

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

PRETAUDZĒJU PROTEKCIJA AR ŽURKAS TERT
APGRIEZTĀS TRANSKRIPTĀZES DOMĒNU DNS
IMUNIZĒTĀS PELĒS

Maģistra darbs

Autors: Alisa Kurļanda
Stud. apl. Nr. ak19215
Darba vadītājs: Dr. biol. Juris Jansons

RĪGA 2021

Kopsavilkums

Darbā tika pārbaudītas un novērtētas žurkas TERT un RT-TERTin DNS imunogēno konstrukciju pretaudzēju protektīvās īpašības pret ar luciferāzi iezīmētām 4T1 derivātu adenokarcinomas līniju šūnām peļu modelī.

Audzēju attīstības, atgrūšanās vai augšanas novērošanā tika veikta imunizētiem dzīvniekiem ar *in vivo* bioluminiscences attēlveidošanu. Iegūtie *in vivo* bioluminiscences dati liecina par ar RT-TERTin efektīvāku dzīvnieku aizsardzību no audzējiem nekā ar pilna garuma aktīvo TERT.

Ar plūsmas citometriju tika pārbaudīta pret TERT vērsto T-šūnas atbildes reakcija. Darba pārbaudītie TERT DNS imunogēni spēj izrāsīt specifisko T-šūnas atbildi. Tika noteikts, ka stimulācija ar TERT sekvencei atbilstošiem oligopeptīdiem izraisa imunizēto dzīvnieku Th un CTL limfocītu aktivāciju.

Daļa no darba rezultātiem tika publicēta 2020. gadā 18.junija žurnālā “*Vaccines*” rakstā ar nosaukumu “Telomerāzes reversās transkriptāzes domēna ekspresija inducē lītisko šūnu reakciju ar DNS imunizētām pelēm un ierobežo peles adenokarcinomas 4T1 šūnu tumorigēno un metastātisko potenciālu”.

Atslēgvārdi: audzējis, TERT, RT-TERT domēns, DNS vakcīna, bioluminiscences attēlveidošana, plūsmas citometrija

Summary

Object of this study is to check and evaluate rat TERT and RT-TERTin DNA immunogenic construct's protective properties against 4T1 derivatives adenocarcinoma cell lines marked with luciferase in mice.

Tumor growth, development and rejection observation was performed on immunized mice using *in vivo* bioluminescence imaging. Obtained *in vivo* bioluminescence data shows evidence of higher protective properties against tumor growth of RT-TERTin, rather than full-length active TERT.

T-cell response against TERT was studied using flow cytometry. Studied TERT DNA immunogenes were able to evoke specific T-cell immune response. Study determined, that stimulation with TERT sequence corresponding oligopeptides causes Th and CTL lymphocyte activation in immunized mice.

Part of this study is published in "Vaccines" journal on June, 18, 2020. Article name: "Expression of the Reverse Transcriptase Domain of Telomerase Reverse Transcriptase Induces Lytic Cellular Response in DNA-Immunized Mice and Limits Tumorigenic and Metastatic Potential of Murine Adenocarcinoma 4T1 Cells"

Keywords: tumor, TERT, RT-TERT domain, DNA vaccines, bioluminescence imaging, flow cytometry

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	5
IEVADS	8
Darba mērķis:	8
Darba uzdevumi:	8
LITERATŪRAS APSKATS.....	9
Audzēja imūnterapija	9
DNS vakcīnas.....	10
Telomerāzes apgrieztā transkriptāze (TERT)	12
MATERIĀLI UN METODEDES	14
Materiāli	14
Plazmīdas	14
Šūnas	14
Laboratorijas dzīvnieki.....	15
METODES	19
Plazmīdu izdalīšana.....	19
Eikariotu šūnu kultūru kultivēšana.....	21
Elektroporācija	21
Bioluminiscences attēlveidošana	23
Peļu splenocītu izolēšana	25
Plūsmas citometrija	26
Protokols	27
Datu apstrāde un analīze	30
REZULTĀTI.....	31
Audzēju attīstības novērošana imunizētos dzīvniekos.....	31
Specifiskas T-šūnu imūnatbildes noteikšana pret TERT epitopiem	38
DISKUSIJA	46

SECINAJUMI.....	49
PATEICĪBAS.....	50

PIEŅEMTIE SAĪSINĀJUMI

APŠ – Antigēnu prezentējošas šūnas

ASV – Amerikas Savienotās Valstis

BLI – Bioluminiscences attēlveidošana

BMC – Biomedical Research and Study Centre

CTE – C-termināla domēns

CTL – Citotoksiskie T-limfocīti

DNS – Dezoksiribonukleīnskābe

DŠ – Dendrītiskās šūnas

FDA – Food and Drug Administration

FSC – Frontāla izkliede

GM-CSF – makrofāgu koloniju stimulējošais faktors

HIV – Cilvēka imūndeficīta vīruss

IFN- γ – Gamma interferons

IL-2 – Interleikīns 2

MHC – Galvenais audu saderības komplekss

PVD- Pārtikas un Veterinārais Dienests

RNS – Ribonukleīnskābe

RT – Apgrieztās transkriptāzes domēns

SSC – Sānu izkliede

TAA – ar audzēju saistīts antigēns

TEN – Galvenais N-terminālo domēns

TERT – Telomerāzes apgrieztā transkriptāze

TERTp – Telomerāzes apgrieztās transkriptāzes promoters

Th – Līdzētājšūnas, T-helperi

TNF- α – Audzēju nekrozes faktors alfa

TRBD – Telomerāzes RNS saistošais domēns

USDA – United States Department of Agriculture

IEVADS

Vēzis ir slimību grupa, kurai ir raksturīga kāda noteikta šūnu kopuma nekontrolējama dalīšana un augšana, kas nelabvēlīgi ietekme visu organismu. Pastāv dažādi vēža tipi, bet visiem ir kopīgs kā cilvēka imūna sistēma nav spējīga pārvarēt audzēju šūnu attīstību. Tomēr ar papildu stimulāciju, piemēram, imūnterapiju, ir iespējams stimulēt imūnas sistēmas aizsargmehānismus.

Dažādas stratēģijas tiek izmantotas lai stimulētu imūno sistēmu iznīcināt audzēju šūnas. Viena no tām ir terapeitiskas pretvēža vakcīnas izstrādāšana. Šajā jomā DNS vakcīnām ir vairākas priekšrocības: izstrādes vienkāršība, zemas izmaksas, stabilitāte, un drošība. Pašlaik apstiprinātās DNS vakcīnās cilvēkiem neeksistē, tomēr dažas DNS vakcīnas pielieto veterinārajā.

Telomerāzes apgrieztā transkriptāze (TERT) ir perspektīvs terapeitiskas pretvēža vakcīnas mērķis, jo ~ 90% cilvēku vēža ir atkarīgi no telomerāzes klātbūtnes un aktivitātes. Sakarā ar plašu un selektīvu ekspresiju vēža šūnās, telomerāze tika uzskatīta par pievilcīgu un gandrīz universālu terapeitisku mērķi pretvēža imūnterapijai.

Darba mērķis: Novērtēt TERT un RT-TERTin DNS imunogēno konstrukciju pretaudzēju protektīvās īpašības.

Darba uzdevumi:

1. Izpētīt zinātnisko literatūru par audzēju imūnterapiju, DNS vakcīnām, TERT proteīnu;
2. Noteikt dažādu līniju audzēju šūnu attīstību peles ar *in vivo* bioluminiscences attēlveidošanas metodi;
3. Salīdzināt audzēju šūnu attīstību ar TERT, RT-TERTin un pVax vektoru imunizētās pelēs;
4. Noteikt pret TERT vērsto T-šūnas atbildi, izmantojot plūsmas citometriju.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1 Audzēja imūnterapija

Pēdējos gados aktīvi attīstās audzēju imūnterapija, kuras mērķis ir kavēt audzēju augšanu un stimulēt organismā pretaudzēju imūnreakciju. Vēža imūnterapija ir mainījusi vēža ārstēšanu: šīs terapijas mērķis ir uzlabot pretaudzēju imūnās atbildes reakcijas ar samazinātu iedarbību uz mērķi nekā ķīmijterapija un citi līdzekļi, kas tieši iznīcina vēža šūnas (Rosenberg, 2014). Vēža imūnterapijā līdzekļi tiek izmantoti, lai aktivizētu imūnsistēmu vai pastiprinātu tās aktivāciju, lai uzbruktu vēža šūnām, izmantojot dabiskos mehānismus, no kuriem daudzi nestrādā slimības progresēšanas laikā (Savas et al., 2016). Pastāv dažādi ļaundabīgo jaunveidojumu imūnterapijas veidi: aktīvā un pasīvā, specifiskā un nespecifiskā (Yuzhakova, Shirmanova, Sergeeva, Zagaynova, & Lukyanov, 2016).

Pasīvā nespecifiskā imūnterapija ir adaptīvā šūnu terapija, kuras pamatā ir efektoru šūnu aktivizēšana ārpus organisma un to turpmāka ievadīšana pacienta ķermenī. Pasīvo specifisko imūnterapiju veic ievadot organismā specifiskās antivielas pret audzēju (Peggs, Quezada, & Allison, 2009).

Aktīvās nespecifiskās imūnterapijas pamatā ir nespecifiskas pretaudzēju imūnās atbildes stimulēšana, izmantojot preparātus, kas var būt citokīni, dažādi baktēriju produkti, sintētiskas molekulas un hormoni. Citokīni ir pirmā imūnterapijas preparātu klase, kas tika ieviesta klīnikā, apstiprinot terapiju ar rekombinanto IFN- α 1986. gadā. Injicētie citokīni tieši stimulē imūno šūnu augšanu un aktivitāti. Trīs galvenie citokīnu veidi, kas tiek pielietoti imūnterapijā, ir interferoni, interleikīni un granulocītu – makrofāgu koloniju stimulējošais faktors (GM-CSF) (Lee & Margolin, 2011). Interferonus parasti ražo imūnās šūnas, reaģējot uz mikrobu patogēniem, un izraisa imūno atbildi, veicinot daudzu imūnšūnu nobriešanu, ieskaitot makrofāgus, dabiskās killeru šūnas, limfocītus un dendrītiskās šūnas. Interleikīni stimulē CD4+ + T šūnu un CD8+ T šūnu aktivitāti un augšanu. GM-CSF uzlabo imūno atbildi, izmantojot divus mehānismus: veicinot T-šūnu homeostāzi, kas uzlabo T-šūnu izdzīvošanu, un atbalstot dendrītisko šūnu diferenciāciju, lai šīs šūnas ekspresētu audzēja specifiskos antigēnus (Emens, 2018).

Aktīvā specifiskā imūnterapija - šis imūnterapijas veids ir balstīts uz vakcīnas lietošanu. Vēža vakcīnas tiek veidotas uz dendrītisko šūnu, neo-antigēnu vai nukleīnskābju (piemēram, DNS) pamata (Srivatsan et al., 2014). Dendrītisko šūnu vakcīnas tiek izgatavotas no

dendrītiskajām šūnām, kas tiek savāktas no pacientiem un modificētas, lai ekspresētu ar audzēju saistītus antigēnus un tādējādi tieši aktivētu T-šūnas, kas uzbrūk vēža šūnām (Garg, Coulie, Van den Eynde, & Agostinis, 2017). Neo-antigēnu vakcīnas tiek izmantotas vēža imūnterapijā, lai uzlabotu imūno reakciju uz vēža šūnām. Neo-antigēni ir audzēja specifiski antigēni, kas rodas notiekot somatiskām DNS izmaiņām vēža šūnās, un viens no galvenajiem neo-antigēnu lietošanas ieguvumiem ir tāds, ka tie atrodas tikai vēža šūnās, tāpēc nevēlamās blakusparādības praktiski tiek novērstas (L. Li, Goedegebuure, & Gillanders, 2017).

Nukleīnskābes terapijas līdzekļi, piemēram, uz DNS vai RNS balstītas ģenētiskās vakcīnas ir kļuvušas par alternatīvu parastajām vakcīnām un balstās uz eksogēno nukleīnskābju intracelulāro ievadīšanu mērķa šūnās. Šajās tehnoloģijās antigēnu prezentējošās šūnas (APŠ) uzņem DNS vai mRNS un notiek translācija, kas izraisa antigēna ekspresiju. Mērķa antigēni tiek uzrādīti T-šūnām, aktivē imūno reakciju pret audzēja šūnām, kas ekspresē interesējošo antigēnu (Riley, June, Langer, & Mitchell, 2019).

1.2 DNS vakcīnas

Vakcinācija ir imūnsistēmas stimulēšana ar modificētu infekciozo aģentu vai infekcijas izraisītāju sastāvdaļām, kas nevar izraisīt slimību, tomēr nodrošina, lai saskaroties ar šo infekciozo aģentu nākotnē, saimniekorganisma imūnsistēma varētu adekvāti to neitralizēt (A.E., C.B., & N.J., 2009).

Termins “vakcīna” ir iegūts no latīņu valodas „*vacca*” - govys, par godu angļu ārstam Edvardam Dženneram, kurš atklāja vakcīnu pret govju bakām. 1796. gadā Dženners ieguva šķidrumu no ar govju bakām slimas sievietes pustulām un inokulēja iegūto šķidrumu veseram astoņgadīgam zēnam (Barquet & Domingo, 1998). Kad īsi pēc tam zēns bija inficēts ar bakām, viņš nenaslima. Dženera veiksmīgi izstrādātā vakcīna atklāja ceļu mūsdienu vakcīnu attīstībai (Arita & Breman, 1979).

Vakcīnas tiek klasificētas kā terapeitiskas vai profilaktiskas. Profilaktiskās vakcīnas tiek dotas veseliem indivīdiem, lai novērstu saslimšanu. Terapeitiskās vakcīnas izmanto, lai apkarotu patogēna darbību inficētā organismā vai ierobežotu infekcijas negatīvās sekas (Lollini, Cavallo, Nanni, & Forni, 2006).

Vakcīnas var ievadīt intramuskulāri, intradermāli un subkutāni (Marino, Scuderi, Provenzano, & Bartoccioni, 2011).

Imunizācija ar nukleīnskābēm pievērs daudz uzmanības jaunās paaudzes vakcīnu jomā. Pirmās DNS vakcīnas efektivitātes pierādījums tika iegūts 1990. gadā un tas ietvēra RNS vai

DNS molekulu injicēšanu peles skeleta muskuļos, ekspresējot hloramfenikola acetiltransferāzi, luciferāzi un beta-galaktozidāzi, kā arī reportera gēnu ekspresiju *in vivo*. Pārbaudes laikā tie varēja būt atklāti līdz diviem mēnešiem pēc injicēšanas (Lei Li & Petrovsky, 2016) (Wolff et al., 1990).

DNS vakcīnām ir zemas ražošanas izmaksas, tās ir stabilas, salīdzinoši viegli izgatavojamas un drošas lietošanā. DNS vakcīnas ir pievilcīgas arī tāpēc, ka spēj izraisīt gan iedzimtās, gan adaptīvās imunitātes atbildi. (Thalmensi et al., 2019).

Neskatoties uz visām priekšrocībām, DNS vakcīnām ir bijuši ierobežoti panākumi terapeitiskā efekta radīšanā pret lielāko daļu audzēju, vājās imunogenitātes dēļ (Yang, Jeang, Yang, Wu, & Hung, 2014). Ir izstrādātas dažādas molekulārās pieejas, lai uzlabotu to efektivitāti, piemēram, kodona optimizācija. Šī gēnu inženierijas metode ļauj aizstāt sinonīmus kodonus, lai palielinātu olbaltumvielu ražošanu un konstrukciju imunogenitāti. Optimizētas pretvēža DNS vakcīnas parādīja labu efektivitāti dažādos preklīniskos modeļos, īpaši profilaktiskos modeļos (Lopes, Vanvarenberg, Préat, & Vandermeulen, 2017).

DNS vakcīna parasti ir baktēriju ražotas plazmīdas, kas zīdītāju promotera vadībā kodē interesējošo proteīnu (antigēnu). Tā tiek ievadīta organismā, lai sasniegtu šūnas kodolu, ļaujot notikt transkripcijai un translācijai transficētās šūnās (Hobernik & Bros, 2018). Pēc plazmīdu uzņemšanas *in vivo* kodētais proteīns tiek ekspresēts saimnieka šūnās, un pēc tam vakcīnas antigēns tiek eksponēts uz antigēnu prezentējošām šūnām (APŠ), piemēram, dendrītiskajām šūnām (DŠ), izmantojot galvenā audu saderības kompleksa (MCH) ceļus, lai aktivizētu naivās T-šūnas (Lei Li & Petrovsky, 2016).

CD8⁺ T-šūnu imunitāti galvenokārt aktivizē iekššūnā producētie antigēni, kas tiek prezentēti uz MHC I klases molekulām. Aktīvā CD8⁺ T šūna producē citokīnus (piemēram, gamma interferonu (IFN- γ) un audzēja nekrozes faktoru alfa (TNF- α)), kas palielina MHC I molekulu ekspresiju. IFN- γ ir kritiski svarīgs endogēna un vairāku citokīnu inducēto pretvēža imūno reakciju mehānismu komponents. IL-2 sinerģiski pastiprina IFN- γ producēšanu gan *in vitro*, gan *in vivo* (Wigginton et al., 2002) Tāpēc tiek aktivizēti arī makrofāgi, lai atbalstītu šūnu izraisītās imūnās atbildes reakciju (Ingolotti, Kawalekar, Shedlock, Muthumani, & Weiner, 2010). TNF- α loma audzēju attīstībā ir diezgan pretrunīga. Augsta TNF- α koncentrācija audos veicina imūno atbildi, kas iznīcina audzēja šūnas, tomēr zemās koncentrācijas TNF- α veicina audzēju neoangiogēnēzi. Neskatoties uz to TNF- α ir potenciāls pretvēža imūnterapijas efektivitātes uzlabošanai (Montfort et al., 2019).

Savukārt, CD4⁺ T-helperu aktivācija tiek veicināta caur MHC II klasi no APŠ. Imunizācija ar DNS vakcīnu izraisa pretiekaisuma citokīnu un hemokīnu sekrēciju no T-helperu limfocītiem. Gadījumā, ja vakcīnas antigēni tiek sekretēti no šūnām, šos mērķus atpazīst B šūnu

receptori naivajās B šūnās, kuras arī aktivizējas izmantojot MHC-II. Šādā imūnās atbildes ceļā aktivētās B šūnas ražo dažādu veidu antivielas (galvenokārt IgG) pret specifiskiem antigēniem (Coban, Kobiyama, Jounai, Tozuka, & Ishii, 2013).

DNS vakcīnas visefektīvāk pielieto vēža modeļos, kur onkogēniem aģentiem ir svešo vīrusu izcelsme, piemēram, ar cilvēka papilomas vīrusu saistīti ļaundabīgi audzēji. Tomēr lielākā daļa audzēju rodas no normāliem ķermeņa audiem un ekspresē endogēnos antigēnus, kurus imūnsistēma vai nu neatpazīst, vai nu imūnai reakcijai nav klīniska efekta.

Pagaidām, pielietošanai uz cilvēkiem nav apstiprināta neviena DNS vakcīna, tomēr dažas DNS vakcīnas guvušas FDA un United States Department of Agriculture (USDA) atļauju veterinārajai lietošanai, ieskaitot vakcīnu pret Rietumnīlas vīrusu zirgiem un suņu melanomu. Vienā no pirmajiem klīniskajiem pētījumiem ar cilvēkiem tika novērtēta DNS vakcīnas terapeitiskā un profilaktiskā iedarbība pret HIV (MacGregor et al., 1998).

ASV šobrīd ir reģistrēti vairāk nekā 500 klīniskie pētījumi, kas ir saistīti ar DNS vakcināciju, īpaši pret vīrusu infekcijām un vēzi, bet mazāk tiek pētītas baktēriju infekcijas un autoimūnās slimības. Klīniskajos pētījumos pārbaudīts liels DNS vakcīnu skaits, kas reflektē šīs medicīniskās pieejas svarīgumu nākotnē (Tiptiri-Kourpeti, Spyridopoulou, Pappa, & Chlichlia, 20)

1.3 Telomerāzes apgrieztā transkriptāze (TERT)

Telomēri ir šūnu nukleoproteīnu kompleksi, kuru galvenā funkcija ir hromosomu integritātes un genoma stabilitātes uzturēšana (Blackburn 2001). Telomerus veido 5'-TTAGGG-3' secības heksamēriski atkārtojumi, kas beidzas ar 3' vienvirziena pārkaru, G-virknes pārkaru (Moyzis et al. 1988, Makarov et al. 1997, Wellinger & Sen 1997), kas aizsargā genomisko DNS no tālākas telomēru erozijas šūnu dalīšanās laikā.

Telomerāze ir ribonukleoproteīnu polimerāze ar reversās transkriptāzes aktivitāti, kas spēj novērst nepārtraukto telomēru eroziju, pievienojot 5'-TTAGGG-3' tandēma atkārtojumus hromosomu beigās (Liu et al. 2004). Aptuveni 85-90% no visiem cilvēka audzējiem parāda augstu telomerāzes aktivitāti, savukārt normālos audos telomerāzes aktivitāte ir mazāka, vai tās vispār nav (Kim, 1997; Nakamura et al., 1997).

Telomerāzes reversā transkriptāze (TERT) ir telomerāzes katalītiskā apakšvienība. Vairumā cilvēku vēža gadījumos telomerāze tiek atkārtoti aktivizēta, pateicoties TERT ekspresijai kancerogēneses laikā. TERT spēlē galveno lomu vēža veidošanā, nodrošinot hromosomu stabilitāti, saglabājot telomēru garumu un ļaujot šūnām novērst novecošanos.

(Daniel, Peek, & Tollefsbol, 2012). Tomēr, lai gan ~ 90% cilvēku audzēju ir atkarīgi no telomerāzes klātbūtnes un aktivitātes, neliels procents (~ 10%) izmanto alternatīvu telomēru mehānisma pagarināšanu. (Dosset, Castro, Carter, & Zanetti, 2020)

Cilvēka TERT ir autoantigēns, kas sastāv no 1132 aminoskābēm. TERT satur telomerāzes galveno N-terminālo (TEN) domēnu, savienotāju reģionu (Linker), telomerāzes RNS saistošo (TRBD) domēnu, apgrieztās transkriptāzes (RT) domēnu un C-termināla domēnu (CTE).

Aminoskābju secība tika atšifrēta pirms vairāk nekā 15 gadiem, kopš tā laika vairākas laboratorijas pārbaudīja TERT antigēnitāti un imunogenitāti (antigēnitāte ir spēja tikt atpazītam ar adaptīvu imūnsistēmu, bet imunogenitāte ir spēja izraisīt adaptīvas imūnsistēmas atbildi). (Zanetti, 2017)

TERT somatiskās mutācijas ir visizplatītākās nekodējošās mutācijas cilvēka vēža šūnās. Lai gan ir dokumentēts, ka tās notiek kodēšanas reģionā, daudz biežāk tās ir sastopamas promotera reģionā (TERTp). Tika pierādīts, ka vairākas TERTp mutācijas ietekmē TERT ekspresiju, telomēru garumu un telomerāzes aktivitāti, atceļot telomerāzes klusēšanu (Chiba et al., 2017). TERTp mutācijas notiek specifiskos dažādu vēža šūnu līniju klīniskos un fenotipiskos apakštipos, un atkārtotas mutācijas ir noteiktas 19% vēža gadījumos (Vinagre et al., 2013). Vēža šūnās TERTp mutācijas parasti ir saistītas ar augstāku TERT ekspresijas līmeni.

TERTp mutācijas tika atklātas vairākos audzēju tipos ar dažādu frekvenci. Parasti izšķir divu veidu audzējus: tos, kuriem ir zems proliferācijas potenciāls un audzēji ar augstu proliferācijas potenciālu. Audzējiem ar augstu TERTp mutācijas līmeni, piemēram, melanomu, glioblastomu, urīnpūšļa vēzi vai aknu šūnu karcinomu (somatisko mutāciju līmenis attiecīgi 64–80%, ~ 84%, ~ 65% un 32–45%) raksturīgs zems proliferācijas potenciāls (Killela et al., 2013). Audzējiem ar zemu vai nenosakāmu TERTp mutācijas līmeni ir augsts proliferācijas potenciāls, piemēram, krūts vēzis 0,9% (Shimoi et al., 2018), sēklinieku vēzis 3% (Cárcano et al., 2016), zarnu vēzis (Huang et al., 2015).

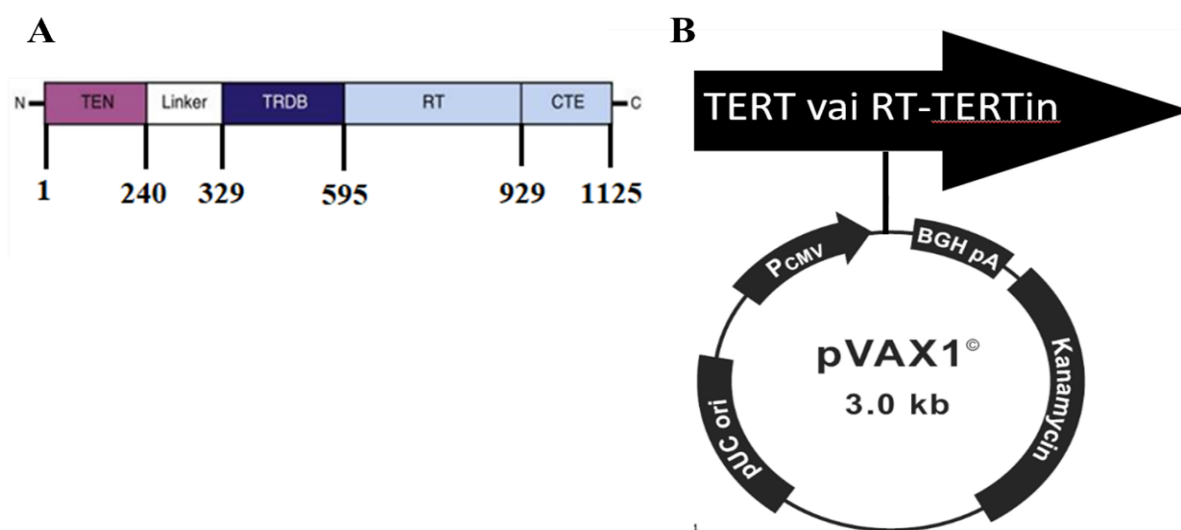
Uz vakcīnām balstītu stratēģiju kontekstā galveno problēmu rada atbilstoša ar audzēju saistītā antigēna (TAA) identificēšana. Ideālam TAA jāekspresējas lielākajā daļā audzēju un visās audzēja progresēšanas fāzēs, lai to varētu izmantot lielam pacientu skaitam, bez autoimūno reakciju riska, kā arī jāizraisa spēcīgu imūno atbildi, ideālā gadījumā iesaistot gan CD4+, gan CD8+ T limfocītus (Mizukoshi & Kaneko, 2019). Sakarā ar plašu un selektīvu ekspresiju vēža šūnās, telomerāze tiek uzskatīta par pievilcīgu un gandrīz universālu terapeitisku mērķi pretvēža imūnterapijai, tāpēc svarīgs apstiprināšanas aspekts bija TERT atvasinātu peptīdu spēja izraisīt efektīvu imūno atbildi (Negrini, De Palma, & Filaci, 2020).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1 MATERIĀLI

2.1.1 Plazmīdas

Darbā tika izmantotas plazmīdas, kas kodē aktīvu pilna garuma žurku TERT proteīnu (pVax TERT) un ar punktveida mutācijām inaktivētu RT-TERT domēnu (pVax RT-TERTin) (Evrogen, Moscow, Russia) (1. attēls).



1. attēls A - Žurkas TERT katalītiskās apakšvienības domēnu struktūra, ar cipariem norādītas domēnu robežu aminoskābju pozīcijas (Sandin & Rhodes, 2014). B - Plazmīdu konstrukcija.

Figure 1. A - Domain structure of the rat TERT catalytic subunit, with numbers are shown the positions of domains borders aminoacids (Sandin & Rhodes, 2014). B - DNA plasmid construction

2.1.2 Šūnas

Darbā tika izmantotas trīs šūnu kultūras līnijas: 4T1luc2 ("Bioware Ultra Cell Line 4T1luc2," Caliper, Hopkinton, MA, USA; <http://www.caliperls.com/assets/014/7158.pdf>) w). – ar luciferāzi iezīmētas peļu adenokarcinomas šūnas; E12 – 4T1luc2 derivāts, peļu adenokarcinomas šūnas, žurku pilna garuma TERT ekspresējošās šūnas; F1 – 4T1luc2 derivāts, peļu adenokarcinomas šūnas, žurku RT-TERT ekspresējošās šūnas. E12 un F1 – abas līnijas ir stabili transficētas ar lentivīrusa vektora palīdzību (Evrogen, Moscow, Russia).

2.1.3 Laboratorijas dzīvnieki

Darbā tika izmantotas BALB/c līnijas pelēs (Envigo, Nīderlande). Darbus ar dzīvniekiem vadīja BMC speciāliste Dr. biol. Dace Skrastiņa. Pārtikas un veterinārā dienesta (PVD) izsniegta atļauja darbam ar laboratorijas dzīvniekiem: Izmēģinājuma projekta atļauja Nr.99 dzīvnieka izmantošanai procedūrā, priekš projekta “DNS zāļu modeļu pārbaude vēža audzēja gadījumos *in vivo*” (3.pielikums).

1.tabula.

Darbā izmantotie žurku TERT sekvenču atbilstoši peptīdi (sintezēti Synpeptide Co.,Ltd., Ķīna).

Table 1.

Rat TERT sequence peptides used in study (synthesized by Synpeptide Co.,Ltd., China).

Nosaukums	Sekvence	Žurkās TERT atrašanās vieta	Identiskums peles TERT, %	Identiskums cilvēka TERT, %	Literatūras avoti
TERT 1	PPSLTGA RRLVEII FLGSRPR TSGPFC	354-381	89	70	(Thalmensi et al., 2016) (Yan et al., 2013)
TERT 2	ILAMFLF WLMDT YVVQLL RSFFYIT ETT	530-558	93	79	(Fenoglio et al., 2015) (Thalmensi et al., 2016) (Fridman et al., 2012) (Adotevi et al., 2010) (Patel & Vonderheide, 2004) (Gross et al., 2004)
TERT 3	QKNRLF FYRKS VWSK LQSIGIR QQL	559-584	92	96	(Thalmensi et al., 2016) (Godet et al., 2012) (Adotevi et al., 2010) (Patel & Vonderheide, 2004) (Hernandez et al., 2002) (Gross et al., 2004)
TERT 4	DTWLA MPICRLR FIPK	600-616	100	44	(Brunsvig et al., 2006) (Fenoglio et al., 2015)
TERT 5	SLLHFFL RFVRHS VVKIDG RFYVQ	791-815	67	50	(Gross et al., 2004) (Thalmensi et al., 2016)
TERT 6	QQDGLL LRFVDD FLLVTPH L	845-865	95	85	(Fridman et al., 2012) (Adotevi et al., 2010) (Patel & Vonderheide, 2004)

1. Tabulas turpinājums.

TERT 7	KTVVN FPVETG ALGGA APHQLP AHCLFP W	888-917	90	76	(Yan et al., 2013) (Thalmensi et al., 2016) (Godet et al., 2012)
TERT 8	LGGAA PHQLPA HCLFP WCGLL LDTRTL E	901-929	93	82	(Yan et al., 2013) (Thalmensi et al., 2016) (Godet et al., 2012) (Fridman et al., 2012)
TERT 9	FLDLQ VNSLQ TVCINI YKIFLL QAYRF HACVI	973-1001	100	90	(Yan et al., 2013) (Thalmensi et al., 2016) (Fridman et al., 2012) (Adotevi et al., 2010) (Patel & Vonderheide, 2004) (Gross et al., 2004) (Hernandez et al., 2002)

Darbā izmantotie reaģenti un to ražotāji.

Table 2.

List of chemical reagents and their distributors.

Ražotājs	Reaģents
Gibco Life Technologies (ASV)	Gibco™ Penicillin-Streptomycin #15140122
Gibco Life Technologies (ASV)	RPMI 1640 barotne
Gibco Life Technologies (ASV)	Liellopu seruma albumīns (FBS)
Sigma (ASV)	DPBS buferis
Sigma (ASV)	Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) # P8139
Sigma (ASV)	Ionomycin # I0634
Sigma (ASV)	PBS fosfāta buferis ar NaCl 0.01 M pH 7.4, pulveris
BD Pharmingen (ASV)	Golgy plug
BD Pharmingen (ASV)	BD Horizon™ Fixable Viability Stain 660 #564405
BD Pharmingen (ASV)	Peles anti-CD8a-FITC #553031
BD Pharmingen (ASV)	Peles anti-CD4+-APC-H7 #560181
BD Pharmingen (ASV)	Peles anti-IFN γ -PE #554412
BD Pharmingen (ASV)	Peles anti-IL-2-BV421 #562969
BD Pharmingen (ASV)	Peles anti-TNF-BV510 #563386
BD Pharmingen (ASV)	Peles anti-CD8a-PE #553032
BD Pharmingen (ASV)	Peles anti-CD8a- BV510 #563068
BD Pharmingen (ASV)	Peles anti-CD8a- BV421 #563898
BD Pharmingen (ASV)	Stain buffer (FBS) #554656
BD Pharmingen (ASV)	Cytofix-cytoperm
Perkin Elmer (ASV)	XenoLight D-luciferīna kalija sals #112799
ThermoFisher Scientific	Trypsin-EDTA (0.5%) #15400054
ThermoFisher Scientific	UltraComp eBeads™ Compensation Beads #01-2222-41
Qiagen (Vācija)	EndoFree Plasmid Mega Kit

Darbā izmantotā aparatūra un tās raksturojums.

Table 3.

List of laboratory equipment.

Aparatūras nosaukums	Izgatavotājs	Aparatūras modelis
Centrifūga/maisītājs	BIOSAN Sci (Latvija)	Combi-Spin, FVL-2400N
Sausais termostats	BIOSAN Sci (Latvija)	THERMO-BLOCK TDB-120
Šūnu CO ₂ inkubators	New Brunswick Scientific (ASV)	Innova CO-48
Laminārs	Tellstar Industrial (Spain)	AV-100
Centrifūga	Eppendorf (Vācija)	5804
Centrifūga	Eppendorf (Vācija)	4524
Plūsmas citometrs	Beckton Dickinson (ASV)	BD FACSAria II
IVIS Spectrum	Perkin-Elmer (ASV)	Perkin-Elmer CT
Izoflurāna anestēzijas sistēma	Kent Scientific (ASV)	SomnoSuite
Elektroporātors	BEX (Japāna)	CUY21EDIT II

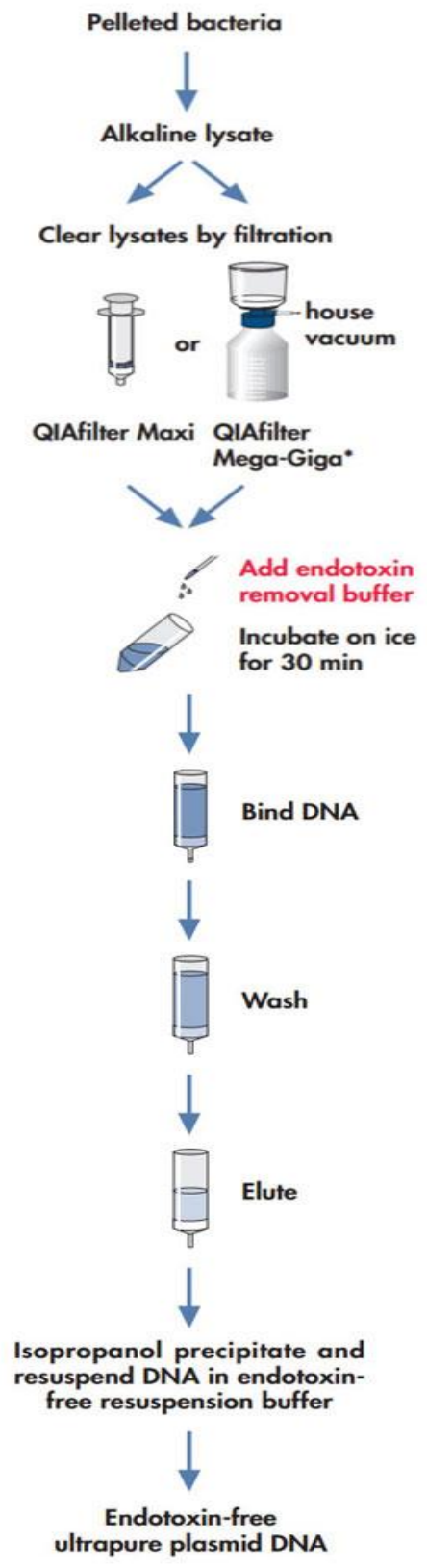
2.2 METODEDES

2.2.1 Plazmīdu izdalīšana

Šajā darba tiek izmantots protokols, lai izdalītu līdz 2,5 mg endotoksīnu nesaturošas DNS plazmīdas, izmantojot komplektu EndoFree Plasmid Mega Kit. DNS bez endotoksīna uzlabo transfekciju jutīgās eikariotu šūnās un ir būtiska gēnu terapijas pētījumiem.

Plazmīdas tika pavairotas XL1-blue *E.coli* celmā. Baktēriju šūnas tiek lizētas sārmainos apstākļos un neapstrādātie lizāti tiek notīrīti, izmantojot QIAfilter Cartridge. Šajā posmā filtrētajam lizātam pievieno endotoksīna noņemšanas buferšķīdumu un inkubē uz ledus. Pēc tam notīrītais lizāts tiek ielādēts anjonu apmaiņas gela kolonnā, kur plazmīdā DNS selektīvi saistās atbilstošos zemas sāls un pH apstākļos. RNS, olbaltumvielas, metabolītus un citus mazmolekulāros piemaisījumus noņem ar mazgāšanas līdzekli ar vidēju sāls daudzumu, un īpaši tīru plazmīdu DNS eluē buferšķīdumā ar augstu sāls saturu. DNS koncentrē un atsāļo, nogulsnējot ar izopropanolu, un savāc centrifugējot (2. attēls). Darbs tika veikts pēc komplekta ražotāja protokola: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/endofree-plasmid-kits/>

EndoFree Plasmid Kits



2. attēls. Plasmīdu izdalīšanas protokols ar EndoFree Plasmid Mega Kit.

Figure 2. EndoFree Plasmid Mega Kit protocol.

2.2.2 Eikariotu šūnu kultūru kultivēšana

1. Šūnas pēc glabāšanas šķidrā slāpekļī tika atmazgātas ar RPMI barotni, centrifugējot pie 390g 5 minūtes.

2. Šūnas tika resuspendētas pilnā RPMI barotnē (10% FBS; 1:100 Penicillin-Streptomycin), pārvietotas T25 šūnu kultivēšanas kolbā ar ventilācijas vāciņu un ieliktās inkubatorā 5%CO₂ +37°C šūnu augšanas tiek kontrolēta, izmantojot gaismas mikroskopu.

3. Sasniedzot 100% konfluenci šūnās tika pasažētās: nomazgātās ar Versen šķīdumu (PBS-EDTA), apstrādātas ar 0,05% tripsina šķīdumu, resuspendētās pilnā RPMI barotnē, savāktas centrifugējot pie 390g 5 minūtes, mazgātās ar PBS šķīdumu centrifugējot pie 390g 5 minūtes, atkal sasuspendētas un apšķaidītās 1:3 ar pilnā RPMI barotnē un iesietās šūnu kultivēšanas kolbā.

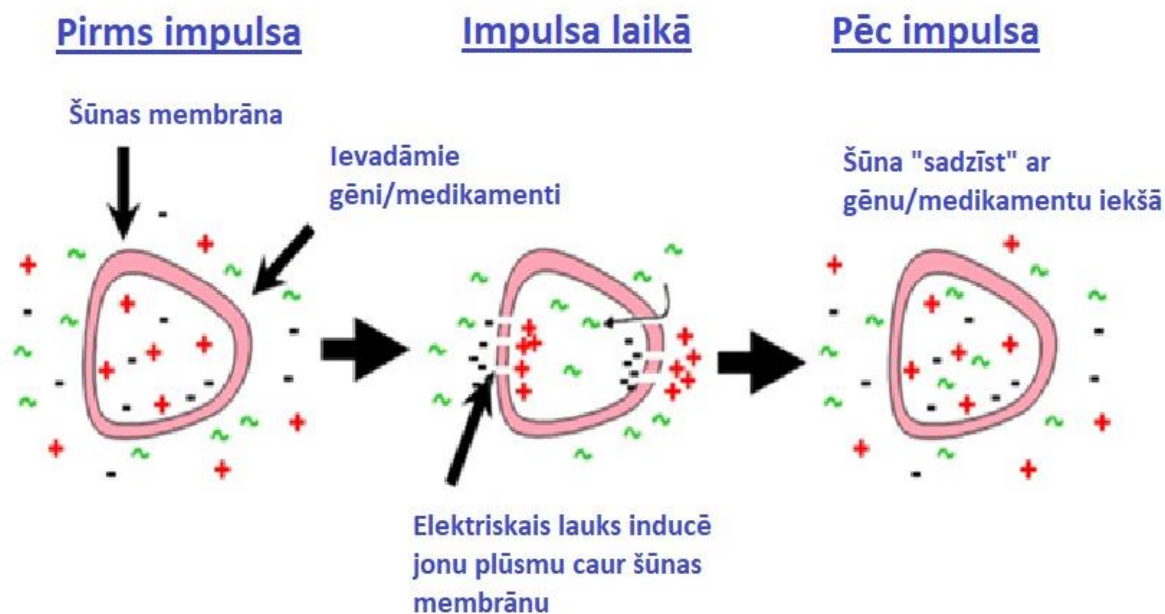
4. Gatavojot šūnas injekcijai dzīvniekos, šūnas tika nomazgātās ar Versen šķīdumu (PBS-EDTA), apstrādātas ar 0,05% tripsina šķīdumu, resuspendētās pilnā RPMI barotnē, savāktas centrifugējot pie 390g 5 minūtes, mazgātās ar PBS šķīdumu centrifugējot pie 390g 5 minūtes un resuspendētas tīrā RPMI barotnē (bez FBS un antibiotiķiem!) lai sasniegtu šūnu koncentrāciju 10⁵ šūnas mililitrā.

2.2.3 Elektroporācija

Elektroporācijas pētījumi šūnu līmenī sākās tikai 1980. gados. Neimans un viņa kolēģi 1982. gadā publicēja revolucionāru ziņojumu, kas parādīja, ka elektroporācija var izraisīt efektīvu plazmīdu DNS transfekciju peles gliomas šūnās (Neumann, Schaefer-Ridder, Wang, & Hofschneider, 1982). Tsong sniegtā elektroporācijas definīcija, kas joprojām ir plaši pieņemta: elektroporācija ir īslaicīgs elektrisko impulsu iedarbībā esošo šūnu membrānu daļējas caurlaidības zudums, tādējādi izraisot jonu noplūdi, metabolītu aizplūšanu un palielinātu šūnu preparātu, molekulārās zondes un DNS uzņemšanu. 21. gadsimtā elektroporācija ir bijusi viena no populārākajām nevirusu šūnu transfekcijas metodēm gan *in vitro*, gan *in vivo*, ko varēja attiecināt uz sistēmas manevrēšanas spēju un tās daudzpusību transfekcijas šūnu tipu ziņā (Kumar, Nagarajan, & Uchil, 2019).

Ir zināms, ka šūnu membrāna galvenokārt sastāv no lipīdu divslāņa ar apmēram 5 nm biezumu, kas darbojas kā šķērslis šūnu komponentiem no ārpusšūnu vides. Kā elektriskais izolators, kam normālos fizioloģiskos apstākļos piemīt izcila dielektriskā īpašība, tas uztur elektrisko potenciālu (~ 0,07 V) pāri membrānai, jo starp citosolu un šķidrums ekstracelulārajā

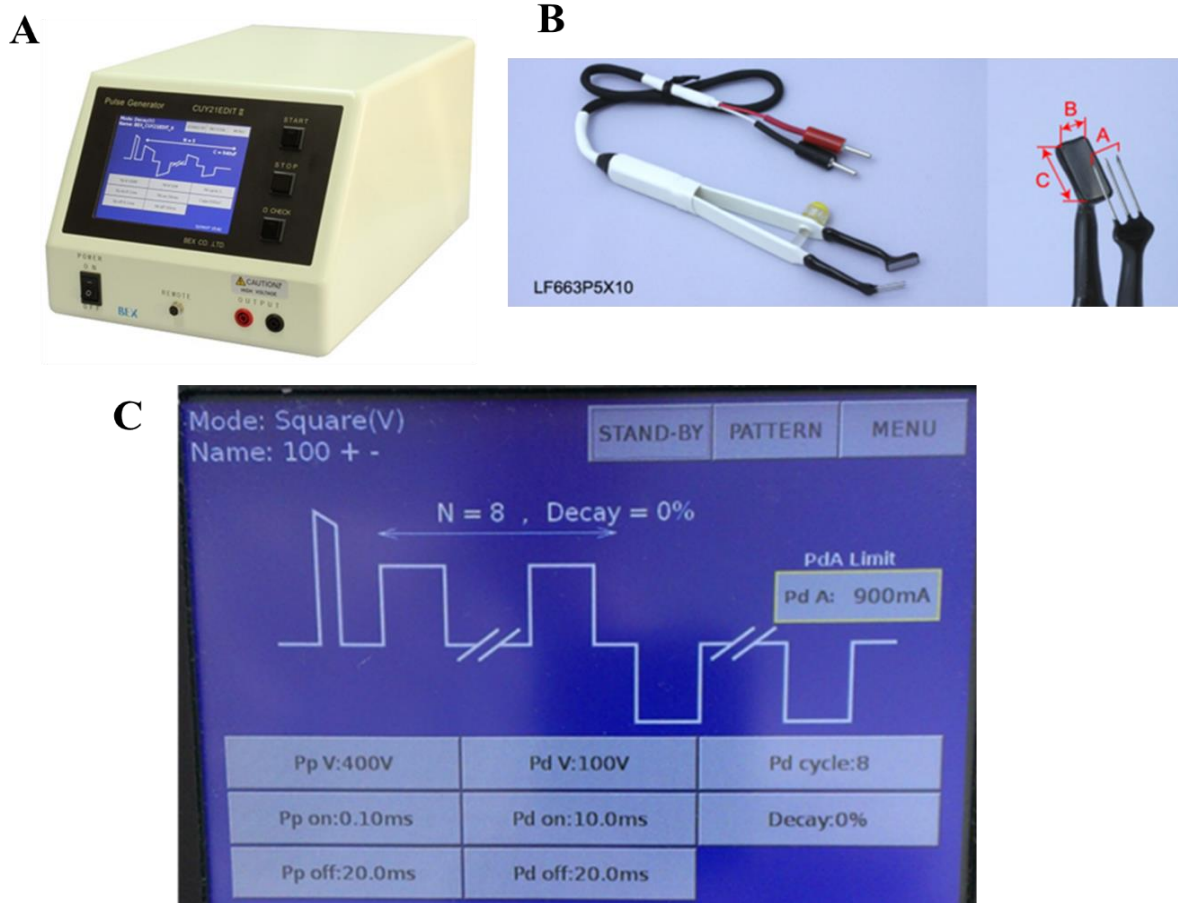
vidē ir ievērojamas jonu koncentrācijas atšķirības. Teorētiski elektroporācija ir efektīva stratēģija poru veidošanai šūnu membrānā, izmantojot potenciālu starpību visā membrānā. Kad potenciālu starpība sasniedz noteiktu sprieguma lielumu, elektroporācijas varbūtība, kas notiek uz šūnu membrānas, palielinās (Shi et al., 2018) (3. attēls).



3. attēls. Elektroporācijas darbības princips

Figure 3. The principle of electroporation

DNS ieviešanas un elektroporācijas laikā dzīvnieki tiek pakļauti isoflurāna respiratorai anestēzijai. Divdesmit mikrogrami (20 μg) plazmīdu DNS izšķaidīta 20 μl PBS buferī tika ievadīta intradermāli ādā uz gurniem (2 injekcijas katrai pelei labā un kreisā gurnā). Elektroporācija tika veikta pielietojot CUY21EDIT II impulsu ģeneratoru (4. attēls A) ar kombinēto dakšas un plāksnes pincetes tipa elektrodu (4. attēls B). Elektroporācijas programma ietver 0,1 ms garu un 400V stipru caursītošu impulsu, kas veido poras šūnu membrānās un virkni ar 10 ms gariem un 100V stipriem virzošiem impulsiem, kas piegādā DNS šūnās. Elektroda dakša tiek ievadīta zem ādās un novietota injekcijas vietas apakšā, bet elektroda plāksne tiek uzlikta virs injekcijas vietas. Mainot elektrodu pozīciju ap injekcijas vietu tiek panākts lai elektroporācijas laikā audu pretestība turētos robežās 1,8-2,2 k Ω . (4. attēls C).



4. attēls. A - CUY21EDIT II impulsu ģenerators. B - Kombinētais dakšas un plāksnes pincetes tipa elektrodos. C - Elektroporācijas programma.

Figure 4. A - CUY21EDIT II pulse generator. B - Tweezers with fork and a plate electrode, BEX. C – Electroporation program.

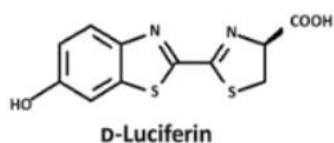
2.2.4 Bioluminiscences attēlveidošana

Bioluminiscences attēlveidošana (BLI) tika attīstīta priekš maziem laboratorijas dzīvniekiem, lai pētītu notiekošos bioloģiskos procesus *in vivo*. Tāda optiska attēlveidošana ir lēta, neinvazīva un atvieglo reāllaika analīzi par slimību procesiem molekulārā līmenī dzīvajos organismos. Metode tika izmantota pētījumos, lai kontrolētu transgēnu ekspresiju, infekcijas progresēšanu, audzēja augšanu un metastāžu veidošanos, transplantāciju, toksikoloģiju, vīrusu infekcijas un gēnu terapiju. Bioluminiscences attēlveidošana (BLI) balstās uz jutīgas, redzamas gaismas noteikšanu, kas rodas molekulārā substrātā enzīma (luciferāzes) mediētās oksidēšanas laikā (Sadikot & Blackwell, 2005).

Luciferāze ir gaismu ražojošs enzīms, kas piemīt jāņtārpiņiem un dažiem jūras organismiem. Jāņtārpiņa luciferāze ir polipeptīds, kas tiek kodēts luc gēnā. Luciferāze ir

piemērots gēnu ekspresijas marķieris tāpēc, ka tam nav pēctranslācijas modifikācijas un *in vivo* pussabrukuma laiks ir apmēram trīs stundas. Jāņtārpiņa luciferāze apvieno luciferīnu oksidēšanu ar enerģijas pārnešanos no ATP (5. attēls) un izstaro dzeltenzaļo gaismu. Gaismas emisijai no jāņtārpiņa luciferāzes reakcijas ir 530–640 nm viļņu garuma diapazons un maksimums pie 562 nm. Šis emisijas spektrs kopā ar bioloģisko audu optiskajām īpašībām ļauj gaismai (īpaši ar spektra saturu virs 600 nm) tikt cauri dažiem audu centimetriem (Eun, 1996).

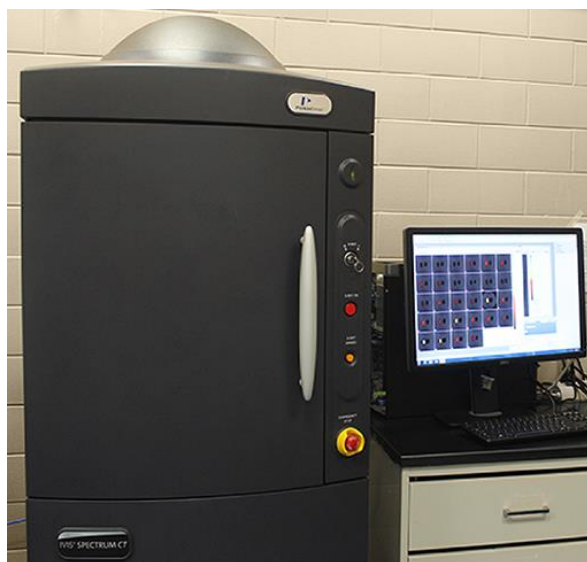
Firefly luciferase (Luc)



5. attēls Jāņtārpiņa luciferāze (luc) gaismas starojumu veidošanas reakcija (Eun, 1996).

Figure 5. Reaction of firefly luciferase (luc) light emanation (Eun, 1996).

Luciferīna šķīdums PBS buferī tiek ievadīts pelēm peritoneāli, substrātā deva tiek aprēķinātā kā 0,15 mg luciferīna uz 1 g peles svara. Pagaidot 10 minūtes, lai luciferīns ar asinsriti tiek vienmērīgi izplatīts pa peļu organismu tiek veikta bioluminiscences attēlveidošana. Darbā mēs izmantojam IVIS Spectrum (Perkin Elmer) kameru (6. attēls).



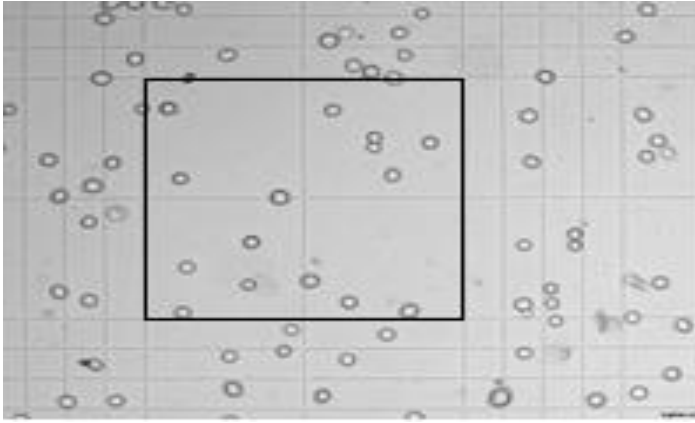
6. attēls. Darbs ar *in vivo* Bioluminiscences attēlveidošana (IVIS Spectrum CT, Perkin-Elmer)

Figure 6. Work with *in vivo* bioluminescence imaging (IVIS Spectrum CT, Perkin-Elmer)

Lai mazinātu ar nejaušo dzīvnieku kustību izraisītos traucējumus, attēlveidošana tika veikta pielietojot isoflurāna respiratoru anestēziju. Attēli tika uzņemti saskaņā ar ražotāja rekomendācijām izmantojot automātisko optimizācijas režīmu. Foto- un bioluminiscences attēlu kombinācija tika apstrādāta izmantojot Living Image Software programmatūru. Bioluminiscences intensitāte izvēlētajos reģionos tika aprēķināta kā izstaroto fotonu skaits sekundē (*total flux*). Bioluminiscences attēlveidošana nepieciešama, lai dinamikā novērotu audzēju attīstību *in vivo* un noteiktu vai notiek audzēja veidošanās vai atgrūšana (attēls)

2.2.5 Peļu splenocītu izolēšana

1. Peles liesu pārnes uz šūnu filtra (ar sietveida apakšu), ievieto Petri platē un pievieno 1 ml RPMI 1640 barotnes.
2. Izmantojot šļirces spiedņa daļu, liesu berž cauri sietiņam (*cell strainer*) ar caurumu izmēru 70 µm Petri platē un noskalo ar 2-3 ml RPMI 1640 barotnē.
3. Šūnas ar pipeti pārnes 15 ml stobrā un pielej RPMI1640 barotni līdz 10 ml.
4. Šūnu suspensiju centrifugē 1500 apgr./min. (390*g) 10 min 4°C temperatūrā.
5. Nolej supernatantu.
6. Nogulsnes resuspendē 5 ml eritrocītu līzes buferī (ACK) un inkubē istabas temperatūrā 5 min. Ik pa brīdim sakrata.
7. Pārtrauc reakciju atšķaidot ar 10 ml 1x PBS buferi.
8. Šūnu suspensiju centrifugē 1500 apgr./min. (390*g) 10 min 4°C temperatūrā.
9. Nolej supernatantu, nogulsnes resuspendē 5 ml pilnā RPMI barotnē (5% FBS, 1:100 Penicillin-Streptomycin).
10. Saskaita šūnas:
 - 10.1. Samaisīt 4 µl šūnas 100 µl PBS eppendorfa stobriņā.
 - 10.2. No maisījuma paņemt 10 µl un samaisīt 10 µl trypane blue.
 - 10.3. Pievieno 10 µl Goryaeva režģi.
 - 10.4. Šūnu skaits vienā lielā režģa laukumā (marķēts ar treknrakstu) atbilst $2,5 \cdot 10^5$ šūnām/ml (Goryaeva režģis) (7. attēls).
 - 10.5. Saskaitīt vismaz trīs kvadrātus un izveidot vidējo vērtību.



7. attēls. Parauga skaitīšanas piemērs Gorjaevā režģī.

Figure 7. Cell counting in Goryaev chamber example.

11. Ilgstošai glabāšanai šūnas centrifugē ar 1500 apgr./min. (390*g) 10 min 4°C temperatūrā, resuspendē saldēšanas barotnē (50% FBS, 40% RPMI, 10% DMSO), ievieto kriokonservācijas stobros, lēnām (pa nakti) atdzesē līdz -80° C un ievieto tvertnē ar šķidro slāpekli.
12. Stobrus ar saldētiem splenocītiem atsaldēšanai izņem ārā no tvertnes ar šķidro slāpekli un atkausē šūnu suspensiju ievietojot stobriņus ūdenī ar temperatūru + 37° C. Šūnu suspensiju pārnes 15 ml stobriņā, kas satur 10 ml pilnas RPMI barotnes. Centrifugē šūnas suspensiju pie 300-400*g 10 minūtes 4°C temperatūrā. Supernatantu izlej un resuspendē šūnas 1 ml pilnā RPMI barotnē.

2.2.6 Plūsmas citometrija

Multiparametru plūsmas citometrija ir spēcīgs analītiskais un preparatīvais instruments. Tas ļauj ātri izmērīt atsevišķu šūnu vai daļiņu fizikālās un ķīmiskās īpašības, kad plūst cauri, uz šķidrums plūsmas fokusētam lāzera gaismas staram. Izmantojot plūsmas citometriju, ir iespējams noteikt šūnu tipus jauktajās šūnu populācijās un pētīt šūnas atsevišķi vai funkcionālo starpšūnu mijiedarbību. Plūsmas citometriju bieži izmanto, lai identificētu molekulas uz šūnas virsmas vai šūnas iekšpusē, izmantojot specifiskās, ar fluorescējošām krāsām iezīmētas antivielas. Vairāku fluorescences parametru vienlaicīga mērīšana ļauj veikt detalizētu analīzi ko-ekspresētām strukturālām, receptoru, signalizācijas un efektoru molekulām, kā arī nukleīnskābēm (BDBiosciences, 2000).

Katru splenocītu paraugu ienes U-veida dibena 96-bedrīšu plātē $1,5 \times 10^6$ šūnas/bedrītē, ievienojot līdz 200 μ l RPMI barotni ar Golgi Plug reaģentu un atbilstošu stimulu. Šūnas stimulē

ar specifiskiem antigēniem - peptīdiem koncentrācijā 10 µg/ml un mitogēniem stimuliem - PMA (50 ng / ml) un ionomicīna (1 µg / ml) maisījumū. Golgi Plug traucē ekspresēto citokīnu sekrēciju apkartēja vidē, nodrošinot to uzkrāšanos šūnās.

Protokols

Stimulācija:

1. Uztaisīt PreMixes no ICS barotnes (RPMI, 5% FBS, 1% Pen/Strep, Golgi Plug 1:200) ar stimuliem.
2. Mediju kontrole un kompensācijas kontrole: ICS barotne, 50 µl uz iedobumu.
 - 2.1. Testēti peptīdi: sagatavot 4x stimulējošu vielu šķīdumu ICS barotne – 40 µg/ml, 50 µl uz iedobumu.
 - 2.2. Mitogēnie stimuli PMA/Ionomicīns: sagatavot 4x PMA (200 ng / ml) un ionomicīna (4 µg / ml) maisījumu ICS vidē, 50 µl uz iedobumu.
3. Ienest ISC vidi ar stimuliem, U-veida plate 50 µl uz iedobumu.
4. Pievienot 150 µl šūnu suspensiju RPMI ($1,5 \times 10^6$ šūnas/ bedrītē priekš paraugiem, 1×10^6 šūnas/iedobuma priekš kompensācijas kontrolēm).
5. Inkubēt 4,5 – 6 stundas pie 37°C un 5% CO₂.

Beigto šūnu selektīva krāsošana:

1. Pārnest šūnas 2 ml eppendorfa stobriņos
2. Centrifugēt stobriņus 5 minūtes 350*g
3. Aspirēt supernatantu ar automātisko pipeti un mazgāt šūnas, pievienojot 200 µl DPBS buferi katrā dobumā.
4. Centrifugēt stobriņus 5 minūtes 350*g
5. Resuspendēt šūnas paraugus 200 µl DPBS buferī ar 1:10 000 atšķaidīto FVS660 reaģentu.
6. Inkubēt 10-15 minūtes pie +4 °C.

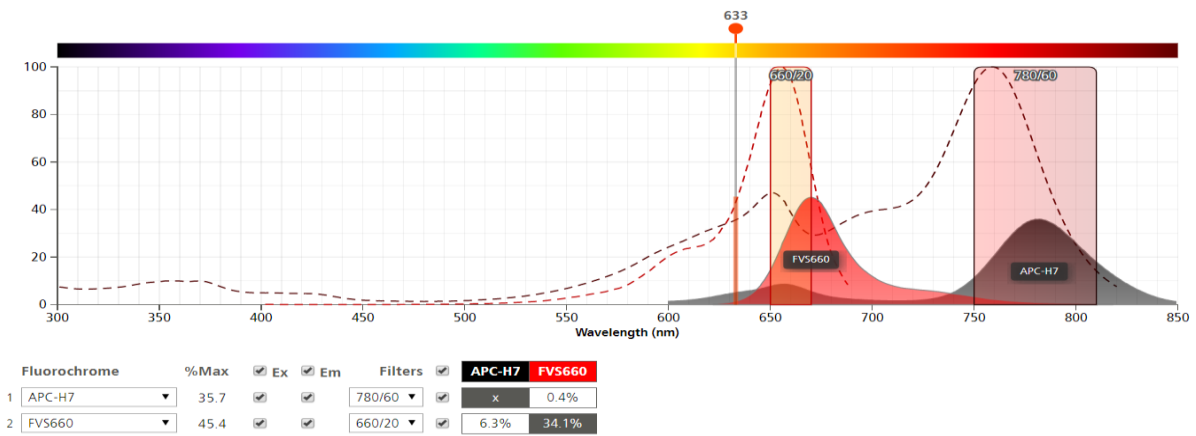
Šūnas virsmas un iekššūnas marķieru krāsošana ar fluorescenci iezīmētām monoklonālām antivielām tika veikta, izmantojot BD Cytotfix/Cytoperm reaģentu komplektu pēc ražotāja protokola: <https://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/others/00-81014-4.pdf> . Ar antivielām tiek noteikti T-limfocītu šūnu virsmas receptori CD4 un CD8, un iekššūnas marķieri – citokīni IFN-γ, IL-2 un TNF-α, kas ir raksturīgi Th1 tipa imūnai atbildei.

Kompensācijas matricas izveidošanai tika izmantotas UltraComp eBeads™ lodītes, izmantojot ražotāju protokolu: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/01-2222.pdf> .

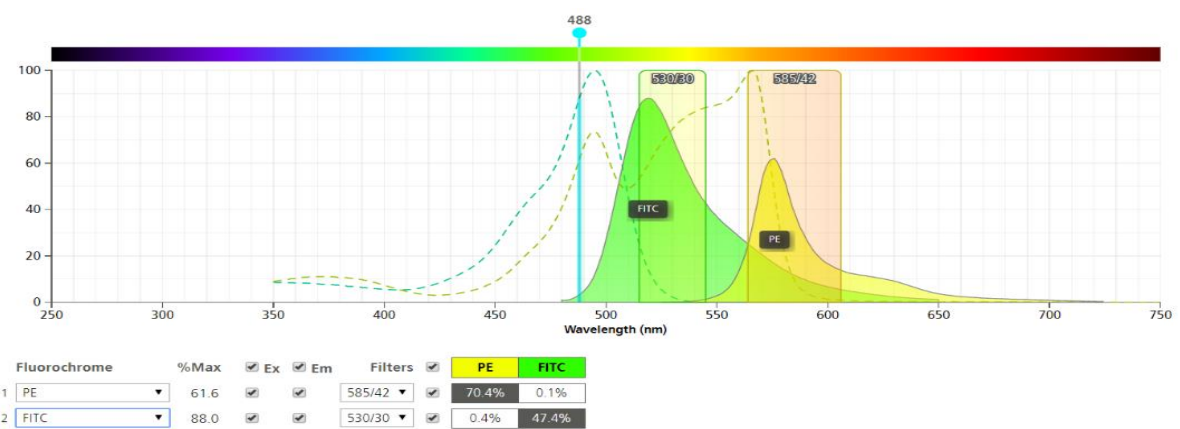
Plūsmas citometrija:

Šūnu suspensija tika analizēta BD FACSAriaII plūsmas citometrijas iekārtā. Šūnas tika raksturotas, mērot šūnu lielumu (frontālo izkliedi, FSC), šūnu iekšējo granularitāti un šūnu membrānas gludumu (sānu izkliede, SSC), šūnu dzīvotspēju (fluorescējošo FVS660 krāsošanu), un tika atrasts procentuālais daudzums CTL šūnu CD8+ populācijas (FITC krāsošana), Th šūnu CD4+ populācijas (APC-H7 krāsošana), šūnas, kas ekspresē citokīnus IFN- γ (PE krāsošana), IL-2 (BV421 krāsošana) un TNF- α (BV510 krāsošana).

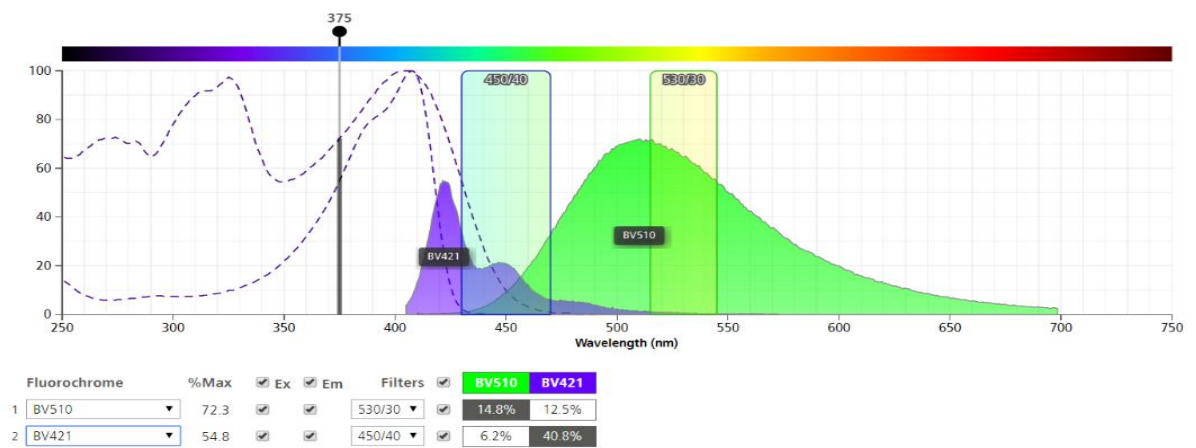
Dati tika savākti izmantojot BD FACSDiva™ 8.0.2 programmatūru un pārnesti FCS v 3.0 failu veidā FlowJo vX.07 programmā tālākai analīzei. Lai novērstu fluorohromu ierosināšanas un emisijas spektru pārklāšanās dēļ radušos traucējumus (8.attēls) tika veikta spektrāla kompensācija. Neiekrāsotās šūnas tika izmantotas autofluorescences noteikšanai, bet ar katru fluorescējošo MAb iezīmi individuāli krāsotās lodītēs un ar FSV660 krāsotas šūnas – lai noteiktu pamata detektorā reģistrētam fluorescences līmenim atbilstošu visos pārējos eksperimentā izmantotos detektoros reģistrēto fluorescenci – tā saucamo *spillover* efektu. Izmantojot iegūtos datus BD FACSDiva programma veidoja kompensācijas matricu, kas tika pielietota rezultātu korekcijai gadījumos, kad tika izmantots fluorescējošo iezīmju maisījums (Herzenberg et al., 2002).



A.



B.



C.

8. attēls. Darbā izmantoto fluorohromu ierosināšanas un emisijas spektri. Attēlā ir atzīmēti ierosināšanas lāzeru un detektoru filtru viļņu garumi. A – Sarkanais lāzers. B – Zilais lāzers. C – Tuvo UV lāzers (www.bdbiosciences.com).

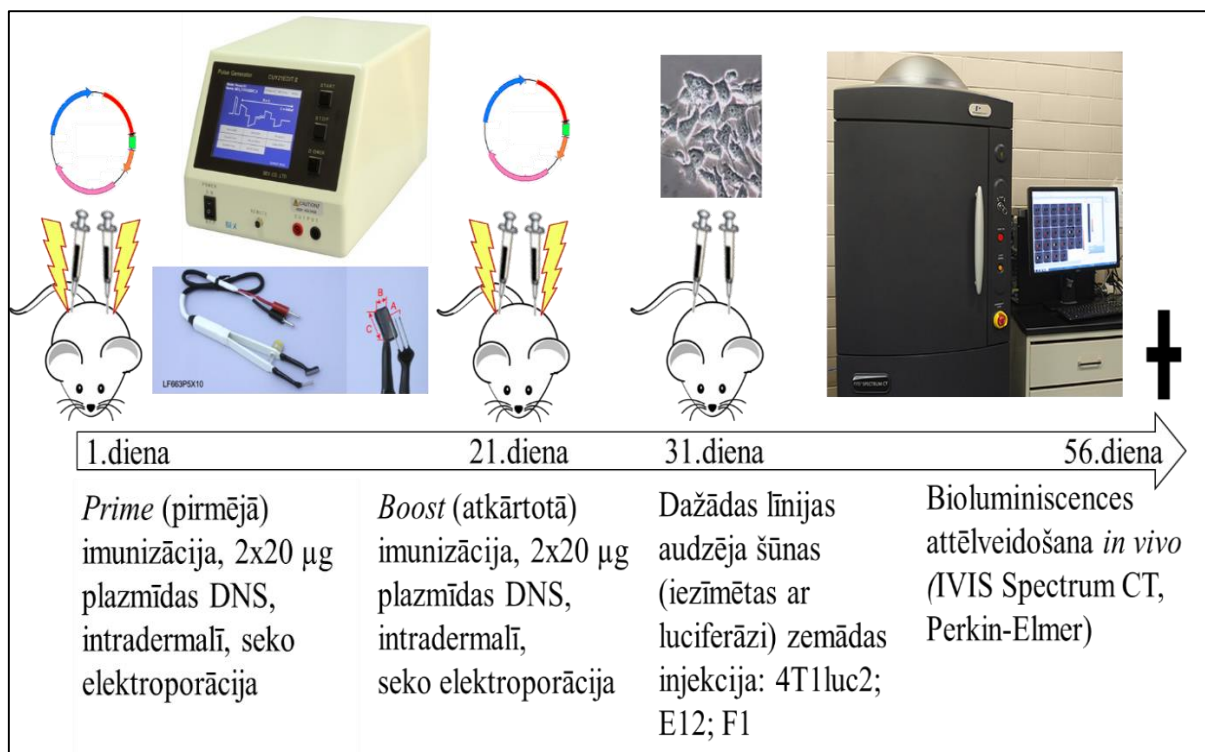
Figure 8. Fluorochromes excitation and emission specters used in the work. The figure shows the wavelengths of lasers and detector filters. A- Red laser. B – Blue laser. C - Near UV laser (www.bdbiosciences.com)

2.2.6 Datu apstrāde un analīze

Citometrijas dati tika savākti izmantojot BD FACSDiva™ v.8.0.2 programmatūru un pārnesti FCS v3.0 failu veidā FlowJo v.X.07 programmā tālākai analīzei. Citometrijas datu primāra analīze tika veikta ar TIBCO Statistica programmu izmantojot Kruskal-Wallis ANOVA testu. Bioluminiscences attēlveidošanas datu apstrādi veic ar Living Image v.4.5 programmu. Bioluminiscences un citomertijas statistiski dati tika attēloti GraphPad Prism v.9.02. programmā, izmantojot Mann Whitney testu. Tabulas un grafiki tika veidotas izmantojot MS Excel 2016.

3. REZULTĀTI

3.1 Audzēju attīstības novērošana imunizētos dzīvniekos



9. attēls. Eksperimenta shēma.

Figure 9. Experiment scheme.

Lai pārbaudītu izmantoto DNS imunogēnu aizsargspējas tika izmantota sekojoša eksperimenta shēma (9.attēls) .

Peles tika sadalītās grupās, pa 5 dzīvniekiem katrā (4. tabula). Eksperiments tika veikts divos posmos, dažām grupām tas tika veikts atkārtoti.

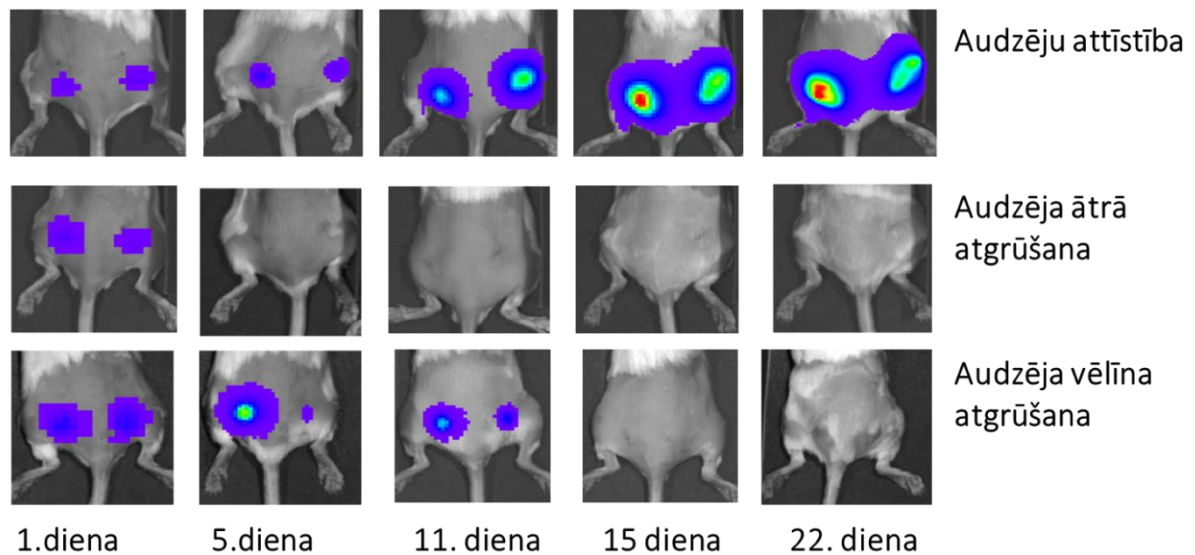
Pētījumā izmantoto peļu sadalījums grupās.

Table 4

Mice grouping used in research.

Peles daudzums katrā grupā		Audzēju šūnas		
		4T1luc2	E12 full TERT	F1 RT-TERT
Imunogēni	pVax	5	5	5
	Aktīvais TERT	5	5	5
	RT-TERT _{in}	5	5	5

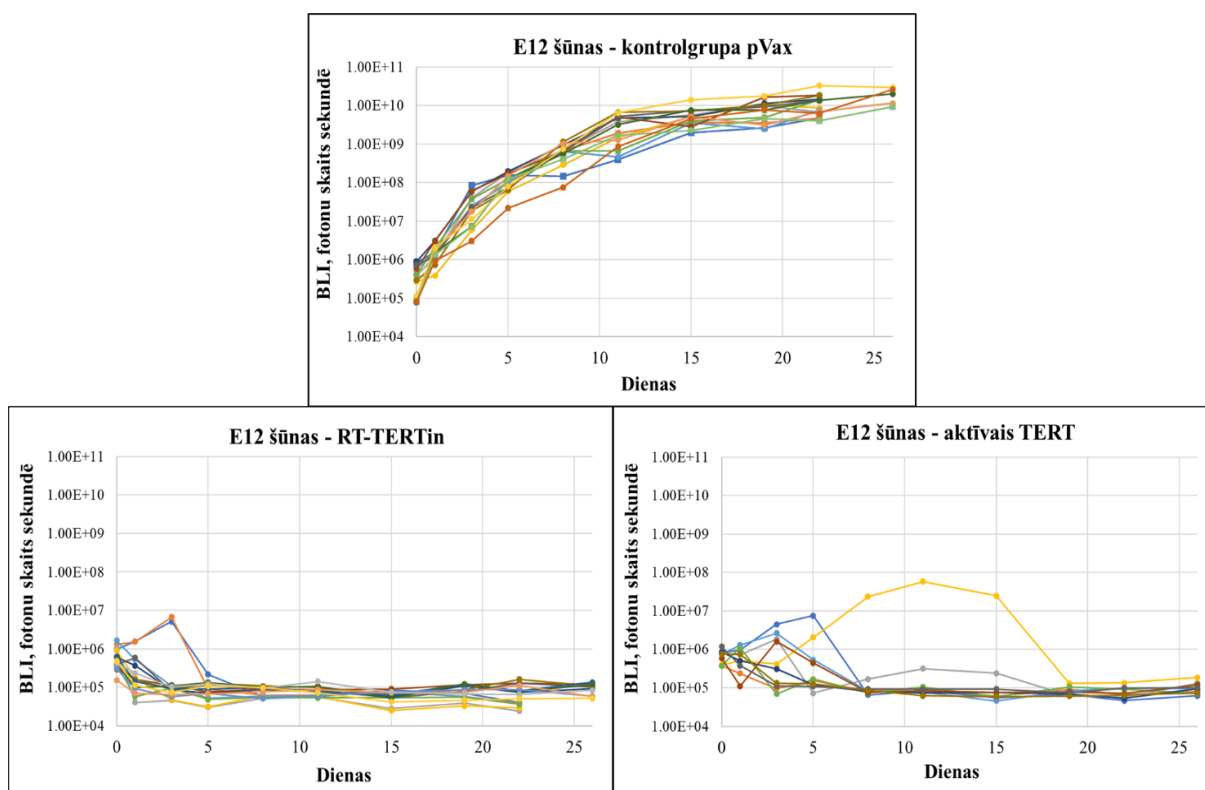
Pirmajā dienā pelēm tika uztaisīta *prime* (pirmējā) imunizācija ar 20 µg plazmīdas DNS intradermāli uz gurniem (2 injekcijas katrai pelei) un tam sekoja elektroporācija. 21. dienā tika uztaisīta *boost* (atkārtota) imunizācija ar 20 µg plazmīdas DNS intradermāli uz gurniem (2 injekcijas katrai pelei) un tam sekoja elektroporācija. 31. dienā pelēm zem ādas tika injicētās ar luciferāzi iezīmētas adenokarcinomas šūnas: 4T1luc2, E12, F1. Katra pele saņēma divas 50µ šūnu suspensiju šķīduma zemādas injekcijas virs labas un kreisas lāpstiņas, 5000 šūnās katra injekcija. Ar bioluminiscences attēlveidošanas metodi (IVIS Spectrum CT, Perkin-Elmer) regulāri (eksperimenta sākumā reiz 2-3 dienas, eksperimenta beigās reiz 4 dienās) nosakot luciferāzes aktivitāti audzējā šūnās tika novērota dinamiskā audzēju attīstība *in vivo* . Tika noteikti trīs dzīvnieku reakcijas profili: audzēju attīstība, kad bioluminiscences signāls pieauga līdz pašam eksperimenta beigām; audzēja ātrā atgrūšana, kad bioluminiscences signāls jau otrā-trešā dienā pēc šūnas injekcijas krita līdz fona līmenim; un audzēja vēlīnā atgrūšana, kad pirmās dienās pēc injekcijas bioluminiscences signāls pieauga kas liecina par audzējā attīstību, bet vēlāk sāka mazināties un nokritās līdz fona līmenim (10. attēls).



10. attēls. *In vivo* Bioluminiscences attēlveidošanas piemērs (IVIS Spectrum CT, Perkin-Elmer)
 Figure 10. Example of *in vivo* bioluminescence imaging (IVIS Spectrum CT, Perkin-Elmer)

Aparāts ne tikai spēj reģistrēt BLI signālus attēlveidā, bet arī kvantificē tos. Tika noteikts bioluminiscences signālu līmenis (fotonu skaits sekundē), kas ir proporcionāls audzēju šūnas skaitam. Kvantificēšanas rezultāti ir parādīti attēlos 11-13, katrai grupai visu eksperimentu dati ir apkopoti atsevišķi.

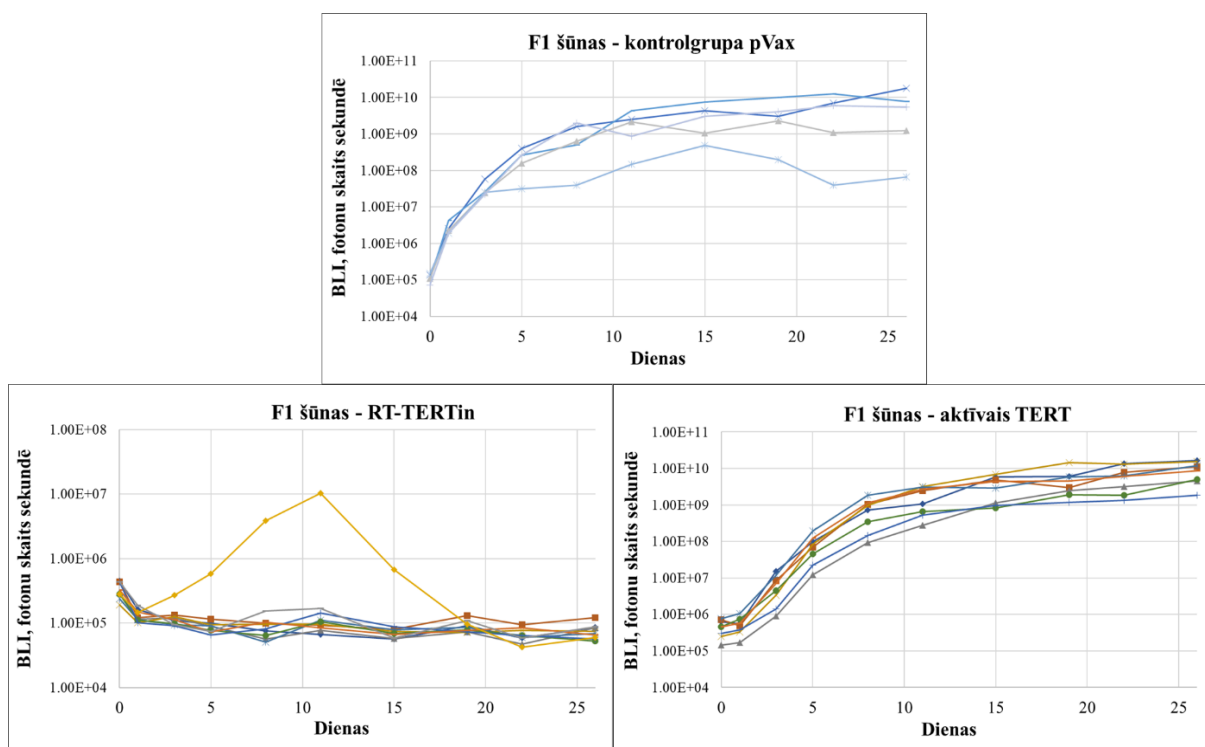
E12 pilna garuma žurku TERT ekspresējošo šūnu gadījumā audzēji izauga visam kontroles grupas (pVax) pelēm. Salīdzinot kontroles grupu ar RT-TERTin un aktīvo TERT imunizētām konstrukcijām ir labi redzams, ka audzēji tika atgrūsti visam pelēm. Aktīva TERT grupā vienai pelei sākumā bija novērota audzēju attīstība, bet pēc 15. dienas tika novērota strauja signālu samazināšana, kas liecina par audzēju atgrūšanu (11.attēls).



11. attēls. Ar *in vivo* bioluminescences analīzi noteikta audzēju attīstība no pilna garuma TERT ekspresējošās E12 līnijas šūnas ar DNS imunizētās pelēs: pVax TERT, pVax RT-TERTin un pVax1 (kontroles grupa)

Figure 11. Full length TERT expressing E12 cell line tumor growth analysis in DNA immunized mice: pVax TERT, pVax RT-TERTin and pVax1(controls), determined by *in vivo* bioluminescence

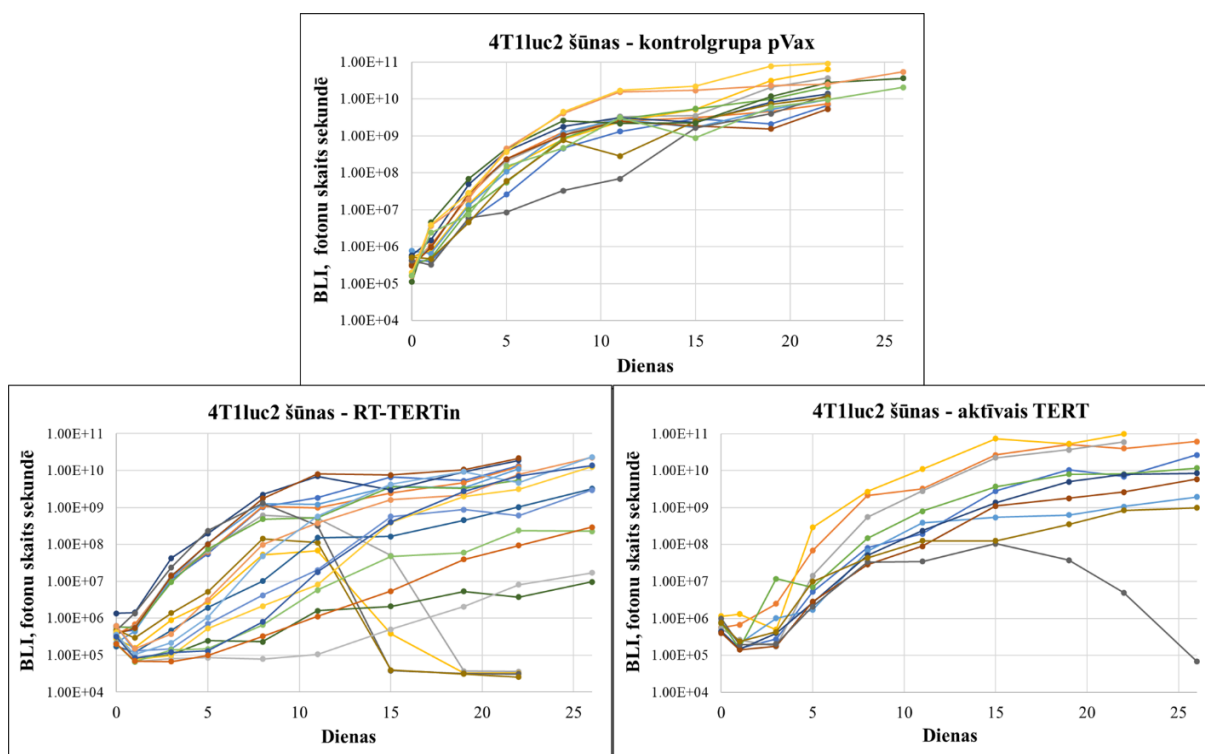
F1 žurku RT-TERT domēnu ekspresējošo šūnu gadījumā audzēji izauga visam kontroles grupas (pVax) pelēm, ka arī visam ar aktīvo TERT imunizētām konstrukcijām pelēm. Ar RT-TERTin imunizētām konstrukcijām audzēji tika atgrūsti visam pelēm. Vienai pelei RT-TERTin grupā līdz 12.dienai tika novērota audzēju augšana, bet pēc 12.dienas tika novērota strauja atgrūšana (12 attēls).



12. attēls. Ar *in vivo* bioluminiscences analīzi noteikta audzēju attīstība no RT-TERT ekspresējošās F1 līnijas šūnās ar DNS imunizētās pelēs: pVax TERT, pVax RT-TERTin un pVax1 (kontrols grupa)

Figure 12. RT-TERT expressing F1 cell line tumor growth analysis in DNA immunized mice: pVax TERT, pVax RT-TERTin and pVax1(controls), determined by *in vivo* bioluminescence.

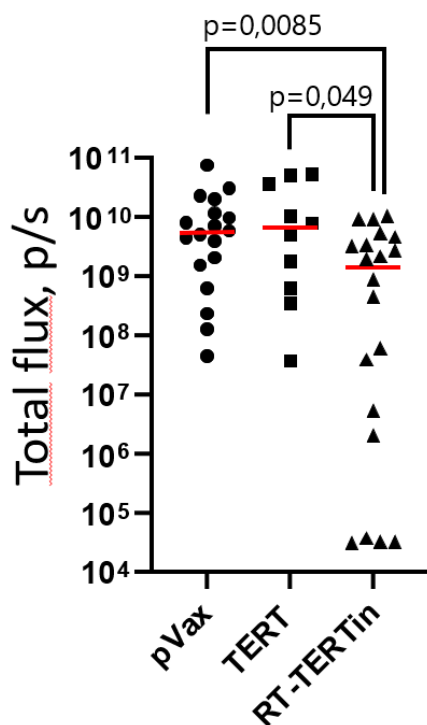
4T1luc2 nemodificētam adenokarcinomas šūnām rezultāti nav tik viennozīmīgi, ka E12 un F1 šūnām. 4T1luc2 šūnām audzēji izauga visam kontrols grupas (pVax) pelēm. RT-TERTin grupā trim pelēm pēc 12. dienas audzēju attīstībā tika apturēta, bet visam parejam pelēm audzēji attīstījās līdz pēdējai dienai. Aktīva TERT grupā vienai pelei pēc 15. dienas sākās audzēja atgrūšana, bet visam parejam pelēm audzēji attīstījās un izauga (13.attēls).



13. attēls. Ar *in vivo* bioluminiscences analīzi noteikta audzēju attīstība 4T1luc līnijas šūnas ar DNS imunizētās pelēs: pVax TERT, pVax RT-TERTin un pVax1 (kontroles grupa)

Figure 13. 4T1luc cell line tumor growth analysis in DNA immunized mice: pVax TERT, pVax RT-TERTin and pVax1 (controls), determined by *in vivo* bioluminescence.

Lai precīzāk raksturotu izmantoto imunogēnu aizsargspējās pret 4T1luc2 audzēja šūnām tika veikta iegūto bioluminiscences datu statistiska analīze. Vislabāk atšķirība starp grupām bija redzama 19. dienā pēc šūnu injekcijas (14. attēls).



14. attēls . BLI no primāriem audzējiem kas attīstījās no 4T1luc2 šūnām 19. dienā pēc injekcijas pelēm kas tika imunizētās ar pVax vektoru, TERT un RT-TERTin ekspresējošām plazmīdām, statistiskā nozīmība tika aprēķināta izmantojot Mann Whitney testu.

Figure 14. BLI of primary tumors developed from the 4T1luc2 cells at day 19 post injection in mice immunized by pVax vector, TERT and RT-TERTin expressing plasmids, statistical significance is calculated using Mann Whitney test.

Tabulā apkopoti bioluminiscences attēlveidošanas rezultāti par audzēju atgrūšanas procentuālo attieksmi. Kontrolgrupā (pVax) 100% izauga visi audzēji, 4T1luc2 šūnu līnijas grupā audzēja šūnu atgrūšana notika 10% ar aktīvo pilna garuma TERT imunizētām pelēm un 20% ar RT-TERTin. E12 šūnu līnijas grupā audzēja šūnu atgrūšana notika 100% ar aktīvo pilna garuma TERT imunizētām pelēm un 100% ar RT-TERTin. F1 šūnu līnijas grupā audzēja šūnu atgrūšana notika 0% ar aktīvo pilna garuma TERT imunizētām pelēm un 100% ar RT-TERTin (5. tabula).

Audzēju šūnu atgrūšana (%).

Table 5.

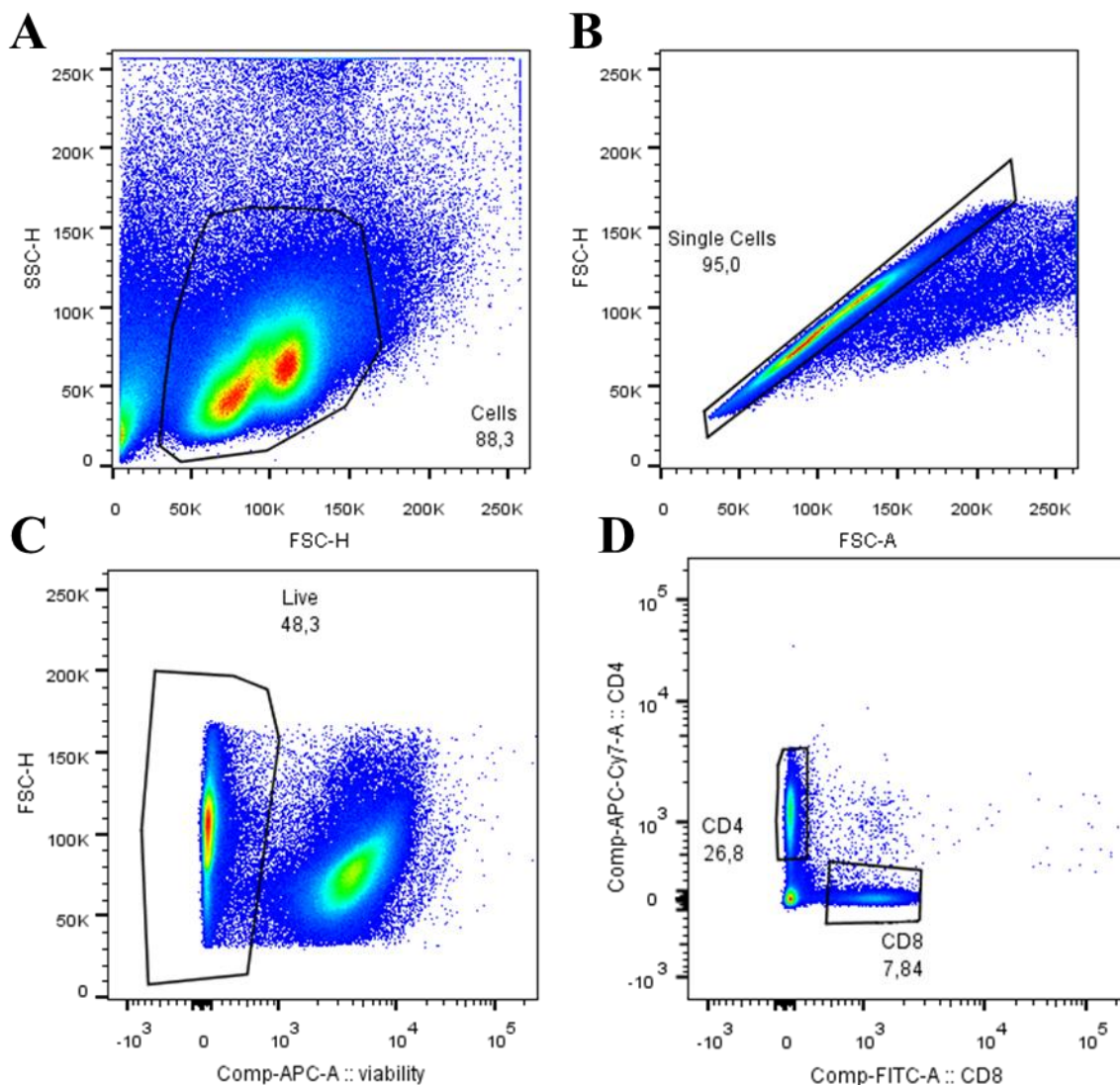
Tumor cell rejection (%).

		Audzēju šūnas		
		4T1luc2	E12	F1
Imunogēni	pVax	0% (0/18)	0% (0/22)	0% (0/10)
	Aktīvais pilna garuma TERT	10% (1/10)	100% (10/10)	0% (0/8)
	RT-TERTin	20% (4/20)	100% (16/16)	100% (10/10)

3.2 Specifiskas T-šūnu imūnatbildes noteikšana pret TERT epitopiem

Specifiska T-šūnu imūnatbilde tika noteikta stimulējot no eksperimenta izmantotiem dzīvniekiem izolētas liesas šūnas ar TERT sekvenču saturošiem oligopeptidiem un izmantojot plūsmas citometriju nosakot Th-1 imūnas atbildes tipam IFN- γ , IL-2 un TNF- α citokīnu ekspresiju stimulēto CD4+ un CD8+ limfocītu populācijās. Ka negatīva kontrole tika izmantota stimulācija ar RPMI barotni, bet par pozitīvo – ar mitogēno aģentu PMA un ionomicina maisījumu. Kopā tika izanalizēti 160 stimulēto šūnu paraugi.

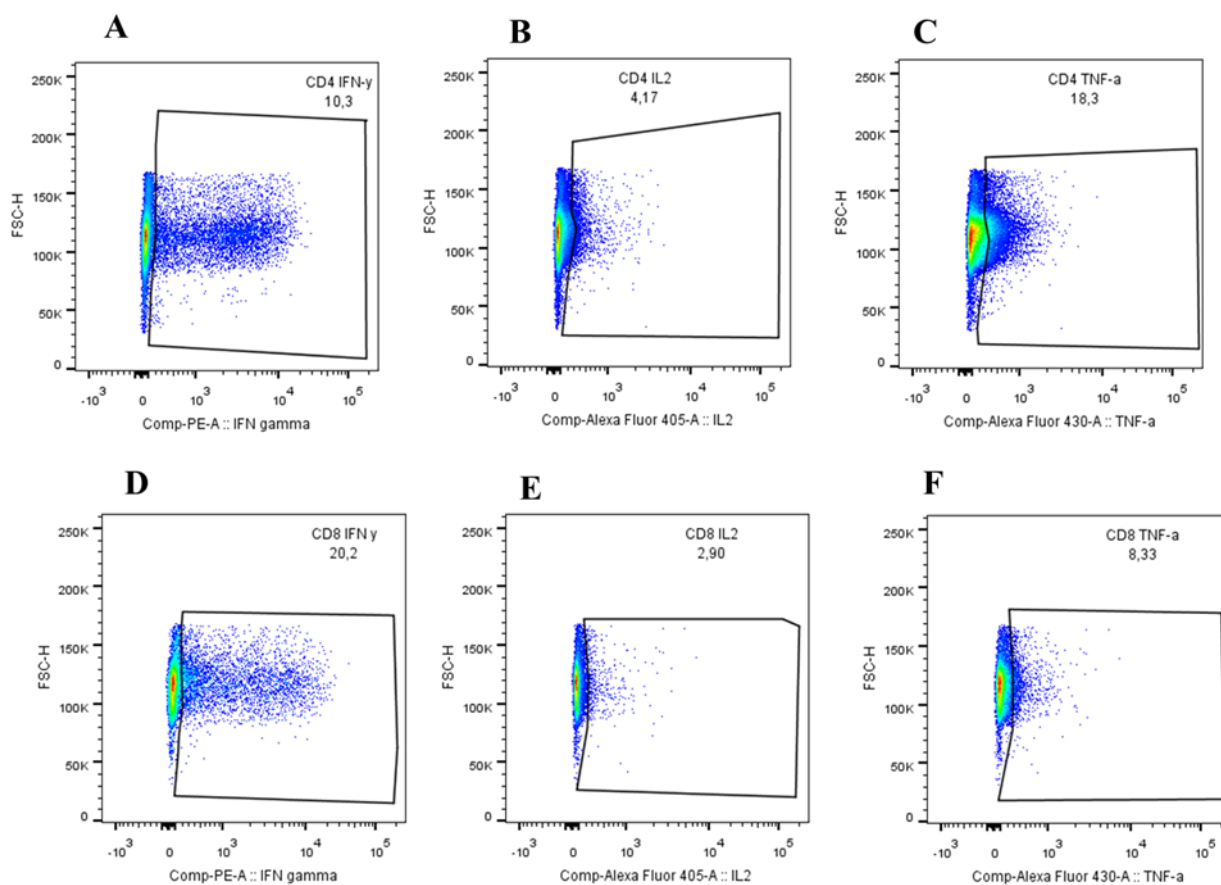
Pirmkārt, katram šūnu paraugam tika noteiktas vispārējās limfocītu populācijas, atsevišķo šūnu populācijas, dzīvo šūnu populācijas, ka arī CD4+ (Th) un CD8+ (CTL) šūnu populācijas (15. attēls). Tālākai analīzei tika izmantotas tikai dzīvo šūnu populācijas, jo mirušas šūnas pirmkārt nespēj ekspresēt citokīnus un otrkārt apoptiskām sūnām piemīt augstais autofluorescences līmenis, līdz ar to mirušo šūnu iekļaušana statistikā negatīvi ietekmē analīzes kvalitāti.



15. attels. Plūsmas citometrijas datu analīzes piemērs pielietojot FlowJo vX.07 programmatūru, lai raksturotu dažādās liesas imūno šūnu populācijās: A – vispārējās limfocītu populācijas noteikšana, B – atsevišķo šūnu populācijas noteikšana, C – dzīvo šūnu populācijas noteikšana, D – CD4+ (Th) un CD8+ (CTL) šūnu populācijas noteikšana.

Figure 15. Example of flow cytometry data analyze by FlowJo vX.07 program to identify different splenocytes populations of immune cells. A – general lymphocytes B –single cells detection, C –live cells detection, D – CD4+ (Th) un CD8+ (CTL) cells population detection.

Citokīnu ekspresija tika noteikta CD4+ un CD8+ šūnu populācijās atsevišķi, jo no literatūras ir zināms ka imūnā atbildē pret dažādiem epitopiem var prevalēt Th vai CTL šūnu loma. (16. attēls) Tālākai analīzei tika izmantotas tikai citokīnus ekspresējošas populācijās, tieši CD4+ IFN- γ ; IL-2, TNF- α un CD8+ IFN- γ ; IL-2, TNF- α .



16. attēls. PC Citokīnu ekspresijas noteikšana CD4+ un CD8+ limfocītu populācijās pēc stimulācijas ar PMA/ionomicīnu. A - CD4+ populācijā IFN- γ ekspresija; B - CD4+ populācijā IL-2 ekspresija; C - CD4+ populācijā TNF- α ekspresija; D – CD8+ populācijā IFN- γ ekspresija; E – CD8+ populācijā IL-2 ekspresija; F – CD8+ populācijā TNF- α ekspresija.

Figure 16. PC cytokine expression in CD4+ and CD8+ lymphocyte populations after stimulation with PMA/ionomycin. A - CD4+ population IFN- γ expression; B - CD4+ population IL-2 expression; C - CD4+ population TNF- α expression; D – CD8+ population IFN- γ expression; E – CD8+ population IL-2 expression; F – CD8+ population TNF- α expression

Izmantojot «Boolean combination gates» funkciju no FlowJo programmas tika noteiktas šūnu populācijas kas ekspresē citokīnus dažādās kombinācijās (6. tabula)

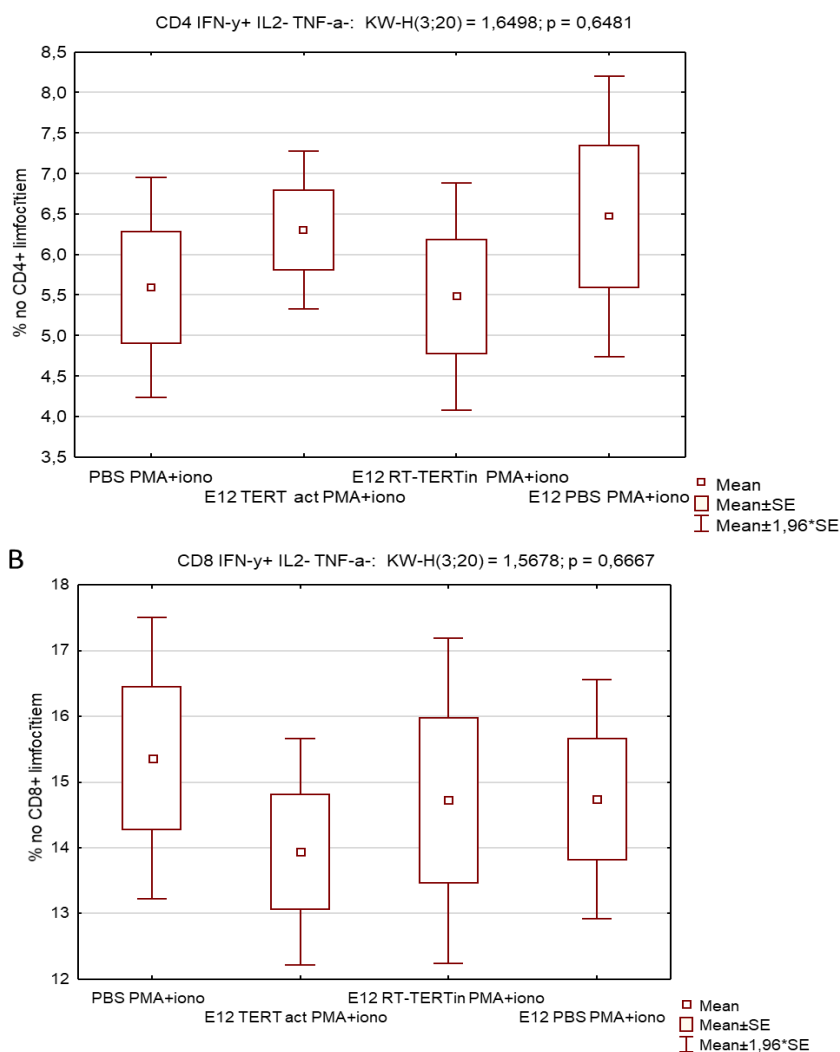
Šūnu populācijās ekspresēto citokīnu kombinācijas.

Table 6

Cytokine expression combinations in cell populations.

CD4+ IFN- γ + IL-2+ TNF- α +	CD8+ IFN- γ + IL-2+ TNF- α +
CD4+ IFN- γ + IL-2+ TNF- α -	CD8+ IFN- γ + IL-2+ TNF- α -
CD4+ IFN- γ + IL-2- TNF- α +	CD8+ IFN- γ + IL-2- TNF- α +
CD4+ IFN- γ + IL-2- TNF- α -	CD8+ IFN- γ + IL-2- TNF- α -
CD4+ IFN- γ - IL-2+ TNF- α +	CD8+ IFN- γ - IL-2+ TNF- α +
CD4+ IFN- γ - IL-2+ TNF- α -	CD8+ IFN- γ - IL-2+ TNF- α -
CD4+ IFN- γ - IL-2- TNF- α +	CD8+ IFN- γ - IL-2- TNF- α +
CD4+ IFN- γ - IL-2- TNF- α -	CD8+ IFN- γ - IL-2- TNF- α -

Pirmkārt, tika salīdzināta liesas šūnu reakcija uz stimulāciju ar mitogēniem aģentiem dažādās dzīvnieku grupās. Iegūtie dati (17. attēls) pierada kā visos analizētos peļu grupas izolēto limfocītu spēja reaģēt uz stimulāciju būtiski neatšķiras ($p > 0,1$) un tāpēc analizējot specifiskās stimulācijas rezultātus mēs varam būt droši kā atrastā starpībā starp grupām atspoguļo atšķirību imūnas atbildes raksturā nevis atšķirību analizēto šūnu kvalitātē.



17. attēls Splenocītu stimulācija ar mitogēnu aģentu PMA/ionomicin. Ar citometrijas palīdzību noteikts IFN- γ ekspresējošo šūnu % CD4+ (A) un CD8+ (B) limfocītu populācijās. Statistiskā analizē veikta izmantojot Kruskal-Wallis ANOVA testu.

Figure 17. Splenocyte stimulation with PMA/ionomycin mitogen. IFN- γ expressing cell % in CD4+ (A) and CD8+ (B) lymphocyte populations, measured by flow cytometry. Data analyzed using Kruskal-Wallis ANOVA test.

Lai noteiktu specifisko imūno atbildi pret TERT splenocīti no dzīvniekiem kas saņēma E12 audzējā šūnas tika stimulēti ar žurku TERT sekvenču saturošiem oligopeptīdiem. Lai noteiktu citokīnu ekspresijas fona līmeni tika izmantota RPMI kontrole. Salīdzinājumam tika izmantoti splenocīti no pelēm kas tika imunizētas ar pVax vektoru bet nesaņēma audzējā šūnas (18.attēls).

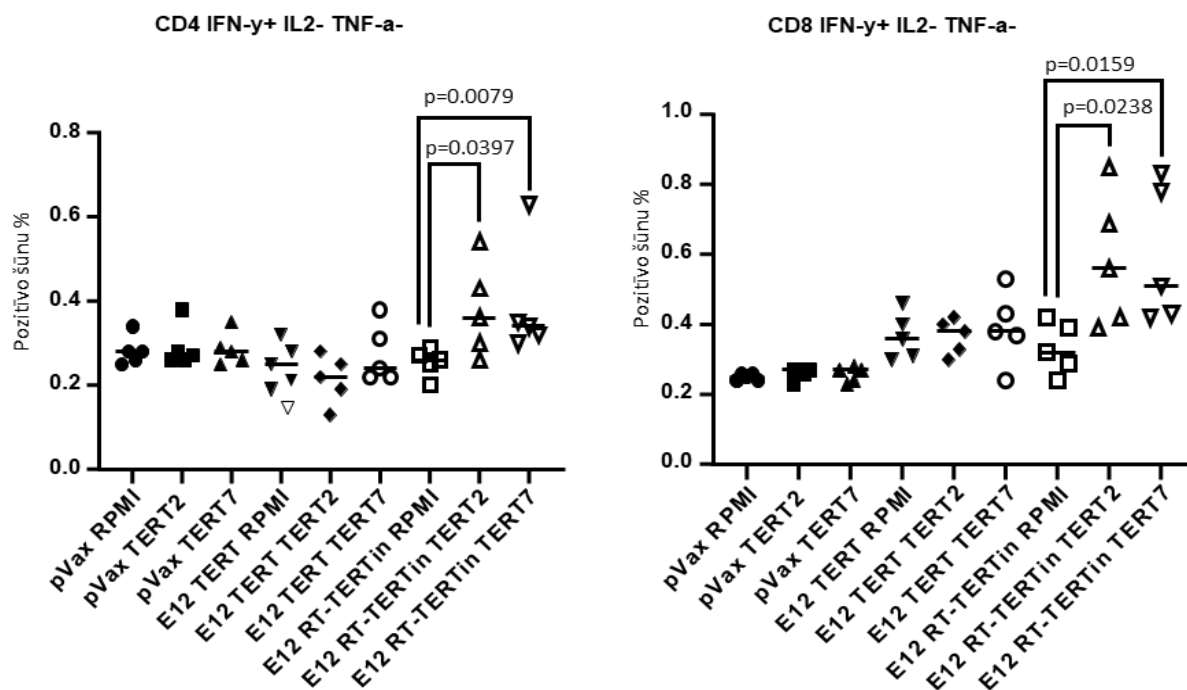


18. attēls. Grafikos tiek attēlotas šūnu populācijās ekspressēto citokīnu kombinācijas. A - CD8+ IFN- γ + IL-2+ TNF- α +; B - CD8+ IFN- γ + IL-2+ TNF- α -; C - CD8+ IFN- γ + IL-2- TNF- α +; D - CD8+ IFN- γ + IL-2- TNF- α -; E - CD8+ IFN- γ - IL-2+ TNF- α +; F - CD8+ IFN- γ - IL-2+ TNF- α -; G - CD8+ IFN- γ - IL-2- TNF- α +.

Figure 18. Graphs depicting cytokine expression combinations in cell populations. A - CD8+ IFN- γ + IL-2+ TNF- α +; B - CD8+ IFN- γ + IL-2+ TNF- α -; C - CD8+ IFN- γ + IL-2- TNF- α +; D - CD8+ IFN- γ + IL-2- TNF- α -; E - CD8+ IFN- γ - IL-2+ TNF- α +; F - CD8+ IFN- γ - IL-2+ TNF- α -; G - CD8+ IFN- γ - IL-2- TNF- α +.

Nespecifiskas citokīnu ekspresijas augstais līmenis ar tīro RPMI barotni stimulētos paraugos būtiski apgrūtinā noteikšanu specifiskai imūnai atbildei pret TERT epitopiem. Tikai analizējot CD4+ un CD8+ limfocītus kas ekspresēja gamma interferonu ir izdevies noteikt specifisko reakciju pret TERT2 un TERT7 oligopeptīdiem dzīvnieku grupā kas tika imunizētā ar RT-TERTin konstrukciju .(Att. 18D, 19D)

Atradums tika apstiprināts veicot detalizētāko datu analīzi ar GraphPad Prism programmu izmantojot Mann–Whitney testu (20.attēls).



20. attēls. CD4+ un CD8+ limfocīti, kas ekspresē gamma interferonu rada specifisko reakciju pret TERT2 un TERT7 oligopeptīdiem, salīdzinot ar kontroles RPMI grupu.

Figure 20. Gamma interferon expressing CD4+ and CD8+ lymphocytes produce specific reaction against TERT2 and TERT7 oligopeptides, comparing to RPMI controls.

4. DISKUSIJA

Bioluminiscences attēlveidošana ļauj noverot un salīdzināt protekcijas līmeni laboratorijas dzīvniekiem. pVax kontrolgrupas izauga 100% audzēju visu šūnu līniju grupās, kas liecina par izpildīto šūnu injekciju labo kvalitāti. 4T1luc2 ar luciferāzi iezīmētas peļu adenokarcinomas šūnās rezultāti nav viennozīmīgi: audzēja šūnu strauja atgrūšana notika tikai vienai ar aktīvo pilna garuma TERT imunizētai pelei, un četrām ar RT-TERTin imunizētam pelēm. Parējām pelēm audzēji auga līdz eksperimenta beigām. E12 žurku pilna garuma TERT ekspresējošās peļu adenokarcinomas šūnām tika novērota pilna audzēju atgrūšana gan ar aktīvo pilna garuma TERT imunizētām pelēm, gan ar RT-TERTin imunizētām pelēm. F1 žurku RT-TERT ekspresējošās šūnas peļu adenokarcinomas šūnām novērota audzēja pilna izaugšana ar aktīvo pilna garuma TERT imunizētām pelēm, bet novērota audzēja šūnu atgrūšana ar RT-TERTin imunizētam pelēm.

Ar pilna garuma aktīvo TERT imunizētas pelēs ir aizsargātās tikai pret E12 šūnu līnijās audzējiem. Ar RT-TERTin imunizētas pelēs ir aizsargātās pret E12 un F1 šūnu līnijām un daļēji arī pret 4T1luc2, kas norada uz to, ka imunizācijai ar RT-TERTin protektīvais efekts ir spēcīgāk nekā ar pilna garuma aktīvo TERT.

BLI izmantošana ļauj kontrolēt šūnu ievadīšanas kvalitāti un sekot audzēja attīstības dinamikai agrīnās stadijās. Pēc novērojumiem, sekošana 4T1luc2 derivātu izcelsmes audzēju attīstības, izmantojot morfometriju zemādas šūnu injekcijas gadījumā ir apgrūtinātā, jo audzēja augšanas virziens ir neparedzams (šūnas var veidot simetrisko audzēju, var izpausties platumā zem ādas, var ieaugt dziļi audos), līdz ar to BLI izmantošana ar luciferāzi iezīmēto šūnu atklāšanai krietni uzlabo mērījumus precizitāti.

Analizējot imūnas atbildes profilu, novēro paaugstināto nespecifisko citokīnu ekspresiju vairākās limfocītu populāciju grupās kas saņēma audzēja šūnas, arī gadījumos kad audzēji tika ātri atgrūsti. Nespecifiski aktivizēto limfocītu augsts skaits var būt izskaidrots ar iekāsuma procesiem dzīvnieku organismā, kas ir saistīti ar audzējā atgrūšanu vai audzējā attīstību ar daļējo nekrozi. Izanalizējot T-šūnu atbildi peļu grupās kas saņēma E12 audzēja šūnas imūnatbildes analīze pārējās grupās netika veikta, jo audzēja atgrūšana tajās tika novērota reti un līdz ar to perspektīvas noteikt specifisko imūno atbildi bija maznozīmīgas sakarā ar paredzamo nespecifisko citokīnu produkciju izolētos limfocītos.

Abu CD4+ un CD8+ limfocītu reakcija uz stimulāciju ar TERT2 un TERT7 peptīdiem bija parādītā jau agrāk analizējot pilna garuma žurkas TERT imūnogenitāti (Jansons et al., 2020). TERT7 peptīda sekvenca atbilst RT domēnam, savukārt TERT2 - telomerāzes RNS

saistošām (TRBD) domēnam. Dotajā eksperimentā dzīvnieki tika imunizēti ar RT-TERTin domēnu, līdz ar to atbilde pret TERT2 peptīdu nevar rasties tiešā imunizācijas rezultātā. Iespējams, limfocīti kas reaģē uz TERT2 ir mērķēti nevis pret ievesto žurkas TERT, bet pret endogenu peļu TERT, un aktivizējas audzējā atgrūšanas procesā, ko izprovocēja imunizācija ar RT-TERTin konstrukciju.

Aktivēto limfocītu noteikšanai kā marķieri tika izmantoti citokīni interferons gamma (IFN- γ), interleikīns-2 (IL-2) un audzēju nekrozes faktors alfa (TNF- α). Šo iekaisuma grupas citokīnu ekspresija limfocītos ir tipiskā Th1 tipa imūnai atbildei. Th1 imūnai atbildei piemīt citotoksisks efekts, līdz ar to mēs sagaidījām kā tieši šī tipa atbilde spēles atslēgas lomu audzēju atgrūšanā.

DNS vakcīnas ir viens no imūnterapijas perspektīviem onkoloģisko slimību ārstēšanas metodēm. Taču, neskatoties uz visām priekšrocībām, DNS vakcīnām ir ierobežoti panākumi terapeitiskā efekta radīšanā pret lielāko daļu vēža tipiem vājās imunogenitātes dēļ (Yang et al., 2014). Šīs darbs parada, kādi uzlabojumi ir iespējami lai paaugstināt DNS vakcīnu imunogenitāti.

Pirmkārt, imunogēna struktūru optimizēšana: tika paņemts tikai RT-TERTin domēns, kas parādīja labāku imūnas atbildes reakciju, nekā pilna garuma aktīvais TERT. Dzīvnieki kas saņēma RT-TERTin konstrukciju bija labāk pasargāti par ar pilna garuma TERT imunizētiem dzīvniekiem, kas pierada modificēta imunogēna augstāko efektivitāti.

Otrkārt, tika izmantots efektīvs DNS vakcīnas piegādēs veids. Elektroporācijas uzlabojumi, īpaši augstsprieguma-zemsprieguma impulsu secības izmantošana, ir ievērojami palielinājusi DNS vakcinācijas efektivitāti (Liu, Kjekken, Mathiesen, & Barouch, 2008). Elektroporācija darbojas arī kā adjuvants, uzlabojot šūnu transfekciju, palielinot antigēna ekspresiju un radot lokālu iekaisumu, kas noved pie APŠ aktivizēšanas (Ahlén et al., 2007). Darba eksperiments pierada, ka DNS vakcīna ar elektroporāciju sasniedz gala mērķi, par to liecina imūnas atbildes reakcija, audzēju atgrūšanas. Darbā bija izmantots peļu modelis, bet ir pierādījumi, ka *in vivo* elektroporācija uzlabo imūno reakciju uz DNS vakcinācijām arī cilvēkiem. Pētījumā, kurā piedalījās veseli brīvprātīgie, *in vivo* elektroporācija uzlaboja imūnas atbildes reakcijas līmeni no 0% līdz 88% pēc DNS ievadīšanas (Sällberg, Frelin, Ahlén, & Sällberg-Chen, 2015). Tas nozīme, ka metode varētu būt izmantota klīniskajā praksē.

Treškārt, *prime* (pirmēja)- *boost* (atkārtota) dubultas imunizācijas shēma bija izmantota, jo pēc Latanova et al. 2018 tāda shēma spēj izraisīt gan augstāku specifisku antivielu līmeni, gan spēcīgāku T-šūnas reakciju.

Darbā izmantotā imunizācijas shēma nevar būt tieši pārnesta klīniskajā praksē, jo nav datu par TERT konstrukciju efektivitāti audzēju terapijā. Tomēr profilaktiskā efekta

sasniegšana liecina par TERT potenciālu kļūt par pretaudzēju imūnas terapijas aģentu, iespējams, izmantojot citas piegādēs platformas (adenovīrusa vektors, mRNS utt). Preklīniskos pētījumos uz maziem dzīvniekiem DNS vakcīna demonstrē tieši savas stipras puses – vienkāršību un zemas izmaksas, un līdz var to būt veiksmīgi izmantota lai pārbaudītu efektivitāti lielām skaitam potenciālo imunogēnu.

5. SECINAJUMI

1. Imunizācija ar RT-TERTin efektīvāk aizsarga dzīvniekus no audzējiem nekā ar pilna garuma aktīvo TERT
2. Bioluminiscences attēlveidošana atvieglo audzēju atklāšanu un attīstības monitorēšanu *in vivo*, īpaši agrīnās stadijās
3. Plūsmas citometrija apstiprināja imūnu reakciju uz stimulāciju ar TERT2 un TERT7 peptīdiem.
4. Darba pārbaudītie TERT DNS imunogēni spēj izrāsīt specifisko T-šūnas atbildi.

6. PATEICĪBAS

- Darba vadītājam Dr. biol. Jurim Jansonam par palīdzību maģistra darba izstrādē, metožu iemācīšanu, atbalstu un vērtīgu padomu sniegšanu;
- BMC dzīvnieku laboratorijas bloka vecākai speciālistei Dr. Biol. Dacei Skrastiņai par palīdzību darbā ar dzīvniekiem
- Dr. biol. Marijai Isaguļancai par piegādātiem DNS imunogēniem, audzēja šūnām, un oligopeptīdiem.
- Visiem Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju Centra kolēģiem.
- Recenzentam Dr. biol. Dacei Pjanovai par ieteikumiem un darba vērtēšanu.
- Projektam “Jauna pieeja ar C hepatītu saistīta vēža aktīvai imūnterapijai (LIVE®VAC) LZP-2018/2-0308”

7. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Ahlén, G., Söderholm, J., Tjelle, T., Kjekken, R., Frelin, L., Höglund, U., ... Sällberg, M. (2007). In Vivo Electroporation Enhances the Immunogenicity of Hepatitis C Virus Nonstructural 3/4A DNA by Increased Local DNA Uptake, Protein Expression, Inflammation, and Infiltration of CD3 + T Cells . *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4741>
2. Cárcano, F. M., Vidal, D. O., van Helvoort Lengert, A., Neto, C. S., Queiroz, L., Marques, H., ... Reis, R. M. (2016). Hotspot TERT promoter mutations are rare events in testicular germ cell tumors. *Tumor Biology*, 37(4), 4901–4907. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4317-y>
3. Chiba, K., Lorbeer, F. K., Shain, A. H., McSwiggen, D. T., Schruf, E., Oh, A., ... Hockemeyer, D. (2017). Mutations in the promoter of the telomerase gene TERT contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aao0535>
4. Coban, C., Kobiyama, K., Jounai, N., Tozuka, M., & Ishii, K. J. (2013). DNA vaccines: A simple DNA sensing matter? *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. <https://doi.org/10.4161/hv.25893>
5. Daniel, M., Peek, G. W., & Tollefsbol, T. O. (2012). Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.095>
6. Dosset, M., Castro, A., Carter, H., & Zanetti, M. (2020). Telomerase and CD4 T cell immunity in cancer. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers12061687>
7. Emens, L. A. (2018). Breast cancer immunotherapy: Facts and hopes. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3001>
8. Garg, A. D., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., & Agostinis, P. (2017). Integrating Next-Generation Dendritic Cell Vaccines into the Current Cancer Immunotherapy Landscape. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.05.006>
9. Hobernik, D., & Bros, M. (2018). DNA vaccines—How far from clinical use? *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19113605>
10. Huang, F. W., Bielski, C. M., Rinne, M. L., Hahn, W. C., Sellers, W. R., Stegmeier, F., ... Kryukov, G. V. (2015). TERT promoter mutations and monoallelic activation of TERT in cancer. *Oncogenesis*. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.39>

11. Ingolotti, M., Kawalekar, O., Shedlock, D. J., Muthumani, K., & Weiner, D. B. (2010). DNA vaccines for targeting bacterial infections. *Expert Review of Vaccines*. <https://doi.org/10.1586/erv.10.57>
12. Jansons, J., Bayurova, E., Skrastina, D., Kurlanda, A., Fridrihsone, I., Kostyushev, D., ... Isaguliantis, M. (2020). Expression of the reverse transcriptase domain of telomerase reverse transcriptase induces lytic cellular response in dna-immunized mice and limits tumorigenic and metastatic potential of murine adenocarcinoma 4t1 cells. *Vaccines*. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020318>
13. Killela, P. J., Reitman, Z. J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L. A., ... Yan, H. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303607110>
14. Kim, N. W. (1997). Clinical implications of telomerase in cancer. *European Journal of Cancer Part A*. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00057-9)
15. Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2019). Electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*. <https://doi.org/10.1101/pdb.top096271>
16. Latanova, A. A., Petkov, S., Kilpelainen, A., Jansons, J., Latyshev, O. E., Kuzmenko, Y. V., ... Isaguliantis, M. G. (2018). Codon optimization and improved delivery/immunization regimen enhance the immune response against wild-type and drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase, preserving its Th2-polarity. *Sci Rep*, 8(1), 8078. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26281-z>
17. Lee, S., & Margolin, K. (2011). Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers3043856>
18. Li, L., Goedegebuure, S. P., & Gillanders, W. E. (2017). Preclinical and clinical development of neoantigen vaccines. *Annals of Oncology*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx681>
19. Li, Lei, & Petrovsky, N. (2016). Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Review of Vaccines*, 15(3), 313–329. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1124762>
20. Liu, J., Kjekens, R., Mathiesen, I., & Barouch, D. H. (2008). Recruitment of Antigen-Presenting Cells to the Site of Inoculation and Augmentation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Vaccine Immunogenicity by In Vivo Electroporation. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.02564-07>

21. Lopes, A., Vanvarenberg, K., Pr at, V., & Vandermeulen, G. (2017). Codon-Optimized P1A-Encoding DNA Vaccine: Toward a Therapeutic Vaccination against P815 Mastocytoma. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.07.011>
22. Mizukoshi, E., & Kaneko, S. (2019). Telomerase-targeted cancer immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20081823>
23. Montfort, A., Colacios, C., Levade, T., Andrieu-Abadie, N., Meyer, N., & S guy, B. (2019). The TNF paradox in cancer progression and immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01818>
24. Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., ... Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.277.5328.955>
25. Negrini, S., De Palma, R., & Filaci, G. (2020). Anti-cancer immunotherapies targeting telomerase. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers12082260>
26. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>
27. Peggs, K. S., Quezada, S. A., & Allison, J. P. (2009). Cancer immunotherapy: Co-stimulatory agonists and co-inhibitory antagonists. *Clinical and Experimental Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03912.x>
28. Riley, R. S., June, C. H., Langer, R., & Mitchell, M. J. (2019). Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>
29. Rosenberg, S. A. (2014). IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1490019>
30. Sällberg, M., Frelin, L., Ahl n, G., & Sällberg-Chen, M. (2015). Electroporation for therapeutic DNA vaccination in patients. *Medical Microbiology and Immunology*. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0384-8>
31. Savas, P., Salgado, R., Denkert, C., Sotiriou, C., Darcy, P. K., Smyth, M. J., & Loi, S. (2016). Clinical relevance of host immunity in breast cancer: From TILs to the clinic. *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.215>
32. Shi, J., Ma, Y., Zhu, J., Chen, Y., Sun, Y., Yao, Y., ... Xie, J. (2018). A review on electroporation-based intracellular delivery. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules23113044>

33. Shimoi, T., Yoshida, M., Kitamura, Y., Yoshino, T., Kawachi, A., Shimomura, A., ... Tamura, K. (2018). TERT promoter hotspot mutations in breast cancer. *Breast Cancer*. <https://doi.org/10.1007/s12282-017-0825-5>
34. Srivatsan, S., Patel, J. M., Bozeman, E. N., Imasuen, I. E., He, S., Daniels, D., & Selvaraj, P. (2014). Allogeneic tumor cell vaccines: The promise and limitations in clinical trials. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. <https://doi.org/10.4161/hv.26568>
35. Thalmensi, J., Pliquet, E., Liard, C., Chamel, G., Kreuz, C., Bestetti, T., ... Langlade-Demoyen, P. (2019). Research paper a DNA telomerase vaccine for canine cancer immunotherapy. *Oncotarget*, 10(36), 3361–3372. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26927>
36. Vinagre, J., Almeida, A., Pópulo, H., Batista, R., Lyra, J., Pinto, V., ... Soares, P. (2013). Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms3185>
37. Wigginton, J. M., Lee, J.-K., Wiltrout, T. A., Alvord, W. G., Hixon, J. A., Subleski, J., ... Wiltrout, R. H. (2002). Synergistic Engagement of an Ineffective Endogenous Anti-Tumor Immune Response and Induction of IFN- γ and Fas-Ligand-Dependent Tumor Eradication by Combined Administration of IL-18 and IL-2. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4467>
38. Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Wolff, J. O. N. A., ... Felgner, P. L. (1990). Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo Agnes Jani and Philip L . Felgner Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2874228> JSTOR is a not-for-profit service that helps scholars , re. *Science*, 247(4949), 1465–1468.
39. Yang, B., Jeang, J., Yang, A., Wu, T. C., & Hung, C. F. (2014). DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.980686>
40. Yuzhakova, D. V., Shirmanova, M. V., Sergeeva, T. F., Zagaynova, E. V., & Lukyanov, K. A. (2016). Immunotherapy of cancer (Review). *Sovremennye Tehnologii v Medicine*. <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.1.23>
41. Zanetti, M. (2017). A second chance for telomerase reverse transcriptase in anticancer immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.67>
42. <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/01-2222.pdf>
43. www.bdbiosciences.com
44. <https://www.bdbiosciences.com/ds/pm/others/00-81014-4.pdf>

Pielikumi

Darba autora publikācija (<https://www.mdpi.com/2076-393X/8/2/318>)[Vaccines \(Basel\)](#), 2020 Jun 18;8(2):318. doi: 10.3390/vaccines8020318.

Expression of the Reverse Transcriptase Domain of Telomerase Reverse Transcriptase Induces Lytic Cellular Response in DNA-Immunized Mice and Limits Tumorigenic and Metastatic Potential of Murine Adenocarcinoma 4T1 Cells

Juris Jansons ^{1 2}, Ekaterina Bayurova ^{3 4}, Dace Skrastina ², Alisa Kurlanda ¹, Ilze Fridrihsone ¹, Dmitry Kostyushev ⁵, Anastasia Kostyusheva ⁵, Alexander Artyuhov ⁶, Erdem Dashinimaev ^{6 7}, Darya Avdoshina ⁴, Alla Kondrashova ⁴, Vladimir Valuev-Elliston ⁸, Oleg Latyshev ³, Olesja Eliseeva ³, Stefan Petkov ⁹, Maxim Abakumov ^{3 10 11}, Laura Hippe ¹, Irina Kholodnyuk ¹, Elizaveta Starodubova ⁸, Tatiana Gorodnicheva ¹², Alexander Ivanov ^{3 8}, Ilya Gordeychuk ^{3 4 13}, Maria Isaguliants ^{1 3 4 9}

Affiliations + expand

PMID: 32570805 PMID: PMC7350266 DOI: 10.3390/vaccines8020318

[Free PMC article](#)

Abstract

Telomerase reverse transcriptase (TERT) is a classic tumor-associated antigen overexpressed in majority of tumors. Several TERT-based cancer vaccines are currently in clinical trials, but immune correlates of their antitumor activity remain largely unknown. Here, we characterized fine specificity and lytic potential of immune response against rat TERT in mice. BALB/c mice were primed with plasmids encoding expression-optimized hemagglutinin-tagged or nontagged TERT or empty vector and boosted with same DNA mixed with plasmid encoding firefly luciferase (Luc DNA). Injections were followed by electroporation. Photon emission from booster sites was assessed by *in vivo* bioluminescent imaging. Two weeks post boost, mice were sacrificed and assessed for IFN- γ , interleukin-2 (IL-2), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) production by T-cells upon their stimulation with TERT peptides and for anti-TERT antibodies. All TERT DNA-immunized mice developed cellular and antibody response against epitopes at the N-terminus and reverse transcriptase domain (rtTERT) of TERT. Photon emission from mice boosted with TERT/TERT-HA+Luc DNA was 100 times lower than from vector+Luc DNA-boosted controls. Bioluminescence loss correlated with percent of IFN- γ /IL-2/TNF- α producing CD8+ and CD4+ T-cells specific to rtTERT, indicating immune clearance of TERT/Luc-coexpressing cells. We made murine adenocarcinoma 4T1Luc2 cells to express rtTERT by lentiviral transduction. Expression of rtTERT significantly reduced the capacity of 4T1Luc2 to form tumors and metastasize in mice, while not affecting *in vitro* growth. Mice which rejected the tumors developed T-cell response against rtTERT and low/no response to the autoepitope of TERT. This advances rtTERT as key component of TERT-based therapeutic vaccines against cancer.

Keywords: CD4+ and CD8+ lytic T cell response; antibodies; electroporation; epitopes; intradermal DNA immunization; lentiviral transduction; metastasis; murine adenocarcinoma cells; rejection; reverse transcriptase domain; suppression; telomerase reverse transcriptase (TERT); therapeutic cancer vaccines; tumor growth.

Darba autora publikācija uz līdzīga temata (<https://www.mdpi.com/2076-2607/9/5/1073>)

> *Microorganisms*. 2021 May 17;9(5):1073. doi: 10.3390/microorganisms9051073.

Reciprocal Inhibition of Immunogenic Performance in Mice of Two Potent DNA Immunogens Targeting HCV-Related Liver Cancer

Juris Jansons ^{1 2}, Dace Skrastina ², Alisa Kurlanda ^{1 2}, Stefan Petkov ³, Darya Avdoshina ⁴, Yulia Kuzmenko ⁵, Olga Krotova ³, Olga Trofimova ^{1 2}, Ilya Gordeychuk ^{4 6}, Irina Sominskaya ², Maria Isagulians ^{1 3 4}

Affiliations + expand

PMID: 34067686 DOI: 10.3390/microorganisms9051073

[Free article](#)

Abstract

Chronic HCV infection and associated liver cancer impose a heavy burden on the healthcare system. Direct acting antivirals eliminate HCV, unless it is drug resistant, and partially reverse liver disease, but they cannot cure HCV-related cancer. A possible remedy could be a multi-component immunotherapeutic vaccine targeting both HCV-infected and malignant cells, but also those not infected with HCV. To meet this need we developed a two-component DNA vaccine based on the highly conserved core protein of HCV to target HCV-infected cells, and a renowned tumor-associated antigen telomerase reverse transcriptase (TERT) based on the rat TERT, to target malignant cells. Their synthetic genes were expression-optimized, and HCV core was truncated after aa 152 (Core152opt) to delete the domain interfering with immunogenicity. Core152opt and TERT DNA were highly immunogenic in BALB/c mice, inducing IFN- γ /IL-2/TNF- α response of CD4+ and CD8+ T cells. Additionally, DNA-immunization with TERT enhanced cellular immune response against luciferase encoded by a co-delivered plasmid (Luc DNA). However, DNA-immunization with Core152opt and TERT mix resulted in abrogation of immune response against both components. A loss of bioluminescence signal after co-delivery of TERT and Luc DNA into mice indicated that TERT affects the *in vivo* expression of luciferase directed by the immediate early cytomegalovirus and interferon- β promoters. Panel of mutant TERT variants was created and tested for their expression effects. TERT with deleted N-terminal nucleoli localization signal and mutations abrogating telomerase activity still suppressed the IFN- β driven Luc expression, while the inactivated reverse transcriptase domain of TERT and its analogue, enzymatically active HIV-1 reverse transcriptase, exerted only weak suppressive effects, implying that suppression relied on the presence of the full-length/nearly full-length TERT, but not its enzymatic activity. The effect(s) could be due to interference of the ectopically expressed xenogeneic rat TERT with biogenesis of mRNA, ribosomes and protein translation in murine cells, affecting the expression of immunogens. HCV core can aggravate this effect, leading to early apoptosis of co-expressing cells, preventing the induction of immune response.

Keywords: CD4+ and CD8+ T cell response; assays of reporter expression; eukaryotic expression; hepatitis C virus; hepatocellular carcinoma; immune suppression; immunotherapy; induction of type I interferons; multi-component DNA vaccine; nucleocapsid (core) protein; telomerase reverse transcriptase.


Pārtikas un veterinārais dienests

**IZMĒĢINĀJUMA PROJEKTA ATĻAUJA Nr. 99
DZĪVNIEKA IZMANTOŠANAI PROCEDŪRĀ**

Atļaujas saņēmējs
Biomedicīnas Pētījumu un Studiju Centrs, Nr. 025413
Izmēģinājuma dzīvnieku lietotājs (nosaukums, PVD reģistra Nr.)

Izmēģinājuma projekta/procedūras nosaukums
DNS zāļu modeļu pārbaude vēža audzēja gadījumos *in vivo*

Maria Isagulians
Par visa izmēģinājuma projekta īstenošanu atbildīgā persona

Dace Skrastiņa, atļauja Nr.9
Par izmēģinājuma projekta atbildīgā persona, PVD atļaujas Nr.

Izmēģinājuma projekta norises vieta
Rātsupītes iela 1, k-1, Rīga, LV-1067
faktiskā adrese

Īpašie nosacījumi:
līdz 2023. gada 24. jūnijam iesniegt PVD 2018. gada 1. jūnija lēmumā Nr. 1.1-13/18/953
pieprasīto informāciju projekta retrospektīvajai izvērtēšanai. Par jebkurām
procedūrās ieviestām izmaiņām nekavējoties ziņot PVD!
Retrospektīvā izvērtēšana u.c.

Atļaujas darbības laiks no 01.06.2018. līdz 25.05.2023.

Pārtikas un veterinārā
dienesta ģenerāldirektors


M. Balodis



AA 090656

Maģistra darbs „Pretaudzēju protekcija ar žurkas TERT apgrieztās transkriptāzes domēnu DNS imunizētās pelēs” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

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

Autors: Alisa Kurļanda *paraksts* 10.06.2021.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr.biol. Juris Jansons *paraksts* 10.06.2021.

Recenzents: *paraksts* asoc. prof., Dr.biol. Dace Pjanova

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 10.06.2021.

Lietvede: *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: