (*infection units/ mL*);

N – vidējais šūnu skaits vienā redzes laukā (number);

C – redzes lauku skaits vienā iedobju plates lodziņā;

D – vīrusa stoka atšķaidījums (dilution);

K – koeficients titra aprēķināšanai uz vienu mL.

C aprēķina sekojoši:

$C = \text{iedobes laukums (mm}^2\text{)}/\pi \cdot (X_{\text{okulāram}}/X_{\text{objektīvam}} \cdot 2)^2$

2.3. RekSFV1/dsRed inficētspējas pārbaude BHK-21 un B16-F10 šūnu kultūrās

Vīrusa inficētspēja tika pārbaudīta ar fluorescences mikroskopiju, vizuāli novērtējot rSFV1/dsRed daļiņu RFP (*red fluorescent protein*) ekspresiju divās šūnu kultūrās:

1. Kontroles šūnu kultūrā BHK-21 (Sīrijas zeltainā kāmjā mazuļa nieru fibroblastu šūnu līnija - *baby hamster kidney cell line*),
2. Peļu melanomas šūnu kultūrā B16-F10 (*mouse melanoma*).

Šūnas tika sagatavotas 24-48 stundas pirms infekcijas sākuma. Katra šūnu kultūra tika audzēta savā 75cm² kultivēšanas matricā. No šūnām tika aizvākta augšanas barotne, tās tika divas reizes skalotas ar 8 mL PBS -/-. Katrā matricā tika pievienoti divi mL 0,25% tripsīna šķīduma, un šūnas tika inkubētas +37°C, 5% CO₂ divas līdz piecas minūtes, kamēr tās bija atdalījušās no matricas virsmas. Šūnas tika maigi resuspendētas tripsīna šķīdumā, lai izvairītos no koloniju veidošanās. Tripsinizācijas process tika neitralizēts, pievienojot 8 mL attiecīgās šūnu augšanas barotnes. BHK-21 šūnām tika izmantota BHK ++ augšanas barotne, B16-F10 šūnām tika izmantota *DMEM GlutaMAX* ++ barotne (skatīt 3. pielikumu). Šūnas tika pārnestas uz 15 mL mēģenēm un centrifugētas piecas minūtes pie 1000 apgr./min. Supernatants tika aizvākts, šūnas tika suspendētas 8 mL PBS -/- un skaitītas *Invitrogen* automātiskajā šūnu skaitītājā. Šūnas tika centrifugētas piecas minūtes pie 1000 apgr./min. Supernatants tika aizvākts, un katra šūnu kultūra tika resuspendēta 8 mL augšanas barotnes. Mēģenē tika sagatavota šūnu – barotnes suspensija ar uzsēšanai nepieciešamo šūnu koncentrāciju. Šūnas tika uzsētas pa vienam mL/iedobē uz 24 iedobju kultivēšanas plates šādās koncentrācijās: 1 · 10⁵/mL BHK-21 šūnas; 3 · 10⁵/mL B16-F10 šūnas.

Infekcija tika veikta, kad šūnu monoslāņa blīvums platē bija sasniedzis 80%. Monoslānim tika pievienoti 300 μL infekcijas šķīduma ar 1 · 10⁷ vīrusa daļiņām/mL. Plates tika inkubētas vienu stundu un 20 minūtes + 37°C, 5%CO₂. Pēc inkubācijas infekcijas šķīdums tika noņemts, un monoslānim tika pievienoti 1,5 mL attiecīgās šūnu kultūras augšanas barotnes uz vienu iedobi. Šūnas tika inkubētas 18 -20 stundas + 37°C, 5% CO₂.

Vīrusa inficētspēja tika pārbaudīta ar fluorescences mikroskopiju, vizuāli novērtējot rSFV1/dsRed daļiņu RFP (*red fluorescent protein*) ekspresiju abās šūnu kultūrās.

2.4. B16-F10 šūnu elektroporācija ar SFV1/dsRed RNS

Lai pārbaudītu, vai rekSFV1/dsRed vīrusa RNS spēj replicēties B16-F10 šūnās, tika veikta B16-F10 šūnu elektroporācija ar SFV1/dsRed RNS.

B16-F10 šūnas tika audzētas 75 cm² kultivēšanas matricā līdz 100% monoslāņa blīvumam *DMEM GlutaMAX*TM ++ barotnē. No šūnām tika aizvākta augšanas barotne, monoslānis tika divas reizes mazgāts ar 10 mL PBS-/-. Monoslānim tika pievienoti 2 mL 0,25% tripsīna šķīduma, un monoslānis tika inkubēts +37°C aptuveni divas minūtes. Tripsīna šķīduma – šūnu suspensija tika maigi resuspendēta, lai neveidojas šūnu kolonijas. Tripsīna darbība tika bloķēta, izmantojot *DMEM GlutaMAX*TM ++ barotni: šūnas ar tripsīna šķīdumu tika maigi resuspendētas 8 mL barotnes, tika skalotas audzēšanas matricas sienīņās. Šūnu suspensija tika pārnesta uz 15 mL mēģeni un centrifugēta 5 min. pie 1000 apg./min.

Supernatants tika aizvākts. Šūnu nogulsnēm tika pievienoti seši līdz astoņi mL PBS -/-, un nogulsnes tika resuspendētas. Tika veikta šūnu skaitīšana, izmantojot automātisko šūnu skaitītāju *Countess® Automated Cell Counter*. Tika veikta atkārtota centrifugēšana, supernatants noliets, un šūnu nogulsnes tika resuspendētas aukstā PBS -/- buferī līdz 1×10^7 šūnu/mL. 700 μ L šūnu suspensijas tika pārnestas elektroporācijas kivetē. Kivetē tika ienesti 20 μ g transkribētās rekSFV1/Red RNS un suspensija tika samaisīta. Kopējam tilpumam elektroporācijas kivetē jābūt 750 - 800 μ L.

Elektroporācijas aparātam *Bio-Red Gene Pulser* tika uzstādīti vajadzīgie parametri (850V, 25 μ F), un šūnu-RNS suspensijai tika pielikti 2 strāvas impulsi bez intervāla starp tiem. Laika konstantei pēc pulsa jābūt aptuveni 0,4. Šūnu suspensija no kivetes tika uzsēta uz 75cm² šūnu kultivēšanas matricas 10 mL DMEM GlutaMAXTM +/- barotnes. Šūnas tika inkubētas 16-18 stundas 37°C.

Par SFV1/dsRed RNS replikācijas spēju B16-F10 šūnās varēja pārliecināties, mikroskopiski novērojot SFV1/dsRed transgēna ekspresiju B16-F10 šūnās pēc 16-18 stundu inkubācijas.

2.5. MTT proliferācijas testa metode

MTT proliferācijas tests tika izmantots, lai:

1. pārbaudītu rekSFV1/dsRed vīrusa citopātisko efektu B16-F10 šūnu līnijā *in vitro*,
2. pārbaudītu ķīmijpreperātu 5Fu (5-fluoruracila) un DOX (doksarubicīna) dažādu koncentrāciju citotoksisko efektu B16-F10 šūnu līnijā *in vitro*,
3. pārbaudītu rekSFV1/dsRed vīrusa un ķīmijpreperātu DOX un 5Fu terapeitiskās kombinācijas citotoksisko efektivitāti B16-F10 šūnu līnijā *in vitro*.

MTT proliferācijas testa metode tika izmantota, lai mērītu B16-F10 šūnu proliferāciju un noteiktu to dzīvotspēju pēc apstrādes ar rekSFV1/dsRed vīrusu un ķīmijpreperātiem 5Fu un DOX. MTT metodes galvenais komponents ir 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-tetrazol-bromīds jeb MTT (C₁₈H₁₆BrN₅S). MTT, kas izšķīdināts šūnu augšanas barotnē vai sāļu šķīdumā bez fenola sarkanā, ir raksturīga dzeltenīga nokrāsa. Aktīvi elpojošas šūnas (dzīvas šūnas) spēj pārvērst ūdenī šķīstošo MTT violetos, nešķīstošos formazāna kristālos, mitohondriālajai dehidrogenāzei šķeļot tetrazola gredzenu. Šūnu skaita pieaugums vai samazināšanās rezultējas izveidoto formazāna kristālu daudzumā. Formazāna kristālus izšķīdinot, to koncentrāciju, tātad arī šūnu dzīvotspēju, var noteikt spektrofotometriski, mērot absorbciju pie 570 nm, un kā references viļņu garumu izmantojot 620 nm. Šūnu skaits tika izteikts kā funkcija no mitohondriālās aktivitātes dzīvās šūnās.

MTT tests tika veikts pēc ‘*SIGMA MTT based in vitro toxicology assay kit*’ protokola. Tika izmantots pulverveida MTT (*USB Corporation, USA*), kam raksturīga dzeltenīga nokrāsa; pulveris sausā veidā tika uzglabāts + 20°C. Tālākam darbam 15 mg MTT pulvera tika šķīdināts 3 mL *DMEM/ F-12 Ham (1:1 x1)* barotnes bez fenola sarkanā, bet ar pievienotu fetālo serumu 5% koncentrācijā, un MTT šķīdums tika uzglabāts + 4°C tumšā vietā. Pirms katras MTT reakcijas šķīduma pievienošanas šūnām, tas tika sajaukts attiecībā 1:10 ar barotni *DMEM/ F-12 Ham (1:1 x1)* bez fenola sarkanā ar pievienotu fetālo serumu 10% koncentrācijā. Izopropanola šķīdums formazāna kristālu izšķīdināšanai tika sagatavots sekojoši: 111,5 mL izopropanols + 12,5 mL Triton x-100 + 1 mL HCl (koncentrācijā 37%).

Strādājot ar MTT, jāievēro darba drošība, jo MTT ir kaitīgs, ja tiek norīts, ieelpots vai absorbēts caur ādu. MTT var izmainīt ģenētisko materiālu. Šķīdums formazāna kristālu šķīdināšanai ir uzliesmojošs un korozīvs. Ar MTT metodē izmantotajiem šķīdumiem jāstrādā laminārās plūsmas boksā, kā arī jāstrādā laboratorijas cimdos un halātā.

B16-F10 šūnas tika sagatavotas 24 stundas pirms infekcijas vai ķīmijpreperātu pievienošanas sākuma. Šūnas tika audzētas 75cm² kultivēšanas matricā. No šūnām tika aizvākta augšanas barotne, tās tika divas reizes skalotas ar 8 mL PBS -/-. Katrā matricā tika pievienoti divi mL 0,25% tripsīna šķīduma, un šūnas tika inkubētas +37°C, 5% CO₂ divas līdz piecas minūtes, kamēr tās bija atdalījušās no matricas virsmas. Šūnas tika maigi resuspendētas tripsīna šķīdumā, lai izvairītos no koloniju veidošanās. Tripsinizācijas process tika neutralizēts, pievienojot 8 mL *DMEM GlutaMAX ++* barotnes (skatīt 3. pielikumu). Šūnas tika pārnestas uz 15 mL mēģenēm un centrifugētas piecas minūtes pie 1000 apgr./min. Supernatants tika aizvākts, šūnas tika suspendētas 8 mL PBS -/- un skaitītas *Invitrogen* automātiskajā šūnu skaitītājā. Šūnas tika centrifugētas piecas minūtes pie 1000 apgr./min. Supernatants tika aizvākts, un katra šūnu kultūra tika resuspendēta 8 mL augšanas barotnes. Mēģenē tika sagatavota šūnu – barotnes suspensija ar $1,5 \cdot 10^5$ B16-F10 šūnu/ mL barotnes. Šūnas tika uzsētas pa vienam mL/iedobē uz 24 iedobju kultivēšanas plates. Šūnas tika inkubētas 24 stundas + 37°C, 5% CO₂.

MTT tests tika veikts sekojoši. No šūnu monoslāņa katrā eksperimenta iedobē tika noņemta šūnu augšanas barotne, un šūnu monoslānis tika skalots ar 0,5 – 1 mL PBS -/- divas reizes. Katrā iedobē tika pievienoti 300 µL MTT reakcijas šķīduma, un iedobju plates tika inkubētas divas stundas + 37°C, 5% CO₂, lai dzīvotspējīgajās šūnās izveidotos formazāna kristāli. Pēc inkubācijas katrā iedobē tika pievienoti 300 µL izopropanola šķīduma, lai izšķīdinātu izveidojušos formazāna kristālus. Lai kristāli tiktu pilnībā izšķīdināti, pēc izopropanola šķīduma pievienošanas katrā iedobē tika veikta maisīšana, pipetējot šūnu - formazāna kristālu – izopropanola šķīduma suspensiju ar vienveidīgām kustībām, iesūcot

šķīdumu pipetē un pipetējot to atpakaļ iedobē, kamēr šķīdums kļūst vienveidīgi violets un iedobē vairs nav novērojams šūnu monoslānis. Iegūto šķīdumu optiskais blīvums tika mērīts ar universālu spektrofotometru - mikroplašu lasītāju, un datu iegūšanai tika izmantota programma *Gen5 2.0 Biotek*. Dati tika analizēti programmā *Microsoft Excel*, apkopojot tos grafikos, kur līknes punkta vērtība tika aprēķināta pēc sekojošas formulas, balstoties uz pieņēmumu, ka formazāna kristālu kvantitāte jeb parauga optiskais blīvums ir tieši proporcionāli dzīvotspējīgo šūnu skaitam:

$$\text{Šūnu relatīvā dzīvotspēja (\%)} = \left[\frac{\text{parauga absorbcija pie } \lambda_{570} - \text{parauga absorbcija pie } \lambda_{620}}{\text{kontroles parauga absorbcija pie } \lambda_{570} - \text{kontroles parauga absorbcija pie } \lambda_{620}} \right] \times 100\%$$

2.5.1. RekSFV1/dsRed vīrusa citopātiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnu kultūrā *in vitro*

Infekcija tika veikta 24 stundas pēc B16-F10 šūnu uzsēšanas. No šūnu monoslāņa tika noņemta augšanas barotne, un monoslānis tika divas reizes skalots ar PBS +/- . Katrā eksperimentālā parauga iedobē tika pievienoti 300 µL infekcijas šķīduma ar koncentrāciju $1 \cdot 10^7$ vīrusa daļiņas/mL. Lai iegūtu nepieciešamo vīrusa atšķaidījumu, vīrusa stoks tika atšķaidīts līdz vajadzīgajai koncentrācijai ar PBS +/- . Plates tika inkubētas vienu stundu un 20 minūtes + 37°C, 5% CO₂. Pēc inkubācijas infekcijas šķīdums tika noņemts, un monoslānim tika pievienoti 1,5 mL B16-F10 šūnu kultūras augšanas barotnes uz vienu iedobi. Šūnas tika inkubētas + 37°C, 5% CO₂ piecas eksperimenta dienas; trešajā eksperimenta dienā augšanas barotne katrā iedobē tika nomainīta, lai šūnu dzīvotspēja nesamazinātos barības vielu nepietiekamības dēļ. Katru dienu tika veikts MTT tests trīs kontroles (neinficētas B16-F10 šūnas) un trīs eksperimenta (inficētas B16-F10 šūnas) iedobēs. Dienā, kad tika veikta infekcija, MTT tests tika veikts trīs kontroles iedobēs, lai pārlicinātos par šūnu dzīvotspēju pirms eksperimenta sākuma. Kopumā šī eksperimenta veikšanai tika uzsētas B16-F10 šūnas uz sešām 24 iedobju platēm katrai šūnu proliferācijas mērījumu eksperimenta dienai. Pirmajā platē tika uzsētas šūnas trīs iedobēs, kas tika izmantots kā nultās dienas kontroles paraugs (neinficētas B16-F10 šūnas). Otrajā līdz sestajā platē tika uzsētas šūnas sešās iedobēs, kur trīs iedobes tika izmantotas kā pirmās līdz piektās eksperimenta dienas pēc infekcijas veikšanas kontroles paraugs (B16-F10 šūnas bez veiktas infekcijas), bet pārējās trīs iedobes – kā pirmās līdz piektās eksperimenta dienas pēc infekcijas veikšanas interesējošais paraugs (nultajā dienā inficētas B16-F10 šūnas).

2.5.2. Ķīmijpreparātu 5Fu un DOX dažādu koncentrāciju citotoksiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās *in vitro*

Lai izvēlētos ķīmijpreparātu 5Fu un DOX koncentrācijas, ar kurām varētu iedarboties uz B16-F10 šūnām tālākajā pētījuma gaitā kombinācijā ar rekSFV1/dsRed vīrusu, bija

nepieciešams pārbaudīt ķīmijpreperātu dažādu koncentrāciju citotoksisko efektu uz B16-F10 šūnām piecu dienu garumā, salīdzinot dzīvotspējīgo šūnu skaita izmaiņas paraugos, kuros pievienoti ķīmijpreperāti, ar kontroles paraugiem (bez pievienotiem ķīmijpreperātiem). Ķīmijpreperātu koncentrācijas tika izvēlētas sekojoši: 1. – koncentrācija neietekmē šūnu dzīvotspēju, salīdzinot ar kontroles paraugu; 2. – koncentrācija samazina šūnu dzīvotspēju par 40 – 50 %; 3. – koncentrācija samazina šūnu dzīvotspēju par 70 – 99 %.

Pētījumā tika izmantots pulverveida doksarubicīns (DOX), kas tika šķīdināts DMSO līdz koncentrācijai 70mg/mL, lai tālāk to šķīdinātu B16-F10 šūnu augšanas barotnē līdz nepieciešamajai koncentrācijai. Pētījumā izmantotais ķīmijpreperāts 5-fluoruracils (5Fu) tika šķīdināts DMSO līdz koncentrācijai 70mg/mL lai tālāk to šķīdinātu B16-F10 šūnu augšanas barotnē līdz nepieciešamajai koncentrācijai.

5Fu iedarbība uz B16-F10 šūnu dzīvotspēju tika pārbaudīta šādās koncentrācijās: 13 µg/mL, 26 µg/mL, 65 µg/mL, 130 µg/mL, 260 µg/mL. DOX iedarbība uz B16-F10 šūnu dzīvotspēju tika pārbaudīta šādās koncentrācijās: 1,2 µg/mL, 2,4 µg/mL, 4,7 µg/mL, 5,9 µg/mL, 11,8 µg/mL, 23,5 µg/mL.

Ķīmijpreperāti tika pievienoti šūnu monoslānim 24 stundas pēc B16-F10 šūnu uzsēšanas. No šūnu monoslāņa tika noņemta augšanas barotne, un katrā eksperimentālā parauga iedobē tika pievienots viens mL B16-F10 šūnu augšanas barotnes ar pievienotu ķīmijpreperātu attiecīgajā koncentrācijā. Šūnas tika inkubētas + 37°C, 5% CO₂ piecas eksperimenta dienas; trešajā eksperimenta dienā augšanas barotne ar pievienoto ķīmijpreperātu katrā iedobē tika nomainīta, lai šūnu dzīvotspēja nesamazinātos barības vielu nepietiekamības dēļ. Katru dienu piecu dienu garumā tika veikts MTT tests trīs kontroles (B16-F10 šūnas bez pievienota ķīmijpreperāta) un trīs eksperimenta (B16-F10 šūnas ar pievienotu ķīmijpreperātu) iedobēs katrai ķīmijpreperāta pētāmajai koncentrācijai. Dienā, kad šūnām tika pievienoti ķīmijpreperāti, MTT tests tika veikts trīs kontroles iedobēs, lai pārlicinātos par šūnu dzīvotspēju pirms eksperimenta sākuma.

2.5.3. RekSFV1/dsRed vīrusa un ķīmijpreperātu DOX un 5Fu terapeitiskās kombinācijas efektivitātes pārbaude B16-F10 šūnās *in vitro*

Lai pārbaudītu, cik efektīvi rekSFV1/dsRed spēj inficēt un samazināt B16-F10 šūnu dzīvotspēju kā onkolītisks aģents kombinācijā ar pretvēža ķīmijpreperātiem DOX un 5Fu, un, vai pastāv sinerģisms starp ķīmijpreperātu DOX, 5FU un SFV vektoru, iedarbojoties uz B16-F10 vēža šūnu līniju, šūnu monoslāņa barotnes tika nomainītas 24 stundas pēc B16-F10 šūnu uzsēšanas ar barotnēm, kurās bija ķīmijpreperāti dažādās koncentrācijās, bet šūnu infekcija ar rekSFV1/dsRed tika veikta otrajā dienā pēc ķīmijpreperātu pievienošanas. Otrajā dienā

barotne ar ķīmijpreparātiem tika noņemta no šūnu monoslāņa, un katra iedobe tika skalota divas reizes ar PBS +/- . Vīrusa stoks tika atšķaidīts līdz koncentrācijai 1×10^7 vīrusa daļiņas/mL ar PBS +/- . Katrā eksperimentālā parauga iedobē tika pievienoti 300 μ L infekcijas šķīduma, un šūnas tika inkubētas vienu stundu $+37^\circ\text{C}$, 5% CO_2 , lai notiktu infekcija. Pēc stundas un 20 minūšu inkubācijas infekcijas šķīdums tika noņemts, un iedobēs tika pievienota B16-F10 šūnu barotne bez pievienotiem ķīmijpreparātiem. Šūnas tika inkubētas $+37^\circ\text{C}$, 5% CO_2 vēl trīs dienas, katru dienu atkārtojot MTT testu trīs katra parauga iedobēs, lai varētu salīdzināt šūnu dzīvotspējas izmaiņas. Kopumā MTT metode tika veikta sešu dienu garumā; pirmajā dienā MTT tests tika veikts trīs kontroles šūnu (bez pievienotiem eksperimentālajiem pretvēža aģentiem) iedobēs.

Vīrusa inficētspēja tika pārbaudīta ar fluorescences mikroskopiju, 16 – 18 stundas pēc infekcijas veikšanas, lai vizuāli novērtētu rSFV1/dsRed daļiņu RFP (*red fluorescent protein*) ekspresiju B16-F10 šūnu kultūrā, un pārlicinātos, vai MTT testa rezultātos novērojamā šūnu dzīvotspējas samazināšanās ir saistāma ar vīrusa iedarbību.

2.6. RekSFV1/dsRed vīrusa inficētspējas un citopātiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās pēc iedarbības ar DOX, 5Fu un rek SFV1/dsRed, izmantojot plūsmas citometriju

Plūsmas citometrija tika izmantota, lai kvantitatīvi noteiktu B16-F10 šūnu dzīvotspēju pēc rekSFV1/dsRed vīrusa un ķīmijpreparātu DOX un 5Fu kombinētas iedarbības uz B16-F10 šūnām. Ar plūsmas citometrijas metodi tika novērtēts uz šūnām iedarbojušos aģentu rekSFV1/dsRed, DOX un 5Fu citopātiskais efekts, kā arī rekSFV1/dsRed vīrusa inficētspēja.

Lai noteiktu vīrusa inficētspēju, tika izmantota Red proteīna ekspresija inficētajās B16-F10 šūnās. Red proteīna absorbcijas maksimums (ierosināšanas spektrs) ir pie 558nm viļņu garuma, bet emisijas maksimums pie 583nm. Lai kvantitatīvi novērtētu mirušo šūnu gadījumus paraugā, šūnas tika iezīmētas ar propīdija jodīdu, kam absorbcijas maksimums ir pie 535nm, bet emisijas maksimums pie 617nm viļņu garuma. Propīdija jodīds ir fluorescēta molekula (molekulārā masa 668,4 kDa), tāpēc to bija iespējams izmantot kā marķieri FACS analizē. Ar šo aģentu tika iezīmētas tikai mirušās šūnas, jo propīdija jodīds ir membrānas necaurlaidīgs un tas nesaistās ar dzīvotspējīgām šūnām. Strādājot ar propīdija jodīdu, jāievēro darba drošība, jo tas ir kancerogēns savienojums.

B16-F10 šūnas tika uzsētas uz sešu iedobju kultivēšanas plates (katrā iedobē $1,2 \times 10^6$ šūnu) 24 stundas pirms plūsmas citometrijas veikšanas un inkubētas $+37^\circ\text{C}$, 5% CO_2 . Pēc 24 stundu inkubācijas šūnu augšanas barotne tika noņemta. Trīs iedobēs tika pievienoti trīs mL

B16-F10 šūnu augšanas barotnes *DMEM GlutaMAX* +/+ ar pievienotu DOX koncentrācijās 1,2 µg/mL; 4,7 µg/mL; 12 µg/mL. Vēl trīs iedobēs tika pievienoti 3 mL B16-F10 šūnu augšanas barotnes ar pievienotu 5Fu koncentrācijās 1,3 µg/mL; 13 µg/mL; 260 µg/mL. Šūnas tika inkubētas 2 stundas + 37°C, 5% CO₂. Negatīvajām kontrolēm tika izmantotas 1) ar ķīmijpreperātiem neapstrādātas un neinficētas B16-F10 šūnas; 2) ar ķīmijpreperātiem neapstrādātas, bet ar rekSFV1/dsRed inficētas B16-F10 šūnas (monoslānis pirms infekcijas veikšanas nepārsniedz 80%). Šūnu infekcija ar rekSFV1/dsRed tika veikta divas stundas pēc ķīmijpreperātu pievienošanas. No šūnām tika noņemta augšanas barotne, šūnu monoslānis tika skalots divas reizes ar 5 mL PBS +/+. Katrā iedobē tika pievienoti 1,2 mL infekcijas šķīduma (vīrusa stoks tika sajaukts ar PBS +/+ līdz vajadzīgajai koncentrācijai) ar rekSVF1/dsRed vīrusa daļiņām koncentrācijā 1×10^7 /mL. Šūnas tika inkubētas vienu stundu + 37°C, 5% CO₂. Pēc stundas inkubācijas infekcijas šķīdums no šūnām tika noņemts, un iedobēs tika pievienota B16-F10 šūnu augšanas barotne. Šūnas tika inkubētas 16 - 18 stundas + 37°C, 5% CO₂. Pēc 16 – 18 stundu inkubācijas tika veikta šūnu mikroskopiska pārbaude katra parauga iedobē, un tika iegūtas gaismas mikroskopijas un fluorescences mikroskopijas fotogrāfijas, lai pārbaudītu Red proteīna ekspresiju šūnu monoslānī. Sekojoši no šūnām tika noņemta augšanas barotne, šūnas katrā iedobē tika mazgātas ar 5 mL PBS -/-. Katrā iedobē tika pievienoti 0,5 mL 0,25% tripsīna šķīduma, un šūnas tika inkubētas divas līdz piecas minūtes + 37°C, 5% CO₂, kamēr tās bija atdalījušās no iedobju virsmas. Šūnas tika maigi resuspendētas tripsīna šķīdumā, lai izvairītos no koloniju veidošanās. Tripsinizācijas process tika neitralizēts, pievienojot 2 mL *DMEM GlutaMAX* +/+ barotnes. Šūnas tika pārnestas uz 15 mL mēģenēm un centrifugētas piecas minūtes pie 1000 apgr./min. Supernatants tika noņemts, un šūnas tika suspendētas 1 mL PBS. Katram sagatavotās šūnu suspensijas paraugam tieši pirms testa veikšanas tika pievienoti 5 µL propīdija jodīda iezīmēšanas šķīduma (PI PBS -/- buferī koncentrācijā 10 µg/mL), lai detektētu agri un vēlu apoptotiskas šūnas un nekrotiskās šūnas.

Propīdija jodīda un Red proteīna fluorescences tika mērīta plūsmas citometrā. Red proteīnu ekspresējošo šūnu, ar propīdija jodīdu iezīmēto (mirušo) šūnu kvantitatīvi mērījumi tika veikti, izmantojot plūsmas citometru un šūnu šķīrotāju *BD FACSAria II*, bet datu apstrādei tika izmantota programma *FACS Diva Version 6.1.3*. Abu FACS marķieru (Red proteīns un propīdija jodīds) spektru īpašības ļāva tos izmantot vienā paraugā, jo abi tika ierosināti ar 488nm lāzeri, abos gadījumos bija iespēja izmantot vienu un to pašu 670 LP standarta filtru, kā arī detektoru FL3.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. RekSFV1/dsRed vīrusa titra noteikšana

Tā kā šūnas titra noteikšanai tika skaitītas 400 x palielinājumā, un 24 iedobju plates vienas iedobes laukums ir 200 mm^2 , tika aprēķināts, ka redzes lauku skaits vienā iedobju plates lodziņā $C = 200/3,14 \cdot (10/40 \cdot 2)^2 = 1020,41$. Saskaitot šūnas astoņos dažādos redzes laukos, un aprēķinot vidējo šūnu skaitu vienā redzes laukā, ieguvām, ka $N = 7,38$. Šūnas tika skaitītas pie vīrusa stoka atšķaidījuma $1 : 10240$. Kā arī katrā iedobē tika pievienoti $300 \mu\text{L}$ infekcijas šķīduma, tātad $k = 1000/300 = 3,3$.

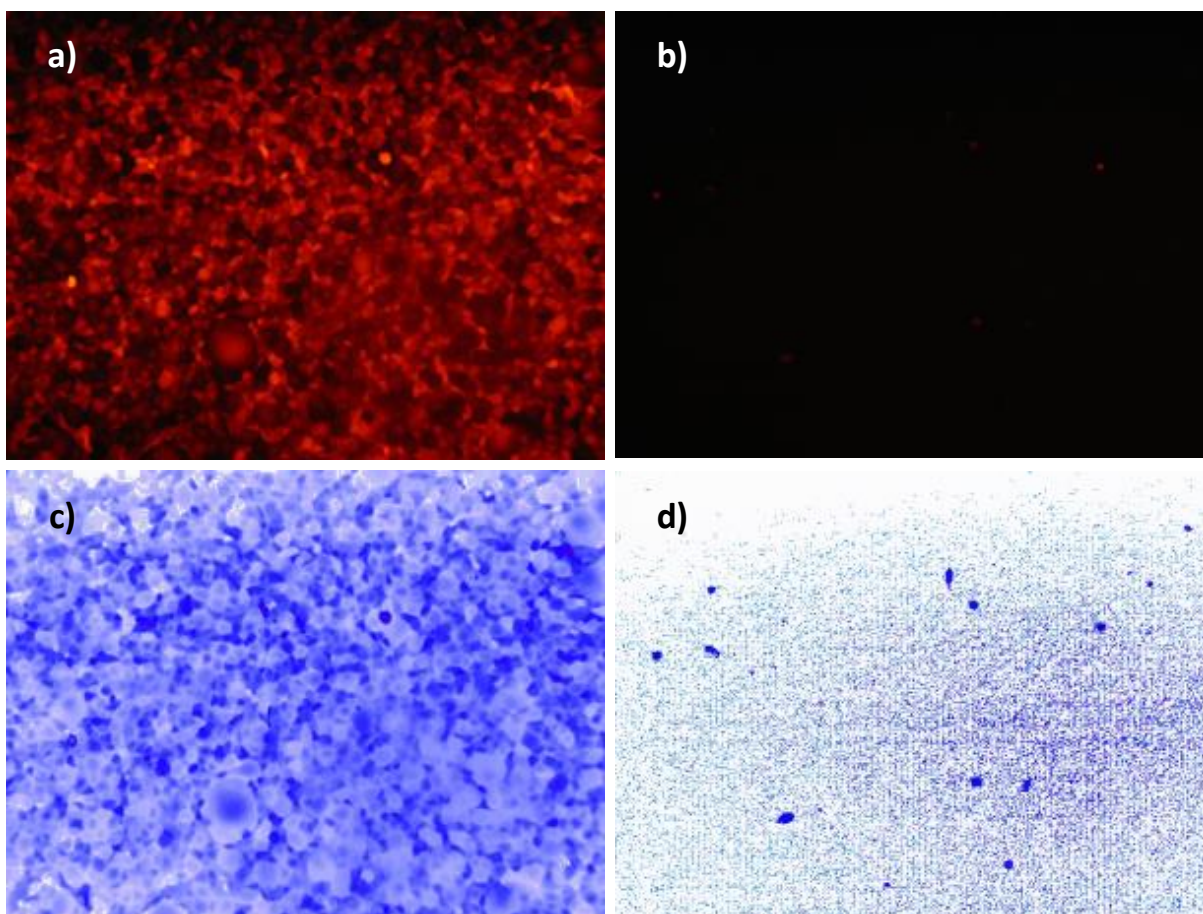
Vīrusa titrs tika aprēķināts, ieliekot visas iegūtās vērtības formulā:

$$IF = N \cdot C \cdot D \cdot k = 7,38 \cdot 1020,41 \cdot 10240 \cdot 3,3 = 2,54 \cdot 10^8 \text{ v.d./mL}$$

Šāds vīrusa titrs bija salīdzinoši augsts, ņemot vērā, ka vīrusa daļiņas netika pēc savākšanas koncentrētas. Literatūrā nekoncentrēta vīrusa stoka titrs dots $1,34 \cdot 10^8 \text{ v.d./mL}$, kas ir 1,9 reizes zemāks kā mūsu iegūtais (21). Secinām, ka mūsu iegūtā rekSFV1/dsRed vīrusa titrs ir augsts, un var tikt veiksmīgi izmantots *in vitro* pētījumos.

Faktori, kas varēja ietekmēt vīrusa titra iznākumu bija RNS daudzums vienai elektroporācijai – jo vairāk tika pievienots RNS, jo vīrusa titrs varēja paaugstināties par desmito daļu. Vīrusa titru ir iespējams paaugstināt, arī nodrošinot šūnu suspensiju lielā augšanas barotnes atšķaidījumā.

3.2. RekSFV1/dsRed vīrusa inficētspējas pārbaude BHK-21 un B16-F10 šūnu kultūrās



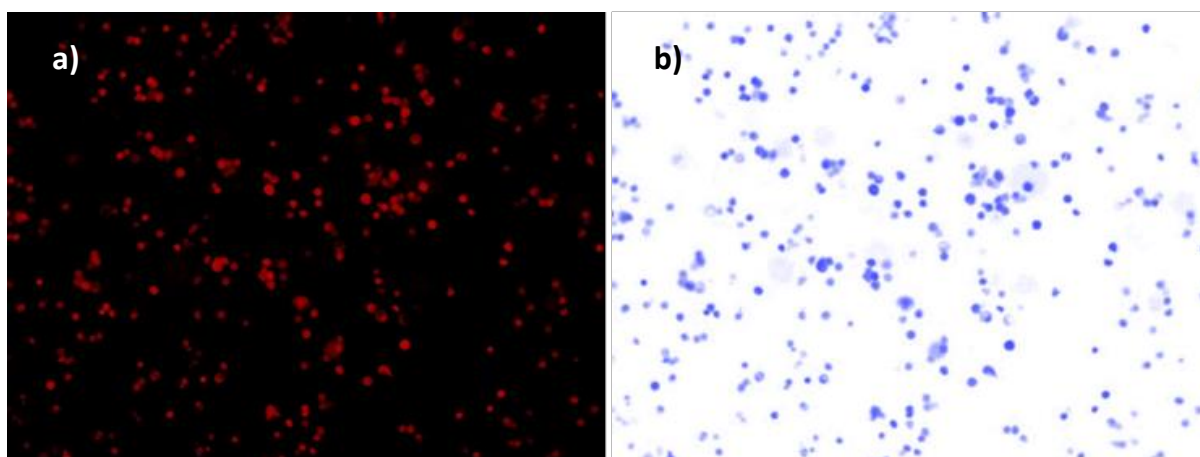
9. attēls. RekSFV1/dsRed vīrusa inficētspējas pārbaude divās šūnu kultūrās, novērtējot dsRed proteīna ekspresiju šūnu monoslānī. a) – dsRed ekspresija BHK-21 kontroles šūnu kultūrā (*fluorescences mikroskopija, palielinājums 200x*), b) – dsRed ekspresija peļu melanomas B16-F10 šūnu kultūrā (*fluorescences mikroskopija, palielinājums 200x*), c) – dsRed ekspresija BHK-21 kontroles šūnu kultūrā (*fluorescences mikroskopijas invertēts attēls, palielinājums 200x*), d) - dsRed ekspresija peļu melanomas B16-F10 šūnu kultūrā (*fluorescences mikroskopijas invertēts attēls, palielinājums 200x*).

Figure 9. Examining the ability of recSFV1/dsRed infect two cell lines by determining expression of dsRed in the monolayer of cells. a) – expression of dsRed in BHK-21 cells (*fluorescence microscopy, magnification 200x*), b) – expression of dsRed in mouse melanoma B16-F10 cells (*fluorescence microscopy, magnification 200x*), c) – expression of dsRed in mouse melanoma BHK-21 cells (*fluorescence microscopy inverted image, magnification 200x*), d) – expression of dsRed in mouse melanoma B16-F10 cells (*fluorescence microscopy inverted image, magnification 200x*).

BHK-21 šūnu kultūra tika izmantota kā kontrole, novērtējot rekSFV1/dsRed spēju inficēt vēža šūnu kultūru B16-F10. Devītajā attēlā a) un c) novērojama izteikta dsRed ekspresija šūnu monoslānī, kas atbilst gaidāmajiem rezultātiem par vīrusa spēju inficēt BHK-21 šūnas (21). Devītajā b) un d) attēlā izteikta dsRed vīrusa ekspresija novērojama tikai 10 šūnās pie palielinājuma 200x, tātad tikai 10 šūnas ekspresēja dsRed/ 0,785mm². Secinājām, ka vīrusa inficētspēja B16-F10 šūnu kultūrā *in vitro* bija stipri samazināta, salīdzinot ar kontroles šūnu BHK-21 līniju.

Agrākajos pētījumos jau tikusi parādīta BHK-21 šūnu augstā uzņēmība pret SFV vektoriem, kā arī samazinātā transdukcijas efektivitāte (1 – 5 %) B16-F10 šūnu kultūrā ar SFV vektoriem (40). Arī Rodrigues-Madoz ar kolēģiem 2007. gadā demonstrēja SFV vīrusa nespēju inficēt B16-F10 šūnu kultūru *in vitro* (32). Mūs interesēja noskaidrot, kāds cēlonis ir samazinātai rekSFV1/dsRed inficētspējai B16-F10 šūnās. Lai izskaidrotu šo novērojumu, tika izvirzīta hipotēze, ka 1) SFV genoms nespēj šūnās iekļūt, kam cēlonis varētu būt rekSFV1/dsRed apvalka membrānas nespēja saplūst ar B16-F10 šūnu membrānu receptoru neatbilstības dēļ, tādējādi B16-F10 šūnām nespējot vīrusa daļiņas endocitēt, bet prethipotēze, ka 2) vīrusa genoms B16-F10 šūnās spēj iekļūt, bet nespēj replicēties. Lai apstiprinātu vienu no izvirzītajām hipotēzēm, nākamajā pētījuma solī bija jāveic elektroporācija, ar kuras palīdzību B16-F10 šūnās tiktu ievadīta rekSFV1/dsRed RNS, un mikroskopiski būtu iespējams novērot, vai šūnas ekspresē dsRed, tā pierādot vai noliedzot rekSFV1/dsRed vīrusa genoma nespēju replicēties B16-F10 šūnās. Secināju, ka jāveic tālāki pētījumi, lai pārbaudītu rekSFV potenciālu gēnu terapijā uz B16-F10 šūnu kultūras.

3.3. B16-F10 šūnu elektroporācija ar SFV1/dsRed RNS



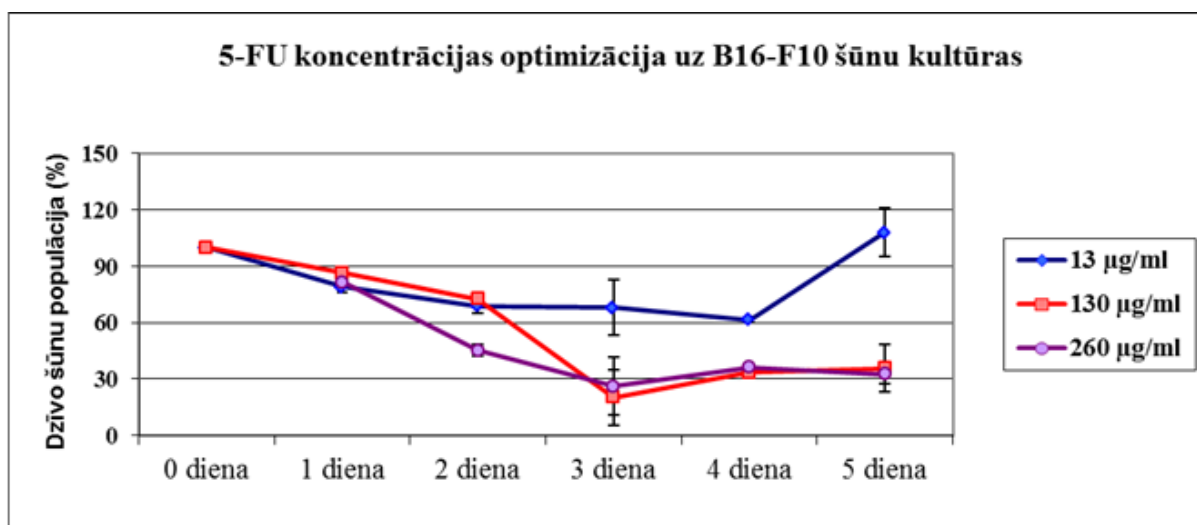
10. attēls. dsRed ekspresija šūnu monoslānī pēc B16-F10 šūnu elektroporācijas ar rekSFV1/dsRed RNS. a) – fluorescences mikroskopija, palielinājums 200x, b) - fluorescences mikroskopija (invertēts attēls), palielinājums 200x.

Figure 10. Expression of dsRed in the monolayer of B16-F10 cells after electroporation with recSFV1/dsRed RNA a) – fluorescence microscopy, magnification 200x), b) - fluorescence microscopy (inverted image), magnification 200x.

Pēc B16-F10 šūnu elektroporācijas ar rekSFV1/dsRed RNS tika parādīta ievērojama dsRed proteīna ekspresija šūnu monoslānī. Pozitīvā dsRed ekspresija liecināja par rekSFV1/dsRed vīrusa spēju replicēties B16-F10 līnijas šūnās, bet ir svarīgi atzīmēt, ka elektroporētajām šūnām ir samazināta cellulārā imūnatbilde pret vīrusa RNS replikāciju, kas varētu būt viens no galvenajiem iemesliem paaugstinātai SFV RNS replikācijai un transgēna produkcijai. Interesanti, ka, inkubējot elektroporētas B16-F10 šūnas ilgākā laika periodā (2-3 dienas pēc elektroporācijas), šūnas ātri kļūst stiprākas, cellulārā imūnatbilde atjaunojas, un šūnas ir spējīgas izslēgt vīrusa RNS replikāciju un bloķēt tās produkciju, kā arī atjaunojas ātra šūnas dalīšanās. Savukārt BHK-21 šūnas tādos pašos apstākļos demonstrē 7 dienas ilglaicīgu transgēna ekspresiju un ievērojami aizkavēto proliferācijas atjaunošanu. Mūsu rezultāti pierādīja, ka, iedarbojoties šūnas imūnatbildei, ir iespējams paaugstināt alfavīrusu produkcijas līmeni, tomēr vēl arvien aktuāls ir jautājums par specifiska receptora trūkumu B16-F10 šūnām. Secināju, ka noderīgi būtu veikt rekSFV un B16-F10 šūnu saistības strukturālos pētījumus. Rodrigues-Madoz et.al. tika parādījis zemu SFV transdukcijas spēju B16-F10 peļu melanomas modelī arī *in vivo* eksperimentos, kā arī pētījumā tika aprakstīti vairāki faktori, kas piedalās alfavīrusu infekcijas un alfavīrusu replikācijas procesā (32), tāpēc kā vēl vienu no tālāko pētījumu virzieniem varējām ierosināt manipulācijas ar vēža šūnu mikrovides faktoriem, lai saprastu alfavīrusu darbības principus un paaugstinātu onkoterapijas efektivitāti.

Vairākos pētījumos tika aplūkots arī alfavīrusu terapeitiskais pretvēža potenciāls kombinācijā ar dažādiem ķīmijpreparātiem. Zajakinas grupas jaunākie dati parādīja, ka peļu audzēju modeļu apstrāde ar 5-Fu ķīmijpreparātu ievērojami samazināja IFN-alfa ekspresiju peļu krūts audzējos, rezultātā paaugstinot SFV vīrusa transdukciju un ekspresiju vairākas reizes (42). Līdz ar to, ir iespējams izvirzīt hipotēzi, ka ķīmijpreparātu izmantojums kombinācijā ar rekSFV1/dsRed varētu uzlabot B16-F10 šūnu inficētspēju.

3.4. Ķīmijpreparātu 5Fu un DOX dažādu koncentrāciju citotoksiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās *in vitro*

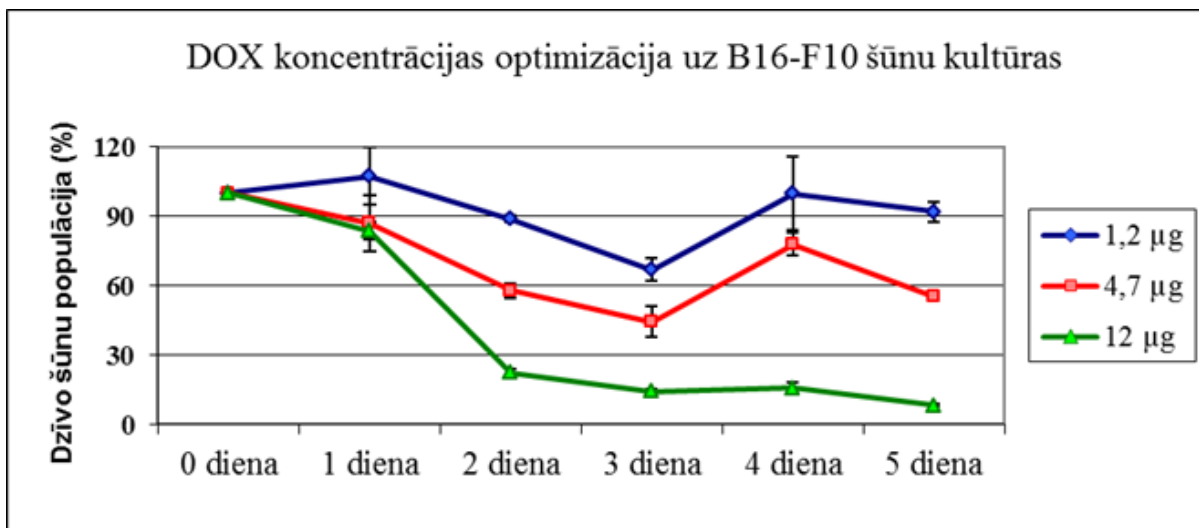


11. attēls. 5Fu (5-fluoruracila) dažādu koncentrāciju (13 µg/mL, 130 µg/mL, 260 µg/mL) citotoksiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnu kultūrā.

Figure 11. Measuring cytotoxicity of 5Fu (5-fluorouracil) concentrations (13 µg/mL, 130 µg/mL, 260 µg/mL) on B16-F10 cells.

Lai pārbaudītu 5Fu dažādu koncentrāciju citotoksisko efektu B16-F10 šūnu līnijā *in vitro*, tika veikti šūnu proliferācijas mērījumi ar MTT metodi. 5Fu citotoksicitāte tika pārbaudīta pie koncentrācijām 13 µg/mL, 26 µg/mL, 65 µg/mL, 130 µg/mL, 260 µg/mL. Kā negatīvā kontrole tika izmantotas B16-F10 šūnas ar normālu augšanas barotni bez ķīmijpreparāta. Piektajā dienā pie koncentrācijas 13 µg/mL nebija novērojamas šūnu proliferācijas izmaiņas, salīdzinot ar kontroli (skat.11.att.), tāpēc šī koncentrācija tika izvēlēta, lai tālākajā pētījuma gaitā ar to iedarbotos uz B16-F10 šūnām kombinācijā ar rekSFV1/dsRed vektoru. Kā maksimālā 5Fu koncentrācija izmantošanai kombinācijā ar rekSFV tika izvēlēta 260 µg/mL, jo pēc iedarbošanās uz šūnām ar 5Fu (260 µg/mL) piektajā dienā dzīvo šūnu populācija bija 30 %. Tātad ķīmijpreparāts šādā koncentrācijā spēja samazināt šūnu proliferāciju vairāk kā trīs reizes, salīdzinot ar negatīvo kontroli. Pārbaudot 5Fu

ķīmijpreperāta dažādo koncentrāciju citotoksisko ietekmi uz B16-F10 šūnām, starp izvēlētajām koncentrācijām netika novērota neviena, kura samazinātu šūnu dzīvotspēju par 40 – 50 %. Interesanti, ka maksimālā izmantotā 5Fu koncentrācija uzrādīja tādu pašu šūnu dzīvotspējas samazināšanos piektajā dienā kā par to divas reizes mazāka koncentrācija (260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ un 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (skat.11.att.).

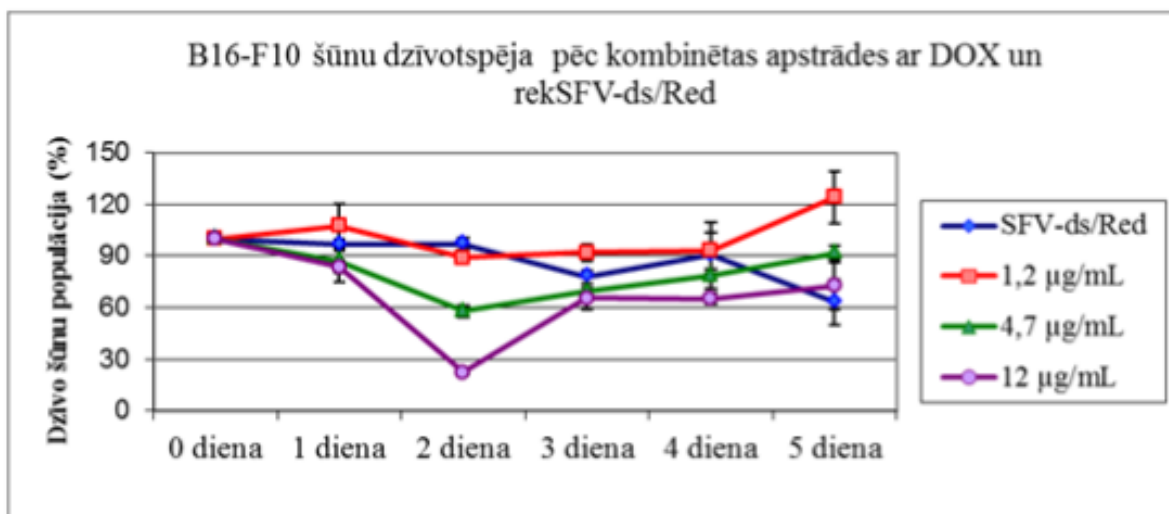


12. attēls. DOX (doksorubicīna) dažādu koncentrāciju (1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) citotoksiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnu kultūrā.

Figure 12. Measuring cytotoxicity of DOX (doxorubicin) concentrations (1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on B16-F10 cells.

Lai pārbaudītu DOX dažādu koncentrāciju citotoksisko efektu B16-F10 šūnu kultūrā in vitro tika veikti šūnu proliferācijas mērījumi pēc to apstrādes ar ķīmijpreperātu. Kā negatīvā kontrole tika izmantotas ar ķīmiju neapstrādātas B16-F10 šūnas. Iedarbojoties uz šūnām ar DOX zemāko koncentrāciju 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tika novērota šūnu dzīvotspējas samazināšanās par 10% (skat.12.att.). Šī koncentrācija tika izmantota tālākai ķīmijpreperāta un rekSFV1/dsRed kombinācijas efektivitātes pārbaudei uz B16-F10 šūnām. Tālākam darbam ar rekSFV tika izvēlētas arī dox koncentrācijas 4,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ un 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kas samazināja šūnu dzīvotspēju par 45% un 90% (skat.12.att.). Dažādu koncentrāciju izvēle un to dažādā ietekme uz šūnu dzīvotspēju ļāva šādas ķīmijpreperāta koncentrācijas izvēlēties tālākam darbam ar rekSFV vīrusu, lai pārbaudītu, vai ķīmijpreparāts spēj veicināt rekSFV1/dsRed vīrusa inficētspēju un ietekmēt šūnu proliferācijas samazināšanos pēc kombinācijterapijas pielietošanas.

3.5. rekSFV1/dsRed vīrusa un ķīmijpreperāta DOX terapeitiskās kombinācijas citotoksiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās *in vitro*

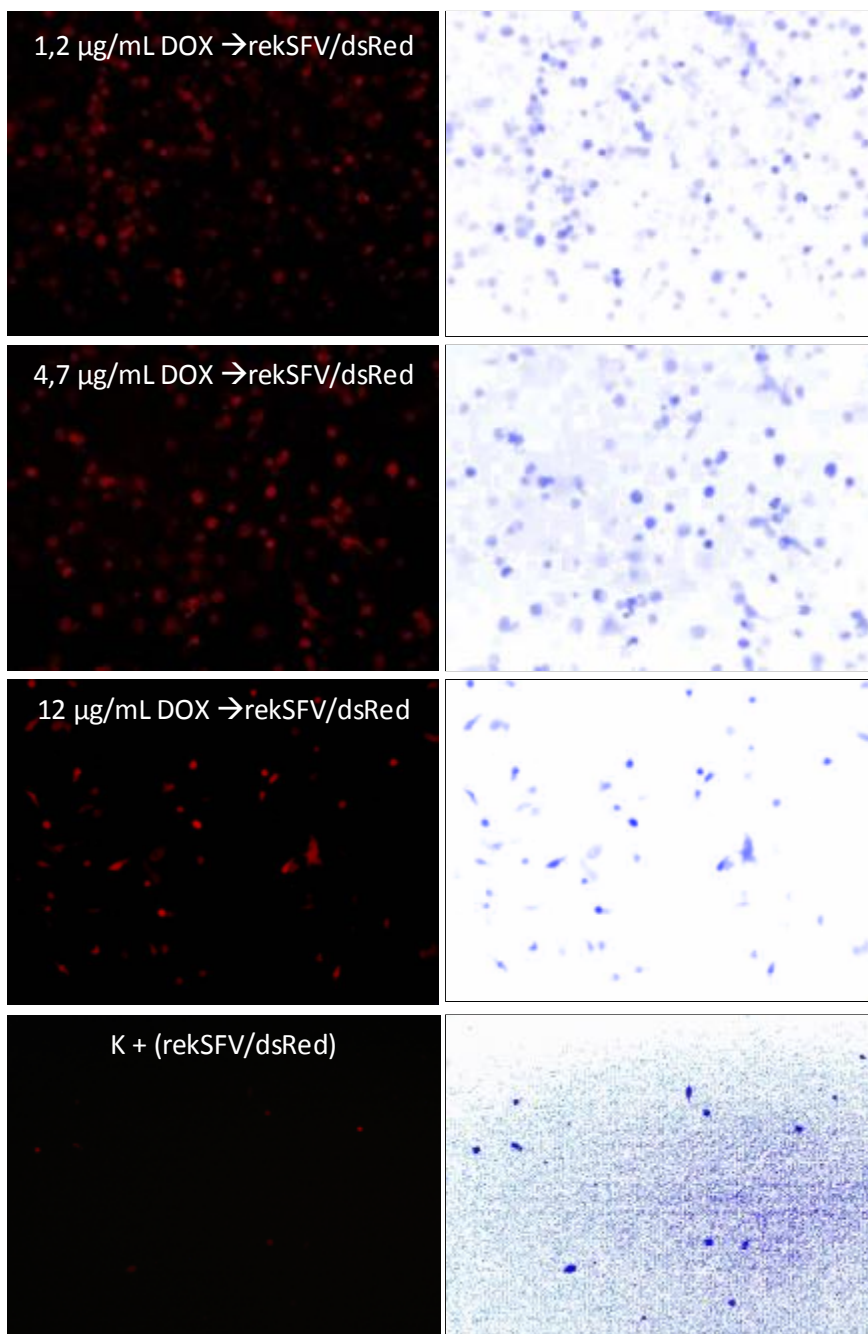


13. attēls. DOX (doksorubicīna) un rekSFV1/dsRed terapeitiskās kombinācijas ietekme uz B16-F10 šūnu dzīvotspēju. 1,2 µg/mL, 4,7 µg/mL, 12 µg/mL – DOX izmantotās koncentrācijas; infekcija ar rekSFV1/dsRed veikta otrajā dienā.

Figure 13. The effects of rekSFV1/dsRed in therapeutic combination with DOX on B16-F10 cell viability. 1,2 µg/mL, 4,7 µg/mL, 12 µg/mL – concentrations of DOX used; infection with rekSFV1/dsRed carried out in day 2.

Piektajā dienā pēc rekSFV1/dsRed iedarbības uz B16-F10 šūnām kombinācijā ar DOX 1,2 µg/mL dzīvo šūnu populācija bija > 120% (skat.13.att.), un, salīdzinot tikai ar DOX 1,2 µg/mL iedarbību uz B16-F10 šūnām (skat.12.att.) šūnu dzīvotspēja bija paaugstinājusies par 30%. Arī pēc kombinatīvas iedarbības ar DOX 4,7 µg/mL un rekSFV1/dsRed dzīvo šūnu populācija piektajā dienā (skat.13.att.) bija par 30 % lielāka nekā iedarbojoties tikai ar DOX 4,7 µg/mL (skat.12.att.). Par 65 % lielāka šūnu dzīvotspēja bija novērojama piektajā dienā pēc kombinētās DOX µg/mL un rekSFV1/dsRed terapijas, salīdzinot tikai ar ķīmijpreperāta iedarbību uz šūnām (skat.12.att.). Secināju, ka starp DOX visās aplūkotajās koncentrācijās un rekSFV1/dsRed bija vērojams pozitīvs sinerģisms, iedarbojoties uz B16-F10 šūnām, kas gan terapeitiski bija vērtējams kā negatīvs, jo šūnu dzīvotspēja pēc kombinatīvās terapijas tika paaugstināta, nevis samazināta. Terapeitiski vislielāko efektivitāti uzrādīja rekSFV1/dsRed iedarbība uz šūnām bez paralēlas apstrādes ar ķīmijpreparātu.

Tomēr, lai pārliecinātos, vai 13. attēlā redzamie rezultāti bija ņemami vērā, kā rekSFV1/dsRed un DOX kombinatīvās terapijas rezultātā, bija nepieciešams pārliecināties par rekSFV1/dsRed vīrusa inficētspēju pēc apstrādes ar DOX (skat.14.att.).



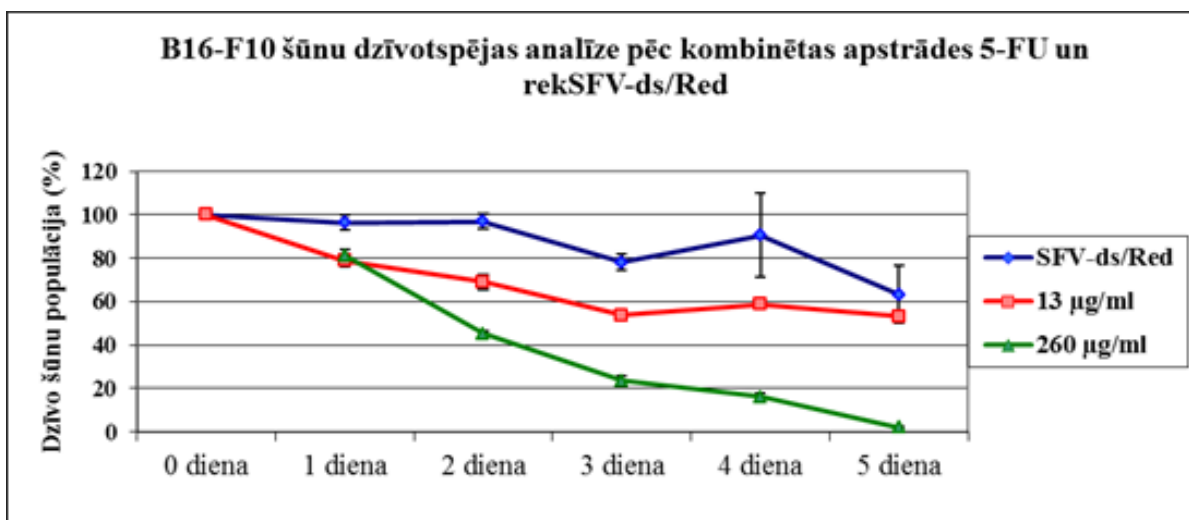
14. attēls. RekSFV1/dsRed inficētspējas mikroskopiska pārbaude uz B16-F10 šūnām pēc iedarbības ar DOX dažādām koncentrācijām un bez kombinācijas ar ķīmijpreparātu.

Figure 14. RekSFV1/dsRed infectivity on B16-F10 cells after treatment with DOX in different concentrations and without DOX.

Pēc B16-F10 šūnu apstrādes ar DOX mazāko un vidējo eksperimentā izmantoto koncentrāciju (1,2 µg/mL, 4,7 µg/mL) bija novērojama vīrusa inficētspējas paaugstināšanās, par ko varēja spriest pēc dsRed ekspresijas šūnu monoslānī, salīdzinot ar pozitīvo kontroli (k+). Mazāka dsRed ekspresija bija novērojama pēc B16-F10 šūnu apstrādes ar DOX lielāko izmantoto koncentrāciju (12 µg/mL), kas gan bija lielāka kā inficējot šūnas bez iepriekšējas

apstrādes ar ķīmijpreparātu (k+), (skat.14.att.). Secinājām, ka vīrusa inficētspēja ir paaugstināta pēc iepriekšējas B16-F10 šūnu apstrādes ar doksarubicīnu, kas varētu būt izskaidrojams ar doksarubicīnu tiešu iedarbību uz šūnu membrānu, tā atvieglojot vīrusa iekļūšanu šūnā (3). Secinājām, ka DOX ir potenciāls aģents rekSFV1/dsRed inficētspējas paaugstināšanai B16-F10 šūnās, bet pētījumi neuzrādīja terapeitisku rekSFV1/dsRed un DOX citotoksisko efektu uz B16-F10 šūnām.

3.6. rekSFV1/dsRed vīrusa un ķīmijpreparāta 5Fu terapeitiskās kombinācijas citotoksiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās *in vitro*



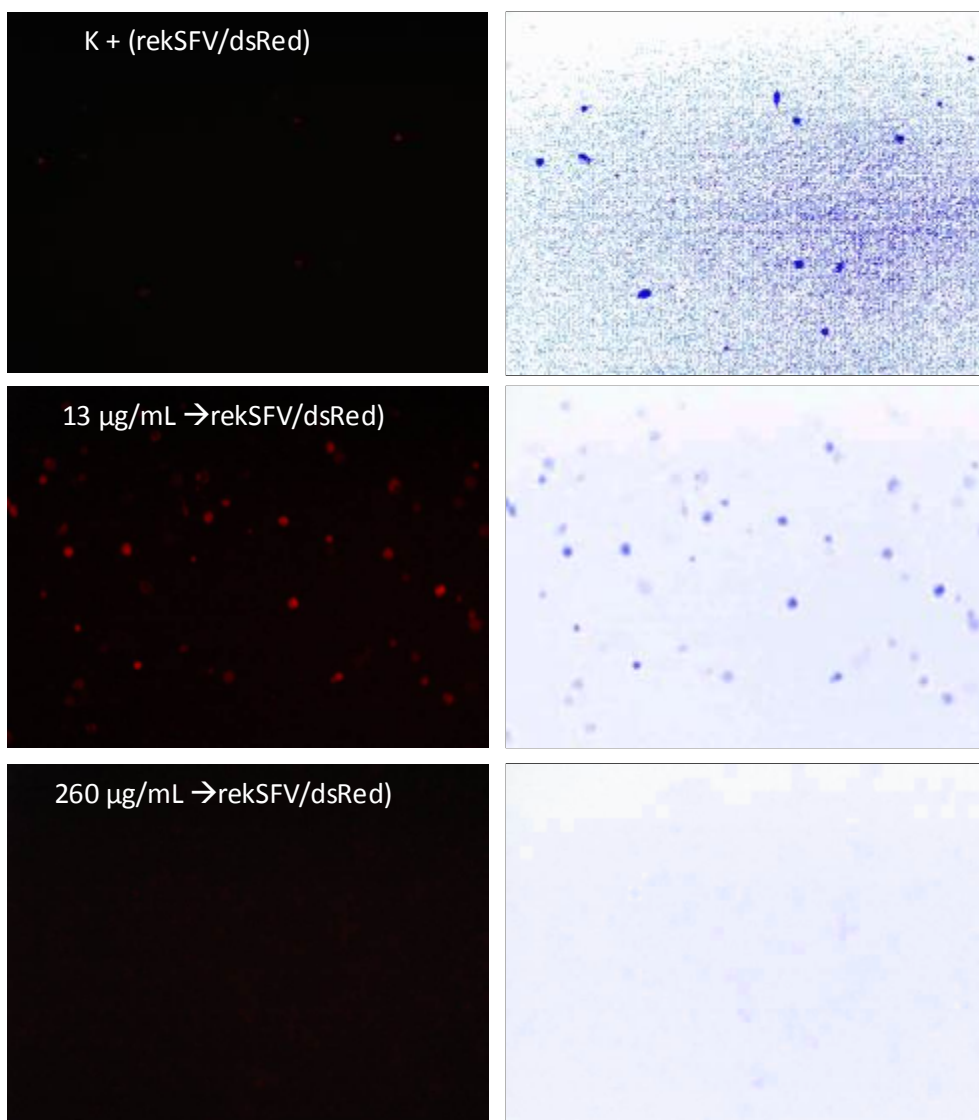
15. attēls. 5Fu (5-fluoruracila) un rekSFV1/dsRed terapeitiskas kombinācijas ietekme uz B16-F10 šūnu dzīvotspēju. 13 µg/mL, 260 µg/mL – 5Fu izmantotās koncentrācijas; infekcija ar rekSFV1/dsRed veikta otrajā dienā.

Figure 13. The effects of rekSFV1/dsRed in therapeutic combination with 5Fu on B16-F10 cell viability. 13 µg/mL, 260 µg/mL – concentrations of 5Fu used; infection with rekSFV1/dsRed carried out in day 2.

Piektajā dienā pēc rekSFV1/dsRed iedarbības uz B16-F10 šūnām kombinācijā ar 5Fu 13 µg/mL dzīvo šūnu populācija bija samazināta uz pusi (55%), (skat.15.att.), un, salīdzinot tikai ar 5Fu 13 µg/mL iedarbību uz B16-F10 šūnām (skat.11.att.) šūnu dzīvotspēja bija samazināta par 55%. Bija vērojams pozitīvs sinerģisms starp 5Fu 13 µg/mL un rekSFV1/dsRed šūnu dzīvotspējas samazināšanā. Arī pēc kombinatīvas iedarbības ar 5Fu 260 µg/mL un rekSFV1/dsRed dzīvo šūnu populācija piektajā dienā (skat.15.att.) bija samazinājusies par 100%. Šāds 5Fu un rekSFV sinerģisms liecināja par kombinācijterapijas augsto citopātisko potenciālu uz malignām šūnām. Salīdzinot ar ķīmijpreparāta 5Fu 260 µg/mL iedarbību uz B16-F10 šūnām bez kombinācijas ar rekSFV1 (skat.11.att.), kombinācijterapija uzrādīja šūnu

dzīvotspējas samazināšanu par 30%. Secināju, ka starp 5Fu abās aplūkotajās koncentrācijās un rekSFV1/dsRed bija vērojams pozitīvs sinerģisms, iedarbojoties uz B16-F10 šūnām, kas bija ar augstu terapeitisku potenciālu jo šūnu dzīvotspēja pēc kombinatīvās terapijas tika samazināta līdz 55% (ar 13 µg/mL 5Fu) un pilnīgi līdz 100% (ar 260 µg/mL 5Fu). Terapeitiski vislielāko efektivitāti uzrādīja rekSFV1/dsRed iedarbība uz šūnām kombinācijā ar 5Fu koncentrācijā 260 µg/mL.

Tomēr, lai pārliecinātos, vai 15. attēlā redzami rezultāti bija ņemami vērā, kā rekSFV1/dsRed un 5Fu kombinatīvās terapijas rezultātā, bija nepieciešams pārliecināties par rekSFV1/dsRed vīrusa inficētspēju pēc apstrādes ar 5Fu (skat.16.att.).



16. attēls. RekSFV1/dsRed inficētspējas mikroskopiska pārbaude uz B16-F10 šūnām pēc iedarbības ar 5Fu dažādām koncentrācijām un bez kombinācijas ar ķīmijpreparātu (k+).

Figure 16. RekSFV1/dsRed infectivity on B16-F10 cells after treatment with 5Fu in different concentrations and without 5Fu (k+).

Pēc B16-F10 šūnu apstrādes ar 5Fu mazāko koncentrāciju (13 µg/mL) bija novērojama neliela vīrusa inficētspējas paaugstināšanās, par ko varēja spriest pēc dsRed ekspresijas šūnu monoslānī, salīdzinot ar pozitīvo kontroli (k+). dsRed ekspresija novērojama nebija pēc B16-F10 šūnu apstrādes ar 5Fu koncentrācijā 260 µg/mL (skat.16.att.). Tā kā bija novērojams sinerģisks 5Fu 13 µg/mL un rekSFV1/dsRed kombinācijterapijas efekts uz šūnu dzīvotspējas samazināšanu un vīrusa inficētspēja 5Fu 13 µg/mL klātbūtnē tika nedaudz paaugstināta, tad secinājām, ka 5Fu un rekSFV kombinācijai ir augsts potenciāls pretvēža terapijā. Tomēr arī 5Fu 260 µg/mL un rekSFV1/dsRed kombinācijterapijas efekts uz šūnu dzīvotspējas samazināšanu bija sinerģisks un pozitīvs, kaut arī vīrusa transgēna dsRed ekspresija šūnu monoslānī pēc iedarbības ar 5Fu novērojama nebija. Lai pārliecinātos par šādu rezultātu pareizību, tika veikta arī FACS analīze.

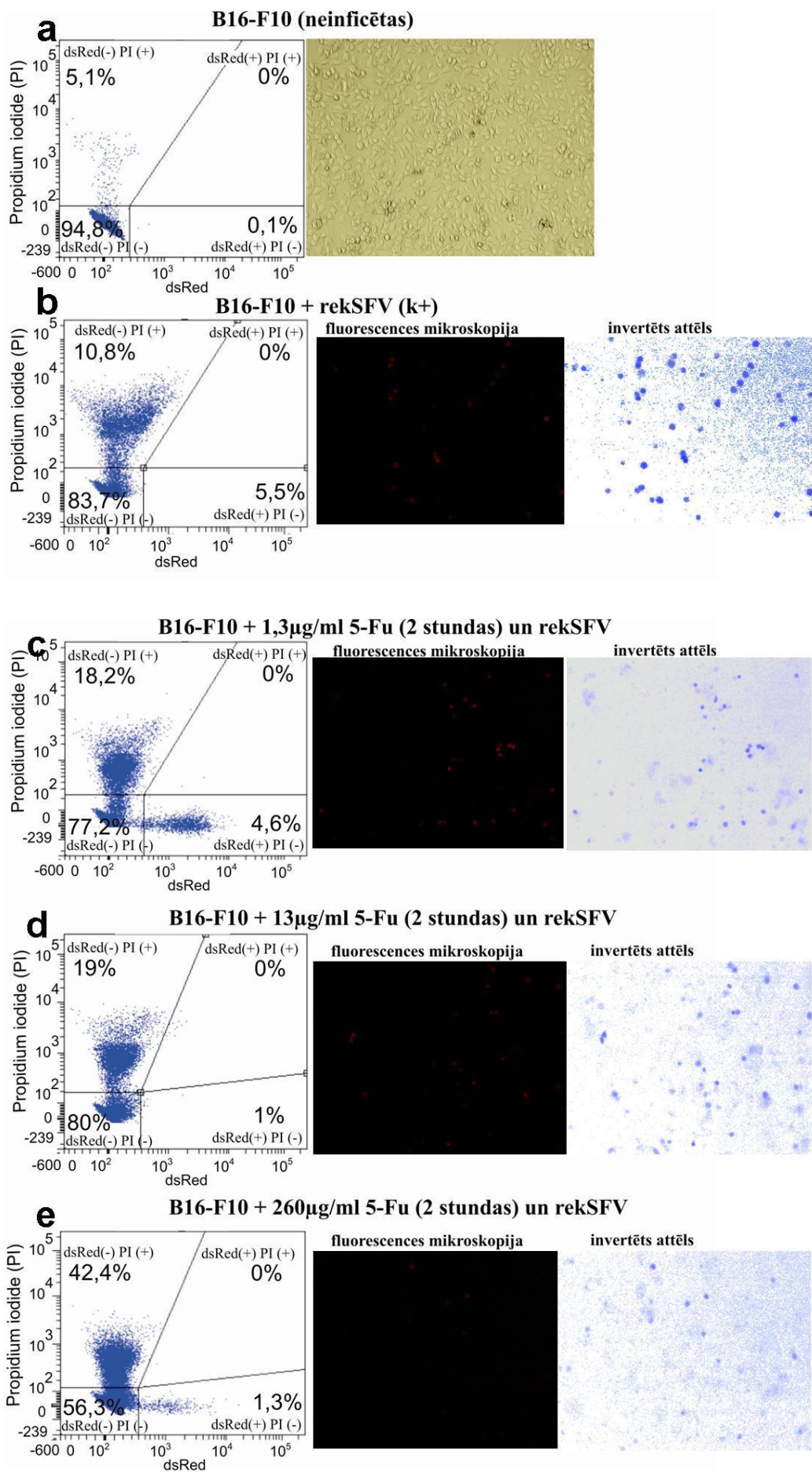
3.7. RekSFV1/dsRed vīrusa inficētspējas un citopātiskā efekta pārbaude B16-F10 šūnās pēc iedarbības ar DOX, 5Fu un rek SFV1/dsRed, izmantojot plūsmas citometriju

Iepriekš aprakstītie rezultāti parādīja ķīmijpreparātu un SFV vīrusa sinerģismu, kas noved pie augstas alfavīrusa inficētspējas (DOX gadījumā) un citotoksicitātes paaugstināšanās (5-Fu un DOX). Lai kvantitatīvi detektētu SFV infektivitāti kombinācijā ar mūsu izvēlētajām ķīmiskām vielām, tika veikta FACS (*fluorescence activated cell sorting*) analīze. Šajā eksperimentā tika nolemts veikt 2 stundas ilgu B16-F10 šūnu apstrādi ar abiem preparātiem pirms alfavīrusu infekcijas, jo dažos literatūras avotos tika parādīti daudzsološi *in vitro* rezultāti, pielietojot pretvēža ķīmijpreparātus kopā ar vīrusiem tieši pēc šādas stratēģijas. Tā piemēram, izmantojot peļu krūts vēža šūnu kultūru tika parādīts, ka 2 stundu apstrāde ar lielu 5-FU koncentrāciju (130 µg/mL) netraucēja SFV vīrusa infekcijai un replikācijai, savukārt 2 dienu inkubācija pilnīgi bloķēja alfavīrusu darbību (42). Citā pētījumā tika parādīta ievērojama adenovīrusu inficētspējas stimulācija, kas tika izraisīta apstrādājot šūnas ar minimālu 5-Fu koncentrāciju 2 stundas (9). Mūsu iepriekšējie rezultāti parādīja augstu SFV inficētspējas paaugstināšanu tikai kombinācijā ar DOX, bet balstoties uz literatūrā aprakstītajiem rezultātiem, tika nolemts turpināt alfavīrusu un 5-FU kombinēto B16-F10 šūnu apstrādi, pievienojot augstāk minētajām koncentrācijām vēl mazāko 5-FU devu (1,3 µg/mL).

3.7.1. RekSFV un 5-FU kombinētas apstrādes efektivitātes analīze

Septiņpadsmitajā attēlā tika parādīti rekSFV un 5-FU dažādu koncentrāciju kombinētas apstrādes efektivitāte B16-F10 šūnās. DsRed (+) procentuālas vērtības FACS datos rāda rekSFV transdukcijas efektivitāti un vektora spēju replicēties un producēt transgēnu. Lai detektētu kombinētas apstrādes citotoksisko efektu, šūnas tika iezīmētas ar propīdija jodīdu, kas tiek apzīmēts mūsu rezultātos kā PI (+). Tā kā alfavīrusi ir onkolītiskie vīrusi, tie inducē šūnas apoptozi pēc infekcijas, tāpēc dsRed (+) PI (+) procentuālas vērtības tika uzskatītas mūsu gadījuma kā pozitīvs kombinētas apstrādes rezultāts. RekSFV un visas trīs 5-FU koncentrācijas neparādīja sinerģisko efektu, un vīrusa transdukcijas un replikācijas spēja netika paaugstināta. Vislabākais dsRed transgēna ekspresijas rezultāts tika detektēts neapstrādātājām B16-F10 šūnām (5,5%). Alfavīrusu infekcijas gadījumā, šūnu apoptoze bieži tiek izraisīta bez vizuālas transgēna ekspresijas (šūna iet bojā pirms vīrusa RNS ir pabeigusi replikāciju). Ar to var izskaidrot PI(+) dsRed(-) šūnu populācijas paaugstināšanu b-c grafikiem. PI(-) dsRed(-) dati attēlo dzīvu un neinficētu šūnu populāciju.

Ir zināms, ka 5-FU un tā atvasinājumi ir spējīgi konkurēt un aizvietot uracilu RNS replikācijas procesā, novedot pie RNS disfunkcijas. Tā kā alfavīrusi ir RNS vīrusi, tie var būt īpaši jutīgi pret 5-FU. Jau sen tika parādīts, kā IFN-alfa ekspresija stimulē 5-Fu aktivitāti (33). IFN-alfa ir dabiska šūnu imūnatbilde, kas ievērojami paaugstinās pēc alfavīrusa infekcijas (42). IFN-alfa un 5-FU kombinētas darbības mehānismu ir iespējams uzskatīt kā pamatiemeslu, kas noved pie zemas kombinētas apstrādes efektivitātes mūsu pētījumā. Ņemot vērā literatūras datus, kur tika rādīti efektīvie SFV un 5-FU kombinācijas rezultāti, ir iespējams secināt kā tādas kombinētas apstrādes efektivitāte ir atkarīga no šūnu kultūrām un nevar būt pielietojama visu vēža tipu ārstēšanā.



17.attēls. (Aprakstam skatīt nākamo lapaspusi.)

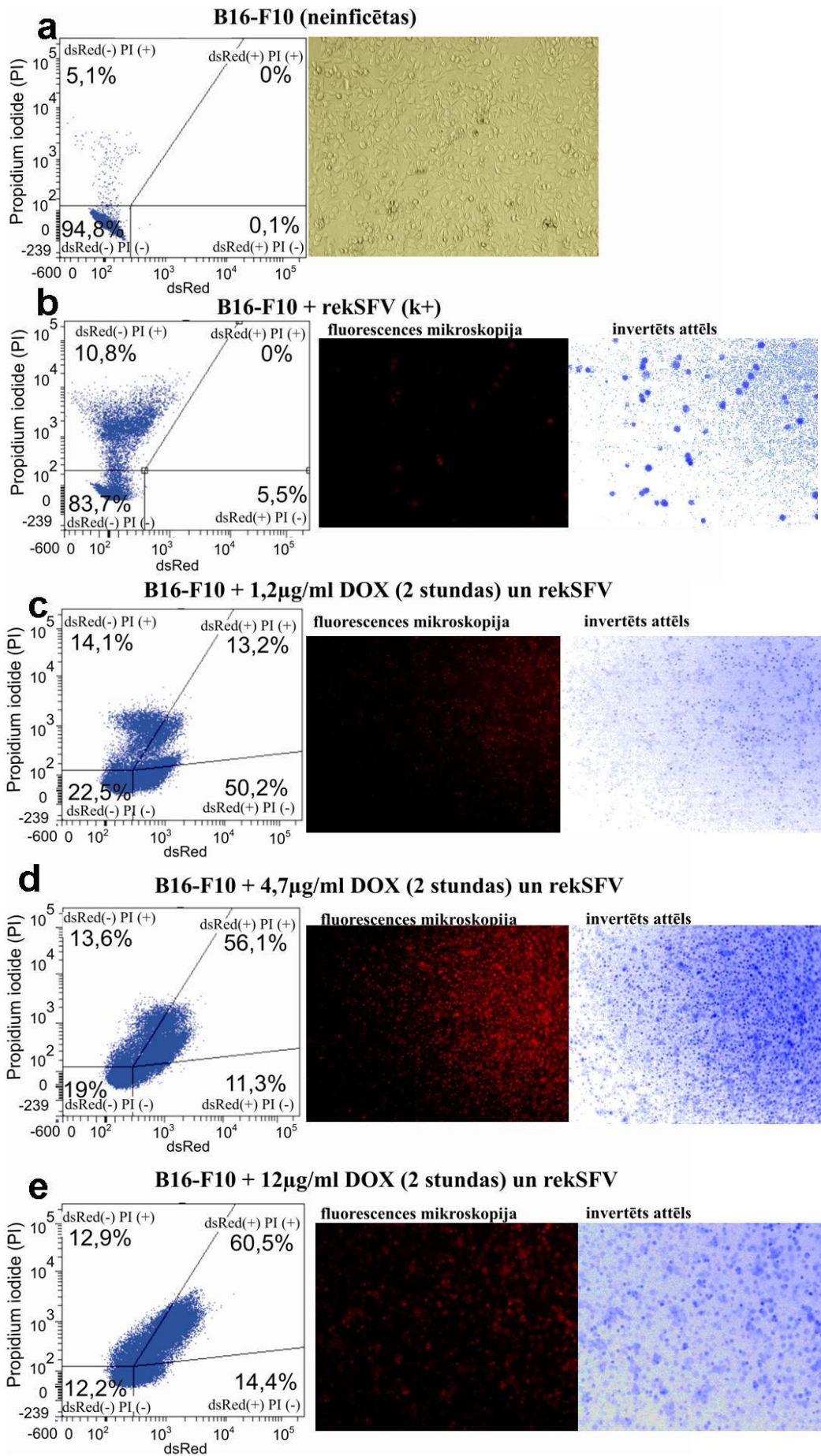
17. attēls. dsRed ekspresijas un B16-F10 šūnu dzīvotspējas pārbaude pēc šūnu apstrādes ar 5Fu (2 stundas) un rekSFV1/dsRed infekcijas. FACS analīzes rezultātu attēlojums punktu grafikā (kreisajā pusē); Apzīmējumi: PI (+) – ar propīdija jodīdu iezīmētās šūnas, dsRed (+) – šūnas, kuras ekspresē dsRed proteīnu. Ds-Red transgēna ekspresijas fluorescences mikroskopijas fotogrāfijas un invertētie attēli (labajā pusē). a) Negatīva kontrole; B16-F10 šūnas bez apstrādes ar 5-Fu un vīrusa infekcijas. b) B16-F10 šūnas pēc infekcijas ar 1×10^7 v.d. rekSFV1/dsRed. c) B16-F10 šūnas apstrādātas ar 1,3 $\mu\text{g/mL}$ 5-Fu preparātu (2 stundas) un sekojošas infekcijas ar 1×10^7 v.d. rekSFV1/dsRed. d) B16-F10 šūnas apstrādātas ar 13 $\mu\text{g/mL}$ 5-Fu preparātu (2 stundas) un sekojošas infekcijas ar 1×10^7 v.d. rekSFV1/dsRed. e) B16-F10 šūnas apstrādātas ar 260 $\mu\text{g/mL}$ 5-Fu preparātu (2 stundas) un sekojošas infekcijas ar 1×10^7 v.d. rekSFV1/dsRed. FACS analīze un fluorescences mikroskopijas fotogrāfijas tika veiktas 20 stundas pēc infekcijas ar rekSFV. Ds-Red transgēna ekspresija tika detektēta 20 stundas pēc infekcijas.

Figure 17: dsRed transgene expression and B16-F10 cell viability after recSFV1/dsRed virus infection followed by cell pretreatment with 5FU (2 hours). FACS test results are represented as a point graph (left), where PI(+) - Propidium iodide labeled cells, dsRed(+) – cells that express dsRed protein. Fluorescence microscopy pictures and their inverted images are demonstrated (right). a) Negative control; 5-Fu non-treated and recSFV non-infected B16-F10 cells. b) B16-F10 cells, infected with 1×10^7 v.p. recSFV1/dsRed. c) B16-F10 cells treated with 1,3 $\mu\text{g/mL}$ of 5-Fu drug during 2 hours and infected with 1×10^7 v.p. recSFV1/dsRed. d) B16-F10 cells treated with 13 $\mu\text{g/mL}$ of 5-Fu drug during 2 hours and infected with 1×10^7 v.p. recSFV1/dsRed. e) B16-F10 cells treated with 260 $\mu\text{g/mL}$ of 5-Fu drug during 2 hours and infected with 1×10^7 v.p. recSFV1/dsRed. FACS analysis and fluorescence microscopy pictures were done 20 hours after recSFV infection.

3.7.2. rekSFV un DOX kombinētas apstrādes efektivitātes analīze

Doksorubicīna īpašības un darbība nozīmīgi atšķiras no 5-FU (skat. literatūras apskatu), un ķīmijpreparāts līdz šim nebija ticis pētīts kombinācija ar alfavīrusiem, kas bija viens no galvenajiem iemesliem, lai sāktu mūsu eksperimentus. Atšķirībā no 5-FU un SFV kombinācijas, 2 stundu ilglaicīga B16-F10 šūnu apstrāde ar visām trim DOX koncentrācijām paaugstināja rekSFV transdukcijas un replikācijas spēju vairāk kā 10 reizes, summējot gan dzīvās gan mirušās dsRed pozitīvas šūnas (skat. 18.att.). Interesanti, ka minimāla DOX koncentrācija (1,2 $\mu\text{g/mL}$) parādīja vislielāko dzīvo dsRed pozitīvo šūnu populāciju (50,2%), nodrošinot ilgāku SFV transgēna ekspresiju, tāpēc to varētu pieņemt par optimālo

koncentrāciju tālākajai kombinētas terapijas izstrādei. Augstākas DOX koncentrācijas (4,7 un 12 µg/mL) arī uzrādīja efektīvu rekSFV vīrusa darbību (ap 70% dsRed pozitīvas šūnas), tomēr, lielākā populācijas daļa jau bija ar inducēto apoptozi (dsRed(+) PI(+)), kas nozīmē, ka šūnas nespēja ilgi producēt transgēnu. Ir jāatzīmē, ka ilglaicīga ekspresija ir viens no svarīgākajiem aspektiem, kas nosaka pretvēža gēnu terapijas efektivitāti, līdz ar to var secināt, ka augstākas DOX koncentrācijas nav piemērotas tālākajos pētījumos. Aktivētais mehānisms, kas izraisa rekSFV un DOX sinerģisko efektu nav zināms un pētīts. Hipotētiski, tas varētu būt gan iekššūnas faktoru izmaiņas, gan šūnas membrānas morfoloģiskas izmaiņas. Tālāki eksperimenti ir nepieciešami, tomēr mūsu rezultāti piedāvā optimālo šūnu kultūras modeli un efektīvu iedarbības stratēģiju, kuru var izmantot nepieciešamo alfavīrusu infekcijas un replikācijas mehānismu pētīšanā.



18.attēls. (Aprakstu skat. nākamajā lapaspusē.)

18. attēls: dsRed ekspresijas un B16-F10 šūnu dzīvotspējas pārbaude pēc šūnu apstrādes ar DOX (2 stundas) un rekSFV1/dsRed infekcijas. FACS analīzes rezultātu attēlojums punktu grafikā (kreisajā pusē); Apzīmējumi: PI (+) – ar propīdija jodīdu iezīmētās šūnas, dsRed (+) – šūnas, kuras ekspresē dsRed proteīnu. Ds-Red transgēna ekspresijas fluorescences mikroskopijas fotogrāfijas un invertētie attēli (labajā pusē). a) Negatīva kontrole; B16-F10 šūnas bez apstrādes ar DOX un vīrusa infekcijas. b) B16-F10 šūnas pēc infekcijas ar 1×10^7 v.d. rekSFV1/dsRed. c) B16-F10 šūnas apstrādātas ar 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX preparātu 2 stundu laikā un sekojošas infekcijas ar 1×10^7 v.d. rekSFV1/dsRed. d) B16-F10 šūnas apstrādātas ar 4,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX preparātu 2 stundu laikā un sekojošas infekcijas ar 1×10^7 v.d. rekSFV1/dsRed. e) B16-F10 šūnas apstrādātas ar 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX preparātu 2 stundu laikā un sekojošas infekcijas ar 1×10^7 v.d. rekSFV1/dsRed. FACS analīze un fluorescences mikroskopijas fotogrāfijas tika veiktas 20 stundas pēc infekcijas ar rekSFV. Ds-Red transgēna ekspresija tika detektēta 20 stundas pēc infekcijas.

Figure 18: dsRed transgene expression and B16-F10 cell viability after recSFV1/dsRed virus infection followed by cell pretreatment with DOX (2 hours). FACS test results are represented as a point graph (left), where PI(+) - Propidium iodide labeled cells, dsRed(+) – cells that express dsRed protein. Fluorescence microscopy pictures and their inverted images are demonstrated (right). a) Negative control; DOX non-treated and recSFV non-infected B16-F10 cells. b) B16-F10 cells, infected with 1×10^7 v.p. recSFV1/dsRed. c) B16-F10 cells treated with 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DOX drug during 2 hours and infected with 1×10^7 v.p. recSFV1/dsRed. d) B16-F10 cells treated with 4,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DOX drug during 2 hours and infected with 1×10^7 v.p. recSFV1/dsRed. e) B16-F10 cells treated with 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DOX drug during 2 hours and infected with 1×10^7 v.p. recSFV1/dsRed. FACS analysis and fluorescence microscopy pictures were done 20 hours after recSFV infection.

4. SECINĀJUMI

1. Tika noteikts vīrusa titrs pēc metodes „viena vīrusu daļiņa ir viena inficēta šūna”. Secinājām, ka mūsu iegūtā rekSFV1/dsRed vīrusa titrs ir augsts, un var tikt veiksmīgi izmantots tālākajos *in vitro* pētījumos.
2. Tika pārbaudīta rekSFV1/dsRed vīrusa inficētspēja divās šūnu kultūrās – BHK-21 un B16-F10 -, novērtējot dsRed proteīna ekspresiju šūnu monoslānī. Secinājām, ka rekSFV1/dsRed spēj labi inficēt BHK-21 šūnas, bet vīrusa spēja inficēt B16-F10 šūnas ir stipri samazināta. Izvirzījām hipotēzi, ka rekSFV1/dsRed nav spējīgs inficēt B16-F10 šūnas specifisku membrānas receptoru trūkuma dēļ B16-F10 šūnās.
3. Pēc B16-F10 šūnu elektroporācijas ar rekSFV1/dsRed RNS tika parādīta ievērojama dsRed proteīna ekspresija šūnu monoslānī, kas pierādīja rekSFV1/dsRed vīrusa spēju replicēties B16-F10 līnijas šūnās. Secinājām, ka vīrusa iekļūšana B16-F10 šūnās ir apgrūtināta. Pamatojoties uz iepriekš veiktiem pētījumiem, tika izvirzīta hipotēze, ka ķīmijpreparātu izmantojums kombinācijā ar rekSFV1/dsRed varētu uzlabot B16-F10 šūnu inficētspēju.
4. Tika novērota rekSFV1/dsRed inficētspējas paaugstināšana pēc šūnu apstrādes ar DOX, kas pierādīja pozitīvu sinerģismu starp DOX un rekSFV1/dsRed. Šūnu apstrāde ar DOX paaugstināja rekSFV transdukcijas un replikācijas spēju B16-F10 šūnās. Netika novērots citopātisks sinerģisms starp rekSFV1/dsRed un DOX. Secinājām, ka DOX ir potenciāls aģents rekSFV1/dsRed inficētspējas paaugstināšanai B16-F10 šūnās.
5. Tika atrasta optimāla DOX koncentrācija tālākai sekmīgai kombinētas terapijas izstrādei un pierādīta tās spēja nodrošināt ilglaicīgu transgēna produkciju. Secinājām, ka augstas DOX koncentrācijas nav piemērotas tālākos pētījumos to īslaicīgās transgēna produkcijas dēļ.
6. Bija vērojams pozitīvs sinerģisms starp 5Fu 13 µg/mL un rekSFV1/dsRed šūnu dzīvotspējas samazināšanā. Secinājām, ka 5Fu un rekSFV kombinācijterapijai ir augsts citopātiskais potenciāls malignās šūnās.
7. Netika mikroskopiski parādīta sinerģija starp 5Fu un rekSFV vīrusa inficētspējas paaugstināšanā. Netika novērota paaugstināta transdukcijas efektivitāte un transgēna ekspresija pēc 5Fu iedarbības. Secinājām, ka alfavīrusu izraisītas šūnu apoptozes gadījumā šūna var iet bojā pirms vīrusa RNS ir pabeigusi replikāciju, un transgēna ekspresija tādā gadījumā nav novērojama.

5. Pateicības

Pateicos sava darba vadītājai Jeļenai Vasiļevskai par apmācību, izsmeļošiem padomiem un vispusīgu palīdzību darba izstrādes laikā, grupas vadītājai Tatjanai Kozlovskai par sniegto iespēju darbu izstrādāt BMC.

Paldies par palīdzību un atbalstu darba tapšanā maniem kolēģiem – Annai Zajakinai, Arnim Strodam, Karīnai Spundei, Aleksandrai Vežānei.

Vēlos pateikties arī recenzentei Andai Hūnai par atsaucību un kritisku darba recenziju.

Darbs tika finansēts no Valsts pētījumu programmas (VPP) „Jaunu profilakses, ārstniecības, diagnostikas līdzekļu un metožu, biomedicīnas tehnoloģiju izstrāde sabiedrības veselības uzlabošanai” 7. projekta: „DNS, RNS, proteīnu, peptīdu un mazmolekulāro medicīnisko preparātu piegādes sistēmas izstrādāšana”

6. Literatūras saraksts

1. Allton K., Jain A.K., Herz H.M., Tsai W.W., Jung S.Y., Qin J., Bergmann A., Johnson R.L., Barton M.C. 2009. Trim24 targets endogenous p53 for degradation. - Proc Natl Acad Sci USA., 106(28):11612-6
2. Álvarez P., Marchal J.A., Boulaiz H., Carrillo E., Vélez C., Rodríguez-Serrano F., Melguizo C., Prados J., Madeddu R., Aranega A. 2008. 5-Fluorouracil derivatives: a patent review. - Expert Rev Mol Med., (11) 10:e33
3. Arcamone F. Medical Chemistry 1981. Volume 17. Doxorubicin Anticancer Antibiotics. Pages 1-25
4. Asselin-Paturel C., Lassau N., Guinebretière J.M., Zhang J., Gay F., Bex F., Hallez S., Leclere J., Peronneau P., Mami-Chouaib F., Chouaib S. 1999. Transfer of the murine interleukin-12 gene in vivo by a Semliki Forest virus vector induces B16 tumor regression through inhibition of tumor blood vessel formation monitored by Doppler ultrasonography. - Gene Ther., 6(4):606-15
5. ATCC. 2014. B16-F0 (ATCC® CRL-6322™); 4T1 (ATCC® CRL-2539™) www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-6322.aspx?geo_country=lv&slp=1#generalinformation
6. Atkins G.J., Fleeton M.N., Sheahan B.J. 2008. Therapeutic and prophylactic applications of alphavirus vectors - Cambridge University Press, 10: e33
7. Balistreri G. 2010. Structure, function and intracellular dynamics of alphavirus replication complexes. Helsinki: Helsinki University Printing House, 88 pp.
8. BioVision, Inc. 2014. Red Fluorescent Protein (dsRed). <http://www.biovision.com/red-fluorescent-protein-dsred-2222.html>
9. Cabrele C., Vogel M., Piso P., Rentsch M., Schroder J., Jauch K.W. et al. 2006. 5-Fluorouracil-related enhancement of adenoviral infection is Coxsackievirus-adenovirus receptor independent and associated with morphological changes in lipid membranes. - World J Gastroenterol, 12: 5168-5174
10. Cancer Research UK. 2014. Worldwide cancer statistics. <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/world/cancer-worldwide-the-global-picture>
11. Chikkanna-Gowda CP., Sheahan BJ., Fleeton MN., Atkins GJ. 2005. Regression of mouse tumours and inhibition of metastases following administration of a Semliki

- Forest virus vector with enhanced expression of IL-12 – *Gene Therapy*, 12(16):1253-63
12. Chroma Technology Corporation. 2012. Fluorescence filter types. <http://www.chroma.com/knowledge/fluorescence-filters/fluorescence-filter-types>
 13. DiCiommo D.P., Bremner R.1998. - Rapid, high level protein production using DNA-based Semliki Forest virus vectors. *J Biol Chem.*, 273(29):18060-6
 14. Eisenberg D.P., Adusumilli P.S., Hendershott K.J., Yu Z., Mullerad M., Chan M.K. et al. 2005. 5-fluorouracil and gemcitabine potentiate the efficacy of oncolytic herpes viral gene therapy in the treatment of pancreatic cancer. - *J Gastrointest Surg*, 9: 1068-1077
 15. Eralp Y., Wang X., Wang J.P., Maughan M.F., Polo J.M., Lachman L.B. 2004. Doxorubicin and paclitaxel enhance the antitumor efficacy of vaccines directed against HER 2/neu in a murine mammary carcinoma model. - *Breast Cancer Res.*, 6(4):275-83
 16. Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J.W.W., Comber H., Forman D., Bray F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49(6): 1374-1403
 17. Granot T., Meruelo D. 2012. The role of natural killer cells in combinatorial anti-cancer therapy using Sindbis viral vectors and irinotecan. - *Cancer Gene Ther*, 19: 588-591
 18. Halloran C.M., Ghaneh P., Shore S., Greenhalf W., Zumstein L., Wilson D. et al. 2004. 5-Fluorouracil or gemcitabine combined with adenoviral-mediated reintroduction of p16INK4A greatly enhanced cytotoxicity in Panc-1 pancreatic adenocarcinoma cells. - *J Gene Med*, 6: 514-525
 19. Huang P.Y., Guo J.H., Hwang L.H. 2012. Oncolytic Sindbis virus targets tumors defective in the interferon response and induces significant bystander antitumor immunity in vivo. - *Mol Ther*, 20(2):298-305
 20. Hunt K.K., Vorburger S.A., Swisher S.G. 2007. *Gene therapy for cancer*. New Jersey: Humana Press Inc., 469 pp.
 21. Hutornojs V., Niedre-Otomere B., Kozlovska T., Zajakina A. 2012. - Comparison of ultracentrifugation methods for concentration of recombinant alphaviruses: sucrose and iodixanol cushions - *Environmental and Experimental Biology*, 10: 117–123

22. Kadota K., Huang C.L., Liu D., Yokomise H., Haba R., Wada H. 2011. Combined therapy with a thymidylate synthase-inhibiting vector and S-1 has effective antitumor activity against 5-FU-resistant tumors. - *Int J Oncol*, 38: 355-363
23. Kelly P.N., Strasser A. 2011. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. - *Cell Death Differ.*, 18(9): 1414–1424.
24. Liljestrom P., Lusa S., Huylebroeck D., Garoff H. 1991. - In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. *J Virol.*, 65(8):4107-13
25. Lyons JA., Sheahan BJ., Galbraith SE., Mehra R., Atkins GJ., Fleeton MN. 2007. - Inhibition of angiogenesis by a Semliki Forest virus vector expressing VEGFR-2 reduces tumour growth and metastasis in mice. *Gene Ther.* 14(6):503-13
26. Murphy A.M., Morris-Downes M.M., Sheahan B.J., Atkins G.J. 2000. Inhibition of human lung carcinoma cell growth by apoptosis induction using Semliki Forest virus recombinant particles. - *Gene Ther.*, 7(17):1477-82
27. Oven K., Luthar Z. 2013. Expression and molecular analysis of DsRed and gfp fluorescent genes in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) - *Acta agriculturae Slovenica*,101(1):5-14
28. Qiu S., Ruan H., Pei Z., Hu B., Lan P., Wang J. et al. 2004. Combination of Targeting Gene-ViroTherapy with 5-FU enhances antitumor efficacy in malignant colorectal carcinoma. - *J Interferon Cytokine Res*, 24: 219-230
29. Quetglas J.I., Ruiz-Guillen M., Aranda A., Casales E., Bezunarte J., Smerdou C. 2010. Alphavirus vectors for cancer therapy. – *Virus Research*, 153(2):179-96
30. Rausalu K., Iofik A., Ülper L., Karo-Astover L., Lulla V., Merits A. 2009. Properties and use of novel replication-competent vectors based on Semliki Forest virus. – *Virology Journal*, 6:33
31. Rhône C., Ehrenguber M.U., Grandgirard D. 2005. Alphaviral cytotoxicity and its implication in vector development. - *Exp Physiol.*, 90(1):45-52.
32. Rodriguez-Madoz J.R., Prieto J., Smerdou C. 2007. Biodistribution and Tumor Infectivity of Semliki Forest Virus Vectors in Mice: Effects of Re-administration. *Mol Ther.*, 15(12):2164-71
33. Sparano J.A., Wadler S., Liebes L., Robert N.J., Schwartz E.L., Dutcher J.P. 1993. Phase I trial of cyclophosphamide, doxorubicin, and 5-fluorouracil plus interferon-alpha 2b in patients with advanced breast cancer. - *Cancer Res.* 53(15):3509-12
34. Stanford M.M., Bell J.C., M.J.V., Koskela V.H. 2010. Novel oncolytic viruses: Riding high on the next wave? - *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21:177–183

35. Tseng J.C., Granot T., DiGiacomo V., Levin B., Meruelo D. 2010. Enhanced specific delivery and targeting of oncolytic Sindbis viral vectors by modulating vascular leakiness in tumor. - *Cancer Gene Ther.*, 17(4):244-55
36. UniProt Consortium 2002. – 2014. Q9U6Y8 (RFP_DISSP). <http://www.uniprot.org/Q9U6Y8> (RFP_DISSP)
37. Vähä-Koskela M.J.V., Heikkilä J.E., Hinkkanen A.E. 2007. Oncolytic viruses in cancer therapy. - *Cancer Letters*, 254:178–216
38. Vasilevska J., Skrastina D., Spunde K., Garoff H., Kozlovska T., Zajakina A. 2012. Semliki Forest virus biodistribution in tumor-free and 4T1 mammary tumor-bearing mice: a comparison of transgene delivery by recombinant virus particles and naked RNA replicon. - *Cancer Gene Ther.*, 19(8):579-87
39. Venticinque L., Meruelo D. 2010. Sindbis viral vector induced apoptosis requires translational inhibition and signaling through Mcl-1 and Bak. - *Mol Cancer.*, 9:37
40. Withoff S., Glazenburg K.L., van Veen M.L., Kraak M.M.J., Hospers G.A.P., Störkel S., de Vries E.G.E., Wilschut J., Daemen T. 2001. Replication-defective recombinant Semliki Forest virus encoding GM-CSF as a vector system for rapid and facile generation of autologous human tumor cell vaccines. – *Gene Therapy*, 8(20): 1515 – 1523
41. Ying H., Zaks T.Z., Wang R.F., Irvine K.R., Kammula U.S., Marincola F.M., Leitner W.W., Restifo N.P. 1999. Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. - *Nat Med.*, 5(7):823-7
42. Zajakina A., Vasilevska J., Zhulenkov D., Spaks A., Plotniece A., Kozlovska T. 2014. High efficiency of alphaviral gene transfer in combination with 5-fluorouracil in mouse mammary tumor model. – *Cancer: Accepted Manuscript ID: 1943893578105853*
43. Zheng J., Lee H.C.M., bin Sattar M.M., Huang Y., Bian J.S. 2011. Cardioprotective effects of epigallocatechin-3-gallate against doxorubicin-induced cardiomyocyte injury. - *Eur J Pharmacol.*, 562:82–88

Pielikumi.

1. Pielikums

Izmantotais inventārs:

- _ Agarozes gēlelektroforēzes aparāts, Roth Chemikalien (Karlsruhe) Laborbedaft, model No. HU6, serial No. 4676
- _ Aizgriežamie plastmasas trauki, 15 ml, SARSTEDT, Vācija
- _ Aizgriežamie plastmasas trauki, 50 ml, SARSTEDT, Vācija
- _ Automātisko pipešu uzgaļi (uz 1ml, 200µl un 10µl), Aktiengesellschaft&Co., Vācija
- _ Cimdi, gumijas, NCA MED-TOUCH™, NCA MED-TOUCH INT 'L, Thailand
- _ Elektroforēzes kamera *Roth*, mini electrophoresis unit N562.1, Vācija
- _ Elektroporācijas kivetes (0,4cm electrode), Gene Pulser-Cuvette, BIO-RAD, ASV
- _ Mikromēģenes (1,5 un 2ml), Eppendorf, Vācija
- _ Kolbas, mērcilindri, stikla pipetes, Petri plates (35x10mm), Miles Laboratories, Inc., ASV
- _ Petri plates, plastikāta, Linbro, Flow Laboratories, ASV
- _ Statīvi „Roth”, Karlsruhe, Vācija
- _ Stikla glāzes JENA er GLAS, RASOTHERM, Vācija
- _ Šūnu kultūru audzēšanas matricas SARSTEDT, Vācija
- _ Kultūru „slaidi”, Chamber-Slide System™, Lab — Tek-, Nalge Nunc International, Lielbritānija
- _ Vienreizējās plastikata pipetes (uz 2, 5, 10 un 25ml) Aktiengesellschaft&Co., Vācija

2. Pielikums

Izmantotās iekārtas:

- _ Autoklāvs, *Systec V-150*, ASV
- _ Automātiskais šūnu skaitītājs *Countess® Automated Cell Counter*, Invitrogen, Lielbritānija
- _ Automātiskās pipetes „*PIPETBOY acu*”, *Integra Biosciences*, Šveice
- _ Elektroforēzes aparāts *Amersham biosciences*, Lielbritānija
- _ Elektroporācijas aparāts, *Gene Pulser-II*, Model No. 165210B, *BIO-RAD*, ASV
- _ Fluorescences mikroskops, invertēts, *DM IL, LEICA*, Vācija
- _ Horizontālās plaknes maisītājs, *OS-10, BIOSAN*, Latvija
- _ Inkubators, šūnu kultūrām, *Sanyo Electronic Co., Ltd.*, Japana
- _ Laminārais skapis, *KOJAIR®*, model: KR-130, 2006-14666, ASV
- _ Mikroskops, invertēts, *LABOVERT FS, Seitz*, Vācija
- _ Minicentrifūga — vorteksējošais aparāts, *5415D, Eppendorf*, Vācija
- _ Plūsmas citometrs un šūnu šķirotājs *BD FACSAria II*, *BD Biosciences*
- _ Spektrofotometrs *NanoDrop 1000 (Thermoscience, USA)*_ Spektrofotometrs, *NanoDrop 1000*, Thermo Fisher Scientific, USA
- _ Strāvas avots forēzes aparātiem, *EPS 301, Amersham biosciences*, Lielbritānija
- _ Svari, analītiskie, *Mettler Toledo*, ASV
- _ Termostats, *THERMO-BLOCK TDB -120, Biosan*, Latvija
- _ Ultracentrifūga, *Eppendorf Centrifuge 5804, Eppendorf*, Vācija
- _ UV-transiluminators/fotografēšanas sistēma, *ULTRA-VIOLET Products*, ASV
- _ Vakuumsūknis, medicīniskais, *Vacusafe Comfort, Integra Biosciences*, Šveice

3. Pielikums

Izmantotie reaģenti un kultūru audzēšanas barotnes:

- _ MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), (*USB Corporation, USA*)
- _Agarozes gels, 1% (1 g agarozes, 100 mL 1x TAE buferšķīdums, 5 µL etīdija bromīds/100 mL TAE)
- _Barotne 4T1 šūnu kultūrai: DMEM *L-Glut*⁺ ++ (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ar pievienotu fetālo serumu (FS), 10%, streptamicīnu (100µg/ml), GIBCO, Lielbritānija
- _Barotne B16-F10 šūnu kultūrai: DMEM GlutaMAXTM ++ (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ar pievienotu fetālo serumu (FBS – fetal bovine serum) koncentrācijā 10% un gentamicīnu (80mg/mL)
- _Barotne BHK-21 šūnu kultūrai: GMEM ++ (Glasgow's Minimal Essential medium) + L-Glutamine +Tryptose Phosphate Broth + HEPES + FS + PEST
- _Barotne, šķidrā, 2Ty (+ 100 µg ampicilīna/ 1 mL barotnes)
- _DEPC H₂O, *Fermentas, Lietuva*
- _DNāze (stock – 5U/ µL), *Fermentas, Lietuva*
- _DOX (*MP Biomedicals, LLC*)
- _EDTA – etilēndiamīntetraactāts, *Gibco*
- _Etanols, 70%
- _Fosfāta buferis PBS+/, -/- (Phosphate beffered saline), ar vai bez MgCl₂ CaCl₂ (*Invitrogen, Lielbritānija*)
- _GeneRulerTM 1 kB DNA Ladder marķieris (*Fermentas, Lietuva*).
- _LB barotne (- ampicilīns)
- _RNāžu inhibitors (RiboLock® RNase Inhibitor, *Fermentas, Lietuva*),
- _RNS *cap* struktūras analogs - 7mG(5')ppp(5'G) (*NewEngland Biolabs, Lielbritānija*)
- _rNTF maisījums (20 µL ATP, 20 µL UTP, 20 µL CTP, 10 µL GTP, 130 µL H₂O) *Fermentas, Lietuva*
- _SP6 RNS polimerāzes (*Fermentas, Lietuva*)
- _SpeI (*BcuI*) restriktāze, *Fermentas, Lietuva*
- _TAE buferšķīdums x 1 (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA),
- _transkripcijas buferis (40 mM Tris-Cl (pH 7.9 25°C), 6 mM MgCl₂, 10mM ditiotritols, 10mM NaCl, 2mM spermidīns (*Fermentas, Lietuva*))
- _Tripsīns, (Trypsin-EDTA, *Gibco, Skotija*)
- _Yellow Tango buffer (x10), *Fermentas, Lietuva*

_ Barotne DMEM/ F-12 Ham 1:1 x1 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham*) ar pievienotu 15 mM HEPES un nātrija bikarbonātu, kā arī piridoksīnu, (*GIBCO*, Lielbritānija)

7. Pielikums

Šī darba rezultāti tika prezentēti:

- Latvijas Universitātes 71. Konferencē, Rīga (2013) „Alfavīrusu onkolītisko īpašību izpēte kombinācijā ar ķīmijas terapijas preparātiem” (J. Vasiļevska, B. Ķūrēna, A. Zajakina);
- Konferencē „Биология - наука XXI века” Krievijā, Puščino (aprīlis 2012), konferenču tēzes: „In vitro evaluation of Semliki Forest virus infectivity in combination with chemotherapeutic agents for cancer treatment” (B. Kurena, A. Zajakina, T. Kozlovska, J. Vasilevska; *Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga, Latvia*)

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes pilna laika (klātienes) bioloģijas bakalaura studiju programmas 3. kursa studentes Baibas Ķūrēnas (stud. apl. Nr. bk11020) bakalaura darbs tika izstrādāts Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autore: _____ /Baiba Ķūrēna/ 2014.g. ____.

Rekomendējam darbu aizstāvēšanai:

Darba vadītāja: _____ /Maģ. biol., Jeļena Vasiļevska/ 2014.g. ____.

Recenzente: _____ / Maģ. biol., Anda Hūna/ 2014.g. ____.

Darbs iesniegts Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes bioķīmijas un molekulārās bioloģijas katedrā 2014.g. ____.

Katedras vadītājs: _____ / Dr. biol., Kaspars Tārs / 2014.g. ____.

Darbs aizstāvēts bakalaura darbu gala pārbaudījuma komisijas sēdē

2014. gada 11. jūnijā, prot. Nr. _____, vērtējums _____

Komisijas sekretārs (-e) _____