

31.08.2020 r.

Zakład Farmacji Stosowanej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Doktorant: Mgr Milena Czajka

Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Maciej Małecki

Temat rozprawy doktorskiej: Rekombinowane wektory wirusowe AAV w obrazowaniu molekularnym komórek nowotworowych

Streszczenie

Terapia genowa jest nową metodą leczenia chorych wykorzystującą najczęściej sekwencje kodujące DNA wprowadzane do komórek za pomocą nośników. Postęp w zakresie terapii genowej utożsamiany jest z odkrywaniem genów o użyteczności/aktywności terapeutycznej oraz z opracowywaniem nośników (postaci leku) dla transgenów. Niezwykle interesującą grupą nośników genów są wektory rAAV. Ze względu na ich unikalne cechy rozpatruje się je jako nośniki genów terapeutycznych oraz jako swoiste narzędzia do markerowania – molekularnego obrazowania komórek nowotworowych. Za pomocą rAAV możliwym jest wprowadzanie genów reporterowych np. *gfp* do komórek nowotworowych, których ekspresja powoduje np. świecenie w świetle fluorescencyjnym. Obrazowanie molekularne komórek nowotworowych pozwala na wykrywanie nowotworów, prowadzenie leczenia chorych zarówno klasycznego, jak i z wykorzystaniem innowacyjnych leków, jak np. preparaty genowe.

Celem badań było wyselekcjonowanie wektora rAAV, który będzie znakował komórki linii B16-F10 w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Na podstawie badań *in vitro* wyselekcjonowano rAAV o najwyższym tropizmie w kierunku B16-F10. Poszukując wydajnych mechanizmów transdukcyjnych przez rAAV/DJ zwrócono uwagę na ekspresję genów błonowych transporterów lipidowych oraz ABC transporterów. Oceniano wydajność transdukcijną komórek linii B16-F10 zlokalizowanych w płucach i podskórnice. Po przeprowadzeniu optymalizacji metody qPCR możliwa była ocena obecności sekwencji rAAV po podaniu donosowym, dootrzewnowym, dożylnym oraz doguzowym formułacji genowych. Wykorzystanie analizy immunohistochemicznej umożliwiło zlokalizowanie rAAV w komórkach linii B16-F10 *in vivo*. Badania *in vitro* wskazują, że komórki linii B16-F10

najefektywniej transdukowane są przez serotyp rAAV/DJ-CAG. Wykazano wydajność transdukcyjną komórek czerniaka na poziomie 81,3% przy MOI=40000. Badania ekspresji genów wykazały, że komórki linii B16-F10 po transdukcji wektorami rAAV ekspresyjną na wysokim poziomie geny *abca1*, *slc27a1*, *absb9*, *tap2*, *abcd2*, *tap1*. Najwyższą wydajność transdukcyjną w komórkach przerzutowych *in vivo* obserwowano po podaniu donosowym dawki 10^{10} gc/0,3 ml wektora rAAV/DJ-CAG.

Niniejsza praca dostarcza interesujących informacji dotyczących możliwości wykorzystania rAAV w znakowaniu molekularnym komórek czerniaka, które mogą być użyteczne do planowania prób terapii genowej, wspomaganie klasycznych protokołów leczenia onkologicznego oraz diagnostyki molekularnej.

Słowa kluczowe: czerniak, przerzutujący czerniak, terapia genowa, rAAV, podanie donosowe, płuca.