

Rīgas Stradiņa universitāte
Medicīnas fakultāte
Akadēmiskā maģistra studiju programma
„Biomedicīna”

MAĢISTRA DARBS
ANTI-MIOSTATĪNA VAKCĪNAS PROTOTIPA IZSTRĀDE
UZ ssRNS BAKTERIOFĀGU VĪRUSVEIDĪGO DAĻIŅU
TEHNOLOĢIJAS BĀZES

Darba autore:

Anna Kozlova

Studenta apliecības Nr. 23-044372

/paraksts/

2025. gada 31. maijā

Darba vadītāja:

Ilva Liekniņa

Dr.biol., pētniece

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Strukturālās bioloģijas laboratorija

/paraksts/

2025.gada 31. maijā

Rīga, 2025

KOPSAVILKUMS

Miostatīns (MSTN) ir negatīvais muskuļu augšanas regulatorais faktors, kura līmeņa novirzes no fizioloģiskās normas var kļūt par cēloni dažādu ar skeleta muskulatūru un metabolismu saistītu patoloģiju attīstībai. Maģistra darba mērķis bija izveidot miostatīnu inhibējošu vakcīnas prototipu uz ssRNS vīrusveidīgo daļiņu (VLP) bāzes un pārbaudīt tā efektivitāti peļu modelī. Mērķa sasniegšanai ģenētiskās modificēšanas ceļā tika sekmīgi izveidoti, uzproduvēti un attīrīti četri fāga AP205 VLP konstrukti ar integrētiem MSTN epitopiem. To spēja aktivēt Smad signālceļu pārbaudīta *in vitro* ar luciferāzes reportiera testu, taču aktivācija netika novērota. Tāpat ķīmiskās konjugācijas ceļā pie fāga Qβ VLP tika piesaistīts MSTN un izveidotais vakcīnas kandidāts pārbaudīts BALB/c peļu modelī. Pēc imunizācijas nenovēroja statistiski būtisku muskuļu masas pieaugumu, taču pelēm veidojās augstas aviditātes anti-MSTN antivielas.

Maģistra darbs izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā *Dr. biol.* Ilvas Liekniņas vadībā.

Atslēgvārdi: miostatīns, ssRNS fāgu VLP, vakcīnu prototipi.

SUMMARY

Myostatin (MSTN) is a negative muscle growth regulator, and deviations from its physiologically normal levels can contribute to the development of various pathologies related to skeletal muscle and metabolism. The aim of this master's thesis was to develop a myostatin-inhibiting vaccine prototype based on the virus-like particles (VLP) of ssRNA bacteriophages and evaluate its efficacy in a mouse model. To achieve the aim, four AP205 phage VLP constructs incorporating MSTN epitopes were successfully designed using genetic fusion, then produced and purified. Their ability to activate Smad signalling pathway was assessed *in vitro* using luciferase reporter assay, however no activation was observed. In a separate approach, MSTN was chemically conjugated to Q β phage VLPs and the resulting vaccine candidate was tested in a BALB/c mouse model. Although no statistically significant increase in muscle mass was observed after immunisation, the mice developed high-avidity anti-MSTN antibodies.

Master's thesis was conducted at the Latvian Biomedical Research and Study Centre under the supervision of *Dr. biol.* Ilva Liekniņa.

Keywords: myostatin, ssRNA phage VLPs, vaccine prototypes.

SATURS

KOPSAVILKUMS	2
SUMMARY	3
SATURS.....	4
SAĪSINĀJUMU SARAKSTS	5
IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1. Miostatīns – struktūra, signālceļi un nozīme organismā	7
1.1.1. TGF-β supersaime un miostatīns	7
1.1.2. Miostatīna signālceļi	10
1.1.3. Miostatīna lomas organismā.....	12
1.1.4. Miostatīns un tā loma patoloģiskos stāvokļos.....	13
1.1.5. Uz miostatīna inhibīciju balstītas terapijas.....	16
1.2. Vienpavediena RNS fāgu vīrusveidīgās daļiņas.....	17
1.2.1. VLP – vīrusveidīgās daļiņas	17
1.2.2. Vienpavediena RNS fāgi	18
1.2.3. VLP modificēšana un funkcionalizēšana	19
1.2.4. VLP imunogenitāte.....	21
2. MATERIĀLI UN METODES	24
2.1. Darbā izmantotie materiāli	24
2.2. Ekspresijas plazmīdu pavairošana.....	24
2.3. Rekombinanto proteīnu producēšana <i>E. coli</i> ekspresijas sistēmā.....	24
2.4. Sākotnēja himēro VLP proteīnu attīrīšana ar amonija sulfāta izgulsnēšanu	25
2.5. VLP attīrīšana ar gēlfiltrāciju un jonapmaiņu	26
2.6. Parauga koncentrācijas mērīšana ar NanoDrop spektrofotometru	26
2.7. Proteīnu iekoncentrēšana.....	26
2.8. NAGE.....	27
2.9. SDS-PAGE	27
2.10. Elektronmikroskopija	27
2.11. Luciferāzes reportiera tests.....	27
2.12. Qβ VLP producēšana	28
2.13. Ķīmiskā konjugācija ar tetrazīna un endo-BCN linkeriem	28
2.14. Peļu imunizācija un monitorēšana.....	29
2.15. Netiešā ELISA.....	29
2.16. Aviditātes ELISA	29
2.17. Statistiskā analīze	30
3. REZULTĀTI	31
3.1. Anti-miostatīna vakcīnas prototipu izveide un raksturošana	31
3.2. Anti-miostatīna vakcīnas prototipa pārbaude peļu modelī.....	37
4. DISKUSIJA.....	45
4.1. Anti-miostatīna vakcīnas prototipu izveide un raksturošana	45
4.2. Anti-miostatīna vakcīnas prototipa pārbaude peļu modelī.....	47
SECINĀJUMI.....	51
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	52
PIELIKUMI	60

SAĪSINĀJUMU SARAKSTS

ActRIIA/B – aktivīna II tipa receptori A/B (<i>activin receptors type II A/B</i>)	JNK – c-Jun N-terminālās kināzes
AIDS – iegūtā imūndeficīta sindroms (<i>acquired immune deficiency syndrome</i>)	kb – kilobāzes
ALK4/5 – aktivīna I tipa receptori 4/5	kDa – kilodaltoni
AP – nobriešanas proteīns	Lys – lizīns (<i>lysine</i>)
APC – antigēnus prezentējošās šūnas (<i>antigen-presenting cells</i>)	LP – lizēšanas proteīns
apgr/min – apgriezieni minūtē	MAPK – mitogēnu-aktivētās proteīnu kināzes
as – aminoskābes	MHC I/II – galvenais audu saderības komplekss (<i>major histocompatibility complex</i>)
BCR – B-šūnu receptori (<i>B-cell receptors</i>)	Myf5 – miogēna faktors 5 (<i>myogenic factor 5</i>)
BMP – kaulu morfogēna proteīns (<i>bone morphogenic protein</i>)	MyoD – mioblastu determinācijas proteīns (<i>myoblast determination protein</i>)
CLR – C-tipa receptori	MYOG – miogenīns (<i>myogenin</i>)
CP – apvalka proteīns (<i>coat protein</i>)	mRNS – matricas ribonukleīnskābe
Da – daltoni	MSTN – miostatīns
DC – dendrītiskās šūnas (<i>dendritic cells</i>)	mTOR – zīdīdāju rapamicīna mērķis (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
dH₂O – destilēts H ₂ O	NHS – N-hidroksisukcinimīds
dsDNS - divpavedienu dezoksiribonukleīnskābe (<i>double-stranded desoxyribonucleic acid</i>)	OD – optiskais blīvums (<i>optical density</i>)
EGR1 – agrais augšanas atbildes proteīns 1 (<i>early growth response protein 1</i>)	OI – nepilnīgā osteogēnēze (<i>osteogenesis imperfecta</i>)
ERK – ekstracelulārās signāl-regulētās kināzes	PAMP – ar patogēnu saistītais molekulārais struktūrmodelis (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
FDA – ASV Pārtikas un zāļu pārvalde (<i>Food and Drug Administration</i>)	PI3K – fosfoinositīda 3-kināzes (<i>phosphoinositide 3-kinases</i>)
FLRG – ar follistatīnu saistītais proteīns (<i>follistatin-related protein</i>)	PRR – struktūrmodeļus atpazīstošie receptori (<i>pattern recognition receptors</i>)
GASP-1 – ar augšanu un diferenciaciju saistīto seruma proteīnu (<i>growth and differentiation factor-associated serum protein</i>)	RP – replikāzes subvienība (<i>replicase protein</i>)
GDF - augšanas/diferenciacijas faktors (<i>growth/differentiation factor</i>)	ssRNS – vienpavediena ribonukleīnskābe (<i>single-stranded ribonucleic acid</i>)
GF – augšanas faktors (<i>growth factor</i>)	TAP – ar antigēnu prezentāciju saistītais transportieris (<i>transporter associated with antigen presentation</i>)
GLUT4 – glikozes 4. tipa transportieris (<i>glucose transporter type 4</i>)	TGF-β – transformējošais augšanas faktors β (<i>transforming growth factor β</i>)
GRE – glikokortikoīdu atbildes elementi (<i>glucocorticoid response elements</i>)	TLD – tolloīds
HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss (<i>human immunodeficiency virus</i>)	TLR – Toll-līdzīgie receptori
Ig – imūnglobulīns	TNF-α – tumora nekrozes faktors α
IL-1β – interleikīns – 1β	UV – ultravioletais starojums
INF-β – interferons β	VLP – vīrusveidīgās daļiņas (<i>virus-like particles</i>)

IEVADS

Miostatīns (MSTN) ir transformējošo augšanas faktoru β supersaimes proteīns, kas pilda nozīmīgu lomu dzīvnieku un cilvēku skeleta muskuļu masas homeostāzes nodrošināšanā, funkcionējot kā negatīvais augšanas regulators [58]. Lai gan tā galvenie efekti ir saistīti ar skeleta muskuļu regulāciju, MSTN tāpat ietekmē glikozes un adipozo audu vielmaiņu, kā arī osteogēnos procesus, realizējot savas funkcijas caur daudzveidīgām signālceļu kaskādēm [2, 17]. MSTN darbības funkcionālie traucējumi var ietekmēt tādu patoloģisko stāvokļu attīstību kā kaheksija, sarkopēnija, aptaukošanās, otrā tipa cukura diabēts, kaulu un locītavu slimības, tādēļ dažādas miostatīna inhibēšanas stratēģijas tiek izstrādātas un izvērtētas kā potenciālas terapeitiskās pieejas šo slimību ārstēšanai. Populārākās miostatīna inhibitoru grupas iekļauj monoklonālas anti-MSTN antivielas, šķīstošus MSTN receptorus, proteīna propeptīda inhibitorus un cita veida funkcionālos antagonistus [92]. Savukārt terapeitisku vakcīnu izstrāde ir salīdzinoši mazāk izpētīta niša.

Viena daudzsološa vakcīnu izveides pieeja ir vīrusveidīgo daļiņu (VLP) bāzes izmantošana. VLP ir vīrusa proteīnu veidotas, simetriskas nanodaļiņas ar augstu organizācijas pakāpi un pašsavākšanās spēju [77]. Daļiņas nesatur vīrusa ģenētisko materiālu, līdz ar to ir drošas, jo nav spējīgas replicēties, kā arī strukturālo īpašību dēļ to morfoloģija atgādina natīvu vīrusu, kas padara VLP augsti imunogēnas [42]. Funkcionalizējot VLP, tām var pievienot interesējošos antigēnus, piemēram, organisma autoantigēnus, tādējādi iegūstot himēriskas VLP. Šādas daļiņas spēj ne tikai inducēt ilgstošu humorālo imūno atbildi, bet arī pārvarēt imūnsistēmas paštoleranci pret autoantigēnu, kas ir īpaši nozīmīgi hronisku slimību ārstēšanai paredzētu vakcīnu izveides kontekstā [5]. ssRNS bakteriofāgu apvalka proteīnu veidotu VLP izmantošana vakcīnu izstrādē piedāvā virkni priekšrocību, kas balstās uz ssRNS fāgu apvalka proteīnu strukturālo vienkāršību, modificējamību un iespēju izmantot baktēriju ekspresijas sistēmas VLP iegūšanai, rezultātā nodrošinot kopējā procesa izmaksu efektivitāti [36].

Darba mērķis: izveidot anti-miostatīna vakcīnas prototipu uz ssRNS bakteriofāgu vīrusveidīgo daļiņu bāzes un pārbaudīt tā efektivitāti peļu modelī.

Darba uzdevumi:

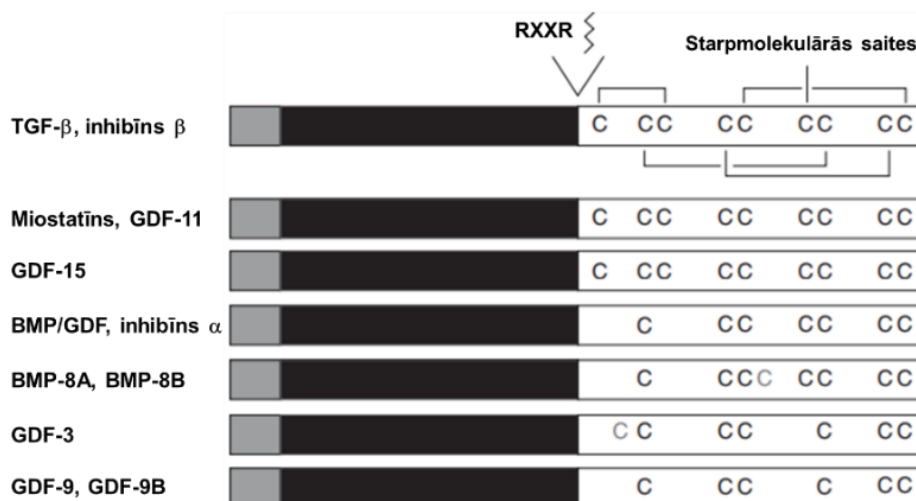
1. Izveidot uz fāga AP205 VLP un miostatīna epitopiem bāzētus vakcīnu kandidātu konstruktus dizainus.
2. Producēt, attīrīt un raksturot ģenētiskās sapludināšanas rezultātā izveidotās himērās VLP.
3. Pārbaudīt izstrādāto vakcīnas kandidātu spēju aktivēt Smad signālceļu *in vitro*.
4. Veikt nobrieduša MSTN proteīna ķīmisku konjugāciju pie fāga Q β VLP.
5. Pārbaudīt izveidotus vakcīnas kandidātus peļu modelī, raksturojot to imunogēnās īpašības un ietekmi uz peļu ķermeņa un muskuļu masu.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Miostatīns – struktūra, signālceļi un nozīme organismā

1.1.1. TGF-β supersaime un miostatīns

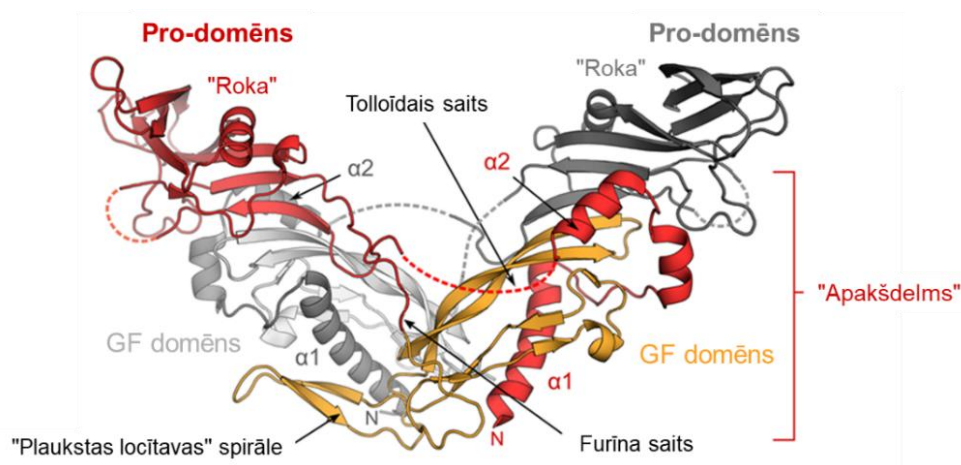
Miostatīns (MSTN) tika atklāts 1997. gadā, paplašinot zināmo transformējošo augšanas faktoru – TGF-β – supersaimes proteīnu skaitu. Sākotnēji proteīns nosaukts par GDF-8 jeb augšanas/diferenciācijas faktoru-8 [58]. Cilvēku *Mstn* gēns ir lokalizēts 2 hromosomas garā pleca pozīcijā 32.2 [35]. TGF-β supersaime ietver 33 strukturāli līdzīgus augšanas un diferenciācijas faktorus un regulatoros proteīnus, kuriem ir būtiska nozīme dzīvnieku embriogēnēzē un audu homeostāzes nodrošināšanā. Supersaimes faktorus iedala TGF-β izoformās, aktīvos/inhibīvos, kaulu morfoģenētiskajos proteīnos un augšanas/diferenciācijas faktoros. Visus TGF-β saimes proteīnus kodē lielāki prekursoru polipeptīdi, kas sastāv no 3 segmentiem: amino-terminālā signālpeptīda, lielāka prekursora segmenta vai prosegmenta un karboksilterminālā TGF-β saimes monomēra polipeptīda (sk. 1.1. att.). Prekursorā prosegmentam seko furīna konvertāzes šķelšanas saits, kurā tiek atpazīts Arg-X-X-Arg (RXXR) vai Arg-X-Lys/Arg-Arg (RXK/RR) motīvs [76]. TGF-β supersaimes proteīnu prosegmentu izmērs variē no 150 līdz 450 aminoskābju atlikumiem, un tie nav konservatīvi starp dažādiem TGF-β proteīniem. Līdzības starp TGF-β proteīniem saskatāmas prosegmentiem sekojošo nobriedušo polipeptīdu sekvencēs. Karboksilterminālais reģions satur konservatīvu cisteīna atlikumu motīvu, kuru lielākajā daļā proteīnu veido septiņi līdz deviņi cisteīna atlikumi. Šie cisteīni savstarpēji mijiedarbojas, veidojot iekš- un starpmolekulārās disulfīdsaites [66].



1.1. att. TGF-β supersaimes proteīnu polipeptīdu organizācijas salīdzinājums. Ar pelēku iekrāsots signālpeptīds, ar melnu – prosegments, ar baltu – konservatīvos cisteīna atlikumus saturošs nobriedis polipeptīds. Attēls adaptēts no Morikawa *et al.* 2016 [66].

Arī miostatīna struktūra iekļauj TGF- β raksturīgo N-terminālo sekrēcijas signālsekveni, proteolītisko procesēšanas saiti ar sekojošu C-terminālo domēnu, kurš satur deviņus cisteīna atlikumus ar tiem raksturīgo izkārtojumu. C-terminālajā reģionā MSTN ir ievērojama homoloģija ar citiem TGF- β supersaimes proteīniem, un kopā ar proteīnu GDF-11 tas veido atsevišķu apakšgrupu supersaimes ietvaros [58]. Miostatīna sekvence evolūcijas gaitā ir saglabājusies ļoti konservatīva dažādām mugurkaulnieku sugām, kas norāda, ka arī proteīna funkcijas tiek saglabātas [59].

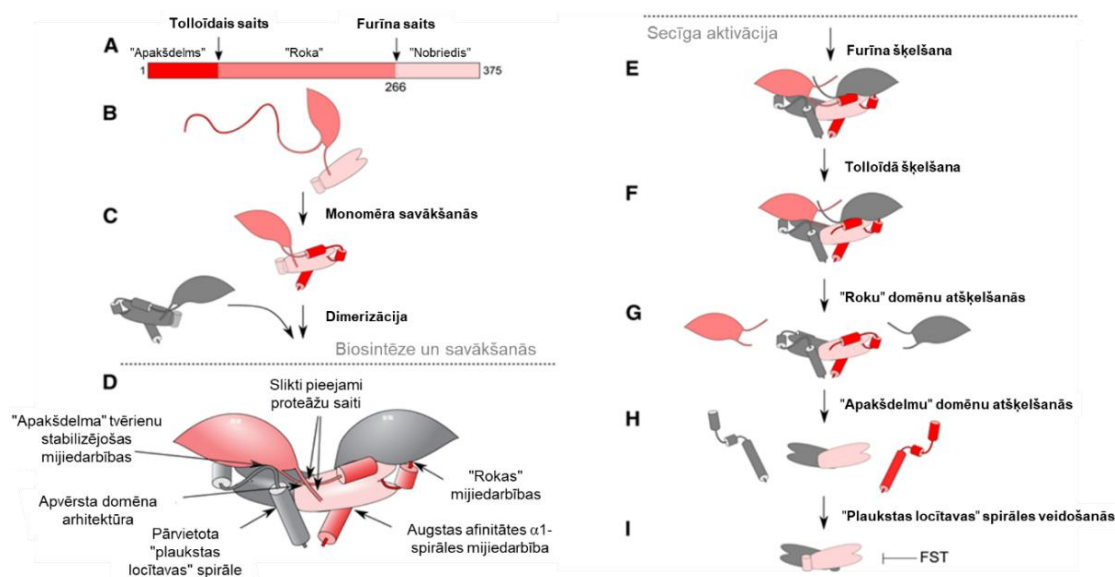
Kā tas raksturīgs pro-TGF- β supersaimes proteīniem, pro-MSTN ir homodimērs, kas sastāv no divām identiskām subvienībām, kas saistītas ar disulfīdsaitēm. Katra subvienība sastāv no 109 aminoskābju atlikumiem un satur pro-domēnu N-terminālajā galā un mazāku augšanas faktora (GF) domēnu C-terminālajā galā. Augšanas faktora domēns satur cisteīna mezgla motīvu (strukturālais motīvs, kurš sastāv no trīs disulfīdu tiltiņiem) un četras antiparalēlas β -plāksnes (dēvētas par “pirkstiem”). Cisteīna mezgla struktūra esamība pro-MSTN pieļauta jau agrāk, jo analogiskas struktūras sastopamas arī citos TGF- β supersaimes proteīnos [50]. Homodimēra abi identiskie GF domēni ir kovalenti saistīti ar disulfīdsaitēm izliekto “plaukstu” locītavu reģionā. Pro-domēna N-terminālajā galā ir “apakšdelma” spirāles, kuras aptver nobriedušu GF, un globulārs “rokas/pleca” domēns. Pro-MSTN no citiem TGF- β supersaimes proteīniem atšķirīgu padara tas, ka proteīns ieņem V-veida struktūru ar apvērstu domēnu topoloģiju, kas tiek dēvēta par “atvērtās rokas” struktūru (sk. 1.2. att.). Šīs struktūras rezultātā starp “rokas” domēniem nav mijiedarbību [7, 22].



1.2. att. Cilvēka miostatīna “atvērtās rokas” prekursora struktūra. Attēls adaptēts no Cotton *et al.* 2018 [22].

Lai iegūtu bioloģiski aktīvu, nobriedušu MSTN, nepieciešami divi proteolītiskās šķelšanas posmi (sk. 1.3. att.). Sākotnēji prekursora MSTN ir 375 aminoskābes garš [58]. Pirmkārt, signālpeptidāze no prekursora miostatīna nošķel 24 aminoskābju garu N-terminālo signālsekveni, izveidojot pro-MSTN. Tālāk, pateicoties disulfīdsaišu izveidei pie C-terminālā gala, seko proteīna

dimerizācija. Dimēra procesēšanas saita vietā furīna proteāze atpazīst Arg-Ser-Arg-Arg motīvu un dimērs tiek atšķelts. C-terminālā gala šķelšana rezultējas N-terminālā propeptīda izveidē ar N-saistītu glikozilgrupu un receptoru saistošo domēnu C-terminālajā galā. Propeptīdam ir nozīmīga loma pareizas C-terminālā domēna struktūras izveidē un C-terminālā dimēra aktivitātes regulēšanā pēc proteolītiskās procesēšanas [52]. Kad N-terminālais propeptīds nekovalenti piesaistās pie C-terminālā reģiona, izveidojas latents MSTN komplekss, kas neļauj proteīnam tūlītēji saistīties pie MSTN receptoriem. Pēdējā posmā tolloīdā proteāze šķel propeptīdu, kas rezultējas C-terminālā dimēra – nobrieduša MSTN – atbrīvošanā [50, 107]. Latenta miostatīna aktivācija iespējama arī bez proteolītiskās šķelšanas, bet gan apstrādes rezultātā ar skābi vai karstumu [107, 115].



1.3. att. Pilns miostatīna biosintēzes process. Miostatīna prekursora sintēze (A – C), latents prekursors (D), secīga pro-miostatīna aktivācija furīna un tolloīdās šķelšanas rezultātā (E, F), kompleksu atšķelšanās un nobrieduša MSTN veidošanās (G – I). Attēls adaptēts no Cotton *et al.* 2018 [22].

Nobrieduša MSTN struktūra pirmo reizi noteikta 2009. gadā kompleksā ar MSTN antagonistu follistatīnu 288 (Fst288). Noteiktajai struktūrai raksturīga klasiskā TGF- β supersaimes proteīnu “rokas” arhitektūra. Katrs pēc proteolītiskās šķelšanas izveidojies MSTN monomērs satur četras starpmolekulāras disulfīdsaites, trīs no kurām ir iesaistītas cistīna mezgla veidošanā. Kad divi MSTN monomēri satuvinās antiparalēlā virzienā, tie rada izliektu vai ieliektu struktūru. Cistīna mezgli un dimerizācija ir ļoti būtisks miostatīna stabilitāti nosakošs faktors [16, 52]. Galvenā atšķirība starp pro-MSTN un nobriedušu miostatīnu ir tajā, ka nobriedušam MSTN ir eksponēti receptoru-saistošie saiti, kas nodrošina proteīna saistīšanos pie aktivīna tipa II receptoriem ActRIIA un ActRIIB [16]. Ilgi tika uzskatīts, ka MSTN strukturāli piederīgs pie TGF- β aktivīniem, jo tam ir 40% līdzība ar aktivīnu klases proteīniem. Tāpat ir pierādīts, ka proteīns mijiedarbojas ar aktivīna

inhibitoru follistatīnu [52]. Taču rentgena kristalogrāfijas ceļā noteiktā struktūra apstiprināja, ka tas ir TGF- β supersaimes proteīns, kas kopā ar GDF-11 pieskaitāms atsevišķai apakšklasei [22].

Miostatīns tiek ekspresēts gan embriogēnēzes laikā, gan pieaugušos īpatņos. *In situ* hibridizācijas analīzes rāda, ka peļu embrijos *Mstn* ekspresija sākas sommītos gestācijas vidū, specifiski miotoma nodalījumā, no kura attīstās skeleta muskulatūra. Embriogēnēzes laikā miostatīna mRNS līmenis sākotnēji ir zems un tālāk paaugstinās, turpinoties attīstībai, kas ļauj attīstīties skeleta muskulatūrai [58]. Pieaugušās pelēs miostatīna RNS tiek ekspresēta pārsvarā skeleta muskuļos. Galvenais cirkulējošā MSTN avots organismā ir muskuļu šķiedras. Papildus skeleta muskulatūrai, MSTN ļoti zemos līmeņos tiek ekspresēts arī sirdī un adipozajos audos. *Mstn* ekspresija sirdī tiek ievērojami augšupregulēta pēc sirds muskuļa traumas [49]. Neprocesēts miostatīna prekursors veido lielāko daļu miostatīna skeleta muskuļu ekstracelulārajā vidē. Tas ir piesaistīts pie šūnu ekstracelulārās matricas, kur mijiedarbojas ar dekorīnu, fibromodulīnu, fibronektīnu un laminīnu. MSTN mijiedarbojas arī ar TGF- β saistošajiem proteīniem – inhibitorajiem follistatīnu un FLRG (ar follistatīna gēnu saistītais proteīns), kā arī ar GASP-1 (ar augšanu un diferenciāciju saistīto seruma proteīnu). Šie proteīni regulē MSTN aktivitāti, veidojot kompleksu ar tā prodomēnu, uzturot to latentā stāvoklī, tādā veidā piedaloties audu homeostāzes nodrošināšanā [3, 62].

1.1.2. Miostatīna signālceļi

Miostatīns īsteno muskuļu regulācijas funkcijas caur daudzveidīgiem signālceļiem. MSTN iedarbības signālceļus var iedalīt Smad un ne-Smad proteīnu mediētajos ceļos. Smad ir strukturāli līdzīgu proteīnu grupa, kuri pārvada TGF- β supersaimes receptoru signālus. Smad proteīnus iedala receptoru-regulētajos Smad (R-Smad) – iesaistīti tiešā signālu nodošanā –, kopīgo partneru (*common partner*) Smad (Co-Smad) – mijiedarbojas ar R-Smad, piesaistot regulatoros faktorus, – un inhibitorajos Smad (I-Smad) – nomāc R-Smad aktivitāti, funkcionē kā transkripcijas faktori [84].

Miostatīna Smad mediētais signālceļš sākas ar nobrieduša MSTN C-terminālā domēna dimēra piesaisti pie ActRIIB vai ActRIIA receptoriem. Lai gan MSTN var saistīties pie abiem receptoriem, spēcīgāka saistība notiek ar ActRIIB [52]. Tas rezultējas aktivīna I tipa receptoru (ALK4 vai ALK5) piesaistē un aktivācijā, izveidojot heteromērisku kompleksu. Šis process savukārt aktivē Smad2 un Smad3 fosforilāciju, kas padara iespējamu to heterodimerizāciju ar Smad4. Izveidojies komplekss tiek pārvietots uz kodolu, lai modulētu lejupejošo (*downstream*) gēnu ekspresiju. Tas iekļauj ar atrofiju saistīto gēnu augšupregulēšanu (*up-regulation*) un miogēno diferenciācijas faktoru supresiju [26]. I-Smad proteīns Smad7 var kavēt R-Smad proteīnu fosforilāciju caur aktivīna I tipa receptoriem un degradēt TGF- β receptoru, tādā veidā bloķējot Smad-mediēto MSTN signālpārraidī [17, 18]. MSTN-ActRIIB-ALK4/ALK5-Smad2/3 ceļa inhibīcija saistīta ar muskuļu hipertrofiju, un

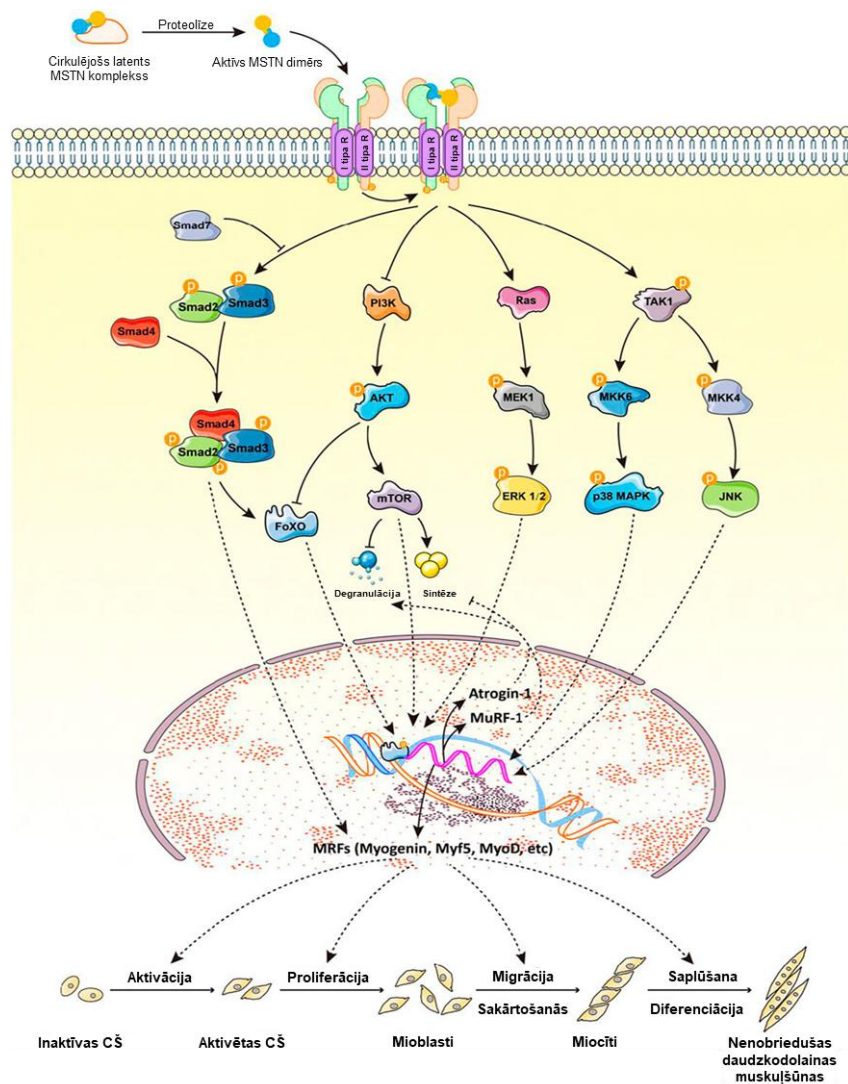
paaugstina E3 ligāžu, atrogīna-1 ekspresiju, kas paaugstina proteīnu katabolismu caur proteosomu ubikvitinēšanas ceļu [50].

Miostatīnam ir vairāki signālceļi, kas nav saistīti ar Smad aktivāciju. MAPK (miogēna aktivētās proteīnu kināzes) signālceļu atzari ERK1/2, JNK un p38MAPK ir iesaistīti MSTN signāla pārvadē pēc tā piesaistīšanās receptoriem [17]. C212 un A-204 šūnu līnijās MSTN caur TAK1-MKK6 signālceļu aktivē p38 MAPK, kas rezultējas mioblastu proliferācijas inhibīcijā un muskuļu atrofijas veicināšanā. JNK ceļa aktivācija caur miostatīna inducētu reaktīvo skābekļa formu veidošanos tāpat inhibē mioblastu proliferāciju un diferenciāciju, veicinot muskuļu apoptozi un noārdīšanos kataboliskos apstākļos. ERK1/2 ceļš savukārt tiek stimulēts caur Ras proteīniem un arī rezultējas kā MSTN-mediēta proliferācijas supresija caur EGR1 fosforilēšanu [41].

Vēl viens nozīmīgs signālceļš, kas nav saistīts ar Smad proteīniem, ir MSTN signāla pārvade caur PI3K/Akt/mTOR signālceļu. MSTN bloķē PI3K, kas rezultējas Akt fosforilēšanas kavēšanā. Tas savukārt noved pie mTORC1 inaktivācijas, mazinot proteīnu sintēzi un aktivējot FoxO1, kas noved pie paaugstināta muskuļu atrofiju modulējošā atrogīna-1 un MuRF-1 ekspresijas [17]. MSTN signālu transdukcija ir komplicēta, jo tas ir iesaistīts daudzveidīgos signālu nodošanas mehānismos, regulējot muskuļu metabolismu, iekaisumu un proteīnu nomaiņu (sk. 1.4. att.) [7].

Tā kā MSTN cirkulē asinīs un tam ir endokrīna iedarbība, ir nepieciešami mehānismi, lai nodrošinātu tā iedarbības specifiskumu. Viens no iespējamajiem mehānismiem ir selektīva latentā kompleksa aktivēšana mērķvietā. BMP-1/TLD proteīnāzes, kas atbildīgas par MSTN propeptīda šķelšanu, tiek aktivētas tikai tajā vietā un laikā, kur nepieciešama muskuļu augšanas inhibīcija. Par labu šai teorijai liecina arī tas, ka ir identificēti vairāki MSTN saistošie ekstracelulārie inhibējošie proteīni, caur kuriem tiek regulēta MSTN aktivitāte [49]. Alternatīvs mehānisms ir selektīvu koreceptoru izmantošana. Daži no TGF- β supersaimes proteīniem izmanto vienu vai vairākus nesaistītus koreceptorus, lai mijiedarbotos ar II tipa receptoriem, īpaši, aktivējot II tipa receptoriem. Trešais iespējama specifiskuma mehānisms ir atbilstošo aktivēto I tipa receptoru ekspresija – tikai tās šūnas, kas ekspresē aktivēto II tipa receptorus un atbilstošos I tipa receptorus spēs transducēt MSTN signālu. Šo teoriju apstiprina tas, ka I tipa receptori var pastiprināt liganda afinitāti II tipa receptoriem [49, 52].

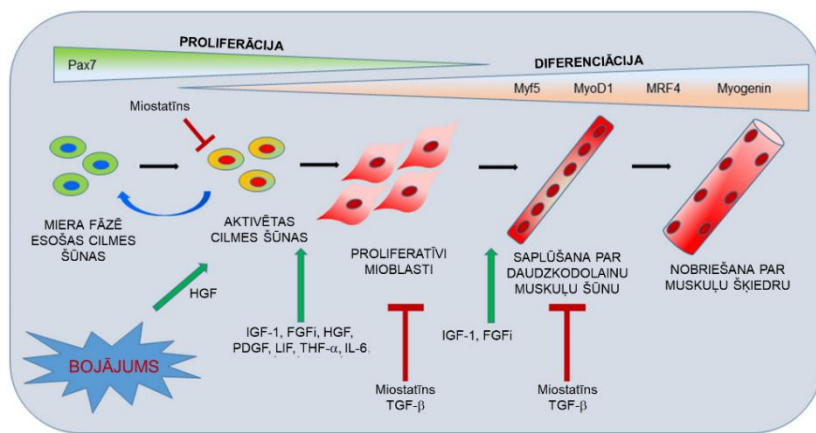
Miostatīna producēšanu organismā kontrolē arī hormonālā regulācija. Glikokortikoīdi stimulē miostatīna producēšanu muskuļos gan caur pastiprinātu *Mstn* gēna transkripciju, gan post-translācijas procesiem. Miostatīna gēna promoters satur *GRE* motīvu (glikokortikoīdu atbildes elementi), kas ļauj glikokortikoīdiem regulēt miostatīna gēna transkripciju [55]. Tādēļ tiek pieļauts, ka MSTN līmeņa pieaugums muskuļos ir nozīmīgs faktors glikokortikoīdu-izraisītas muskuļu atrofijas attīstībā [47].



1.4. att. Miostatīna Smad un ne-Smad signālceļu atspoguļojums no piesaistes pie receptoriem līdz gēnu regulācijai un ietekmei uz muskuļu šūnām dažādos to diferenciācijas posmos. Attēls adaptēts no Chen *et al.* 2021 [17].

1.1.3. Miostatīna lomas organismā

Miostatīns ir vitāli svarīgs proteīns, kas pilda nozīmīgu funkciju dzīvnieku skeleta muskulatūras attīstībā, normālos fizioloģiskos apstākļos darbojoties kā negatīvais regulators un ierobežojot muskuļu augšanu. Funkcionālie pētījumi ar *Mstn* ^{-/-} pelēm pierādījuši, ka gēna delēcija pelēs rezultējas muskuļu šķiedru skaita pieaugumā sākotnējos augšanas posmos, kā arī muskuļu šķiedru skaita un laukuma palielinājumā arī pieaugušā vecumā [86]. Šādām pelēm novēro palielinātu muskuļu un sakodiena spēku. Daļa no fenotipiskajām izmaiņām MSTN deficīta gadījumā skaidrojama ar muskuļšķiedru hiperplāziju, kas pierāda, ka MSTN ir nozīmīga loma muskuļšķiedru skaita regulēšanā [58]. Miostatīns tieši negatīvi regulē muskuļu satelītšūnu un mioblastu proliferāciju un diferenciāciju, kavējot pāreju no šūnas cikla G1 uz S fāzi [57, 97]. Miostatīns tāpat samazina muskuļu šūnu diferenciācijā iesaistīto gēnu – *Myf5*, *MyoD*, *MYOG* – ekspresiju (sk. 1.5. att.), kā arī diferencējušos nenobriedušo daudzkodolainu muskuļšūnu (*myotubes*) diametru [41, 99].



1.5. att. Miostatīna un citu faktoru ietekme uz muskuļus veidojošo šūnu proliferāciju. Attēls adaptēts no Romagnoli *et al.* 2021 [80].

Miostatīna būtiskā loma muskuļu šķiedru regulēšanā postnatāli ir pierādīta ar pētījumiem, kas rāda, ka proteīna inhibēšana izraisa muskuļu hipertrofiju gan veseliem, gan muskuļu distrofijas skartiem dzīvniekiem. Proteīns ietekmē ne tikai muskuļu hipertrofiju un hiperplāziju, bet arī muskuļu šķiedru tipu līdzsvaru. *MSTN knock-out* pelēs tiek novērota samazināta lēno oksidatīvo šķiedru proporcija un palielināta ātro glikolītisko šķiedru proporcija [49]. Caur iepriekš aprakstītajiem signālceļiem miostatīns piedalās arī līdzsvara nodrošināšanā starp skeleta muskuļu proteīnu sintēzi un noārdīšanu. Nozīmīgākie faktori, kas iesaistīti šajā procesā, ir E3 ligāzes MuRF-1 un atrogīns-1. To mediētā muskuļu proteolīze pastiprinās, paaugstinoties *MSTN* līmenim [11].

Miostatīnam ir arī nozīmīgas lomas, kas neskar muskuļu masas regulēšanu. Tas ietekmē glikozes un adipozo audu vielmaiņu, tādā veidā iesaistoties enerģijas metabolismā un insulīna rezistences attīstības procesā. Funkcionālie *in vitro* pētījumi ir pierādījuši, ka *MSTN* ietekmē adipocītus, kavējot to diferenciāciju un augšanu [2, 101]. Miostatīns kavē insulīna-stimulēto Akt fosforilāciju, mazinot glikozes uzņemšanu skeleta muskuļos, kā arī samazina GLUT4 (glikozes 4. tipa transportiera) translokāciju uz plazmatisko membrānu, pazeminot glikozes uzņemšanu un jutību pret insulīnu. Tā, piemēram, *Mstn* ^{-/-} pelēm paaugstinās tolerance pret glikozi, un tās ir pasargātas no insulīna rezistences pat pie diētas ar augstu tauku saturu [2, 19].

Miostatīns tāpat ir iesaistīts arī kaulu veidošanās procesā. Miostatīns inhibē osteoblastu diferenciāciju un sekmē osteoklastoģenēzi un kaulu resorbciju. Netiešā veidā *MSTN* izraisītā muskuļu augšanas inhibīcija iespaido arī skeleta attīstību, samazinot mehānisko slogu uz kauliem. Šis samazinātais slogs var novest pie samazināta kaulu blīvuma veidošanās [43, 70].

1.1.4. Miostatīns un tā loma patoloģiskos stāvokļos

Ņemot vērā miostatīna plašo iesaisti dažādos organisma vielmaiņas procesos – tostarp muskuļu šūnu diferenciācijā un proliferācijā, muskuļu masas regulācijā, taukaudu un glikozes metabolismā, kaulu veidošanās procesos –, tā funkcionālie traucējumi var izraisīt un būt iesaistīti

virknē dažādu patoloģisku stāvokļu. MSTN disfunkcijas var būt saistītas ne tikai ar muskuļu attīstības traucējumiem, bet arī ar vielmaiņas slimībām, piemēram, aptaukošanos, insulīna rezistenci un 2. tipa cukura diabētu, kā arī reimatoloģiskām saslimšanām.

1.1.4.1. Kaheksija

Kaheksija ir multifaktoriāls sindroms, kas ir saistīts ar hroniskām slimībām. Tā izsauc svara zudumu pazeminātas muskuļu masas dēļ, kuru dažos gadījumos var pavadīt arī tauku masas krišanās. Kaheksijas gadījumā zaudēto svaru nav iespējams atgūt, uzlabojot uztura režīmu, un tās rezultātā notiek progresīvs funkcionālātes zudums [28]. Kaheksija visbiežāk saistīta ar tādām patoloģijām kā hroniska obstruktīva plaušu slimība, hroniska nieru slimība, AIDS, onkoloģiskas saslimšanas, hroniskas iekaisuma slimības, un tās prevalence šajās saslimstību grupās ir diezgan augsta [81]. Visizteiktākā sindroma pazīme ir muskuļu masas samazināšanās paaugstināta proteīnu katabolisma rezultātā. Pētījumi liecina, ka paaugstināta MSTN ekspresija varētu būt viens kaheksiju pastiprinošiem faktoriem, jo Samant *et al.* 2017. gadā veiktajā pētījumā dzīvniekiem ar audzēja-inducētu kaheksiju tika novērota paaugstināta MSTN ekspresija, turklāt šos rezultātus apstiprina arī citi pētījumi [21, 82]. Tāpat konstatēts, ka seruma un intramuskulārā MSTN līmeņi ir paaugstināti ar HIV inficētiem vīriešiem ar svara zudumu, kas liek domāt, ka miostatīnam ir loma muskuļu svara samazināšanā slimības gadījumā [35]. Šo iemeslu dēļ ActRIIB receptoru un miostatīna antagonisti tiek izskatīti kā potenciālas terapeitiskās iespējas, lai cīnītos ar hronisku slimību izraisītu kaheksiju [90].

1.1.4.2. Sarkopēnija

Sarkopēnija ir geriatrisks sindroms, kas attīstās cilvēkiem mūža otrajā pusē un izpaužas kā pakāpeniska muskuļu spēka, masas, kvalitātes un veiktspējas samazināšanās. Sarkopēnija attīstās, samazinoties motoro vienību skaitam un atrofējoties muskuļu šķiedrām. Ar vecumu saistīta skeleta muskuļu atrofija parasti sākas dzīves ceturtajā desmitgadē, un katrā nākamajā dekādē tiek zaudēti aptuveni 3 – 8% muskuļu masas [75]. Uz 80 gadu vecumu novērojams aptuveni 30 – 50% muskuļu masas zudums, savukārt muskuļu spēks samazinās pat straujāk nekā muskuļu masa [45]. Sarkopēnijas gadījumā mainās arī muskuļu šķiedru kompozīcija, samazinoties II tipa ātrajām šķiedrām un palielinoties I tipa lēnajām šķiedrām [30]. Sarkopēnija tiek saistīta ne tikai ar fizisku mazspēju un pasliktinātu dzīves kvalitāti, bet arī ar paaugstinātām pēcoperāciju komplikāciju iespējām, kas var rezultēties kaulu lūzumos, metabolajās saslimšanās un paaugstinātā mirstībā [110]. Šobrīd sarkopēnijas ārstēšana balstās uz regulāru fizisku treniņu veikšanu un uztura bagātināšanu, kas ir efektīvas stratēģijas, taču neaizvieto nepieciešamību pēc iedarbīgas terapijas, jo dzīvesveida izmaiņas nespēj pilnībā novērst slimības attīstību, turklāt ne visiem pacientiem ir iespējas tās īstenot [45]. Lai arī sarkopēnijas pamatā esošie bioloģiskie mehānismi nav pilnībā

izpētīti, ir zināms, ka seruma miostatīna līmeņi ar vecumu palielinās. Pētījumi apstiprina, ka MSTN inhibīcija pieaugušos un geriatriskos dzīvniekos palielina muskuļu masu, uzlabojot veiktspēju un metabolismu, tādēļ terapeitiskā pieeja, kas vērsta uz MSTN darbības kavēšanu, varētu būt pievilcīga opcija sarkopēnijas ārstēšanai [104].

1.1.4.3. Aptaukošanās

Kā aprakstīts iepriekš, miostatīnam ir nozīmīga loma enerģijas vielmaiņā, un pētījumu dati liecina, ka paaugstināta MSTN ekspresija ir saistīta ar aptaukošanās attīstību. Pelēs ar ģenētisko aptaukošanos un leptīna deficītu (piemēram, ob/ob peļu līnijās), kā arī pelēm ar lipīdiem bagātu diētu novēro paaugstinātus miostatīna mRNS līmeņus, kas svara zaudēšanas procesā samazinās [1]. Arī cilvēkiem ar aptaukošanos muskuļu un cirkulējošā miostatīna līmenis ir paaugstināts, un saglabājas likumsakarība, ka pēc svara zaudēšanas MSTN mRNS līmeņi samazinās [40, 73]. Miostatīna signālu pārvadīšanas inhibēšana var kavēt aptaukošanās attīstību pelēs un mazināt tās sekas, kas varētu būt skaidrojams ar adipocītu tiešo reakciju uz MSTN signāliem [2]. Adipocīti ekspresē ActRIIB receptorus, turklāt receptoru mRNS ekspresija ob/ob pelēs arī ir paaugstināta. Taču gan ActRIIB, gan MSTN mRNS līmeņi adipocītos pelēm ar aptaukošanos ir zemāki nekā neaptaukojošos vai aptaukojošos peļu skeleta muskuļos, līdz ar to nav precīzi zināms, vai šis līmenis ir pietiekams, lai izraisītu bioloģiski nozīmīgu atbildes reakciju adipozajos audos [1]. Kopumā tomēr valda viedoklis, ka MSTN kavēšanas labvēlīgā ietekme uz aptaukošanos un tās negatīvo seku mazināšanu galvenokārt izriet no MSTN bloķēšanas labvēlīgās ietekmes uz skeleta muskulatūru [2].

1.1.4.4. Otrā tipa cukura diabēts

Iepriekš minētā MSTN iesaiste insulīna rezistences mehānismos tiek novērota arī 2. tipa cukura diabēta gadījumā. Otrā tipa diabēta pacientiem, kā arī viņu radniekiem ar hiperinsulinēmiju, skeleta muskuļu biopsijās konstatēti paaugstināti miostatīna mRNS līmeņi [72]. MSTN var ietekmēt cirkulējošos glikozes līmeņus, tieši ietekmējot glikozes uzņemšanu, darbojoties kā funkcionāls insulīna efektu antagonists. Paaugstināta miostatīna ekspresija korelē ar samazinātu jutīgumu pret insulīnu, kas ir kritiski nozīmīgs aspekts 2. tipa diabēta attīstībā [2]. Vēl viens veids, kā izpaužas miostatīna loma sistēmiskā glikozes metabolisma regulācijā, skar MSTN ietekmi uz aknu darbību. Paaugstināta glikoneoģenēze aknās ir hepatiskā insulīna rezistences sekas, kas veicina glikozes līmeņa paaugstināšanos asinīs 2. tipa diabēta slimniekiem. Pētījumi liecina, ka MSTN šķietami modulē hepatiskā insulīna rezistenci un/vai glikozes ražošanu. Taču jautājums par to, vai latentā miostatīna kompleksa aktivācija ir iespējama aknās, paliek neatbildēts [2, 105]. MSTN tāpat ir netieši iesaistīts diabēta komplikāciju parādīšanās un attīstības procesā [109].

1.1.4.5. Kaulu un locītavu slimības

Tā kā miostatīns piedalās arī kaulaudu veidošanās un resorbcijas procesos, pastāv viedoklis, ka MSTN varētu būt zināma loma dažādu kaulu slimību attīstībā. Viena no tām ir *ostegenesis imperfecta* (OI) jeb nepilnīgā osteoģenēze – ģenētisko slimību grupa, kuru raksturo I tipa kolagēna strukturālās izmaiņas, kuru rezultātā palielinās kaulu trauslums un lūzumu risks. Ir veikti pētījumi peļu modeļos ar OI reprezentējošām mutācijām, kuros noskaidrots, ka ģenētiska vai farmakoloģiska MSTN inhibīcija rezultējas uzlabotā skeleta fenotipā un lielākā muskuļu spēkā [69]. Tāpat novērots, ka pacientiem ar osteoartrītu ir paaugstināti seruma miostatīna līmeņi, turklāt pastāv korelācija starp miostatīna līmeni un slimības smaguma pakāpi [114]. *Mstn* -/- peļu modeļos ar osteoartrītu novērotas mazāk izteiktas slimības izpausmes ar zemāku kaulu eroziju un iekaisumu, kā arī lielāku satvēriena spēku [24]. Šī iemesla dēļ MSTN aktivitātes bloķēšana varētu kalpot par potenciāli efektīvu terapijas virzienu ne tikai muskuļu, bet arī kaulu un locītavu patoloģiju gadījumā.

1.1.5. Uz miostatīna inhibīciju balstītas terapijas

Miostatīns gandrīz kopš tā atklāšanas brīža ir raisījis lielu interesi zinātniskajā vidē kā potenciāls mērķis deģeneratīvu muskuļu slimību terapijā. Miostatīna inhibitoru izstrādes stratēģijas ir diezgan plašas: neitralizējošas anti-MSTN antivielas, miostatīna propeptīdi, šķīstoši ActRIIA un ActRIIB receptori un receptoru blokatori, gēnu terapijas un MSTN antagonisti. Taču anti-MSTN terapiju izstrādē jāņem vērā, ka strukturālo un signālceļu līdzības dēļ antagonisti varētu ietekmēt arī citus TGF- β supersaimes proteīnus, tādēļ terapijas iedarbībai jābūt specifiski mērķētai tieši uz MSTN, lai mazinātu iespējamās nevēlamos efektus [92]. Šobrīd ir vairāki terapeitiskie līdzekļi, kas atrodas dažādās klīnisko pētījumu fāzēs. Lielākā daļa no tiem ir anti-MSTN monoklonālās antivielas – Stamulumab (MYO-029), Landogrozumab (LY-2495655), Domagrozumab (PF-06252616), Trevogrumab (REGN-1033), SRK-015 un citas –, kas indicētas muskuļu distrofiju, vēža kaheksijas un sarkopēnijas gadījumiem. Antivielu Stamulumab, Domagrozumab un Landogrozumab pētījumi gan ir terminēti, jo nav novērots pārliecinoši pozitīvs efekts. Izstrādes procesā tāpat bijuši arī šķīstoši ActRIIB receptori ACE-031, ACE-011, ACE-536, taču ACE-031, ACE-2494 pētījumi tika pārtraukti novēroto nevēlamo efektu dēļ. Savukārt ACE-011 (Sotatercept) 2024. saņēma FDA (*Food and Drug Administration*) atļauju pulmonārās arteriālās hipertensijas ārstēšanai, bet ACE-536 (Luspatercept) apstiprināts β -talasēmijas ārstēšanai [51, 92].

Ir bijuši arī pētījumi par iespējamās miostatīnu inhibējošas vakcīnas izveidi. Tang un kolēģi (2007) izveidoja terapeitisku DNS vakcīnu, kurā tetānusa toksīna imūndominantais T-līdzētājšūnu epitops tika piesaistīts pie MSTN. Peļu imunizācijas rezultātā iegūtajos serumos detektēja specifiskas antivielas pret rekombinanto proteīnu, turklāt peļu ķermeņa un muskuļu masa, kā arī satvēriena spēks statistiski nozīmīgi pieauga [95]. Pētīta ir peļu maternālās anti-miostatīna

imunizācijas ietekme uz pēcnācēju skeleta muskuļu augšanu. Lai arī pētījumā izmantotie imunogēni izraisīja anti-miostatīna antivielu veidošanos, kuras tika nodotas arī pēcnācējiem, šīm antivielām nebija nekādas statistiski nozīmīgas ietekmes uz to muskuļu masu. Luciferāzes reportiera testā antivielas arī neuzrādīja spēju inhibēt miostatīna aktivitāti [10]. Vienā no pētījumiem tika izmantota novatoriska metode, kurā ar karstumu inaktivēts, MSTN ekspresējošs rekombinants *Saccharomyces cerevisiae* tika izmantots imunizācijām orālā un injekciju ceļā. Abu imunizācijas metožu rezultātā pelēm veidojās specifiskas anti-miostatīna antivielas un novērots statistiski nozīmīgs ķermeņa svara un muskuļu masas pieaugums [113]. Līdzīga pieeja izmantota arī Sung *et al.* 2022. gada pētījumā, kurā zinātnieki izstrādāja orālas vakcīnas kandidātu BLS-M22, balstītu uz modificētu, cilvēka MSTN ekspresējošu *Lactobacillus casei*. Izveidotā vakcīna tika pārbaudīta Dišēna muskuļu distrofijas *mdx* peļu modelī. Rezultātā pēc imunizācijas pelēm novēroja paaugstinātus anti-MSTN IgG titrus un ķermeņa masas pieaugumu, uzlabotas motorās funkcijas uzvedības testos, kā arī distrofisko parametru uzlabojumus histoloģiskajā analīzē [94]. Kopumā pētījumi liecina, ka anti-miostatīna vakcīnas ir potenciāla un samērā neizpētīta terapeitisko risinājumu niša.

1.2. Vienpavediena RNS fāgu vīrusveidīgās daļiņas

1.2.1. VLP – vīrusveidīgās daļiņas

Vīrusveidīgās daļiņas jeb VLP (*virus-like particles*) ir vīrusa proteīnu veidotas nanostruktūras ar izteiktu simetriju un regulāru proteīnu kopiju izvietojuma ģeometriju. Vīrusveidīgo daļiņu struktūrai ir augsta līdzība ar attiecīgo natīvo vīrusu, no kura proteīniem daļiņa ir izveidota [78]. VLP piemīt plaša strukturālā dažādība, kas padara tās funkcionāli daudzpusīgas. Vīrusveidīgās daļiņas var iedalīt divās lielās grupās: neapvalkotās VLP un daļiņas, kurām ir papildus lipīdu apvalks. Gan apvalkotās, gan neapvalkotās VLP var sastāvēt no viena vai vairākiem vīrusa proteīniem, kuri var būt izkārtoti vienā vai vairākos slāņos [54]. Atkarībā no vīrusa, kura proteīni tiek izmantoti VLP veidošanai, to struktūra var būt ikosaedriskā, sfēriska, spirālveida vai pavedienvēda [111]. Zinātniskajā literatūrā aprakstītie VLP izmēri ir variabli, taču visbiežāk daļiņu izmērs svārstās no 20 līdz 200 nm. Šis izmērs ir lieliski piemērots, lai VLP varētu ātri nokļūt limfritē caur limfvadu sienīņu porām un mijiedarboties ar antigēnus prezentējošajām šūnām (APC) un B-šūnām [56, 65]. Viena no raksturīgākajām VLP īpašībām ir to veidojošo proteīnu spēja pašsavākties daļiņās ekspresijas procesā. Tā, piemēram, ssRNS fāgu apvalka proteīni (CP) satur visu informāciju, kas nepieciešama, lai proteīnu dimēri, savstarpēji mijiedarbojoties, savāktos ikosaedriskās VLP, papildus iekapsulējot heterogēnu šūnu RNS maisījumu [74]. Taču daļiņas nesatur vīrusa ģenētisko materiālu, tādēļ tās nav infekciozas un nespēj replicēties, kas ir viens no būtiskākajiem drošības aspektiem to pielietošanai dažādu biomedicīnisku tehnoloģiju izstrādē [42].

VLP proteīnu producēšanai ir iespējams izmantot bakteriālās, raugu, insektu, zīdītāju un augu šūnu ekspresijas sistēmas, katrai no kurām ir savas priekšrocības un trūkumi [32]. Ekspresijas sistēma jāizvēlas, balstoties uz nepieciešamajām proteīnu foldinga un pēctranslācijas modifikāciju (fosforilēšanas, glikozilēšanas) prasībām. Ir iespējama arī VLP producēšana *in vitro* bezšūnu (*cell-free*) sistēmā [48]. Bezšūnu ekspresijas sistēma piedāvā vairākas priekšrocības salīdzinājumā ar klasiskajām ekspresijas sistēmām, piemēram, ātrāku proteīna producēšanu vai iespēju producēt VLP, kas satur nedabiskas aminoskābes vai toksiskus proteīnu starpproduktus. Taču šis ekspresijas veids ir dārgāks nekā VLP producēšana citās ekspresijas sistēmās un procesa mēroga palielināšana ir ierobežota [37]. Lai izveidotu VLP, kuras būtu piemērotas vakcīnu izveidei, ekspresijas sistēmai jābūt drošai, iegūtajam produktam jābūt augstas tīrības pakāpes, nav jāsaturs endotoksīni un producēšanas procesa mērogam jābūt viegli optimizējamam un palielināmam [79].

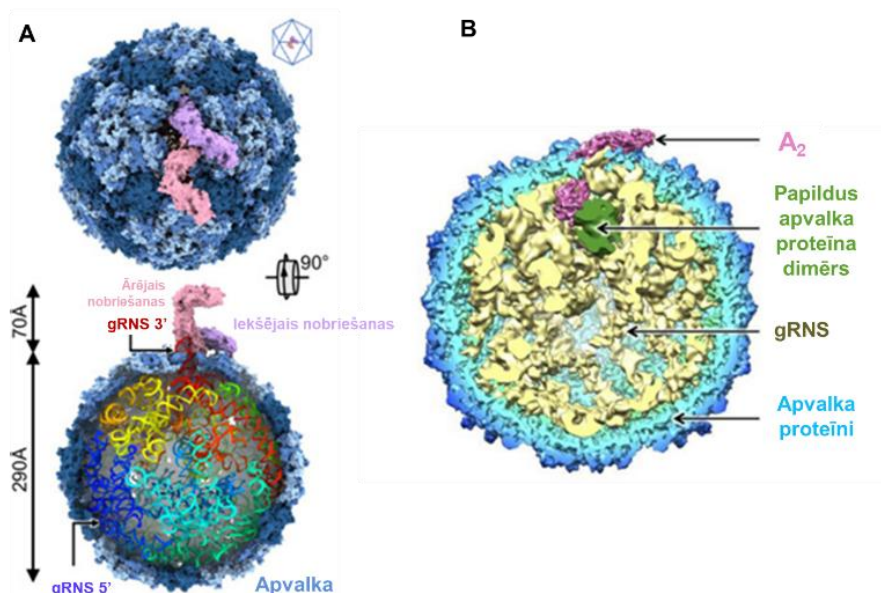
VLP strukturālā variabilitāte piedāvā pielāgojamu VLP funkcionalitāti, kas paver plašu VLP pielietojumu klāstu. Vīrusveidīgās daļiņas var pielietot kā nesējus dažādu bioloģisku molekulu transportēšanai un mērķētai piegādei organismā. VLP centrā var iekapsulēt oligonukleotīdus, zāļvielas, fluorescentos proteīnus, enzīmus un citas bioloģiskās molekulas. Pateicoties šai īpašībai, VLP var izmantot attēlveidošanai, specifiskai mērķētai šūnu un audu iezīmēšanai, biosensoru izveidei, terapeitisku proteīnu un enzīmu precīzai nogādei organismā. Tāpat, iekapsulējot enzīmus, VLP var izmantot nanoreaktoru izveidei [93]. Papildus iekapsulēšanai, VLP var modificēt ar mērķi eksponēt antigēnus uz to virsmas. Tādā veidā VLP kļūst par efektīvu platformu imūnterapijas pieeju un vakcīnu izveidei [63].

1.2.2. Vienpavediena RNS fāgi

Lai gan vīrusveidīgās daļiņas var iegūt no dažādu vīrusu proteīniem, VLP producēšanai no ssRNS bakteriofāgu apvalku proteīniem ir ievērojamas priekšrocības. ssRNS fāgi ir *Leviviricetes* klasei piederoši, baktērijas inficējoši vīrusi [15]. Tā kā ssRNS dabiskais saimniekorganisms ir baktērijas, to apvalka proteīnu sintēzi var veikt bakteriālajā ekspresijas sistēmā, kas ir ievērojams ieguvums laika, izmaksu un procesa sarežģītības ziņā. Tāpat tas nozīmē, ka proteīniem nebūs nepieciešamas specifiskas pēctranslācijas modifikācijas, lai saglabātu pareizo struktūru (foldu). Šajā darbā tuvāk tiks apskatīti ssRNS *Fiersviridae* saimes fāgs *Qubevirus durum* jeb Qβ un *Duinviridae* saimes fāgs *Apeevirus quebecense* jeb AP205 (sk. 1.6. att.) [15, 27, 46, 116].

ssRNS fāgu genoma izmērs ir 3500 līdz 4300 nukleotīdus garš, to veido viena pozitīvi kodējoša (*positive sense*) RNS molekula, kas translācijā tieši tiek izmantota kā matricas RNS [88]. Genomā tiek kodēti četrus proteīnu sintēze: apvalka proteīna (CP), nobriešanas A/A2 proteīna (AP), replikāzes subvienības (RP) un lizēšanas (LP) vai caurlasīšanas (A1) proteīna sintēze [77]. Vienpavediena RNS fāgu genoms ir iepakots neapvalkotos, sfēriskos virionos. Tiem ir T=3

ikosaedriskā simetrija un diametrs robežās no 25 līdz 30 nm [96]. Fāga kapsīdu, saistoties ar genomisko RNS, veido 178 identiskas apvalka proteīnu kopijas un viena nobriešanas proteīna kopija. Pateicoties stabilizējošām spēcīgām hidroforām un polārām mijiedarbībām, apvalka proteīnu monomēri veido 89 dimērus [25]. Gan fāga Q β , gan AP205 daļiņas tāpat tiek papildus stabilizētas ar kovalentajām disulfīdsaitēm starp kapsīdas subvienībām [34, 87]. Pēc Shishova un kolēģu noskaidrotā 2016. gadā, fāga AP205 apvalka proteīns strukturāli ievērojami atšķiras no iepriekš zināmo fāgu apvalku proteīniem. Parasti ssRNS fāgu CP veido N-terminālā β -matadata, piecu virkņu antiparalēla β -plāksne un divas α -spirāles terminālajā C-galā. Taču fāga AP205 apvalka proteīna struktūrai nav pirmās N-terminālā gala β -virknes, taču ir papildus virkne C-galā. Šīs cirkulārās permutācijas rezultātā pēc viriona savākšanās uz tā virsmas ir eksponēti gan N-, gan C-terminālie gali [87]. Šī īpašība nodrošina, ka AP205 fāga apvalka proteīna N- un C-terminālajos galos iespējams ievietot garākus insertus (līdz 55 aminoskābēm), kas padara to par izdevīgu izvēli ģenētiski rekombinantu VLP veidošanai, kas nepieciešams, piemēram, vakcīnu izstrādei [98].



1.6. attēls. (A) Fāga AP205 un (B) fāga Q β struktūras. Attēli adaptēti no Cui *et al.* 2017 un Ment *et al.* 2024 [23, 60].

1.2.3. VLP modificēšana un funkcionalizēšana

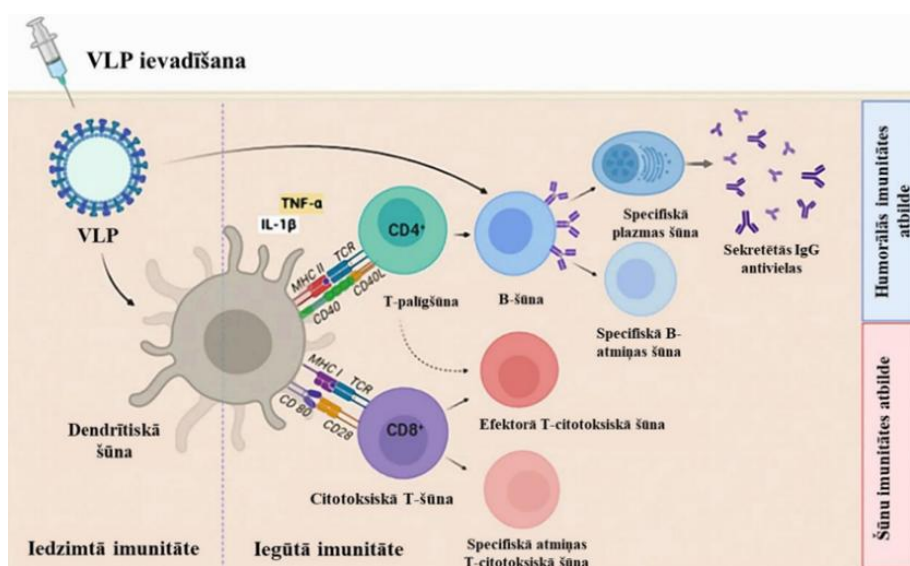
Viens perspektīvākajiem un izplatītākajiem VLP pielietojumiem ir to izmantošana vakcīnu izstrādē. VLP imunogēnās īpašības ir lieliski piemērotas, lai pastiprinātu antigēnu izraisīto imūno atbildi. Pievienojot vīrusveidīgajai daļiņai antigēnu – organisma autoantigēnu vai proteīnu, kurš nav vīrusa struktūras daļa –, tiek iegūta himēriska VLP [79]. Visbiežāk antigēnu piesaistīšanai pie VLP tiek izmantota ģenētiskā modificēšana vai ķīmiskā konjugācija.

Ģenētiskās modificēšanas gadījumā vēlamā antigēna kodējošā sekvenca tiek ieviesta vīrusa apvalka proteīnu kodējošajā sekvencē. Plānojot modificētā proteīna sekvenci, jāņem vērā, ka inserts jāievieto tā, lai antigēns tiktu eksponēts uz VLP virsmas, ja nepieciešams panākt antivielu veidošanos pret mērķproteīnu. Tas ļaus B-šūnām atpazīt antigēnu izvietojuma struktūru un caur B-šūnu receptoru (BCR) šķērssaistīšanos (*crosslinking*) aktivēt humorālās imunitātes mehānismus. Antigēni var tikt eksponēti arī VLP iekšienē, tādā gadījumā tiks izraisīta T-šūnu mediēta imūnā atbilde [71]. Ģenētiskā modificēšana kā VLP funkcionalizēšanas metode ir izaicinoša ar to, ka pēc antigēna un kapsīdas monomēra sekvences apvienošanas ir grūti paredzēt, vai antigēns un kapsīdas proteīns ieņems pareizo konformāciju. Tas ietekmēs, vai VLP spēs savākties, izveidojot natīvajam virionam līdzīgu struktūru un pareizi eksponējot interesējošo antigēnu. Tādēļ ģenētiskās modificēšanas pieeja biežāk ir pielietojama, ja uz VLP paredzēts izvietot atsevišķus mērķproteīnu epitopus nevis pilna izmēra proteīnus [79]. Līdz ar to ģenētiskās sapludināšanas metode, lai arī lētāk realizējama, nav universāla un prasa fundamentāli dziļu izpratni par izmantojamo VLP strukturālajām īpašībām [67].

Otra plaši izmantota metode VLP modificēšanai ir ķīmiskā konjugācija, kas balstīta uz aminoskābju brīvo atlikumu mijiedarbībām. Ķīmiskās konjugācijas pamatā ir kovalento saišu veidošanās starp brīvajiem aminoskābju atlikumiem uz VLP virsmas un tiem komplementārajām grupām uz antigēna. Modificēšanas metodes var būt mērķētas uz aminogrupām, karboksilgrupām, sulfhidrilgrupām vai hidroksilgrupām [65]. Visbiežāk saišu veidošanai izmanto uz VLP esošos lizīna atlikumus. Lys var konjugēt ar N-hidroksisukcinimīda (NHS) esterī, kā rezultātā veidojas stabila amīdsaite. Ķīmiskajai konjugācijai tāpat var izmantot cisteīna ķēžu sulfhidrilgrupas, kuras reakcijā ar maleimīdu rada stabili tiolētera saiti, kas efektīvi saista VLP ar proteīnu. Šādas konjugācijas gadījumā tiek izmantots bifunkcionāls linkeris (*cross-linker*) [42]. Ja uz interesējošo proteīnu virsmas nav nepieciešamo piesaistīšanās saītu, tos var ieviest, ģenētiski modificējot proteīna sekvenci un pievienojot, piemēram, uz VLP virsmas eksponētus lizīna vai cisteīna atlikumus. Šādā gadījumā gan jāņem vērā, ka tas var ietekmēt VLP spēju pašsavākties un iegūtās daļiņas stabilitāti [74]. Ķīmiskajai konjugācijai kā VLP funkcionalizēšanas metodei ir gan trūkumi, gan priekšrocības. Ķīmiskās saistīšanas reakcija var būt grūti kontrolējama un tās rezultātā ne vienmēr iespējams modificēt visus VLP veidojošos monomērus [67]. Tāpat antigēnu izvietojums uz VLP var būt heterogēns un nepilnīgs [13]. Taču ir arī virkne priekšrocību. Tā kā VLP un mērķa antigēns sākotnēji tiek ekspresēti atsevišķi, tas palielina iespēju, ka gan VLP, gan antigēniem būs pareiza proteīnu struktūra, kam ir kritiska nozīme korektas imūnās atbildes izsaukšanā. Tāpat ķīmiskās modificēšanas ceļā uz VLP virsmas var izveidot dažādus antigēnus: peptīdus, proteīnus, ogļhidrātus un citas bioloģiskās molekulas. Ar ģenētiskās modificēšanas metodi par antigēnu var kalpot tikai proteīni vai peptīdi [31].

1.2.4. VLP imunogenitāte

Viena no perspektīvākajām VLP pielietojuma iespējām ir to izmantošana vakcīnu izstrādē. Tā kā vīrusveidīgās daļiņas morfoloģiski ir gandrīz identiskas natīva vīrusa struktūrai, tām ir izteiktas imunogēnās īpašības. Tas skaidrojams ar to, ka imūnsistēma identificē vīrusveidīgās daļiņas kā PAMP – ar patogēnu asociēto molekulāro struktūrmodeļi (*pathogen-associated molecular pattern*). Evolūcijas gaitā specifiskā imunitāte ir attīstījusies, lai atrastu, atšķirtu un veidotu atbildes reakcijas uz patogēniem, tajā skaitā, vīrusiem raksturīgajām organizētajām, atkārtotajām virsmas struktūrām. PAMP struktūras atpazīst uz APC esošie struktūrmodeļus atpazīstošie receptori jeb PRR (*pattern recognition receptors*). Imunizācija ar VLP stimulē gan iedzimto, gan iegūto imunitāti, kā arī izraisa gan humorālās, gan šūnu imunitātes aktivāciju (sk. 1.7. att.) [36, 42].



1.7. att. Imūnsistēmas atbilde uz imunizāciju ar VLP. Attēls adaptēts no Nooraei *et al.* 2021 [68].

Terapeitiskās un profilaktiskās vakcīnās parasti tiek izmantoti dažādi vakcīnu dizaina veidi. Profilaktisko vakcīnu efekti balstās uz ilgi paliekošām T-līdzētājšūnu atkarīgām IgG atbildes reakcijām. Tādēļ klasiskais profilaktisko vakcīnu dizains ir vērsts uz B-šūnu atbildes uzlabošanu. Terapeitiskās vakcīnas, piemēram, pret hronisku iekaisumu vai vēža terapijām, pamatojas uz CD4+ un CD8+ T-šūnu atbildes izraisīšanu [6].

Kad VLP nokļūst organismā, tās cirkulē asinsritē un limfritē. VLP 20 – 200 nm izmērs ir labi piemērots, lai daļiņas caur limfvadu porām varētu nokļūt sekundārajos limfātiskajos orgānos, kur tajos rezidējošās APC – dendrītiskās šūnas (DC) – fagocitozes un makropinocitozes ceļā uzņem vīrusveidīgās daļiņas [68]. Antigēni mijiedarbojas ar tiem PRR, kuri visefektīvāk atpazīst tieši vīrusu proteīnus: CLR (C-tipa lecitīna receptori) un TLR (Toll-līdzīgie receptori). CLR ir specifisku ogļhidrātu motīvu atpazīšanas domēni, tādēļ šie receptori labāk atpazīst glikozilētus vīrusu proteīnus, kas īpaši attiecas uz apvalkotajiem vīrusiem [8]. Savukārt TLR receptoru ligandi ir vīrusu

nukleīnskābes. VLP saistās ar TLR3, TLR7/8 un TLR9 receptoriem, kuri atrodas APC endosomālajos kompartmentos [44]. Lai gan VLP nesatur vīrusa genomu, savākšanās procesā tāpat tiek iekapsulētas šūnu nukleīnskābes, kā arī VLP var modificēt, lai tās saturētu TLR ligandus, piemēram, nemetilētas CpG sekvences. TLR receptoru saimē dsRNS kalpo kā TLR3 ligands, ssRNS ir TLR7/8 ligands, savukārt CpG ir TLR9 ligands [12]. TLR3 aktivācija pastiprina IFN- β produkciju un iekaisuma citokīnu veidošanos un stimulē T-citotoksiskās šūnas. Saistīšanās ar TLR7/8 veicina T-līdzētājšūnu šūnu un T-citotoksisko limfocītu atbildes reakcijas, savukārt saistīšanās ar TLR9 veicina B-šūnu proliferāciju un plazmas šūnu veidošanos [44, 63, 83].

Pēc sekmīgas VLP uzņemšanas dendrītiskajās šūnās, antigēni nonāk endosomālī-lizosomālajos kompartmentos, kur daļiņas tiek noārdītas līdz peptīdiem, savukārt dendrītiskās šūnas migrē uz sekundārajiem limfoidajiem orgāniem [6]. VLP mijiedarbība ar PRR iniciē iekaisuma atbildes reakciju un iekaisuma faktoru TNF- α un IL-1 β izdalīšanos. Iekaisuma faktori piesaista papildus dendrītiskās šūnas un paaugstina proteāžu koncentrāciju tajās, kas pastiprina lizosomālo proteolīzi. Rezultātā VLP tiek procesēta un izveidojas 3 kDa gari peptīdi, kuri kompleksā ar MHC II (*major histo-compatibility complex*) var tikt prezentēti uz APC virsmas. Paralēli uz DC virsmas parādās arī limfocītu kostimulatorās molekulas – CD80 un CD86. MHC II-peptīdu komplekss un kostimulatorās molekulas aktivē CD4⁺ T-līdzētājšūnas, kuras ir nepieciešamas gan T-šūnu, gan B-šūnu proliferācijai un diferenciācijai [29, 112].

VLP peptīdi var tikt prezentēti arī saistībā ar MHC I kompleksu. Klasiskā MHC I aktivēšanas ceļa gadījumā tiek aktivētas T-citotoksiskās šūnas, kas vēršas pret intracelulārajiem patogēniem un vēža šūnām. VLP kā eksogēnais antigēns saistībā ar MHC I kompleksu var tikt prezentētas krusteniskās prezentēšanas ceļā (*cross-presentation*) [36]. Krusteniskajai prezentēšanai antigēni tiek degradēti proteosomu citosolā, veidojot īsus peptīdus, kuri tālāk tiek pārvietoti uz endoplazmatisko tīklu ar TAP (ar antigēnu prezentāciju saistītas transportieris) un tiek pievienoti MHC I molekulām. Tālāk izveidotie MHC I-peptīdu kompleksi tiek pārvietoti uz dendrītiskās šūnas virsmu, kur tiek prezentēti T-citotoksiskajām šūnām [9].

Blīvais un atkārtojumiem bagātais antigēnu izvietojums ļauj VLP efektīvi šķērssaistīties (*cross-linking*) ar B-šūnu receptoru (BCR) imūnglobulīniem, kas nodrošina, ka B-šūnas tiešā veidā atpazīst antigēnus, tiek aktivētas un nodrošina IgM atbildes reakciju. Optimālā ģeometrija B šūnu aktivācijai ir 15 – 20 haptēnu molekulas, kas ir izvietotas 5 – 10 nm attālumā viena no otras. Šie attālumi ir līdzīgi vidējam attālumam starp vīrusa apvalka proteīniem [6]. Īpaši nozīmīga atkārtojumiem bagāta struktūra ir gadījumos, ja nepieciešams izraisīt organisma pašantigēniem specifiskas antivielu atbildes reakcijas, jo šī struktūra ļauj pārvarēt B-šūnu toleranci pret autoantigēniem. Tā ir nozīmīga īpašība terapeitiskajām vakcīnām, kas vērstas uz autoantivielu veidošanos hronisku saslimšanu ārstēšanai [5]. Pēc VLP saistīšanās ar BCR daļiņas tiek pārvietotas

līdz liesai, kur antigēni tiek nogādāti folikulārajās dendrītiskajās šūnās. Aktivētas B-šūnas mijiedarbojas ar T-līdzētājšūnām un ļauj veikt imūnglobulīnu klases nomaiņu uz IgG, kā arī veidot specifiskās atmiņas B-šūnas [112]. TLR7 un TLR9 tāpat veicina izotipu klases nomaiņu uz IgG2 pelēs un IgG1 cilvēkos [64]. Lai arī VLP spēj izraisīt daudzveidīgas imūnās sistēmas atbildes reakcijas, papildus imunogenitātes paaugstināšanai vakcīnu formulēšanā tāpat tiek izmantoti adjuvanti [36].

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Darbā izmantotie materiāli

Pētījums izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā periodā no 01.09.2023. līdz 30.05.2025.

Darbā izmantotie materiāli iedalīti grupās: fāgu apvalku proteīni, reaģenti, materiāli, aparatūra un iekārtas, mikrobioloģiskās un zīdītāju šūnu kultūru barotnes un izmantotie šķīdumi. Tabulas ar pilnu darbā izmantoto materiālu uzskaitījumu pieejamas pielikumos: fāgu apvalku proteīni – 1. pielikums, reaģenti – 2. pielikums, materiāli – 3. pielikums, aparatūra un iekārtas – 4. pielikums, mikrobioloģiskās un zīdītāju šūnu kultūru barotnes – 5. pielikums, izmantotie šķīdumi – 6. pielikums. Darbā imunizācijas eksperimenti veikti peļu modelī – sešas nedēļas vecos BALB/c līnijas peļu tēviņos, kas iegādāti no Envigo RMS B. V. (Nīderlande).

Visi darbi ar pelēm tika veikti stingrā saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Direktīvu 2010/63/ES. Atļaujas numurs dzīvnieku izmantošanai izmēģinājuma procedūrā – Nr. 136/2022, Pārtikas un veterinārā dienesta atļauja izsniegta *Dr. biol.* Dacei Skrastiņai.

2.2. Ekspresijas plazmīdu pavairošana

Ar N₂ metodi iepriekš sagatavotas kompetentās XL1-Blue celma *E. coli* šūnas transformēja ar ģenētiskos konstruktus saturošajām gēnu sintēzes plazmīdām. Pie 100 µl šūnu suspensijas pievienoja piecus mikrolitrus plazmīdu šķīduma, inkubēja 15 min ledus vannā, pēc kā transformāciju veica ar termiskā šoka metodi – 35 sek inkubācija +42 °C ūdens termostātā, kurai sekoja 3 min inkubācija ledus vannā. Kompetentajām šūnām pievienoja 900 µl LB barotnes, inkubēja suspensiju +37 °C vienu stundu un izsēja uz agarizētas LB barotnes ar konstrukta rezistencei atbilstošo antibiotiku (0,1 mg/ml) selektīvai atlasei. Plates inkubēja termostātā pie +37 °C 16-24 h.

Atsevišķas kolonijas no plates pārnesa 5 ml LB barotnē ar konstrukta rezistencei atbilstošo antibiotiku (0,1 mg/ml) un inkubēja kratītājā pie +37 °C 16-24 h pie 200 apgr/min. Pēc inkubācijas šūnu suspensiju centrifugēja 7 min pie 10 000 apgr/min. Plazmīdas no šūnām tika izdalītas ar *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* reaģentu komplektu saskaņā ar ražotāja protokolu. Izdalītās plazmīdas uzglabāja pie -20 °C.

2.3. Rekombinanto proteīnu producēšana *E. coli* ekspresijas sistēmā

Ar PEG metodi iepriekš sagatavotas kompetentās *E. coli* BL21 (DE3) celma šūnas transformēja ar ģenētiskos konstruktus saturošajām plazmīdām pēc iepriekš aprakstītās termiskā

šoka metodes ar divu minūšu inkubāciju pie +42 °C. Transformēto šūnu suspensiju izsēja uz agarizētas LB barotnes ar selektīvo antibiotiku un inkubēja termostatā pie +37 °C 16 – 24 h.

Producēšana analītiskiem mērķiem

Optimālu ekspresijas apstākļu noteikšanai veica producēšanu analītiskos daudzumos. Sējmateriāla sagatavošanai atsevišķas kolonijas pārnesa 5 ml LB barotnes ar atbilstošu selektīvo antibiotiku un inkubēja kratītājā 16 – 24 h 37 °C temperatūrā pie 200 apgr/min. Pēc inkubācijas sējmateriāls pārņests 50 ml 2TY barotnes ar selektīvo antibiotiku (0,1 mg/ml) un šūnas tika kultivētas +37 °C temperatūrā pie 200 apgr/min līdz optiskais blīvums pie 600 nm (OD_{600}) sasniedza 0,6 – 0,9 optiskās vienības. Mērķa proteīna ekspresijas indukcijai pievienoja IPTG gala koncentrācijā 1 mM turpmākai 4 h inkubācijai pie +37 °C vai IPTG gala koncentrācijā 0,5 mM turpmākai inkubācijai pie +20 °C 16 – 24 h. Pēc inkubācijas šūnu suspensiju centrifugēja 30 min pie 5000 apgr/min pie +4 °C. Proteīnu ekspresiju un šķīdību novērtēja, šūnu 20 optiskās vienības lizējot ar ultraskaņas dezintegratoru, pievienojot paraugiem urīnvielu tilpuma attiecībā 1:9. Iegūto lizātu centrifugēja 20 min pie 12 000 apgr/min, atdalīja supernatanta un nogulsņu frakcijas. Nogulsnes resuspendēja 1X PBS, iegūto lizātu, supernatantu un resuspendētās nogulsnes analizēja ar SDS-PAGE.

Producēšana preparatīviem mērķiem

Pēc optimālu ekspresijas apstākļu noskaidrošanas, veica producēšanu preparatīvos daudzumos. Sējmateriālu sagatavoja, atsevišķas kolonijas pārnesot 100 ml LB barotnes ar atbilstošu selektīvo antibiotiku. Sējmateriālu inkubēja kratītājā kā aprakstīts iepriekš un pēc inkubācijas pārnesa 1000 ml 2TY barotnes ar attiecīgo antibiotiku. Šūnu suspensiju turpināja inkubēt ar kratīšanu (200 apgr/min) pie +37 °C līdz suspensijas OD_{600} sasniedza 0,6 – 0,9 optiskās vienības. Tālāk atbilstoši noteiktajiem optimālajiem apstākļiem proteīnu ekspresiju inducēja ar IPTG 1 mM vai 0,5 mM gala koncentrācijā un turpināja inkubāciju ar kratīšanu attiecīgi 4 h pie 37 °C vai 16 – 24 h pie 20 °C. Pēc inkubācijas šūnu suspensiju centrifugēja 30 min pie 5000 apgr/min pie +4 °C un iegūto šūnu masu uzglabāja pie -20 °C.

2.4. Sākotnēja himēro VLP proteīnu attīrīšana ar amonija sulfāta izgulsnēšanu

Pēc producēšanas preparatīvos daudzumos veica analītisku sākotnējo proteīnu attīrīšanu ar amonija sulfāta izgulsnēšanas metodi. Lai noteiktu optimālo amonija sulfāta koncentrāciju izgulsnēšanai, šūnām pievienoja 4X tilpumu lizēšanas buferšķīduma un 8 M urīnvielu 1/16 daļu no kopējā tilpuma, analītisko šūnu masas daudzumu lizēja ar ultraskaņu amplitūdā 40-50%, pēc lizēšanas iegūtajam supernatantam, lēni vorteksējot, pievienoja amonija sulfātu 20%, 30% un 40% koncentrācijās. Gulsnēšanu veica, stundu turot paraugus uz ledus. Pēc tam paraugus centrifugēja 20 min pie 12 000 apgr/min, iegūto supernatantu atdalīja un atlikušo precipitātu šķīdināja ekstrakcijas

buferšķīdumā. Alikvotas no katras iegūtās frakcijas analizēja ar SDS-PAGE gela elektroforēzi, lai noteiktu optimālo amonija sulfāta koncentrāciju katra parauga izgulsnēšanai.

Preparatīvai VLP attīrīšanai ar noteikto optimālo amonija sulfāta koncentrāciju lizēja 2 g proteīnus saturošo šūnu, pievienojot 8 ml lizēšanas buferšķīduma, 500 µl 8 M urīnvielu, un PMSF gala koncentrācijā 1 mM. Šūnas lizēja ar ultraskaņas palīdzību, iegūto lizātu centrifugēja 20 min pie 10 000 apgr/min. Izgulsnētos VLP proteīnus resuspendēja 2 ml ekstrakcijas buferšķīduma.

2.5. VLP attīrīšana ar gēlfiltrāciju un jonapmaiņu

Izgulsnētās himērās VLP attīrīja šķidrums hromatogrāfijas ceļā ar *AKTA pure* proteīnu attīrīšanas hromatogrāfijas sistēmu. Sākotnēji izgulsnētās VLP attīrīja ar lieluma izslēgšanas hromatogrāfiju jeb gēlfiltrāciju. Ekstrakcijas buferšķīdumā resuspendētos VLP proteīnus (2 ml) uznesa uz *Sepharose 4FF* 30 ml kolonnas, kas līdzsvarota ar 1X PBS buferšķīdumu. Kolonnas plūsmas ātrums saskaņā ar ražotāja rekomendācijām iestatīts 0,5 ml/min, spiediens kolonnā nedrīkst pārsniegt 0,5 MPa. Kad sākās straujš absorbcijas pieaugums, ieslēdza fracionēšanas režīmu un ievāca 2 ml frakcijas. Iegūtās VLP saturošās frakcijas analizēja ar NAGE un SDS-PAGE gelu elektroforēzi.

Pēc attīrīšanas ar lieluma izslēgšanas hromatogrāfiju, papildus veica attīrīšanu ar jonapmaiņas hromatogrāfiju. VLP saturošās frakcijas no gēlfiltrācijas apvienoja un uznesa uz *DEAE Fractogel (M)* 5 ml kolonnas. Kolonna iepriekš bija līdzsvarota ar 1X PBS buferšķīdumu. Saskaņā ar kolonnas ražotāja rekomendācijām, bija izvēlēts 2 ml/min plūsmas ātrums. Piesaistītie proteīni no kolonnas eluēti ar lineāri pieaugošu 30 ml 0,15-1 M NaCl gradientu 1X PBS buferšķīdumā. Eluēšanas laikā tika ievāktas 2 ml frakcijas, kas analizētas ar NAGE un SDS-PAGE gelu elektroforēzi. Tīrākās un augstāko proteīna koncentrāciju saturošās frakcijas tika apvienotas un dializētas pret 1X PBS, lai atbrīvotos no augstās NaCl koncentrācijas un nomainītu buferšķīdumu.

2.6. Parauga koncentrācijas mērīšana ar NanoDrop spektrofotometru

NanoDrop datorprogrammā izvēlējās atbilstošu mērīšanas režīmu (nukleīnskābes/proteīni). Kalibrēja spektrofotometru, uznesot 3 µl dH₂O uz gaismas emisijas lodziņa. Pēc kalibrēšanas emisijas lodziņu noslaucīja, uznesa 1 – 3 µl analizējamā parauga un absorbciju mērīja pie noteiktiem viļņu garumiem. Emisijas un detektora lodziņu tīrīšanu ar dH₂O veica pēc katra parauga koncentrācijas noteikšanas.

2.7. Proteīnu iekoncentrēšana

Lai pēc dialīzes iegūtu proteīnus vēlamajā koncentrācijā, proteīnus saturošo šķīdumu koncentrēja ar *Amicon Ultra 100 kDa MWCO* centrifugēšanas filtriem, centrifugējot pie 5000 g līdz iegūta nepieciešamā koncentrācija.

2.8. NAGE

Natīvo agarozes gela elektroforēzi izmantoja VLP migrācijas atšķirību novērtēšanai, balstoties uz daļiņas ārējās virsmas lādiņu. Pagatavoja 1% agarozes gela šķīdumu 1X TAE buferšķīdumā, pievienoja tam etīdija bromīdu gala koncentrācijā 0,5 µg/ml. VLP paraugiem pievienoja *6X Loading Dye* krāsvielu, kas paredzēta DNS paraugiem, un 5 – 10 µl parauga ienesa agarozes gela bedrītē. Elektroforēzi veica pie strāvas stipruma 100 mA un 120 V sprieguma 20 līdz 30 minūtes. Paraugus agarozes gelā vizualizēja ar UV apgaismojuma palīdzību.

2.9. SDS-PAGE

Proteīnu vizualizēšanai, kvalitatīvajai analīzei un to molekulmasas noteikšanai izmantoja proteīnu elektroforēzi poliakrilamīda gelā denaturējošos apstākļos. Proteīnu paraugiem pievienoja *Laemmli* buferšķīdumu un karsēja termoblokā 10 min pie +95 °C temperatūras. Iepriekš sagatavota 15% SDS-PAGE gela bedrītēs uznesa 7 µl proteīnu molekulmasas marķiera (PMW) un 5 – 10 µl analizējamā parauga. Elektroforēzi veica 1X SDS-PAGE darba buferšķīdumā pie strāvas stipruma 700 mA un sprieguma 250 V 40 min vai līdz brīdim, kad krāsas josla migrēja ārā no gela. Pēc elektroforēzes gelu 10 minūtes fiksēja ar kratīšanu fiksēšanas buferšķīdumā. Pēc fiksēšanas gelu 10 min krāsoja ar *Commasie* zilo krāsu un atkrāsoja ar dH₂O.

2.10. Elektronmikroskopija

Metodi veica: *Dr. biol.* Juris Jansons.

VLP analīzei ar transmisijas elektronu mikroskopiju 5 µl VLP parauga koncentrācijā 1 mg/ml adsorbēja uz iepriekš sagatavotiem elektronmikroskopijas sietiņiem Mesh 200 un Mesh 300, kas pārklāti ar oglekļa Formvar pārklājumu. Adsorbētos paraugus skaloja ar 1 mM EDTA šķīdumu un krāsoja ar 0,5 % uranila acetāta šķīdumu. Paraugus apskatīja ar *JEM-1230* elektronu mikroskopu pie 100 000 reižu palielinājuma.

2.11. Luciferāzes reportiera tests

Lai novērtētu, vai izveidotās himērās VLP spēja aktivēt Smad signālceļa kaskādi, veica luciferāzes reportiera testu, izmantojot cilvēka rabdomiosarkomas šūnu līniju A-204. Adherentās šūnas tika kultivētas DMEM barotnē, kas papildināta ar 10% FBS un 1% penicilīnu-streptomicīnu, un iesētas 96-bedrīšu platēs (25 000 šūnas/100 µl). Pēc nakts inkubācijas pie +37 °C un 5% CO₂, šūnas tika transficētas ar luciferāzes reportiera plazmīdu (CAGA)₁₂-pGL3-Basic, izmantojot Opti-MEM barotni un *TurboFect*TM transfekcijas reaģentu, ievērojot ražotāja protokolu. Apmēram 16–20 stundas pēc transfekcijas šūnām pievienoja 100 µl barotnes ar himērajām VLP gala koncentrācijās no 0,03 līdz 20 nM vai kontroles monoklonālajām anti-MSTN antivielām (Landogrozumab) tādās

pašās koncentrācijās kopā ar nobriedušu miostatīnu gala koncentrācijā 2 nM. Pēc 16–20 stundu inkubācijas barotni aspirēja un šūnām pievienoja *Luciferase Assay System* lizēšanas buferšķīdumu un luminiscences reaģentu saskaņā ar ražotāja protokolu. Luminiscences signāls tika noteikts ar luminometru Victor V3.

2.12. Q β VLP producēšana

Ķīmiskajai konjugācijai tika izmantotas Q β vīrusveidīgās daļiņas no K. Tāra laboratorijas kolekcijas. VLP iegūšanas protokols aprakstīts no Liekniņa *et al.*, 2019 [53]. Lai uzproducētu VLP daļiņas, fāga Q β apvalka proteīnu kodējošās gēnu sekvenses gēnu ievietoja pET-24a(+) plazmīdā gēnu sintēzes ceļā. *E. coli* BL21(DE3) celma šūnas transformēja ar rekombinantajām plazmīdām, apvalka proteīnu ekspresiju veica četras stundas +37 °C temperatūrā. Iegūto šūnu masu resuspendēja lizēšanas buferšķīdumā tilpuma attiecībā 1:4 un lizēja ar ultrasonificēšanas palīdzību. Iegūto lizātu centrifugēja 30 min pie 12 000 apgr/min, proteīnus no iegūtā supernatanta attīrīja ar gēlfiltrācijas hromatogrāfijas palīdzību, uznesot lizātu uz *Sepharose 4FF* (30 ml) kolonnas. Pēc gēlfiltrācijas VLP saturošās caurplūdes frakcijas apvienoja un attīrīja ar jonapmaiņas hromatogrāfiju. Jonapmaiņai izmantoja *Fractogel DEAE (M)* kolonnu. Pie kolonnas piesaistītie proteīni tika eluēti ar lineāri pieaugošu NaCl gradientu, izmantojot 10 kolonnas tilpumus 1X PBS buferšķīduma ar 1 M NaCl. Iegūtās augstas tīrības VLP frakcijas tika apvienotas un dializētas pret 1X PBS. Ilgtermiņa uzglabāšanai dializētajām VLP pievienoja glicerīnu gala koncentrācijā 50% un glabāja pie -20 °C.

2.13. Ķīmiskā konjugācija ar tetrazīna un endo-BCN linkeriem

Vakcīnas kandidāta izveidei ķīmiskās konjugācijas ceļā izmantoja tetrazīna-PEG5-NHS un endo-BCN-PEG8-NHS esterus. Q β VLP koncentrācijā 1 mg/ml apstrādāja ar tetrazīna linkeriem attiecībā 1:1 pēc molaritātes. Reakcijas maisījumu inkubēja stundu istabas temperatūrā un atsāloja ar *Zeba*TM atsālošanas kolonnas palīdzību, kas līdzsvarota ar 1X PBS buferšķīdumu. Uz atsālošanas kolonnas uznesa 60 – 130 μ l parauga un centrifugēja 2 min pie 4000 apgr/min. Miostatīnam pievienoja BCN linkeriem attiecībā 1:3 pēc molaritātes un borāta šķīdumu līdz gala koncentrācijai 15 mM, lai šķīduma pH=8. Reakcijas maisījumu inkubēja stundu istabas temperatūrā un atsāloja ar *Zeba*TM atsālošanas kolonnu pēc iepriekš aprakstītā protokola. Pēc inkubācijas abus reakcijas maisījumus apvienoja un inkubēja pa nakti pie +4 °C. Reakcijas maisījumu pēc konjugācijas dializēja pret 1X PBS ar 1000 kDa dialīzes komplektu. Neapstrādāta MSTN, ar BCN linkeriem apstrādāta MSTN parauga alikvotas analizēja ar SDS-PAGE gela elektroforēzi. Neapstrādāta VLP parauga, ar tetrazīna linkeriem apstrādāta VLP parauga un VLP-MSTN konjugāta alikvotas analizēja ar NAGE un SDS-PAGE gela elektroforēzi.

2.14. Peļu imunizācija un monitorēšana

Imunizāciju veica: *Dr. biol.* Dace Skrastiņa un *Dr. biol.* Ilva Liekniņa

Imunizāciju veica vivārija SPF telpās. Eksperimentā izmantoja sešas nedēļas vecus BALB/c līnijas peļu tēviņus. Peļu aklimatizācija vivārijā notika 10 dienas. Peles atbilstoši dzīvnieku labturības prasībām turēja būros no 2 līdz 4 dzīvniekiem būrī ar nepieciešamajām bagātināšanas metodēm. Būros ventilācijas ceļā gaisa apmaiņa tika nodrošināta 2x dienā. Gaisa temperatūra bija 24 °C, gaisa mitruma līmenis no 45 līdz 55%. Izveidoja 3 randomizētas eksperimenta grupas – imunizācija ar vakcīnas kandidātu Qβ-Myo, imunizācija ar Qβ VLP un intakto peļu grupa – katrā no kurām bija 10 peles. Peļu identificēšanai tika veikta ausu iezīmēšana. Imunizācijai paredzētās vakcīnas formulēja ar adjuvantu *AddaVax* saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Peles imunizēja subkutāni skaustā. Imunizācija veikta četrās devās ar divu nedēļu intervālu, vakcīnas deva vienai pelei bija 25 µg. Serum paraugi no peļu astes vēnas iegūti 75., 116. un 138. dienā pēc pirmās imunizācijas.

Visa eksperimenta laikā veica peļu ķermeņa masas uzraudzību. Peles tika svērtas reizi nedēļā.

2.15. Netiešā ELISA

Pie EIA/RIA 96-bedrīšu mikrotitrēšanas plates sorbēja antigēnu, pret kuru tiks pārbaudīta antivielu klātbūtne paraugā. Antigēns atšķaidīts karbonātu buferšķīdumā pH=9,5 (MSTN koncentrācijā 5 µg/ml, Qβ VLP koncentrācijā 10 µg/ml). Plates ar piesorbētajiem antigēniem inkubēja pa nakti pie +4 °C. Pēc sorbcijas plates mazgāja ar 0,1% Tween-20 1X PBS (PBST) šķīdumu un bloķēja ar 1% BSA-PBST šķīdumu 1 h pie +37 °C. Plates bedrītes ar piesorbēto antigēnu pārklāja ar divkārtējiem vai trīskārtējiem serumu atšķaidījumiem 1% BSA-PBST. Plates ar serumiem inkubēja 1 h pie +37 °C un 3 reizes mazgāja ar PBST un dH₂O. Pie antigēna piesaistītās primārās antivielas noteica ar 100 µl mērrutku peroksidāzes, kas konjugēta ar poliklonālām anti-peļu IgG antivielām. Sekundārās antivielas atšķaidīja attiecībā 1:5000 BSA-PBST, inkubācija ar tām veikta 1 h pie +37 °C. Pēc inkubācijas plati mazgāja 3 reizes ar PBST un dH₂O. Krāsu reakciju veica 7 – 10 minūtes, pievienojot o-fenilēndiamīna dihidrohlorīda substrātu, izšķīdinātu fosfāta-citrāta buferšķīdumā. Peroksidāzes reakciju apstādināja ar 2 N H₂SO₄ pievienošanu. Optisko blīvumu mērīja ar Immunoskan ELISA plašu lasītāju pie gaismas viļņu garuma 492 nm.

2.16. Aviditātes ELISA

Pie EIA/RIA 96-bedrīšu mikrotitrēšanas plates sorbēja karbonātu buferšķīdumā atšķaidītu antigēnu (MSTN koncentrācijā 5 µg/ml). Plati ar piesorbēto MSTN inkubēja pa nakti pie +4 °C. Pēc sorbcijas plati mazgāja ar PBST šķīdumu un bloķēja ar 1% BSA-PBST šķīdumu 1 h pie +37 °C. Plates bedrītes ar piesorbēto antigēnu pārklāja ar divkārtējiem serumu atšķaidījumiem 1% BSA-

PBST. Plates ar serumiem inkubēja 1 h pie +37 °C un trīs reizes mazgāja ar PBST un dH₂O. Pēc tam plates bedrītes pārklāja ar 7 M urīnvielu, ar kuru plates inkubēja 15 minūtes istabas temperatūrā. Pēc inkubēšanas plates mazgāja 3 reizes ar PBST un dH₂O un uz bedrītēm uznesa ar HRP-konjugētas sekundārās poliklonālās anti-peļu IgG antivielas atšķaidījumā 1:5000 BSA-PBST. Inkubāciju ar tām veica 1 h pie +37 °C. Piesaistītās antivielas noteica ar krāsu reakcijas palīdzību, pievienojot bedrītēs o-fenilēndiamīna dihidrohlorīda substrātu izšķīdinātu fosfāta-citrāta buferšķīdumā un inkubējot 7 – 10 minūtes. Peroksidāzes reakciju apstādināja ar 2 N H₂SO₄ pievienošanu. Optisko blīvumu mērīja ar Immunoskan ELISA plašu lasītāju pie gaismas viļņu garuma 492 nm.

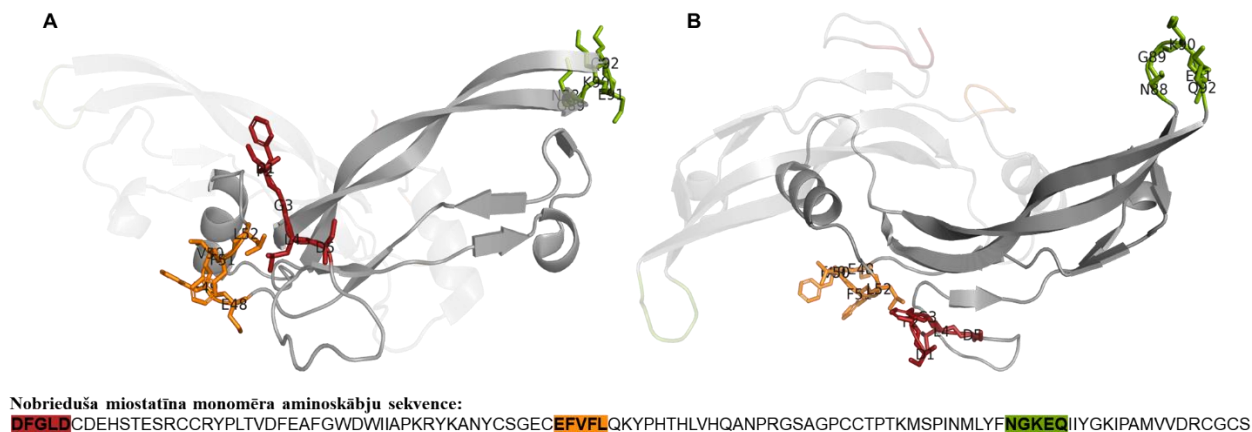
2.17. Statistiskā analīze

Datu apstrāde, statistiskā analīze un vizualizācija veikta ar integrēto izstrādes vidi R (versija 4.3.0 (2023-04-21 ucrt) Windows operētājsistēmai). Izmantotā RStudio versija – 2024.12.1.563. Vizualizācija tāpat veikta ar GraphPad Prism 8.0.2. programmu. Datu normalitātes pārbaudei izmantots Shapiro-Wilk tests. Divu saistītu mērījumu salīdzināšanai izmantots pāru t-tests, ņemot vērā datu sadalījuma normalitāti un mērījumu saistību. Statistiski būtisku atšķirību konstatēšanai starp trīs un vairāk neatkarīgām grupām izmantots parametriskais vienvirziena ANOVA tests vai neparametriskais Kruskal-Wallis H tests, atkarībā no datu sadalījuma normalitātes. Ja testa rezultāti bija statistiski nozīmīgi, kā Post-Hoc testi konkrētu atšķirību noteikšanai starp grupām attiecīgi veikti TukeyHSD vai Dunn tests. Būtisku atšķirību noteikšanai atkārtotu mērījumu gadījumā vismaz 3 grupās izmantots neparametriskais Friedman tests, ņemot vērā pārbaudāmo datu sadalījuma normalitātes neesamību. Statistiski būtiska testa rezultāta gadījumā kā Post-Hoc testu izmantoja pāru Wilcoxon testu konkrētu atšķirību konstatēšanai starp grupām. Korelāciju analīzei izmantoja neparametrisko Spearman ranku korelācijas analīzes testu, ņemot vērā pārbaudāmo datu sadalījuma normalitātes neesamību. Visās statistiskajās analīzēs par būtiskuma līmeni ņemts $\alpha \leq 0,05$.

3. REZULTĀTI

3.1. Anti-miostatīna vakcīnas prototipu izveide un raksturošana

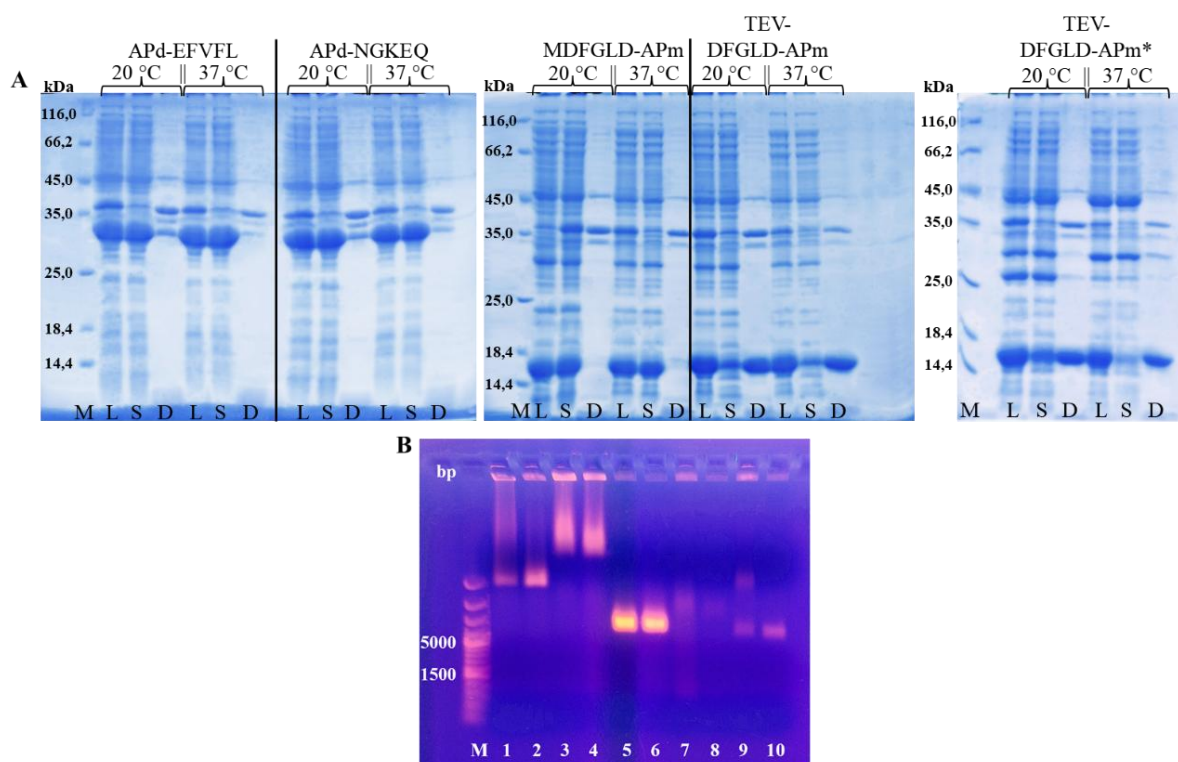
Anti-miostatīna vakcīnas prototipu izveidei uz vīrusveidīgo daļiņu platformas bāzes izvēlējās divas atšķirīgas vakcīnas kandidātu izstrādes pieejas. Pirmo vakcīnas prototipu grupu izveidoja ar ģenētiskās sapludināšanas metodes palīdzību. Vakcīnas kandidātu izveidei tika atlasīti potenciāli terapeitiski uz nobrieduša miostatīna ārējās virsmas eksponēti epitopi EFVFL, NGKEQ, DFGLD (sk. 3.1. att.), kas tika sapludināti ar fāga AP205 apvalka proteīna dimēra vai monomēra sekvenci.



3.1. att. Epitopu kartēšanas rezultātā atlasītie uz miostatīna ārējās virsmas eksponētie epitopi. Ar sarkanu apzīmēts epitops DFGLD, ar oranžu – EFVFL, ar zaļu – NGKEQ. Viens no proteīna monomēriem attēlots puscaurspīdīgs. **A** – proteīna skats no priekšas. **B** – proteīna skats no augsas. Attēls izveidots ar PyMOL (versija 4.6.0., Schrödinger).

Epitopi EFVFL un NGKEQ tika ievietoti fāga AP205 apvalka proteīna dimēra cilpā, izveidojot konstruktus APd-EFVFL un APd-NGKEQ. Savukārt epitops DFGLD tika ievietots AP205 CP monomēra sekvences N-galā, izveidojot konstruktu MDFGLD-APm. Tā kā epitops DFGLD tika ievietots N-terminālajā galā, tam priekšā atrodas aminoskābe metionīns. Mazāku metionīnam sekojošu aminoskābju gadījumā tas tiek atšķelts proteīna biosintēzes laikā, taču, tā kā epitopa sekvencē pirmā aminoskābe ir asparagīnskābe, var būt nepieciešams papildus mehānisms M nošķelšanai [106]. Lai to nodrošinātu, proteīna sekvencē aiz metionīna tika ieviests TEV šķelšanas saits ENLYFQ, izveidojot konstruktu TEV-DFGLD-APm (1.pielikums). Tādā veidā, ekspresējot proteīnu kopā ar TEV proteāzi, enzīms atšķels īsu peptīdu un rezultātā himērais proteīns sāksies ar asparagīnskābi, kas atbilst nobrieduša miostatīna N-galam. Konjugātu proteīnus kodējošās sekvenču gēnus sintēzes ceļā tika ievietotas ekspresijas plazmīdās. APd-EFVFL un APd-NGKEQ ekspresijai izmantoja pETDuet-1 plazmīdu, savukārt MDFGLD-APm un TEV-DFGLD-APm sekvenču ievietotas pRSFDuet-1 plazmīdā. Proteīnu producēšanai kompetentās *E. coli* BL21(DE3) celma šūnas transformēja ar rekombinantajām plazmīdām. Proteīnus producēja analītiski, lai noteiktu optimālos šķīdības un ekspresijas apstākļus. TEV proteāzes šķelšanas saitu

saturošā konstrukta producēšanai papildus izmantoja arī izmantoja divu plazmīdu ekspresijas sistēmu ar pRK793-MBP-TEV, lai himēros proteīnus ko-ekspresētu ar TEV proteāzi, nodrošinot metionīna nošķelšanu ekspresijas laikā (producētais konstrukts apzīmēts ar TEV-DFGLD-APm*). Proteīnu ekspresijas efektivitāte un šķīdība tika pārbaudīta ar SDS-PAGE analīzi, izvērtējot mērķa proteīnu daudzumu lizāta supernatantā (šķīstošo proteīnu frakcija) un resuspendētajās nogulsnēs (nešķīstošo proteīnu frakcija) (sk. 3.2. att.). Optimālos ekspresijas apstākļus noteica, balstoties uz lielāko šķīstošu proteīnu iznākumu. Producēto proteīnu spēju savākties par VLP apstiprināja ar NAGE palīdzību, pamatojoties uz atšķirībām migrācijas ātrumā. Optimālie ekspresijas apstākļi apkopoti 3.1. tabulā. Pēc optimālo ekspresijas apstākļu noteikšanas proteīni tika producēti preparatīvā daudzumā ar mērķi veikt tālāku attīrīšanu ar amonija sulfāta izgulsnēšanas un hromatogrāfijas palīdzību.

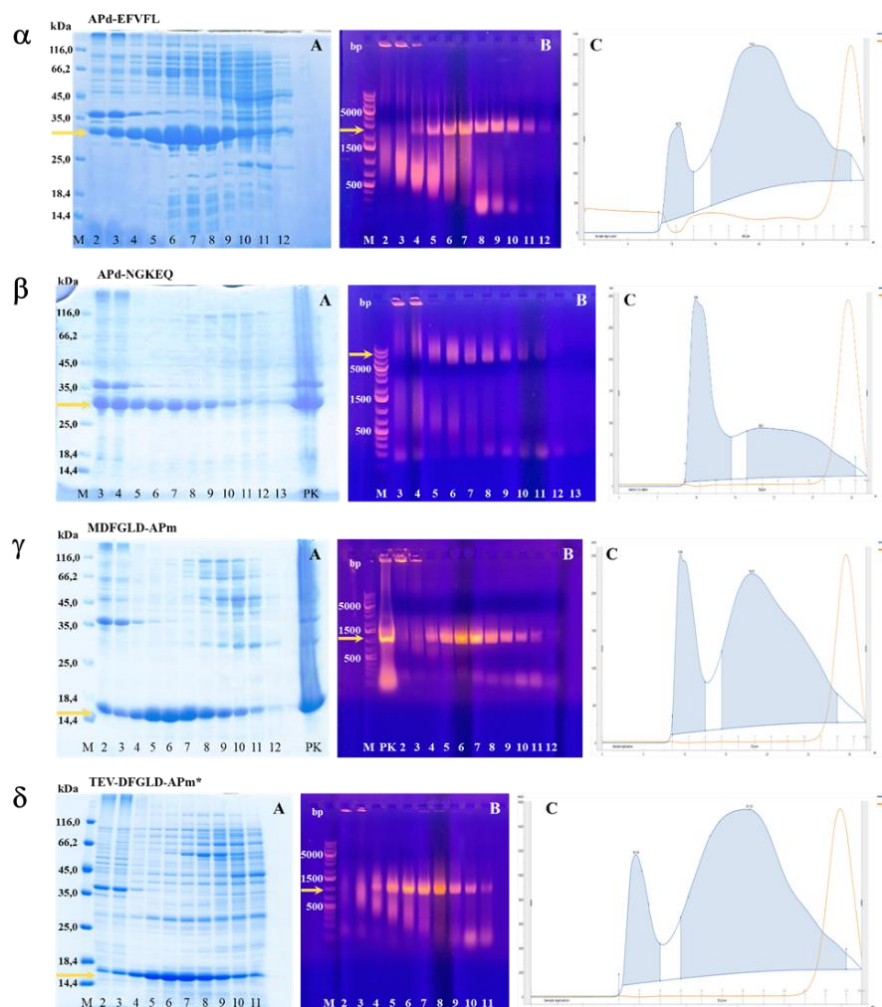


3.2. att. Preparatīva himēro ģenētisko konjugātu producēšana optimālo ekspresijas apstākļu noteikšanai. **(A)** Paraugu analīze ar SDS-PAGE gela elektroforēzi. **M** – PMW marķieris; **L** – lizāts; **S** – lizāta supernatants (frakcija ar šķīstošiem proteīniem); **D** – nešķīstošus proteīnus saturošas nogulsnes. **(B)** Paraugu analīze ar NAGE gela elektroforēzi. **1** – APd-EFVFL producēts pie +20 °C. **2** – APd-EFVFL producēts pie +37 °C. **3** – APd-NGKEQ producēts pie +20 °C. **4** – APd-NGKEQ producēts pie +37 °C. **5** – MDFGLD-APm producēts pie +20 °C. **6** – MDFGLD-APm producēts pie +37 °C. **7** – TEV-DFGLD-APm producēts pie +20 °C. **8** – TEV-DFGLD-APm producēts pie +37 °C. **9** – TEV-DFGLD-APm* producēts pie +20 °C. **10** – TEV-DFGLD-APm* producēts pie +37 °C.

3.1. tab. Optimālo ekspresijas apstākļu apkopojums ģenētisko konstruktus proteīniem.

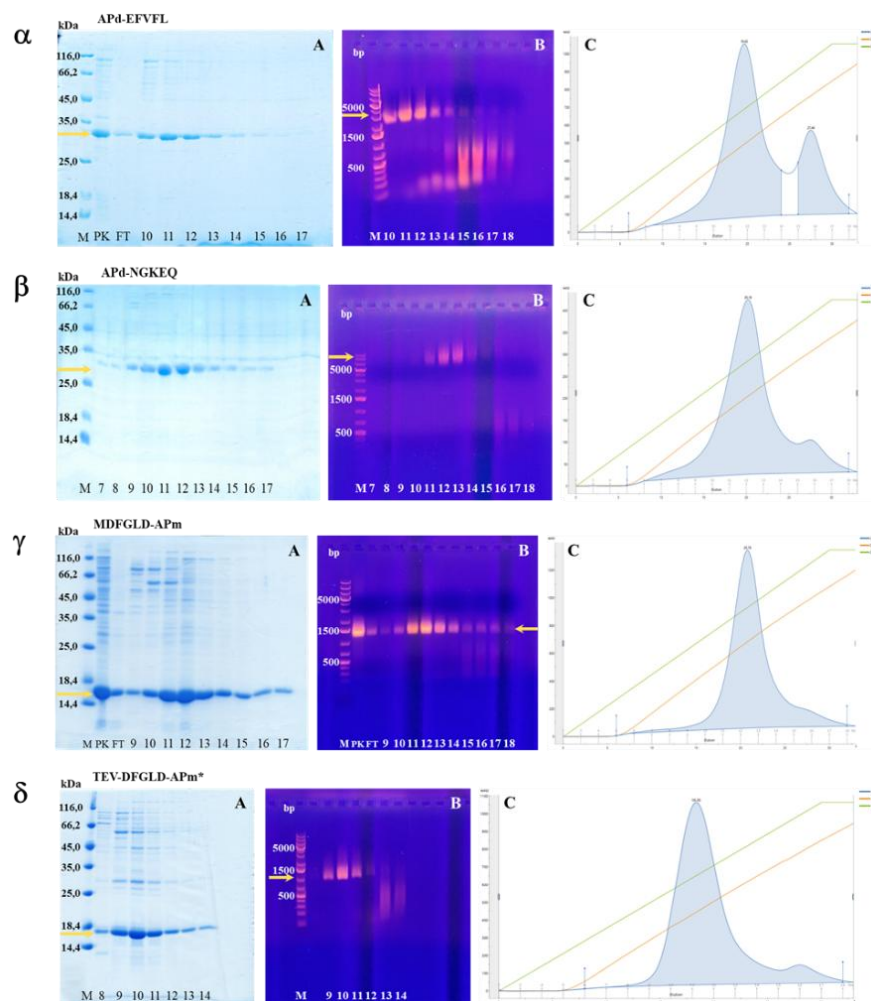
Konstrukta nosaukums	Šūnu līnija	Optimālā ekspresijas temperatūra, °C	Optimālais ekspresijas laiks, h	Ekspresijas iznākums	Šķīdība
APd-EFVFL	BL21(DE3)	37	4	+++	+++
APd-NGKEQ	BL21(DE3)	37	4	+++	+++
MDFGLD-APm	BL21(DE3)	20	16	+++	+++
TEV-DFGLD-APm	BL21(DE3)	20	16	+	+
TEV-DFGLD-APm*	BL21(DE3) pBAD-JV1 (MBP+TEV).	20	16	++	++

Iegūtās himērās VLP no *E. coli* šūnu lizāta sākotnēji attīrīja ar izgulsnēšanu 20 – 40% amonija sulfātā, lai atdalītu mazmolekulāro piesārņojumu. Pēc attīrīšanas ar amonija sulfāta izgulsnēšanu veica gēlfiltrāciju jeb lieluma izslēgšanas hromatogrāfiju ar *Sepharose 4FF* 30 ml kolonnu. Gēlfiltrācijas procesā hromatogrammā vērojami vairāki pīķi, pirmā pīķa frakcijas satur lielmolekulārus agregātus, kas no kolonnas tiek eluēti ātrāk. Savukārt otrā pīķa frakcijas parasti satur attīrāmās vīrusveidīgās daļiņas. Gēlfiltrācijas rezultātā iegūtās frakcijas analizēja ar SDS-PAGE, lai pārlicinātos, vai frakcijas satur mērķa proteīnus ar sagaidāmo molekulmasu, kā arī ar NAGE, lai apstiprinātu VLP izveidošanos un integritāti. Attēlā 3.3. parādītas izveidoto konstruktus gēlfiltrācijas hromatogrammas (C) un frakciju analīze ar SDS-PAGE (A) un NAGE (B) gelu elektroforēzi.



3.3. att. Ģenētisko konstruktus attīrīšana ar gēlfiltrācijas *Sepharose 4FF* kolonnu. **α** – konstrukta APd-EFVFL attīrīšanas rezultāti; **β** – konstrukta APd-NGKEQ attīrīšanas rezultāti; **γ** – konstrukta MDFGLD-APm konstrukta attīrīšanas rezultāti; **δ** – konstrukta TEV-DFGLD-APm* attīrīšanas rezultāti. Hromatogrammu (C) pīķa frakcijas analizētas ar SDS-PAGE (A) un NAGE (B) gelu elektroforēzes palīdzību. **M** – marķieris (attēlos A – PMW; attēlos B – *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*); **PK** – paraugs pirms kolonnas. Skaitļi apzīmē frakcijas. Ar dzeltenajām bultiņām parādītas himēro VLP zonas. Ar zilo līkni hromatogrammās attēlota UV absorbcija, ar oranžo – konduktivitāte.

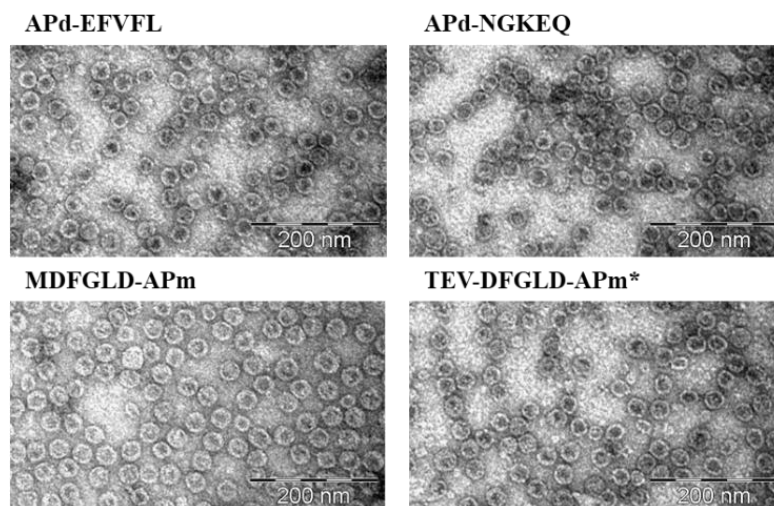
Kā redzams, hromatogrammu otro pīķu frakciju analīze SDS-PAGE un NAGE gelos parāda, ka frakcijas ar lielāko mērķa proteīna saturu likumsakarīgi sakrīt ar hromatogrammās redzamajām pīķa frakcijām. Gelos redzamas izteiktas proteīnu zonas, kuru molekulmasa atbilst sagaidāmajai mērķa proteīnu molekulmasai, kas liecina, ka proteīnu producēšanās un attīrīšana notikusi veiksmīgi. Pēc gēlfiltrācijas paraugi tika attīrīti ar jonapmaiņas hromatogrāfiju, lai attīrītu VLP no piemaisījumiem. Jonapmaiņas hromatogrāfijai izvēlējās tīrākās gēlfiltrācijas frakcijas ar lielāko mērķproteīna saturu, šajā gadījumā visiem paraugiem no 4. līdz 8. frakcijai (ieskaitot). Frakcijas apvienoja un uznesa uz *DEAE Fractogel (M)* 5 ml jonapmaiņas kolonnas. Jonapmaiņu veica ar pieaugošu NaCl gradientu. Jonapmaiņas rezultātā iegūtās pīķa frakcijas tika analizētas ar SDS-PAGE un NAGE gelu elektroforēzi (sk. 3.4. att.).



3.4. att. Ģenētisko konstruktu attīrīšana ar jonapmaiņas *DEAE Fractogel (M)* kolonnu. **α** – konstrukta APd-EFVFL attīrīšana; **β** – konstrukta APd-NGKEQ attīrīšana; **γ** – konstrukta MDFGLD-APm konstrukta attīrīšana; **δ** – konstrukta TEV-DFGLD-APm* attīrīšana.

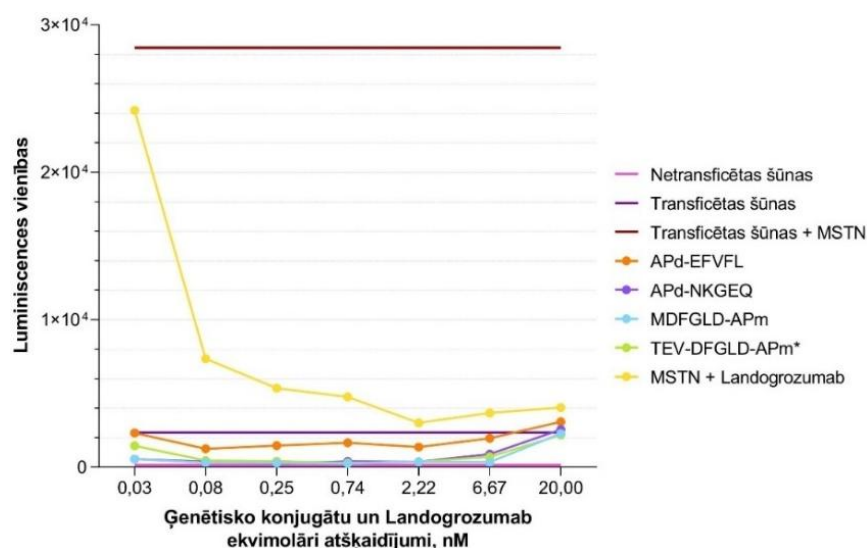
Hromatogrammu (C) pīķa frakcijas analizētas ar SDS-PAGE (A) un NAGE (B) gelu elektroforēzes palīdzību. **M** – marķieris (attēlos A – PMW; attēlos B – *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*); **PK** – paraugs pirms kolonnas; **FT** – caurplūde. Skaitļi apzīmē frakcijas. Ar dzeltenajām bultiņām parādītas himēro VLP zonas. Ar zilo līkni hromatogrammās attēlota UV absorbcija, ar oranžo – konduktivitāte, ar zaļo – buferšķīduma B koncentrācija.

Jonapmaiņas rezultātā izdevās iegūt ievērojami tīrākas interesējošā mērķproteīna frakcijas, kas apstiprināts ar SDS-PAGE. Analīze ar NAGE apstiprināja sekmīgu VLP savākšanos un nukleīnskābju iepakojšanos. Pēc jonapmaiņas trīs līdz četras tīrākās frakcijas ar augstāko konstruktu proteīnu un iepakoto nukleīnskābju saturu apvienoja un dializēja pret 1X PBS, lai nomainītu buferšķīdumu ar augsto NaCl saturu. Dializētie VLP proteīni tika iekonzentrēti līdz aptuveni 1 mg/ml un analizēti ar elektronmikroskopijas metodi, lai definitīvi pārliecinātos par sekmīgu vīrusveidīgo daļiņu izveidi. Transmisijas elektronmikroskopijā iegūto attēlu analīze (sk. 3.5. att.) apstiprināja homogēnu un sagaidāmās morfoloģijas VLP izveidošanos.



3.5. att. Konstruktus veidoto VLP daļiņu elektronmikroskopijas attēli.

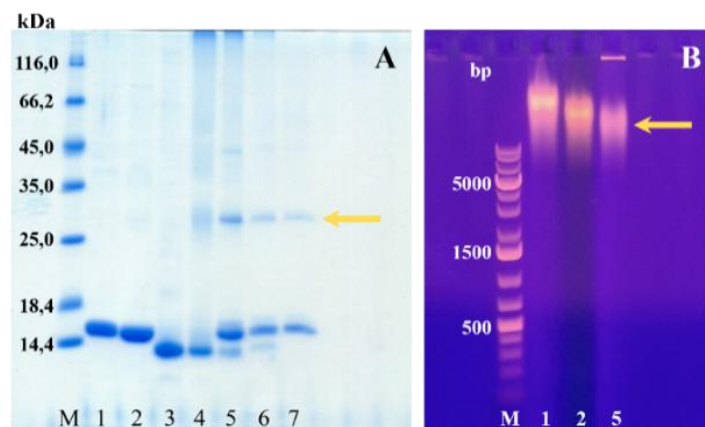
Tā kā izveidoto vakcīnas kandidātu efektivitāti bija paredzēts pārbaudīt peļu imunizācijas eksperimentos, sākotnēji tika nolemts *in vitro* pārbaudīt to spēju aktivēt Smad signālceļu, kas ir viens no centrālajiem MSTN darbības mehānismiem, caur kuru proteīns realizē savas bioloģiskās funkcijas. Tādēļ tika veikts luciferāzes reportiera tests, kura ietvaros cilvēka rabdomiosarkomas A-204 līnijas šūnas transficēja ar reportiera konstruktus saturošu (CAGA)₁₂-pGL3-Basic plazmīdu. Pēc transfekcijas šūnām pievienoja vakcīnas kandidātus, lai pārbaudītu, vai tie ir spējīgi iniciēt Smad2/3 signālceļu. Reportiera testā Smad2/3 signālceļa aktivācijas gadījumā novēro luciferāzes luminiscenci. Kā pozitīvo kontroli luminiscences līmenim Smad2/3 signālceļa aktivācijas gadījumā izmantoja šūnas, kurām pievienots MSTN gala koncentrācijā 2 nM. Savukārt kā negatīvo kontroli izmantoja netransficētas un transficētas šūnas, lai varētu fiksēt luminiscences fona līmeni. Luciferāzes reportiera testa rezultāti no diviem atkārtojumiem apkopoti 3.6. attēlā.



3.6. att. Luciferāzes reportiera testa rezultāti. Izveidotie ģenētiskie konjugāti neizraisa Smad2/3 signālceļa aktivāciju. Kontrolei MSTN inaktivācijai izmantotas monoklonālas anti-MSTN antivielas Landogrozumab, fona līmeņa noteikšanai – netransficētas un transficētas A-204 šūnas.

Luciferāzes reportiera testi liecina, ka izveidotie ģenētiskie konjugāti neizraisa Smad2/3 signālceļa aktivāciju, jo novērotie luminiscences līmeņi ir zemi.

Sekojoši ķīmiskās konjugācijas rezultātā tika izveidots vēl viens vakcīnas kandidāts. Kā vakcīnas bāze tika izmantotas fāga Q β VLP, pie kurām ķīmiskās konjugācijas rezultātā ar tetrazīna-PEG5-NHS un endo-BCN-PEG8-NHS esteru palīdzību piesaistīja MSTN proteīnu. Konjugēšanas efektivitāti un rezultātus analizēja ar SDS-PAGE (sk. 3.7. att. A). Iegūtā konjugāta molekulmasu veidoja fāga Q β apvalka proteīna molekulmasa (14,3 kDa) un nobrieduša MSTN molekulmasa (12,4 kDa), rezultātā veidojoties 26,7 kDa kopējai molekulmasai. Sekmīgu konjugātu izveidošanās tika apstiprināta arī ar NAGE elektroforēzes palīdzību, analizējot VLP saturošās frakcijas, balstoties uz migrācijas ātruma atšķirībām daļiņas virsmas lādiņa izmaiņas rezultātā pēc konjugācijas (sk. 3.7. att. B).

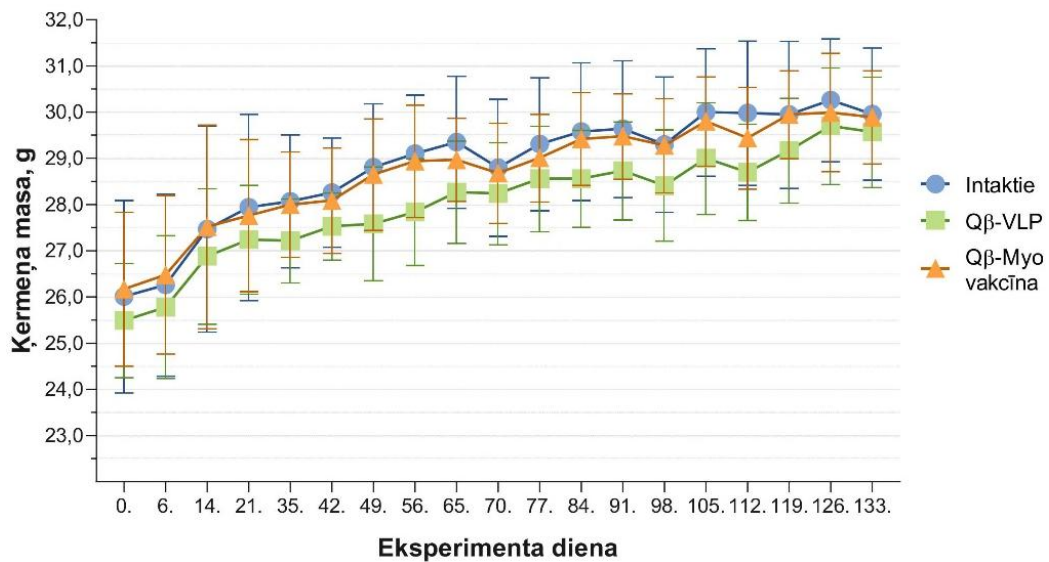


3.7. att. Ķīmiskās konjugācijas rezultāti. SDS-PAGE (A) un NAGE (B) gelu elektroforēze. M – marķieris; 1 – Q β -VLP; 2 – Q β -VLP + tetrazīns; 3 – MSTN; 4 – MSTN + endo-BCN; 5 – Q β -MSTN konjugāts (Q β -Myo); 6 – Q β -MSTN (Q β -Myo) pēc dialīzes; 7 – Q β -MSTN (Q β -Myo) pēc dialīzes un filtrēšanas.

3.2. Anti-miostatīna vakcīnas prototipa pārbaude peļu modelī

Lai pārbaudītu izveidotā vakcīnas prototipa spēju ietekmēt muskuļu masu un izsaukt imūnsistēmas atbildes reakciju, pārvarot organisma paštoleranci pret miostatīnu, tika veikta peļu imunizācija. Sešas nedēļas veci BALB/c līnijas peļu tēviņi tika sadalīti 3 eksperimentālajās grupās – intaktie, imunizācija ar Q β -VLP un imunizācija ar Q β -Myo vakcīnu –, 10 peles katrā grupā. Imunizācija tika veikta 4 devās ar divu nedēļu intervālu. Visa eksperimenta laikā tika fiksēta peļu ķermeņa masa. Datu statistiskajā analīzē pieņemtais būtiskuma līmenis $\alpha \leq 0,05$.

Vidējā peļu ķermeņa masas dinamika grupas ietvaros eksperimenta laikā parādīta 3.8. attēlā.

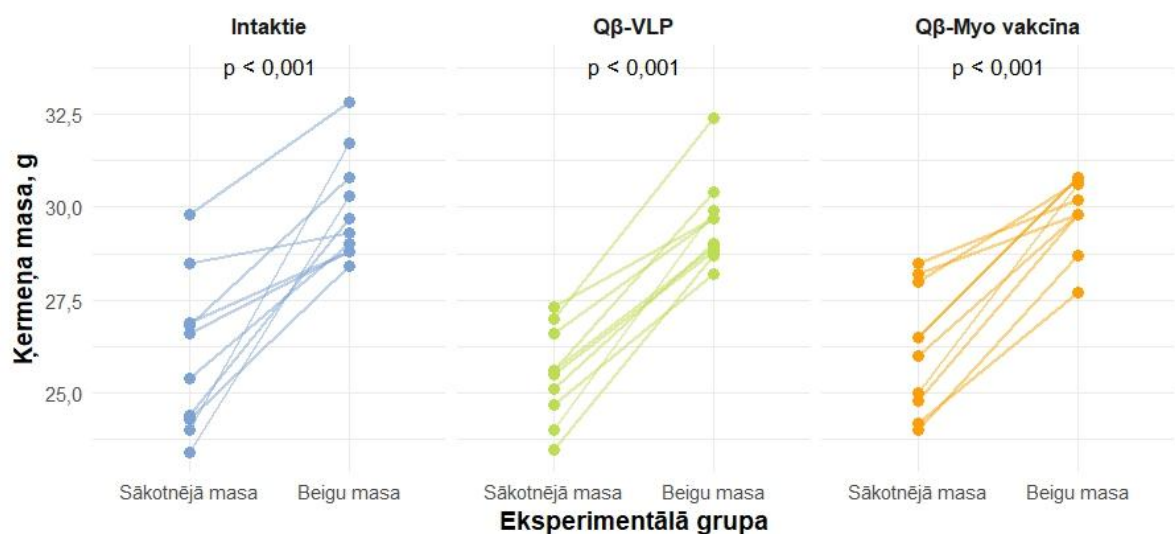


3.8. att. Ķermeņa masas pieauguma dinamika grupas ietvaros eksperimenta laikā.

Statistiskās analīzes rezultāti rāda, ka ķermeņa masas pieaugums kopš eksperimenta sākuma ir statistiski nozīmīgs, visās grupās p -vērtība $< 0,001$ (sk. 3.9. att.). Masas pieaugums noteikts ar pāru t -testu, kura rezultāti apkopoti 3.2. tabulā.

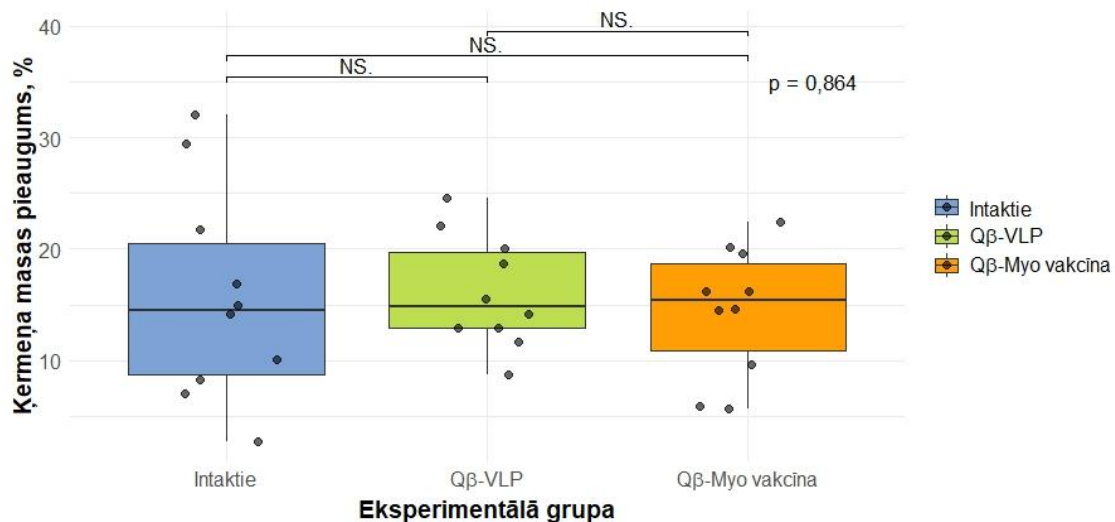
3.2. tab. Ķermeņa masas pieaugums eksperimentālajās grupās. Pāru t -testa rezultāti.

Grupa	Vidējais ķermeņa masas pieaugums	Vidējā ķermeņa masas pieauguma standartnovirze	t -vērtība	df	p -vērtība
Intaktie	3,95	2,18	5,73	9	$< 0,001$
Qβ-VLP	4,08	1,16	11,12	9	$< 0,001$
Qβ-Myo vakcīna	3,72	1,35	8,69	9	$< 0,001$



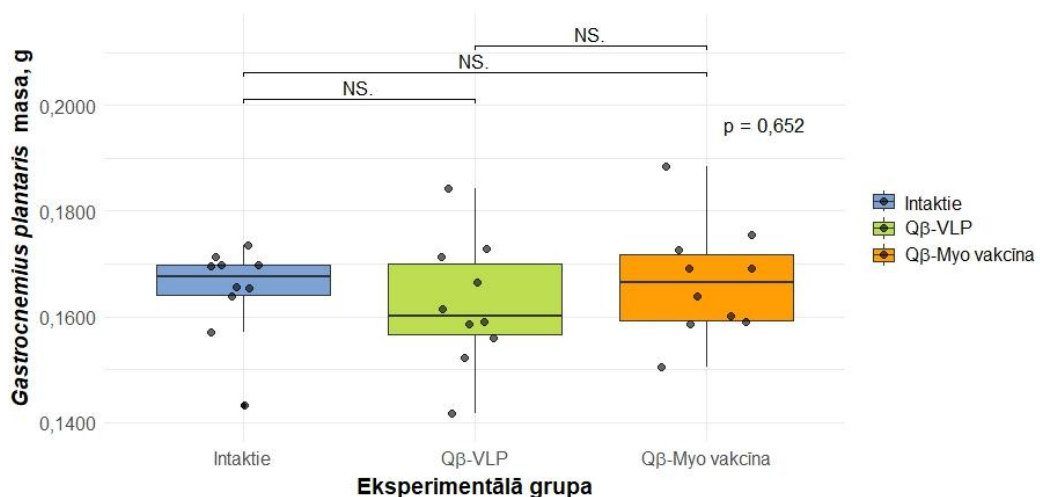
3.9. att. Ķermeņa masas pieauguma salīdzinājums eksperimentālajās grupās. Salīdzinājumam izmantots pāru t -tests, visās grupās pieaugums ir statistiski būtisks ($p < 0,001$).

Lai salīdzinātu ķermeņa masas pieaugumu starp grupām un noteiktu, vai ir statistiski būtiskas atšķirības, aprēķināja ķermeņa masas procentuālo pieaugumu no eksperimenta sākuma līdz eksperimenta beigām (sk. 3.10. att.). Grupas salīdzinātas ar vienvirziena ANOVA testu. Rezultāti norāda, ka ķermeņa masas procentuālais pieaugums būtiski neatšķiras starp grupām ($F(2,27) = 0,147$; $p = 0,864$).



3.10. att. Ķermeņa masas procentuālais pieaugums eksperimenta laikā. Grupas salīdzinātas ar vienvirziena ANOVA testu. NS. attēlā apzīmē statistiski būtisku atšķirību neesamību ($p > 0,05$).

Pēc eksperimenta beigām noteica arī muskuļa *Gastrocnemius plantaris* masu katrā no eksperimentālajām grupām (sk. 3.11. att., 3.12. att.). Muskuļa masu atšķirību esamība starp grupām pārbaudīta ar Kruskal-Wallis H testu. Pēc tā rezultātiem starp grupām nebija statistiski būtisku atšķirību ($\chi^2(2;30) = 0,855$; $p = 0,652$).

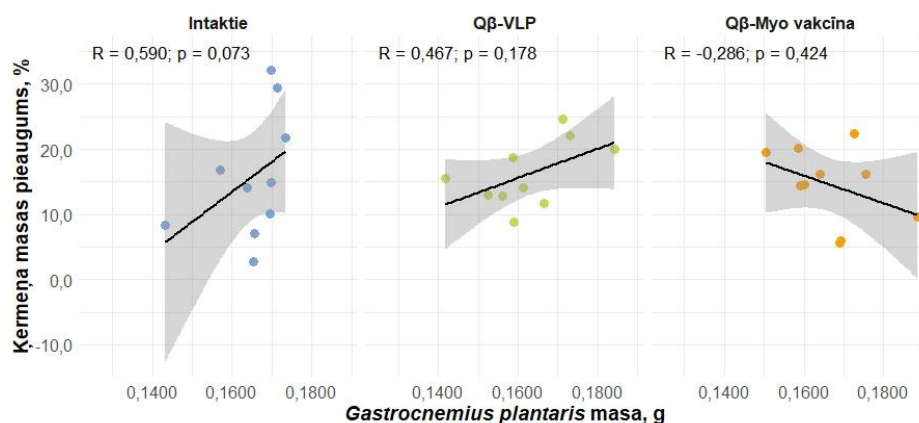


3.11. att. *Gastrocnemius plantaris* muskuļa masas salīdzinājums starp eksperimentālajām grupām. Salīdzinājums veikts ar Kruskal-Wallis H testu, NS. attēlā apzīmē statistiski būtisku atšķirību neesamību ($p > 0,05$).



3.12. att. Eksperimentālo grupu *Gastrocnemius plantaris* muskuļi.

Lai pārbaudītu, vai eksistē saistība starp ķermeņa masas procentuālo pieaugumu un *Gastrocnemius plantaris* masu grupas ietvaros, tika veikta korelāciju analīze ar Spearman ranku korelācijas metodi katrā no grupām (sk. 3.13. att.). Rezultāti parādīja pozitīvu korelāciju intaktajā grupā ($\rho = 0,590$), kas nebija statistiski nozīmīga ($p = 0,073$), un pozitīvu korelāciju Q β -VLP grupā ($\rho = 0,467$), kas arī nebija statistiski nozīmīga ($p = 0,178$). Savukārt Q β -Myo vakcīnas grupā novēroja negatīvu korelāciju ($\rho = -0,286$), tā arī nebija statistiski nozīmīga ($p = 0,424$). Korelācijas pastāv, taču neviena no tām nav statistiski nozīmīga.



3.13. att. Korelāciju analīze starp *Gastrocnemius plantaris* masu un ķermeņa masas procentuālo pieaugumu katrā no eksperimentālajām grupām. Analīze veikta ar Spearman rangu korelācijas metodi.

Eksperimenta laikā no pelēm tika iegūti serumu paraugi 75., 116. un 138. dienā pēc eksperimenta sākuma, lai noteiktu anti-miostatīna un anti-Q β VLP antivielu klātbūtni tajos. Antivielu titri tika noteikti ar ELISA testa palīdzību pie trīskārtējas fona vērtības.

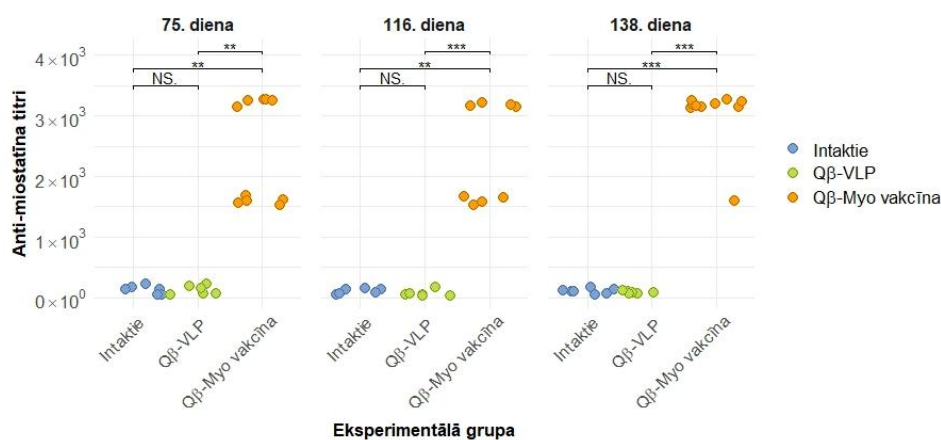
Lai pārbaudītu, vai pastāv statistiski nozīmīgas atšķirības starp anti-miostatīna antivielu titriem eksperimentālajās grupās, tika veikts Kruskal-Wallis H tests. Testa rezultāti parādīja, ka 75. eksperimenta dienā paņemtajos serumos starp grupām ir statistiski nozīmīga atšķirība ($\chi^2 (2;22) = 16,825$; $p < 0,001$). Arī 116. dienas serumos anti-MSTN antivielu titru atšķirības bija statistiski nozīmīgas ($\chi^2 (2;20) = 16,343$; $p < 0,001$), tāpat arī 138. dienā ($\chi^2 (2;24) = 22,400$; $p < 0,001$). Rezultāti liecina, ka visās trīs serumu pārbaudes reizēs vismaz viena grupa atšķiras no pārējām. Lai noteiktu, starp kurām grupām pastāv atšķirības, tika veikti Dunn testa Post-Hoc salīdzinājumi (ar Bonferroni korekciju), kuru rezultāti apkopoti 3.3. tabulā.

3.3. tab. Anti-miostatīna antivielu titru salīdzinājums eksperimentālajās grupās dažādos laika punktos. Dunn Post-Hoc testa rezultāti.

Serumu pārbaudes diena	Salīdzināmā grupa 1	Salīdzināmā grupa 2	Z-vērtība	Pielāgotā p-vērtība
75.	Intaktie	Qβ-VLP	0,276	1,000
	Intaktie	Qβ-Myo vakcīna	3,548	0,001
	Qβ-VLP	Qβ-Myo vakcīna	3,239	0,004
116.	Intaktie	Qβ-VLP	-0,631	1,000
	Intaktie	Qβ-Myo vakcīna	3,037	0,007
	Qβ-VLP	Qβ-Myo vakcīna	3,712	< 0,001
138.	Intaktie	Qβ-VLP	0,000	1,000
	Intaktie	Qβ-Myo vakcīna	3,976	< 0,001
	Qβ-VLP	Qβ-Myo vakcīna	3,976	< 0,001

Visās serumu pārbaudes dienās statistiski būtiskas atšķirības anti-miostatīna titros konstatētas starp intakto un Qβ-Myo vakcīnas grupu, kā arī Qβ-VLP un Qβ-Myo vakcīnas grupu. Starp intakto un Qβ-VLP grupu statistiski būtisku atšķirību nebija.

Friedman tests tika veikts, lai pārbaudītu, vai anti-MSTN antivielu titru līmeņi grupu ietvaros nozīmīgi atšķiras starp laika punktiem. Tikai Qβ-VLP grupai anti-MSTN titru līmeņos tika atrastas statistiski nozīmīgas atšķirības starp laika punktiem – testa rezultāti intaktajai grupai: $\chi^2(2) = 4,000$; $p = 0,135$; Qβ-VLP grupai: $\chi^2(2) = 7,600$; $p = 0,022$; Qβ-Myo vakcīnas grupai: $\chi^2(2) = 4,667$; $p = 0,097$. Lai gan Qβ-VLP grupai pēc Friedman testa starp laika punktiem konstatētas būtiskas atšķirības, Post-Hoc pāru salīdzinājumā ar pāru Wilcoxon testu statistiski būtisku atšķirību nebija ne starp 75./116., ne 116./138., ne 75./138. dienu ($p > 0,05$). Anti-miostatīna titru līmeņu apkopojums visās eksperimentālajās grupās dažādos laika punktos parādīts attēlā 3.14., norādot tikai titru līmeņu atšķirības starp grupām viena laika punkta ietvaros.



3.14. att. Anti-MSTN antivielu titru salīdzinājums eksperimentālajās grupās katrā no titru noteikšanas dienām pēc pirmās imunizācijas. Statistiski būtiska ietekme ir tikai grupas, bet ne laika punkta faktoram. Salīdzinājumu veica ar Kruskal-Wallis H un Dunn testu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS. $p > 0,05$).

Antivielu titru līmeņi tāpat tika noteikti pret Q β -fāga apvalka proteīnu, lai pārliedzinātos par tā izraisīto imunogēno efektu. Imunizācija ar Q β -VLP izraisīja stabilu, augstu antivielu titru veidošanos Q β -VLP un Q β -Myo vakcīnas eksperimentālajās grupās. Statistiski būtisku atšķirību esamība starp eksperimentālajām grupām pārbaudīta ar Kruskal-Wallis H testu. Pēc testa rezultātiem katra laika punkta ietvaros starp eksperimentālajām grupām pastāvēja statistiski būtiska anti-Q β VLP titru atšķirība:

75. dienā ($\chi^2(2;26) = 21,615$; $p < 0,001$), 116. dienā ($\chi^2(2;23) = 19,082$; $p < 0,001$), tāpat arī 138. dienā ($\chi^2(2;30) = 24,051$; $p < 0,001$). Rezultāti liecina, ka katrā serumu pārbaudes reizē vismaz viena grupa atšķīrās no pārējām. Lai noteiktu, starp kurām grupām pastāvēja anti-Q β VLP titru atšķirības, veica Dunn testa Post-Hoc salīdzinājumus (ar Bonferroni korekciju), kuru rezultāti apkopoti 3.4. tabulā.

3.4. tab. Anti-Q β VLP antivielu titru salīdzinājums eksperimentālajās grupās dažādos laika punktos. Dunn Post-Hoc testa rezultāti.

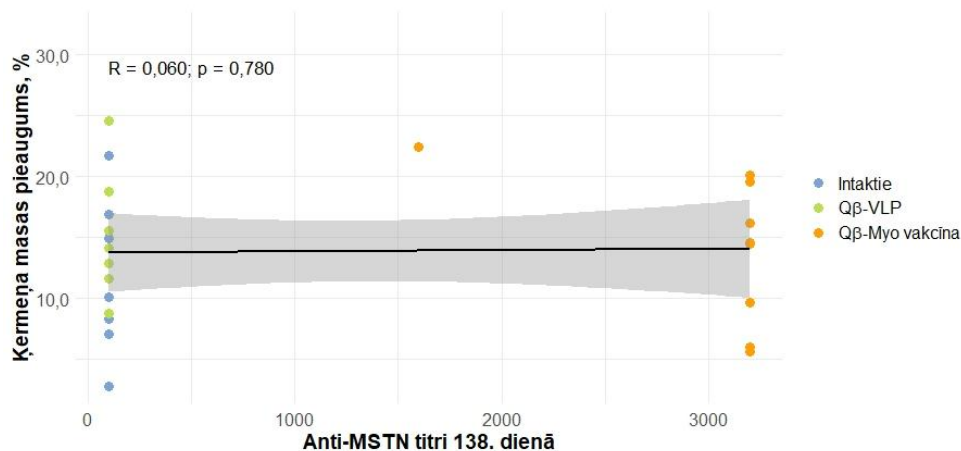
Serumu pārbaudes diena	Salīdzināmā grupa 1	Salīdzināmā grupa 2	Z-vērtība	Pielāgotā p-vērtība
75.	Intaktie	Q β -VLP	4,354	< 0,001
	Intaktie	Q β -Myo vakcīna	3,354	0,002
	Q β -VLP	Q β -Myo vakcīna	-1,450	0,441
116.	Intaktie	Q β -VLP	3,992	< 0,001
	Intaktie	Q β -Myo vakcīna	3,200	0,004
	Q β -VLP	Q β -Myo vakcīna	-0,871	1,000
138.	Intaktie	Q β -VLP	4,767	< 0,001
	Intaktie	Q β -Myo vakcīna	3,382	0,002
	Q β -VLP	Q β -Myo vakcīna	-1,385	0,498

Lai pārbaudītu, vai antivielu titri grupas ietvaros nozīmīgi atšķiras starp laika punktiem, tika veikts Friedman tests. Intaktajai grupai testu neveica datu variabilitātes trūkuma dēļ (titri visos laika punktos = 0). Q β -VLP un Q β -Myo vakcīnas imunizācijās grupās pēc Friedman testa rezultātiem antivielu titri statistiski nozīmīgi atšķīrās starp laika punktiem: Q β -VLP grupai $\chi^2(2) = 8,4$; $p = 0,015$, savukārt Q β -Myo vakcīnas grupai: $\chi^2(2) = 6$; $p = 0,049$. Taču ar pāru Wilcoxon Post-Hoc analīzes testu palīdzību salīdzinātie anti-Q β VLP titru līmeņi Q β -VLP un Q β -Myo vakcīnas grupās statistiski būtiski neatšķīrās nevienā no laika punktu pāru salīdzinājumiem (visos gadījumos $p > 0,05$). Anti-Q β VLP titru līmeņu apkopojums visās eksperimentālajās grupās dažādos laika punktos parādīts attēlā 3.15., norādot titru līmeņu atšķirības starp grupām viena laika punkta ietvaros.



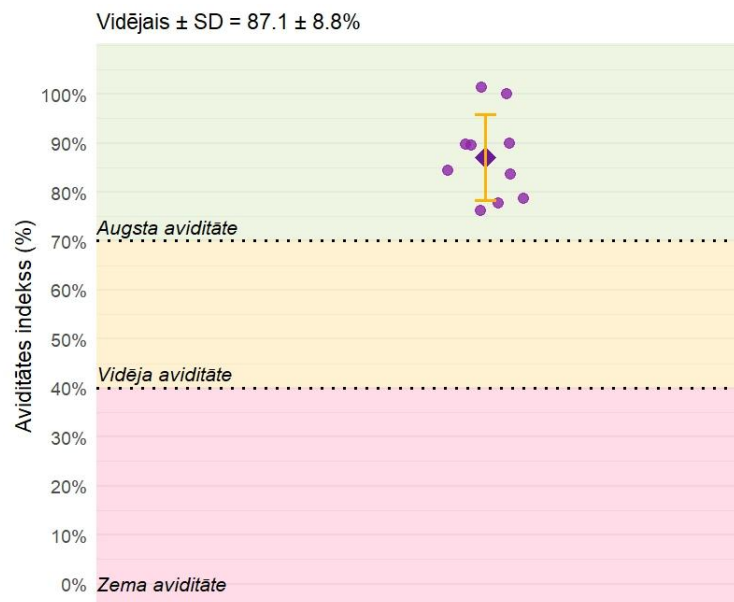
3.15. att. Anti-Qβ VLP antivielu titru salīdzinājums eksperimentālajās grupās katrā no titru noteikšanas dienām pēc pirmās imunizācijas. Statistiski būtiska ietekme ir tikai grupas, bet ne laika punkta faktoram. Salīdzinājumu veica ar Kruskal-Wallis H un Dunn testu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ NS. $p > 0,05$).

Lai pārbaudītu, vai eksistē saistība starp anti-MSTN antivielu titriem un ķermeņa masas procentuālo pieaugumu, veica korelāciju analīzi (sk. 3.16. att.). Analīzei izmantoja neparametrisko Spearman ranku korelācijas metodi. Rezultāti parādīja ļoti vāju pozitīvu korelāciju ($p = 0,060$), kas nebija statistiski nozīmīga ($p = 0,780$).



3.16. att. Korelāciju analīze starp anti-MSTN antivielu titriem eksperimentālajās grupās un ķermeņa masas pieaugumu. Analīze veikta ar Spearman rangu korelācijas metodi, korelācija starp lielumiem nav statistiski būtiska ($p = 0,780$).

Lai pārlicinātos par anti-MSTN antivielu aviditāti, veica aviditātes ELISA ar 7 M urīnvielu. Aviditātes ELISA un aviditātes indeksa aprēķinam izmantoja anti-MSTN antivielu titrus, noteiktus 138. dienā paņemtajos serumos. Aviditātes indeksu noteica pie atšķaidījumiem, kas izmantoti anti-MSTN titru noteikšanai netiešās ELISA analīzē. Aviditāti raksturoja kā zemu, ja tā bija zem 40%, vidēju – no 40 līdz 70% un augstu, ja aviditātes indekss bija no 70 līdz 100%. Vidējais anti-MSTN antivielu aviditātes indekss bija $87,1 \% \pm 8,8 \%$, kas liecina par augstu antivielu aviditāti (sk. 3.17. att.).



3.17. att. Aviditātes ELISA testa rezultāti anti-MSTN antivielām, kas veidojušās pēc imunizācijas ar Q β -MSTN vakcīnas kandidātu (Q β -Myo vakcīna).

Aprakstītie maģistra darba rezultāti prezentēti apvienotajā Latvijas Bioķīmijas biedrības un 83. Latvijas Universitātes starptautiskās zinātniskās konferences molekulārās bioloģijas sekcijas sēdē 14.02.2025. (8. pielikums).

4. DISKUSIJA

4.1. Anti-miostatīna vakcīnas prototipu izveide un raksturošana

Kopš miostatīna atklāšanas un tā fizioloģiskās nozīmes noskaidrošanas, šis proteīns ir kļuvis par pievilcīgu un daudzsološu mērķi terapeitisku pieeju izstrādē deģeneratīvu muskuļu slimību ārstēšanai [58]. Cilvēkiem un dzīvniekiem, kas dzimuši ar proteīna funkcijas zudumu kodējošām mutācijām *Mstn* gēnā, tiek novērota muskuļu masas palielināšanās jeb “dubultošanās”. Jau ilgāk nekā 200 gadus muskuļu masas dubultošanās (faktiski muskuļu masas palielināšanās par 20 – 25%) novērota vairākām liellopu šķirnēm. McPherron un Lee 1997. gadā izdevās identificēt mutācijas, kas atbildīgas par muskuļu masas izmaiņām tādās liellopu šķirnēs kā Pjemontas un Beļģijas zilā. Pjemontas govīm miostatīna gēnā atrasta *missense* mutācija, bet Beļģijas zilajām – 11 nukleotīdu delēcija, abos gadījumos izmaiņas rezultējās ar MSTN molekulas nobriedušā reģiona funkcijas zudumu [59]. Savukārt Schuelke un kolēģi 2004. gadā ziņojuši par klīnisko gadījumu, kurā bērnam kopš dzimšanas konstatēts ievērojami paaugstināts muskuļu masas apjoms un samazināta adipozitāte. Pacientam identificēta funkcijas zuduma mutācija *Mstn* gēnā, bet serumā netika noteikta MSTN propeptīda klātbūtne, no kā autori secina, ka pacientam vērojams arī nobrieduša miostatīna trūkums [85].

Ņemot vērā pozitīvos MSTN trūkuma efektus, proteīna nozīmīgo lomu skeleta muskuļu masas un homeostāzes nodrošināšanā, kā arī tā plašāku iesaisti dažādos organisma fizioloģiskajos procesos, pēdējo 20 gadu laikā tiek izstrādātas dažādas miostatīna inhibīcijas terapeitiskās pieejas. Proteīna funkcionālie antagonisti piedāvātu ievērojamu terapeitisku potenciālu ne tikai tādu patoloģiju gadījumos kā kaheksija un sarkopēnija, bet arī aptaukošanās, II tipa cukura diabēta un kaulu slimību ārstēšanā [39]. Šobrīd visizplatītākie antagonistu veidi ir monoklonālas anti-MSTN antivielas, taču to liela mēroga ražošana ir salīdzinoši dārga un komplicēta, turklāt terapeitiskā efekta panākšanai hronisku slimību gadījumā pacientiem nepieciešama regulāra, atkārtota antiviēlu administrēšana, kas padara terapijas procesu sarežģītāku un nepieejamāku. Klīniskajos pētījumos novērotais liesās ķermeņa masas pieaugums svārstās starp 3 līdz 8%, ko nevar raksturot kā augstu efektivitāti. Turklāt šāda līmeņa pieaugums netiek saistīts ar klīniski nozīmīgiem funkcionālo rezultātu uzlabojumiem, piemēram, fiziskās slodzes testos [51]. Tādēļ ir nepieciešamas alternatīvas terapiju stratēģijas, par vienu no kurām varētu kļūt terapeitisko vakcīnu izveide.

Anti-MSTN vakcīnu izstrāde ir mazāk izpētīta pieeja nekā monoklonālo antiviēlu vai šķīstošu ActRIIB izveide, taču terapeitiska vakcīna varētu būt daudzsološa opcija, jo tā nodrošinātu ārstniecisko efektivitāti ar zemākām izmaksām, kā arī antiviēlu atbildes laiks pacienta organismā būtu ilgāks. Viens no anti-MSTN savienojumu izveides izaicinājumiem skaidrojams ar faktu, ka miostatīns ir dabīgi organismā sastopams proteīns, pret kuru normālos fizioloģiskos apstākļos

antivielas neveidojas. Vīrusveidīgo daļiņu bāzes izmantošana ļauj pārvarēt šo šķērsli, pateicoties augstajai VLP imunogenitātei [36]. Turklāt VLP ir perspektīva, droša un plaši funkcionalizējama platforma vakcīnas kandidātu izstrādei savu izmēru, struktūras un citu iepriekš aprakstītu īpašību dēļ [65].

Maģistra darba pētījuma ietvaros miostatīnu inhibējošu vakcīnas kandidātu izveidei izmantoja divas dažādas metodes, kas tiek plaši pielietotas darbā ar VLP vakcīnām. Viena no tām bija ģenētiskā sapludināšana. Tās gaitā ssRNS bakteriofāga AP205 apvalka proteīna monomēra vai dimērās formas sekvencē gēnu sintēzes ceļā tika ieviesti atlasīti potenciāli terapeitiski miostatīna epitopi, kas eksponēti uz proteīna ārējās virsmas. Kā VLP bāzi izvēlējās tieši AP205 daļiņas, pateicoties to unikālajai struktūrai, kurā apvalka proteīnu N- un C- terminālie gali ir izvietoti uz daļiņas virsmas, kas piedāvā izdevīgu opciju peptīdu eksponēšanai [87]. VLP daļiņu izveidei un epitopu eksponēšanai izmantoja ne tikai AP205 CP monomērus, bet arī dimērus, kas ir kovalenti sasiāti monomēri, jo šādam konstrukta modelim piemīt tādas priekšrocības kā iespēja izvietot lielākus insertus, uzlabota daļiņas stabilitāte un optimizēta antigēna prezentēšana, kas paaugstina spēcīgas imūnsistēmas atbildes reakcijas izsaukšanas iespēju [91].

Ģenētiskās sapludināšanas metode ļauj vienkāršot vakcīnu ražošanas procesu un, nepieciešamības gadījumā, ērti palielināt tā mērogus. Taču ģenētiskās sapludināšanas metodes galvenais trūkums ir risks, ka izmaiņas proteīna struktūrā izjauks VLP savākšanās integritāti vai ievietotais inserts netiks eksponēts pareizā konformācijā [79]. Tā kā ģenētiskās sapludināšanas ceļā izveidotie konstrukti APd-EFVFL, APd-NGKEQ, MDFGLD-APm un TEV-DFGLD-APm* veidoja homogēnas, sagaidāmās morfoloģijas VLP daļiņas, tas liecināja, ka atlasīto epitopu pievienošana AP205 CP sekvencei netraucēja sekmīgam vīrusveidīgās daļiņas savākšanās procesam. Taču konstruktu funkcionālās pārbaudes – luciferāzes reportiera testa – rezultāti rāda, ka konstrukti neizraisa Smad signālceļa aktivāciju. Smad signālceļš ir viens no centrālajiem mehānismiem, caur kuriem organismā notiek miostatīna funkciju realizēšana. Miostatīna piesaistīšanās pie ActRIIB/ActRIIA receptoriem caur Smad signālceļu modulē ar muskuļu atrofiju un mioģēno diferenciāciju saistītu faktoru regulāciju [50]. Luciferāzes reportiera testa gaitā miostatīna receptorus ekspresējoša zīdītāju šūnu līnija (A-204 vai HEK293) tiek transficēta ar (CAGA)₁₂–pGL3-Basic plazmīdu, kura satur luciferāzes reportieri, kas tiek aktivēts MSTN piesaistes gadījumā pie receptoriem. Sekojoši tiek palaists luciferāzes ekspresijas process un novērota luminiscence [33, 89]. Ja izveidoto ģenētisko konstruktu eksponētie epitopi piesaistītos pie ActRIIB/ActRIIA receptoriem un aktivētu Smad signālceļu, būtu pamats domāt, ka antivielas pret atlasītajiem MSTN epitopiem spētu efektīvi ar to saistīties un inhibēt proteīna darbību, neļaujot aktivēt Smad signālceļu un modulēt atrogēna-1 un MuRF-1 ekspresiju. Taču pēc testa rezultātiem neviens izveidotajiem konstruktiem – APd-EFVFL, APd-NGKEQ, MDFGLD-APm un TEV-DFGLD-APm* – neizraisīja

luciferāzes ekspresiju reportiera testa laikā. Iegūtos rezultātus var skaidrot vairākos veidos. Pirmkārt, lai gan elektronmikroskopijas attēli apstiprināja netraucētu VLP savākšanos, pastāv risks, ka MSTN epitopi tomēr netika eksponēti pareizā konformācijā vai to izvietojums uz VLP virsmas padarīja tos nepieejamus mijiedarbībai ar receptoriem. Tādā gadījumā tie nebūtu pieejami piesaistei pie receptora, kas rezultētos kā nespēja aktivēt signālceļu. Otrkārt, pat ja ģenētiskā sapludināšana un himēro VLP ekspresija bija notikusi korekti, ir iespējams, ka atlasītie epitopi nepiedalās saistīšanās procesā ar ActRIIB/ActRIIA receptoriem un nav iesaistīti Smad signālceļa aktivācijā. Ņemot vērā Smad signālceļa nozīmi MSTN funkciju nodrošināšanā [17], nebija sagaidāms, ka imunizācija ar šādiem vakcīnas kandidātiem izraisītu bioloģiski nozīmīgas, funkcionālas imūnās atbildes veidošanos. Šo pieņēmumu apstiprina Bobbili un kolēģu veiktais pētījums par maternālās anti-miostatīna imunizācijas ietekmi uz pēcnācēju muskuļu masu. Imunizācija tika veikta ar atlasītiem MSTN aktīvās formas peptīdiem. Pētījuma ietvaros pētnieki veica luciferāzes reportiera testu A-204 šūnās, kurā pārbaudīja pēc imunizācijas iegūtu, attīrītu IgG antivielu spēju inhibēt miostatīnu. Autoru iegūtie rezultāti bija negatīvi un demonstrēja, ka iegūtās antivielas nespēja nomākt MSTN aktivitāti. Turklāt autori nāca pie secinājuma, ka iegūtās antivielas nespēj saistīties ar MSTN homodimēru, lai kavētu tā aktivitāti, un muskuļu masas pieaugums, kas novērots vienā no eksperimentālajām grupām, nevarēja tikt skaidrots ar antivielu izraisītajiem efektiem [10].

Otrā metode, kas izmantota vakcīnas kandidātu izveidei, bija ķīmiskā konjugācija. Šai metodei izmantoja no ssRNS fāga Q β apvalka veidotās vīrusveidīgās daļiņas. Uz fāga Q β VLP virsmas ir eksponēti lizīni, tādēļ tā ir ērta, piemērota, kā arī pārbaudīta platforma vakcīnu prototipu izstrādei ar ķīmiskās konjugācijas metodi. Galvenā ķīmiskās modificēšanas priekšrocība balstās tajā, ka VLP un antigēns tiek sākotnēji iegūti atsevišķi, kas ievērojami palielina iespēju, ka abiem vakcīnas komponentiem būs pareiza struktūra [31]. Pētījuma gaitā Q β VLP un komerciāli iegūtu nobrieduša MSTN proteīna homodimēru savstarpēji konjugēja ar tetrazīna-PEG5-NHS un endo-BCN-PEG-NHS esteru palīdzību. Konjugātu izveidošanos apstiprināja analīzes SDS-PAGE un NAGE gelos. Komerciāla, eikariotu šūnās producēta MSTN izmantošana vakcīnas izveidē nodrošināja, ka proteīns būs pareizā konformācijā un palielināja iespēju, ka izsauktā imunizācijas atbildes reakcija būs korekta un varēs veidoties funkcionālas, terapeitiskas antivielas.

4.2. Anti-miostatīna vakcīnas prototipa pārbaude peļu modelī

Ķīmiskās konjugācijas ceļā izveidotā vakcīnas prototipa efektivitāti pārbaudīja BALB/c līnijas peļu tēviņos, balstoties uz to, ka zīdītāju tēviņiem parasti ir lielāka kopējā ķermeņa muskuļu proporcija, līdz ar to būtu vieglāk novērot eksperimenta gaitā radušās muskuļu masas izmaiņas. Visā eksperimenta laikā tika monitorēta peļu ķermeņa masa, un trīs laika punktos tika noteikti antivielu titri pret miostatīnu un pret fāga Q β vīrusveidīgajām daļiņām, lai atsevišķi noskaidrotu vakcīnas

kandidāta un vakcīnas platformas izraisīto imūnsistēmas atbildes reakciju. Visās grupās sagaidāmi tika novērots būtisks peļu ķermeņa masas pieaugums no eksperimenta sākuma līdz beigām, taču procentuālā pieauguma salīdzinājums neuzrādīja statistiski būtiskas atšķirības starp kontroles un eksperimentālajām grupām. Līdzīgi statistiski būtisku atšķirību nebija arī salīdzinot muskuļa *Gastrocnemius plantaris* masas starp grupām eksperimenta beigās. Pārbaudot saistību starp *Gastrocnemius plantaris* un ķermeņa masas procentuālo pieaugumu, statistiski būtiskas korelācijas tāpat neidentificēja, kas liecina, ka *Gastrocnemius plantaris* masas atšķirības nav saistītas ar ķermeņa masas pieaugumu grupas ietvaros.

ELISA testa rezultātā noskaidroto anti-MSTN titru salīdzinājums parādīja, ka pēc imunizācijas Q β -Myo vakcīnas kandidātu eksperimentālajā grupā veidojas noturīgi augsti antivielu titri pret miostatīnu, kas būtiski atšķirās no kontroles intaktās un Q β -VLP imunizācijas grupas visos pārbaudītajos laika punktos. Tas liecina, ka VLP platforma ļauj sekmīgi pārvarēt organisma toleranci pret endogēno miostatīnu. Viena no lielākajām VLP platformas priekšrocībām ir to potenciālais izmantojums antivielu veidošanās izraisīšanai pret organisma pašantigēniem, piemēram, hronisku slimību gadījumos. VLP struktūra pieļauj multivalentu antigēnu izvietošanu, kuru organisma imūnsistēma atpazīst kā PAMP. Pamatojoties uz šo īpašību, VLP platformas ir izmantotas terapeitisku līdzekļu izstrādē pret tādām slimībām kā reimatoīdais artrīts, osteoporoze, ateroskleorze, Alcheimera slimība un citas [42, 108].

Salīdzinot antivielu titru atšķirības Q β -Myo vakcīnas grupā laika dinamikā, statistiski būtisku atšķirību nebija, kas liecina, ka izveidojušos antivielu titru līmenis ir stabils un laika gaitā nepazeminās. Lai pārbaudītu, vai eksistē saistība starp noteikto anti-MSTN antivielu līmeni un ķermeņa masas procentuālo pieaugumu, tika veikta korelāciju analīze pēc Spearman metodes. Statistiski nozīmīgu korelāciju neidentificēja, kas nozīmē, ka ķermeņa masas procentuālais pieaugums nav saistīts ar anti-MSTN IgG titru līmeni.

Lai pārliccinātos par Q β VLP imunogenitāti, tāpat tika noteikts antivielu titru līmenis pret Q β VLP. Antivielu līmenis bija stabili augsts Q β -VLP un Q β -Myo vakcīnas imunizācijas grupās un statistiski būtiski atšķirās no intaktās grupas. Antivielu titru līmeņi pret Q β -VLP bija augstāki nekā pret MSTN, taču tāds rezultāts bija sagaidāms, jo Q β VLP ir spēcīgs imunogēns, bet miostatīns ir autoantigēns.

Lai uzzinātu vairāk par antivielu funkcionālajām īpašībām un novērtētu iegūto antivielu saistības spēku ar imunizācijā izmantoto antigēnu, tika noteikta antivielu aviditāte. Tā apraksta multivalentas mijiedarbības starp antigēnu un antivielām, turklāt šis parametrs tiek izmantots izveidotās imunoloģiskās atmiņas raksturošanai, tādēļ aviditāte ir viens no lielumiem, ko pielieto vakcīnu efektivitātes novērtēšanā. Augstas aviditātes antivielas parasti veidojas afinitātes

nobriešanas rezultātā germinālajos centros, kad B-šūnas ar folikulāro T-līdzētājšūnu palīdzību iziet cauri somatiskās hipermutācijas un atlasēšanas procesam. Tādēļ augsta antivielu aviditāte liecina par noturīgas ilgtermiņa imūnās atbildes veidošanos [20]. Pēc imunizācijas iegūto antivielu aviditāte noteikta ar aviditātes ELISA testu un rezultāti izteikti kā aviditātes indekss. Vidējais anti-MSTN antivielu aviditātes indekss bija augsts ($87,1 \% \pm 8,8 \%$), kas liecina, ka imunizācijas rezultātā ar Q β -Myo konjugātu veidojas ne tikai titru līmeņu, bet arī funkcionālas saistības ziņā noturīgas antivielas.

Lai gan imunizācija ar vakcīnas kandidātu izraisīja izmērāmu antivielu atbildi pret miostatīnu, ķermeņa un muskuļu masas mērījumi neatklāja statistiski nozīmīgas atšķirības starp vakcīnas un kontroles grupām. Viena no iespējamajām negatīvo ķermeņa masas rezultātu interpretācijām ir, ka sasniegtais MSTN neitralizācijas līmenis nepārsniedza nepieciešamo sliekšni, lai izraisītu izmērāmu muskuļu hipertrofiju pētījuma periodā. Iespējams, potenciāli aktivēto hipertrofijas molekulāro mehānismu izpausmei muskuļu masas izmaiņu līmenī ir nepieciešams ilgāks eksperimentālā modeļa novērošanas ilgums vai lielāka imunizācijas deva [38, 102]. Vēl viens izaicinājums MSTN inhibitoru izstrādē ir pētījuma modeļa izvēle. Cirkulējošie MSTN līmeņi pelēs ir robežās no 60 – 100 ng/ml, kamēr cilvēkos tie ir gandrīz desmit reizes zemāki [49]. No šī aspekta peļu modelis nav optimāla izvēle MSTN inhibitoru pētījumiem. Populāras peļu līniju izvēles anti-MSTN savienojumu pētījumiem iekļauj ne tikai BALB/c peles, bet ar *mdx* peles muskuļu distrofijas pētījumiem. Taču, arī izvēloties alternatīvu peļu modeli, nav iespējams precīzi modelēt terapijas efektivitāti, piemēram, Dišēna muskuļu distrofijas (DMD) gadījumā, jo cirkulējošā MSTN mRNS līmeņi DMD skartos skeleta muskuļos ir ievērojami zemāki, salīdzinot ar *mdx* muskuļiem, *mdx* muskuļos sasniedzot 25% no *wild type* ekspresijas, bet DMD gadījumā – tikai 8% no vesela cilvēka kontroles līmeņa [14]. Līdz ar to jāsecina, ka signālu pārvade veselā muskulī precīzi neparedz signālpārvades norisi un efektu distrofiskā muskulī [100].

Zinātniskajā literatūrā iepriekš nav aprakstīti mēģinājumi izveidot miostatīnu inhibējošu vakcīnas kandidātu uz VLP bāzes, kas rada izaicinājumu iegūto rezultātu interpretēšanai kopējā pētnieciskajā kontekstā. Kā iespējamās imunizācijas stratēģijas ir pētītas: DNS vakcīnu izveides iespējas [4, 95], rekombinantu, miostatīnu ekspresējošu *Saccharomyces* un *Lactobacillus* izvide orālai imunizācijai [94, 113], kā arī maternālās imunizācijas ietekme uz pēcnācējiem peļu un vistu modelī [10, 61]. Anti-MSTN vakcīnu izveides mēģinājumiem raksturīgi mainīgi panākumi. Imunizācijas rezultātā ar DNS vakcīnām, kas balstītas uz miostatīnu, saistītu ar tetānusa toksīna T-līdzētājšūnu epitopiem, Andoney un kolēģu novērotais BALB/c peļu dažādo ķermeņa segmentu masas pieaugums nebija statistiski būtisks visos apskatītajos gadījumos. Turklāt ELISA pārbaudes rezultātā autoriem neizdevās noteikt specifisku antivielu klātbūtni pēc imunizācijas, un novērotie muskuļu masas palielinājuma efekti tika skaidroti ar šūnu imunitātes atbildes reakcijām [4].

Savukārt līdzīga eksperimentālā dizaina Tang un kolēģu veiktajā pētījumā pelēm pēc imunizācijas tika novērots ne tikai statistiski būtisks muskuļu masas pieaugums, muskuļu šķiedru hipertrofija un proporcionāli palielināts satvēriena spēks, bet arī specifiski anti-MSTN antivielu titri [95]. Pētījumā, kurā kā imunizācijas stratēģija tika izmantots MSTN ekspresējošs *S. cerevisiae*, pelēm pēc imunizācijas tāpat veidojās anti-MSTN antivielu titri un statistiski būtisks ķermeņa un atsevišķu muskuļu masas pieaugums [113]. Savukārt jau pieminētajā Bobbili un kolēģu anti-miostatīna maternālās imunizācijas pētījumā rezultāti liecināja, ka imunizētajām pelēm veidojas statistiski būtiski anti-MSTN titri, kuri tiek nodoti pēcnācējiem, taču izveidojušās antivielas nebija terapeitiski funkcionālas, jo neizraisīja muskuļu masas izmaiņas imunizēto peļu pēcnācējiem [10].

Iepriekš aprakstīto pētījumu rezultāti ir neviennozīmīgi, kas liecina par izvēlētas vakcīnas platformas un imunizācijas metodes būtiskumu, kā arī uzsver nepieciešamību pēc padziļināta imunizācijas efektivitātes izvērtējuma. Turpmākiem pētījumiem vakcīnas funkcionālās efektivitātes papildus novērtējumam eksperimentālajā dizainā varētu ieviest ķermeņa adipozo audu procenta noteikšanu, lai gūtu pilnvērtīgāku priekšstatu par kopējām organisma kompozīcijas izmaiņām pēc imunizācijas. Tāpat muskuļu morfometriskā analīze ļautu detalizētāk novērtēt strukturālās izmaiņas muskuļu audos, kas radušās imunizācijas rezultātā. Potenciālos funkcionālos uzlabojumus tāpat varētu identificēt ar kontraktīlā spēka mērījumu testu palīdzību, savukārt izmaiņas molekulārā līmenī varētu noteikt ar muskuļu diferenciacijā un atjaunošanā iesaistītu ekspresijas marķieru, piemēram, *MyoD*, analīzi. Turpmākos pētījumos inhibitoru stratēģiju izstrādi tāpat varētu vērst uz latentās pro-MSTN formas inhibīciju, jo tas varētu nodrošināt lielāku iedarbības specifiskumu, kā arī mazinātu problēmu ar ierobežotu aktīva, nobrieduša MSTN pieejamību organisma cirkulācijas sistēmā [103].

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pēc imunizācija ar izveidoto Q β -Myo vakcīnas kandidātu radusies spēcīga humorālās imunitātes atbildes reakcija, kas, lai arī daudzsoļa no imunogenitātes viedokļa, ne vienmēr garantē vēlamo fizioloģisko efektu. Šī atšķirība starp sagaidāmo un faktisko rezultātu rosina domāt par turpmāku antivielu funkcionālo aspektu pārbaudi, īpaši par to neitralizējošo efektivitāti miostatīna inhibīcijas kontekstā.

SECINĀJUMI

1. Četri izveidotie konstrukti APd-EFVFL, APd-NGKEQ, MDFGLD-APm un TEV-DFGLD-APm* producēšanas procesā sekmīgi savācās, veidojot normālas morfoloģijas himēras VLP – epitopu EFVFL, NGKEQ un DFGLD pievienošana fāga AP205 apvalka proteīna sekvencei netraucē VLP daļiņu veidošanos.
2. Himērās VLP ar integrētajiem MSTN epitopiem neizraisa Smad signālceļa aktivāciju *in vitro*, tādēļ tās netika pārbaudītas *in vivo* imunizācijas eksperimentos.
3. Ar tetrazīna-PEG5-NHS un endo-BCN-PEG8-NHS esteru palīdzību iespējams sekmīgi piesaistīt miostatīnu pie fāga Q β VLP, iegūstot himēras vīrusveidīgās daļiņas.
4. Imunizācija ar Q β -Myo konjugātu ļauj pārvarēt organisma paštoleranci pret autoantigēnu, rezultātā pelēm veidojas augstas aviditātes anti-miostatīna antivielas, kas saistās ar imunizācijā izmantoto MSTN.
5. Peļu ķermeņa masas pieaugums un *Gastrocnemius plantaris* masa starp eksperimentālajām grupām statistiski būtiski neatšķiras, un korelāciju analīze rāda, ka masas pieaugumu nevar skaidrot ar piederību kādai no eksperimentālajām grupām.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Allen, D.L., Cleary, A.S., Speaker, K.J., Lindsay, S.F., Uyenishi, J., Reed, J.M., Madden, M.C., Mehan, R.S. Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, vol. 294, p. 918–927.
2. Allen, D.L., Hittel, D.S., McPherron, A.C. Expression and function of myostatin in obesity, diabetes, and exercise adaptation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2011, N 10, vol. 43, p. 1828–1835.
3. Anderson, S.B., Goldberg, A.L., Whitman, M. Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, N 11, vol. 283, p. 7027–7035.
4. Andoney, V.R., Vázquez, A.G., Ríos, J.P.P., Buchelli, J.E.V., Morales, R.A.A. Chimeric Myostatin — Tetanic Toxin Epitopes and Heterologous Prime-boost Immunization Improve Immune Response Stimulating Muscle Growth in Mice. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2019, N 5, vol. 24, p. 773–781.
5. Bachmann, M.F., Dyer, M.R. Therapeutic vaccination for chronic diseases: a new class of drugs in sight. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 2001, vol. 3, p. 1–8.
6. Bachmann, M.F., Jennings, G.T. Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology*, 2010, N 11, vol. 10, p. 787–796.
7. Baig, M.H., Ahmad, K., Moon, J.S., Park, S.Y., Ho Lim, J., Chun, H.J., Qadri, A.F., Hwang, Y.C., Jan, A.T., Ahmad, S.S., Ali, S., Shaikh, S., Lee, E.J., Choi, I. Myostatin and its Regulation: A Comprehensive Review of Myostatin Inhibiting Strategies. *Frontiers in Physiology*, 2022, vol. 13, p. 1–16.
8. Bermejo-Jambrina, M., Eder, J., Helgers, L.C., Hertoghs, N., Nijmeijer, B.M., Stunnenberg, M., Geijtenbeek, T.B.H. C-type lectin receptors in antiviral immunity and viral escape. *Frontiers in Immunology*, 2018, N 590, vol. 9, p. 1–12.
9. Blum, J.S., Wearsch, P.A., Cresswell, P. Pathways of antigen processing. *Annual Review of Immunology*, 2013, vol. 31, p. 443–473.
10. Bobbili, N.K., Kim, Y.S., Dunn, M.A., Yang, J., Ong, A. Effects of maternal immunisation against myostatin on post-natal growth and skeletal muscle mass of offspring in mice. *Food and Agricultural Immunology*, 2008, N 2, vol. 19, p. 93–106.
11. Bonaldo, P., Sandri, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 2013, N 1, vol. 6, p. 25–39.
12. Bowie, A.G., Unterholzner, L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 2008, N 12, vol. 8, p. 911–922.
13. Brune, K.D., Leneghan, D.B., Brian, I.J., Ishizuka, A.S., Bachmann, M.F., Draper, S.J., Biswas, S., Howarth, M. Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Scientific Reports*, 2016, N 19234, vol. 6, p. 1–13.
14. Burch, P.M., Pogoryelova, O., Palandra, J., Goldstein, R., Bennett, D., Fitz, L., Guglieri, M., Bettolo, C.M., Straub, V., Evangelista, T., Neubert, H., Lochmüller, H., Morris, C. Reduced serum myostatin concentrations associated with genetic muscle disease progression. *Journal of Neurology*, 2017, N 3, vol. 264, p. 541–553.

15. Callanan, J., Stockdale, S.R., Adriaenssens, E.M., Kuhn, J.H., Rumnieks, J., Pallen, M.J., Shkoporov, A.N., Draper, L.A., Ross, R.P., Hill, C. Leviviricetes: Expanding and restructuring the taxonomy of bacteria-infecting single-stranded RNA viruses. *Microbial Genomics*, 2021, N 11, vol. 7, p. 1–7.
16. Cash, J.N., Rejon, C.A., McPherron, A.C., Bernard, D.J., Thompson, T.B. The structure of myostatin:follistatin 288: Insights into receptor utilization and heparin binding. *EMBO Journal*, 2009, N 17, vol. 28, p. 2662–2676.
17. Chen, M.M., Zhao, Y.P., Zhao, Y., Deng, S.L., Yu, K. Regulation of Myostatin on the Growth and Development of Skeletal Muscle. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, N 785712, vol. 9, p. 1–10.
18. Cohen, T. V., Kollias, H.D., Liu, N., Ward, C.W., Wagner, K.R. Genetic disruption of Smad7 impairs skeletal muscle growth and regeneration. *Journal of Physiology*, 2015, N 11, vol. 593, p. 2479–2497.
19. Consitt, L.A., Clark, B.C. The Vicious Cycle of Myostatin Signaling in Sarcopenic Obesity: Myostatin Role in Skeletal Muscle Growth, Insulin Signaling and Implications for Clinical Trials. *The Journal of frailty & aging*, 2018, N 1, vol. 7, p. 21–27.
20. Correa, V.A., Rodrigues, T.S., Portilho, A.I., Trzewikowski de Lima, G., De Gaspari, E. Modified ELISA for antibody avidity evaluation: The need for standardization. *Biomedical Journal*, 2021, N 44, p. 433 – 438.
21. Costelli, P., Muscaritoli, M., Bonetto, A., Penna, F., Reffo, P., Bossola, M., Bonelli, G., Doglietto, G.B., Baccino, F.M., Fanelli, F.R. Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *European Journal of Clinical Investigation*, 2008, N 7, vol. 38, p. 531–538.
22. Cotton, T.R., Fischer, G., Wang, X., McCoy, J.C., Czepnik, M., Thompson, T.B., Hyvönen, M. Structure of the human myostatin precursor and determinants of growth factor latency. *The EMBO Journal*, 2018, N 3, vol. 37, p. 367–383.
23. Cui, Z., Gorzelnik, K. V., Chang, J.Y., Langlais, C., Jakana, J., Young, R., Zhang, J. Structures of Q β virions, virus-like particles, and the Q β –MurA complex reveal internal coat proteins and the mechanism of host lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, N 44, vol. 114, p. 11697–11702.
24. Dankbar, B., Fennen, M., Brunert, D., Hayer, S., Frank, S., Wehmeyer, C., Beckmann, D., Paruzel, P., Bertrand, J., Redlich, K., Koers-Wunrau, C., Stratis, A., Korb-Pap, A., Pap, T. Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice. *Nature Medicine*, 2015, N 9, vol. 21, p. 1085–1090.
25. Dent, K.C., Thompson, R., Barker, A.M., Hiscox, J.A., Barr, J.N., Stockley, P.G., Ranson, N.A. The Asymmetric Structure of an Icosahedral Virus Bound to Its Receptor Suggests a Mechanism for Genome Release. *Structure*, 2013, N 7, vol. 21, p. 1225–1234.
26. Derynck, R., Zhang, Y., Feng, X.-H. Smads: Transcriptional Minireview Activators of TGF-Responses. *Cell*, 1998, vol. 95, p. 737–740.
27. Van Duin, J. Single-Stranded RNA Bacteriophages. In: Calendar, R. (ed.) *The Bacteriophages*. pp. 117–167. Plenum Press, New York (1988).

28. Fearon, K., Strasser, F., Anker, S.D., Bosaeus, I., Bruera, E., Fainsinger, R.L., Jatoi, A., Loprinzi, C., Macdonald, N., Mantovani, G., Davis, M., Muscaritoli, M., Ottery, F., Radbruch, L., Ravasco, P., Walsh, D., Wilcock, A., Kaasa, S., Baracos, V.E. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncology*, 2011, vol. 12, p. 489–495.
29. Fiebiger, E., Meraner, P., Weber, E., Fang, I.-F., Stingl, G., Ploegh, H., Maurer, D. Cytokines Regulate Proteolysis in Major Histocompatibility Complex Class II-dependent Antigen Presentation by Dendritic Cells. *J. Exp. Med*, 2001, N 8, vol. 193, p. 881–892.
30. Fielding, R.A., Vellas, B., Evans, W.J., Bhasin, S., Morley, J.E., Newman, A.B., Abellan van Kan, G., Andrieu, S., Bauer, J., Breuille, D., Cederholm, T., Chandler, J., De Meynard, C., Donini, L., Harris, T., Kannt, A., Keime Guibert, F., Onder, G., Papanicolaou, D., Rolland, Y., Rooks, D., Sieber, C., Souhami, E., Verlaan, S., Zamboni, M. Sarcopenia: An Undiagnosed Condition in Older Adults. Current Consensus Definition: Prevalence, Etiology, and Consequences. International Working Group on Sarcopenia. *Journal of the American Medical Directors Association*, 2011, N 4, vol. 12, p. 249–256.
31. Frietze, K.M., Peabody, D.S., Chackerian, B. Engineering virus-like particles as vaccine platforms. *Current Opinion in Virology*, 2016, vol. 18, p. 44–49.
32. Fuenmayor, J., Gòdia, F., Cervera, L. Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnology*, 2017, vol. 39, p. 174–180.
33. Funkenstein, B., Rebhan, Y. Expression, purification, renaturation and activation of fish myostatin expressed in *Escherichia coli*: Facilitation of refolding and activity inhibition by myostatin prodomain. *Protein Expression and Purification*, 2007, N 1, vol. 54, p. 54–65.
34. Golmohammadi, R., Fridborg, K., Bundule, M., Valegård, K., Liljas, L. The crystal structure of bacteriophage Q β at 3.5 Å resolution. *Structure*, 1996, N 5, vol. 4, p. 543–554.
35. Gonzalez-Cadavid, N.F., Taylor, W.E., Yarasheski, K., Sinha-Hikim, I., Ma, K., Ezzat, S., Shen, R., Lalani, R., Asa, S., Mamita, M., Nair, G., Arver, S., Bhasin, S. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. 1998, vol. 95, p. 14938–14943.
36. Grgacic, E.V.L., Anderson, D.A. Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods*, 2006, N 1, vol. 40, p. 60–65.
37. Gupta, R., Arora, K., Roy, S.S., Joseph, A., Rastogi, R., Arora, N.M., Kundu, P.K. Platforms, advances, and technical challenges in virus-like particles-based vaccines. *Frontiers in Immunology*, 2023, vol. 14, p. 1–21.
38. Haidet, A.M., Rizo, L., Handy, C., Umapathi, P., Eagle, A., Shilling, C., Boue, D., Martin, P.T., Sahenk, Z., Mendell, J.R., Kaspar, B.K. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *PNAS*, 2008, N 11, vol. 105, p. 4318–4322.
39. Han, H.Q., Mitch, W.E. Targeting the myostatin signaling pathway to treat muscle wasting diseases. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 2011, N 4, vol. 5, p. 334–341.
40. Hittel, D.S., Berggren, J.R., Shearer, J., Boyle, K., Houmard, J.A. Increased secretion and expression of myostatin in skeletal muscle from extremely obese women. *Diabetes*, 2009, N 1, vol. 58, p. 30–38.
41. Huang, Z., Chen, X., Chen, D. Myostatin: A novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. *Cellular Signalling*, 2011, N 9, vol. 23, p. 1441–1446.

42. Jennings, G.T., Bachmann, M.F. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological Chemistry*, 2008, N 5, vol. 389, p. 521–536.
43. Kellum, E., Starr, H., Arounleut, P., Immel, D., Fulzele, S., Wenger, K., Hamrick, M.W. Myostatin (GDF-8) deficiency increases fracture callus size, Sox-5 expression, and callus bone volume. *Bone*, 2009, N 1, vol. 44, p. 17–23.
44. Kheirvari, M., Liu, H., Tumban, E. Virus-like Particle Vaccines and Platforms for Vaccine Development. *Viruses*, 2023, N 5, vol. 15, p. 1–24.
45. Kim, H.J., Jung, D.W., Williams, D.R. Age Is Just a Number: Progress and Obstacles in the Discovery of New Candidate Drugs for Sarcopenia. *Cells*, 2023, N 22, vol. 12, p. 1–26.
46. Klovins, J., Overbeek, G.P., Van Den Worm, S.H.E., Ackermann, H.-W., Van Duin, J. Nucleotide sequence of a ssRNA phage from *Acinetobacter*: kinship to coliphages. *Journal of General Virology*, 2002, vol. 83, p. 1523–1533.
47. Kostyunina, D.S., Ivanova, A.D., Smirnova, O. V. Myostatin: Twenty Years Later. *Human Physiology*, 2018, N 1, vol. 44, p. 88–101.
48. Kushnir, N., Streatfield, S.J., Yusibov, V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 2012, N 1, vol. 31, p. 58–83.
49. Lee, S.-J. Myostatin: A Skeletal Muscle Chalone. *Annual Review of Physiology*, 2023, vol. 85, p. 269–291.
50. Lee, S.J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004, vol. 20, p. 61–86.
51. Lee, S.J., Bhasin, S., Klickstein, L., Krishnan, V., Rooks, D. Challenges and Future Prospects of Targeting Myostatin/Activin A Signaling to Treat Diseases of Muscle Loss and Metabolic Dysfunction. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 2023, vol. 78, p. 32–37.
52. Lee, S.-J., McPherron, A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, N 16, vol. 98, p. 9306–9311.
53. Liekniņa, I., Kalniņš, G., Akopjana, I., Bogans, J., Šišovs, M., Jansons, J., Rumnieks, J., Tars, K. Production and characterization of novel ssRNA bacteriophage virus-like particles from metagenomic sequencing data. *Journal of Nanobiotechnology*, 2019, N 61, vol. 17.
54. Lua, L.H.L., Connors, N.K., Sainsbury, F., Chuan, Y.P., Wibowo, N., Middelberg, A.P.J. Bioengineering Virus-Like Particles as Vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, N 3, vol. 111, p. 425–440.
55. Mallidis, C., Artaza, J., Taylor, W., Gonzalez-cadavid, N., Bhasin, S., Gonzalez-Cadavid, N. Characterization of 5-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *AJP Endocrinology and Metabolism*, 2001, N 6, vol. 281, p. 1128–1136.
56. Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., Bachmann, M.F. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European Journal of Immunology*, 2008, N 5, vol. 38, p. 1404–1413.
57. McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M., Kambadur, R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *Journal of Cell Biology*, 2003, N 6, vol. 162, p. 1135–1147.

58. McPherron, A., Lawler, A.M., Lee, S.-J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, 1997, N 6628, vol. 387, p. 83–90.
59. Mcpherron, A., Lee, S.-J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Genetics Communicated by Daniel Nathans*, 1997, vol. 94, p. 12457–12461.
60. Meng, R., Xing, Z., Chang, J.Y., Yu, Z., Thongchol, J., Xiao, W., Wang, Y., Chamakura, K., Zeng, Z., Wang, F., Young, R., Zeng, L., Zhang, J. Structural basis of *Acinetobacter* type IV pili targeting by an RNA virus. *Nature Communications*, 2024, N 1, vol. 15, p. 1–9.
61. Mishra, R., Jha, R., Mishra, B., Kim, Y.S. Maternal immunization against myostatin suppresses post-hatch chicken growth. *PLoS ONE*, 2022, N 10 October, vol. 17.
62. Miura, T., Kishioka, Y., Wakamatsu, J.I., Hattori, A., Nishimura, T. Interaction between myostatin and extracellular matrix components. *Animal Science Journal*, 2010, N 1, vol. 81, p. 102–107.
63. Mohsen, M.O., Bachmann, M.F. Virus-like particle vaccinology, from bench to bedside. *Cellular and Molecular Immunology*, 2022, N 9, vol. 19, p. 993–1011.
64. Mohsen, M.O., Gomes, A.C., Vogel, M., Bachmann, M.F. Interaction of viral capsid-derived virus-like particles (VLPs) with the innate immune system. *Vaccines*, 2018, N 37, vol. 6, p. 1–12.
65. Mohsen, M.O., Zha, L., Cabral-Miranda, G., Bachmann, M.F. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminars in Immunology*, 2017, vol. 34, p. 123–132.
66. Morikawa, M., Derynck, R., Miyazono, K. TGF- β and the TGF- β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016, N 5, vol. 8, p. 1–24.
67. Ning, W., Yan, S., Song, Y., Xu, H., Zhang, J., Wang, X. Virus-like particle: a nano-platform that delivers cancer antigens to elicit an anti-tumor immune response. *Frontiers in Immunology*, 2024, vol. 15, p. 1–12.
68. Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z.S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A.J., Ahmadian, G. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, N 59, vol. 19, p. 1–27.
69. Oestreich, A.K., Carleton, S.M., Yao, X., Gentry, B.A., Raw, C.E., Brown, M., Pfeiffer, F.M., Wang, Y., Phillips, C.L. Myostatin deficiency partially rescues the bone phenotype of osteogenesis imperfecta model mice. *Osteoporosis International*, 2016, N 1, vol. 27, p. 161–170.
70. Omosule, C.L., Phillips, C.L. Deciphering Myostatin's Regulatory, Metabolic, and Developmental Influence in Skeletal Diseases. *Frontiers in Genetics*, 2021, vol. 12, p. 1–14.
71. O'Rourke, J.P., Peabody, D.S., Chackerian, B. Affinity selection of epitope-based vaccines using a bacteriophage virus-like particle platform. *Current Opinion in Virology*, 2015, vol. 11, p. 76–82.
72. Palsgaard, J., Brøns, C., Friedrichsen, M., Dominguez, H., Jensen, M., Storgaard, H., Spohr, C., Torp-Pedersen, C., Borup, R., De Meyts, P., Vaag, A. Gene Expression in Ekeletal Muscle Biopsies from People with Type 2 Diabetes and Relatives: Differential Regulation of Insulin Signaling Pathways. *PLoS ONE*, 2009, N 8, vol. 4, p. 1–12.

73. Park, J.-J., Berggren, J.R., Hulver, M.W., Houmard, J.A., Hoffman, E.P., Hoffman, E.P. GRB14, GPD1, and GDF8 as potential network collaborators in weight loss-induced improvements in insulin action in human skeletal muscle. *Physiol Genomics*, 2006, vol. 27, p. 114–121.
74. Peabody, D.S. A Viral Platform for Chemical Modification and Multivalent Display. *Journal of Nanobiotechnology*, 2003, N 5, vol. 1, p. 1–8.
75. Petermann-Rocha, F., Balntzi, V., Gray, S.R., Lara, J., Ho, F.K., Pell, J.P., Celis-Morales, C. Global prevalence of sarcopenia and severe sarcopenia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 2022, N 1, vol. 13, p. 86–99.
76. Piek, E., Heldin, C., Dijke, P. Ten Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. *The FASEB Journal*, 1999, N 15, vol. 13, p. 2105–2124.
77. Pumpens, P. *Single-Stranded RNA Phages; From Molecular Biology to Nanotechnology*. (2020).
78. Pumpens, P., Grens, E. Artificial Genes for Chimeric Virus-Like Particles. In: *Artificial DNA*. pp. 249–327. CRC Press (2002).
79. Rebeaud, F., Bachmann, M. Virus-like particles as efficient delivery platform to induce a potent immune response. *Innovation in Vaccinology: From Design, Through to Delivery and Testing*, 2012, p. 87–122.
80. Romagnoli, C., Iantomasi, T., Brandi, M.L. Available in vitro Models for Human Satellite Cells From Skeletal Muscle. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, N 24, vol. 22, p. 1–17.
81. Sadeghi, M., Keshavarz-Fathi, M., Baracos, V., Arends, J., Mahmoudi, M., Rezaei, N. Cancer cachexia: Diagnosis, assessment, and treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2018, vol. 127, p. 91–104.
82. Samant, S.A., Kanwal, A., Pillai, V.B., Bao, R., Gupta, M.P. The histone deacetylase SIRT6 blocks myostatin expression and development of muscle atrophy. *Scientific Reports*, 2017, N 1, vol. 7, p. 1–18.
83. Sartorius, R., Trovato, M., Manco, R., D'Apice, L., De Berardinis, P. Exploiting viral sensing mediated by Toll-like receptors to design innovative vaccines. *npj Vaccines*, 2021, N 127, vol. 6, p. 1–15.
84. Schiffer, M., Von Gersdorff, G., Bitzer, M., Susztak, K., Bo'ttinger, E.P., Bo'ttinger, B. Smad proteins and transforming growth factor- β signaling. *Kidney International*, 2000, vol. 58, p. 45–52.
85. Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., Braun, T., Tobin, J.F., Lee, S.-J. Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. *The New England Journal of Medicine*, 2004, N 26, vol. 350, p. 2682–2688.
86. Sharma, S., Patil, A.S. Myostatin's marvels: From muscle regulator to diverse implications in health and disease. *Cell Biochemistry and Function*, 2024, N 6, vol. 42, p. 1–13.
87. Shishovs, M., Rumnieks, J., Diebolder, C., Jaudzems, K., Andreas, L.B., Stanek, J., Kazaks, A., Kotelovica, S., Akopjana, I., Pintacuda, G., Koning, R.I., Tars, K. Structure of AP205 Coat Protein Reveals Circular Permutation in ssRNA Bacteriophages. *Journal of Molecular Biology*, 2016, N 21, vol. 428, p. 4267–4279.
88. Skripkin, E.A., Adhin, M.R., de Smit, M.H., Van Duin, J. Secondary Structure of the Central Region of Bacteriophage MS2 RNA. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 211, p. 447–463.

89. Smith, R.C., Cramer, M.S., Mitchell, P.J., Capen, A., Huber, L., Wang, R., Myers, L., Jones, B.E., Eastwood, B.J., Ballard, D., Hanson, J., Credille, K.M., Wroblewski, V.J., Lin, B.K., Heuer, J.G. Myostatin neutralization results in preservation of muscle mass and strength in preclinical models of tumor-induced muscle wasting. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2015, N 7, vol. 14, p. 1661–1670.
90. Smith, R.C., Lin, B.K. Myostatin inhibitors as therapies for muscle wasting associated with cancer and other disorders. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 2013, N 4, vol. 7, p. 352–360.
91. Stephen, S.L., Beales, L., Peyret, H., Roe, A., Stonehouse, N.J., Rowlands, D.J. Recombinant expression of tandem-HBc virus-like particles (VLPs). In: *Methods in Molecular Biology*. pp. 97–123. Humana Press Inc. (2018).
92. Suh, J., Lee, Y.S. Myostatin Inhibitors: Panacea or Predicament for Musculoskeletal Disorders? *Journal of Bone Metabolism*, 2020, N 3, vol. 27, p. 151–165.
93. Sun, X., Lian, Y., Tian, T., Cui, Z. Virus-like particle encapsulation of functional proteins: advances and applications. *Theranostics*, 2024, N 19, vol. 14, p. 7604–7622.
94. Sung, D.K., Kim, H., Park, S.E., Lee, J., Kim, J.A., Park, Y.C., Jeon, H.B., Chang, J.W., Lee, J. A New Method of Myostatin Inhibition in Mice via Oral Administration of *Lactobacillus casei* Expressing Modified Myostatin Protein, BLS-M22. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, N 16, vol. 23.
95. Tang, L., Yan, Z., Wan, Y., Wei, H., Zhang, Y. Myostatin DNA vaccine increases skeletal muscle mass and endurance in mice. *Muscle and Nerve*, 2007, N 3, vol. 36, p. 342–348.
96. Tars, K. SsRNA phages: Life cycle, structure and applications. *Biocommunication of Phages*, 2020, p. 261–292.
97. Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., Kambadur, R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, N 51, vol. 275, p. 40235–40243.
98. Tissot, A.C., Renhofa, R., Schmitz, N., Cielens, I., Meijerink, E., Ose, V., Jennings, G.T., Saudan, P., Pumpens, P., Bachmann, M.F. Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines. *PLoS ONE*, 2010, N 3, vol. 5, p. 1–8.
99. Ulrike Trendelenburg, A., Meyer, A., Rohner, D., Boyle, J., Hatakeyama, S., Glass, D.J. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, vol. 296, p. 1258–1270.
100. Wagner, K.R. The elusive promise of myostatin inhibition for muscular dystrophy. *Current Opinion in Neurology*, 2020, N 5, vol. 33, p. 621–628.
101. Wang, H., Guo, S., Gao, H., Ding, J., Li, H., Kong, X., Zhang, S., He, M., Feng, Y., Wu, W., Xu, K., Chen, Y., Zhang, H., Liu, T., Kong, X. Myostatin regulates energy homeostasis through autocrine-and paracrine-mediated microenvironment communications. *Journal of Clinical Investigation*, 2024, N 16, vol. 134, p. 1–18.
102. Welle, S., Burgess, K., Thornton, C.A., Tawil, R. Relation between extent of myostatin depletion and muscle growth in mature mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, vol. 297, p. 935–940.
103. Wetzlich, B., Nyakundi, B.B., Yang, J. Therapeutic applications and challenges in myostatin inhibition for enhanced skeletal muscle mass and functions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2024, vol. 480, p. 1535–1553.

104. White, T.A., Lebrasseur, N.K. Myostatin and sarcopenia: Opportunities and challenges - A mini-review. *Gerontology*, 2014, N 4, vol. 60, p. 289–293.
105. Wilkes, J.J., Lloyd, D.J., Gekakis, N. Loss-of-function mutation in myostatin reduces tumor necrosis factor a production and protects liver against obesity-induced insulin resistance. *Diabetes*, 2009, N 5, vol. 58, p. 1133–1143.
106. Wingfield, P.T. N-terminal methionine processing. *Current Protocols in Protein Science*, 2017, N 88, vol. 1.
107. Wolfman, N.M., Mcpherron, A.C., Pappano, W.N., Davies, M. V, Song, K., Tomkinson, K.N., Wright, J.F., Zhao, L., Sebald, S.M., Greenspan, D.S., Lee, S.-J. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *PNAS*, 2003, N 26, vol. 100, p. 15842–15846.
108. Yan, D., Wei, Y.Q., Guo, H.C., Sun, S.Q. The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, N 99, p. 10415 – 10432.
109. Yang, M., Liu, C., Jiang, N., Liu, Y., Luo, S., Li, C., Zhao, H., Han, Y., Chen, W., Li, L., Xiao, L., Sun, L. Myostatin: a potential therapeutic target for metabolic syndrome. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, N 14, vol. 1181913.
110. Yuan, S., Larsson, S.C. Epidemiology of sarcopenia: Prevalence, risk factors, and consequences. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2023, vol. 144, p. 1–9.
111. Zeltins, A. Construction and characterization of virus-like particles: A review. *Molecular Biotechnology*, 2013, N 1, vol. 53, p. 92–107.
112. Zepeda-Cervantes, J., Ramírez-Jarquín, J.O., Vaca, L. Interaction Between Virus-Like Particles (VLPs) and Pattern Recognition Receptors (PRRs) From Dendritic Cells (DCs): Toward Better Engineering of VLPs. *Frontiers in Immunology*, 2020, vol. 11.
113. Zhang, T., Yang, H., Wang, R., Xu, K., Xin, Y., Ren, G., Zhou, G., Zhang, C., Wang, L., Zhang, Z. Oral administration of myostatin-specific whole recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* vaccine increases body weight and muscle composition in mice. *Vaccine*, 2011, N 46, vol. 29, p. 8412–8416.
114. Zhao, C., Shao, Y., Lin, C., Zeng, C., Fang, H., Pan, J., Cai, D. Myostatin serum concentrations are correlated with the severity of knee osteoarthritis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2017, N 5, vol. 31, p. 1–4.
115. Zimmers, T.A., Davies, M. V, Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N., McPherron, A.C., Wolfman, N.M., Lee, S.-J. Induction of Cachexia in Mice by Systemically Administered Myostatin. *Science*, 2000, N 5572, vol. 296, p. 1486–1488.
116. Current ssRNA phage ICTV Taxonomy [tiešsaiste] – [atsauce 17.04.2025.]. Pieejams: <https://ictv.global/taxonomy>.

PIELIKUMI

Darbā izmantotie ssRNS fāgu apvalku proteīni.

Nosaukums	Raksturojums	Garums, as skaits	Molmasa, kDa	Aminoskābju sekvence
Oβ	Fāga Qβ apvalka proteīna monomērs	133	14,26	MAKLETVTLGNIKDGG KQTLVLNPRGVNPTNG VASLSQAGAVPALEKRV TVSVSQPSRNRKNYKV QVKIQNPACTANGSCD PSVTRQAYADVTFSTQ YSTDEERAFVRELAAL LASPLLDIAIDQLNPAY
APd- EFVFL	Fāga AP205 apvalka proteīna dimērs ar MSTN epitopu EFVFL cilpā	272	28,91	MANKPMQPITSTANKI VWSDPTRLSTTFASLL RQRVKVGIAELNNVSG QYVSVYKRPAPKPEGC ADACVIMPNNQSIRTV ISGSAENLATLKAEWET HKRNVDTLFASGNAGL GFLDPTAAIVSSDTTAGS GEFVFLGSGANKPMQPI TSTANKIVWSDPTRLSTT FSASLLRQRVKVGIAELN NVSGQYVSVYKRPAPKP EGCADACVIMPNNQSI RTVISGSAENLATLKAEW ETHKRNVDTLFASGNAG LGFLDPTAAIVSSDDTA
APd- NGKEQ	Fāga AP205 apvalka proteīna dimērs ar MSTN epitopu NGKEQ cilpā	272	28,83	MANKPMQPITSTANKIV WSDPTRLSTTFASLLRQ RVKVGIAELNNVSGQYV SVYKRPAPKPEGCADACV IMPNNQSIRTVISGSAEN LATLKAEWETHKRNVD TLFASGNAGLGFLDPTAA IVSSDTTAGSGNGKEQG SGANKPMQPITSTANKIV WSDPTRLSTTFASLLRQ RVKVGIAELNNVSGQYVS VYKRPAPKPEGCADACV IMPNNQSIRTVISGSAEN LATLKAEWETHKRNVD TLFASGNAGLGFLD PTAAIVSSDDTA
MDFGLD- APm	Fāga AP205 apvalka proteīna monomērs ar MSTN epitopu DFGLD N-galā	138	14,70	MDFGLDGSANKPMQPI TSTANKIVWSDPTRLSTT FSASLLRQRVKVGIAELN NVSGQYVSVYKRPAPKP EGCADACVIMPNNQSI RTVISGSAENLATLKAEW ETHKRNVDTLFASGNAG LGFLDPTAAIVSSDDTA
TEV- DFGLD- APm	Fāga AP205 apvalka proteīna monomērs ar TEV šķelšanas saiti un MSTN epitopu DFGLD N-galā	144	15,50	MENLYFQDFGLDGSANK PMQPITSTANKIVWSDPT RLSTTFASLLRQRVKVG IAELNNVSGQYVSVYKR PAPKPEGCADACVIMPNE NQSIRTVISGSAENLATLK AEWETHKRNVDTLFASGN AGLGLDPTAAIVSSDDTA

Reaģenti	Izgatavotājs (valsts)
96% etanols	Kalsnava (Latvija)
Agaroze	Thermo Fisher Scientific™ (ASV)
Agars	Difco (ASV)
Akrilamīds	Sigma-Aldrich (ASV)
Amonija persulfāts (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Amresco (ASV)
Ampicilīns	Sigma-Aldrich (ASV)
Bisakrilamīds (N,N'(1,2- dihidroksietilēn) bisakrilamīds))	Sigma-Aldrich (ASV)
Bromfenolzilais	Merck (Vācija)
<i>Coomassie Brilliant blue G250</i> (Kumasī briljantzilais)	AppliChem GmbH (Vācija)
Dinātrija fosfāts (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich (ASV)
Endo-BCN-PEG8-NHS esteris	BroadPharm (ASV)
Etiķskābe (CH ₃ COOH)	Sigma-Aldrich (ASV)
Etilēndiamīntetraetiķskābe (EDTA)	AppliChem GmbH (Vācija)
Etīdija bromīds (EtBr)	AppliChem GmbH (Vācija)
Fenilmetilsulfonilfluorīds (PMSF)	Sigma-Aldrich (ASV)
Fetālais liellopu serums (FBS)	Merck (Vācija)
Fosfāta-citrāta buferšķīduma tabletes	Sigma-Aldrich (ASV)
Glicerīns (C ₃ H ₈ O ₃)	AppliChem GmbH (Vācija)
Izopropil-β-d-1-tiogalaktopiranozīds (IPTG)	Sigma-Aldrich (ASV)
Kanamicīns (<i>Streptomyces kanamyceticus</i>)	Sigma-Aldrich (Kīna)
Kālija dihidrogēnfosfāts (KH ₂ PO ₄)	AppliChem GmbH (Vācija)
Liellopu seruma albumīns (BSA)	Sigma-Aldrich (ASV)
N,N,N',N'-tetrametiletilēndiamīns (TEMED)	AppliChem GmbH (Vācija)
Nātrija dodecilsulfāts (SDS)	Sigma-Aldrich (ASV)
Nātrija hidroģēnkarbonāts (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich (ASV)
Nātrija hlorīds (NaCl)	AppliChem GmbH (Vācija)
Nātrija karbonāts (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich (ASV)
o-fenilēndiamīna dihidrohlorīda substrāts	Thermo Fisher Scientific™ (ASV)
Penicilīns-Streptomicīns (PenStrep)	Thermo Fisher Scientific™ (ASV)
Peptons	Sigma-Aldrich (Francija)
Rauga ekstrakts	Sigma-Aldrich (ASV)
Sālsskābe (HCl)	RK Chem (Latvija)
Sērskābe (H ₂ SO ₄)	Reahim, (PSRS)
Tetrazīna-PEG5-NHS esteris	Sigma-Aldrich (ASV)
Trihloretiķskābe (TCA)	AppliChem GmbH (Vācija)
Tris (tris(hidroksimetil)aminometāns)	AppliChem GmbH (Vācija)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (ASV)
Tween-20	Prolabo (Beļģija)
Uznesšanas krāsa <i>6X Loading Dye</i>	Thermo Fisher Scientific™ (ASV)
Ūdeņraža peroksīds (H ₂ O ₂) (30% šķīdums)	Chempur (Polija)
β-merkaptotetanols	Prolabo (Beļģija)

Materiālu grupa	Raksturojums (ražotājs)
Adjuvants	<i>AddaVax</i> , adjuvants vakcīnu formulēšanai (InvivoGen SAS)
Antivielas	Poliklonālās trušu anti-peļu IgG antivielas - ELISA testos netiešai mērķa proteīna noteikšanai (Sigma-Aldrich)
	Monoklonālās anti-MSTN antivielas Landogrozumab – MSTN inhibīcijas kontrolei luciferāzes reportiera testos (MedChemExpress)
Atsāļošanas kolonnas	<i>Zeba™ Spin Desalting Columns</i> ; 0,5 ml (Thermo Fisher Scientific™)
Automātiskās regulējamās pipetes	2,5 µl; 10 µl; 100 µl; 200 µl; 10 ml (Eppendorf AG)
Automātisko pipešu uzgaļi	10 µl; 250 µl; 1000 µl; 10 ml (SARSTEDT AG & Co. KG)
Baktēriju celmi	<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue (BMC laboratorijas kolekcija)
	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) (BMC laboratorijas kolekcija)
Centrifūgas mēģenes	15 ml; 50 ml (SARSTEDT AG & Co. KG)
Centrifugēšanas filtri proteīnu iekonzentrēšanai	<i>Amicon Ultra 100 kDa MWCO</i> (Millipore)
Dialīzes komplekts	<i>Float-A-Lyzer G2</i> , caurlaidība savienojumiem 1000 kDa, tilpums 1 ml (Sigma-Aldrich)
Elektronmikroskopijas sietiņi	Mesh 200 un 300 (Sigma-Aldrich)
Filtri sterilai filtrēšanai	Filtropur S 0,2; 0,45 µm (SARSTEDT AG & Co. KG)
Flaski	Zīdītāju šūnu kultivēšanai (SARSTEDT AG & Co. KG)
Hromatogrāfijas kolonnas	Gēlfiltrācijas: <i>Sepharose 4FF</i> (30 ml) (Omnifit labware, Diba Industries Inc.)
	Jonapmaiņa: <i>DEAE Fractogel (M)</i> (5 ml) (Omnifit labware, Diba Industries Inc.)
Luciferāzes testa sistēma	Reaģentu komplekts <i>Luciferase Assay System</i> luciferāzes reportiera testam (Promega)
Marķieri	<i>GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder</i> (Thermo Fisher Scientific™)
	<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i> (PMW) (Thermo Fisher Scientific™)

Materiālu grupa	Raksturojums (ražotājs)
Mikromēģenes	PCR mikromēģenes 0,2 ml (Eppendorf AG)
	1,5 ml (Eppendorf AG)
	3,5 ml (hromatogrāfijas) (SARSTEDT AG & Co. KG)
Mikrotitrēšanas plates	EIA/RIA ELISA 96 bedrītes (Corning Life Sciences)
Miostatīns	Rekombinants cilvēku/peļu/žurku GDF-8/Miostatīns (R&D Systems)
Plazmīdas	Luciferāzes reportieris: (CAGA) ₁₂ -pGL3-Basic. Ampicilīna rezistence (BioCat GmbH)
	AP205d-EFVFL inserts pETDuet-1. Ampicilīna rezistence (BioCat GmbH)
	AP205d-NGKEQ inserts pETDuet-1. Ampicilīna rezistence (BioCat GmbH)
	MDFGLD-AP205m inserts pRSFDuet-1. Kanamicīna rezistence (BioCat GmbH)
	TEV-DFGLD-AP205m inserts pRSFDuet-1. Kanamicīna rezistence (BioCat GmbH)
	pRK793 (TEV proteāzes ekspresijai BL21 (DE3) šūnās). Ampicilīna rezistence (AddGene).
Plazmīdu izdalīšanas komplekts	<i>GeneJET Plasmid Miniprep Kit</i> reaģentu komplekts plazmīdu izdalīšanai (Thermo Fisher Scientific™)
Seroloģiskās pipetes	5; 10; 25 ml (SARSTEDT AG & Co. KG)
Skalpeļi	Sterili, vienreizlietojami (GIMA)
Stikla trauki	Erlenmejera kolbas, mēģenes, mērcilindri, vārglāzes (RASOTHERM®)
Šļircēs	Plastmasas – 5 ml; 10 ml; 25 ml (Becton Dickinson)
Transfekcijas reaģents	<i>TurboFect™</i> (Thermo Fisher Scientific™)
Zīdītāju šūnas	A-204 šūnu līnija (cilvēka rabdomiosarkomas šūnas) (BMC laboratorijas kolekcija)
Zīdītāju šūnu kultūru plates	<i>Greiner Bio-One</i> polisterēna 6 un 96-bedrīšu adherento šūnu plates (Thermo Fisher Scientific)
	<i>Lumox® multiwell</i> 96 bedrīšu plates (SARSTEDT AG & Co. KG)

Darbā izmantotā aparātūra un iekārtas.

Aparātūra	Modelis	Izgatavotājs (valsts)
Augstas izšķirtspējas proteīnu šķīduma hromatogrāfijas sistēma	ÄKTA pure	GE Healthcare, ASV
Centrifūgas	Centrifuge 5424	Eppendorf AG (Vācija)
	Centrifuge 5418 R	Eppendorf AG (Vācija)
	Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG (Vācija)
Elektroforēzes barošanas bloks	MP-250V	Cleaver Scientific Ltd (Apvienotā Karaliste)
	EPS 600	Pharmacia (Zviedrija)
Elektroforēzes iekārta	OmniPAGE mini	Cleaver Scientific Ltd (Apvienotā Karaliste)
Elektronmikroskops	JEM-1230, 100 kV	Jeol (Japāna)
Kratītāji	Orbitālais kratītājs PSU-10i	BIOSAN (Latvija)
	Kratītājs mikroorganismu inkubācijai (grīdas) Multitron	INFORS HT (Šveice)
Laminārs	KR-130 BW MSC CL-II En124469	Kojair (Somija)
Magnētiskais maisītājs	Bio Magnetic Stirrer MMS3000N	Biosan (Latvija)
Mikroskops	AE31E; Trinokulārs, invertēts, ar LED fluorescenci	Motic (Vācija)
Miniatūra galda centrifūga/vortekss Mikrospin	FV-2400	BIOSAN (Latvija)
pH metrs	AM1605	Adrona (Latvija)
Plašu lasītāji	BDSL Immunoskan MS 355	Labsystems (Somija)
	Victor 3V	Perkin Elmer (ASV)
Spektrofotometri	NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific™ (ASV)
	Cφ-26X JI42	(Krievija)
Svari	Elektroniskie KERN EG 420-3NM	KERN & SOHN GmbH (Vācija)
	Elektroniskie KERN EMB200-2	KERN & SOHN GmbH (Vācija)
	Analītiskie KERN ADB 100-4	KERN & SOHN GmbH (Vācija)
Termostati	Sausā bloka termostats TDB-120	BIOSAN (Latvija)
	Echotherm IN55 Programmable Chilling/Heating Incubator	Torrey Pines Scientific, Inc. (ASV)
	Ūdens termostats W1	MLW (Ukraina)
	CO2 inkubators MCO-18AC-PE	Panasonic (Japāna)
Ultraskaņas dezintegrators	Ultrasonic Processor UP200S	Hielscher – Ultrasound Technology (Vācija)
UV gaismas transiluminātors	2011 Macrovue Transilluminator	LKB (Austrija)

Darbā izmantotās mikrobioloģiskās un zīdītāju šūnu kultūru barotnes.

Barotne	Barotnes sastāvs (uz 1 l)
LB (<i>Luria – Bertani</i>) šķidrā barotne	10 g peptons; 5 g rauga ekstrakts; 10 g NaCl; dH ₂ O līdz 1 litram.
2TY (peptona rauga ekstrakta) šķidrā barotne	16 g peptons; 10 g rauga ekstrakts; 5 g NaCl; dH ₂ O līdz 1 litram.
LB agarizētā barotne	15 g agars; 10 g peptons; 5 g rauga ekstrakts; 10 g NaCl; dH ₂ O līdz 1 litram.
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Zagle Medium</i>)	DMEM (Thermo Fisher Scientific™) 4 mM L-glutamīns; 1% penicilīns-streptomicīns; 10% FBS.
Opti-MEM	Reducēta seruma barotne (Thermo Fisher Scientific™)

Pielietojums	Šķīdums	Receptūra
<i>E. coli</i> šūnu audzēšana un inducēšana	Ampicilīna šķīdums (50 mg/l)	- 0,5 mg ampicilīns; - 10 ml dH ₂ O.
	Kanamīcīna šķīdums (30 mg/l)	- 0,3 mg kanamīcīns; - 10 ml dH ₂ O.
	1M IPTG	- 2,38 g IPTG; - dH ₂ O līdz 10 ml.
<i>E. coli</i> šūnu lizēšana	Lizēšanas buferšķīdums	- 50 mM Tris-HCl (pH = 8,0); - 150 mM NaCl; - 0,1% Triton X-100.
Elektroforēze agarozes gelā	1X TAE buferšķīdums	50X TAE (1 litrs): - 242 g Tris; - 57,1 ml HCl (konc.) (līdz pH = 8,0); - 100 ml 0,5 M EDTA (pH = 8,0); - dH ₂ O līdz 1 litram. 1X TAE (1 litrs): - 20 ml 50X TAE; - dH ₂ O līdz 1 litram.
	1% agarozes gels	- 1 g agaroze; - 99 ml 1X TAE buferšķīdums; - 5 µl etīdija bromīda šķīdums (10 mg/ml).
Elektroforēze poliakrilamīda gelā	SDS-PAGE darba buferšķīdums	- 250 mM Tris; - 1,9 M glicīns; - 35 mM SDS.
	Laemmli šķīdums	- 0,125 M Tris – HCl (pH = 6,8); - 4% SDS; - 10% β-merkaptoetanolis; - 20% glicerīns; - 0,05% bromfenolzilaiss.
ELISA imūnsorbēcija	0,05% Tween-20 PBS (PBST)	- 25 µl Tween-20; - 1X PBS līdz 500 ml.
	1% BSA	- 1 g BSA; - 100 ml 1X PBS.
	2 N H ₂ SO ₄	- 5 g konc. H ₂ SO ₄ ; - dH ₂ O līdz 50 ml.
	Fosfāta-citrāta buferšķīdums	- 1 fosfāta-citrāta buferšķīduma tablete; - 100 ml dH ₂ O.
	Karbonātu buferšķīdums (pH=9,5)	10X karbonātu buferšķīdums (pH=9,5): - 5,3 g Na ₂ CO ₃ - 4,2 g NaHCO ₃ - dH ₂ O līdz 100 ml. Koriģē pH ar nepieciešamo sāli.
	o-fenilēndiamīna dihidrohlorīda substrāts	- 1 fenilēndiamīna dihidrohlorīda substrāta tablete; - 10 ml dH ₂ O
	1X PBS	1X PBS: - 137 mM NaCl - 2,7 mM KCl - 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ - 1,47 mM KH ₂ PO ₄

Pielietojums	Šķīdums	Receptūra
Hromatogrāfija (lieluma izslēgšanas)	Proteīnu buferšķīdums	- 1X PBS
Hromatogrāfija (jonapmaiņas)	Buferšķīdumi sāls gradienta veidošanai	- 1X PBS; - 1X PBS ar 1 M NaCl.
	Šķīdums kolonnas tīrīšanai	- 0,5 M NaOH
	Šķīdums kolonnas līdzsvarošanai	0,5 M fosfātu buferšķīdums (pH 7,2-7,3): - 4,49 g NaH ₂ PO ₄ ; - 13,57 g Na ₂ HPO ₄ ; - dH ₂ O līdz 250 mL
Poliakrilamīda gela pagatavošana	1,5 M Tris – HCl (pH = 8,8) buferšķīdums	- 181,7 g Tris; - dH ₂ O līdz 1 litram; - ar HCl (konc.) paaugstina pH līdz 8,8.
	30% akrilamīda un bisakrilamīda šķīdums	- 72,75 g akrilamīds; - 2,25 g bisakrilamīds; - dH ₂ O līdz 250 ml.
	10% SDS	- 10 g SDS; - dH ₂ O līdz 100 ml.
	10% amonija persulfāta šķīdums (APS)	- 1 g amonija persulfāts; - dH ₂ O līdz 10 ml.
	Sadalotais gels (15%) (2 geli)	- 2,8 ml dH ₂ O; - 3 ml 1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8); - 6 ml 30% akrilamīda un bisakrilamīda šķīdums; - 120 µl 10% SDS; - 90 µl 10% APS; - 15 µl TEMED.
	Koncentrējošais gels (2 geli)	- 3 ml koncentrējošā gela maisījuma; - 17 µl 10% APS; - 3 µl TEMED.
	Koncentrējošā gela maisījums (4%)	- 60,08 ml dH ₂ O; - 13,3 ml 30% akrilamīda šķīduma - 25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8); - 1 ml 10% SDS
Poliakrilamīda krāsošana un atkrāsošana	Fiksēšanas šķīdums	- 600 ml dH ₂ O; - 100 ml etiķskābe; - 300 ml 96% etanols.
	Coomassie briljanzilā krāsvielu poliakrilamīda gela krāsošanai	- 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G250; - 8 ml 50% TCA; - 12 ml 96% etanols; - dH ₂ O līdz 200 ml.
Proteīnu sākotnējā attīrīšana	Piesātināta amonija sulfāta šķīdums	- 550 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ; - dH ₂ O līdz 1 litram.
	Ekstrakcijas buferšķīdums	- 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); - 150 mM NaCl; - 0,5 M urīnviela; - 1 mM PMSF; - 0,1% Tween-20.



Pārtikas un veterinārais dienests

Peldu iela 30, Rīga, LV-1050, tālr. 67095230, fakss 67322727, e-pasts pvd@pvd.gov.lv, www.pvd.gov.lv
Rīgā

IZMĒĢINĀJUMA PROJEKTA ATĻAUJA Nr. 136/2022

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs, Nr. 025413

Atļaujas saņēmējs: izmēģinājuma dzīvnieku lietotājs (nosaukums, PVD reģistra Nr.)

Jaunu vakcīnu modeļu imūnās atbildes pārbaude laboratorijas pelēs

Izmēģinājuma projekta/procedūras nosaukums

Dace Skrastiņa

Par projektu atbildīgā persona

Dace Skrastiņa, atļauja Nr.9

Par izmēģinājuma projekta īstenošanu un par izmēģinājuma projekta atbilstību izsniegtajai atļaujai atbildīgā persona, PVD atļaujas Nr.

Izmēģinājuma projekta norises vieta

Rātsupītes iela 1, Rīga, LV-1067

faktiskā adrese

Īpašie nosacījumi:

līdz 2027. gada 25. decembrim iesniegt PVD 2022. gada 25. novembra lēmumā 11/22/2.7-23.3 pieprasīto informāciju projekta retrospektīvajai izvērtēšanai.

Par jebkurām procedūrās ieviestām izmaiņām nekavējoties ziņot PVD!

Retrospektīvā izvērtēšana u.c.

Atļaujas darbības laiks no 25.11.2022. līdz 25.11.2027.

Atļaujas izsniegšanas datums: 25.11.2022.

Pārtikas un veterinārā
dienesta ģenerāldirektors

M.Balodis

ŠIS DOKUMENTS IR PARAKSTĪTS AR DROŠU
ELEKTRONISKO PARAKSTU UN SATUR LAIKA ZĪMOGU

ED-2 (1no 1) 02.versija

Apliecinājums par dalību konferencē.

2025. gada 14. februārī Anna Kozlova piedalījās apvienotajā Latvijas Bioķīmijas biedrības un 83. Latvijas Universitātes starptautiskās zinātniskās konferences molekulārās bioloģijas sekcijas sēdē ar prezentāciju “Anti-miostatīna vakcīnas prototipa izstrāde uz ssRNS bakteriofāgu vīrusveidīgo daļiņu tehnoloģijas bāzes”, kurā izklāstīti maģistra darbā aprakstītie rezultāti. Apliecinājums pievienots saīsinātas konferences programmas formā.

Molekulārās bioloģijas sekcijas un Latvijas Bioķīmijas biedrības 8. konferences sēde



Molekulārās bioloģijas sekcijas un Latvijas Bioķīmijas biedrības 8. konferences sēde / Thursday, February 13, 2025
Scientific Program

16.15-16.30 Āķas genomā CAST gēna ar barības efektivitāti saistīto variāciju un ekspresijas analīze Latvijā audzētās aitu šķirnēs. I. Traipiņa1, S. Plaviņa1, D. Malakovska1, N. Krasņevska1, J. Paramonovs1, D. Kairiša2,3, N. Paramonova1. 1 – LU Medicīnas un Biozinātnu fakultāte; 2 - LU Agrobiotehnoloģijas institūts; 3 - Latvijas aitu audzētāju asociācija.

16.30-16.45 Anti-miostatīna vakcīnas prototipa izstrāde uz ssRNS bakteriofāgu vīrusveidīgo daļiņu tehnoloģijas bāzes. Anna Kozlova, Ilva Liekniņa, Gints Kalniņš, Dace Skrastiņa, Ramona Petrovska, Kaspars Tārs

Friday, February 14, 2025 - Friday, February 14, 2025

Scientific Program

Molekulārās bioloģijas sekcijas un Latvijas Bioķīmijas biedrības 8. konferences sēde /
Scientific Program

Thursday, February 13, 2025

Page 4