

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

ALFAVĪRUSU VADĪTA *SI-CLP* GĒNA PIEGĀDE PEĻU
KRŪTS VĒŽA MODELĪ

Maģistra darbs

Autors: Agnese Ezerta
Stud. apl. Nr. ae10021
Darba vadītājs: Dr. biol. Anna Zajakina
Recenzents: Dr. biol. Dace Skrastīņa

RĪGA 2015

SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	5
KOPSAVILKUMS.....	6
SUMMARY	7
IEVADS	8
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	10
1.1. Krūts vēzis un audzēju veidojošās šūnas	10
1.2. Audzēju mikrovide un makrofāgu loma tajā.....	10
1.2.1. Makrofāgu tipi.....	13
1.2.2. Makrofāgu loma audzēju progresijā un attīstībā	15
1.3. Hitināzei-līdzīgais <i>SI-CLP</i> proteīna gēns.....	17
1.4. Alfavīrusi	19
1.4.1. Alfavīrusu struktūra un replikācija	19
1.4.2. Rekombinanto alfavīrusu ekspresijas vektoru sistēmas	22
1.4.3. Rekombinanto alfavīrusu vektoru priekšrocības audzēju gēnu terapijā	25
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	27
2.1. Materiāli	27
2.1.1. Plazmīdas.....	27
2.1.2. Baktēriju celmi	29
2.1.3. Rekombinantie alfavīrusu vektori	29
2.1.4. Šūnu līnijas	29
2.1.5. Reaģenti.....	29
2.1.6. Reaģentu komplekti.....	31
2.1.7. Buferšķīdumi	31
2.1.8. Šūnu barotnes	32
2.1.9. Ierīces	33
2.1.10. Materiāli	34
2.1.11. Programmatūra	34

2.2. Metodes	35
2.1.1. Bakteriālā transformācija.....	35
2.2.2. Baktēriju kolonnu pārvešana šķidrā LB barotnē	35
2.2.3. pDNS izdalīšana no <i>E.coli</i> šūnām	35
2.2.4. Plasmīdu restrikcija	36
2.2.5. pSFV1/Enh.mSI-CLP un pSFV1/Helper1 RNS transkripcija in vitro	36
2.2.6. BHK-21 šūnu elektroporācija ar rekombinantām RNS un vīrusu daļiņu savākšana/sasaldēšana	37
2.2.7. rekSFV1/Enh.mSI-CLP vīrusa koncentrēšana ar ultracentrifugēšanu	37
2.2.8. BHK-21 un TS/A šūnu audzēšana 24 aiļu platē	38
2.2.9. BHK-21 un TS/A šūnu inficēšana ar <i>mSI-CLP</i> gēna SFV un SIN vektoriem un <i>Luc</i> gēnu saturošo SFV vektoru 24 aiļu platē	38
2.2.10. <i>mSI-CLP</i> gēna saturošo SFV un SIN vektoru un <i>Luc</i> gēna saturošo SFV vektora vīrusa titra imunodetekcija.....	38
2.2.11. Vīrusu titra noteikšana.....	39
2.2.12. BHK-21 un TS/A šūnu inficēšana 75 cm ² matracī ar <i>mSI-CLP</i> gēna saturošo SFV un SIN vektoriem un <i>Luc</i> gēna saturošo SFV vektoru	40
2.2.13. Ar <i>mSI-CLP</i> gēna saturošo SFV un SIN vektoru un <i>Luc</i> gēna saturošo SFV vektoru inficēto BHK-21 un TS/A šūnu barotņu un lizātu savākšana.....	40
2.2.14. SI-CLP un <i>Luc</i> proteīna imunoprecipitācija no vīrusu inficētām BHK-21 un TS/A šūnu kultūru barotnēm un lizātiem.....	40
2.2.15. SDS–PAGE – nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gēla elektroforēze.....	41
2.2.16. Western blot proteīna analīze	41
2.2.17. Makrofāgu izdalīšana no BALB/c pelēm	42
2.2.18. Makrofāgu imunokrāsošana	43
2.2.19. TS/A audzēju iegūšana peļu organismā	43
2.2.20. TS/A audzēju saturošo peļu infekcija ar rekSFV vīrusiem	44
2.2.21. TS/A audzēju mikrogriezumu veikšana un to fiksēšana	44
2.2.22. TS/A mikrogriezumu fiksētu PFA imūnhistoķīmijas analīze.....	44
2.2.23. TS/A mikrogriezumu fiksētu acetona imūnhistoķīmijas analīze.....	45
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	47

3.1. Rekombinanta alfavīrusu vektora rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG konstrukcija un vīrusu vektoru vadīta <i>SI-CLP</i> gēna ekspresija <i>in vitro</i>	47
3.2. Alfavīrusu rekSFV1/Enh.mSI-CLP un rekSFV1/Enh.Luc vadīta transgēnu pārbaude proteīnu līmenī.	50
3.3. Alfavīrusa rekSFV1/Enh.mSI-CLP ekspresija peļu krūts vēža modelī <i>in vivo</i>	53
3.4. No BALB/c pelēm izdalīto makrofāgu analīze.....	55
3.5. TS/A audzēju imunohistoķīmiskā analīze.....	56
SECINĀJUMI.....	62
PATEICĪBAS.....	63
IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	64
PIELIKUMI	

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

- BHK-21 – Sīrijas zeltainā kāmjā mazuļu nieru šūnas (*Baby Hamster Kidney*)
- DNS – dezoksiribonukleīnskābe
- FLAG – peptīda sekvence
- hSI-CLP – hitināzei-līdzīgais cilvēka *SI-CLP* gēns (*human SI-CLP*)
- IL – interleikīns
- ip* – intraperitoneāla injekcija
- it* – intratumorāla injekcija
- kDa – kilodaltoni
- M1 – klasiski aktivētie makrofāgi
- M2 – alternatīvi aktivētie makrofāgi
- MHC – galvenais audu saderības komplekss (*Major Histocompatibility Complex*)
- mSI-CLP – hitināzei-līdzīgais peles *SI-CLP* gēns (*mouse SI-CLP*)
- ORF – atvērtais nolasīšanas rāmis (*Open Reading Frame*)
- pDNS – plazmīdas DNS
- pSFV1 – Semliki meža vīrusa plazmīdas vektors
- rekSFV vīruss – *in vitro* sintezēts, rekombinants Semliki meža vīruss
- RNS – ribonukleīnskābe
- RNS (-) ķēde – RNS negatīvās polaritātes ķēde
- RNS (+) ķēde – RNS pozitīvās polaritātes ķēde
- SDS-PAGE – nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gēla elektroforēze (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
- SFV – Semliki meža vīruss (*Semliki Forest Virus*)
- SFV/Enh.Luc – rekombinantais Semliki meža vīrusa replikons ar ieklonētu translācijas enhanceru un jāņtārpiņu luciferāzes gēnu
- SFV/Enh.SI-CLP – rekombinantais Semliki meža vīrusa replikons ar ieklonētu translācijas enhanceru un hitināzei-līdzīgo *SI-CLP* gēnu
- SIN – Sindbis vīruss (*Sindbis virus*)
- Th1 – T palīgšūna 1 (*T helper 1*)
- Th2 – T palīgšūna 2 (*T helper 2*)
- TS/A – metastazējoša peles krūts adenokarcinomas šūnu līnija
- v.d. – vīrusa daļiņas
- VEE – Venecuēlas zirga encefalīta vīruss (*Venezuelan Equine Encephalitis virus*)

KOPSAVILKUMS

Pēdējā laikā parādīta augsta alfavīrusu vektoru aktivitāte divos pretvēžu terapijas pamatvirzienos: audzēju šūnu apoptozes indukcijā un pretvēža imūnmodulācijā, kur makrofāgiem ir neaizvietoājama loma pretvēža imūnātbildes veidošanā.

Šī darba ietvaros izveidots jauns onkolītisks SFV vektors ar saturošo hitināzei-līdzīgo peles *SI-CLP* gēnu, kura funkcijas organismā līdz šim nav zināmas. Izveidotā rekSFV1/Enh.mSI-CLP vektora raksturošanai tika analizēta tā infekcijas spēja BHK-21 un peļu krūts vēža TS/A šūnu līnijās *in vitro* un SI-CLP proteīna produkcijas un sekrēcijas pārbaude ar Western blot metodi.

Lai izpētītu vektora terapeitiskas īpašības, tika veikts *in vivo* eksperiments krūts audzēja TS/A modelī. Atkārtotas intratumorālas injekcijas ar SFV vektoru uzrādīja audzēja samazināšanos visām ārstētām pelēm par 10–40% un tika detektēta SI-CLP proteīna spēja stimulēt makrofāgu plūsmu uz audzēju perifēriju, kas pierāda tā terapeitisko potenciālu vēža terapijā.

Atslēgvārdi: krūts vēzis, audzēju asociētie makrofāgi, alfavīrusi, SI-CLP, terapija

SUMMARY

Lately high activity of alphavirus vectors has been shown in two main directions of anti-cancer therapy: induction of tumor cell apoptosis and anticancer immunomodulation, where macrophages take irreplaceable role in anti-tumor immune response.

In this study, we have designed a new oncolytic SFV vector carrying chitinase-like mouse *SI-CLP* gene, that functions still remain unknown. The infection ability of constructed rekSFV1/Enh.mSI-CLP vector was analyzed *in vitro* using BHK-21 and mouse breast cancer TS/A cell lines, and SI-CLP protein production and secretion was tested by Western blot technique.

To study vector therapeutic potential, *in vivo* experiment in TS/A mammary tumor models was performed. We have shown that repeated intratumoral injections with SFV vector led to 10–40% reduction in tumor volume in all treated mice, moreover, SI-CLP protein was able to stimulate macrophage infiltration in tumor periphery that demonstrates its high therapeutic potential for cancer treatment.

Keywords: breast cancer, tumor-associated macrophages, alphaviruses, SI-CLP, therapy

The title of the work: Alphavirus mediated *SI-CLP* gene delivery in a mouse mammary tumor model.

IEVADS

Krūts vēzis ir visbiežāk diagnosticētais ļaundabīgais audzējs sievietēm, kas izraisa vienu no vislielākajiem mirstību rādītājiem starp citiem audzēju veidiem. Katru gadu pasaulē tiek diagnosticēti vairāk nekā 1,38 miljoni jaunu saslimšanu gadījumu (Jiang 2014). Neskatoties uz sasniegumiem agrīnā krūts vēža diagnostikā un ārstēšanā, kas veicina mirstības samazināšanos, metastazējošais krūts vēzis joprojām tiek uzskatīts par neārstējamu slimību. Līdz ar to, ir nepieciešamas jaunas un efektīvākas ārstēšanas metodes cīņā ar krūts vēzi (Di Gioia et al. 2015).

Pēdējā laikā par vienu no svarīgākajiem faktoriem vēža progresijā, angiogēnēzē, metastāzēs un imūnās atbildes traucējumos tiek uzskatīta audzēja mikrovide (Tsai et al. 2014). Aptuveni pusi no krūts audzēja masas aizņem makrofāgi, kurus ir iespējams aktivizēt ar dažādiem stimuliem un polarizēt funkcionāli atšķirīgos fenotipos M1 un M2. Pēdēja laikā ir nostiprinājies pieņēmums, ka M2 makrofāgi aizsargā attīstošo audzēju no imūnsistēmas, ekspresējot plašu pret-iekaisuma citokīnu spektru, tajā skaitā arī dažādus angiogēnēzes stimulējošos faktorus, kas nodrošina audzēja augšanu un metastazēšanu. Turpretī, M1 fenotipa makrofāgiem ir pro-iekaisuma funkcijas, kas varētu apstādināt audzēju attīstību (Obeid et al. 2013). Līdz ar to, audzēju mikrovides modulēšana, pielietojot dažādus vektorus un ekspresējot jaunus gēnu kandidātus ar mērķi nodrošināt makrofāgu plūsmu audzējos un to polarizāciju uz M1 fenotipu, tiek uzskatīta par vienu no pievilcīgākajām stratēģijām pretvēžu imūnterapijā (Noy et al. 2014).

Audzēju asociētiem makrofāgiem raksturīgs šūnu virsmas receptors stabilīns-1, ar kuru mijiedarbības rezultātā sekretējas hitināzei-līdzīgais SI-CLP proteīns. Līdz šim proteīna SI-CLP funkcijas audzējā nav zināmas (Kzhyshkowska 2010).

Darba mērķis: Noskaidrot ar Semliki meža vīrusa (SFV) replikona palīdzību piegādāta SI-CLP gēna kodētā proteīna sekrēcijas ietekmi uz krūts audzēja mikrovidi.

Darba mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši uzdevumi:

1. Izveidot rekombinantu rekSFV1/Enh.mSI-CLP vektoru.
2. Pārbaudīt *SI-CLP* gēna saturošo SFV un SIN vektoru ekspresiju BHK-21 un TS/A šūnu kultūrās.
3. Pārbaudīt SI-CLP proteīna produkciju un sekrēciju BHK-21 un TS/A šūnu barotnēs un lizātos pēc infekcijas ar *SI-CLP* gēna saturošiem SFV un SIN vektoriem.
4. Veikt rekombinantā alfavīrusu vektora rekSFV1/Enh.mSI-CLP aktivitātes pārbaudi peļu krūts vēža TS/A modelī.

5. Pēc intratumorālām injekcijām ar rekSFV1/Enh.mSI-CLP vektoru, veikt makrofāgu lokalizācijas analīzi peļu TS/A audzējos.

Maģistra darbs tika izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā no 2013. gada septembra līdz 2015. gada maijam; Heidelbergas universitātē, Manheimas medicīnas centrā 2014. gada novembrī.

In vivo eksperimentam tika izmantotas BALB/c peles, kas iegūtas no Rīgas Stradiņa universitātes Latvijas Eksperimentālās dzīvnieku laboratorijas, bet pētījumi veikti Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā (BMC). Eksperimentus ar pelēm apstiprināja Latvijas dzīvnieku aizsardzības ētikas komiteja un Pārtikas un veterinārais dienests, atļauja nr. 31/23.10.2010.

Darba rezultāti ir prezentēti sekojošā zinātniskajā konferencē:

A.Zajakina, J.Vasilevska, **A.Ezerta**, D. Zhulenkovs, T.Kozlovska "Application of oncolytic alphaviral vectors in combination with 5-fluorouracil for cancer treatment", lpp 24, Minsk 04-06.06.2014. *V Международная конференция «ХИМИЯ, СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ БИОМОЛЕКУЛ»*

Šobrīd sagatavošanā oriģinālā zinātniskā darba manuskripts:

A. Ezerta, A. Zajakina, J. Kzhyshkowska, J. Vasilevska, T. Kozlovska "Investigation of macrophage phenotype in mouse tumor models using alphaviral vectors".

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Krūts vēzis un audzēju veidojošās šūnas

Vēzis ir multifaktoriāla slimība, ko raksturo nekontrolēta audzēja šūnu proliferācija, invāzija un metastāzes. Metastāžu veidošanās dēļ, vēzis tiek uzskatīts par vienu no galvenajiem mirstības cēloņiem pasaulē (Tsai et al. 2014). Neskatoties uz panākumiem audzēju diagnostikā un terapijā, līdz 2030. gadam tiek prognozēti aptuveni 11,5 miljoni saslimšanas gadījumu (Conniot et al. 2014).

Krūts vēzis ir viens no visbiežāk diagnosticētajiem audzējiem sievietēm un, starp visiem audzēju veidiem, raksturojas ar lielāko pacientu mirstības līmeni. Lielākoties mirstība tiek saistīta ar audzēja spēju veidot metastāzes, galvenokārt, plaušās, aknās, kaulos un smadzenēs. Krūts vēža metastāzes ir multifunkcionāls process, kas ietver audzēja šūnu invāziju bazālā membrānā un limfātiskajā sistēmā, izdzīvotību asins šūnu cirkulācijā un limfvados, piestiprināšanos pie asinsvadu sienām un ekstravazāciju mērķa orgānos, kam seko tūlītēja kolonizēšanās un agresīva augšana, veidojot metastāzes audzējam labvēlīgos vides apstāļos (Ding et al. 2012).

Vēža ārstēšanas stratēģijas mūsdienās ietver ķīmijterapiju, radioterapiju, imūnterapiju un ķirurģiju. Daudzām no šīm ārstēšanas metodēm piemīt dažādi blakusefekti, kā arī ierobežota spēja organismu pilnīgi atbrīvot no vēža šūnām. Līdz ar to, tiek meklēti efektīvāki un specifiskāki alternatīvi ārstēšanas paņēmieni (Conniot et al. 2014).

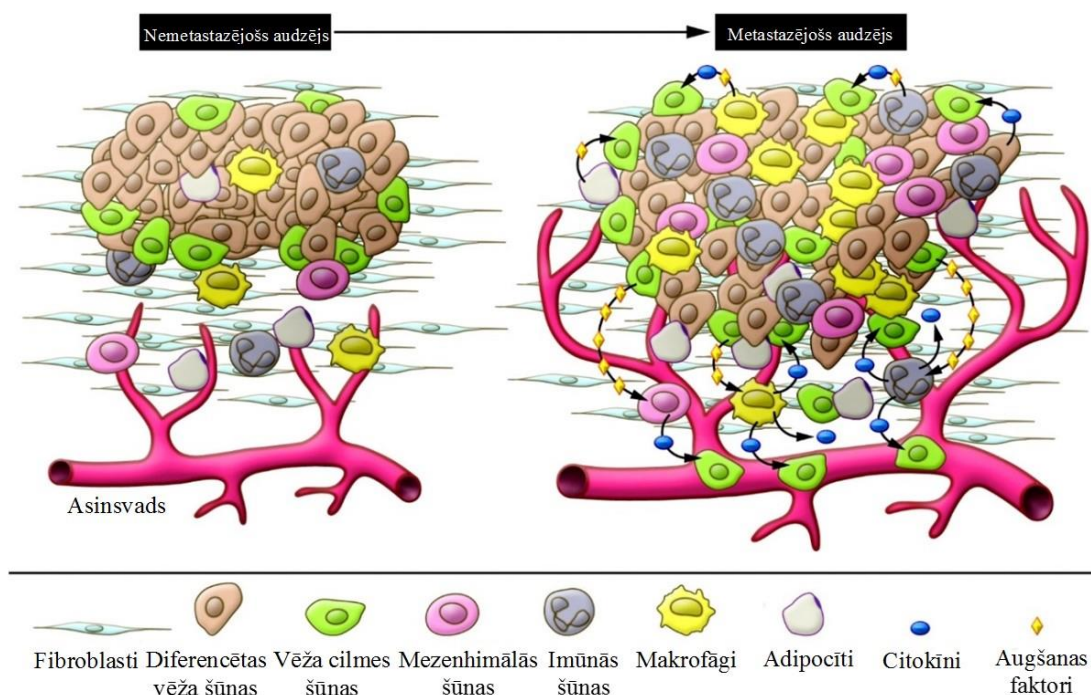
1.2. Audzēju mikrovide un makrofāgu loma tajā

Audzēju mikrovide veido dažādi organisma šūnu tipi, tiem apkārt esošie asinsvadi, matriksa proteīni un šķīstošas molekulas (Obeid et al. 2013). Imūnsistēmas šūnas, kas galvenokārt veido audzēja masu, sekretē citokīnus, hemokīnus, augšanas un proangiogēnos faktorus, kuri stimulē epiteliālo proliferāciju un veido reaktīvo skābekli (*reactive oxygen species* – ROS), bojājot šūnu DNS, veicinot audzēja veidošanos un progresiju. Tās izdala arī proteolītiskos enzīmus, kas piedalās matriksa pārveidošanā un angiogēneses attīstībā (Siemann 2011).

Krūts vēža mikrovide ir īpaši bagāta ar iekaisuma citokīniem, kas ļoti bieži nespēj izraisīt imūno aizsardzības mehānismu, bet darbojas pretēji – veicina audzēja attīstību (Leibovich-Rivkin et al. 2013). Svarīgākie audzēja progresiju veicinošie citokīni ir, piemēram, audzēja nekrozes faktors alfa (*tumor necrosis factor alpha* – TNF- α), interleikīns 1

beta (IL-1 β) un transformējošais augšanas faktors beta (*transforming growth factor beta* – TGF- β) (Esquivel-Velázquez et al. 2015). TNF- α ir visplašāk pētītais krūts vēža citokīns, jo piedalās audzēja proliferācijā, progresijā, šūnu diferenciācijā, migrācijā un apoptozē (Esquivel-Velázquez et al. 2015). TNF- α un IL-1 β normālos krūts epitēlija audos tiek ekspresēti minimālā daudzumā, bet ir augsti ekspresēti audzēja šūnās. Pētījumi peļu krūts vēža modelī norāda uz to, ka TNF- α ekspresija samazinās, ja samazinās krūts audzēja ļaundabīgums, bet IL-1 β paaugstinās angiogēnēzes un krūts vēža progresijas gadījumā (Leibovich-Rivkin et al. 2013).

Audzēja masu veido tādas organisma šūnas kā audzēja šūnas, T šūnas, naturālās galētajšūnas (*natural killer cells* – NK), makrofāgi, dendrītiskās šūnas (Tsai et al. 2014), fibroblasti, limfoīdās šūnas, granulocīti un tuklās šūnas (1. attēls). Aptuveni 50% no krūts audzējā esošām šūnām sastāda makrofāgi (Mukhtar et al. 2011).



1. attēls. Audzēju mikrovide.

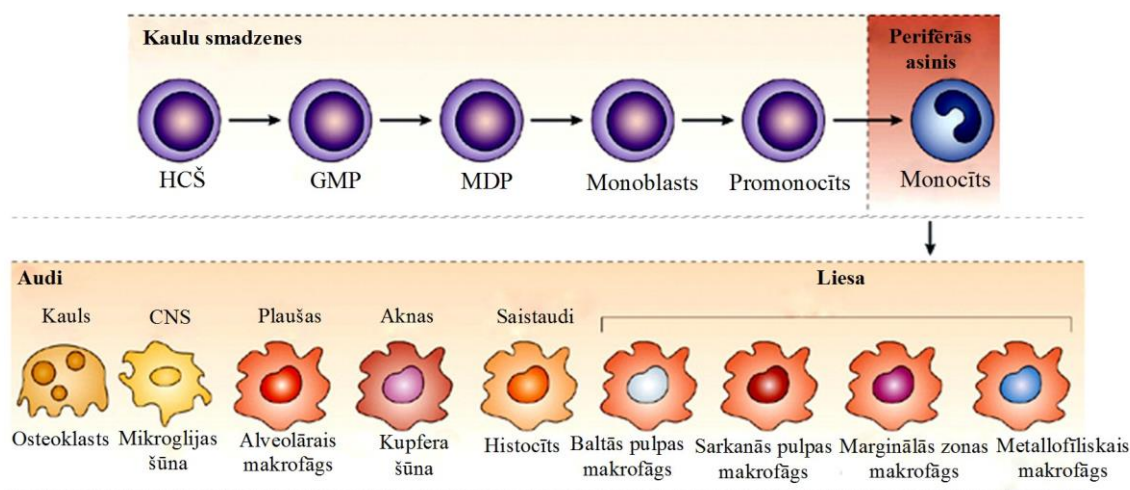
Vēža šūnu producēts paaugstināts citokīnu un augšanas faktoru līmenis veicina vēža cilmes šūnu proliferāciju un izdzīvotību, inducē angiogēzi, piesaista vidē audzēja asociētos makrofāgus, neitrofilus un tuklās šūnas. Tie attiecīgi sekretē augšanas hormonus, veicinot audzēja šūnu invāziju un metastāžu veidošanos (attēls pārveidots no Korkaya et al. 2011).

Figure 1. The tumor microenvironment.

Elevated levels of cytokines and growth factors produced by tumor cells enhance the proliferation and survival of cancer stem cells, induce angiogenesis, and recruit tumor-

associated macrophages, neutrophils, and mast cells. They secrete additional growth factors, promoting tumor cell invasion and metastasis (figure converted from Korkaya et al. 2011).

Makrofāgi ir mieloīdo šūnu heterogēna populācija, kurai ir svarīga loma iedzimtajā imūnajā sistēmā (Heusinkveld, Van der Burg 2011). To veidošana ietver sekojošus posmu – HCŠ diferencēšanos par granulocītu-makrofāgu priekšteci (GMP), kam seko diferenciacija par makrofāgu un dendrītisko šūnu priekšteci (MDP), monocītu priekšteci (monoblasts), promonocītu un monocītu (Italiani, Boraschi 2014) (2. attēls).



2 attēls. Monocītu heterogenitāte (attēls pārveidots no Mosser, Edwards 2008).

Figure 2. Monocyte heterogeneity (figure converted from Mosser, Edwards 2008).

Makrofāgu priekšteči ir monocīti, kas ir balto asins šūnu (leikocītu) grupa, cirkulējoša asinīs, kaulu smadzenēs un liesā. Cilvēka organismā tie sastāda aptuveni 10% no kopējā leikocītu daudzuma, bet pelēs 2–4%. Monocīti veidojas kaulu smadzenēs no hematopoētisko $CD34^+$ cilmes šūnu (HCŠ) priekštečiem (Shi, Pamer 2011), proliferē (Lewis, Pollard 2006) un attīstās, izmantojot virkni secīgus diferenciacijas posmus, dēvētus par monopoēzi (Richards et al. 2013). To galvenā loma ir organismu nodrošināt ar makrofāgiem un dendrītiskajām šūnām (Yang et al. 2014), kā arī atbrīvot no atmirušajām šūnām un toksiskām molekulām (Woollard, Geissmann 2010). Tā kā cirkulācijā monocīti atrodas aptuveni vienu līdz divas dienas, tad infekcijas vai audu iekaisuma gadījumā, tie no cirkulācijas migrē uz audiem, kļūstot par audu makrofāgiem (Italiani, Boraschi 2014).

Makrofāgi atrodas gandrīz visos organisma audos (Parsa et al. 2012) un sastāda aptuveni 10–15% no kopējā organisma šūnu daudzuma. Tiem ir svarīga loma organisma aizsargreakcijās, imūnās atbildes veidošanā pret patogēniem, iekaisuma veidošanā un veicināšanā, šūnu proliferācijā, antigēnu prezentēšanā, audu modelēšanā (Brown et al. 2014),

kā arī audu homeostāzes nodrošināšanā (apopotisku un novecojošu šūnu aizvākšanā no audiem) (Italiani, Boraschi 2014). Iekaisuma veidošanās gadījumā, organismā raksturīgs straujš makrofāgu skaita pieaugums 24–48 h laikā (Brown et al. 2014).

1.2.1. Makrofāgu tipi

Ir sastopami divu tipu makrofāgi – klasiski aktivētie jeb M1 tipa un alternatīvi aktivētie jeb M2 tipa makrofāgi. Makrofāgu tips tiek identificēts, balstoties uz transkripcijas faktoru ekspresiju, šūnas virsmas marķieriem, citokīnu un hemokīnu produkciju, kā arī uz to funkcijām audos (Heusinkveld, Van der Burg 2011). Tie spēj kavēt vai veicināt audzēja veidošanos un ir saistīti ar dažādu audzēju attīstību un progresiju, kā krūts vēža, prostatas, gliomas, limfomas, urīnpūšļa, melanomas, plaušu, kakla (Mukhtar et al. 2011), dzemdes kakla, vairogdziedzera, aizkuņģa dziedzera, aknu un citiem vēža veidiem (Zhang et al. 2014).

M1 tipa makrofāgi ir iekaisumu veicinošas imūnsistēmas šūnas. Tie piedalās T palīgšūnu 1 (*T helper 1* – Th1) imūnās atbildes veidošanā, šūnu infekcijas gadījumā ir spējīgi iznīcināt organisma saimniekaudus, lai atbrīvotos no tajā iekļuvušajiem intracelulārajiem patogēniem (Villalta et al. 2009), un tiem piemīt augstas antigēnu prezentēšanas spējas (Wang et al. 2014).

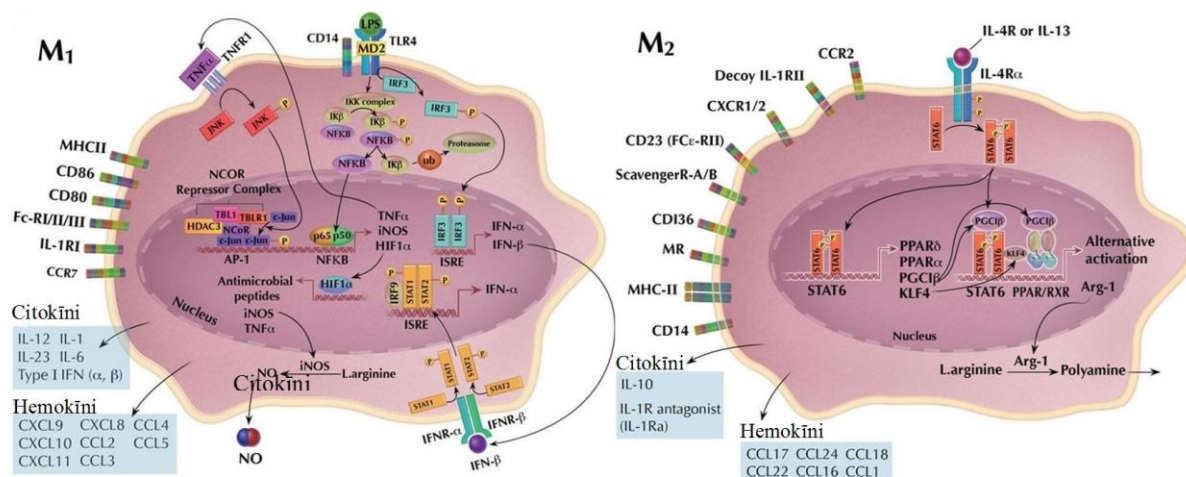
M2 tipa makrofāgi tiek saistīti ar bojāto audu labošanu, modelēšanu un fibrozi (Ploeger et al. 2013). Tie piedalās T palīgšūnu 2 (*T helper 2* – Th2) imūnās atbildēs, spēlē svarīgu lomu ekstracelulāru patogēnu aizvākšanā no organisma (Villalta et al. 2009) un alerģiskās reakcijās (O'Brien, Schedin 2009). Tiem raksturīga zema antigēnu prezentēšanas spēja (Allavena et al. 2008). M2 tipa makrofāgi iedalās trīs subtipos, balstoties uz konkrētiem šūnu aktivējošiem faktoriem – M2a (aktivēti ar IL-4 un IL-13), M2b (aktivēti ar imūniem kompleksiem vai TLR receptoru ligandiem) un M2c (aktivēti ar IL-10 palīdzību un glukokortikoīdu hormoniem) (Villalta et al. 2009). M2a un M2b makrofāgu subtipi veicina Th2 imūnās atbildes, sekretējot Th2 citokīnus, tādējādi aktivējot šūnas. Turpretī M2c subtips ir atbildīgs par iekaisuma nomākšanu, kas ir Th1/M1 tipa imunoloģiskās reakcijas atbilde (Obeid et al. 2013). Atšķirībā no M2a un M2b makrofāgiem, M2c nomāc MHC II klases molekulu darbību, kuras nepieciešamas antigēnu prezentēšanai (O'Brien, Schedin 2009).

M1 un M2 tipa makrofāgi audos sekretē lielu daudzumu citokīnu un hemokīnu, kas ir svarīgi dažādos makrofāgu tipam raksturīgos fizioloģiskos procesos (Heusinkveld, Van der Burg 2011) (1. tabula) (3. attēls).

1. tabula
Makrofāgu polarizācijas inducētāji, virsmas marķieri un produkti.

Table 1
Macrophage inducers, surface markers and products.

M1 tipa makrofāgi	M2 tipa makrofāgi
<u>Polarizācijas inducētāji:</u> INF- γ , TNF- α , LPS, GM-CSF (Orme, Mohan 2012);	<u>Polarizācijas inducētāji:</u> IL-4, IL-10, IL-13, PPAR γ -antagonisti, IL-1R antagonisti, LPS, TLR antagonisti, glukokortikoīdi, TGF- β (Orme, Mohan 2012);
<u>Virsmas marķieri un produkti:</u> CCL2, CCL5, CCR2, CCR7, CD14, CD68, CD86, CXCL8, CXCL16, CXCL9-11, Fc γ (augsta produkcija), IFN, IL-1, IL-6, IL-10 (zema produkcija), IL-12 (augsta produkcija), IL-23, IL-R $_1$, Ly6C (augsta produkcija), CCL2-4, MHC II, TLR (augsta produkcija), TNF- α , iNOS (ROS) (Orme, Mohan 2012), MHC I (Chanmee et al. 2014), NO (Obeid et al. 2013), CD11c (Movahedi et al. 2010), CD80 (Hirose et al. 2011) u.c.	<u>Virsmas marķieri un produkti:</u> argināze, CCL1, CCL2, CCL16-18, CCL17, CCL22, CD163, CXCR1-2 (augsta produkcija), CCL24, dektīns-1, FC ϵ R, IL-1, IL-6, IL-4R, IL-10 (augsta produkcija), IL-12 (zema produkcija), IL-R $_2$, lektīns, MHC II, MSR1, mannoze R, scavenger R, P2Y12-13, CD68, CD86, TNF, CCR2 (augsta produkcija), CD14 (augsta ekspresija), CD150, CD163, ECM, IL-Ra, Stabilīns-1 (Orme, Mohan 2012) u.c.



3. attēls. M1 un M2 tipa makrofāgi ar tiem raksturīgo šūnas signālu mehānismu (attēls pārveidots no Tugal et al. 2013).

Figure 3. M1 and M2 type macrophages with typical signal mechanism of the cell (figure converted from Tugal et al. 2013).

1.2.2. Makrofāgu loma audzēju progresijā un attīstībā

Makrofāgi audzējos sastāda lielāko daļu no stromā esošā leikocītu infiltrāta un tos dēvē par audzēju asociētajiem makrofāgiem (*Tumor-associated macrophages* – TAM) (Obeid et al. 2013). Līdz šim makrofāgu loma audzējā tiek aprakstīta pretrunīgi, jo zināms, ka kolorektālā audzējā tiem piemīt iekaisumu veicinošās īpašības, turpretī tādos audzējos kā krūšu, prostatas, olnīcu, kakla, plaušu un melanomā, makrofāgiem ir pretiekaisumu funkcijas (Hao et al. 2012). Ir veikti vairāki klīniskie pētījumi, lai noskaidrotu korelāciju starp audzēju asociēto makrofāgu daudzumu audzējā un prognozēm to samazināt vai likvidēt. Rezultāti ir pierādījuši, ka palielināts makrofāgu daudzums 80% gadījumu tiek saistīts ar audzēja metastāzēm un sliktām prognozēm, piemēram, krūts vēža likvidēšanā (Bingle et al. 2002 cit. pēc Obeid et al. 2013). Audzēju asociētie makrofāgi atbilst M2 tipa raksturīgajām funkcijām (Guo et al. 2013) un marķieru ekspresijai (Hao et al. 2012). Lai identificētu tos krūts vēža modeļos, tiek izmantota imūnohistoķīmijas analīze, plūsmas citometrija un to funkcionāla pārbaude (Mukhtar et al. 2011).

Makrofāgu migrācija audzējā notiek pateicoties dažādiem hemoatraktantiem, kurus izdala audzēja šūnas (Fujimoto et al. 2009), fibroblasti, endotēlija šūnas, kā arī paši audzēju asociētie makrofāgi (Murdoch et al. 2004). Audzēja mikrovidē sekretēto hemoatraktantu līmenis pozitīvi korelē ar audzēju asociēto makrofāgu daudzumu (Lewis, Pollard 2006). Svarīgākie no sekretētajiem hemoatraktantiem ir hemokīna (C-C motīva) ligandi – CCL2 un CCL5, kuri ir nepieciešami vēža progresijā. Hemoatraktanti stimulē monocitārās šūnu līnijas, asins monocītus un smadzeņu makrofāgus sekretēt matricas metalopeptidāzes (MMP) un urokināzes tipa plazminogēna aktivatora receptoru (*urokinase-type plasminogen activator receptor* - uPAR), lai degradētu bazālo membrānu un ekstracelulārā matricas komponentus (Murdoch et al. 2004).

Audzēju asociētie makrofāgi ekspresē dažādus faktoros, kā epidermālo augšanas faktoru (*epidermal growth factor* – EGF), TGF-β1, hepatocītu augšanas faktoru (*hepatocyte growth factor* – HGF) un fibroblastu augšanas faktoru (*basic fibroblast growth factor* – bFGF), kas stimulē audzēju proliferāciju un dzīvotspēju. Turklāt, audzēju asociēto makrofāgu klātbūtne ir svarīga dažādu audzēju augšanai *in vivo* (Lewis, Pollard 2006).

Viena no audzēju vidē raksturīgajām īpašībām ir zems skābekļa daudzums audos jeb hipoksija, kas saistīts ar nepilnīgi izveidojušos angioģenēzi. Rezultātā audzējā veidojas audu nekrotiska vide, kas būtiski pievilina audu makrofāgus, pateicoties to spējai fagocitēt

(Murdoch et al. 2004). Ir pierādīts, ka līdz ko makrofāgi ir pievilināti, tie vairs nespēj pamest nekrotisko vidi (Turner et al. 1999), līdz ar to, audzēja asociēto makrofāgu akumulācija hipoksijas apstākļos var tikt saistīta ar audzēja agresivitātes izpausmēm (Obeid et al. 2013).

Lai audzējs spētu progresēt, invadēt un veidot metastāzes, tam nepieciešama asinsvadu izveide skābekļa un barības vielu piegādei (Guo et al. 2013). Audzēju asociētie makrofāgi ietekmē audzēju, stimulējot angiogēnēzi. Tas tiek panākts ekspresējot dažādus angiogēnēzi veicinošus faktorus, piemēram, vaskulārā endotēlija augšanas faktoru (*vascular endothelium growth factor* – VEGF) (Obeid et al. 2013), TNF- α , IL-8, bFGF (Lewis, Pollard 2006) un makrofāgu kolonijas stimulējošo faktoru (*macrophages-colony stimulation factor* – M-CSF1). M-CSF-1 daudzuma samazināšanās vai inhibēšanas gadījumā, samazinās audzēja asociēto makrofāgu daudzums, kas noved pie ievērojamiem audzēja augšanas traucējumiem (Guo et al. 2013).

Audzēju asociētiem makrofāgiem ir atšķirīgs fenotips dažādos vēža attīstības stāvokļos. M2 fenotips raksturīgs tā progresijas laikā, tomēr audzēja agrīnajā stadijā, tas līdzinās M1 tipa makrofāga fenotipam, inhibējot angiogēnēzi, audzēja imunitāti (Lewis, Pollard 2006) un jaunu audzēja šūnu veidošanos (Allavena et al. 2008). M1 tipa makrofāgi atrodies audzējā lizē tā šūnas, prezentē audzēja-asociētos antigēnus T šūnām, kā arī ekspresē imūnstimulējošus citokīnus (Lewis, Pollard 2006). Molekulārajā līmenī, audzēju asociētiem makrofāgiem novērojami abu tipu makrofāgu marķieri, tomēr ievērojami atšķirīgos daudzumos (Guo et al. 2013). Vēža veidošanās vēlākajā posmā, M1 makrofāgus nomaina M2 makrofāgi, kam piemīt zema spēja cīnīties ar audzēja šūnām. Audzēju asociēto makrofāgu polarizācijas maiņā ir svarīgi daudzi faktori – signāli, kurus šūnas saņem no stromas un iekaisuma šūnā, hipoksija, ģenētiskās un epiģenētiskās izmaiņas audzēja šūnās, molekulārie signālceļi, ieskaitot NF-kB, Notch un Wnt5a (Guo et al. 2013).

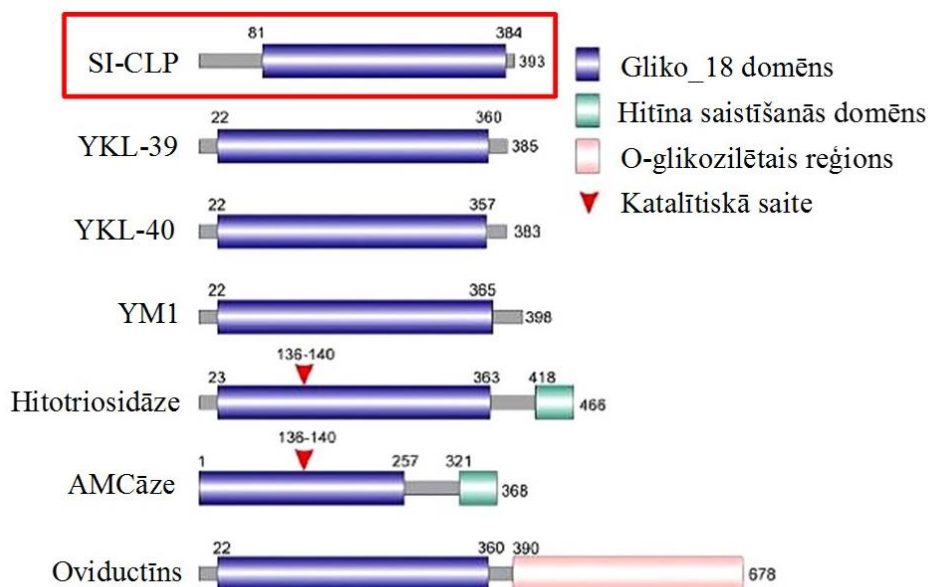
Pastāv pieņēmums, ka audzēju asociētie makrofāgi varētu būt potenciāli izmantojami pretvēža terapijā. Līdz šim ir veikti vairāki pētījumi, kuros apstiprinās audzēju izmēru samazināšanās un iekaisuma citokīnu sekrēcija audzēju mikrovidē, izmantojot vielas, kas darbojas nomācot M2 makrofāgus. Piemēram, trabectedīnam, dabiskam produktam no jūras organisma *Ecteinascidia turbinata*, piemīt citotoksiskais efekts uz cilvēku makrofāgiem un audzēju asociētiem makrofāgiem *in vitro*. Dažādām farmakoloģiskām zālēm, piemēram, zoledronskābei, talidomidīnam un pentoksifilīnam, piemīt spēja inhibēt makrofāgu infiltrēšanos un samazināt audzēju izmērus (Hao et al. 2012). Arī pēc apstrādes ar makrofāgu met-CCL-5 receptora anagonistu, tika iegūta ievērojama makrofāgu skaita un audzēja izmēra samazināšanās (Robinson et al. 2003). Kā labāku nākotnes terapijas veidu varētu uzskatīt M2

tipa makrofāgu polarizāciju uz iekaisuma veicinošo M1 tipu. Vairāki pētījumi ir publicēti saistībā ar *Toll*-veida receptoru aktivēšanu, kas stimulē M1 polarizēto makrofāgu aktivāciju, inducējot iekaisumu procesus audzējā. Ir iespējams izmantot arī makrofāgus kā dabīgos vektorus terapeitisko molekulu piegādei, piemēram, pēc intratumorālas injekcijas ar makrofāgiem, kuri transficēti ar IL-12 ekspresējošiem rekombinantiem adenovīrusu vektoriem, tika uzlabots T šūnu daudzums audzējā, samazinot tā augšanu un metastāzes (Hao et al. 2012).

Veicot padziļinātus pētījumus makrofāgu polarizācijā, audzēju asociētie makrofāgi nākotnē varētu kalpot kā potenciāla terapija vēža un dažādu iekaisuma slimību ārstēšanā. Līdz šim ir izmantoti dažādi citokīni, kam piemīt spēja polarizēt makrofāgus no M2 uz M1 tipu, piemēram, IFN- γ un TNF- α (Davis et al. 2013), tomēr mēs audzēja terapijai piedāvājam jaunatklātu proteīnu SI-CLP, kura funkcijas līdz šim saglabājas nezināmas.

1.3. Hitināzei-līdzīgais SI-CLP proteīna gēns

SI-CLP (*Stabilin-Interacting Chitinase-Like Protein*) ir hitināzei-līdzīgais 39 kDa liels zīdītāju dzimtas proteīns (Kzhyshkowska et al. 2006). Tas satur 393 aminoskābes ar signālpeptīdu N termināla galā un Gliko_18 domēnu (Meng et al. 2010). Šis domēns ir augsti specifisks hitināzes piederošajai 18 glikozilhidrolāzes dzimtai, kas atrodama baktērijās, augos, sēnēs, insektos, parazītos un zīdītājos. Gliko_18 domēnu satur ne tikai SI-CLP, bet arī tādi dzimtas proteīni, kā hitotriosidāze, AMCāze, YKL-39 un YKL-40 (Kzhyshkowska et al. 2007). Tie darbojas kā šķīstoši mediatori un ir iesaistīti audzēju progresijā un organisma traucējumos, ko raksturo izmaiņas asinsvadu sistēmā un ekstracelulārā matricas pārveidošanā, piemēram, reimatoīdā artrītā, zarnu iekaisuma slimībās, aknu fibrozē un sistemātiskā sklerozē (Zhang et al. 2009). SI-CLP līdzība ar YKL-39 proteīna domēna organizāciju ir 20%, bet ar pārējiem dzimtas proteīniem svārstās no 43–68% (Kzhyshkowska et al. 2006). Salīdzinot proteīnu domēnu strukturālās atšķirības, noteikts, ka SI-CLP proteīna struktūra satur papildus spirāles reģionus ar dažiem sekundārās struktūras elementiem N gala terminālā, kā arī domēna garums ir salīdzinoši īss (Kzhyshkowska et al. 2007) (4. attēls).



4. attēls. Gliko_18 domēna saturošo cilvēka hitināzes un hitināzei-līdzīgais proteīnu strukturāls attēlojums (attēls pārveidots no Kzhyshkowska 2010)

Figure 4. Structures of Glyco_18 domain-containing human chitinases and chitinase-like proteins (figure converted from Kzhyshkowska 2010).

SI-CLP ir bagātīgi ekspresēts alternatīvi aktivētos (M2) makrofāgos un salīdzinoši maz neitrofilos, lai gan regulatorais mehānisms, kas kontrolē proteīna atbrīvošanos vēl saglabājas nezināms. Proteīns tiek regulēts ar Th2 citokīniem IL-4 un deksametazonu un spēj piesaistīt LPS *in vivo*, kā arī neitralizēt endoksīnu efektu uz makrofāgiem. SI-CLP ir bagātīgi ticis detektēts plaušu biopsijās no pacientiem ar respiratorā trakta hronisku iekaisumu, cilvēku perifēriem asins leukocītiem un pacientiem, kas saņem glukokortikoīdu terapiju (Kzhyshkowska et al. 2007).

Lai SI-CLP spētu sekretēties un stimulēt iekaisumu, ir nepieciešama mijiedarbība ar virsmas receptoru stabilīnu-1 un saistīšanās pie receptora ekstracelulārā fasciclīna 7 (F7) domēna (Kzhyshkowska 2010). Receptors kalpo kā starpnieks SI-CLP intracelulārā pārvietošanā alternatīvi aktivētos makrofāgos, t.i., izmantojot endosomu/trans-goldži transporta ceļu (Zhang et al. 2009). Stabilīna-1 transporta ceļā SI-CLP sākumā raksturīga lokalizācija endosomās, kam seko lokalizēšanās CD63+ sekretorās un Lamp-1 pozitīvās lizosomās (Kzhyshkowska et al. 2006). Tur SI-CLP atdalās no stabilīna-1 un transportējas uz sekretorām lizosomām, ar kuru palīdzību sekretējas ekstracelulārajā telpā (Zhang et al. 2009). Tomēr lizosomālā lokalizācija stabilīna-1 negatīvos makrofāgos norāda uz to, ka, iespējams, stabilīns-1 nav vienīgais receptors, kas ietekmē šūnās jaunsintezētā SI-CLP pārvietošanos (Kzhyshkowska et al. 2006).

Līdz šim ir atklāts, ka hitināzei-līdzīgajam proteīnam SI-CLP trūkst enzimatiskas aktivitātes. Proteīna pētījumi liecina, ka tam piemīt saharīdu-saistīšanas īpašības un loma mikrobu infekcijās, tomēr līdz šim vēl nav zināmas proteīna fizioloģiskās funkcijas un nozīme imūnajā sistēmā (Kzhyshkowska et al. 2007). Lai notiktu gēna *SI-CLP* piegāde krūts audzējā un proteīna sekrēcija, darba tiek izmantoti alfavīrusu vektori kā potenciāli gēnu piegādes līdzekļi.

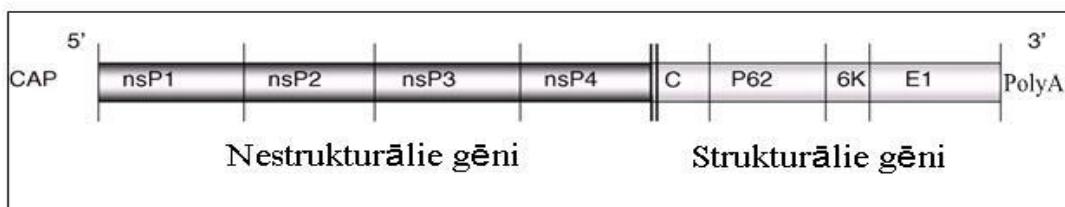
1.4. Alfavīrusi

1.4.1. Alfavīrusu struktūra un replikācija

Alfavīrusu ģints klasificējas pie *Togaviridae* dzimtas. Kopumā tā ietver 30 vīrusa sugas (Hyde et al. 2015), no kurām visplašāk pētītās ir Semliki meža vīruss (*Semliki Forest virus* – SFV), Sindbis vīruss (*Sindbis virus* – SIN), Venecuēlas zirga encefalīta vīruss (*Venezuelan Equine Encephalitis virus* – VEE), Ross Upes vīruss (*Ross River virus* – RRV) u.c. (Jose et al. 2009). Alfavīrusi tiek klasificēti pie A arbovīrusu grupas, jo asinssūcēju posmukāji jeb odi kalpo kā vīrusa pārnēsātāji (Kujala 2000). Pirmo reizi SFV tika izolēts no moskītiem 1944. gadā Ugandā (Smithburn, Haddow 1944), bet 1980. gadā tika sekvenēts alfavīrusu strukturālo proteīnu kodējošais reģions. Sešus gadus vēlāk tika nosekvenēts un iegūts jau pilnais 11'445 nukleotīdu garais SFV genoms (Kujala 2000).

Alfavīrusiem ir sfēriska forma un to izmērs variē no 65 līdz 70 nm diametrā (Jose et al. 2009). Vīrusa genomu apņem kapsīds, kopā veidojot nukleokapsīdu. Kapsīds sastāv no 240 proteīnu monomēriem, veidojot ikosaedrisku T=4 simetriju. Savukārt, nukleokapsīdu ietver lipīdu dubultslāņa apvalks, kā sastāvā ietilpst 240 glikoproteīni E1,E2 (SIN), kā arī E3 (SFV), kas uz nukleokapsīda virsmas veido 80 izaugumus (Balistreri 2010).

Alfavīrusu genoms ir lineāra, aptuveni 11 – 12 kilobāzes (kb) gara, nesegmentēta, vienpavediena (+)RNS molekula. RNS 5' gals satur metilētu *cap* struktūru, bet 3' gals satur poliadenilētu (poli-A) asti (Hyde et al. 2015). Alfavīrusu genomu kodē divi atvērtie nolasīšanas rāmji (*open reading frame* – ORF), no kuriem viens kodē četrus vīrusa nestukturālos proteīnus (nsP1-4), kas nepieciešami transkripcijai, vīrusa RNS replikācijai, poliproteīnu šķelšanai un RNS noslēgšanai, bet otrs – piecus vīrusa strukturālos proteīnus, kas veido vīrusa apvalku un nepieciešami vīrusa RNS inkapsidācijai (C, E1, E2, E3 un 6K) (5. attēls). Šo proteīnu ekspresija un vīrusa genoma replikācija noris saimniekšūnas citoplazmā, kaut arī nsP2 un atsevišķu alfavīrusu kapsīdu proteīni iekļūst šūnas kodolā un traucē saimniekšūnas gēnu transkripcijai (Weaver et al. 2012).



5. attēls. Semliki meža vīrusa (+)RNS genoma struktūra.

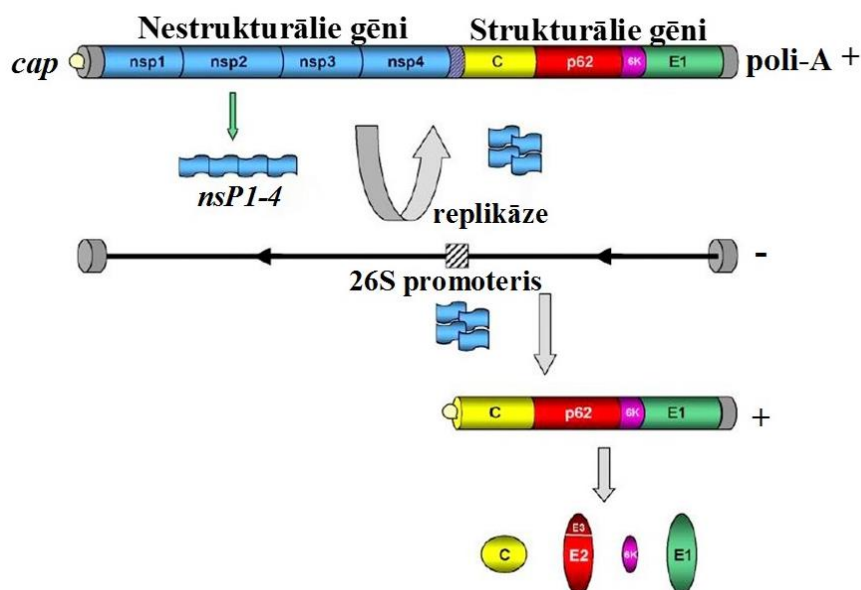
RNS genoms sastāv no diviem atvērtiem nolasīšanas rāmjiem, kur pirmais kodē četrus nestrukturālos proteīnus, kas veido vīrusa replikācijas kompleksu, bet otrs kodē četrus strukturālos proteīnus, kas veido vīrusa apvalku (attēls pārveidots no Riezebos-Brilman et al. 2006).

Figure 5. The (+)RNA genome of Semliki Forest virus.

The genome consists of two open reading frames, where the first encodes the four nonstructural proteins that form the virus replicase complex, but the second codes for the four structural proteins (figure converted from Riezebos-Brilman et al. 2006).

Genoma starposmu starp strukturālajiem un nestrukturālajiem domēniem aizņem subgenomiskās mRNS transkripcijas promoteris – 26S promoteris. Galvenā 26S promotera nozīme ir strukturālo gēnu translācija no subgenomiskās mRNS (Vander Veen et al. 2012).

SFV replikācijas procesā vīrusa genoma RNS kalpo kā mRNS četrus nestrukturālo proteīnu gēnu (*nsP1-4*) translācijai, veidojot RNS replikāzes kompleksu, kurš sintezē pilna garuma (-)RNS pavedienu. Tas kalpo par transkripcijas matricu pilna garuma plus (+)pavediena genomiskajai RNS un īsākajai plus (+)pavediena subgenomiskajai RNS, kas kodē strukturālo proteīnu gēnus. Vīrusa strukturālie proteīni tiek sintezēti kā poliproteīni, kuri vēlāk tiek sašķelti attiecīgi kapsīdas un apvalka proteīnos E1 un p62 (E3 un E2 priekštecējis) (Atkins et al. 2008) (6. attēls).



6. attēls. Alfavīrusu SFV RNS replikācijas cikls.

Genoma (+)RNS ir 11-12 kb gara vienpavediena molekula. RNS 5' gals satur metilētu *cap* struktūru, bet 3' gals satur poliadenilētu (poli-A) asti. Pēc iekļūšanas šūnās, alfavīrusa RNS kalpo kā mRNS četru nestrukturālo proteīnu (nsP1-4) translācijai, veidojot RNS replikāzi, kas sintezē komplementāru pilna garuma mīnus (-)RNS pavedienu. No mīnus (-)RNS pavediena vīrusa replikāze sintezē pilna garuma genomisku plus (+)RNS un īsāku subgenomisku plus (+)RNS, kas kodē strukturālo proteīnu gēnus (*C*, *E1*, *E2*, *E3* un *6K*). Strukturālos proteīnus sintezē kā poliproteīnus, kuru attiecīgi sašķeļ kapsīdas un apvalka proteīnos E1 un p62 (E3 un E2) (attēls pārveidots no Quetglas et al. 2010).

Figure 6. Alphavirus SFV RNA replication cycle.

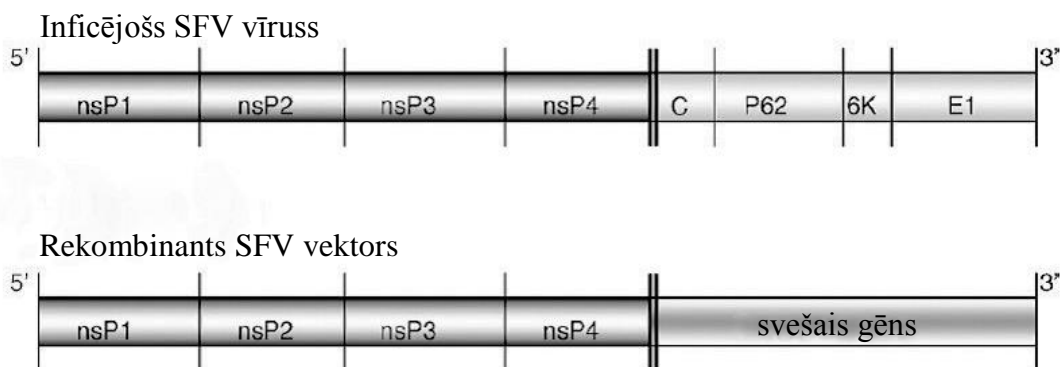
(+)RNA genome is about 11-12 kb long single-stranded molecule. RNA contains a methylate cap structure at the 5'-end and a poly-A tail at the 3'. After entry the cell, alphavirus RNA is used as mRNA for four non-structural protein (nsP1-4) translation, forming RNA replicase, which synthesis a complementary full length minus (-)RNA. (-)RNA is used as strain for full length (+)RNA, as also short subgenomic (+)RNA synthesis, which code the structural protein genes (*C*, *E1*, *E2*, *E3* and *6K*). The structural proteins are synthesized as a polyprotein, which will be processed to produce the viral capsid and structural proteins E1 and p62 (E3 and E2) (figure converted from Quetglas et al. 2010).

Par alfavīrusi saimniekorganismiem kalpo dažādi mugurkaulnieki, to skaitā, zīdītāji, putni, abinieki un rāpuļi (Kujala 2000). Tie augstos titros spēj inficēt dažādas šūnu kultūras, saglabājoties nepatogēniski (Leung et al. 2011). Cilvēku un dzīvnieku saslimšanas gadījumos raksturīgākie simptomi ir drudzis, izsitumi un artrīts. Zīdītāju šūnu inficēšanās gadījumā, alfavīrusi vairāku mehānismu rezultātā izraisa šūnu apoptozi (Jose et al. 2009). Pateicoties tiem piemītošajam plašajam tropismam, alfavīrusi spēj inficēt arī neironus, glijas šūnas, šķērssvītrotās un gludās muskuļšūnas, limfoīdās šūnas, sinoviālās šūnas, kā arī adipocītus. Tas

liecina par to, ka alfavīrusi inficēšanas procesā izmanto šūnu virsmas receptoru, kas ir raksturīgs dažādiem šūnu tiem. Šis receptors, iespējams, ir 67 kDa lielais laminīnreceptors (proteīns p40 vai laminīna saistošais proteīns), kas atrodams uz kukaiņu un moskītu šūnām. Pastāv hipotēze, ka vīrusi spēj mijiedarboties ar vairākiem celulāriem receptoriem (Jose et al. 2009). Jāpiemin, ka audzēju šūnas bieži mēdz pārproducēt šo receptoru, kam pateicoties alfavīrusi tik efektīvi inficē dažādas audzēju šūnu kultūras. Šī īpašība dod iespēju pielietot alfavīrusu vektorus dažādos pretvēža terapijas pētījumos.

1.4.2. Rekombinanto alfavīrusu ekspresijas vektoru sistēmas

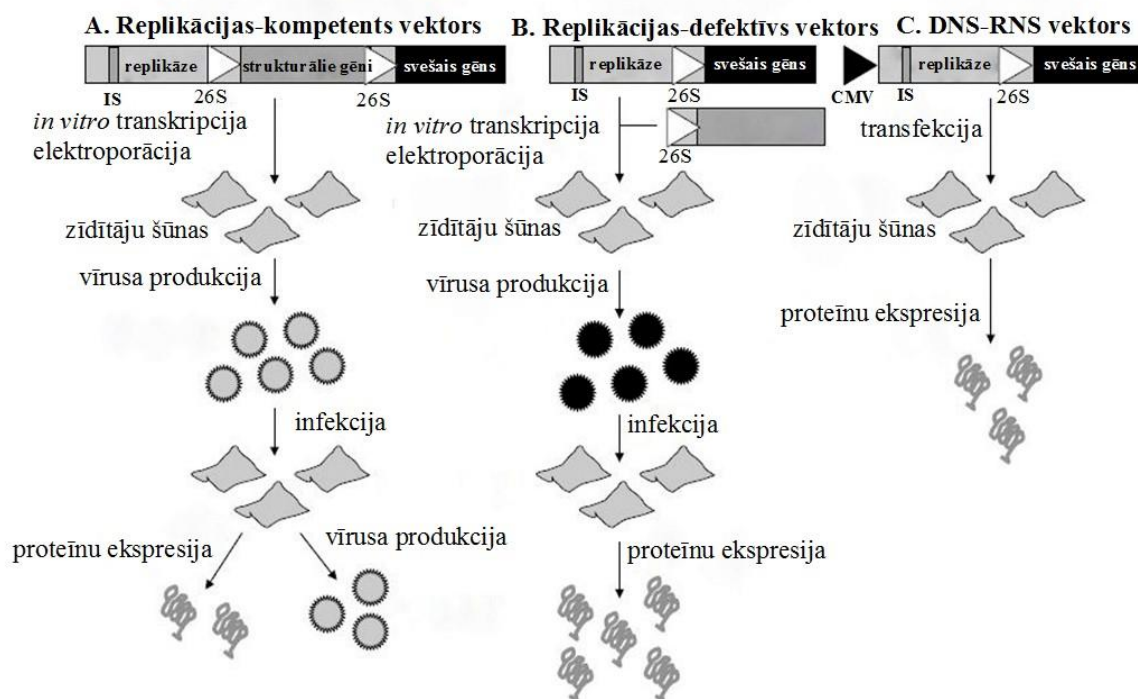
Alfavīrusu ekspresijas vektoru izveidē būtisks solis bija vairāku alfavīrusu genomu RNS klonēšanai par komplementāru DNS (kDNS). Pirmo reizi to paveica Pītera Liljestroma un Henrika Garofa grupa no Karolīniskā Institūta ar SFV vīrusu, Roberts J. Džonstons no Ziemeļu Karolīnas Štata Universitātes ar VEE vīrusu un Henrijs V. Huangs no Vašingtonas Universitātes ar SIN vīrusu (Quetglas et al. 2010). Pilna garuma vīrusa genoma kDNS kopija un DNS-atkarīgā RNS polimerāze (Riezebos-Brielman et al. 2006), SP6 vai T7 polimerāze, tika ieklonēta bakteriālā plazmīdā, lai vīrusa RNS varētu tikt transkribēta *in vitro*. Pēc transfekcijas eikariotu šūnās, transkribētā RNS bija spējīga izveidot produktīvu infekciju, līdzīgi kā vīrusa daļiņas. Lai alfavīrusu ekspresijas vektorus varētu izmantot kā terapeitiskos aģentus, tie spētu replicēties, veidot vīrusam līdzīgās daļiņas un šūnās ekspresēt interesējošo proteīnu, vīrusa strukturālie proteīni ir izņemti un aizstāti ar svešu interesējošo gēnu (7. attēls). Līdz šim alfavīrusu vektori ir izveidoti no SFV, SIN, VEE, SAG (*Sagiyama virus*) un CHIK (*Chikungunya virus*) vīrusiem (Quetglas et al. 2010).



7. attēls. Infekciju izraisoša SFV vīrusa genoma un rekombinanta SFV vīrusa genoma shematisks attēlojums. Rekombinanta alfavīrusa vektora sistēma, kur strukturālos proteīnus aizstāj ievietots svešais interesējošais gēns (attēls pārveidots no Riezebos-Brielman et al. 2006).

Figure 7. Schematic description of the wild-type SFV virus genome and the recombinant SFV virus genome. For use of alphavirus as recombinant vector systems, the structural proteins are replaced with foreign gene of interest (figure converted from Riezebos-Brielman et al. 2006).

Pastāv trīs alfavīrusu ekspresijas vektoru sistēmas – replikācijas-kompetenta vektoru sistēma, replikācijas-defektīva vektoru sistēma un DNS-RNS vektoru sistēma (Lundstrom 2009) (8. attēls).



8. attēls. Rekombinanto SFV vektoru ekspresijas sistēmas.

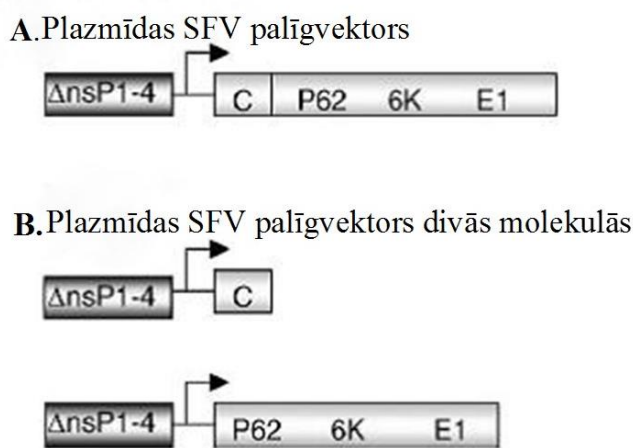
A – Replikācijas-kompetents vektors: pilna garuma SFV genoms ar subgenomisko 26S promoteri un svešo interesējošo gēnu. Vektoru sistēma veido replikācijas-kompetentas daļiņas, kuras pēc šūnu infekcijas producē jaunas vīrusa daļiņas un rekombinanto proteīnu. B – Replikācijas-defektīvs vektors: to veido ekspresijas vektors un palīgvektors, kuri pēc elektroporācijas šūnās veido replikācijas-defektīvās daļiņas. Daļiņas satur tikai RNS iepakojšanas signālu (IP). Šūnu infekcijas rezultātā ekspresējas tikai rekombinants proteīns. C – DNS-RNS vektors: RNS SP6 polimerāzes promotēris ir aizstāts ar CMV promotēri, kas ļauj tiešu DNS plazmīdas izmantošanu šūnu transfekcijā, lai veidotu rekombinantu proteīnu. (attēls pārveidots no Lundstrom 2012).

Figure 8. Recombinant SFV vector expression systems.

A - Replication-competent vector: Full-length genome of SFV with an additional SFV 26S subgenomic promoter and foreign gene of interest. This vector system generates replication-proficient particles, which after infection produces new viral particles and recombinant protein. B – Replication-deficient vector: this system consists of expression and helper vectors, which after co-electroporation in cells generates replication-deficient particles. These particles are packaging only packaging signal (PS). Infection results in recombinant protein expression. C – DNA-RNS vector: SP6 RNA polymerase promoter has been replaced by the

CMV promoter that allows direct use of plasmid DNA for cell transfection to generate recombinant protein (figure converted from Lundstrom 2012).

Darbā tiek pielietota replikācijas-defektīvā (*replication deficient*) ekspresijas sistēma sastāv no diviem vektoriem – ekspresijas vektora un palīgvektora (Lundstrom 2009). Palīgvektors (*helper vector*) satur vīrusa strukturālos gēnus un kodē kapsīda un nukleokapsīda virsmas izauguma proteīnus. Palīgvektors var tikt izmantots pilna garuma vai sadalīts divās daļās, kas samazina kompetenta vīrusa replicēšanos, inficēšanās risku un rekombinēšanos starp diviem palīgvektoriem vai vektoru plazmīdām (Riezebos-Brielman et al. 2006) (9. attēls).



9. attēls. Plazmīdas SFV (pSFV) palīgvektoru konstrukti.

A - Pilna garuma pSFV palīgvektors ar nestrukturāliem gēniem (*nsP1-4*) un strukturāliem gēniem (*C*, *P62*, *6K* un *E1*); B - pSFV palīgvektors divās molekulās: viena molekula satur nestrukturālos gēnus (*nsP1-4*) un vienu strukturālo gēnu – *C*, bet otra satur nestrukturālos gēnus (*nsP1-4*) un trīs strukturālos gēnus – *P62*, *6K* un *E1* (attēls pārveidots no Riezebos-Brielman et al. 2006).

Figure 9. Plasmid SFV (pSFV) helper vector constructs.

A – Full length pSFV helper vector with non-structural genes (*nsP1-4*) and structural genes (*C*, *P62*, *6K* and *E1*); B – pSFV split helper vector: one part consists of non-structural genes (*nsP1-4*) and one structural gene – *C*, but the other consists of non-structural genes (*nsP1-4*) and three structural genes – *P62*, *6K* and *E1* (figure converted from Riezebos-Brielman et al. 2006).

Ekspresijas vektors sastāv no vīrusa nestrukturālajiem gēniem, kas ir atbildīgi par RNS replikācijas funkcijām, kā arī svešu interesējošo gēnu (Riezebos-Brielman et al. 2006) Replikācijas-defektīva vīrusa iegūšanā, šūnas transficētas ar divām *in vitro* sintezētām vīrusa RNS – palīgvektoru un ekspresijas vektoru, kas satur vienu subgenomisko 26S promoteri un

zem tā ieklonētu transgēnu (Lundstrom 2009). Pēc vīrusa rekombinantās RNS elektroporācijas šūnās, tiek iegūts replikācijas-defektīvais vīruss, kurš iepakojas jaunizveidotās vīrusa daļiņās – vienu rekombinanto RNS ar nestrukturālajiem gēniem (replikāzi) un interesējošo gēnu (Riezebos-Brielman et al. 2006) (8. attēls; B). Rekombinantais vīruss sekretējas šūnu vidē un to ir iespējams savākt un izmantot šūnu inficēšanai un interesējošo gēnu ekspresijai. Vidējais replikācijas defektīva SFV vīrusa titrs ir aptuveni 10^7 līdz 10^8 v.d./ml (Lundstrom 2005). Tā kā rekombinantās vīrusa daļiņas nesatur strukturālos gēnus, tad replikācijas defektīvais vīruss ir spējīgs veikt tikai vienreizēju infekciju un nespēj vairoties inficētajās šūnās (Lundstrom 2012).

Alfavīrusu vektoru replikācija šūnās izraisa citopātisko efektu, kas novērojams aptuveni 40 h pēc infekcijas (Li et al. 2012). Pastāv pieņēmums, ka citopātiskais efekts varētu arī būt saistīts ar vīrusa kapsīda glikoproteīniem, lai gan glikoproteīnu molekulu daudzums saimniekšūnu transfekcijā ir ierobežots (Morse et al. 2004). Ir izveidoti necitopātiski alfavīrusu vektori, kuriem ir papildus priekšrocība – ilgāka spēja ekspresēties *in vitro*, kā arī inducējamie, temperatūras jutīgie vektori (Rheme et al. 2004). Šūnās, kuras ir inficētas ar necitopātiskiem vektoriem, notiek vektora gēnu ekspresija, bet citopātiskais efekts ir vājš. Tas šūnās nodrošina ilgāku un augstāku transgēna ekspresiju (Khudyakov 2008). Necitopātiskie vektori ir iegūti, radot mutācijas alfavīrusa genoma nestrukturālajā domēna *nsP2* gēnā, piemēram, vektors pSFV(PD) (Rheme et al. 2004).

Inducējamie, temperatūras jutīgie vektori ir iegūti, radot mutācijas genoma *nsP2* un *nsP4* nestrukturālajos gēnos, piemēram, vektors pSFV(PD713P). Temperatūras jutīgie alfavīrusu vektori ir mazāk citotoksiski un, noteiktas temperatūras ietekmē, spēj paildzināt proteīnu ekspresiju. Šo vektoru transgēnu ekspresija veiksmīgi notiek 31°C temperatūrā, bet 37°C temperatūrā tā ir ierobežota vai apstādināta, tādēļ vektorus iespējams izmantot tikai *in vitro* apstākļos (Rheme et al. 2004).

1.4.3. Rekombinanto alfavīrusu vektoru priekšrocības audzēju gēnu terapijā

Alfavīrusi kā gēnu ekspresijas vektori ir potenciāli izmantojami, pateicoties to raksturīgajām iezīmēm – plašajam tropismam; augstam replikācijas līmenim šūnās, izraisot augstu vīrusa strukturālo proteīnu ekspresiju, kuru potenciāli var izmantot, lai ekspresētu heterologus proteīnus līdzīgā līmenī; relatīvi mazam RNS genomam, ar kuru viegli manipulēt komplementārās DNS (kDNS) sintēzei; vīrusa RNS šūnām ir infekcioza, kas ļauj sasniegt produktīvu vīrusa infekciju. Šīs īpašības padara alfavīrusa vektorus nozīmīgus augsta vēlamā

proteīna ekspresijas iegūšanai īsā laikā periodā zīdītāju šūnu kultūrās. Tomēr, alfavīrusu vektoru proteīnu ekspresija *in vivo* ir īslaicīga, jo vīrusa iekļūšana šūnās inducē apoptozi. Šis fakts ir ierobežojis to pielietošanu gēnu terapijā, kur ir nepieciešama ilglaicīga transgēna ekspresija. Līdz ar to uzskata, ka alfavīrusu vektori ir daudzsolāši audzēju terapijā, jo ne tikai spēj ekspresēt transgēnu liels daudzumos audzēju šūnās, bet arī papildus inducē audzēja šūnu nāvi aptuveni 48 h laikā (Quetglas et al. 2010).

Augsto transgēnu ekspresiju var papildus 10x palielināt, ja transgēns tiek savienots ar vīrusa kapsīdas gēniem (Riezebos-Brilman et al. 2006). Šī stratēģija tiek pielietota, izmantojot SFV un SIN, lai sasniegtu augstu apvalka proteīnu ekspresiju. Iegūtā genoma sekvenca tiek raksturota kā minimālais translācijas enhancers un aptver pirmos 102-226 nukleotīdus no SFV un SIN kapsīdas. Lai nodrošinātu vektora stabilitāti, SIN gadījumā heterogēnas sekvences tiek ievietotas starp nsp un strukturālajiem gēniem, bet SFV gadījumā – tās ievieto 3' genomā galā. Lielākoties, alfavīrusu vektori balstās uz vīrusa genomu, kurā vīrusa strukturālie gēni tiek aizvietoti ar interesējošiem gēniem (Quetglas et al. 2010).

Salīdzinājumā ar citiem vīrusa vektoriem, kas tiek izmantoti audzēju gēnu terapijā, alfavīrusu inserti var sasniegt līdz pat 7 kb, turpretī lentivīrusu un adeno-asociēto vīrusu (*adeno-associated virus* – AAV) insertu garumi var būt ne lielāki par 4 kb. Būtiski, ka alfavīrusu augstais titrs (10^9 - 10^{10} iu/ml) iegūstams divās dienās, bet retrovīrusiem, lentivīrusiem un AAV nepieciešams ilgāks laiks līdzīga titra iegūšanai (Lundstrom 2001).

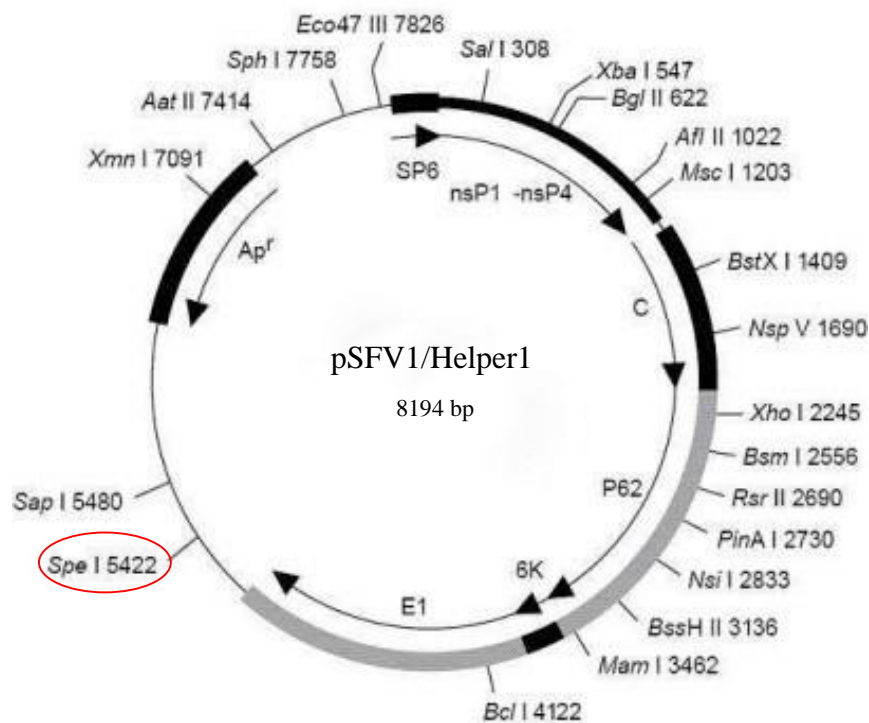
Līdz šim veikti vairāki pētījumi, lai veicinātu audzēju regresiju vai inhibētu to augšanu. Pētījumi ir uzrādījuši, ka, piemēram, audzēju regresija tiek panākta pēc B16 melanomas intratumorālas injekcijas ar alfavīrusa vektoru SFV-IL12. Vektors izraisīja audzēja vaskularizāciju un inducēja nekrozi. Izmantojot vektoru SFV-GFP, gēns *GFP* izraisīja apoptozi cilvēka plaušu karcinomas H358A šūnās (Templeton 2015). Kā arī audzējiem K-BALB un resnās zarnas karcinomas šūnu līnijai CT26 regresiju izraisīja injekcija ar alfavīrusa SFV-IL18 (Chikkanna-Gowda et al. 2005). Tādēļ, pateicoties alfavīrusu īpašībām, tie var tikt uzskatīti par perspektīvu ekspresijas vektoru sistēmu audzēju terapijā, ar kuras palīdzību iespējams ekspresēt nepieciešamos transgēnus, īsā laika periodā veicināt augstu proteīna sintēzi un audzēju šūnās inducēt apoptozi (Quetglas et al. 2010).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

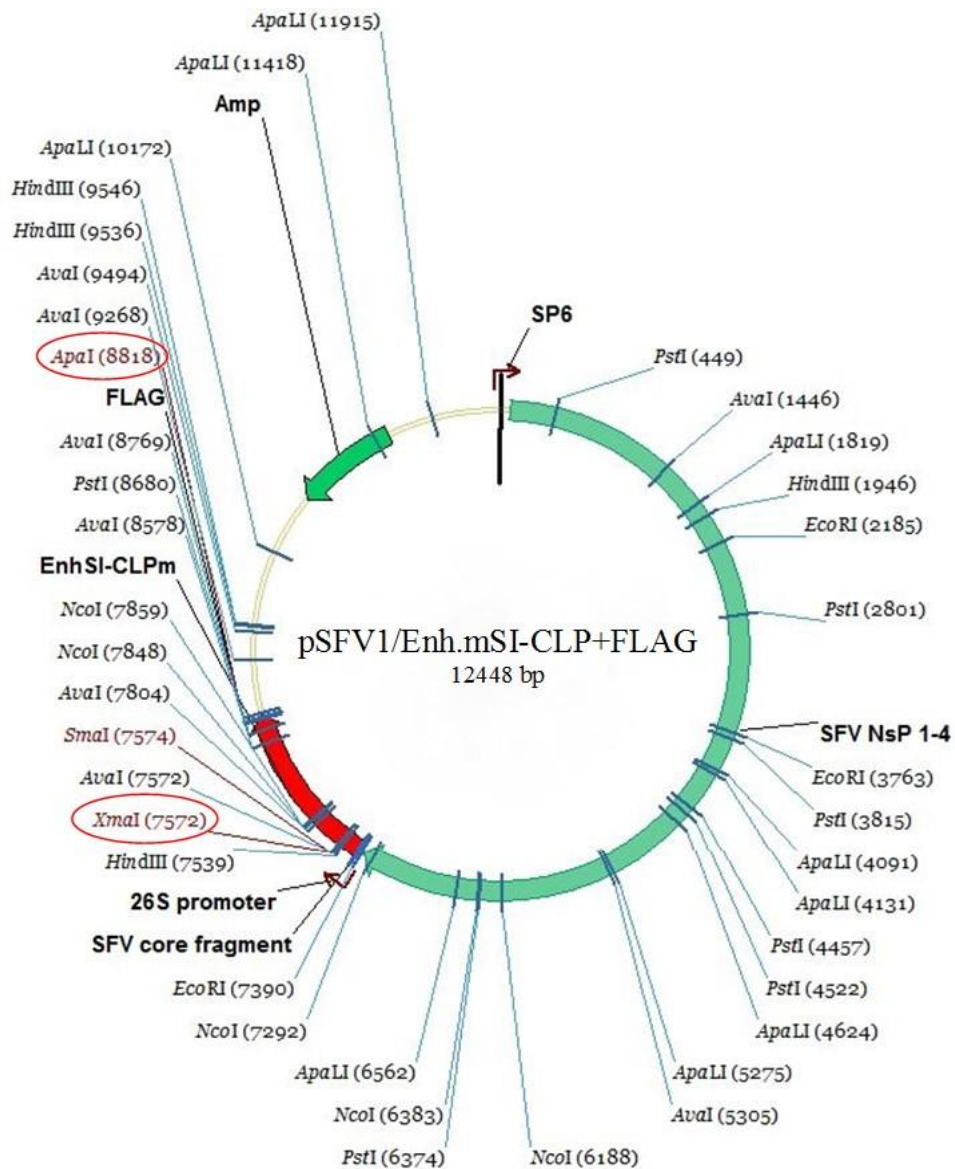
2.1.1. Plazmīdas

- pSFV1/Helper1 – 8194 bp; kodē SFV strukturālos gēnus (10. attēls). Prof. H. Garofa dāvinājums (Karolinskas institūts, Zviedrija);
- pSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG – 12448 bp; kodē receptora stabilīns-1 hitināzei-līdzīgo peles (m – mouse) gēnu *SI-CLP* (*mSI-CLP*) un SFV nestrukturālos gēnus (11. attēls). Prof. Dr. J. Kzhyshkowska dāvinājums (Heidelbergas universitāte, Manheimas medicīnas centrs, Vācija).



10. attēls. pSFV1/Helper1 plazmīdas restrikcijas karte: *C*, *P62*, *6K*, *E1* – SFV strukturālo proteīnu gēni; *nsP1-4* – SFV nestrukturālo proteīnu gēni; *Ap^r* – ampicilīna rezistences gēns; *SP6* – RNS polimerāzes promoteris *in vitro* transkripcijai; *Spe I* – plazmīdas DNS linearizācijas saits; bp – bāžu pāri.

Figure 10. pSFV1/Helper1 plasmid restriction map: *C*, *P62*, *6K*, *E1* – SFV structural protein genes, *nsP1-4* – SFV nonstructural protein genes; *Ap^r* – ampicillin resistance gene; *SP6* – RNA polymerase promoter for transcription *in vitro*; *Spe I* – plasmid DNA linearization site; bp – base pairs.



11. attēls. pSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG plazmīdas restrikcijas karte: SFV *nsP1-4* – SFV nestrukturālo proteīnu gēni; *Amp* – ampicilīna rezistences gēns; SP6 – RNS polimerāzes promoteris *in vitro* transkripcijai; SFV *core* gēna fragments; 26S promoteris – SFV 26S subgenoma RNS promoteris; Enh – enhancers; *SI-CLPm* – hitināzei-līdzīgais peles (*m* – mouse) *SI-CLP* gēns; FLAG – polipeptīdu sekvenca; *Xma* I, *Apa* I – plazmīdas DNS linearizācijas saiti; bp – bāzu pāri.

Figure 11. pSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG plasmid restriction map: SFV *nsP1-4* – SFV nonstructural protein genes; *Amp* – ampicillin resistance gene; SP6 – RNA polymerase promoter for transcription *in vitro*; SFV core gene fragment; 26S promoter – SFV 26S subgenomic RNA promoter; Enh – enhancer; *SI-CLPm* – chitinase-like *SI-CLP* gene of mouse (*m* – mouse); FLAG – polypeptide sequence; *Xma* I, *Apa* I – plasmid DNA linearization site; bp – base pairs.

2.1.2. Baktēriju celmi

- *Escherichia coli* (*E.coli*) celma XL10-Gold šūnas – Stratagene, ASV

2.1.3. Rekombinantie alfavīrusu vektori

- SIN-Rep5-mSI-CLP
- SIN-nspSer-mSI-CLP
- SIN-nspSer-hSI-CLP
- rekSFV1/Enh.Luc (kontroles vektors)

2.1.4. Šūnu līnijas

- BHK-21 – Sīrijas zeltainā kāmjā (*Mesocricetus auratus*) jaundzimušā mazuļa nieru fibroblastu šūnu līnija (*Baby Hamster Kidney-21*)
- TS/A – metastazējoša peles (*Mus musculus*) krūts adenokarcinomas šūnu līnija

2.1.5. Reaģenti

2. tabula
Pētījumā izmantotie reaģenti.

Table 2
Reagents used in this study.

Ražotājs, Valsts	Reaģenti
Acris, ASV	Žurkas Anti-CD68 primārā antivielā (kat. nr. SM1550PS)
Amersham Biosciences, Zviedrija	Glicīns (<i>PlusOne Glycine</i>)
Chempur, Vācija	Nātrija hlorīds (NaCl)
Dako, Dānija	Dako AEC substrata-hromogēns Dako antiviēlu atšķaidītājs ar fona samazinošiem komponentiem Dako Pen zīmulis
Feran Berlin, Vācija	Bakto agars; Merkaptoetānols (βME; tioetilēnglikols)
GIBCO (Life Technologies), Lielbritānija	DPBS-/- 10X (-CaCl ₂ , -MgCl ₂) (<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>) DPBS-/- 1X (-CaCl ₂ , -MgCl ₂) (<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>) DPBS+/+ 1X (+CaCl ₂ , +MgCl ₂) (<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>) FBS G-MEM (<i>Glasgow Minimum Essential Medium</i>) Kazas Anti-peles IgG (H+L) Alexa-488 sekundārā antivielā (kat. nr. A-11029) Kazas Anti-truša IgG (H+L) Alexa-594 sekundārā antivielā (kat. nr. A-11037) L-glutamīns (200 mM; 100X) Magnētiskās lodītes (<i>Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG</i>) PEST (Penicilīns/Streptamicīns) (10'000 u/ml) G-MEM BHK-21 1X (+L-glutamīns, -Triptozes fosfāta buljons) barotne

	DMEM (1X) + GlutaMAX barotne (+4.5 g/L +D-Glikoze, +Piruvāts) DMEM 1X (+4.5 g/L +D-Glikoze, +L-glutamīns, +Piruvāts) RPMI-1640 barotne (<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>) Tripānzilā krāsa Tripsīns
Fluka, Vācija	Vājpiena pulveris
Jaunpagasts plus, Latvija	Etanols
Medochemia, Kipra	Ampicilīns (100 mg/ml)
Merck, Vācija	Glicerīns SDS (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄) (nātrija laurilsulfāts) Tris (tris-(hidroksimetil) aminometāns)
New England Biolabs, Lielbritānija	RNS CAP struktūras analogs (1 μmol; 7mG(5')ppp(5'G))
Reanal, Ungārija	TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamīns)
Rīgas ķīmija, Latvija	Ledus etiķskābe
Sakura, Japāna	O.C.T. gēls (<i>Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound and Cryomolds®</i>)
Santa Cruz Biotechnology, ASV	Kazas Anti-žurkas IgG (HRP) sekundārā anti- <i>viela</i> (kat. nr. sc-2303)
Sigma-Aldrich, ASV	Agarozē Akrilamīda šķīdums (40%) (<i>RapidGel™-XL-40% Concentrate</i>) APS (amonija persulfāts) BSA DAPI EDTA (etilēndiamīntetraetiķskābe) Etūdijs bromīds Hematoksilīns; HEPES (1M) LB pulveris Metanols PBS Peles Anti-FLAG (M2) monoklonālā anti- <i>viela</i> (kat. nr. F3165) PFA (paraformaldehīds) Tioglikolāta šķīdums Triptozes fosfāta buljons Triton X-100 Tween-20 (Polioksietilēnsorbitānmonolaurāts)
Stanlab, Polija	Hlorūdeņradis (HCl)
Thermo Scientific, ASV	Acetons <i>Apa</i> I restrikāze (10 U/μl) <i>Ar</i> DEPC apstrādāts ūdens <i>Bcu</i> I (<i>Spe</i> I) restriktāze 10 U/μl) Bromfenolzilā krāsa dNTP maisījums (katrs dGTP, dATP, dTTP, dCTP 10 mM) DTT (ditiotreitols) EDTA (etilēndiamīntetraetiķskābe) (25mM) Gēnu marķieris (0,5 μg/μl) (<i>GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder</i> un <i>GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder</i>) Kazas Anti-peles (HRP) sekundārā anti- <i>viela</i> (kat. nr. 32430) Kazas Anti-truša IgG (H+L) (HRP) sekundārā anti- <i>viela</i> (kat. nr. 31460) Kazas Anti-žurkas IgG (Fc) (HRP) sekundārā anti- <i>viela</i> (kat. nr. 31475) Krāsa (<i>6X DNA Loading dye</i>) Proteīnu krāsošanas šķīdums (<i>PageBlue protein staining solution</i>) Proteīnu marķieris (<i>Prestained protein molecular weight marker</i>) Ribonukleāžu inhibitori (40 U/μl) (<i>RiboLock® RNase inhibitor</i>) SP6 RNS polimerāze (20 U/μl) Tango (Yellow) buferšķīdums (10X) Transkripcijas buferšķīdums (5X) <i>Xma</i> I restriktāze (10 U/μl)
USB (Life Technologies), Lielbritānija	Saharozē

Antivielu dāvinājumi	Truša Anti-SFV-nsP1 monoklonālā antiviela (Prof. A. Merits, Tartu universitāte, Igaunija) Truša RS1 Anti-GST-HSTAB1-CT monoklonālā antiviela (Prof. Dr. J. Kzhyskowska dāvinājums, Heidelbergas universitāte, Vācija) Žurkas Anti-peles 1B8 (SI-CLP) monoklonālā antiviela (Elisabeta Kemmer dāvinājums, Minhene, Vācija)
-----------------------------	---

2.1.6. Reaģentu komplekti

3. tabula
Pētījumā izmantotie reaģentu komplekti.

Table 3
Reagent kits used in this study.

Ražotājs, Valsts	Reaģentu komplekts
Affymetrix USB, Lielbritānija	Plazmīdu attīrīšanas reaģentu komplekts bez endotoksīna (PrepEase™ Endotoxin-Free Plasmid Purification Kits)
Kodak, Beļģija	Rentgena filmu reaģentu komplekts (attīstītājs: Carestream Dental Developer, fiksētājs: Carestream Dental Developer Fixer)
Life Technologies, Lielbritānija	Metāla-DAB Substrāts (Metal Enhanced DAB Substrate Kit)
Mettler-Toledo, Vācija	pH buferšķīdumi (pH buffer solution, pH 9.21±0.02)
Thermo Scientific, ASV	Hemiluminescenta substrāta šķīdumu reaģentu komplekts (SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit) Peroksidāzes detektēšanas reaģentu komplekts (Pierce Peroxidase Detection Kit)

2.1.7. Buferšķīdumi

4. tabula
Pētījumā izmantotie buferšķīdumi.

Table 4
Buffers used in this study.

Šķīdumi	Reaģenti
10X Tris-glicīna šķīdums	250 mM Tris; 1,92 M glicīns; 10 g SDS; destilēts ūdens līdz 1 L (pH 8,3).
1X TAE buferšķīdums (Tris-acetāta-EDTA)	10 ml 50X TAE buferis: 2 M Tris; 57,1 ml ledus etiķskābe; 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); destilēts ūdens līdz 1 L; destilēts ūdens līdz 500 ml.
5% vājpiena šķīdums	0,3 ml Tween-20; 300 ml PBS; 15 g piena pulveris.
6X Laemmli buferšķīdums	1,2 ml 0,5 M Tris buferšķīdums (pH 6,8); 1,2 g SDS; 0,93 g 1M DTT; 4,7 ml glicerīns; 2,1 ml destilēta ūdens; 6 mg bromfenolzilā krāsa; Pirms lietošanas pievieno 6 ml merkaptoetanolu.

Bloķēšanas šķīdums	1 ml 10X DPBS -/-; 500 µl 10% BSA; 500 µl 5% FBS; destilēts ūdens līdz 10 ml.
Mazgāšanas buferšķīdums	Izmantojot peroksidāzes detektēšanas reaģentu komplekts un ražotāja protokolu.
Proteīnu elektroforēzes buferšķīdums	100 ml 10X Tris-glicīna šķīduma; 10 ml 10% SDS; destilēts ūdens līdz 1 L.
Proteīnu pārneses buferšķīdums	26 mM Tris; 14 g glicerīns; 200 ml metanols; destilēts ūdens līdz 1 L.
TNE buferšķīdums	10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA (pH 7,6).
Tris buferšķīdums pH 6,8	37,8 g Tris; 150 ml destilēts ūdens; pH izlīdzināts ar HCl.
Tris buferšķīdums pH 8,8	56,8 g Tris; 150 ml destilēts ūdens; pH izlīdzināts ar HCl.

2.1.8. Šūnu barotnes

5. tabula
Pētījumā izmantotās barotnes.

Table 5
Medium used in this study.

Barotnes	Sastāvs
1X BHK-21	5% FBS; 10% triptozes fosfāta buljons; 2 mM L-glutamīns; 2 mM PEST; 20 mM HEPES; 1X G-MEM BHK-21.
1X TS/A	10% FBS; 2 mM L-glutamīns; DMEM (1X) + GlutaMAX barotne.
LB agarizēta barotne	2% LB pulveris; 1,5% bakto agars; Destilētu ūdeni pievieno līdz nepieciešamajam daudzumam; Autoklāvē 15 min 120°C.
LB barotne šķidra	2% LB pulveris; Destilētu ūdeni pievieno līdz nepieciešamajam daudzumam; Autoklāvē 15 min 120°C.
10% RPMI-1640 barotnē	10% FBS; 5 U penicilīns/streptomicīns; RPMI 1640 barotne.

2.1.9. Ierīces

6. tabula
Pētījumā izmantotās ierīces.

Table 6
Equipment used in this study.

Aparatūra	Modelis	Ražotājs	Valsts
Autoklāvs	Systec V-150	Systec Lab	ASV
Automātiskā šūnu skaitīšanas iekārta	Countess [®] Automated Cell Counter	Invitrogen	ASV
Automātiskās pipetes	PIPETBOY acu	Integra Biosciences	Šveice
Centrifūga	5417R	Eppendorf	Vācija
Centrifūga barotnēm	K26	Irnetzki	Vācija
Digitālā fotokamera	PowerShot S80	Canon	Japāna
Elektroforēzes kameras strāvas avots	EPS-301	Amersham Bioscience	Anglija
Elektroporators	Gene Pulser II System	Bio-Rad	ASV
Gaismas mikroskops	DM IL	Leica	Vācija
Gaismas mikroskops	Widefield Microscope (DMRBE)	Leica	Vācija
Gēlu vizualizācijas kamera	BioSpectrum [®] AC Imaging System, BioSpectrum 500	UVP	ASV
Hibridizācijas krāsniņa	ProBlot Hybridization Oven L12-2	Labnet	ASV
Horizontālā elektroforēzes kamera	HU6	Carl Roth	Vācija
Inkubators	5% CO ₂ , 37°C, MCO-5AC	Sanyo Electronic Co., Ltd	Japāna
Invertētais gaismas mikroskops	Labovert FS	Leitz	Vācija
Krāsniņa	IP22	Thermo Electron Corporation	ASV
Kratītājs	Shaker Pos-20L	Skyline	ASV
Laminārs	KOJAIR [®] KR-130	Kojair Tech Oy	ASV
Ledus mašīna	ZBE 70-35	Ziegra	Vācija
Magnētiskais maisītājs	MSH-300	Biosan	Latvija
Mikrogriezumu ierīce	CM1850	Leica	Vācija
Mikroviļņu krāsns	J17M	Zanussi	Itālija
Orbitālais kratītājs	PSU-10i	Biosan	Latvija
Pārneses aparāts western blot pH metrs	Apollo [™] S-20	CLP Metter-Toledo	ASV
Rotators/mikseris	RM-2S	Elmi	Latvija
Spektrofotometrs	(NanoDrop [®] ND-1000)	Thermo Scientific	ASV
Svari	Type P-120	Mettler-Toledo	ASV
Termostats	Thermo-Block TDB-120	Biosan	Latvija
Ultracentrifūga	L-100 XP	Beckman Coulter	ASV
Ūdens vanna-termostats	WB-4MS	Biosan	Latvija
UV-transiluminators /fotogrāfēšanas sistēma	BioSpectrum [®] Imaging System	UVP	ASV
Vertikālā elektroforēzes kamera	SE250	Amersham Biosciences	ASV
Vortekss/centrifūga	Combi-Spin FVL-2400N	Biosan	Latvija

2.1.10. Materiāli

7. tabula
Pētījumā izmantotie materiāli.

Table 7
Supplies used in this study.

Materiāli	Raksturojums	Ražotājs	Valsts
24 aiļu plates	Tissue Cell Test Plate 24 well	SPL Life Sciences	Koreja
Elektroporācijas kivetes	Gene Pulser Electroporation Cuvettes (0.4 cm gap)	Bio-Rad	ASV
Gumijas cimdi	Powder-free Latex Gloves	Great Glove	Malaizija
Kolbas, mērcilindri, Petri plates	-	Miles Laboratories Inc	ASV
Kolonnas	PrepEase™-EF kolonna	Affymetrix USB	Lielbritānija
Mikromēģenes	1,5 ml; 2 ml	Eppendorf	Vācija
Histoloģiskie stikla slaidi	SuperFrost® Plus Objekträger	R. Langenbrinck Labortechnik Medizintechnik	Vācija
Histoloģiskie stikla slaidi	Knittel-Glaeser Glass Microscope Slides	Knittel-Glaeser	Vācija
Plastikāta mēģenes	15 ml; 50 ml; 120x17 mm	Sarstedt	Vācija
Proteīnu pārnese membrāna	Hybond-P, PVDF Transfer Membrane	Amersham Biosciences	ASV
Rentģena filma	Amersham Hyperfilm ECL (18 × 24 cm)	Amersham Biosciences	ASV
Segstikliņi	Microscope Cover Glasses, 24x32 mm	Menzel-Glaser	Vācija
Seroloģiskās pipetes	5 ml, 10 ml, 25 ml	GenFollower	Ķīna
Šūnu kultivēšanas slaidi	Lab-Tek® II Chamber Slide™ System	Thermo Scientific	ASV
Šūnu matračī	CELLSTAR® Standard Cell Culture Flasks (25 cm ² ; 75 cm ²)	Greiner Bio-One	Vācija
Šūnu sieti	Cell sieve (d=70 μm)	Thermo Scientific	ASV
Šūnu skaitīšanas slaidi	Countess® cell counting chamber slides	Life Technologies	Lielbritānija
Šūnu skrāpi	NUNC™ Cells scraper 32 cm	Thermo Scientific	ASV

2.1.11. Programmatūra

- ImageJ 1.48v, National Institute of Health, USA.
- Leica Microsystems Heidelberg GmbH. Version 2.3.
- NanoDrop 1000. Version 3.7.
- Vision Works®LS Image Acquisition and Analysis Software. Version 6.3.3.

2.2. Metodes

2.1.1. Bakteriālā transformācija

Transformācijai tika izmantotas aptuveni 100 µl *E.coli* celma XL10-Gold šūnas, kas glabājās -80°C. Baktēriju šūnas tika atkausētas uz ledus un tām pievienots 1 ng/µl pSFV1/Enh.mSI-CLP plazmīdas. Šūnu/plazmīdu maisījums inkubēts 15 min uz ledus. Pēc inkubācijas uz ledus, šūnas inkubētas 35 sek +42°C ūdens vannā/termostatā, kam sekoja 2 min inkubācija uz ledus. Baktērijām pievienots 100 µl 50 mg/ml ampicilīns un 900 µl šķidra LB barotne, kam sekoja inkubācija uz kratītāja 1 h +37°C. Kolonnu iegūšanai Petrī platē uz agarizētas LB barotnes (200 ml LB barotne; 400 µl 50 mg/ml ampicilīns) blīvsējā uzsētas 200 µl XL10-Gold šūnas un inkubētas 24 h +37°C.

2.2.2. Baktēriju kolonnu pārņemšana šķidrā LB barotnē

Šķidru LB barotni (400 ml LB barotne; 400 µl 50 mg/ml ampicilīns) iepilda mēģenēs katrā pa 5 ml. Kolonnas, izaugušas Petrī platē uz agarizētas LB barotnes, pa vienai tika pārnestas attiecīgā mēģenē, kuras inkubētas uz kratītāja 200 rpm 24 h +37°C. Pēc 24 h katrs mēģenes saturs pārņemts 200 ml jaunā šķidrā LB barotnē un atkārtoti inkubēts uz kratītāja 200 rpm 24 h +37°C.

2.2.3. pDNS izdalīšana no *E.coli* šūnām

Pēc *E.coli* celma kolonnu inkubācijas 200 ml šķidrās LB barotnes, uz svariem tika pārbaudītas kolbu svara attiecības, tās izlīdzinot ar NaCl. Kolbu saturs tika centrifugēts 3000 rpm 10 min. Pēc centrifugēšanas no kolbām tika izlieta barotne un izveidojušās nogulsnes šķīdinātas 30 ml NaCl. Izšķīdinātās nogulsnes pārņemtas 50 ml plastikāta mēģenēs, kas centrifugētas 5000 rpm 10 min, pēc kā pārņemtas uz ledus. Tālākā pDNS izdalīšana veikta, izmantojot plazmīdu attīrīšanas reaģentu komplektu un ražotāja protokolu. Attīrītai pDNS tika izmērīta koncentrācija ar spektrofotometru un paraugi pārbaudīti, veicot elektroforēzi 1% agarozes gēlā 1X TAE buferšķīdumā. Elektroforēzes parametri tika iestatīti atbilstoši elektroforēzes kameras ražotāja instrukcijai – 100 mA, 299 V. Paraugi uzglabāti -70°C.

2.2.4. Plasmīdu restrikcija

pSFV1/Enh.mSI-CLP un pSFV1/Helper1 plazmīdu restrikcija (linearizācija) tika veikta, izmantojot restriktāzes *Apa I* un *Xma I* (*Thermo Scientific*). Restrikcijas reakcija tika veikta, atbilstoši ražotāja instrukcijām.

Reakcijas maisījums:

- 1 µg pDNS;
- 2 µl Tango (Yellow) buferšķīdums (10X);
- 1,5 µl *Apa I* (10 U/µl);
- 1,5 µl *Xma I* (10 U/µl);
- līdz 20 µl ar DEPC apstrādāts ūdens.

Reakcijas maisījuma tilpums = 20 µl

Lai pārbaudītu restrikcijas saitu, kas tiks tālāk izmantots plazmīdas preparatīvā šķelšanā, tika veikta reakcija, izmantojot restriktāzes *Bcu I* (*Spe I*) un *Xma I* (*Thermo Scientific*). Restrikcijas reakcija veikta, atbilstoši ražotāja instrukcijām.

Reakcijas maisījums:

- 600 ng pDNS;
- 2 µl Tango (Yellow) buferšķīdums (10X);
- 1,5 µl *Spe I* (10 U/µl);
- 1,5 µl *Xma I* (10 U/µl);
- līdz 20 µl ar DEPC apstrādāts ūdens.

Reakcijas maisījuma tilpums = 20 µl

Reakcijas maisījumi tika inkubēti 1 h 30 min +37°C. Restrikcijas rezultāti pārbaudīti, veicot elektroforēzi 1% agarozes gēlā 1X TAE buferšķīdumā. DNS identifikācijai izmantoti *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus* un *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* marķieri. Elektroforēzes parametri tika iestatīti atbilstoši elektroforēzes kameras ražotāja instrukcijai – 100 mA, 299 V.

2.2.5. pSFV1/Enh.mSI-CLP un pSFV1/Helper1 RNS transkripcija in vitro

Linearizētās pSFV1/Enh.mSI-CLP un pSFV1/Helper1 plazmīdas tālāk tika izmantotas RNS transkripcijai *in vitro*. Reakcijai tika izmantots 1 µg/µl linearizētās pSFV1/Enh.mSI-CLP un pSFV1/Helper1 plazmīdas. Transkripcijas reakcija veikta 50 µl tilpumā. Reakcijas maisījums – 5X transkripcijas buferšķīdums, 20 U/µl SP6 RNS polimerāze (*Thermo*

Scientific), 2 mM dNTP maisījums, 40 U/μl ribonukleāžu inhibitors (*Thermo Scientific*), līdz 1 mM RNS CAP struktūras analogs (*New England Biolabs*) un ar DEPC apstrādāts ūdens līdz 50 μl tilpumam. Reakcijas maisījums inkubēts 1 h 30 min 37°C, pēc tam jaunsintezētās RNS kvalitāte pārbaudīta, veicot elektroforēzi 1% agarozes gēlā 1X TAE buferšķīdumā. Elektroforēzes parametri tika iestatīti atbilstoši elektroforēzes kameras ražotāja instrukcijai – 100 mA, 299 V. RNS paraugi uzglabāti -70°C.

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

BHK-21 šūnas kultivē līdz 100% monoslāņa blīvumam, monoslāni divas reizes skalo ar 1X DPBS +/- reaģentu un tripsinizē ar 0,05% tripsīna šķīdumu 2-3 min +37°C. Tripsinizēšanu apstādina, izmantojot 1X BHK-21 barotni. Šūnas centrifugē 10 min pie 1000 rpm un nogulsnes skalo ar 1X DPBS +/- . Atkārtoti veic centrifugēšanu 10 min 1000 rpm, noņem supernatantu un šūnas suspendē 770 μl aukstā 1X DPBS +/- . Šūnas (kopā 10⁷ šūnu) pārnes elektroporācijas kivetē (sprauga 0,4 cm), pievienojot 20-30 μg transkribētās pSFV1/Enh.mSI-CLP un pSFV1/Helper1 RNS. Kopējam tilpumam elektroporācijas kivetē jābūt 800 μl. Elektroporatorā noregulē vajadzīgos parametrus (850 V, 25 μF) un šūnu-RNS suspensiju pakļauj diviem strāvas impulsiem. Šūnu suspensiju no kivetes uzsēj uz 75 cm² matrača 12 ml 1X BHK-21 barotnes. Pēc 16 h ilgas inkubācijas pie 37°C, rekombinantā rekSFV1/Enh.mSI-CLP vīrusa saturošā šūnu barotne tika savākta vīrusa koncentrēšanai vai uzglabāta mikromēģenēs -70°C.

2.2.7. rekSFV1/Enh.mSI-CLP vīrusa koncentrēšana ar ultracentrifugēšanu

Lai atdalītu vīrusu no BHK-21 šūnām, vīrusu daļiņu saturošo barotni 16 h pēc elektroporācijas centrifugē 11'000 rpm 30 min. Centrifugēšanas stobriņos sagatavo pakāpenisku saharozes gradientu: 50% un 20% saharozes šķīdumus TNE buferšķīdumā. Trīs ml saharozes spilvenus, sākot ar koncentrētāko, uzslāņoja vienu uz otra un 3 ml rekSFV1/Enh.mSI-CLP vīrusa saturošo slāni novieto šķīduma virspusē. Līdzsvarošanai izmanto 1X BHK-21 barotni. Ultracentrifugēšanas parametri – 90 min, 30'500 rpm (max 160'000 g), SW-32 rotors. Pēc 90 min vīrusu daļiņas saturošo 20% saharozes šķīduma slāni savāc un ielej dialīzes membrānās maisīnā. Dialīzes membrānas maisīnu ar 20% saharozes-

vīrusa šķīdumu ievieto 1X DPBS -/- (1:100) un dializē 24 h. Pēc dialīzes vīrusu alikvoti tika sasaldēti -70°C.

2.2.8. BHK-21 un TS/A šūnu audzēšana 24 aiļu platē

BHK-21 un TS/A šūnām noņem barotni un vienu reizi skalo ar siltu (+37°C) 1X DPBS-/- reaģentu. Pievieno 0,05% tripsīnu (1 ml uz 25 cm² matraci) un inkubē +37°C aptuveni 3 min līdz šūnas atdalījušās no matrača un brīvi peld tripsīna šķīdumā (pārbauda mikroskopējot). Pēc tripsinizācijas šūnu suspensijai pievieno ekvivalentu daudzumu attiecīgās barotnes, lai apturētu tripsīna darbību. Suspendē un centrifugē 1000 rpm 10 min. Pēc centrifugēšanas šūnām noņem barotni, suspendē svaigā attiecīgās šūnas barotnē un skaita šūnas. Nepieciešamo šūnu daudzumu ($0,4 \times 10^5$ šūnas/ml) uzsēj katrā plates ailē.

2.2.9. BHK-21 un TS/A šūnu inficēšana ar *mSI-CLP* gēna SFV un SIN vektoriem un *Luc* gēnu saturošo SFV vektoru 24 aiļu platē

24 aiļu platē šūnām BHK-21 un TS/A, sasniedzot 80–90% blīvumu, noņem barotni un vienu reizi skalo ar siltu (+37°C) 1X DPBS ++ reaģentu. Katrā plates ailē pievieno attiecīgo vīrusu dažādos atšķaidījumos. Vīrusi tiek atšķaidīti 1X DPBS ++ reaģentā un katrā ailē šūnām tiek pievienoti 300 µl attiecīgā vīrusa atšķaidījuma. Šūnas inkubē 1h 10 min +37°C, 5% CO₂ atmosfērā. Pēc inkubācijas šūnām noņem infekcijas šķīdumu un pievieno 1 ml attiecīgās barotnes. Šūnas inkubē 16 h +37°C.

2.2.10. *mSI-CLP* gēna saturošo SFV un SIN vektoru un *Luc* gēna saturošo SFV vektora vīrusa titra imunodetekcija

BHK-21 un TS/A šūnas divas reizes skalo ar 1X DPBS -/- reaģentu. Katrā ailē pievieno 300 µl 2% PFA un inkubē 15 min istabas temperatūrā. Šūnas divas reizes skalo ar 1% DPBS -/- un pievieno 300 µl 0,1% Triton-X100, inkubē 10 min istabas temperatūrā. Pievieno 1 ml bloķēšanas šķīdumu un inkubē 40 min +37°C. Šūnām pievieno primārās antivielas, kas atšķaidītas bloķēšanas šķīdumā, 150 µl uz plates aili – rekSFV1/Enh.Luc vīrusa titra imunodetekcijai truša Anti-SFV-nsP1 monoklonālās antivielas (1:3500) (*Prof. A. Merits dāvinājums, Tartu universitāte, Igaunija*), bet rekSFV1/Enh.mSI-CLP vīrusa titra imunodetekcijai peles Anti-FLAG (M2) monoklonālās antivielas (1:2000) (*Sigma-Aldrich*,

kat. nr. F3165), inkubē 45 min +37°C. Pēc inkubācijas šūnas trīs reizes mazgā ar 1X DPBS -/- reagentu. Šūnām pievieno sekundārās antivielas, kas atšķaidītas bloķēšanas šķīdumā, 150 µl uz plates aili – rekSFV1/Enh.Luc vīrusa titra imunodetekcijai kazas Anti-truša IgG (H+L) Alexa-594 (1:1000) (*Life Technologies*, kat. nr. A-11037), bet rekSFV1/Enh.mSI-CLP vīrusa titra imunodetekcijai kazas Anti-peles IgG (H+L) Alexa-488 (1:1000) (*Life Technologies*, kat. nr. A-11029), inkubē 45 min + 37°C. Sekundārās antivielas tiek aizvāktas un šūnas mazgātas trīs reizes ar 1X DPBS -/-. Šūnu kodolu detekcijai pievieno 200 µl DAPI fluorescento reagentu (1:10), kas atšķaidīts 1X DPBS -, un inkubē 10 min istabas temperatūrā. DAPI aizvāc un šūnas trīs reizes mazgā ar 1X DPBS -/-. Veic vīrusu titra noteikšanu un 24 aiļu plati uzglabā +4°C.

2.2.11. Vīrusu titra noteikšana

Lai noteiktu vīrusa titru, tiek aprēķināts vidējais pozitīvais šūnu skaits vienā redzes laukā. Izvēlētajā atšķaidījumā pozitīvo šūnu skaits redzes laukā ir aptuveni no piecām līdz piecdesmit šūnām. Pie konkrētā atšķaidījuma veikta redzes lauka maiņa vismaz astoņas reizes. Mikroskopā objektīva lēca izvēlēta 10X vai 20X palielinājumā, no tā izrēķinot redzes lauka lielumu (8. tabula).

8. tabula.
Objektīva lēcas redzes lauks.

Table 8.
Field sizes of objective lenses.

Objektīva lēca	Actīvas lēcas			Lauki/ailes	
	Kopējais palielinājums	Lauka diametrs	Lauka platība (mm ²)	12 aiļu plate	24 aiļu plate
4X	40X	5 mm	19.6	19	10
10X	100X	1.8 mm	2.54	150	79
20X	200X	0.9 mm	0.64	594	313

Izvēloties objektīva lēcas palielinājumu 10X, iegūst lauka diametra palielinājumu 1.8 mm (D=1.8 mm).

$$\text{Lauka platība} = 3.14 \times (D/2)^2 = 3.14 \times 0.92 = 2.54 \text{ mm}^2$$

Tā kā vīrusa titrs tiek aprēķināts šūnām 24 aiļu platē, kuras standarta diametrs ir 2.0 cm², līdz ar to:

$$\text{Lauki/ailes} = 2.0 \text{ cm}^2 / 2.54 \text{ mm}^2 = 2.0 \text{ cm}^2 / 2.54 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 = 79$$

Vīrusa titra aprēķināšana (Infekcijas vienības vai ifu/ml) 24 aīlu platē:

$$\frac{(\text{vidējais pozitīvais šūnu skaits/lauks}) \times (79 \text{ lauki/ailes}) \times (\text{vīrusa atšķaidījums})}{0.1 \text{ ml}}$$

2.2.12. BHK-21 un TS/A šūnu inficēšana 75 cm² matracī ar *mSI-CLP* gēna saturošo SFV un SIN vektoriem un *Luc* gēna saturošo SFV vektoru

BHK-21 un TS/A monoslāņiem 75 cm² matracī, sasniedzot 90% blīvumu, noņem barotni un divas reizes skalo ar siltu (+cC) 1X DPBS ++ reaģentu. Katrā matracī monoslānim pievieno rekombinanto vīrusu atšķaidītu (1:3). Vīrusa atšķaidījums tiek veikts 1X DPBS ++ reaģentā. Infekciju veic šūnas inkubējot ar vīrusa preparātu 1h 10 min +37°C, 5% CO₂ atmosfērā. Noņem infekcijas šķīdumu un monoslānim pievieno 9 ml attiecīgās barotnes. Šūnas inkubē 16 h +37°C.

2.2.13. Ar *mSI-CLP* gēna saturošo SFV un SIN vektoru un *Luc* gēna saturošo SFV vektoru inficēto BHK-21 un TS/A šūnu barotņu un lizātu savākšana

Pēc šūnu infekcijas ar attiecīgo vīrusu, no šūnu matrača tika savākta šūnu barotne un centrifugēta 10 min 6000 rpm. Pēc centrifugēšanas šūnu barotne atdalīta no nogulsniem, barotne inkubēta -70°C. Šūnu monoslānis mazgāts ar 8 ml aukstu 1X DPBS -/- reaģentu un šūnas noskāpētas no plastmasas ar šūnu skrāpi. Tām pievieno 2 ml aukstu 1X DPBS -/- reaģentu, pārnes 15 ml stobriņā un centrifugē 3 min 1000 rpm. Pēc centrifugēšanas noņem 1X DPBS -/- reaģentu un pievienoti 700 µl 2X Laemmy buferšķīdumu ar 7 µl merkaptotanolu. Šūnu lizātus uzglabā -70°C.

2.2.14. SI-CLP un *Luc* proteīna imunoprecipitācija no vīrusu inficētām BHK-21 un TS/A šūnu kultūru barotnēm un lizātiem

Proteīna attīrīšanai no BHK-21 un TS/A šūnu barotnes un lizātiem, tika izmantoti 50 µl magnētiskās lodītes. Lodītes divas reizes tika mazgātas ar 1 ml 0,1% PBS/BSA šķīdumu un suspendētas 200 µl 0,1% PBS/BSA šķīduma. Lodītēm pievienoti 5 µl peles Anti-FLAG (M2) monoklonālās antivielas (*Sigma-Aldrich*, kat. nr. F3165) un maisījums inkubēts 12 h uz rotatora/miksera. Monoklonālās antivielas un 0,1% PBS/BSA šķīdums tika aizvākts un lodītes trīs reizes mazgātas ar 1 ml 0,1% PBS/BSA šķīdumu, suspendētas attiecīgā šķīduma daudzumā, tā, lai katros 1,5 ml šūnu barotnes un lizātu paraugos pievienotu 30 µl lodīšu

suspensiju. Paraugi 12 h inkubēti uz rotatora/miksera. Pēc inkubācijas šūnu barotnes un lizāti tika aizvākti un lodītes trīs reizi mazgātas 500 µl 0,1% PBS/BSA šķīduma. Pēc mazgāšanas suspendētas 30 µl 1X Laemmli buferšķīdumā. Paraugi uzglabāti -20°C vai uzreiz izmantojami SI-CLP proteīna analīzei.

2.2.15. SDS–PAGE – nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gēla elektroforēze

Proteīna SI-CLP izdalīšanai no BHK-21 un TS/A šūnu barotnes un lizātiem tika izmantots 15% poliakrilamīda (PAA) sadalošais un 4% koncentrējošais gēls (9. tabula).

9. tabula
SDS-PAGE gēlu sagatavošana Western blot analīzei.

Table 9
SDS-PAGE gel preparation for Western blot analysis.

Reāģenti	15% sadalošais gēls	4% koncentrējošais gēls
Akrilamīda šķīdums (40%)	5,625 ml	0,3 ml
Tris-HCl	3,8 ml (1,875 M; pH 8,8)	0,380 ml (1,25 M; pH 6,8)
10% SDS	0,150 ml	0,03 ml
10% APS	0,150 ml	0,03 ml
Destilēts ūdens	līdz 15 ml	līdz 3 ml
TEMED	0,015 ml	0,01 ml

Pirms paraugu uznešanas uz gēla, tie tika denaturēti 10 min 95°C. Proteīna molekulārās masas noteikšanai izmantots proteīnu marķieris. Elektroforēze tika veikta proteīnu elektroforēzes buferšķīdumā, atbilstoši vertikālās elektroforēzes ražotāja instrukcijai (10–15 mA, 100–120 V) aptuveni 1 h.

2.2.16. Western blot proteīna analīze

SI-CLP proteīna noteikšanai tika izmantota Western blot metode. Proteīnus pārnesa uz polivinilidendifluorida (PVDF) membrānas. Pirms proteīnu pārneses PVDF „Hybond – P” membrāna tika sagatavota atbilstoši ražotāja protokolam – 1 min metanolā, tad to noskaloja ar destilētu ūdeni un pārnesa uz 15-20 min proteīnu pārneses buferšķīdumā. Western blot analīzei proteīnus sadalīja ar SDS-PAGE gēlu, kuru veica saskaņā ar augstāk minēto protokolu. Proteīnu pārnesi no PAGE gēla sadalošās daļas uz sagatavotas membrānas veica ar elektropārneses aparātā 100–120 mA, 1–3 V, 40 min.

Pēc proteīnu pārneses, membrānu bloķēja 5% vājpiena PBS šķīdumā 1 h istabas temperatūrā uz orbitālā kratītāja. Pēc bloķēšanās membrānu inkubēja ar primārām antivielām – peles Anti-FLAG (M2) monoklonālās antivielas (1:1000) (*Sigma-Aldrich*, kat. nr. F3165) (FLAG sekvenču detektēšanai) vai žurkas Anti-peles 1B8 (SI-CLP) (1:200) (*Elisabeth Kemmer dāvinājums, Minhene, Vācija*) (SI-CLP proteīna detektēšanai), kas tika atšķaidītas 5% vājpiena PBS buferšķīdumā 1 h 10 min istabas temperatūrā. Pēc tam membrānu skaloja četras reizes pa 15 min 5% vājpiena PBS buferšķīdumā. Pēc skalošanas membrānu inkubēja ar sekundārām antivielām – kazas Anti-peles poliklonālās antivielām iezīmētām ar mārrotku peroksidāzi (HRP) (1:3000) (*Thermo Scientific*, kat. nr. 32430) (FLAG sekvenču detektēšanai) vai kazas Anti-žurkas IgG poliklonālās antivielas iezīmētas ar mārrotku peroksidāzi (HRP) (*Santa Cruz Biotechnology*, kat. nr. sc-2303) (SI-CLP proteīna detektēšanai), kas tika atšķaidītas 5% vājpiena PBS buferšķīdumā 1 h istabas temperatūrā, izmantojot termostatu ar rotatoru. Pēc membrānas skalošanas četras reizes PBS buferšķīdumā ar 0,1% Tween-20 piedevu, membrānu pārklāja ar hemiluminescenta substrāta šķīdumu (1:1) atbilstoši ražotāja protokolam – uz 1 cm² membrānas izmantoja 0,1 ml substrāta. Pēc membrānas 5 min inkubācijas ar hemiluminescento reaģentu, signālu detekcijai izmantoja rentgena filmu, ekspozīcijas laiks svārstījās atkarībā no signāla stipruma, sākot ar vienu minūti līdz vairākām stundām. Rentgena filmu attīstīja un fiksēja ar Kodak attīstīšanas un fiksācijas šķīdumiem.

2.2.17. Makrofāgu izdalīšana no BALB/c pelēm

Makrofāgu izdalīšanai tika izmantota BALB/c peles. Lai aktivētu un palielinātu makrofāgu daudzumu peļu vēdera dobumā, BALB/c peles tika intraperitoneāli (*ip*) injicētas ar 3% tioglikolāta šķīdumu izšķīdinātu ūdenī. Četras dienas pēc injekcijas, pelēm caur labo kāju vēdera dobumā tika ievadīti 5 ml DPBS -/- reaģents ar 5% FBS. Lai noskalotu makrofāgus no zarnām, peles maigi tika sakratītas, DPBS -/- + 5% FBS iejicēts organismā un aizvākts ar šūnām. Tās tika centrifugētas pie 1000 rpm 10 min, suspendētas 10% RPMI-1640 barotnē un uzsētas uz petri plates. Lai atdalītu izdalītās dendrītiskās šūnas no makrofāgiem, uzsētas šūnas tika inkubētas 1 h 37°C, 5% CO₂ atmosfērā, lai dendrītiskās šūnas varētu piestiprināties pie petri plates virsmas. Pēc inkubācijas barotne ar nepiestiprinātiem makrofāgiem tika aizvākta un uzsēta uz četru-iedobju slaidiem tālākajai imūnokrāsošanai. 4 h pēc makrofāgu uzsēšanas, barotne ar palikušiem limfocītiem tika samainīta, pievienojot svaigu 10% RPMI barotni.

2.2.18. Makrofāgu imunokrāsošana

24 h pēc makrofāgu uzsēšanas uz četru-iedobju slaidiem, šūnas tika skalotas ar DPBS -/-, fiksētas 2–3% PFA 15 min istabas temperatūrā un divas reizes skalotas ar DPBS -/-. Tam sekoja 10 min inkubācija DPBS -/-, kam pievienots 0,1% Tritons X-100 un skalošana divas reizes ar DPBS -/-. Makrofāgu imunokrāsošana tika veikta saskaņā ar peroksidāzes detektēšanas reaģenta komplekta protokolu. Šūnas tika divas reizes skalotas pa 3 min ar DPBS -/-. Lai novērstu nespecifisko antivielas piesaistīšanos, paraugi tika inkubēti ar bloķēšanas buferšķīdumu 30 min istabas temperatūrā. Lai pierādītu, ka izdalītas šūnas ir makrofāgi, tika izmantotas specifiskās makrofāgu antivielas, kas atpazīst virsmas marķieri CD68. Pēc bloķēšanās šūnas inkubēja ar primārām antiviellām – žurkas Anti-CD68 (1:200) (*Acris*, kat. nr. SM1550PS), kas tika atšķaidītas bloķēšanas buferšķīdumā un inkubētas 1 h 10 min istabas temperatūrā. Pēc tam makrofāgus trīs reizes pa 3 min skaloja ar mazgāšanas buferšķīdumu. Pēc skalošanas paraugus inkubēja ar sekundārām antiviellām – kazas Anti-žurkas IgG (Fc) poliklonālās antivielas iezīmētas ar mārutku peroksidāzi (HRP) (1:400) (*Thermo Scientific*, kat. nr. 31475), kas tika atšķaidītas bloķēšanas buferšķīdumā, 1 h istabas temperatūrā. Paraugi tika atmazgāti no antiviellām, tos trīs reizes pa 3 min ar mazgāšanas buferšķīdumu. Lai vizualizētu peroksidāzes pozitīvas šūnas, metāla-DAB substrāts tika pielietots, kas izmanto kobalta un niķeļa hlorīdu pēc īpašas formulas diaminobenzidīna peroksidāzes substrāta, nodrošinot intensīvu krāsu imūnhistoķīmiskai krāsošanai. Makrofāgu šūnas inkubētas ar metāla-DAB substrātu 15 min un trīs reize pa 3 min skalotas ar mazgāšanas buferšķīdumu. Lai krāсотu paraugus ar hematoksilīnu, šūnas divas reizes tika skalotas ar destilētu ūdeni un 1 min inkubētas ar hematoksilīnu. Pēc krāsošanas šūnas atkārtoti skalotas ar destilētu ūdeni un mazgāšanas buferšķīdumu.

2.2.19. TS/A audzēju iegūšana peļu organismā

TS/A šūnu kultūru audzē DMEM barotnē ar 10% FBS un antibiotiķiem (5 U penicilīns/streptomīcīns). No šūnām aizvāc augšanas barotni, tripsinizē aptuveni 2 min 0,1% tripsīna šķīdumā +37°C un skalo divas reizes ar DPBS -/-. TS/A šūnas suspendētas DPBS -/- reaģentā un filtrētas caur sietu (70 μm caurumu diametrs), lai iegūtu viendabīgu suspensiju, kuru atšķaidīja līdz koncentrācijai 25×10^6 šūnas/ml.

Darbā izmantotas sešas līdz astoņas nedēļas vecas sievišķā dzimuma BALB/c peles. BALB/c pelēm zem ādas muguras rajonā tika ievadīti 0,2 ml sagatavotas TS/A šūnu

suspensijas (5×10^6 šūnas/ml). Septiņu dienu laikā šūnu injekcijas vietā tika konstatēti audzēju veidojumi ar vidējo apjomu $2,2 \text{ cm}^3$, audzēji tika nomērīti.

2.2.20. TS/A audzēju saturošo peļu infekcija ar rekSFV vīrusiem

9 BALB/c peles ar TS/A audzējiem tika sadalītas trīs grupās, katrā grupā pa trīs pelēm. Tām tika veiktas divas intratumorālas (*it*) injekcijas ar rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG un rekSFV1/Enh.Luc alfavīrusu ekspresijas vektoriem un PBS. Abu vektoru gadījumā tika izmantots vienāds vīrusa titrs $5,7 \times 10^7$ v.d. Injekcijas tika veiktas septītajā un devītajā dienā pēc audzēju izveidošanās. 24 h pēc otrās *it* infekcijas, TS/A audzēji tika izņemti, nomērīti un sasaldēti O.C.T gēlā un šķidrajā slāpekļī. Visi peļu audzēji tika uzglabāti -80°C .

2.2.21. TS/A audzēju mikrogriezumu veikšana un to fiksēšana

Pirms mikrogriezumu veikšanas, TS/A audzēji tika ievietoti -20°C temperatūrā uz 1 h. Radiālie un tangenciālie audzēju mikrogriezumi tika veikti -18°C ar biezuma variāciju 5-10 μm , izmantojot mikrogriezumu ierīci. Lai veiktu mikrogriezumu krāsošanu ar antivielām, kas atpazīst FLAG sekvenci, tika izmantota griezumumu fiksēšana uz histoloģiskiem slaidiem ar 2% un 4% PFA. Fiksēšana tika veikta trijos etapos: uz stikla slaidiem ar TS/A audzēju mikrogriezumiem tika uzpilināts 2% PFA un tie tika inkubēti 10 min istabas temperatūrā. Pēc tam audzēju mikrogriezumiem pievienots PBS šķīdums ar 0,5% Triton X-100 un tie inkubēti 15 min istabas temperatūrā. Pēdējā fiksācija tika veikta, inkubējot paraugus 4% PFA 10 min istabas temperatūrā. Pēc fiksēšanas, slaidi tika izžāvēti istabas temperatūrā un uzglabāti $+4^\circ\text{C}$. Pārējo griezumumu imūnhistoķīmiskai krāsošanai, tie fiksēti ar acetonu 10 min istabas temperatūrā. Pēc fiksēšanas, tioglikolāta šķīdumu slaidi tika izžāvēti istabas temperatūrā un uzglabāti -80°C .

2.2.22. TS/A mikrogriezumu fiksētu PFA imūnhistoķīmijas analīze

Paraugu mikrogriezumu imūnhistoķīmiskā analīze tika veikta saskaņā ar peroxidāzes detekcijas reaģentu komplekta protokolu. Lai bloķētu dabīgas peroxidāzes aktivitāti, fiksētie TS/A mikrogriezumu tika inkubēti ar peroxidāzes supresoru 30 min istabas temperatūrā. Paraugu slaidi divas reizes pa 3 min tika skaloti ar mazgāšanas buferšķīdumu. Lai novērstu nespecifisko antivielas piesaistīšanos, paraugi tika inkubēti ar bloķēšanas buferšķīdumu 30

min istabas temperatūrā. Pēc bloķēšanās, mikrogriezumus inkubēja ar primārām antivielām – peles Anti-FLAG (M2) monoklonālās antivielas (1:200) (*Sigma-Aldrich*, kat. nr. F3165), kas atšķaidītas bloķēšanas buferšķīdumā, 1 h 10 min istabas temperatūrā. Pēc inkubēšanas mikrogriezumus skaloja trīs reizes pa 3 min ar mazgāšanas buferšķīdumu. Pēc skalošanas paraugus inkubēja ar sekundārām antivielām – kazas Anti-peles IgG (H+L) Alexa-488 (1:400) (*Life Technologies*, kat.nr. A-11029), kas atšķaidītas bloķēšanas šķīdumā, 1 h istabas temperatūrā. Paraugi tika atmazgāti no antivielām, skalojot tos trīs reizes pa 3 min ar mazgāšanas buferšķīdumu. Lai vizualizētu peroksidāzes pozitīvas šūnas, audzēju mikrogriezumi tika inkubēti ar 1X DAB/Metāla koncentrātu 15 min un skaloti trīs reizes pa 3 min ar mazgāšanas buferšķīdumu. Lai krāsotu paraugus ar hematoksilīnu, slaidi divas reizes tika skaloti ar destilētu ūdeni un inkubēti ar hematoksilīnu 1–2 min istabas temperatūrā. Pēc krāsošanas slaidi tika atkal skaloti ar destilētu ūdeni un mazgāšanas buferšķīdumu.

2.2.23. TS/A mikrogriezumu fiksētu acetonā imūnhistokīmijas analīze

Paraugu mikrogriezumi, kas fiksēti acetonā, tika ieslēgti ar Dako Pen zīmuļa šķīdumu un 30 sek mazgāti 1X PBS/0,1% Tween-20 šķīdumā. Lai bloķētu dabīgas peroksidāzes aktivitāti, fiksētie TS/A mikrogriezumi tika inkubēti ar peroksidāzes supresoru 30 min istabas temperatūrā. Paraugu slaidi no peroksidāzes supresora tika skaloti vienu reizi ar 1X PBS/0,1% Tween-20 šķīdumu 30 min istabas temperatūrā. Pēc skalošanas, mikrogriezumus inkubēja ar primārām antivielām – žurkas Anti-CD68 (1:400) (*Acris*, kat. nr. SM1550PS), žurkas Anti-peles 1B8 (SI-CLP) (1:200) (*Elisabeta Kemmer dāvinājums, Minhene, Vācija*) vai truša RS1 Anti-GST-HSTAB1-CT (Stabilīna-1) (1:800) (*Prof. Dr. J. Kzhyshkowska dāvinājums, Heidelbergas universitāte, Vācija*), kas atšķaidītas 1X PBS/0,1% Tween-20 šķīdumā, 1 h istabas temperatūrā, pēc kā skaloja divas reizes pa 5 min 1X PBS/0,1% Tween-20 šķīdumā. Pēc skalošanas paraugus inkubēja ar attiecīgām sekundārām antivielām – kazas Anti-žurkas IgG (Fc) poliklonālās antivielas iezīmētas ar mārrotku peroksidāzi (HRP) (1:400) (*Thermo Scientific*, kat. nr. 31475), kazas Anti-žurkas IgG poliklonālās antivielas iezīmētas ar mārrotku peroksidāzi (HRP) (1:400) (*Santa Cruz Biotechnology*, kat. nr. sc-2303) vai kazas Anti-truša IgG (H+L) poliklonālās antivielas iezīmētas ar mārrotku peroksidāzi (HRP) (*Thermo Scientific*, kat. nr. 31460), kas atšķaidītas 1X PBS/0,1% Tween-20 šķīdumā, 1 h istabas temperatūrā. Paraugi tika atmazgāti no antivielām, skalojot tos trīs reizes pa 5 min 1X PBS/0,1% Tween-20 šķīdumā. Lai vizualizētu peroksidāzes pozitīvas šūnas, audzēju mikrogriezumi tika inkubēti ar Dako AEC substrāta-hromogēnu 15 min istabas temperatūrā.

Mikrogriezumi atkārtoti vienu reizi skaloti ar 1X PBS/0,1% Tween-20 šķīdumu. Lai atbrīvotos no nevēlamā kontrastējošā fona, izmanto hematoksilīna un inkubē griezumus 30 sek istabas temperatūrā. Pēc krāsošanas slaidi tika skaloti ar destilētu ūdeni. Mikrogiezumiem pievienots viens piliens Dako krāsošanas vide un tie pārklāti ar segstikliņiem.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

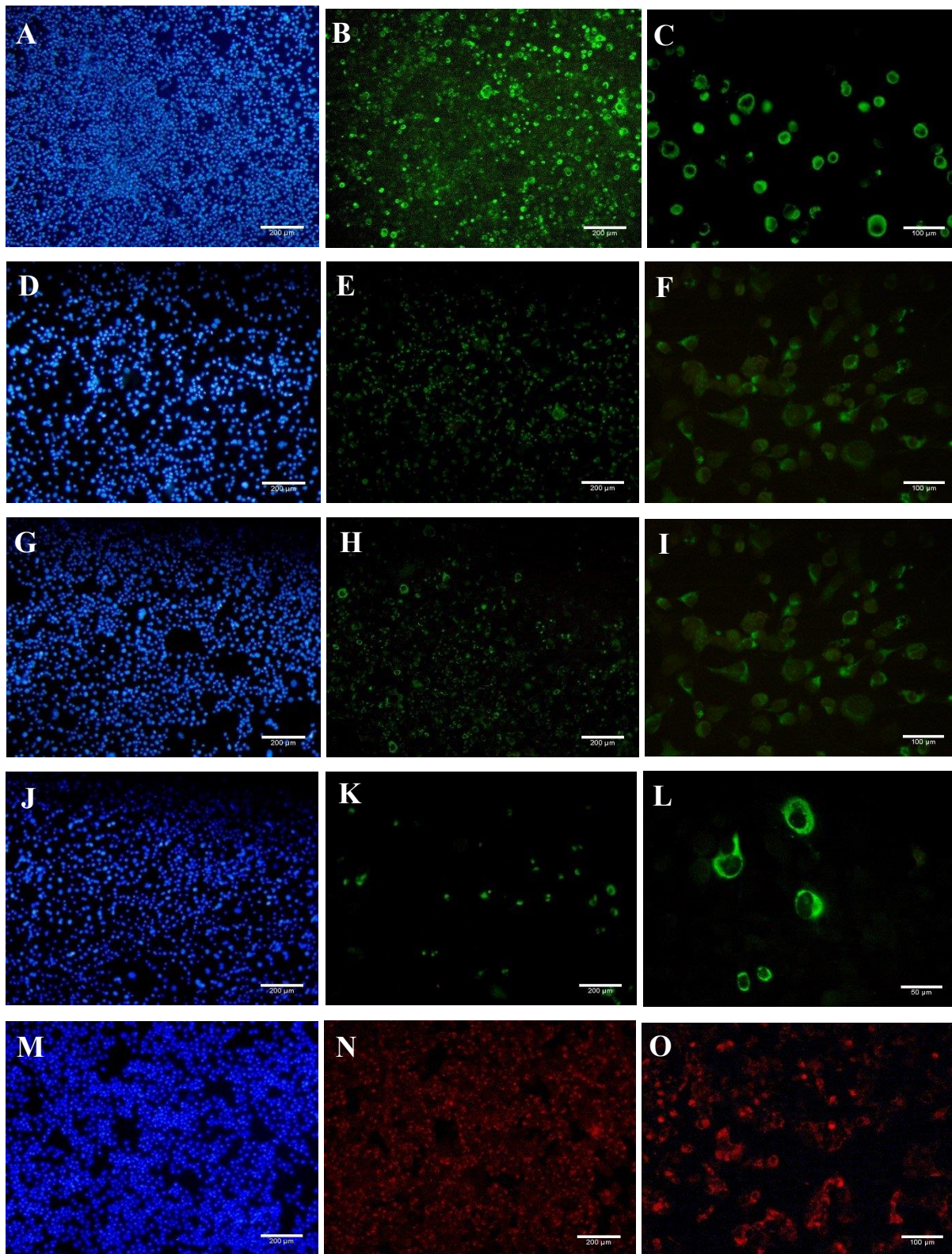
3.1. Rekombinanta alfavīrusu vektora rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG konstrukcija un vīrusu vektoru vadīta *SI-CLP* gēna ekspresija *in vitro*.

Alfavīrusu vektoriem piemīt augsta replikācijas spēja zīdītāju šūnu kultūrās un augsts transgēna ekspresijas līmenis, kas padara tos par daudzsološiem aģentiem audzēju terapijā (Quetglas et al. 2010). Darbā tika analizēta alfavīrusu SFV un SIN vektoru vadīta hitināzei-līdzīgā *SI-CLP* gēna un kontroles SFV vektora vadīta *Luc* gēna ekspresijas efektivitāte BHK-21 un krūts vēža TS/A šūnu līnijās. Izmantoti gatavi sekojoši peles (*m – mouse*) un cilvēka (*h – human*) *SI-CLP* gēna saturoši alfavīrusu vektoru konstrukti – SIN-Rep5-mSI-CLP+FLAG, SIN-nspSer-mSI-CLP+FLAG un SIN-nspSer-hSI-CLP+FLAG. Lai SFV ekspresētu peles *SI-CLP* gēnu, tika izmantota pSFV1/Enh.mSI-CLP plazmīda, kura kalpoja rekombinantā alfavīrusa rekSFV1/Enh.mSI-CLP izveidē, kā aprakstīts sadaļā “Materiāli un Metodes”.

Izmantojot iepriekš pārbaudītu kontroles alfavīrusa vektoru rekSFV1/Enh.Luc (Vasilevska et al. 2012), tika uzrādīts augsts *Luc* gēna ekspresijas līmenis BHK-21 šūnu kultūrā. Līdz ar to, BHK-21 kalpoja kā kontroles šūnu līnija, lai pārbaudītu alfavīrusu vektoru spēju inficēt šūnas un ekspresēt *SI-CLP* gēnu. Pētījumos ir parādīts, ka BHK-21 šūnas *in vitro* transficējot ar alfavīrusiem, veidojas augsts vīrusa titrs ($10^9 - 10^{10}$ *i. u./ml*) (Lundstrom 2003). Tādēļ šūnas tika inficētas ar transgēna saturošiem vektoriem, no kuriem citopātiski ir rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG un SIN-Rep5-mSI-CLP+FLAG vektori, bet necitopātiski ir SIN-nspSer-mSI-CLP+FLAG un SIN-nspSer-hSI-CLP+FLAG vektori. Aptuveni 16 h pēc šūnu infekcijas sekoja imūnohistoķīmiskā analīze ar antivielām, kas atpazīst FLAG sekvenci. Visu vektoru gadījumā tika detektēta pozitīva *SI-CLP* gēna ekspresija un lokalizācija šūnu citoplazmā (12. attēls). Kontroles vektora imūnohistoķīmijas analīzē tika izmantotas anti-SFV antivielas.

Mikroskopējot tika noteikts, ka gēna *SI-CLP* ekspresijas līmenis viszemāk detektējams ar vektoru SIN-nspSer-mSI-CLP+FLAG. Tas skaidrojams ar to, ka vektors ir necitopātisks, kā rezultātā tā replikācijai šūnās ir nepieciešams ilgāks laika posms (Plesa et al. 2006). Neskatoties uz to, ka necitopātiski vektori šūnās nodrošina ilgāku transgēna ekspresiju un augstāku vektora stabilitāti, ir noskaidrots, ka šo vektoru transgēna ekspresijas līmenis ir zems. Tas var sasniegt pat tikai četrus procentus no citopātiskā vektora gēna ekspresijas līmeņa (Casales et al. 2008). Zema transgēna ekspresija varēja būt atkarīga arī no tā, ka, iespējams, izmantotais vīrusa vektora titrs bija salīdzinoši zemāks nekā pārējiem vektoriem. Savukārt, necitopātiskais vektors SIN-nspSer-hSI-CLP+FLAG uzrādīja aptuveni vienlīdz

augstu transgēna *SI-CLP* ekspresiju ar citopātisko vektoru SIN-Rep5-mSI-CLP. Tas varētu būt saistīts ar to, ka infekcijai izmantotais šūnu daudzums vai vīrusa titrs necitopātiskā alfavīrusa vektora gadījumā varēja būt lielāks nekā citopātiskā vīrusa vektora gadījumā.



12. attēls. SFV un SIN vektoru saturošā *SI-CLP* un *Luc* gēna ekspresijas imunohistoķīmiska analīze, izmantojot antivielas, kas atpazīst FLAG sekvenci. Kontrolas vektora gadījumā tika izmantotas anti-SFV antivielas. A, B, C – rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG vektors

(citopātiskais vektors); D,E,F – SIN-Rep5-mSI-CLP+FLAG vektors (citopātiskais vektors); G, H, I – SIN-nspSer-hSI-CLP+FLAG vektors (necitopātiskais vektors); J, K, L – SIN-nspSer-mSI-CLP+FLAG (necitopātiskais vektors); M, N, O – rekSFV1/Enh.Luc vektors; mSI-CLP – peles SI-CLP gēns (m – *mouse*); hSI-CLP – cilvēka SI-CLP gēns (h – *human*).

Figure 12. Immunohistochemistry analysis of SFV and SIN vectors consisting *SI-CLP* and *Luc* genes using antibodies against FLAG sequence. Anti-SFV antibodies were used for control vector detection. A, B, C – rekSFV1/Enh.SI-CLP+FLAG vector (cytopathic vector); D,E,F – SIN-Rep5-SI-CLP+FLAG vector (cytopathic vector); G, H, I – SIN-nspSer-SI-CLP+FLAG human gene vector (non-cytopathic vector); J, K, L – SIN-nspSer-SI-CLP+FLAG mouse gene vector (non-cytopathic vector); M, N, O – rekSFV1/Enh.Luc vector; mSI-CLP – mouse SI-CLP gēns (m – *mouse*); hSI-CLP – human SI-CLP gēns (h – *human*).

Abiem necitopātiskiem vektoriem, kuru gadījumā atšķirās transgēna *SI-CLP* saimniekorganisms, mikroskopējot redzams, ka gēna ekspresijas līmenis ir zemāks nekā citopātiskajiem vektoriem.

Visaugstākā gēna *SI-CLP* ekspresija vērojama šūnas transficējot ar vektoru rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG. Pēc literatūras datiem, BHK-21 šūnu kultūrā SFV vektoriem vērojama augstāka transdukcijas efektivitāte un transgēna ekspresijas līmenis nekā SIN vektoriem (Wahlfors et al. 2000), kas izskaidro gēna ekspresijas līmeņa atšķirības. Tādēļ, lai noskaidrotu *SI-CLP* gēna ekspresiju krūts vēža TS/A šūnu kultūrā, tika veikta šūnu inficēšana ar rekSFV1/Enh.mSI-CLP vektoru, kam sekoja imūnhistoķīmiskā analīze, izmantojot antivielas, kas atpazīst FLAG sekvenci. Kā kontrole kalpoja vektors rekSFV1/Enh.Luc, kas tika detektēts ar anti-SFV antivielām. Iegūtie rezultāti tika salīdzināti ar kontroles šūnu līniju BHK-21 (attēli darbā netiek uzrādīti). Krūts audzēja TS/A šūnu līnija konstruētā vektora gadījumā uzrādīja zemāku transgēna *SI-CLP* ekspresijas līmeni nekā tas bija novērojams kontroles BHK-21 šūnu līnijā, tādēļ, ka BHK-21 šūnām transficētām ar alfavīrusiem raksturīga aptuveni 100% transfekcijas efektivitāte (Robinson et al. 2003). Arī citos pētījumos tika rādīts, ka alfavīrusa infekciozitāte un tā ekspresijas līmenis dažādās šūnu līnijās ir atšķirīgs (Rodriguez-Madoz et al. 2007), līdz ar to tiek pieņemts, ka alfavīrusu vektoriem piemīt specifiska transfekcija un replikācija audzēja šūnās (Piver et al. 2005). Alfavīrusiem piemīt spēja inficēt šūnas, kuras atrodas atšķirīgā bioķīmiskā un ģenētiskā vidē (Kononchik et al. 2011). Tomēr vīrusa infekciozitāte un tā ekspresijas līmenis dažādās šūnu līnijās ir atšķirīgs (Rodriguez-Madoz et al. 2007). Nav pieejama pietiekoši liela informācija par alfavīrusu vektoru mijiedarbību ar šūnām, kā arī ar šūnu intracelulārajiem faktoriem un virsmas marķieriem, kas modulē alfavīrusu iekļūšanu šūnā un replikāciju. Dažādos pētījumos ir informācija, ka alfavīrusi izmanto šūnu-mediētu endocitozi, pateicoties pāris proteīniem, kuri varētu iesaistīties vīrusa absorbcija/transdukcija. Šie proteīni ir, piemēram, heparīna

sulfāts (Smit et al. 2002), laminīna receptors (Wang et al. 1992), MHC (Helenius et al. 1978), C-tipa lektīna receptori (*DC-sign*, *L-sign*) (Klimstra et al. 2003), karstuma šoka proteīna-70 (Ryan et al. 1992), $\alpha 1\beta 1$ integrīns (La Linn et al. 2005) un citi. Visticamāk, ka alfavīrusi varētu izmanto vairākus proteīnus kā receptorus vai alternatīvus ceļus, lai iekļūtu dažādās šūnās. Būtiski, ka laminīna receptors ir augsti ekspresēts uz audzēja šūnām (Rodriguez-Madoz et al. 2007), tādēļ ir parādīts, ka, piemēram, alfavīrusu SIN vektorus ievadot pelēs, tie ātri spēj sasniegt audzēja šūnas (Tseng et al. 2004).

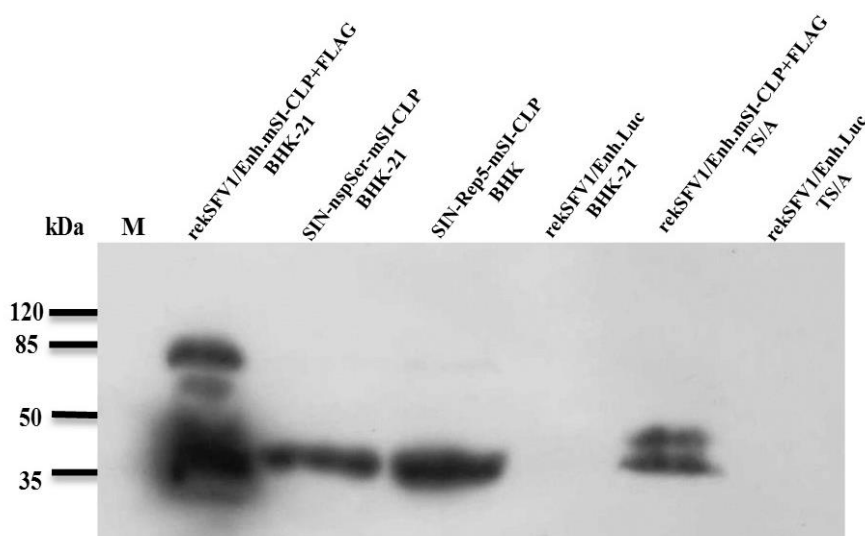
Lai ar mikroskopu detektētu augstāku transgēna ekspresijas līmeni šūnu citoplazmā, būtu nepieciešams uzlabot alfavīrusu vektoru kvalitāti. Tas būtu veicams, uzlabojot vīrusa produktivitāti, kuru ietekmē *in vitro* transkribētās RNS kvalitāte un daudzums, kā arī elektroporācijas efektivitāte. Pētījumi parāda, ka vektora ekspresiju šūnās ietekmē arī alfavīrusu vektoru stabilitāte, kas atkarīga no vektora lieluma un transgēna garuma. Lielāka izmēra vektori ir mazāk stabili un tiem ir zemāka ekspresija, līdz ar to, transgēna produkcija (Quetglas et al. 2010). Transgēna ekspresijas līmenis šūnās paaugstināsies, ja papildus tiks pagarināts šūnu infekcijas laiks ar alfavīrusu vektoriem. Ir zināms, ka vislielāko transgēna ekspresiju iespējams detektēt 24 h laikā pēc infekcijas, tomēr pēc 24 h pozitīvo šūnu skaits strauji samazinās, jo citopātisko vektoru gadījumā, šūnas iet bojā no inducētās apoptozes (Wahlfors et al. 2000). Pēc tā var secināt, ka alfavīrusu ekspresijas vektori ir aktīvi, spējīgi piegādāt un augstā līmenī ekspresēt hitināzei-līdzīgo *SI-CLP* gēnu, lai gan tas notiek ar atšķirīgu efektivitātes līmeni.

3.2. Alfavīrusu rekSFV1/Enh.mSI-CLP un rekSFV1/Enh.Luc vadīta transgēnu pārbaude proteīnu līmenī.

Pēc gēna *SI-CLP* detektētās ekspresijas sekoja gēna pārbaude proteīnu līmenī. Tas tika veikts BHK-21 un krūts audzēja TS/A šūnas inficējot ar *SI-CLP* gēna saturošiem SFV un SIN vektoriem. Kā negatīvā kontrole kalpoja vektors rekSFV1/Enh.Luc. Lai noskaidrotu, cik daudz *SI-CLP* proteīna producējas 16 h laikā pēc infekcijas, tika savākta pētāmo šūnu kultūru barotnes un lizāti. Iegūtie paraugi pārbaudīti ar Western blot metodi, izmantojot antivielas, kas atpazīst FLAG sekvenci (13. attēls).

BHK-21 un TS/A šūnu lizātu paraugos visu vektoru gadījumā tika detektēta proteīna *SI-CLP* ekspresija, kura molekulārā masa atbilst 39 kDa. Visaugstākā proteīna produkcija detektēta BHK-21 šūnu kultūrā ar rekombinanto alfavīrusa vektoru rekSFV1/Enh.mSI-CLP, līdzīgi kā tika noteikts pēc gēna ekspresijas līmeņa. Augsto proteīna produkciju papildus

ietekmē gēnam pievienotā enhancera sekvenca, kas paaugstina tā sintēzes daudzumu aptuveni 10 reizes (Yáñez-Cuna et al. 2014).



13. attēls. SI-CLP proteīna ekspresijas analīze BHK-21 un krūts vēža TS/A šūnu kultūru lizātos pēc to inficēšanas ar SFV un SIN vektoriem. Proteīna detekcija veikta ar Western blot metodi, izmantojot antivielas pret FLAG sekveni. M – marķieris; kDa – kilodaltoni.

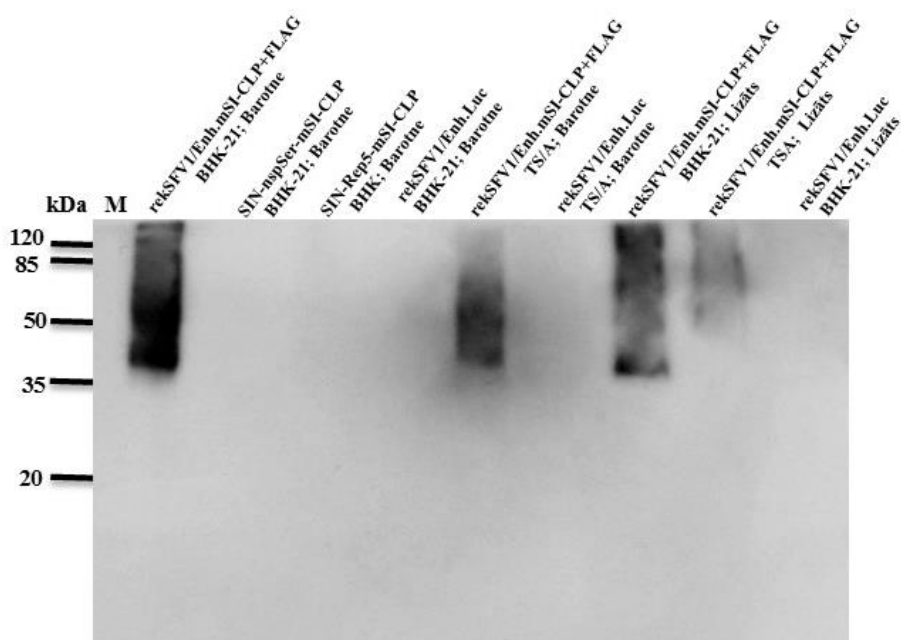
Figure 13. Expression analysis of protein SI-CLP in BHK-21 and breast cancer TS/A cell culture lysates after infection with SFV and SIN vectors. Protein detection performed by Western blot method using antibodies against the FLAG sequence. M – marker; kDa – kilodaltons.

Tika detektēts, ka TS/A šūnu kultūras lizātos SI-CLP proteīna daudzums ir zemāks nekā BHK-21 kultūrā. Tas izskaidrojams ar to, ka alfavīrusiem raksturīga 100% spēja inficēt BHK-21 šūnas atšķirībā no audzēja šūnām, tādēļ arī producētā un sekretētā proteīna daudzums audzēja šūnās attiecīgi būs zemāks.

Jāatzīmē, ka no abām šūnu kultūrām iegūtie lizāti, kuri tika inficēti ar vektoru rekSFV1/Enh.mSI-CLP, uzrādīja vairāk kā vienu detektējamu zonu. Līdz šim ir parādīts, ka proteīna SI-CLP veidotās izoformas var būt šūnu līniju specifiskas, līdz ar to, SDS-PAGE uzrādot divas joslas ar neliela izmēra starpību – 33 kDa un 39 kDa. Ja gēns satur papildus FLAG sekveni, tad inficējot šūnas, proteīna ekspresija var uzrādīt nelielu lielāku proteīna molekulu, aptuveni, zem 50 kDa (Kzhyshkowska et al. 2006). Tā kā BHK-21 kultūras lizāti pēc infekcijas ar SIN ekspresijas vektoriem analīzē uzrādīja tikai vienu ekspresijas zonu, tad vairāku zonu detektēšana varētu būt saistīta ar konkrēto SFV vektoru. Iespējams, ka pēc proteīna denaturācijas veidojusies proteīna renaturēšanās, vai arī vektors šķēļoties palicis daļēji saistīts ar enhancera un FLAG sekveni.

Ņemot vērā, ka SFV ekspresijas vektors satur peles transgēnu un TS/A ir peles krūts vēža šūnu kultūra, tad nerodas papildus ekspresijas zonas, kā tas ir BHK-21 kultūras gadījumā. Varētu pieņemt, ka peles gēna ekspresijas vektoram sintēze Sīrijas kāmjū mazuļu nieru šūnu līnijā notiek specifiski.

No šūnu barotnes netika detektēta pozitīva proteīna SI-CLP produkcija, tādēļ veicām šūnu barotnes un lizāta imunoprecipitāciju. Pēc imunoprecipitācijas atkārtoti veikts Western blot, izmantojot SI-CLP proteīna detekcijai specifiskas antivielas 1B8 (14. attēls).



14. attēls. SI-CLP proteīna ekspresijas analīze BHK-21 un krūts vēža TS/A šūnu kultūru barotnēs un lizātos pēc to inficēšanas ar SFV un SIN vektoriem. Proteīna detekcija veikta ar Western blot metodi, izmantojot antivielas pret SI-CLP proteīnu (1B8). M – marķieris, kDa – kilodaltoni.

Figure 14. Expression analysis of protein SI-CLP in BHK-21 and breast cancer TS/A cell culture medium and lysates after infection with SFV and SIN vectors. Protein detection performed by Western blot method using antibodies against SI-CLP protein (1B8). M – marker; kDa – kilodaltons.

Pēc attēla var noteikt, ka proteīns SI-CLP ir detektējams tikai BHK-21 un TS/A šūnu barotnēs un lizātos, kas inficēti ar vektoru rekSFV1/Enh.mSI-CLP. Proteīna ekspresija šūnu lizātos salīdzinājumā ar šūnu barotni ir aptuveni uz pusi zemāka. Tas izskaidrojams ar to, ka vektors ir citopātisks, tādēļ proteīna sintēzes laikā šūna iet bojā un tās satur lielākoties nonāk šūnu barotnē. Vektora citopātiskais efekts vērojams 12. attēlā BHK-21 šūnām, kurām ir mainījusies morfoloģija – tās ir kļuvušas apaļas, kas liecina par vīrusa inducētu šūnu apoptozi.

Proteīna SI-CLP sekrēcija nav novērojama ar SIN vektoru inficētajos šūnu paraugos, kas varētu būt saistīts ar nelielo sekretēto proteīna daudzumu, kas apgrūtina tā detekciju. Lai uzlabotu detekciju, būtu nepieciešams lielāks pārbaudāmā parauga daudzums, ilgāks Western blot metodē izmantotās membrānas ekspozīcijas laiks vai ilgāka citopātiskā efekta indekcija, kuras laikā palielinātos sintezētā proteīna daudzums gan šūnu barotnē, gan lizātos. Apskatot 12. attēlu vērojams, ka BHK-21 šūnām inficētām ar SIN vektoriem citopātiskais efekts ir palēnināts, jo šūnu morfoloģija nav izmainījusies.

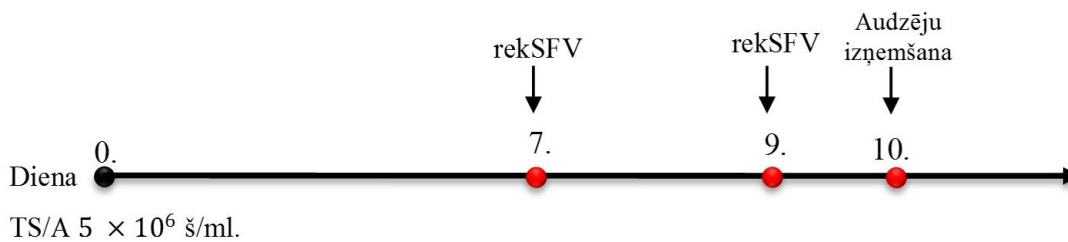
Vektora rekSFV1/Enh.Luc sekretētais proteīns Luc kalpoja kā negatīva kontrole, tādēļ paraugi uzrādīja negatīvu SI-CLP proteīna sekrēciju gan šūnu barotnes, gan lizātu paraugos, kas apstiprināja antivielu 1B8 specifiskumu sekretētajam SI-CLP proteīnam.

3.3. Alfavīrusa rekSFV1/Enh.mSI-CLP ekspresija peļu krūts vēža modelī *in vivo*

TS/A ir peļu krūts vēža modelis, kas ļoti ātri veido metastāzes BALB/c pelēs (Giducci et al. 2004). Tā kā *in vitro* pētījumos šūnas inficētas ar alfavīrusu vektoru rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG uzrādīja augstāko *SI-CLP* gēna ekspresiju un proteīna analīzē tikai ar šo vektoru tika detektēta proteīna sekrēcija, tad bija interesanti pārbaudīt vektora inficēšanas spēju un gēna terapeitisko efektu krūts vēža TS/A šūnu modelī *in vivo*. Lai peļu organismā iegūtu audzējus, pelēm tika veikta zemādas injekcija ar TS/A šūnām (5×10^6 šūnas/ml). Septiņu dienu laikā šūnu injekcijas vietā tika konstatēti izveidojušies audzēji ar vidējo apjomu 2,2 cm³. Pirms terapijas sākuma audzēji tika nomērīti.

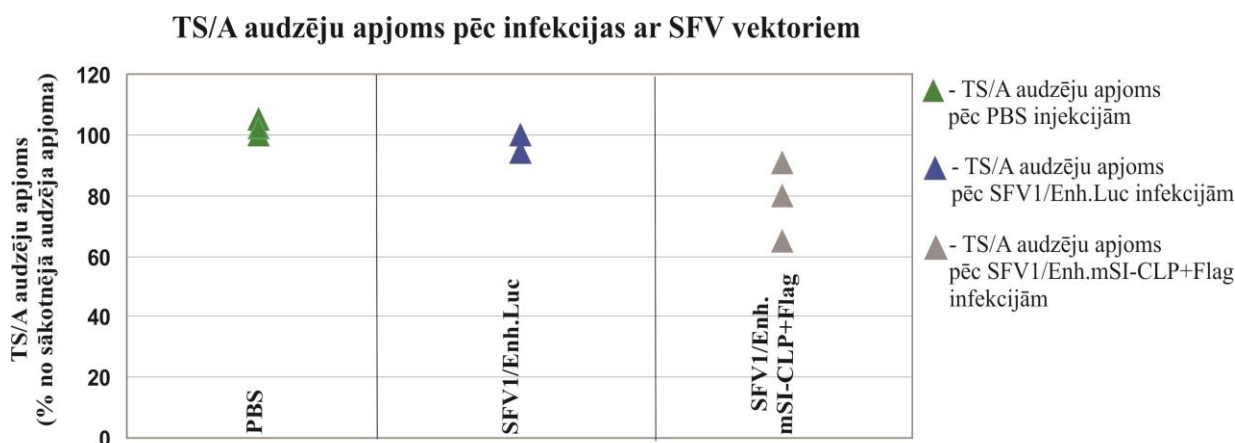
Lai krūts audzēja TS/A modelī noteiktu *SI-CLP* gēna terapeitisko ietekmi, pētījumā tika izmantotas deviņas BALB/c peles ar izveidojušiem metastazējošiem audzējiem. *In vivo* eksperimentam peles tika sadalītas trīs apakšgrupās, katra no peļu apakšgrupām tika divas reizes intratumorāli (*intratumoral* – *it*) injicētas ar koncentrētiem alfavīrusu vektoriem rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG un rekSFV1/Enh.Luc ar titru $5,7 \times 10^7$ v. d vai PBS. Pirmā *it* injekcija veikta septītajā dienā pēc audzēja šūnu ievadīšanas, bet otrā *it* injekcija veikta devītajā dienā (15. attēls). 24 h pēc atkārtotas injekcijas, peļu krūts TS/A audzēji tika nomērīti un izņemti. Tie tika sasaldēti šķidrā slāpēlī un uzglabāti -80 °C tālākai analīzei.

Iegūtie dati par audzēju apjomu tika salīdzināti savā starpā – pirms terapijas un pēc divām *it* injekcijām (16. attēls).



15. attēls. rekSFV vīrusa ievadīšanas shēma metastazējošos krūts TS/A audzēju modeļos.

Figure 15. Administration scheme of rekSFV virus in metastasizing breast TS/A tumor models.



16. attēls. Peles krūts TS/A audzēju apjoms pēc divām *it* injekcijām ar rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG vektoru, rekSFV1/Enh.Luc vektoru un PBS.

Figure 16. Mouse mammary TS/A tumor volume after two *it* injection with rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG vector, rekSFV1/Enh.Luc vector and PBS.

Iegūtie rezultāti pēc TS/A audzēju atkārtotas *it* injekcijas jeb reinjekcijas ar PBS uzrādīja audzēju apjoma nelielu palielināšanos vai nemainīgu audzēja izmēru, kas kalpoja kā kontrole. Pēc *it* reinjekcijas ar rekSFV1/Enh.Luc vērojams, ka audzēju apjomi samazinājās aptuveni par 10%. Tas izskaidrojams ar to, ka vīrusam piemīt citotoksicitāte un injekcijas vietā tas inducē audzēja šūnu apoptozi. Vīrusa izraisītā apoptoze varētu novest pie audzējam specifisko antigēnu atbrīvošanas, ko uzņemtu antigēnu prezentējošās šūnas, kā makrofāgi un dendrītiskās šūnas, veicinot audzēja regresiju (Rodriguez-Madoz et al. 2005).

Pēc audzēju *it* reinjekcijas ar alfavīrusa vektoru rekSFV1/Enh.mSI-CLP vērojams, ka audzēju augšana tika kavēta un to apjomi strauji samazinās, aptuveni, par 10-40%, salīdzinot ar audzējiem pirms terapijas pielietošanas. Ja audzēja samazināšanās balstītos tikai uz alfavīrusa spēju inducēt šūnu apoptozi, tad, līdzīgi, kā ar rekSFV1/Enh.Luc vīrusu, izmēra samazināšanās būtu neliela un nepietiekoša, lai inducētu audzēja regresiju. Iegūtie rezultāti

liecina par to, ka, veicot divas *it* injekcijas ar rekSFV1/Enh.SI-CLP+FLAG vīrusu, tiek iegūta audzēju izmēru samazināšanās, kas norāda uz vektorā ieklonētā *SI-CLP* gēna terapeitisko efektu. Tomēr literatūrā ir pieejami pretrunīgi dati par *SI-CLP* gēna iespējamo terapeitisko efektu organismā.

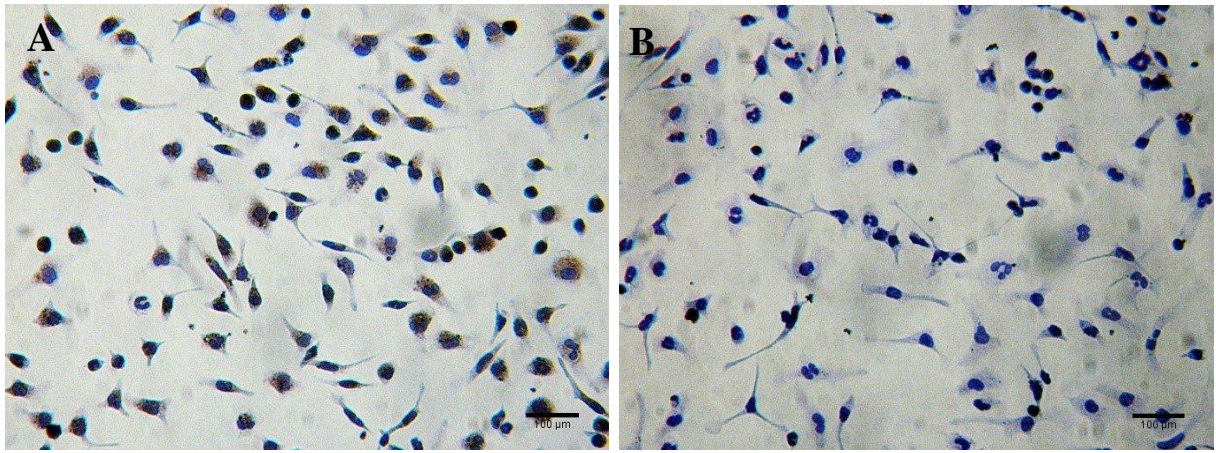
Pētot reimatoīdo artrīdu, autori savā pētījumā uzrāda, ka SI-CLP proteīnu regulē gan Th1, gan Th2 asociētie citokīni, norādot uz to, ka proteīns ir iesaistīts kā iekaisuma procesos, tā arī iekaisuma nomākšanā (Xiao et al. 2014). Literatūra liecina, ka SI-CLP proteīns tiek sekretēts, pateicoties stabilīna-1 receptoram, kas, galvenokārt, atrodas uz audzēja progresiju veicinošajiem M2 tipa makrofāgiem. Tā kā audzēju mikrovidē M2 tipa makrofāgu loma ir audzēju aizsargāt un veicināt metastāžu veidošanos (Kzhyshkowska 2010), tad varētu secināt, ka SI-CLP proteīna loma ir saistīta ar audzēja imunitāti un progresiju. Tomēr pētījumi parāda, ka pēc *SI-CLP* gēna intraperitonālas (*intraperitoneal – ip*) injekcijas pelēs, *in vivo* apstākļos tika veicināti iekaisuma procesi, tādējādi norādot pretējo, ka SI-CLP spēlē svarīgu lomu ar iekaisuma saistīto citokīnu produkcijā makrofāgos (Xiao et al. 2014).

Pierādīts, ka, lai palielinātu audzēja inhibēšanās efektu, ir jāpalielina audzējā injicējamā vektora doza, kā arī jāveic trīs injekcijas, vēlams 48 h intervālā, tādējādi paaugstinot terapeitisko efektu un audzēja regresiju. Tomēr jāazīmē, ka izmantojot mazāku injicējamu alfavīrusu vektoru doza, palielinās bioloģiskā drošība, bet atkārtoto injekciju gadījumā organismā varētu rasties imūnā atbilde pret pašu vektoru, inhibējot tā terapeitisko efektu (Rodriguez-Madoz et al. 2005).

Līdzīgos eksperimentos, izmantojot alfavīrusu SFV ar tajā ieklonētu citokīnu IL-12 parādīts, ka pēc krūts audzēja 4T1 *it* injekcijas pilnīga audzēju izzušana iegūta 18-22 dienu laikā pēc terapijas sākuma (Chikkanna-Gowda et al. 2005). Tā kā *in vivo* eksperimentā audzēji pelēm tika izņemti 3 dienas pēc terapijas sākuma, uzrādot jau aptuveni 10-40% izmēra samazinājumu, tad varētu pieņemt, ka pēc ilgākas terapijas audzēji sasniegtu pilnīgu regresiju.

3.4. No BALB/c pelēm izdalīto makrofāgu analīze

M2 tipa makrofāgi sastāda lielāko daļu no krūts audzēja šūnu masas un, pateicoties to īpašībām, tie ir galvenie vēža augšanas, progresijas un metastāžu veicinātāji (Zhang et al. 2014). Lai pārbaudītu antivielu specifiskumu pret makrofāgiem raksturīgo virsmas marķieri CD68, šūnas tika izdalītas no BALB/c pelu vēdera dobuma un tika veikta imūnkrāsošana (17. attēls).



17. attēls. Makrofāgu imūnhistoķīmiskā analīze. A – makrofāgi izdalīti no BALB/c pelēm un imūnhistoķīmiski krāsoti, izmantojot specifiskas makrofāgu antivielas CD68; B – negatīvā kontrole: makrofāgu šūnas bez imūnkrāsošanas ar CD68 antivielām; krāsotas ar hematoksilīnu.

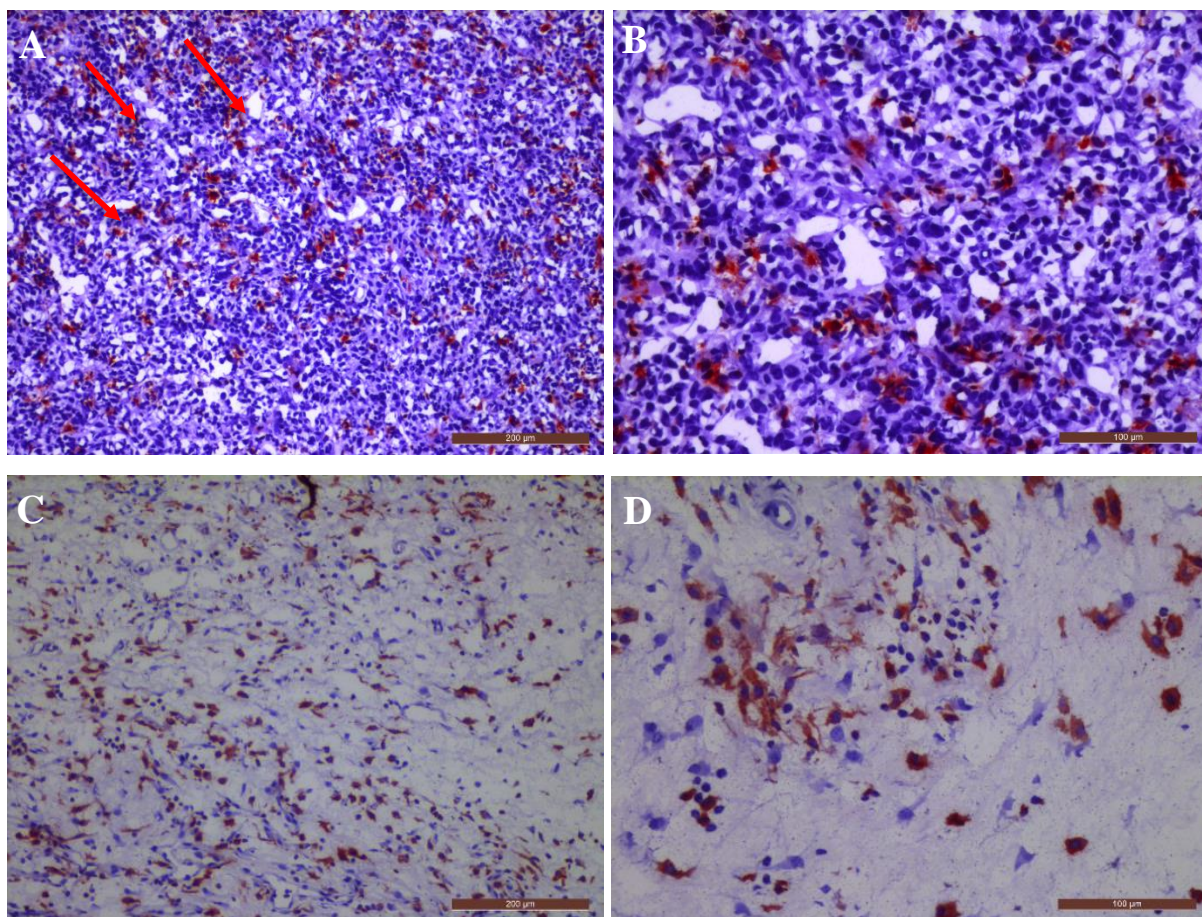
Figure 17. Immunohistochemical analysis of macrophages. A – Macrophages isolated from BALB/c mice and stained, using specific macrophages antibody CD68; B – negative control: macrophages without immunostaining with CD68 antibodies, stained with hematoxylin.

Pēc krāsojuma var spriest par to, ka ar hematoksilīnu ir iekrāsošies visu no BALB/c pelēm izdalīto šūnu kodolu hromatīni. Savukārt, pēc šūnu krāsošanas ar makrofāgu specifiskām antivielām, kas atpazīst virsmas marķieri CD68, redzams, ka tumša krāsā iekrāsojušās tikai noteiktas izdalītās šūnas, kas ir makrofāgi. No tā var spriest par antivielu specifiskumu konkrētām izdalītajām imūnsistēmas šūnām.

3.5. TS/A audzēju imūnhistoķīmiskā analīze

Pēc makrofāgu izdalīšanas un imūnkrāsošanas ar antivielām pret-CD68 marķieri, tika veikta TS/A audzēju mikrogriezumu imūnhistoķīmiskā analīze. Analīzē izmantoti TS/A audzēji pēc divkārtas *it* injekcija ar vīrusa vektoriem rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG un rekSFV1/Enh.Luc, kam novērota audzēja apjoma samazināšanās. Lai audzēju mikrogriezumos detektētu makrofāgus, to virsmas receptoru stabilīnu-1 un terapeitisko proteīnu SI-CLP, tika izmantotas specifiskas antivielas.

Krūts vēža TS/A mikrogriezumos makrofāgu detektēšanai izmantotas iepriekš pārbaudītas specifiskas antivielas, kas atpazīst virsmas marķeri CD68 (18. attēls).



18. attēls. TS/A audzēja makrofāgu virsmas marķera CD68 imūnhistoķīmiskā analīze. Audzēja šūnas un imūnšūnas (violetā krāsā), makrofāgi (sarkanā krāsā). A, B – TS/A audzēju mikrogriezumi pēc divkārtšas *it* injekcijas ar vīrusa vektoru rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG. C, D – TS/A audzēju mikrogriezumi pēc divkārtšas *it* injekcijas ar vīrusa vektoru rekSFV1/Enh.Luc.

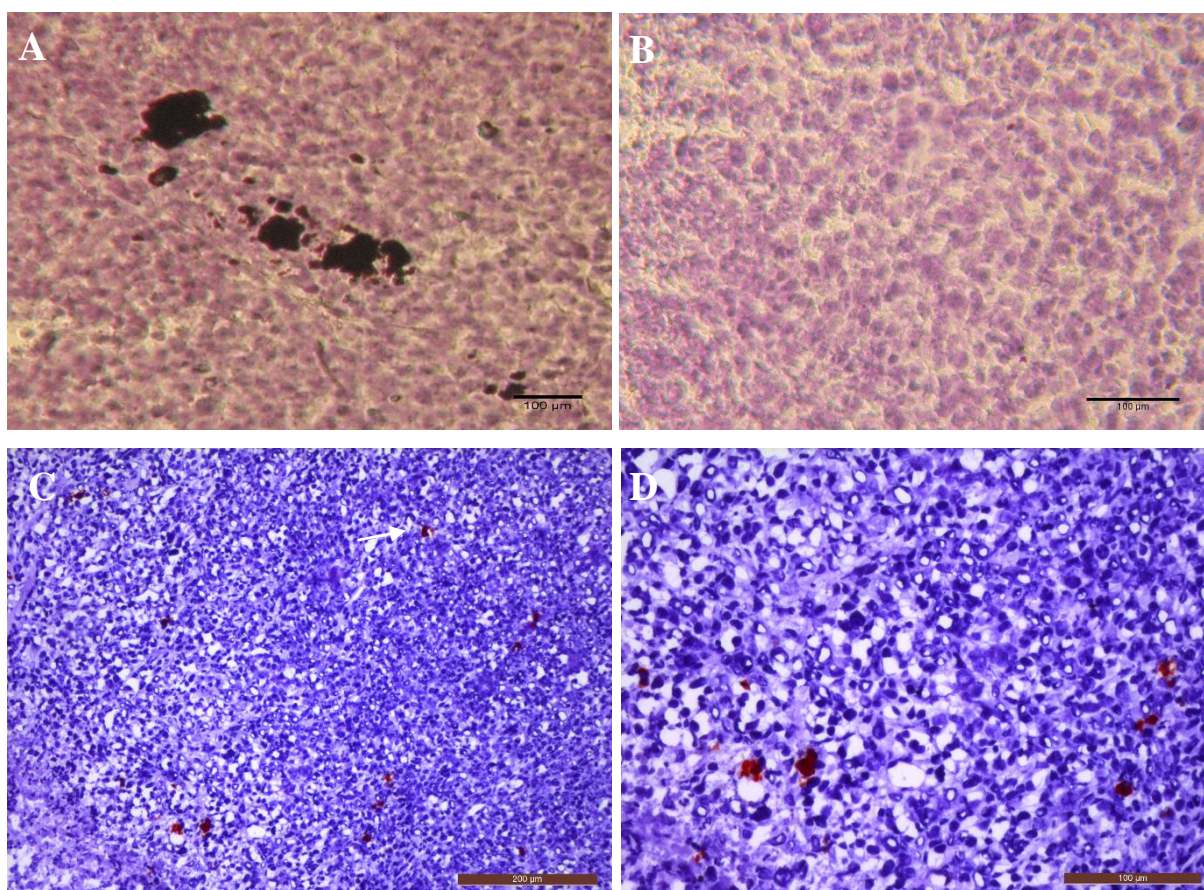
Figure 18. Immunohistochemistry analysis of tumor TS/A macrophage surface marker CD68. Tumor cells and immune cells (purple color), macrophage (red color). A, B – TS/A tumor microslides after double *it* injection with virus vector rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG; C, D – TS/A tumor microslides after double *it* injection with virus vector rekSFV1/Enh.Luc.

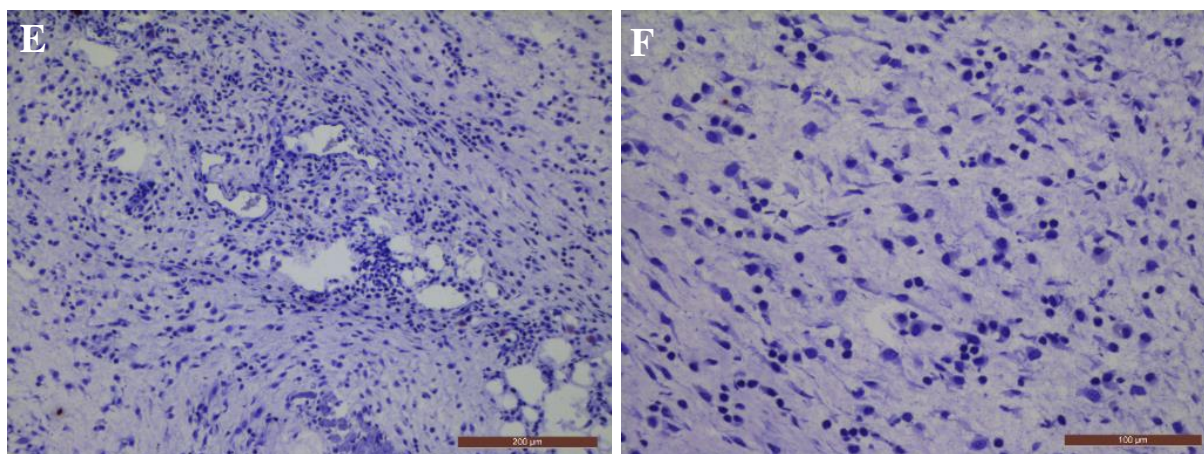
Astoņpadsmitajā attēlā ar bultiņām norādīts, ka pēc atkārtotas krūts TS/A audzēju injekcijas ar alfavīrusu rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG, vērojama makrofāgu kustība uz audzēja perifēriju. Pēc literatūras zināms, ka audzējos esošie makrofāgi nelielos daudzumos vidē sekretē SI-CLP proteīnu, pateicoties receptoram stabilīnam-1 (Kzhyshkowska 2010). Veicot divas *it* injekcijas ar vektora saturošo *SI-CLP* gēnu, vidē tiek pastiprināta proteīna sekrēcija, kas varētu veicināt iekaisuma makrofāgu jeb M1 tipa makrofāgu plūsmu uz audzēja mikrovidi. Pateicoties to spējai fagocitēt šūnas, būtu iespējama audzēja izmēra samazināšanās. Tā kā M1 makrofāgiem ir augstas antigēnu prezentēšanas spējas, tie varētu sekmēt imūnsistēmas aktivāciju, tādējādi cenšoties iznīcināt vēža šūnas. Krūts vēža TS/A regresija, iespējams, ir saistīta arī ar to, ka vektora sintezētais terapeitiskais SI-CLP proteīns saistās pie

makrofāgu virsmas, stimulējot makrofāgus audzēju mikrovidē izdalīt iekaisumu veicinošos citokīnus (Xiao et al. 2014). Balstoties uz to, ka audzēju mikrovidē atrodas audzēju asociētie makrofāgi, kas aizsargā audzēja šūnas no imūnsistēmas, tad varētu pieņemt, ka, pateicoties šiem izdalītajiem citokīniem, notiek makrofāgu polarizācijas maiņa no M2 tipa uz M1. Tādējādi, varētu izskaidrot audzēja izmēra samazināšanos BALB/c pelēs un atkārtoti pierādīt SI-CLP terapeitisko efektu krūts audzējā.

Veicot imūnhistoķīmisko analīzi TS/A audzēja mikrogriezumiem pēc divkārtas injekcijas ar rekSFV1/Enh.Luc, makrofāgi audzējā ir nevienlīdzīgi izkārtoti un nav novērojama to kustība uz perifēriju.

Lai specifiski noteiktu proteīna SI-CLP daudzumu audzējā pēc divkārtas *it* injekcijas, tika izmantotas anti-FLAG antivielas, kas atpazīst FLAG sekveni un specifiskas antivielas 1B8, kas atpazīst SI-CLP proteīnu (19. attēls).





19. attēls. TS/A audzējā sintezētā proteīna SI-CLP imūnhistoķīmiskā analīze, izmantojot proteīnam specifiskas antivielas 1B8 un antivielas pret FLAG sekvenci. Audzēja mikrovides šūnas (violetā krāsā), sintezētais proteīns SI-CLP (sarkanā krāsā). A – TS/A audzēja mikrogriezums pēc divkārtas *it* injekcijas ar vīrusa vektoru rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG, detekcija ar antivielām pret FLAG sekvenci; B – TS/A audzēja mikrogriezums pēc divkārtas *it* injekcijas ar vīrusa vektoru rekSFV1/Enh.Luc, detekcija ar antivielām pret FLAG sekvenci; C, D – TS/A audzēju mikrogriezumi pēc divkārtas *it* injekcijas ar vīrusa vektoru rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG, detekcija ar antivielām 1B8; E, F – TS/A audzēju mikrogriezumi pēc divkārtas *it* injekcijas ar vīrusa vektoru rekSFV1/Enh.Luc, detekcija ar antivielām 1B8.

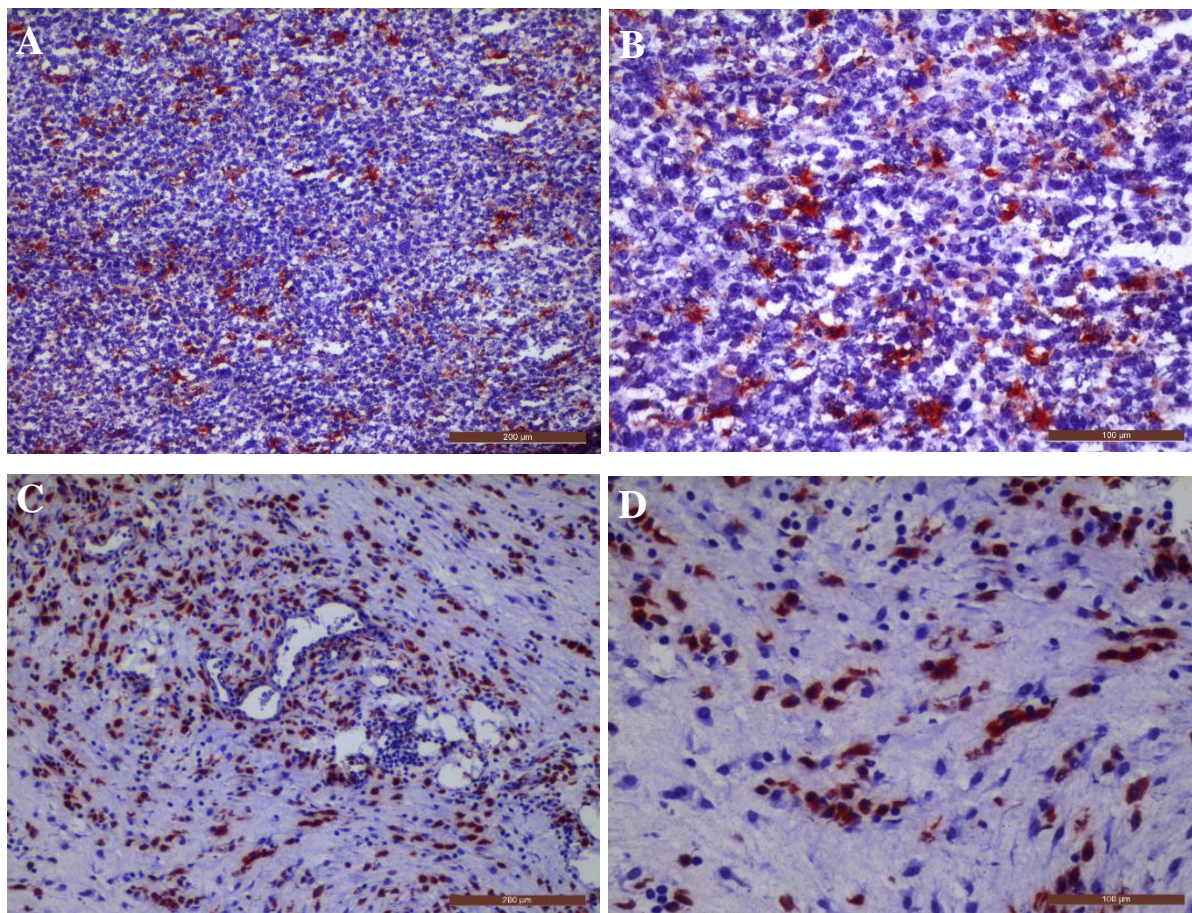
Figure 19. Immunohistochemistry analysis of protein SI-CLP synthesis in TS/A tumor with antibodies 1B8 and antibodies against FLAG sequence. Tumor microenvironment cells (purple color), syntheses protein SI-CLP (red color). A – TS/A tumor microslides after double *it* injection with virus vector rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG, detection using antibodies against FLAG sequence; B – TS/A tumor microslides after double *it* injection with virus vector rekSFV1/Enh.Luc, detection using antibodies against FLAG sequence; C, D – TS/A tumor microslides after double *it* injection with virus vector rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG, detection using antibodies 1B8; E, F – TS/A tumor microslides after double *it* injection with virus vector rekSFV1/Enh.Luc, detection using antibodies 1B8.

Iegūtie mikrogriezumi no TS/A audzēja, kas injicēti ar vektoru rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG, un krāsoti ar antivielām pret FLAG sekvenci, uzrāda detektējamu SI-CLP proteīnu audzēju mikrovidē, bet pēc injekcijas ar rekSFV1/Enh.Luc, proteīns nav detektējams.

Pēc SI-CLP proteīna detekcijas ar specifiskām antivielām 1B8, vektora rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG gadījumā SI-CLP proteīns detektējams nelielā daudzumā. Tas varētu būt saistīts ar to, ka pēc atkārtotas injekcijas ar vīrusu būtu nepieciešams ilgāks laika periods par 24 h proteīna sintēzei, kas būtiski varētu palielināt makrofāgu daudzumu audzēju mikrovidē un samazināt audzēju izmērus. Neliela daudzuma SI-CLP proteīna detekciju var ietekmēt arī imūnhistoķīmijas analīzē konkrētais izvēlētais mikrogriezums vai gēna produkcijas specifiskums *in vivo*. Mikrogriezumi no TS/A audzējiem, kas injicēti ar

rekSFV1/Enh.Luc vīrusu, uzrāda negatīvu krāsojumu, tādējādi apstiprinot SI-CLP proteīna iztrūkumu audzēju mikrovidē.

Lai pārlicinātos par audzēja augšanu un metastāžu veicinošo M2 makrofāgu klātbūtni audzēju mikrovidē, mikrogriezumi tika krāsoti ar M2 makrofāgu receptora stabilīna-1 specifiskām antivielām RS1 (20. attēls).



20. attēls. TS/A audzēja M2 makrofāgu virsmas receptora stabilīna-1 imunohistoķīmiskā detektēšana ar receptora specifiskām antivielām RS1. Audzēja šūnas un imūnšūnas (violetā krāsā), stabilīna-1 receptoru saturošie M2 makrofāgi (sarkanā krāsā). A, B – TS/A audzēju mikrogriezumi pēc divkārtas *it* injekcijas ar vīrusa vektoru rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG. C, D – TS/A audzēju mikrogriezumi pēc divkārtas *it* injekcijas ar vīrusa vektoru rekSFV1/Enh.Luc.

Figure 20. Immunohistochemical detection of M2 macrophage surface receptor stabilin-1 in TS/A tumor. Tumor cells and immune cells (purple color), receptor stabilin-1 containing macrophages (red color). A, B – TS/A tumor microslides after double *it* injection with virus vector rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG; C, D – TS/A tumor microslides after double *it* injection with virus vector rekSFV1/Enh.Luc.

Pēc attēla vērojams, ka lielākā daļa no TS/A audzējiem, kas divkārti *it* injicēti ar alfavīrusu vektoriem rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG un rekSFV1/Enh.Luc, satur audzēju asociētos makrofāgus, kam ir raksturīgais virsmas marķieris stabilīns-1. Pēc *in vitro*

pārbaudes tika noteikts, ka TS/A šūnas stabilīnu-1 neekspresē. Virsmas receptora stabilīna-1 izkliede audzēja masā ir vienmērīga, tomēr audzējs, kas injicēts ar vektoru rekSFV1/Enh.mSI-CLP+FLAG, satur nedaudz mazāk detektējami stabilīna-1 proteīnu. Iespējams, ka, pateicoties *it* injekcijām un transgēna ekspresijai, makrofāgi atrodas pārpolarizācijas stāvoklī no M2 tipa makrofāgiem uz M1 makrofāgiem, balstoties uz audzēja izmēra samazināšanos. Jāatzīme, ka sakarā ar to, ka nav zināmas proteīna SI-CLP funkcijas audzējā, varētu pieņemt, ka tas aktivē ne tikai M1, bet arī M2 makrofāgu pastiprinātu plūsmu audzējā ar mērķi tiem veikt fagocitozes funkciju un aktivēt citas imūnsistēmas šūnas cīnīties ar mutagēnajām krūts vēža šūnām.

SECINĀJUMI

1. Tika izveidoti un pārbaudīti *SI-CLP* gēna saturošo alfavīrusu konstruktus (rekSFV1/Enh.mSI-CLP; SIN-Rep5-mSI-CLP; SIN-nspSer-mSI-CLP un SIN-nspSer-hSI-CLP) spēja transficēt BHK-21 un krūts vēža TS/A šūnu līnijas. Augsts transgēna *SI-CLP* ekspresijas līmenis un SI-CLP proteīnu produkcija tika detektēti abās šūnu kultūrās pēc infekcijas ar visiem izveidotajiem alfavīrusu vektoriem, tomēr proteīnu sekrēcija tika novērota šūnām, inficētām tikai ar citopātisko rekSFV1/Enh.SI-CLP vektoru.
2. Pirmo reizi tika pārbaudīta SI-CLP proteīna spēja ietekmēt audzēja mikrovidi pēc *it* injekcijām ar rekSFV1/Enh.mSI-CLP vektoru. Pēc divkārtas *it* injekcijas ar *SI-CLP* gēna saturošo alfavīrusa vektoru detektējama krūts vēža samazināšanās par 10–40%, alfavīrusa vektors bez terapeitiskā transgēna spēja inducēt audzēja izmēra samazināšanos aptuveni par 10%, bet pēc injekcijas ar PBS tika novērota audzēja izmēra palielināšanās.
3. Tika detektēta SI-CLP proteīna spēja stimulēt makrofāgu plūsmu uz krūts vēža perifēriju, izraisot tā regresiju, kas norāda uz to, ka SI-CLP var kalpot kā potenciāls kandidāts krūts vēža gēnu terapijas izveidē.

PATEICĪBAS

Izsaku pateicību maģistra darba vadītājai Dr. biol. Annai Zajakinai par darba vadīšanu un ieteikumiem.

Paldies Mag. biol. Jeļenai Vasiļevskai par darba konsultēšanu.

Paldies Dr. habil. biol. Tatjanai Kozlovskai par doto iespēju strādāt darba grupā Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Paldies Irēnai Timofējevai par vērtīgiem padomiem darbā ar šūnām.

Paldies Prof. Dr. Juliai Kzhyshkowskai par darba konsultēšanu.

Paldies maniem kolēģiem – Karīnai Spundei, Artim Linaram, Baibai Ķūrēnai, Aleksejam Fjodorovam un Gunai Petajai par atbalstu darba tapšanā.

Paldies Dr. biol. Dacei Skrastiņai par darba recenziju.

Darbs tika finansēts no VPP Biomedicīnas 3.projekta “Jaunu pretvēža zāļu un imunoterapijas līdzekļu izstrāde” un Baltijas-Vācijas Augstskolu biroja projekta “Makrofāgu fenotipa pētīšana peļu audzēju modeļos, pielietojot alfavīrusu vektorus” līdzekļiem.

IZMANTOTĀ LITERĀTŪRA

- Allavena P., Sica A., Solinas G., Porta C., Mantovani A. 2008. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. – *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 66 (1): 1-9.
- Atkins G.J., Fleeton M.N., Sheahan B.J. 2008. Therapeutic and prophylactic applications of alphavirus vectors. – *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10: e33.
- Balistreri G. 2010. Structure, function and intracellular dynamics of alphavirus replication complexes. Doctoral dissertation. University of Helsinki, Faculty of Biological and Environmental Sciences, Department of Biosciences, Microbiology.
- Brown B.N., Sicari B.M., Badylak S.F. 2014. Rethinking regenerative medicine: a macrophage-centered approach. – *Frontiers in Immunology*, 5: 510.
- Casales E., Rodriguez-Madoz J.R., Ruiz-Guillen M., Razquin N., Cuevas Y., Prieto J., Smerdou C. 2008. Development of a new noncytopathic Semliki Forest virus vector providing high expression levels and stability. – *Virology*, 376 (1): 242-251.
- Chanmee T., Ontong P., Konno K., Itano N. 2014. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. – *Cancers*, 6 (3): 1670–1690.
- Chikkanna-Gowda C.P., Sheahan B.J., Fleeton M.N., Atkins G.J. 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, 1253–1263.
- Conniot J., Silva J.M., Fernandes J.G., Silva L.C., Gaspar R., Brocchini S., Florindo H.F., Barata T.S. 2014. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. – *Frontiers in Chemistry*, 2 (105): 1-27.
- Davis M.J., Tsang T.M., Qiu Y., Dayrit J.K., Freij J.B., Huffnagle G.B., Olszewski M.A. 2013. Macrophage M1/M2 Polarization Dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* Infection. – *American Society of Microbiology*, 4 (3): e00264-13.
- Di Gioia D., Stieber P., Schmidt G.P., Nagel D. Heinemann V., Baur-Melnyk A. 2015. Early detection of metastatic disease in asymptomatic breast cancer patients with whole-body imaging and defined tumour marker increase. – *British Journal of Cancer*, 112: 809-818.
- Ding J., Jin W., Chen C., Shao Z., Wu J. 2012. Tumor associated macrophage cancer cell hybrids may acquire cancer stem cell properties in breast cancer. – *PLoS One*, 7 (7): e41942.

- Esquivel-Velázquez M., Ostoa-Saloma P., Palacios-Arreola M.I., Nava-Castro K.E., Castro J.I., Morales-Montor J. 2015. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. – *The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression*, 35 (1): 1-16.
- Fujimoto H., Sangai T., Ishii G., Ikehara A., Nagashima T., Miyazaki M., Ochiai A. 2009. Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression. – *International Journal of Cancer*, 125 (6): 1276-1284.
- Guo C., Buranych A., Sarkar D., Fisher P.B., Wang X.Y. 2013. The role of tumor-associated macrophages in tumor vascularization. – *Vascular Cell*, 5: 20
- Hao N.-B., Lu M.-H., Fan Y.-H., Cao Y.-L., Zhang Z.-R., Yang S.-M. 2012. Macrophages in tumor microenvironment and the progression of tumors. – *Clinical and Developmental Immunology*, ID 948098.
- Helenius A., Morein B., Fries E., Simons K., Robinson P., Schirmacher V., Terhorst C., Strominger J.L. 1978. Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. – *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75 (8): 3846-3850.
- Heusinkveld M., Van der Burg S.H. 2011. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *Journal of Translational Medicine*, 9: 216.
- Hirose K., Iwabuchi K., Shimada K., Kiyonagi T., Iwahara C., Nakayama H., Daida H. 2011. Different responses to oxidized low-density lipoproteins in human polarized macrophages. – *Lipids in Health and Disease*, 10: 1.
- Hyde J.L., Chen R., Trobaugh D.W., Diamond M.S., Weaver S.C., Klimstra W.B., Wilusz J. 2015. The 5' and 3' end of alphavirus RNAs – Non-coding is not non-functional. – *Virus Research*, S0168-1702(15)00026-X.
- Italiani P., Boraschi D. 2014. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. Functional differentiation. – *Frontiers in Immunology*, 5: 514.
- Yáñez-Cuna J.O., Arnold C.D., Stampfel G., Boryn L.M., Gerlach D., Rath M., Stark A. 2014. Dissection of thousands of cell type-specific enhancers identifies dinucleotide repeat motifs as general enhancer features. – *Genoma Research*, 24: 1147-1156.
- Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X.-F., Wang H. 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research*, 2: 1.

- Jiang X. 2014. Harnessing the immune system for the treatment of breast cancer. – *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 5 (1):1-15.
- Jose J., Snyder J.E., Kuhn R.J. 2009. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. – *Future Microbiology*, 4 (7): 837-856.
- Khudyakov Y.E. 2008. *Medicinal Protein Engineering*. Londona: CRC Press, 523-526 pp.
- Klimstra W.B., Nangle E.M., Smith M.S., Yurochko A.D., Ryman K.D. 2003. DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses. – *Journal of Virology*, 77 (22): 12022-12032.
- Kononchik J.P., Hernandez R., Brown D.T. 2011. An alternative pathway for alphavirus entry. – *Virology Journal*, 8: 304.
- Korkaya H., Liu S., Wicha M.S. 2011. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. – *The Journal of Clinical Investigation*, 121 (10): 3804–3809.
- Kujala P. 2000. *The Togavirus RNA replication complex*. Academic dissertation. Estonia, University of Helsinki, 66 pp.
- Kzhyshkowska J. 2010. *Multifunctional Receptor Stabilin-1 in Homeostasis and Disease*. – *The Scientific World Journal*, 10: 2039–2053.
- Kzhyshkowska J., Gratchev A., Goerd S. 2006. Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions. – *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10 (3): 635-649.
- Kzhyshkowska J., Gratchev A., Goerd S. 2007. Human Chitinases and Chitinase-Like Proteins as Indicators for Inflammation and Cancer. – *Biomarker Insights*, 2: 128–146.
- Kzhyshkowska J., Mamidi S., Gratchev A., Kremmer E., Schmuttmaier C., Krusell L., Haus G, Utikal J., Schledzewski K., Scholtze J., Goerd S. 2006. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. – *Blood*, 107 (8): 3221-3228.
- La Linn M., Eble J.A., Lubken C., Slade R.W., Heino J., Davies J., Suhrbier A. 2005. An arthritogenic alphavirus uses the alpha1beta1 integrin collagen receptor. – *Virology*, 336 (2): 229-239.
- Leibovich-Rivkin T., Liubomirski Y., Bernstein B., Meshel T., Ben-Baruch A. 2013. Inflammatory factors of the tumor microenvironment induce plasticity in nontransformed breast epithelial cells: EMT, invasion, and collapse of normally organized breast textures. – *Neoplasia*, 15 (12): 1330–1346.
- Leung J.Y.S., Ng M.M.L., Chu J.J.H. 2011. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. – *Advances in Virology*: 249640.

- Lewis C.E., Pollard J.W. 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. – *Cancer Research*, 66 (2): 605-612.
- Li J., Zhu W., Wang H., Li J., Zhang Q., He Y., Li J., Fu J., Li D., Liang G. 2012. Rapid, specific detection of alphaviruses from tissue cultures using a replicon-defective reporter gene assay. – *PLoS ONE*, 7 (4): 10.
- Lundstrom K. 2001. Alphavirus vectors for gene therapy applications. – *Current Gene Therapy*, 1 (1): 19-29.
- Lundstrom K. 2003. Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. – *Biochimica et Biophysica Acta*, 1610 (1): 90-96.
- Lundstrom K. 2005. Biology and application of alphaviruses in gene therapy. – *Gene Therapy*, 1: S92-7.
- Lundstrom K. 2009. Alphaviruses in gene therapy. – *Viruses*, 1 (1): 13-25.
- Lundstrom K. 2012. Alphavirus vectors for therapy of neurological disorders. – *Journal of Stem Cell Research and Therapy*, S4: 002.
- Lundstrom K. 2012. Alphavirus vectors in vaccine development. – *Journal of Vaccines & Vaccination*, 3 (3): 139.
- Meng G., Zhao Y., Bai X., Liu Y., Green Y.J., Luo M., Zheng X. 2010. Structure of human stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) reveals a saccharide-binding cleft with lower sugar-binding selectivity. – *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (51): 39898–39904.
- Morse M.A., Clay T.M., Lyerly H.K. 2004. Handbook of cancer vaccines. Cancer drug discovery and development. New York: Human Press, 592 pp.
- Mosser D.M., Edwards J.P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. – *Nature Reviews Immunology*, 8 (12): 958–969.
- Movahedi K., Laoui D., Gysemans C., Baeten M., Stangé G., Van den Bossche J., Mack M., Pipeleers D., In't Veld P., De Baetselier P., Van Ginderachter J.A. 2010. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. – *Cancer Research*, 70 (14): 5728-5739.
- Mukhtar R.A., Nseyo O., Campbell M.J., Esserman L.J. 2011. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. – *Expert review of molecular diagnostics*, 11 (1): 91-100.
- Murdoch C., Giannoudis A., Lewis C.E. 2004. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. – *Blood*, 104 (8): 2224-2234.

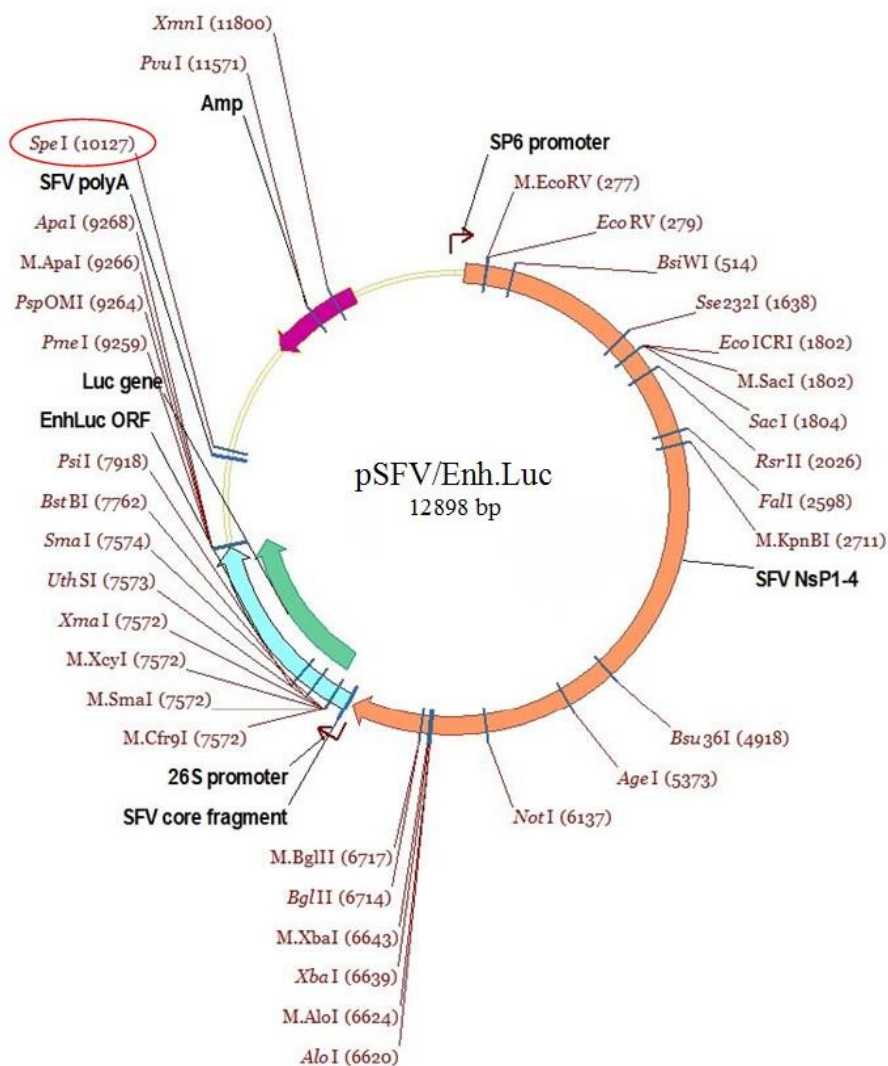
- Noy R., Pollard J.W. 2014. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. – *Immunity*, 41 (5): 866.
- O'Brien J., Schedin P. 2009. Macrophages in breast cancer: Do involution macrophages account for the poor prognosis of pregnancy-associated breast cancer? – *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 14 (2): 145-157.
- Obeid E., Nanda R., Fu Y.X. 2013. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression. – *International Journal of Oncology*, 43 (1): 5-12.
- Orme J., Mohan C. 2012. Macrophage Subpopulations in Systemic Lupus Erythematosus. – *Discovery Medicine*: 13 (69): 151-158.
- Parsa R., Andresen P., Gillett A., Mia S., Zhang X.M., Mayans S., Holmberg D., Harris R.A. 2012. Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages prevents type 1 diabetes in NOD mice. – *Diabetes*, 61 (11): 2881-2892.
- Piver E., Collin C., Diatta A., Vaudin P., Pages J.-C. 2005. Cellular factors influencing Semliki Forest Virus vector biology. – *Gene Therapy*, 12: S111–S117.
- Plesa G., McKenna P.M., Schnell M.J., Eisenlohr L.C. 2006. Immunogenicity of cytopathic and noncytopathic viral vectors. – *Journal of Virology*, 80 (13): 6259–6266.
- Ploeger D.T.A., Hosper N.A., Schipper M., Koerts J.A., De Rond S., Bank R.A. 2013. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. – *Cell Communication and Signaling*, 11: 29.
- Quetglas J.I., Ruiz-Guillen M., Aranda A., Casales E., Bezunartea J., Smerdou C. 2010. Alphavirus vectors for cancer therapy. – *Virus Research*, 153 (2): 179-196.
- Rheme C., Ehrenguber M.U., Grandgirard D. 2004. Alphaviral cytotoxicity and its implication in vector development. – *Experimental Physiology*, 90 (1): 45-52.
- Richards D.M., Hettinger J., Feuerer M. 2013. Monocytes and macrophages in cancer: development and functions. – *Cancer Microenvironment*, 6 (2): 179-191.
- Riezebos-Brilman A., De Mare A., Bungener L., Huckriede A., Wilschut J., Daemen T. 2006. Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy. – *Journal of Clinical Virology*, 35 (3): 233-243.
- Ryan C., Stevens T.H., Schlesinger M.J. 1992. Inhibitory effects of HSP70 chaperones on nascent polypeptides. – *Protein Science*, 1 (8): 980-985.
- Robinson A., Hudson M.J., Cranage M.P. 2003. Vaccine protocols. Second edition. New Jersey: Springer Science & Business Media, 414 pp.

- Robinson S.C., Scott K.A., Wilson J.L., Thompson R.G., Proudfoot A.E.I., Balkwill F.R. 2003. A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. – *Cancer Research*, 63 (23): 8360-8365.
- Rodriguez-Madoz J.R., Prieto J., Smerdou C. 2005. Semliki forest virus vectors engineered to express higher IL-12 levels induce efficient elimination of murine colon adenocarcinomas. – *Molecular Therapy*, 12 (1): 153-163.
- Rodriguez-Madoz J.R., Prieto J., Smerdou C. 2007. Biodistribution and Tumor Infectivity of Semliki Forest Virus Vectors in Mice: Effects of Re-administration. – *Molecular Therapy*, 15 (12): 2164-2171.
- Shi C., Pamer E.G. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. – *Nature Reviews Immunology*, 11: 762-774.
- Siemann D.W. 2011. Tumor microenvironment. New Jersey: Wiley-Blackwell, 454 pp.
- Smit J.M., Waarts B.-L., Kimata K., Klimstra W.B., Bittman R., Wilschut J. 2002. Adaptation of Alphaviruses to Heparan Sulfate: Interaction of Sindbis and Semliki Forest Viruses with Liposomes Containing Lipid-Conjugated Heparin. – *Journal of Virology*, 76 (20): 10128–10137.
- Smithburn, K.C., Haddow, A.J. 1944. Semliki Forest virus. I. Isolation and pathogenic properties. *The Journal of Immunology*, 49 (3): 141-157.
- Stewart D.A., Yang Y., Makowski L., Troester M.A. 2012. Basal-like Breast Cancer Cells Induce Phenotypic and Genomic Changes in Macrophages. – *Molecular Cancer Research*, 10 (6): 727–738.
- Tsai M.-J., Chang W.-A., Huang M.-S., Kuo P.-L. 2014. Tumor Microenvironment: A New Treatment Target for Cancer. – *ISRN Biochemistry*, ID 351959: 1-8.
- Tseng J.C., Levin B., Hurtado A., Yee H., Perez de Castro I., Jimenez M., Shamamian P., Jin R., Novick R.P., Pellicer A., Meruelo D. 2004. Systemic tumor targeting and killing by Sindbis viral vectors. – *Nature Biotechnology*, 22: 70–77.
- Tugal D., Liao X., Jain M.K. 2013. Transcriptional Control of Macrophage Polarization. – *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33 (6): 1135-1144.
- Turner L., Scotton C., Negus R., Balkwill F. 1999. Hypoxia inhibits macrophage migration. – *European Journal of Immunology*, 29 (7): 2280-2287.
- Vander Veen R.L., Hank Harris D.L., Kamrud K.I. 2012. Alphavirus replication vaccines. – Cambridge University Press, 1-9.
- Vasilevska J, Skrastina D., Spunde K., Garoff H., Kozlovska T., Zajackina 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 Therapy*, 19 (8):579-87.
- Villalta S.A., Nguyen H.X., Deng B., Gotoh T., Tidball J.G. 2009. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. – *Human Molecular Genetics*, 18 (3): 482–496.
- Wahlfors J.J., Zullo S.A., Loimas S., Nelson D.M., Morgan R.A. 2000. Evaluation of recombinant alphaviruses as vectors in gene therapy. – *Gene Therapy*, 7 (6): 472-480.
- Wang K.S., Kuhn R.J., Strauss E.G., Ou S., Strauss J.H. 1992. High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. – *Journal of Virology*, 66: 4992-5001.
- Wang N., Liang H., Zen K. 2014. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. – *Frontiers in Immunology*, 5: 614.
- Weaver S.C., Winegar R., Manger I.D., Forrester N.L. 2012. Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. – *Antiviral Research*, 94 (3): 242–257.
- Woollard K.J., Geissmann F. 2010. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. – *Nature Reviews Cardiology*, 7 (2): 77-86.
- Xiao W., Meng G., Zhao Y., Yuan H., Li T., Peng Y., Zhao Y., Luo M., Zhao W., Li Z., Zheng X. 2014. Human Secreted Stabilin-1 Interacting Chitinase-like Protein Aggravates the Inflammation Associated With Rheumatoid Arthritis and Is a Potential Macrophage Inflammatory Regulator in Rodents. – *Arthritis & Rheumatology*, 66 (5): 1141–1152.
- Zhang J., Gratchev A., Riabov V., Mamidi S., Schmuttermaier C., Krusell L., Kremmer E., Workman G., Sage E.H., Jalkanen S., Goerdt S., Kzhyshkowska J. 2009. A Novel GGA-binding site is required for intracellular. – *Molecular and Cellular Biology*, 29 (22): 6097-6105.
- Zhang M., He Y., Sun X., Li Q., Wang W., Zhao A., Di W. 2014. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. – *Journal of Ovarian Research*, 7: 19.

PIELIKUMI

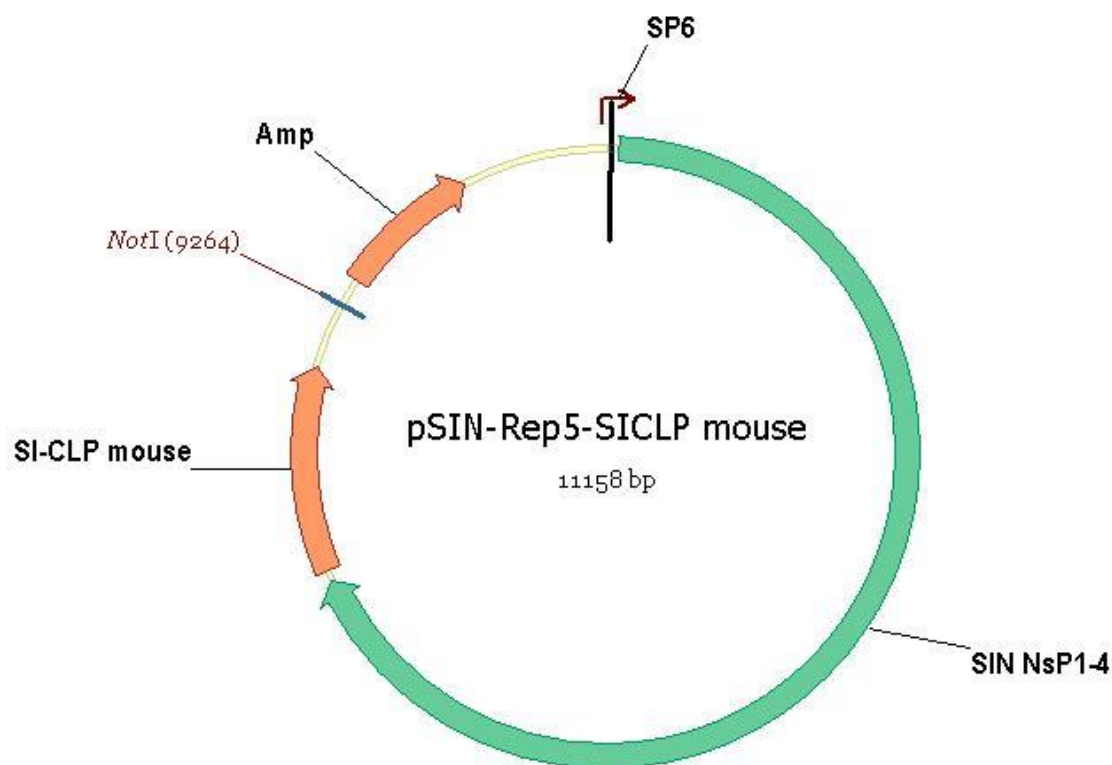
1-1. pielikums.



pSFV1/Enh.Luc plazmīdas restrikcijas karte: SFV *nsP1-4* - SFV nestrukturālo proteīnu gēni; *Amp* – ampicilīna rezistences gēns; SP6 – RNS polimerāzes promoteris *in vitro* transkripcijai; SFV *core* gēna fragments; 26S promoteris – SFV 26S subgenoma RNS promoteris; Enh – enhancers; ORF – atvērtais nolasīšanas rāmis; *Luc gene* – jāņtārpiņa luciferāzes gēns; SFV polyA – SFV vīrusa 3' gala poliadenilētā sekvence; *Spe I* – plazmīdas DNS linearizācijas saits; bp – bāzu pāri.

pSFV1/Enh.Luc plasmid restriction map: SFV *nsP1-4* – SFV nonstructural protein genes; *Amp* - ampicillin resistance gene, SP6 - RNA polymerase promoter for transcription *in vitro*; SFV *core* gene fragment; 26S promoter – SFV 26S subgenomic RNA promoter; Enh – enhancer; ORF – open reading frame; *Luc gene* – firefly luciferases gene; SFV polyA – SFV virus polyadenylated tail on the 3' end of sequence; *Spe I* – plasmid DNA linearization site; bp – base pairs.

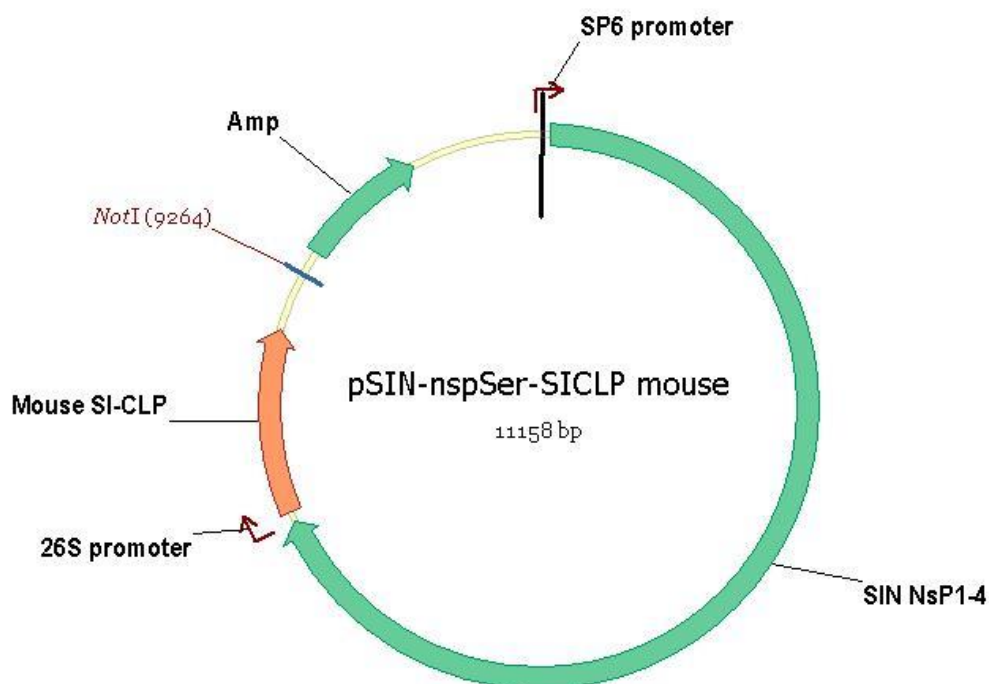
1-2. pielikums.



pSIN-Rep5-SI-CLP mouse plazmīdas restrikcijas karte: SFV *nsP1-4* - SFV nestrukturālo proteīnu gēni; *Amp* – ampilīna rezistences gēns; SP6 – RNS polimerāzes promoteris *in vitro* transkripcijai; *SI-CLP mouse* – hitināzei-līdzīgais peles *SI-CLP* gēns; *Not I* – plazmīdas DNS linearizācijas saits; bp – bāžu pāri.

pSIN-Rep5-SI-CLP mouse plasmid restriction map: SFV *nsP1-4* – SFV nonstructural protein genes; *Amp* - ampicillin resistance gene, SP6 - RNA polymerase promoter for transcription *in vitro*; *SI-CLP mouse* – chitinase-like mouse *SI-CLP* gene; *Not I* – plasmid DNA linearization site; bp – base pairs.

1-3. pielikums.



pSIN-nspSer-SI-CLP mouse plazmīdas restrikcijas karte: SFV *nsP1-4* - SFV nestrukturālo proteīnu gēni; *Amp* – ampilīna rezistences gēns; SP6 – RNS polimerāzes promoteris *in vitro* transkripcijai; 26S promoteris – SFV 26S subgenoma RNS promoteris; *Mouse SI-CLP* – hitināzei-līdzīgais peles *SI-CLP* gēns; *Not I* – plazmīdas DNS linearizācijas saits; bp – bāzu pāri.

pSIN-Rep5-SI-CLP mouse plasmid restriction map: SFV *nsP1-4* – SFV nonstructural protein genes; *Amp* - ampicillin resistance gene, SP6 - RNA polymerase promoter for transcription *in vitro*; 26S promoter – SFV 26S subgenomic RNA promoter; *Mouse SI-CLP* – chitinase-like mouse *SI-CLP* gene; *Not I* – plasmid DNA linearization saits; bp – base pairs.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes pilna laika (klātienes) bioloģijas maģistra studiju programmas 2. kursa studentes Agneses Ezertas (stud. apl. nr. ae10021) maģistra darbs tika izstrādāts Latvijas 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: Agnese Ezerta/ _____ / 2015.g. ____ . _____

Rekomendējam darbu aizstāvēšanai

Darba vadītāja: Dr. biol. Anna Zajakina/ _____ / 2015.g. ____ . _____

Recenzents: Dr. biol. Dace Skrastiņa/ _____ /2015.g. ____ . _____

Katedras vadītājs: _____ /Dr. biol., Kaspars Tārs/ 2015.g. ____ . _____

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

2015. gada ____ . _____, prot. Nr. _____, vērtējums _____

Komisijas sekretārs (-e) _____