

VZPOSTAVITEV ELEKTROPRENOSA SISTEMA TRANS-POMNOŽUJOČIH mRNA NA MODELU MIŠJEGA MELANOMA B16-F10 *IN VITRO* IN *IN VIVO*

Jaka Vrevc Žlajpah^{1,2}, Urška Kamenšek^{1,3}, Urša Lampreht Tratar^{1,4}, Maja Čemažar^{1,5}, Gregor Serša^{1,6}, Katja Uršič Valentinuzzi^{1,3}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

⁴ Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

⁵ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Izola, Slovenija

⁶ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: jvrevc@onko-i.si

Genska terapija je eden izmed obetavnih pristopov zdravljenja raka. Pri nevirusnih dostavnih sistemih se kot nosilec genske informacije najpogosteje uporabljata plazmidna DNA in molekule mRNA. Slednje odlikuje odsotnost insercijske mutageneze in visoka učinkovitost transfekcije, vendar jih omejuje intrinzična nestabilnost in razgrajevanje z ribonukleazami.

V naši raziskavi želimo vzpostaviti elektroprenos dvo-komponentnega, trans-pomnožujočega sistema mRNA (angl. trans-amplifying, taRNA) za lokalno dostavo in znotrajcelično pomnoževanje molekul mRNA z namenom podaljšanega izražanja transgena na modelu mišjega melanoma B16-F10.

Sistem taRNA sestavljata dve ločeni molekuli mRNA: prva zapisuje izbrani protein (transgen, trRNA), druga pa nosi zapis za alfavirusno replikazo (nrRNA-REPL)1. Slednja na osnovi prepoznavnih zaporedij za replikazo v neprevedenih regijah na 5'- in 3'-koncu trRNA po prevodu v proteinski kompleks na ribosomih omogoča selektivno pomnoževanje transgena.

Za namene raziskave smo načrtovali dva transgena z zapisom za zeleni fluorescentni protein (angl. green fluorescent protein, trRNA-EGFP) in za luciferazo (trRNA-LUC2). Za določanje učinkovitosti transfekcije po elektroprenosu sistema taRNA s trRNA-EGFP na celicah B16-F10 (*in vitro*) smo uporabili pretočno citometrijo. V poskusih *in vivo* (dovoljenje U34401-3/2022/17) smo učinkovitost transfekcije določili z merjenjem jakosti bioluminiscentnega signala po intratumorskem elektroprenosu taRNA s trRNA-LUC2 na miših C57/Bl6 s tumorji B16-F10 s slikovnim sistemom IVIS®. Tako *in vitro* kot *in vivo* smo primerjali učinkovitost transfekcije po elektroprenosu različnih koncentracijskih razmerij komponent sistema taRNA (od 20 ng do 20 µg) in po uporabi različnih protokolov elektroporacije (EP1: 8 pulzov v trajanju 100 µs s frekvenco 1 Hz, razmerje med napetostjo in razdaljo med elektrodama 1300 V/cm; EP2: 8 pulzov v trajanju 100 µs s frekvenco 5000 Hz, razmerje med napetostjo in razdaljo med elektrodama 1300 V/cm; EP3: 8 pulzov v trajanju 5 ms s frekvenco 1 Hz, razmerje med napetostjo in razdaljo med elektrodama 600 V/cm; EP4: 2 pulza v trajanju 20 ms s frekvenco 1 Hz, razmerje med napetostjo in razdaljo med elektrodama 120 V/cm).

Po elektroprenosu taRNA *in vitro* v različnih koncentracijskih razmerjih smo zaznali populacijo visoko GFP⁺ celic, ki ni bila prisotna po elektroprenosu trRNA-EGFP v odsotnosti nrRNA-REPL. Ta populacija je bila največja pri uporabi EP3. V poskusih *in vivo* smo potrdili, da je intratumorski elektroprenos učinkovit dostavni sistem za dostavo mRNA v širokem koncentracijskem območju. Prav tako smo potrdili uspešno intratumorsko trans-pomnoževanje mRNA, kjer smo izmerili 4-kratno povečanje intenzitete bioluminiscentnega signala ob sočasnem elektroprenosu trRNA-LUC2 in nrRNA-REPL v primerjavi z elektroprenosom samo trRNA-LUC2 v odsotnosti nrRNA-REPL. Pomnoževanje je bilo najbolj izrazito pri uporabi nizkih odmerkov trRNA-LUC2 (v ng), medtem

p37

ko je višanje odmerkov transgena vodilo v manj izrazito pomnoževanje. Ob uporabi 10 μg in 20 μg nrRNA-REPL smo izmerili primerljive intenzitete bioluminescentnega signala, kar bi lahko nakazovalo na zasičenje ob uporabi višjih odmerkov nrRNA-REPL. Jakost bioluminescentnega signala je bila odvisna tako od uporabljenega odmerka komponent taRNA kot tudi od protokola elektroporacije, med katerimi je bil najbolj učinkovit EP3.

S predstavljenim delom smo potrdili uspešno trans-pomnoževanje mRNA tako *in vitro* kot *in vivo*. Trenutne raziskave so usmerjene v nadaljnje izboljšanje izražanja transgena v sistemu taRNA za vzpostavitev nove platforme za gensko terapijo raka.

Zahvala

Raziskava je potekala v okviru raziskovalnega programa P3-0003 in projekta J3-50110, ki ju financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

Literatura

1. Perkovic M, et al. A trans-amplifying RNA simplified to essential elements is highly replicative and robustly immunogenic in mice. *Mol Ther.* 2023 Jun. 31;6: 1636-1646 .