

Valsts pētījumu programmas „Jaunu profilakses, ārstniecības, diagnostikas līdzekļu un metožu, biomedicīnas tehnoloģiju izstrāde sabiedrības veselības uzlabošanai”

7. projekta

DNS, RNS, proteīnu, peptīdu un mazmolekulāro medicīnisko preparātu piegādes sistēmas izstrādāšana
pārskata seminārs

Alfavīrusu vektori kā gēnu piegādes līdzekļi pretvēža terapijai

Autore: Jeļena Vasiļevska Mg.biol.

Darba vadītāja: Anna Zajakina, Dr.biol.

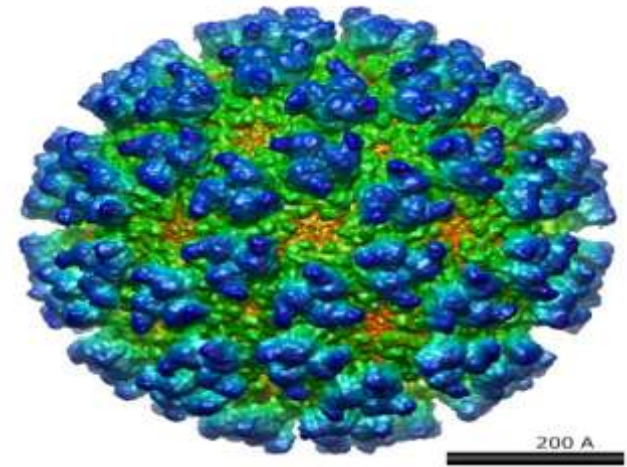
Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

15. novembris, 2011

Alfavīrusu vektori

Semliki meža vīruss (Semliki Forest Virus - SFV), kā alfavīrusu pārstāvis, ir perspektīvs gēnu terapijas vektors.

- + Augsts transgēna produkcijas līmenis
- + Ļoti plašs tropisms
- + Liela vektora kapacitāte
- + Biodrošs cilvēkiem
- + Ir iespējams iegūt augstu vīrusa titru
- + SFV šūnu citopātiskais efekts
- Īslaicīga gēnu ekspresija *in vivo*



rekSFV1/Enh.Luc vīruss

! optimālā pretvēža terapijas stratēģija nav izstrādāta

Darba mērķis un uzdevumi

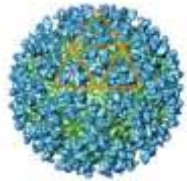
➤ Darba mērķis:

1. Izpētīt uz Semliki mēža vīrusa (SFV) replikona pamata izveidota rekombinanta alfavīrusu vektora rekSFV1/Enh.Luc spēju **nogādāt luciferāzes marķiera gēnu 4T1 peļu krūts vēža modelī *in vivo*.**

➤ Darba uzdevumi:

1. Alfavīrusu rekSFV1/Enh.Luc bioizplatīšanas un gēnu ekspresijas pārbaude Balb/c peļu organismā *in vivo*.
2. Alfavīrusu rekSFV1/Enh.Luc gēnu ekspresijas pārbaude dažādās vēža šūnu kultūrās *in vitro*.
3. Alfavīrusu rekSFV1/Enh.Luc bioizplatīšanas un gēnu ekspresijas pārbaude 4T1 audzēju peļu modelī.

Alfavīrusa rekSFV/1Enh.Luc vadīta *Enh.Luc* gēnu ekspresijas pārbaude Balb/c pelēs *in vivo*



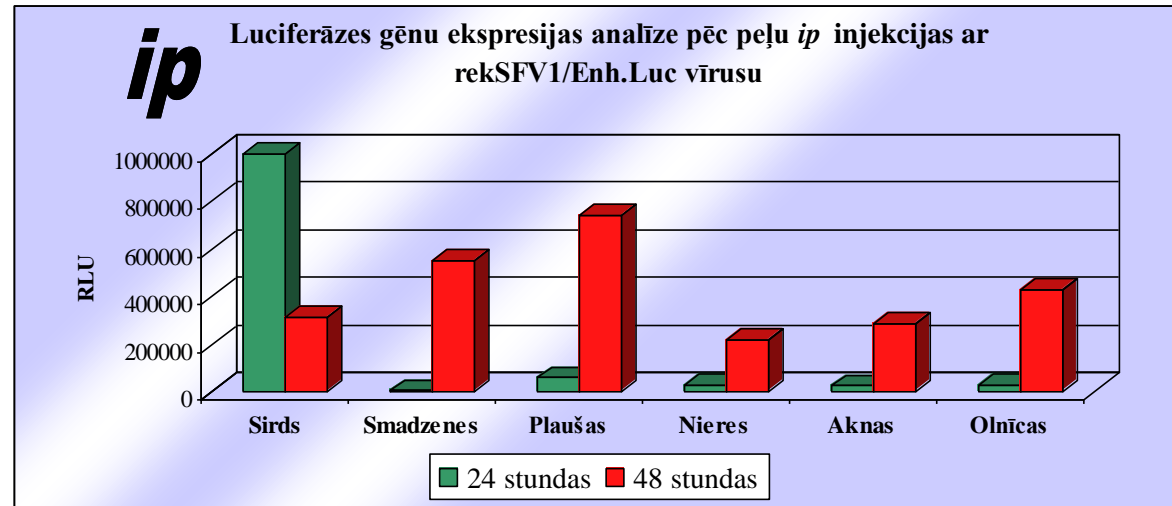
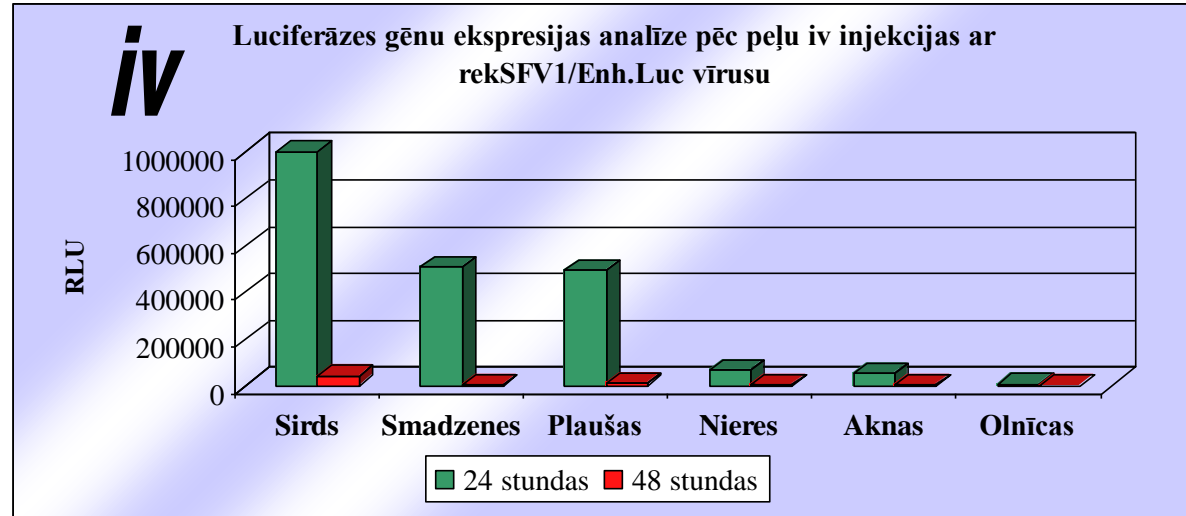
rekSFV1/Enh.Luc



orgānu
homogenizācija

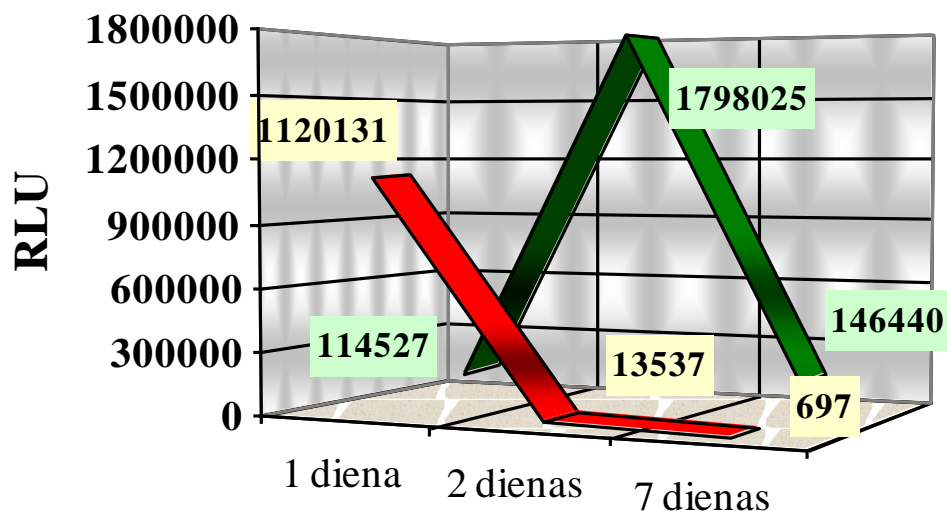
orgānu
homogenizācija

Luciferāzes aktivitātes
analīze orgānu lizātos
(ar luminometrijas palīdzību)



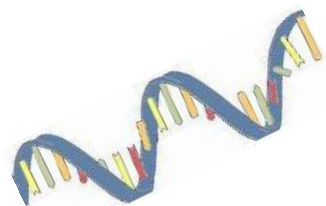
Alfavīrusa rekSFV/1Enh.Luc vadīta *Enh.Luc* gēnu ekspresijas pārbaude *in vivo*

Luciferāzes gēna ekspresijas analīze peļu organismā pēc *iv* vai *ip* injekcijas nedēļas laikā



- Luciferāzes gēna ekspresija nedēļas laikā pēc *iv* injekcijas
- Luciferāzes gēna ekspresija nedēļas laikā pēc *ip* injekcijas

rekSFV1/Enh.Luc RNS ievadīšana un *Enh.Luc* gēna ekspresijas pārbaude *in vivo*



rekSFV1/Enh.Luc RNS

iv



ip



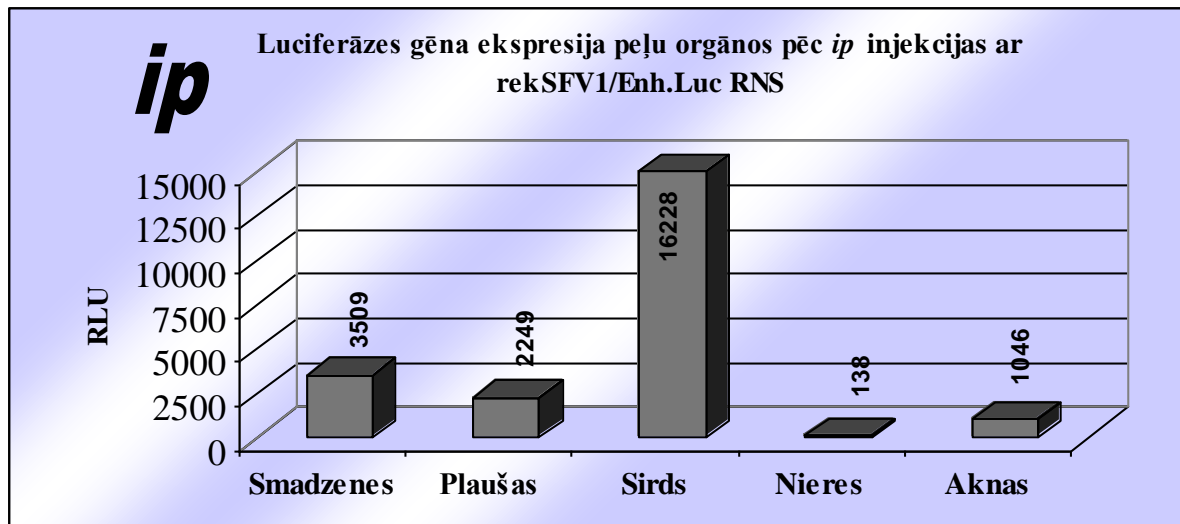
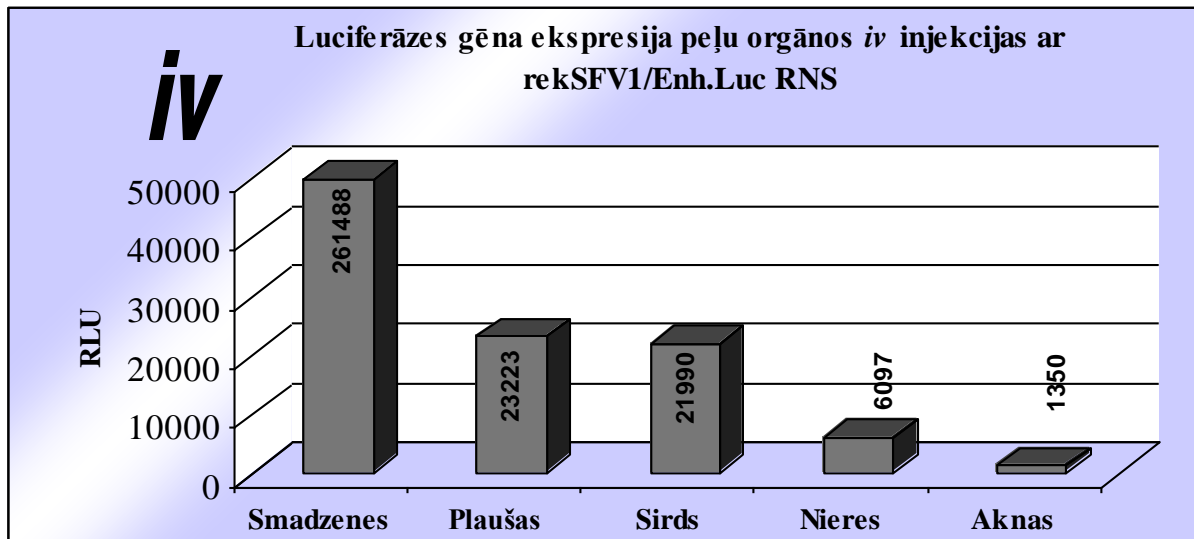
orgānu

orgānu

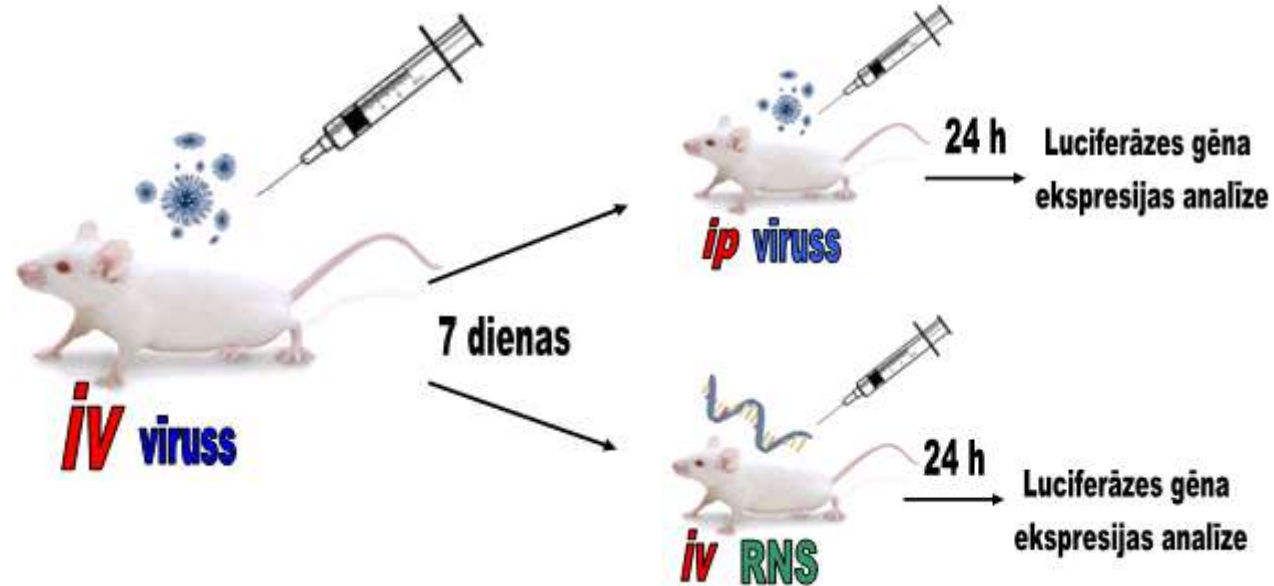
homogenizācija

homogenizācija

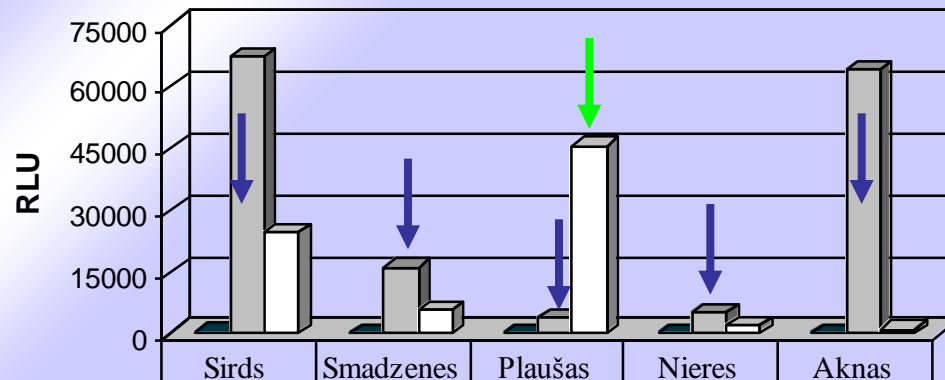
Luciferāzes aktivitātes
analīze orgānu lizātos
(ar luminometrijas palīdzību)



Reinjekcijas efektivitāte *Enh.Luc* gēna piegādei *in vivo*

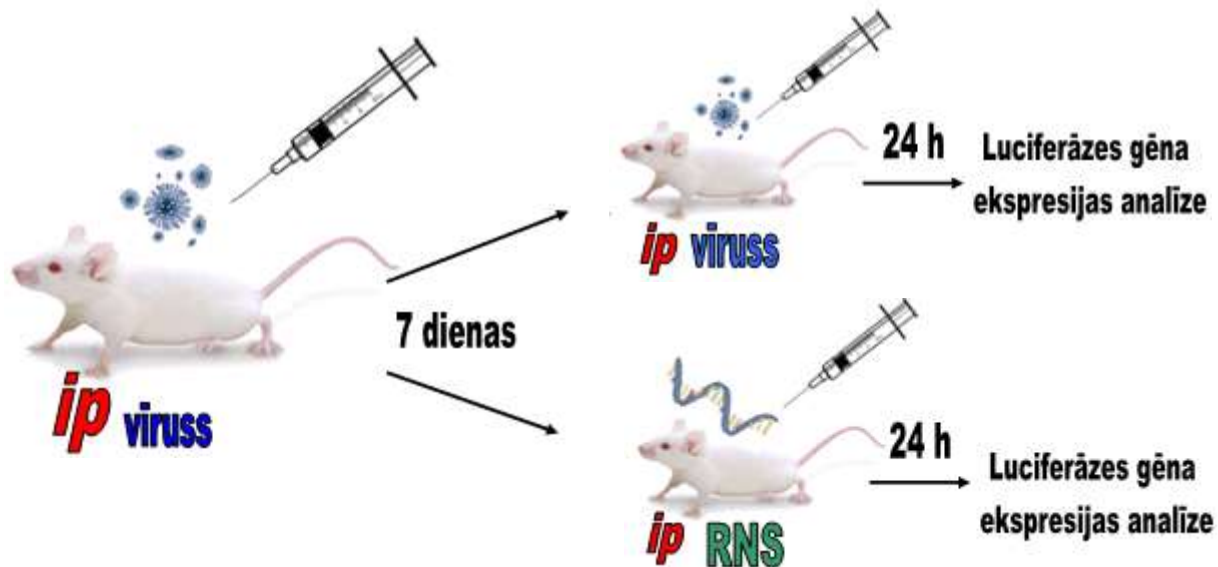


Luciferāzes gēna ekspresijas analīze peļu orgānos pēc *iv* reinjekcijas 7-ajā dienā pēc pirmās rekSFV1/*Enh.Luc* vīrusa *iv* injekcijas

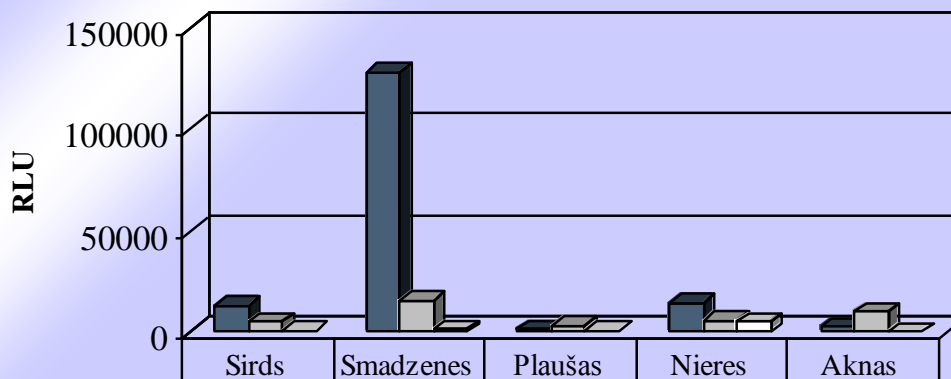


■ Luciferāzes gēna ekspresija orgānos 7 dienā pēc pirmās vīrusa injekcijas	319	307	127	248	14
■ Vīrusa reinjekcija	67416	16028	3955	5128	64313
□ RNS reinjekcija	24745	5820	45760	1903	1129

Reinjekcijas efektivitāte *Enh.Luc* gēna piegādei *in vivo*



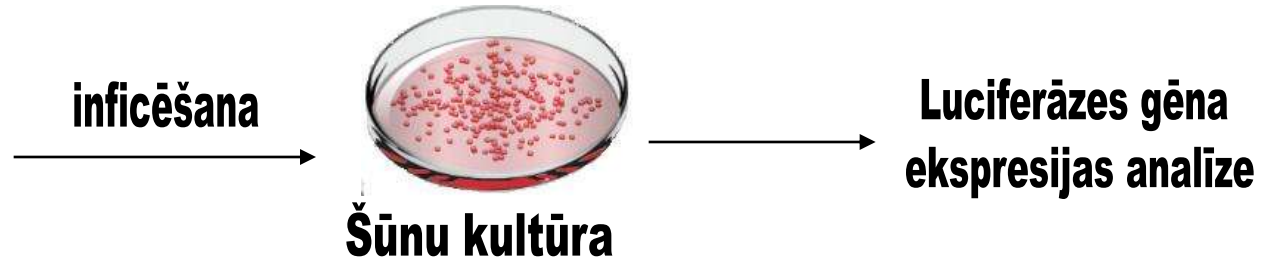
Luciferāzes gēna ekspresijas analīze peļu orgānos pēc *ip* reinjekcijas 7-ajā dienā pēc pirmās rekSFV1/*Enh.Luc* vīrusa injekcijas



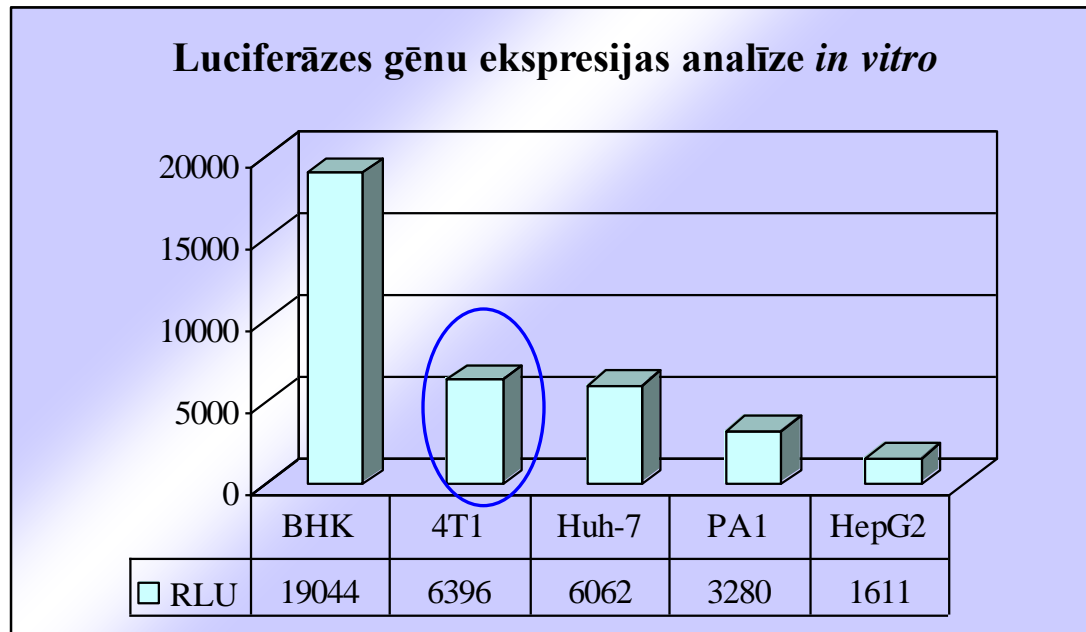
	Sirds	Smadzenes	Plaušas	Nieres	Aknas
■ Luciferāzes gēna ekspresija orgānos 7 dienā pēc pirmās vīrusa injekcijas	13373	128135	1459	14222	2624
■ Vīrusu reinjekcija	4964	15425	3183	5477	9885
□ RNS reinjekcija	909	1443	633	5320	430

Rekombinanta alfavīrusa rekSFV1/Enh.Luc vadīta *Enh.Luc* gēna

ekspresijas pārbaude *in vitro*

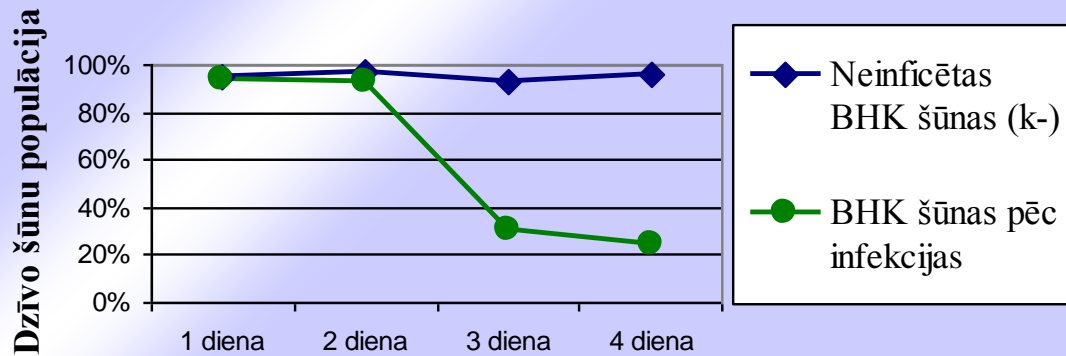


- BHK – Sīrijas kāmjū mazuļu nieru šūnu līnija
- 4T1 – peļu krūts vēža šūnu līnija
- Huh-7 – cilvēka hepatomas šūnu līnija
- PA1 – cilvēka olnīcu teratokarcinomas šūnu līnija
- HepG2 – cilvēka aknu karcinomas šūnu līnija



Rekombinanta alfavīrusa rekSFV1/Enh.Luc citopātiskā efekta pārbaude *in vitro*

BHK šūnu dzīvotspējas analīze pēc infekcijas ar rekSFV1/Enh.Luc vīrusu



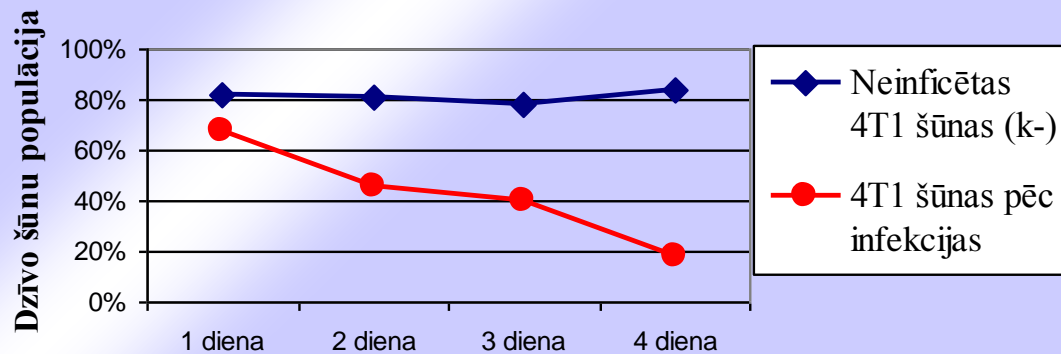
Neinficētas BHK
1 diena

Inficētas BHK
1 diena

Neinficētas BHK
4 diena

Inficētas BHK
4 diena

4T1 šūnu dzīvotspējas analīze pēc infekcijas ar rekSFV1/Enh.Luc vīrusu



Neinficētas 4T1
1 diena

Inficētas 4T1
1 diena

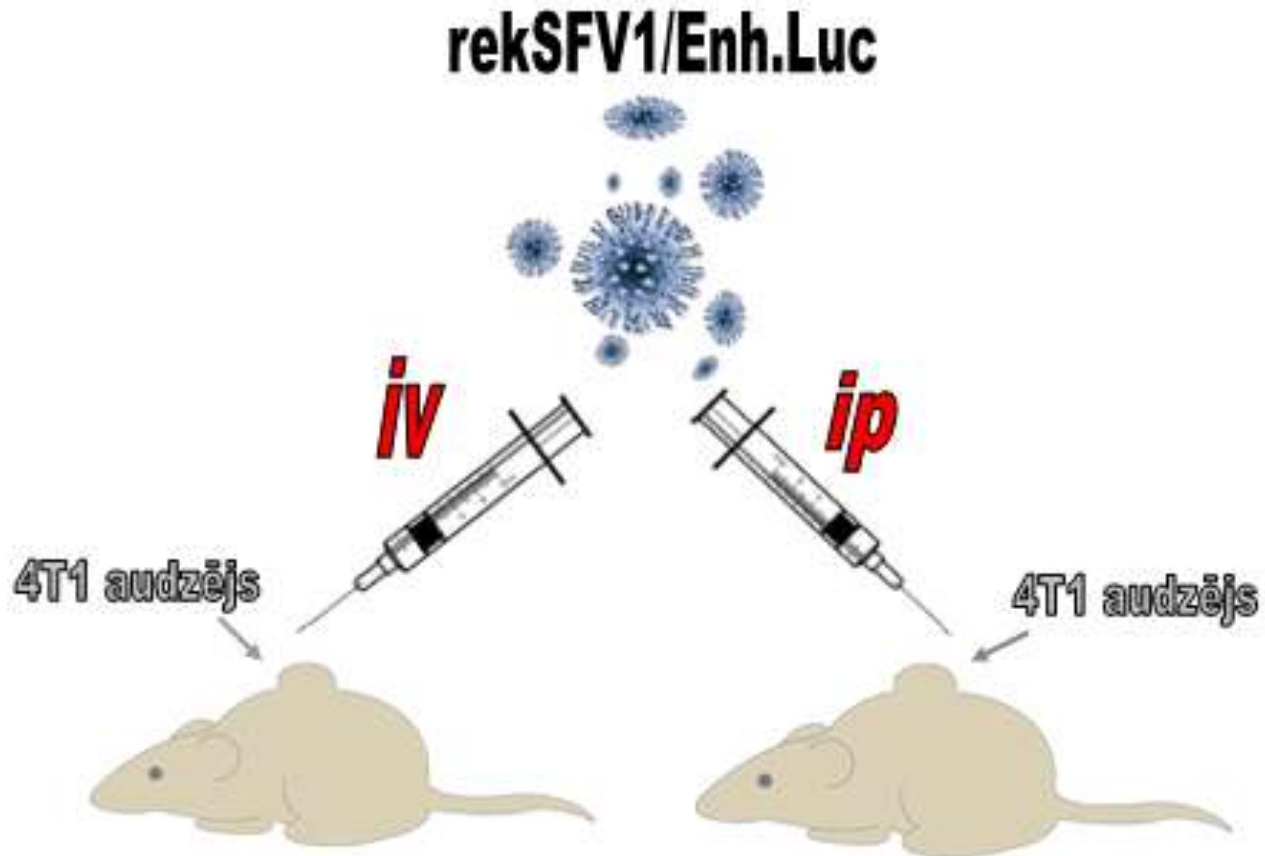
Neinficētas 4T1
4 diena

Inficētas 4T1
4 diena

Alfavīrusa rekSFV1/Enh.Luc ekspresija peļu krūts vēža modelī

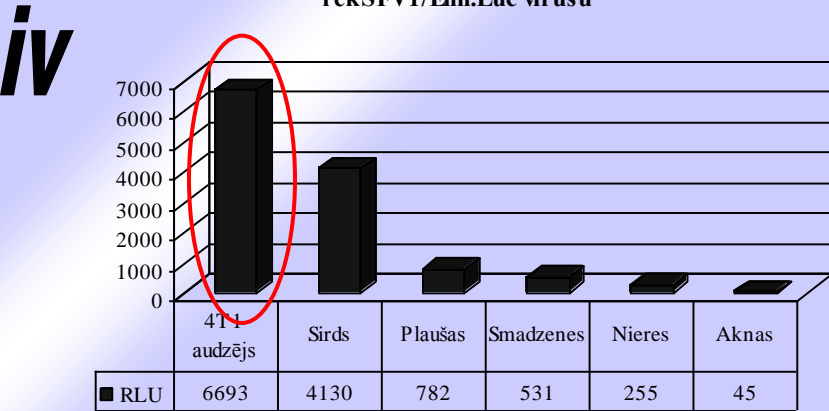
Ievadīta vīrusa daudzums:

- Nekoncentrēts vīruss: $3,3 \times 10^8$ v.d
- Koncentrēts vīruss: $1,6 \times 10^9$ v.d.

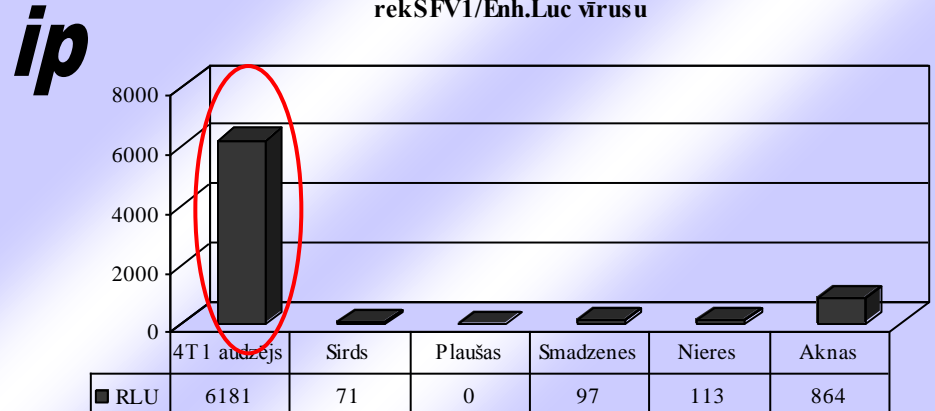


Nekoncentrēts viruss

Luciferāzes gēna ekspresija peļu orgānos pēc *iv* injekcijas ar nekonzentrētu rekSFV1/Enh.Luc vīrusu

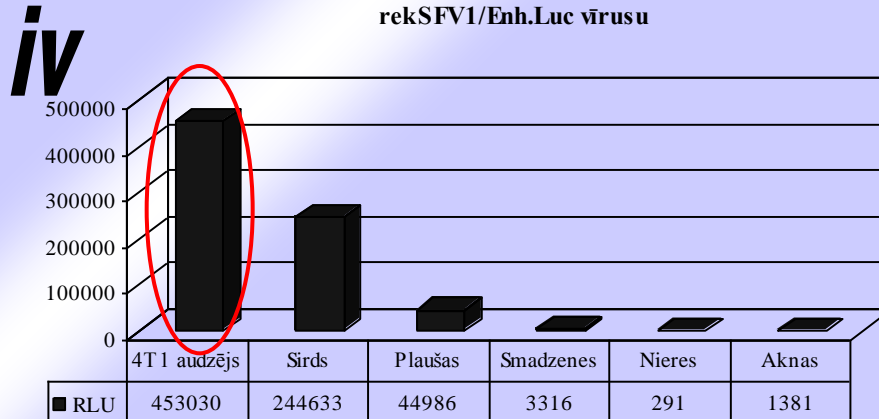


Luciferāzes gēna ekspresija peļu orgānos pēc *ip* injekcijas ar nekonzentrētu rekSFV1/Enh.Luc vīrusu

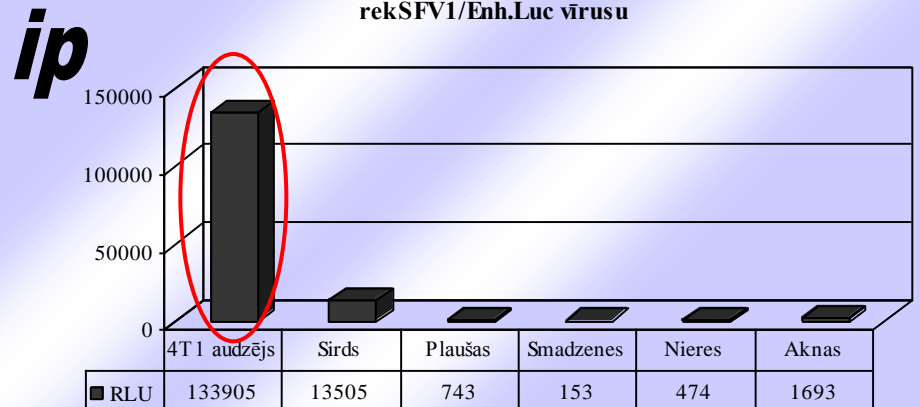


Koncentrēts viruss

Luciferāzes gēna ekspresija peļu orgānos pēc *iv* injekcijas ar koncentrētu rekSFV1/Enh.Luc vīrusu



Luciferāzes gēna ekspresija peļu orgānos pēc *ip* injekcijas ar koncentrētu rekSFV1/Enh.Luc vīrusu



Secinājumi

- Pārbaudot divas rekSFV1/Enh.Luc vīrusa ievadīšanas shēmas, tika konstatēts, ka SFV vīrusa izplatīšanās peļu organismā nav atkarīga no injekcijas veida (*iv*, *ip*) un transgēna ekspresija tika detektēta visos pētītajos orgānos. Visaugstākā luciferāzes gēna ekspresija bija konstatēta sirdī, smadzenēs un plaušās. Bet peļu modeļos ar 4T1 audzējiem rekSFV1/Enh.Luc vīrusa izplatīšana ievērojami mainās, un visaugstākā gēnu ekspresija bija novērota 4T1 audzējos, kas pierāda SFV vīrusa 4T1 vēža šūnu tropismu.
- Tika parādīts, ka maksimālā luciferāzes gēna ekspresija ir novērota pēc 48 stundām pie *ip* injekcijas un pēc 24 stundām pie *iv* injekcijas. Neatkarīgi no injekcijas veida visos orgānos tika noteikta transgēna ekspresijas ievērojama samazināšanas nedēļas laikā.
- Pirmoreiz tika parādīta *in vitro* sintezētas rekSFV1/Enh.Luc RNS spēja nodrošināt transgēna (luciferāze) ekspresiju peļu modelī pēc *iv* un *ip* rekRNS injekcijām. Luciferāzes gēna ekspresija tika detektēta visos pētītajos orgānos. Visaugstākā luciferāzes gēna ekspresija pēc *iv* injekcijas tika detektēta smadzenēs, bet pēc *ip* injekcijas – sirdī.

Finansēšana:

Darbs tika finansēts no Valsts pētījumu programmas (VPP) „Jaunu profilakses, ārstniecības, diagnostikas līdzekļu un metožu, biomedicīnas tehnoloģiju izstrāde sabiedrības veselības uzlabošanai“ 7. projekta: „DNS, RNS, proteīnu, peptīdu un mazmolekulāro medicīnisko preparātu piegādes sistēmas izstrādāšana” un ESF/014/39 ”Jaunu farmokomodulātoru dizains un to nanoasociātu kā transporta formu pētījumi”.

Darba rezultāti tika prezentēti:

- Konferencē “Viral Vectors in Gene Therapy”, Somija, Kuopio, (augusts 2010) stenda prezentācija: “Semliki Forest Virus Vector distribution in mice” (A. Zajakina, Y. Vasilevska, D. Skrastina, and T. Kozlovska);
- Studentu konferencē "The COINS 2010", Lietuva, Viļņa (septembris 2010) stenda prezentācija: “Reference Virus Dependent Quantification of Recombinant Semliki Forest virus” (Y. Vasilevska, V. Hutornojs, T. Kozlovska, and A. Zajakina)
- Konferencē „Биология - наука XXI века” Krievija, Puščino (aprīlis 2010), konferenču tēzes: „Транспортировка рекомбинантного генома вируса леса Семлики *in vitro* и *in vivo*” (Е. Василевская, Д. Скрастиня, А. Плотниец, Г. Дубурс, Т. Козловска, А. Заякина)
- Apvienotais Pasaules latviešu zinātnieku III kongress un Letonikas IV kongress „Zinātne, sabiedrība un nacionālā identitāte”. Latvijā, Rīgā, (2011. gada 24.-27. oktobrī.) “Rekombinanto alfavīrusu vektoru pretvēža aktivitāte *in vivo*.”, konferenču tēzes, stenda ziņojums. (Anna Zajakina, Jeļena Vasilevska, Dace Skrastiņa, Tatjana Kozlovska)

Paldies par uzmanību!