

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA ZAGORC

DIPLOMSKA NALOGA

UN KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA ZAGORC

PROUČEVANJE IZRAŽANJA RECEPTORJEV ZA TRANSFERIN IN  
EPIDERMALNI RASTNI DEJAVNIK V ČLOVEŠKIH KERATINOCITIH

STUDY OF TRANSFERRIN AND EPIDERMAL GROWTH FACTOR  
RECEPTOR EXPRESSION IN HUMAN KERATINOCYTES

UN KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo (Katedra za farmacevtsko biologijo) pod mentorstvomizr. prof. dr. Mojce Lunder in asist. dr. Mihe Vodnika. Spektroskopske meritve, mikroskopijo in druga merjenja sem opravila v laboratorijih Fakultete za farmacijo.

Zahvaljujem se mentoriciizr. prof. dr. Mojci Lunder in asist. dr. Mihi Vodniku za strokovno pomoč, trud in nasvete, ki sem jih dobila v času izdelave diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo za pomoč in prijaznost pri delu v laboratoriju.

Iskreno se zahvaljujem staršem, ki so me ves čas študija podpirali in mi stali ob strani. Zahvaljujem se tudi prijateljem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku te diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Mojce Lunder.

Maruša Zagorc

## VSEBINA

1	UVOD.....	8
1.1	Luskavica.....	8
1.1.1	Mehanizem nastanka luskavice.....	9
1.1.2	Zdravljenje.....	10
1.1.2.1	Lokalno zdravljenje.....	10
1.1.2.2	Sistemsko zdravljenje.....	11
1.1.2.3	Nove možnosti zdravljenja.....	11
1.2	Ciljana dostava učinkovin v celice z receptorsko endocitozo.....	12
1.2.1	Receptorska endocitoza.....	12
1.2.2	Receptor za epidermalni rastni dejavnik.....	12
1.2.3	Dostava učinkovin preko receptorja za epidermalni rastni dejavnik.....	13
1.2.4	Receptor za transferin.....	14
1.2.5	Dostava učinkovin preko receptorja za transferin.....	15
1.2.6	Bakteriofagi kot dostavni sistem.....	16
2	NAMEN DELA.....	17
3	MATERIALI IN METODE.....	18
3.1	Gojenje celične linije HaCaT.....	18
3.2	Izolacija RNA.....	19
3.3	Reverzna transkripcija mRNA v cDNA.....	20
3.4	RT-PCR.....	20
3.5	Agarozna gelska elektroforeza.....	22
3.6	Pomnoževanje bakteriofagov.....	23
3.7	Določanje koncentracije bakteriofagov z mikrobiološko titracijo.....	24
3.8	Določanje vezave bakteriofagov na površino in njihovega prehoda v celice.....	25
3.9	Določanje prehajanja bakteriofagov v celice pri visoki in nizki gostoti.....	28
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	30
4.1	Izražanje TfR in EGFR v keratinocitih.....	30
4.1.1	Izolacija RNA.....	30
4.1.2	Reverzna transkripcija.....	31
4.1.3	Verižna reakcija s polimerazo in agarozna gelska elektroforeza.....	31
4.2	Internalizacija nitastih bakteriofagov s prikazanimi peptidi z afiniteto do TfR... ..	34
4.2.1	Priprava bakteriofagov in mikrobiološka titracija.....	34
4.2.2	Vezava bakteriofagov na površino in prehod v celice.....	35
4.3	Določanje prehajanja bakteriofagov v celice pri visoki in nizki gostoti.....	38

5	SKLEP.....	40
6	VIRI.....	41

## KAZALO SLIK

Slika 1: Vezava EGF na EGFR .	13
Slika 2: Celični privzem železa vezanega na Tf	15
Slika 3: Postopek določanja vezave bakteriofagov na površino in njihovega prehoda v celice.	27
Slika 4: Postopek določanje prehoda bakteriofagov v celice pri nizki in visoki gostoti. ....	29
Slika 5: Absorpcijski spekter izolirane celokupne RNA izmerjen s spektrofotometrom NanoDrop ND1000.	31
Slika 6: Izražanje receptorja za Tfr.....	32
Slika 7: Izražanje receptorja za EGFR. ....	33
Slika 8: Koncentracija vezanih bakteriofagov na površini celic in koncentracija bakteriofagov v celicah.....	36
Slika 9: Vrednosti izmerjenih absorbanc za posamezne vzorce bakteriofagov.....	37
Slika 10: Koncentracija bakteriofagov pri nizki in visoki gostoti celic HaCaT.....	39

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Peptidi predstavljeni na površini bakteriofagov.....	16
Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi za PCR.....	21
Preglednica III: Priprava vzorcev za nanos na elektroforezo. ....	22
Preglednica IV: Število modro obarvanih plakov na agarjem gojišču LB/IPTG/X-gal pri posamezni redčitvi in izračunana koncentracija bakteriofagov po pomnoževanju in izolaciji. ....	34
Preglednica V: Koncentracija bakteriofagov v eluatih kislega spiranja (pokazatelj vezave na površino celic) in lizatih celic (pokazatelj prehoda v celico). ....	35
Preglednica VI: Ponovno določanje koncentracije zaloge bakteriofagov TUP in T12. ....	38
Preglednica VII: Število bakteriofagov pri nizki in visoki gostoti HaCaT celic.....	39

## POVZETEK

Luskavica ali *psoriasis vulgaris* je kronična vnetna bolezen kože. Klinično se izraža v odebeljenih roženih lezijah, ki so srebrno-bele z značilnimi luskami. Običajno luskavica ni življenjsko ogrožajoča, vendar ima številne negativne vplive na pacienta in kvaliteto življenja. Za zdravljenje je na voljo veliko učinkovin, vendar vse zdravijo le simptome in ne vzroka bolezni. Blago luskavico lahko zdravimo topikalno, medtem ko hujše oblike zdravimo sistemsko.

Poleg novih učinkovin je pomemben tudi razvoj sistemov za ciljno dostavo teh učinkovin v tarčne celice. Velik potencial ima ciljana dostava učinkovin v celico preko receptorjev. Pri tem izkoriščamo interakcije ligandov z receptorji na površini celic, ki aktivirajo proces receptorske endocitoze. V diplomski nalogi smo raziskali, ali so na celični liniji človeških keratinocitov HaCaT prisotni receptorji za epidermalni rastni dejavnik in transferin. Z uporabo verižne reakcije s polimerazo in agarozno elektroforezo smo potrdili, da omenjene celice na svoji površini izražajo receptorja za transferin in epidermalni rastni dejavnik. Poznavanje izražanja receptorjev za epidermalni rastni dejavnik in transferin je pomembno za razvoj dostavnega sistema. Namen je namreč, da bi preko omenjenih receptorjev v celice vnesli gen za zmanjšanje vnetja pri luskavici (gensko zdravljenje). Kot dostavni sistem lahko uporabimo bakteriofage. Proučevali smo šest klonov bakteriofagov (TUP, T12, C34, M2, L4 in NL8). Bakteriofagne klone smo pomnožili v bakterijah *E. coli* ER2738. Po inkubaciji v celičnem inkubatorju smo glede na število prešteti kolonij ugotovili, da bakteriofag TUP najbolje prehaja v celice, saj je bilo število vezanih bakteriofagov na površino tukaj najnižje. Bakteriofag NL8, ki ima najnižno afiniteto do celic, smo izbrali za negativno kontrolo. Proučevali smo tudi, kako število celic vpliva na vezavo bakteriofagov. Izkazalo se je, da gostota celic ne vpliva na prehod TUP in NL8, medtem ko močno vpliva na prehod T12.

Da bi razvili celoten postopek za uspešno zdravljenje luskavice s pomočjo bakteriofagov kot dostavni sistem, je potrebno še kar nekaj študij. Ugotoviti bi bilo potrebno, na kakšen način bi želene gene za zmanjšanje vnetja dostavili na tarčno mesto. Ugotovitve, do katerih smo prišli, lahko pomagajo v začetnih korakih kompleksnega procesa.

## **ABSTRACT**

Psoriasis or psoriasis vulgaris is a chronic inflammatory disease of the skin. Clinically, it is expressed in thickened stratum lesions which are silver-white with characteristic scales. Usually, psoriasis is not life-threatening, but it has many negative effects on the patient and their quality of life. There are many active substances available for the treatment. However, all of them treat only the symptoms and not the cause of the disease. Mild psoriasis can be treated topically, while severe forms are treated systemically.

In addition to the new substances, it is also important to develop systems for targeted delivery of these active ingredients into the target cells. Targeted delivery of active substances into the cell via receptors has significant potential. In the process we exploit the interaction of ligands with receptors on the surface of cells, which activate the process of receptor-mediated endocytosis. In the thesis we investigated whether receptors for epidermal growth factor and transferrin are present on the cell line of human keratinocytes HaCaT. By using the polymerase chain reaction, and agarose electrophoresis we confirmed that said cells express the receptors for transferrin and epidermal growth factor on their surface. Knowledge of the expression of receptors for the epidermal growth factor and transferrin is important for the development of the delivery system. The aim is to enter the gene to reduce the inflammation associated with psoriasis into the cells through said receptors (gene therapy). Bacteriophages can be used as the delivery system. We studied six clones of bacteriophages (TUP, T12, C34, M2, L4 and NL8). Bacteriophage clones were multiplied in the *E. coli* ER2738 bacteria. After incubation in the cell incubator, we established that, based on the number of colonies counted, bacteriophage TUP passes best into the cells, as the number of bacteriophages attached to the surface was the lowest here. Bacteriophage NL8, which has the lowest affinity to cells, was selected for the negative control. We also studied how the number of cells affects the binding of bacteriophages. It has been shown that cell density does not affect the passage of TUP and NL8, while it has a significant impact on the transition of T12.

Further studies are needed in order to develop the entire process for the successful treatment of psoriasis using a bacteriophage as a delivery system. It would be necessary to establish in what way the desired genes to reduce inflammation could be delivered to the target site. Our findings can help in the early stages of the complex process.

## SEZNAM OKRAJŠAV

AP2	adaptorski protein 2
bp	bazni pari
cDNA	komplementarna DNA
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EGF	epidermalni rastni dejavnik
EGFR	receptor za epidermalni rastni dejavnik
HaCaT	nesmrtna celična linija človeških keratinocitov
kDa	kilo Dalton
LDL	lipoprotein z nizko gostoto
mRNA	informacijska RNA
PBS	phosphate buffered saline
PCR	verižna reakcija s polimerazo
pfu	plaque-forming unit
RNA	ribonukleinska kislina
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
Tf	transferin
Tfr	receptor za transferin
TMB	tetrametilbenzidin
TNF $\alpha$	dejavnik tumorske nekroze alfa



# 1 UVOD

## 1.1 Luskavica

Luskavica ali *psoriasis vulgaris* je kronična vnetna bolezen kože (1). Klinično se izraža v obliki odebeljenih roženih lezij, ki so srebrno-bele z značilnimi luskami. Pogojena je s številnimi genetskimi in imunološkimi dejavniki. Lezije se najpogosteje pojavijo na komolcih, kolenih, lasišču in področju križa. Prizadenejo pa lahko tudi druge površine kože. Lezije so praviloma ostro ločene od okolne kože, njihovo področje je odebeljeno in s hrapavo površino. Pod njimi poteka proces vnetja (2). V določenih primerih lahko tudi bolijo, srbijo ali krvavijo (3). Pogosto pride do krvavenja, če luske mehansko odstranimo (2). Značilne so vidne lokalne spremembe v žilju in hiperkeratoza povrhnjice. V zdravi koži se keratinociti diferencirajo v zrnati plasti in v roženi plasti postanejo brezjedrni korneociti, medtem ko pri luskavici ves čas ohranijo celično jedro. Pri tem se čas celične delitve skrajša iz 457 na 37 ur, čas potovanja celic od bazalne plasti v roženo plast pa skrajša iz 28 na 4-7 dni (2). Lahko se pojavi pred štiridesetim letom starosti (tip I) ali po štiridesetem letu starosti (tip II) (1). Tip I se pojavlja v več kot 75% primerov. Pri bolnikih s tem tipom je pogosta pozitivna družinska anamneza in so bolj dovzetni za ostale bolezni kot bolniki s tipom II. Prav tako je bilo dokazano, da se tip I pogosteje pojavlja pri ljudeh z levkocitnim antigenom (HLA)-Cw6. Bolezen se najpogosteje prvič pojavi med 15-20 letom starosti in 55-60 letom starosti (4). Pri 6-42% bolnikov z luskavico se lahko pojavi psoriazni artritis (PsA) (1). Psoriazni artritis je kronična vnetna artropatija. Običajno se razvije z merna oblika, ki pa lahko vodi v destruktivni artritis, pri katerem vnetni proces povzroči tudi razgradnjo kosti (5). Luskavica je tudi dejavnik tveganja za razvoj srčnožilnih bolezni, hipertenzije, diabetesa, debelosti in hiperlipidemije (1).

Luskavica prizadene okoli 2% ljudi, v 5-8% lahko prizadene tudi sklepe (psoriazni artritis). Najpogosteje se luskavica pojavlja v Severni Evropi, kjer prizadene do 3% celotne populacije, na Japonskem pa samo do 0,2%. Najmanj pogosto se pojavlja pri Eskimih in Indijancih, kjer je skoraj ni (6).

Običajno luskavica ni življenjsko ogrožajoča, vendar ima številne negativne vplive na pacienta in kvaliteto življenja (4). Klinično jo razvrstimo v tri skupine. Pri blagi obliki plaki prekrivajo manj kot 3% telesne površine, srednji 3-10 % in pri hudi obliki več kot 10 % telesne površine. Če se luskavica pojavi na vidnih mestih, kot so obraz, roke ali lasišče,

ima ta večji vpliv na kvaliteto življenja obolelega. Vpliva lahko tudi na funkcijske zmožnosti, če se pojavi na mestih, kot so dlani, podplati in genitalni predeli (7).

### **1.1.1 Mehanizem nastanka luskavice**

Poznamo 8 različnih za luskavico dovzetnih genskih lokusov (PSORS1-8). Ti se nahajajo na 15 različnih kromosomih. Najpomembnejši je PSORSI-1, ki prispeva okoli 15-30 % genskega prispevka. Nahaja se na kromosomu 6 na lokusu 6p21.3 (8). Na pojav bolezni vplivajo tudi dejavniki iz okolja, kot so akutne infekcije, kemijske poškodbe, UV žarki, stres, kajenje, alkoholizem in drugi.

Vidne spremembe so posledica imunskih procesov na lokalni ravni. Patološki proces sprožijo različni antigeni, ki aktivirajo antigen predstavitvene celice, Langerhansove in dendritične celice v koži. Te celice nato migrirajo v regionalne bezgavke, kjer interagirajo z limfociti T. Celice T sodelujejo v tem procesu z receptorji, kot je na primer receptor limfocitov T (TCR) in drugimi molekulami (CD4, CD8, CD3, CD28). Aktivirajo se tisti kloni limfocitov T, ki imajo dovolj veliko afiniteto do predstavljenega antigena. Ti kloni se nato delijo in difundirajo v obtok. Za luskavico je značilno povečano izločanje citokinov, kot so interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), interlevkin-12 (IL-12) in interlevkin-23 (IL-23). Posledično limfociti začnejo izločati vnetne mediatorje IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  in IL-2. Aktivirane antigen predstavitvene celice izločajo citokina IL-1 in TNF- $\alpha$ , ki povzročata lokalno izražanje adhezijskih molekul (ICAM-1) na endotelijskih celicah in keratinocitih. Glavna naloga teh molekul je usmerjanje aktiviranih limfocitov T v področje vnetja. V lezijah so prisotne tudi spominske efektorske celice T. Interlevkini, ki jih izločajo limfociti T, spodbudijo izražanje dodatnih mediatorjev vnetja, kar privede do podaljšanja vnetnega procesa pri luskavici (9).

Th17 celice in CD4+CD25+ regulatorne T celice ( $T_{reg}$ ) imajo pomembno vlogo v patogenezi luskavice, pri čemer je povezava med obema tipoma celic nepojasnjena. Ugotovili so povišanje Th17 celic v periferni cirkulaciji ter lezijah kožnih tkiv. Prav tako naj bi bile pri obolelih povišane vrednosti seruma IL-17 in IL-17 sekretornih limfocitov v primerjavi z zdravimi posamezniki. Razumevanje povezave med Th17 celicami in  $T_{reg}$  celicami bi lahko imelo velik vpliv pri zdravljenju (10).

## **1.1.2 Zdravljenje**

Raznolikost v klinični sliki luskavice pri posameznikih je vzrok, da zdravljenje prilagodimo posameznemu pacientu (7). Pri tem upoštevamo naravo, obsežnost bolezni, lokacijo kožnih sprememb, sprožitveni dejavnik, učinek predhodnega zdravljenja in ekonomske dejavnike. Za zdravljenje je na voljo veliko učinkovin, vendar vse zdravijo le simptome in ne vzroka bolezni (11). Blago luskavico lahko zdravimo lokalno (topikalno), medtem ko hujše oblike zdravimo sistemsko (7).

### **1.1.2.1 Lokalno zdravljenje**

Za lokalno zdravljenje uporabljamo kortikosteroide, vitamin D in njegove analoge, retinoide in salicilno kislino (11). Najpogosteje uporabljamo lokalne kortikosteroide, saj so učinkoviti, relativno varni in enostavni za uporabo (12). Analoge vitamina D3, kot je kalcipotriol, uporabljamo predvsem zaradi dolgotrajne varne uporabe (13). Delujejo protivnetno ter imajo protiproliferativno vlogo. Najpogosteje se uporabljajo kalcitriol, metakalcitriol in takakalcitriol (14). Visoko učinkovite so kombinacije analogov vitamina D (kalcipotriol) in topikalnih kortikosteroidov (betametazon dipropionat) (7). Pogosto se uporablja tudi tazaroten, učinkovina s protivnetnim delovanjem, ki jo uvrščamo med retinoide. Normalizira diferenciacijo keratinocitov ter zmanjša njihovo proliferacijo (15). Prav tako zmanjša vnetne znake. Uporablja se predvsem za manjše in tanjše plake (14).

Ultravijolično sevanje inhibira sintezo DNA in proliferacijo epidermalnih keratinocitov in povzroči apoptozo T celic. UVA in UVB sevanje izkazuje imunosupresivno in protivnetno delovanje (14). Če so prizadete večje površine kože, uporabljajo obsevanje z ultravijolično-B svetlobo (UVB) (16). Pogosto pa dajejo psoralen in hkrati obsevajo z ultravijolično-A svetlobo (PUVA) (11). Največkrat uporabljajo UVA obsevanje z valovno dolžino 365 nm v kombinaciji s fotoaktivnimi furokumarini. Pri UVB obsevanju pa uporabljajo valovno dolžino od 290 do 320 nm (16). UVB fototerapija poveča učinkovitost kalcipotriola (14).

### **1.1.2.2      Sistemsko zdravljenje**

Za sistemsko zdravljenje uporabljamo protivnetne in imunosupresivne učinkovine metotreksat, ciklosporin, retinoide, estre fumarinske kisline in biološka zdravila (1). Sistemsko zdravljenje pri otrocih uporabljamo zelo redko (14). Metatreksat je visoko učinkovito zdravilo in se lahko uporablja tudi za zdravljenje PsA (1). Ciklosporin inhibira funkcijo T celic in IL-2 (14). Pri približno 80 % bolnikih z luskavico zagotavlja hitre in zanesljive izboljšave, vendar predstavlja tveganje za razvoj skvamoznega celičnega karcinoma (1). Pogosto se uporablja za zdravljenje luskavice pri otrocih (14). Med retinoidi (derivati vitamina A) se uporablja acitretin, ki predstavlja ugodno alternativo za metotreksat. Učinek zdravljenja z acitretinom se okrepi v kombinaciji s fototerapijo. Zdravljenje z estri fumarinske kisline je v Centralni Evropi v klinični uporabi že več kot 40 let. Klinični odziv na zdravljenje se pri 50-70 % pacientov pojavi po 16 tednih (1).

Pri težjih oblikah uporabljamo biološka zdravila, med katerimi so najpogostejši antagonisti dejavnika tumorske nekroze alfa (TNF $\alpha$ ) (etanercept, infliksimab in adalimumab), alefacept in ustekinumab. Etanercept je proti-TNF $\alpha$  fuzijski protein. Učinkovit je tako pri zdravljenju otrok kot odraslih. Zdravljenje otrok z biološkimi zdravili ni zaželeno, saj lahko povzročajo stranske učinke ter potencialno ogrozijo življenje (14). Z večjim razumevanjem imunopatologije luskavice se razvijajo nove možnosti za zdravljenje. Pri tem je največji poudarek na biološkem zdravljenju (1).

### **1.1.2.3      Nove možnosti zdravljenja**

Raziskave patogeneze luskavice razkrivajo nekatere tarče, ki bi lahko v prihodnosti omogočile bolj specifično zdravljenje. Nove možnosti se odpirajo predvsem na področju razvoja novih dostavnih sistemov in genskega zdravljenja (17).

Hiperproliferacijo keratinocitov bi na primer lahko preprečevali z delovanjem na specifične tarče znotraj celic, vendar so za to potrebni napredni sistemi za znotrajcelično dostavo učinkovin. Velik potencial ima ciljana dostava učinkovin v celico preko receptorjev. Pri tem izkoriščamo interakcije ligandov z receptorji na površini celic, ki aktivirajo proces receptorske endocitoze. Na primer pegilirani liposomi so učinkovit dostavni sistem zaradi aktivnega ciljanja preko povezave receptor-ligand (18).

## **1.2 Ciljana dostava učinkovin v celice z receptorsko endocitozo**

### **1.2.1 Receptorska endocitoza**

Receptorska endocitoza je proces prenosa molekul/delcev v celico z uvijanjem celične membrane. Sproži se kot posledica interakcije liganda z receptorjem na površini celice. Za omenjen proces so značilni receptorji, ki se nahajajo na površini celic in vežejo topne ligande z visoko afiniteto (npr. lipoproteini z nizko gostoto (LDL)) (19).

Proces poteka v več stopnjah. Ključno vlogo pri prenosu pa ima protein klatrin. V začetni stopnji pride do vezave liganda na membranski receptor. Kompleks receptor-ligand potuje do membrane s klatrinom (20). Klatrin ni direktno vezan na membrano ali receptorje, ampak se opira na adaptorske proteine in komplekse (npr. adaptorski protein 2 (AP2)) ter dodatne proteine (npr. AP180, epsin). Vsi dodatni proteini so citoplazemski proteini. Ko je mehurček narejen, se vrne nazaj v citoplazmo in so na voljo v ponovnem ciklu endocitoze (21). Sledi endocitoza, pri kateri nastane mehurček, ki vsebuje omenjen kompleks. Znotraj celice se klatrinski plašč loči od vezikla, ločita pa se tudi ligand in receptor. Ligandi potujejo do lizosomov ali Golgijevega aparata, medtem ko se mehurček z receptorjem vrne v celično membrano (20).

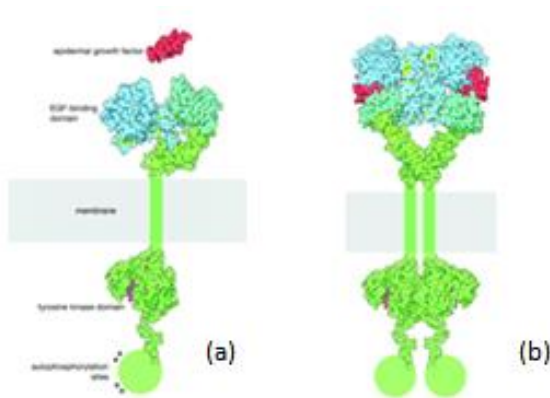
S klatrinom posredovana endocitoza je pomembna za regulacijo izražanja proteinov na površini, pripravo okolja za rast celic, prenos hranil v celico, nadzor aktivacije signalnih poti ter vračanje membranskih komponent v lizosome, kjer poteče njihova razgradnja.

Kljub pomembnosti endocitoze, ki poteka preko klatrinskih molekul, njena vloga v številnih fizioloških procesih še vedno ni povsem jasna. Potrebne so dodatne raziskave v začetnih korakih prenosa signalov (21).

### **1.2.2 Receptor za epidermalni rastni dejavnik**

Receptor za epidermalni rastni dejavnik (EGFR) je 170 kDa velik transmembranski protein (22) in je pomemben pri razvoju kože in njenem delovanju (23). V diplomski nalogi je omenjena tudi njegova vloga v patogenezi luskavice. Poudarek pa je na njegovi uporabnosti pri procesu receptorske endocitoze. Namen je namreč, da bi lahko preko EGFR po mehanizmu receptorske endocitoze v notranjost celice dostavili bakteriofag z želenim genom za zmanjšanje vnetja pri luskavici.

EGFR sestavlja ena polipeptidna veriga iz 1186 aminokislin in znatna količina oligosaharidov (24). Izraža se tudi v keratinocitih psoriatične kože. Mehanizem, preko katerega EGFR vpliva na celično rast keratinocitov, ni dobro poznan (25). Model, s katerim lahko razložimo kompleksni sistem signalizacije, temelji na treh posameznih plasteh. Zunajcelično plast sestavljajo ligandi. Njihovo delovanje je odvisno od koncentracije in biološke razpoložljivosti. Receptorji, ki obsegajo drugo plast, ob prisotnosti ustrezne koncentracije ligandov dimerizirajo in postanejo aktivni. Če pride do dimerizacije receptorjev, se poveča znotrajcelična katalitična aktivnost. Proteini znotrajcelične plasti se vežejo na specifična mesta na receptorjih. Sprožijo se signali, potrebni za ustrezen odziv (26).



Slika 1: Vezava EGF na EGFR (27).

(a) V odsotnosti liganda se EGFR nahaja v neaktivni monomerni obliki in ne pride do dimerizacije (27). EGFR sestavljajo 3 domene (domena I, domena II in domena III) (28). (b) Vezava EGF povzroči spremembo oblike zunanje domene, dimerizacijo receptorja in aktivacijo signalnih poti (Slika 1) (27).

### 1.2.3 Dostava učinkovin preko receptorja za epidermalni rastni dejavnik

EGFR lahko uporabimo za dostavo genov v celico. Razvoj sistema za dostavo učinkovin preko receptorske endocitoze v celice bi imelo velik pomen predvsem za ciljano zdravljenje. Prvi korak v razvoju je identifikacija receptorja, ki omogoča endocitozo in se hkrati in v zadostni meri izraža v obolelem tkivu. Drugi pomemben dejavnik pa je ligand, ki se specifično veže na tak receptor (22).

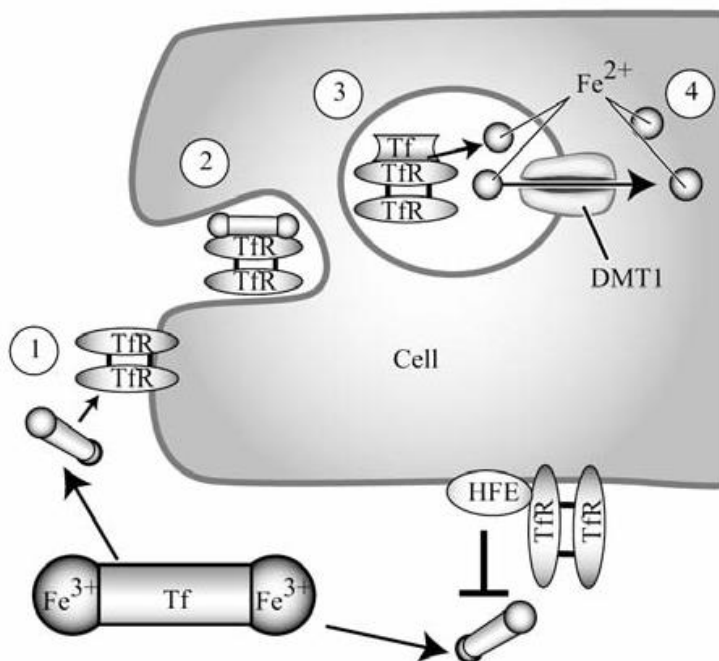
V literaturi so že opisani nekateri primeri dostave protiteles in genov v celice, ki izražajo EGFR. Mišja monoklonska protitelesa se lahko specifično vežejo na epitop prisoten na EGFR, in vstopajo v celico preko endocitotskega mehanizma. To potrjuje, da lahko na ta način v celico prenesemo veliko proteinsko molekulo. Do sedaj so poleg protiteles preko EGFR poskusili dostaviti tudi večje vezikle in bakteriofage (29).

Pri razvoju genskega zdravljenja se pojavlja vprašanje, kako vnesti terapevtski gen v obolele celice, da bi bilo izražanje zadostno in trajno. Ligandi, ki ciljajo receptorje na površini celic, se lahko uporabljajo tako za virusno kot nevirusno gensko zdravljenje (30). Tarčni ligand je lahko naravni ligand (rastni dejavnik), peptidni mimetik ali protitelo proti receptorju na površini celice (31). Da bi našli izboljššan ligand, je Larocca s sodelavci v svoji raziskavi za določanje internalizacije ligandov uporabil fagni prikaz. Osnovni fibroblastni rastni dejavnik (FGF2), ter liganda Tf in EGF so pritrtili na proteinski plašč bakteriofagov ter preverili izražanje nekega določenega gena v tarčnih celicah. Ugotovili so, da je FGF2 bolj učinkovit kot pa Tfr ali EGFR, saj je bila internalizacija uspešnejša in izražanje vnesenega gena močnejše (30). Bakteriofagne vektorje lahko spremenimo tako, da imajo visoko sposobnost vezave, internalizacije in prenosa tarčnega gena v sesalske celice (31). Virusne vektorje lahko nadomestimo s fagmidi. Z njimi lahko vnesemo večje gene, so bolj stabilni in omogočajo multivalentni prikaz, ki je potreben za vezavo in internalizacijo. Ugotovili so, da je bil multivalentni prikaz najučinkovitejši, ko je bil EGF vezan na C-terminalno domeno pIII proteinskega plašča bakteriofaga (32).

#### **1.2.4 Receptor za transferin**

Receptor za transferin je 85 kDa velik transmembranski protein, sestavljen iz dveh polipeptidnih verig, ki sta med seboj povezani z disulfidnimi vezmi. Vsaka polipeptidna veriga je glikozilirana (33). Receptor se izraža v bazalnem epidermisu, hepatocitih, Kupfferjevih celicah in testisih (34). Visoko izražen je tudi na zunanem delu korena lasnega folikla (35). Poznamo Tfr1, ki je v manjših količinah izražen v večini normalnih tkiv pri ljudeh in Tfr2. Slednji je protein, ki je homologen Tfr1, vendar je njegovo izražanje omejeno na hepatocite (36). Količina receptorskih molekul je odvisna od potrebe celic po železu (37). Ker Tf in Tfr nista prisotna v enterocitih, Tf veže železo in ima pomembno vlogo pri njegovem prenosu v krvni obtok. Tf z vezanima atomoma železa ( $\text{Fe}^{3+}$ ) kroži v plazmi, dokler ne doseže tarčne celice (slika 2). Na membrani celice veže

Tfr. Sledi endocitoza Fe-Tf in Tfr kompleksa. Kisel pH v endosomu pa povzroči ločitev  $\text{Fe}^{3+}$  od Tf. Prenos  $\text{Fe}^{2+}$  omogoča divalentni kovinski transporter 1 (DMT1). Tf-Tfr kompleks se nato vrne nazaj na površino celice (38).



Slika 2: Celični privzem železa vezanega na Tf (43).

### 1.2.5 Dostava učinkovin preko receptorja za transferin

Tako kot lahko preko EGFR dostavimo gene in zdravilne učinkovine v celice, lahko za isti namen uporabimo tudi Tfr. Oba receptorja sta lahko tarči za ciljno dostavo, vendar se bomo v diplomski nalogi zaradi poznavanja ustreznih peptidnih ligandov osredotočili predvsem na Tfr. V literaturi je njegova uporaba že omenjena pri zdravljenju rakavih obolenj. Prednost njegove uporabe je zadostna internalizacija ter njegova povečana količina na površini večine rakavih celic. Omenjen receptor lahko uporabimo za dostavo terapevtskih molekul v omenjene celice ter blokado njegove naravne funkcije, kar vodi v direktno celično smrt rakave celice. Ciljanje Tfr je bilo dokazano učinkovito pri dostavi številnih terapevtskih učinkovin. Prav tako je povzročilo toksične učinke na rakave celice tako *in vitro* kot *in vivo* (36).

Na Tfr se vežejo poleg naravnega liganda Tf še dva peptida, HAIYPRH in THRPPMWSPVWP. Peptid HAIYPRH se zaradi funkcije liganda uporablja kot dostavni



sistem za ciljano dostavo zdravilnih učinkovin in genov v celice. HAIYPRH se lahko veže na Tfr in se nato z endocitozo prenese v celice s pomočjo Tf. Oba peptida so z rešetanjem bakteriofagne knjižnice odkrili Han in sodelavci (39).

Artemisinin, protirakavo učinkovino, izolirano iz *Artemisia annua* L., so kovalentno pritrčili na peptid HAIYPRH in jo uspešno dostavili v celice. Oh s sodelavci je pripravil dva konjugata z artemisininom. Oba konjugata so testirali na levkemičnih celicah in jih primerjali z normalnimi človeškimi levkociti. Ugotovili so, da oba konjugata uničita rakave celice že v nizki mikromolarni koncentraciji (40).

### 1.2.6 Bakteriofagi kot dostavni sistem

Uporaba bakteriofagov ima velik potencial pri genskem zdravljenju. Bakteriofagi so virusi, ki se razmnožujejo izključno v bakterijskih celicah. Vsak virusni delec je zgrajen iz nukleinske kisline, ki jo obdaja proteinski plašč. Pri nitastih bakteriofagih je genska informacija bakteriofagov v obliki enoverižne krožne DNA. Bakteriofage uporabljamo kot vektorje za vnos genske informacije v bakterijske celice. Če pa na njihovo površino pripnemo ligand (najpogosteje kratek peptid) z afiniteto do določenega receptorja, jih lahko uporabimo tudi za dostavo genov v sesalske celice (41). Bakteriofage s prikazanimi peptidi z afiniteto do različnih receptorjev lahko pridobimo iz obsežnih peptidno-predstavitvenih knjižnic bakteriofagov (30). Pri delu v laboratoriju smo uporabljali nitaste bakteriofage M13.

Preglednica I: Peptidi predstavljeni na površini bakteriofagov.

Poimenovanje bakteriofagov	Prikazani peptidi
TUP	HAIYPRH
T12	THRPPMWSPVWP
M2	CRMQMPSSC
NL8	GLVDVLF
L4	ASVQERK
C34	brez peptida

## 2 NAMEN DELA

V okviru te diplomske naloge bomo najprej raziskali prisotnost receptorjev za epidermalni rastni dejavnik in transferin na celični liniji človeških keratinocitov HaCaT. Receptorja sta pomembna, saj omogočata dostavo v celico. Z uporabo metod, kot so izolacija RNA, reverzna transkripcija, RT-PCR in agarozna elektroforeza bomo preverili, ali omenjene celice na svoji površini izražajo receptorja za epidermalni rastni dejavnik in transferin. Širši namen pa je razviti sistem za ciljano dostavo genov v celico. Želeli bi razviti dostavni sistem, s katerim bi v celice pri bolnikih z luskavico vnesli gene, ki bi zmanjšali vnetje. Kot možni dostavni sistem bomo preizkusili bakteriofage. Osredotočili se bomo na prehod bakteriofagov preko receptorja za transferin. Uporabili bomo šest različnih rekombinantnih bakteriofagov (TUP, T12, C34, M2, NL8 in L4), ki na svoji površini izražajo različne peptide. Z mikrobiološko titracijo jim bomo določili koncentracijo. Preučevali bomo, kateri od omenjenih bakteriofagov najbolje prehaja v celice, kateri se najbolje veže ter kateri je najboljša negativna kontrola. Preverili bomo tudi, kako pogoji vplivajo na prehajanje omenjenih bakteriofagov v celice. Pri tem bomo kot spremenljivko upoštevali število celic. Uporabili bomo celice z visoko in nizko gostoto.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Gojenje celične linije HaCaT

Gojišče:

- 88 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM),
- 10 mL fetusni serum goveda (FBS),
- 1 mL raztopina antibiotikov (penicilina in streptomocina (končna koncentracija v gojišču 2 mM)),
- 1 mL raztopine L-glutamina (končna koncentracija v gojišču 2 mM).

Reagenti za tripsinizacijo celic:

- 5 mL pufra PBS:
  - 3,2 g NaCl (Sigma, Nemčija)
  - 0,08 g KCl (Carlo Erba, Italija)
  - 0,576 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, ZDA)
  - 0,096 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kemika, Zagreb)
- 5 mL 0,02 % raztopine EDTA v PBS (EDTA/PBS),
- 50 µL raztopine tripsina.

Oprema:

- platenke za gojenje celic T75 (TPP, Švica),
- celični inkubator (37°C, atmosfera s 5 % CO<sub>2</sub>),
- komora z laminarnim pretokom zraka,
- sterilne serološke pipete, mikropipete in sterilni pipetni nastavki,
- centrifuga.

HaCaT celice smo gojili pritrjene v monosloju v platenkah za gojenje celic v zgoraj navedenem gojišču po opisanem postopku (42). Gojili smo jih v inkubatorju pri 37°C s 5 % vsebnostjo CO<sub>2</sub>. Celotno delo s celicami je potekalo v sterilnih pogojih celičnega laboratorija. Gojišče smo celicam zamenjali vsak tretji dan. Ko je bila dosežena 80% konfluentnost, smo jih presejali v razmerju 1:5. Najprej smo odstranili gojišče ter nato sprali celice s 5 mL izotoničnega pufra PBS (angl. Phosphate buffered saline). Dodali smo

5 mL 0,02% EDTA/PBS in 50  $\mu$ L tripsina ter inkubirali pri 37°C 20 minut. Tripsin je serinska proteaza, ki odcepi adherirane celice od podlage, kar omogoča njihovo kasnejše suspendiranje. EDTA kompleksira kalcij in zrahlja tesne stike med celicami, kar omogoča lažje delovanje tripsina. Ko so se celice odlepili od podlage, smo dodali 5 mL svežega gojišča, ki je preprečil nadaljnje delovanje tripsina. Suspenzijo celic smo nato prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 1200 vrt./minuto. Odstranili smo supernatant in celice resuspendirali v svežem gojišču. Ustrezen delež suspenzije smo prenesli v novo plastenko za gojenje celic.

### 3.2 Izolacija RNA

Komplet za izolacijo RNA:

- RNeasy Mini Kit (pufer RLT, pufer RPE,  $\beta$ -merkaptotanol), (Q-IAGEN, Nemčija).

Oprema:

- centrifuga,
- vibracijski mešalnik,
- mikrocentrifugirke,
- spektrofotometer Nano Drop ND (Thermo Scientific, ZDA).

Pred začetkom dela smo pufru za lizo (RLT) dodali inhibitor RNAz,  $\beta$ -merkaptotanol (Sigma, Nemčija) v koncentraciji 10  $\mu$ L na 1 mL RLT pufra. Pufer RPE je bil shranjen kot koncentrat, zato smo mu pred uporabo dodali 4 volumske deleže 96% etanola. Celice smo tripsinizirali, določili njihovo število, centrifugirali 5 minut pri 1200 vrt./min in odstranili ves supernatant. Nepopolna odstranitev gojišča celične kulture bi inhibirala lizo in zmanjšala količine izolirane RNA. V 1,5 mL mikrocentrifugirki smo celicam dodali 600  $\mu$ L pufera RLT ter lizat homogenizirali s pipeto in vibracijskim mešalnikom. Dodali smo 600  $\mu$ L 70% etanola in močno premešali s pipetiranjem. Vsebinsko smo prenesli na kolono, centrifugirali 15 sekund pri 10000 vrt./min in zavrgli eluat. 700  $\mu$ L vzorca smo prenesli na novo kolono, ponovno centrifugirali 15 sekund pri enaki hitrosti ter zavrgli eluat. Nato smo dodali 500  $\mu$ L pufera RPE, centrifugirali pri enakih pogojih in zavrgli eluat. Spiranje s pufrom RPE smo ponovili še enkrat. Kolono smo nato prenesli v novo 2 mL

mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 minuto pri najvišji hitrosti. Kolono smo prenesli v novo 1,5 mL mikrocentrifugirko, dodali 50  $\mu$ L vode brez RNAz in centrifugirali 1 minuto pri 10 000 vrt./min. Eluat z RNA smo shranili. Koncentracijo in čistost izolirane RNA smo določili spektrofotometrično s spektrofotometrom NanoDrop ND1000.

### 3.3 Reverzna transkripcija mRNA v cDNA

Komplet za reverzno transkripcijo

- Omniscript RT kit (pufer RT, dNTP Mix, začetni oligonukleotidi oligo- dT, encim reverzna transkriptaza, voda brez RNAz), (QIAGEN, Nemčija).

Oprema:

- mikrocentrifugirke,
- vibracijski mešalnik,
- centrifuga,
- PCR aparat (GeneAmp, PCR System 2700, Applied Biosystems).

Na ledu smo pripravili osnovno zmes, ki je vsebovala 2  $\mu$ L pufera RT, 2  $\mu$ L zmesi deoksiribonukleotidov (dNTP Mix), 2  $\mu$ L začetnih oligonukleotidov oligo- dT, 1  $\mu$ L encima reverzne transkriptaze in 3  $\mu$ L vode brez RNAz. Zmes smo pazljivo mešali z vibracijskim mešalnikom, centrifugirali in shranili na ledu. Dodali smo 10  $\mu$ L raztopine RNA s koncentracijo 100 ng/ $\mu$ L, pazljivo premešali z vibracijskim mešalnikom in centrifugirali. Reakcijsko zmes smo inkubirali 1 uro pri 37°C v PCR aparatu.

### 3.4 RT-PCR

Material:

- osnovna zmes za PCR (PCR Master Mix ( Fermentas, ZDA)),
- začetni oligonukleotidi (Sigma, ZDA):
  - Tfr smiselni: 5'-CTGCTATGGGACTATTGCTGTG-3',
  - Tfr protismiselni: 5'-CCGACAACCTTTCTCTTCAGGTC-3',(2)
  - EGFR smiselni: 5'-ACCTGCGTGAAGAAGTGTCC-3',

-EGFR protismiselni: 5'-CACATCTCCATCACTTATCTCC-3', (3)

- cDNA,
- voda brez nukleaz.

Oprema

- PCR aparat (GeneAmp, PCR System 2700, Applied Biosystems).

Pripravili smo raztopine začetnih oligonukleotidov s koncentracijo 5  $\mu\text{M}$ . Nato smo pripravili PCR vzorce, s katerimi smo preverili ali celice HaCaT izražajo receptorja za transferin (Tfr) in epidermalni rastni dejavnik (EGFR).

Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi za PCR.

	Vzorec	Negativna kontrola
Osnovna zmes za PCR	12,5 $\mu\text{L}$	12,5 $\mu\text{L}$
Smiselni začetni oligonukleotid	1,5 $\mu\text{L}$	1,5 $\mu\text{L}$
Protismiselni začetni oligonukleotid	1,5 $\mu\text{L}$	1,5 $\mu\text{L}$
cDNA	1 $\mu\text{L}$	/
Voda brez nukleaz	8,5 $\mu\text{L}$	9,5 $\mu\text{L}$
Celokupni volumen	25 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$

PCR reakciji za preverjanje izražanja Trf in EGFR sta potekali ločeno, saj temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov vzorcev nista enaki. PCR reakcija je potekala v šestih korakih v PCR aparatu (GeneAmp, PCR System 2700, Applied Biosystems). Prvi korak je bila aktivacija encima, ki je trajala 5 minut pri temperaturi 95°C (Hot-start princip). Uporabljen encim je zaradi obdelave s protitelesi neaktiven in se aktivira po zgoraj navedeni inkubaciji. Sledilo je 40 ciklov denaturacije cDNA pri 95°C 30 sekund, prileganje začetnih oligonukleotidov na cDNA pa je potekalo 30 sekund. Temperatura prileganja Tfr začetnih oligonukleotidov je bila 54°C in EGFR začetnih oligonukleotidov 50°C . Sledil je korak podaljševanja pri 72°C, ki je trajal 2 minuti. Omenjeni trije koraki so

se ponovili 40×. Nato je sledilo končno podaljševanje 10 minut pri 72°C. Sledila je zadnja stopnja pri 4°C.

### 3.5 Agarozna gelska elektroforeza

- Nanašalni pufer (6× DNA Loading dye-Thermo Scientific),
- označevalec velikosti (Gene Ruler mix- DNA Ladder mix (Thermo Scientific),
- SYBR Gold (Invitrogen, ZDA),
- agarozna (Sigma, ZDA),
- pufer TAE (50× založna raztopina: 242 g Tris-HCl, 57,1 mL brezvodne očetne kisline, 100 mL 0,5 M EDTA, prečiščena voda do 1000 mL, pH= 8).

Oprema:

- elektroforezna kadička (B1A, Owl separation system, ZDA),
- mikrovalovna pečica,
- aparat G/Box (Syngene, Združeno kraljestvo).

Pripravili smo 1,5 % agarozni gel za elektroforezo. Zmešali smo 30 mL pufera TAE in 0,45 g agaroze in jo raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Ko se je raztopina nekoliko ohladila, smo jo vlili v kadičko in pustili na sobni temperaturi, da je nastal gel. Nato smo na gel nalili pufer TAE. Za nanos na gel smo vzorce cDNA zmešali z nanašalnim pufrom in vodo brez nukleaz, kot je prikazano v preglednici 2.

Preglednica III: Priprava vzorcev za nanos na elektroforezo.

Vzorec	Tfr/EGFR	Negativna kontrola	Označevalec velikosti
Nanašalni pufer	2 µL	2 µL	2 µL
DNA	10 µL	10 µL	2 µL
Voda (brez nukleaz)	/	/	8 µL

Nanašalni pufer vsebuje barvili bromfenolno modro in ksilen cianol, ki olajšata nanos vzorcev in označujeta pot, ki jo v gelu prepotujejo koščki DNA. Barvili sta negativno

nabiti, zato potujeta v isti smeri kot DNA, bromfenol modro potuje tako hitro kot 300 bp dolga DNA, ksilen cianol pa kot 4000 bp dolga DNA. Pripravljene vzorce smo nanesti v žepke elektroforeznega gela. Elektroforezni sistem smo priključili na električno napetost 80 V. Ko so vzorci prepotovali polovico poti, smo elektroforezo ustavili in DNA obarvali z barvilom SYBR Gold. Barvilo difundira skozi gel, se vgradi v DNA in fluorescira pod UV svetlobo. Gel smo 20 minut rahlo stresali v raztopini SYBR Gold v pufru TAE (3 µL/30 mL). Nato smo z uporabo aparata G/Box pod UV svetlobo opazovali fluorescenco DNA. Pri identifikaciji lis, ki pripadajo Tfr in EGFR, smo si pomagali z označevalcem velikosti.

### 3.6 Pomnoževanje bakteriofagov

Material:

- PEG/NaCl (PEG 8000 in NaCl: Sigma, Nemčija),
- pufer PBS,
- bakterijski sev: *E. coli*: ER2738 ( New England, BioLabs, ZDA),
- Tetraciklin (10 µg/mL),
- tekoče gojišče LB: (14 g gojišča LB v prahu (Sigma, ZDA), prečiščena voda do 400 mL).

Oprema:

- 250 mL erlenmajerice z utori,
- inkubator pri 37°C,
- mikrocentrifugirke,
- centrifuga,
- vibracijski mešalnik.

Najprej smo pripravili bakterijske kulture. V penicilinko smo dodali 10 mL gojišča LB, 10 µL tetraciklina ter nekaj µL bakterij *E. coli* ER2738. Pripravljeno kulturo smo pustili na stresalniku, dokler ni zrastle dovolj bakterij. Pripravili smo tudi tekoče LB gojišče. Natehtali smo 14 g LB agarja, dopolnili do 400 mL s prečiščeno vodo in pustili mešati na magnetnem mešalu. Nato smo LB medij avtoklavirali. Bakteriofagne klone (TUP, T12, C34, M2, NL8 in L4) smo pomnožili v bakterijah *E. coli* ER2738. V 20 mL bakterijskih



kultur smo dodali nekaj  $\mu\text{L}$  bakteriofagov in erlenmajerico stresali 4-5 ur pri  $37^\circ\text{C}$ . Kulture smo nato prelili v 50-mL centrifugirke in centrifugirali 10 minut pri 10000 vrt./min in  $4^\circ\text{C}$ . Sediment bakterij smo zavrgli, supernatant pa prelili v svežo centrifugirko in ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Supernatant smo ponovno prelili v svežo centrifugirko, dodali 1/6 volumna PEG/NaCl, premešali z vibracijskim mešalnikom in inkubirali preko noči pri  $4^\circ\text{C}$ . Naslednji dan smo oborjene bakteriofage centrifugirali 15 minut, pri  $4^\circ\text{C}$  in 10000 vrt./min. Supernatant smo odlili, usedlino pa resuspendirali v 0,5 mL pufra PBS v 1,5-mL mikrocentrifugirki. Ponovno smo dodali 1/6 volumna PEG/NaCl in inkubirali 1 uro na ledu. Nato smo mikrocentrifugirke 10 minut centrifugirali pri  $4^\circ\text{C}$  in 10000 vrt./min in odstranili supernatant. Usedlino smo resuspendirali v 200  $\mu\text{L}$  pufra PBS, premešali z vibracijskim mešalnikom in 5 minut centrifugirali pri  $4^\circ\text{C}$  in 10000 vrt./min. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in shranili pri  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3.7 Določanje koncentracije bakteriofagov z mikrobiološko titracijo

Material:

- tekoče gojišče LB,
  - bakterijska kultura *E. coli* ER273,
  - agarno gojišče LB/IPTG/X-gal (14 g gojišča):
    - LB gojišče,
    - 15 g/L agarja (Sigma, ZDA),
    - 800  $\mu\text{L}$  2% X-gal (Sigma, ZDA),
    - 84  $\mu\text{L}$  1 M IPTG (Sigma, ZDA), prečiščena voda do 400 mL,
  - Top agaroz:
- 8 g gojišča LB v prahu,  
1970  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{MgCl}_2$ , 2,8 g agaroze (Sigma, ZDA).

Pri pripravi agarne gojišča LB/IPTG/Xgal smo natehtali 14 g zmesi za gojišče LB-agar, dopolnili do 400 mL s prečiščeno vodo in mešali na magnetnem mešalu. X-gal in IPTG smo dodali po avtoklaviranju, ko se je gojišče nekoliko ohladilo. Vsebino smo še enkrat premešali in vlili na plastične petrijevke.

Pri pripravi top agaroze smo natehtali 8 g zmesi za LB gojišče ter dopolnili s prečiščeno vodo do 400 mL. Dodali smo 1970  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{MgCl}_2$  in 2,8 g agaroze. Sledilo je avtoklaviranje in vlivanje top agaroze v centrifugirke.

Posamezne vzorce bakteriofagov smo redčili od  $10^2$  do  $10^9$  s pufrom PBS. 10  $\mu\text{L}$  redčitev  $10^7$ ,  $10^8$  in  $10^9$  smo zmešali z 200  $\mu\text{L}$  bakterijske kulture in prenesli v 3 mL Top agaroze, premešali in vlili na petrijevke z agarnim gojiščem LB/IPTG/X-gal. Top agarosa je bila med mikrobiološko titracijo v termostatu na  $52^\circ\text{C}$ , saj se le ta pri nižjih temperaturah strdi. Petrijevke smo čez noč pustili v inkubatorju pri  $37^\circ\text{C}$ . Naslednji dan smo prešteli število modro obarvanih kolonij.

### **3.8 Določanje vezave bakteriofagov na površino in njihovega prehoda v celice**

Material:

- pufer PBS,
- gojišče za celice,
- klorokin (0,1  $\mu\text{mol/mL}$ ),
- protitelesa (HRP/anti-M13 konjugati: hrenova peroksidaza konjugirana z mišjimi anti-M13 monoklonskimi protitelesi),
- 2% raztopina mleka v prahu v PBS,
- substrat TMB,
- 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,
- 0,1% Tween-20 v PBS,
- elucijski pufer (75 mg glicina, 50 mL bidestilirane vode, uravnava pH pufra s HCl, do 2,2),
- nevtralizacijski pufer (2,423 g Tris, 20 mL bidestilirane vode, pH 9,9),
- PBS/EDTA (0,02%),
- gojišče za celice HaCaT, gojišče brez seruma.

Oprema:

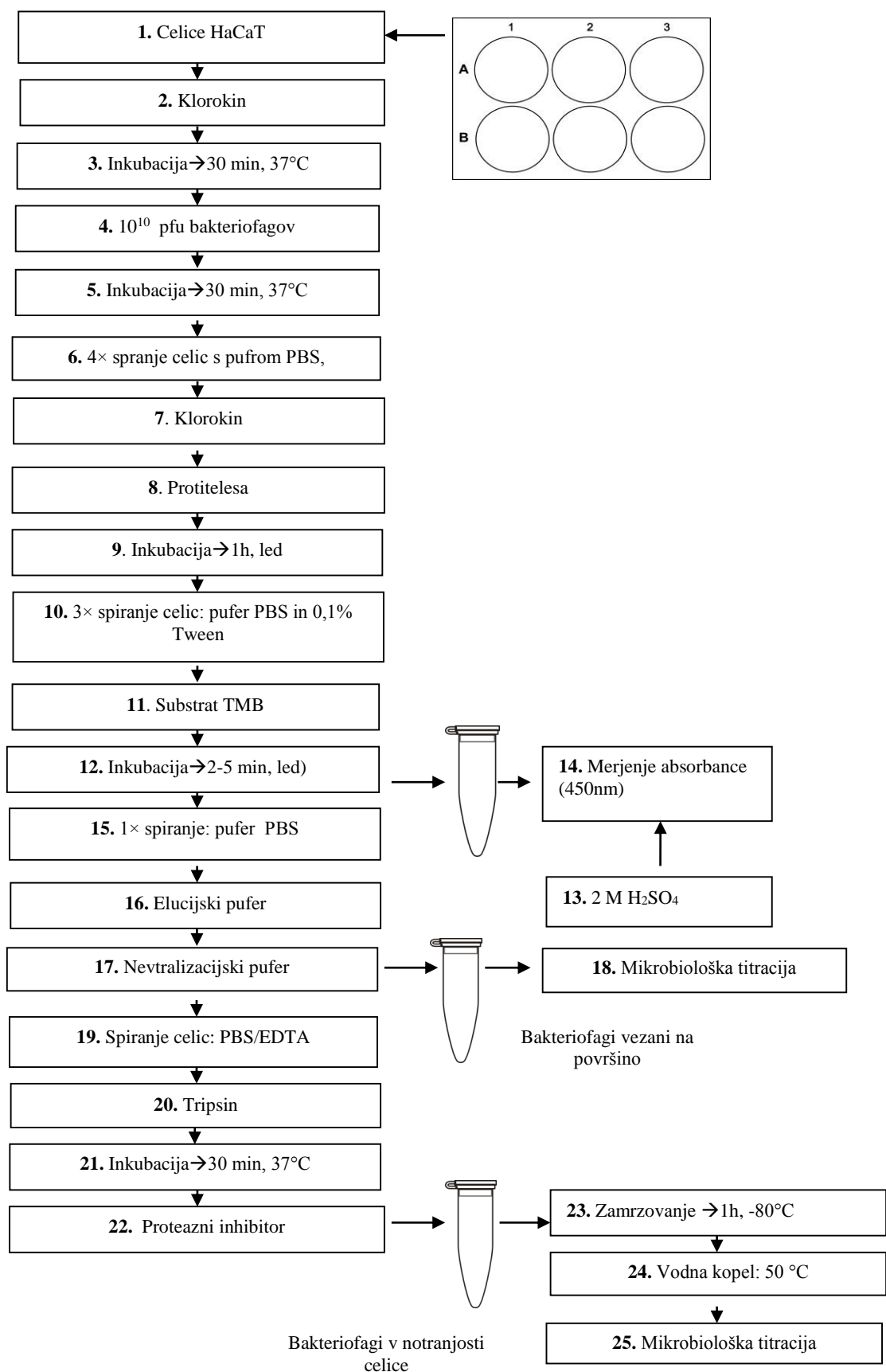
- mikrotitrna plošča s šestimi vdolbinicami (TPP, Švica),
- celični inkubator,
- mikrocentrifugirke,

- Spektrofotometer (Tecan genios).

Celice HaCaT smo dan pred izvedbo poskusa prenesli na ploščo s šestimi vdolbinicami z gostoto  $5 \times 10^5$  celic/vdolbinico v običajnem gojišču (slika 3). Naslednje jutro smo običajno gojišče zamenjali z gojiščem brez seruma. S tem smo odstranili vpliv dejavnikov iz seruma na celice. Dodali smo 8  $\mu$ L klorokina na 2 mL BS gojišča in celice inkubirali 30 minut pri 37°C v celičnem inkubatorju. Klorokin prepreči zlivanje endocitotskih mehurčkov z lizosomi in s tem morebitno razgradnjo bakteriofagov. Nato smo dodali  $1 \times 10^{10}$  pfu posameznih bakteriofagov in inkubirali 30 minut pri 37°C v celičnem inkubatorju. Vsi naslednji koraki so potekali na ledu, da smo preprečili propad celic. Odstranili smo raztopino bakteriofagov, ki se niso vezali ali prešli v celico in celice 4× sprali z 1 mL hladnega pufru PBS. Nato smo celicam ponovno dodali klorokin in 1 mL protiteles, redčenih 1:5000 v 2% posnetem mleku v prahu. Uporabili smo mišja monoklonska protitelesa anti- M13, ki so konjugirana s hrenovo peroksidazo. Inkubirali smo jih 1 uro na ledu. Sledilo je 3× spiranje z 1 mL pufru PBS z 0,1% Tweena 20. S tem smo sprali vsa nevezana protitelesa. Dodali smo 1 mL substrata TMB in pustili, da deluje 2-5 minut. TMB se obarva modro in omogoča detekcijo bakteriofagov, ki se vežejo na celice. Tekočino iz posameznih vdolbinic smo prenesli v mikrocentrifugirke in dodali 250  $\mu$ L 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ki ustavi encimsko reakcijo. Tekočino smo iz mikrocentrifugirk prenesli na mikrotitrne ploščice in pomerili absorbanco pri 450 nm na čitalcu Tecan genios.

Ploščo s šestimi vdolbinicami, na kateri so ostale vezane celice, smo sprali z 1 mL pufru PBS, s katerim smo odstranili preostanek substrata TMB. Nato smo dodali 1 mL elucijskega pufru s pH 2,2 za 10 minut. Znižanje pH vodi v disociacijo kompleksov bakteriofag - tarčna molekula. Nato smo dodali 200  $\mu$ L nevtralizacijskega pufru in vsebino prenesli v mikrocentrifugirke. Bakteriofagom, eluiranim s površine celic, zbranim v mikrocentrifugirkah, smo določili število z mikrobiološko titracijo.

Iz plošče s šestimi vdolbinicami smo odstranili pritrjene celice z dodatkom 1 mL PBS/EDTA in 10  $\mu$ L tripsina ter inkubirali 30 minut pri 37°C. Celice smo lizirali z zamrzovanjem (1 h, -80°C) ob dodatku 10  $\mu$ L proteaznega inhibitorja . Odtalili smo jih v vodni kopeli na 50°C in z mikrobiološko titracijo določili koncentracijo bakteriofagov, ki so prešli v celice.



Slika 3: Postopek določanja vezave bakteriofagov na površino in njihovega prehoda v celice.

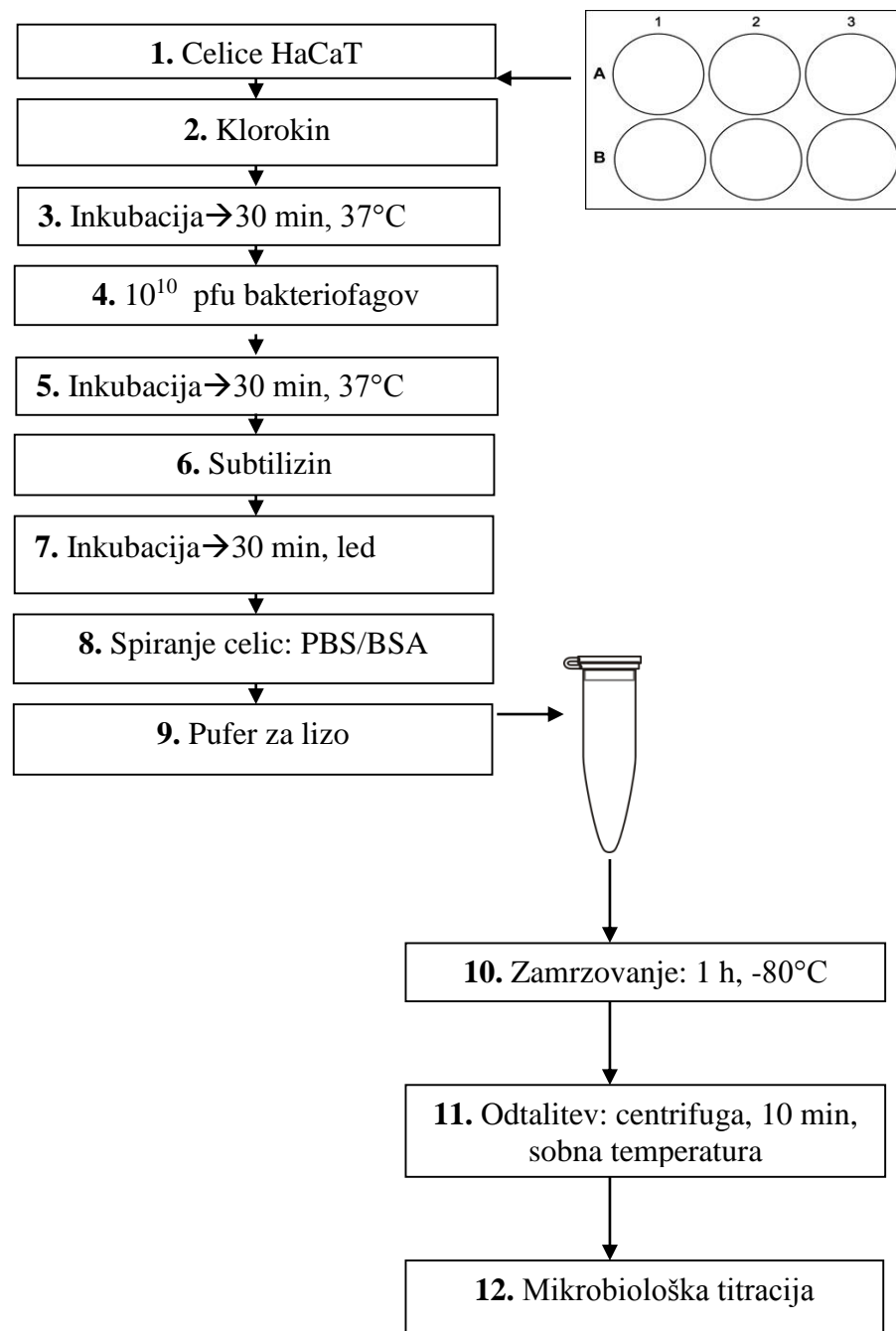
### 3.9 Določanje prehajanja bakteriofagov v celice pri visoki in nizki gostoti

- Pufer PBS,
- Triton: X-114 (Sigma, ZDA),
- Subtilizin (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),
- Pufer PBS/BSA (Sigma, ZDA).

Oprema:

- mikrotitrna plošča s šestimi vdolbinicami,
- celični inkubator,
- mikrocentrifugirke.

Celice HaCaT smo pripravili v plošči s šestimi vdolbinicami enako, kot je opisano v prejšnjem odstavku. Uporabili smo dve različni gostoti celic:  $5 \times 10^5$  celic/vdolbinico (visoka gostota celic) in  $1 \times 10^5$  celic/vdolbinico (nizka gostota celic). Nato smo v vsako vdolbinico z visoko in nizko gostoto celic dodali  $1 \times 10^{10}$  bakteriofagov in inkubirali v celičnem inkubatorju 30 minut na  $37^\circ\text{C}$  (slika 4). Dodali smo 40  $\mu\text{L}$  subtilizina s koncentracijo 0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (v pufru PBS s 50% glicerola) in inkubirali 30 minut na ledu. S tem smo razgradili vse bakteriofage, ki ne prehajajo v celice. Nato smo gojišče odstranili in celice spirali z 1 mL PBS/BSA. Nato smo odstranili vso tekočino iz vdolbinic in dodali pufer za lizo (1 mL PBS + 1% BSA + 1% triton). Celice smo postrgali in vzorce prenesli v mikrocentrifugirke in jih za 1 uro zamrznili na  $-80^\circ\text{C}$ . Vzorce smo nato odtalili in centrifugirali pri sobni temperaturi 10 minut in pri najvišjih obratih. Koncentracijo bakteriofagov v supernatantu smo določili z mikrobiološko titracijo. Vzorce smo redčili do redčitve  $10^2$ .



Slika 4: Postopek določanje prehoda bakteriofagov v celice pri nizki in visoki gostoti.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

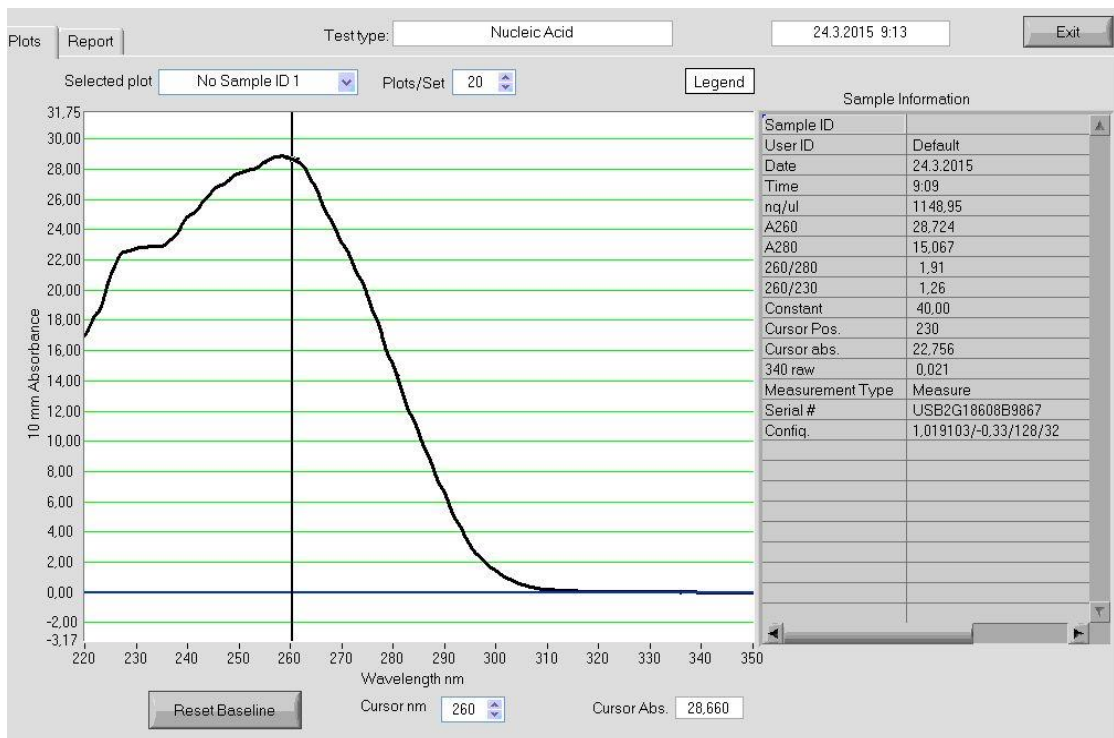
Opravljena diplomska naloga je del širše raziskave, v kateri razvijamo bakteriofage kot dostavne sisteme za vnos genov v sesalske celice, ki bi bili uporabni tako v raziskovalne kot tudi terapevtske namene. Širši namen je poiskati tiste rekombinantne nitaste bakteriofage, ki bi se vezali na EGFR ali Tfr in v celico prehajali z receptorsko endocitozo. V raziskavi smo uporabili človeške keratinocite HaCaT. V prvem delu diplomske naloge smo preverili ali celice HaCaT izražajo omenjena receptorja. V ta namen smo celice HaCaT gojili v gojišču in ustreznih plastenkah ter iz njih izolirali RNA. Informacijsko RNA smo z metodo reverzne transkripcije pretvorili v cDNA in jo uporabili kot matrico za RT-PCR. S specifičnimi začetnimi oligonukleotidi smo *in vitro* pomnožili odseke cDNA značilne za EGFR in Tfr (sliki 6 in 7).

V drugem delu diplomske naloge pa smo preverjali, ali lahko bakteriofagi s prikazanimi peptidi z afiniteto do Tfr prehajajo v celice HaCaT z receptorsko endocitozo. Uporabili smo bakteriofagna klon TUP in T12, ki se vežeta na Tfr, in klon NL8, ki se je v naših poskusih izkazal kot najbolj primerna negativna kontrola.

### 4.1 Izražanje Tfr in EGFR v keratinocitih

#### 4.1.1 Izolacija RNA

Filtratu z eluirano RNA smo s spektrofotometrom NanoDrop ND 1000 določili koncentracijo in ocenili njeno čistost. Izmerjena absorbanca pri 260 nm je znašala 28,724, izračunana koncentracija pa 1148,95 ng/ $\mu$ L (slika 5). Razmerje absorbanca pri 260 in 280 nm je bilo 1,91, kar pomeni, da je bila izolirana RNA zadovoljivo čista. Na sliki 5 vidimo vrh z maksimumom absorpcije pri približno 260 nm, kar še dodatno potrjuje, da smo izolirali čisto nukleinsko kislino.



Slika 5: Absorpcijski spekter izolirane celokupne RNA izmerjen s spektrofotometrom NanoDrop ND1000.

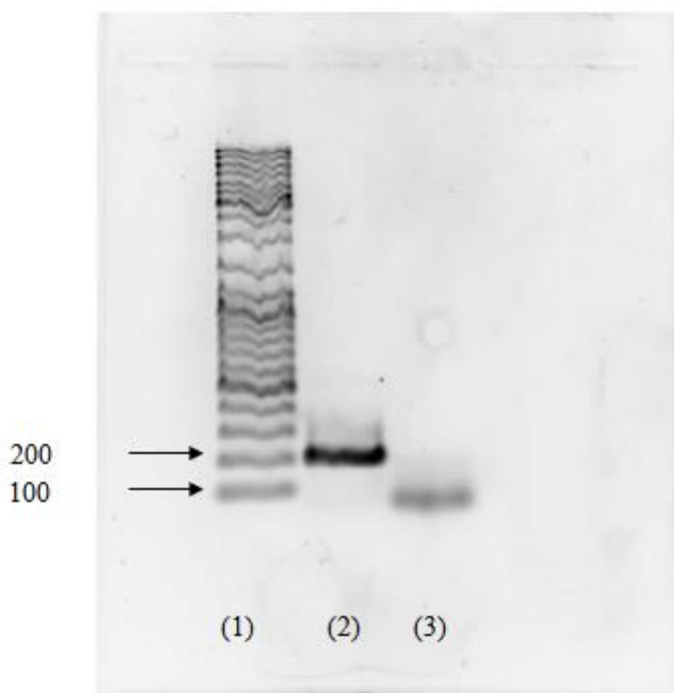
#### 4.1.2 Reverzna transkripcija

Izolirano celokupno RNA smo razredčili na koncentracijo 100 ng/ $\mu$ L, da smo lahko pripravili reakcijsko zmes za reverzno transkripcijo z ustrežno količino RNA (največ 2  $\mu$ g RNA/reakcijo). K 20  $\mu$ L izolirane RNA s koncentracijo 1148,95 ng/ $\mu$ L smo tako dodali 210 vode brez RNAz, da smo dobili 230  $\mu$ L raztopine RNA s koncentracijo 100 ng/ $\mu$ L. Z uporabo začetnih oligonukleotidov oligo-dT smo iz izolirane celokupne RNA samo mRNA obratno prepisali v cDNA.

#### 4.1.3 Verižna reakcija s polimerazo in agarozna gelska elektroforeza

Z verižno reakcijo s polimerazo in agarozno gelsko elektroforezo smo preučevali izražanje receptorja za transferin in epidermalni rastni dejavnik v keratinocitih HaCaT. S specifičnimi oligonukleotidi smo iz množice mRNA prisotnih v celicah pomnožili samo odseke, ki so specifični za Tfr in EGFR. Z uporabo aparata G/Box smo pod UV svetlobo opazovali fluorescentno označeno DNA. Pri identifikaciji lis, ki pripadajo Tfr in EGFR smo si pomagali z označevalcem velikosti.

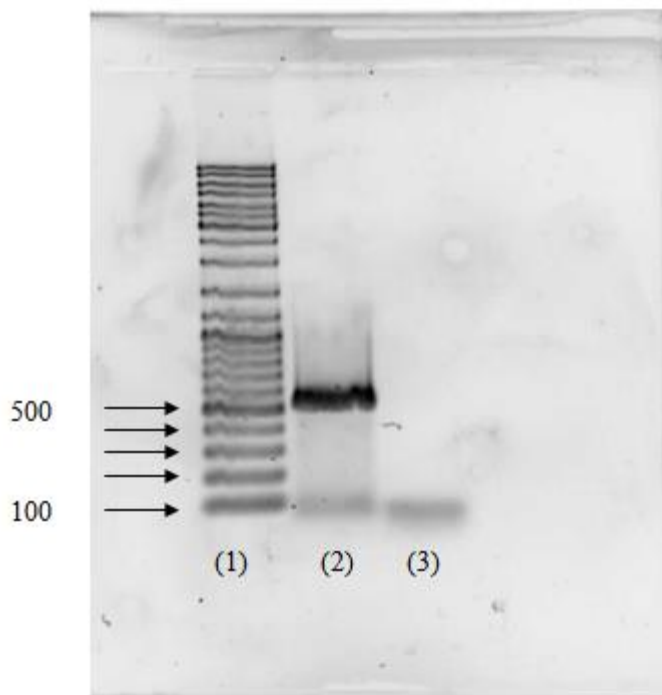




Slika 6: Izražanje receptorja za Tfr.

Kolone: (1) označevalec velikosti, (2) Tfr, (3) negativna kontrola.

Celice HaCaT izražajo receptor za transferin, kar dokazuje močno obarvana lisa pri približno 180 bp, kar ustreza pričakovani dolžini (slika 6). Vidna je samo ena lisa, kar pomeni, da smo z uporabljenimi začetnimi oligonukleotidi specifično pomnožili samo en produkt. Prva kolona prikazuje označevalec velikosti. Pri negativni kontroli se je pojavila ena lisa pri dolžini pod 100 bp. Ta predstavlja začetne oligonukleotide, ki se niso porabili pri PCR in so se zato obarvali z barvilom SYBR Gold, ki lahko obarva tudi majhne količine enoverižnih DNA. Milstone je v svoji raziskavi uporabil vzorec cDNA, ki je bil izoliran iz epidermisa. Z metodo PCR je pri 180 bp zaznal liso, ki potrjuje izražanje Tfr. Iz tega lahko potrdimo, da lisa, ki smo jo pri omenjeni dolžini bp zaznali mi, prav tako potrjuje izražanje Tfr (43).



Slika 7: Izražanje receptorja za EGFR.

Kolone: (1) označevalec velikosti, (2) EGFR, (3) negativna kontrola.

Celice HaCaT izražajo tudi receptor za epidermalni rastni dejavnik, kar dokazuje lisa malo višje od 500 bp in ustreza pričakovani dolžini 516 bp (slika 7). Pod to liso se je pojavila dodatna lisa, ki je najverjetneje (glede na dolžino) posledica ostankov oligonukleotidnih začetnikov, ki se niso v celoti porabili pri sintezi DNA. Na podobnem mestu se je pojavila lisa tudi pri negativni kontroli. Trditev, da lisa pri 516 bp res pripada EGFR, smo lahko potrdili iz do sedaj objavljenih ugotovitev. Bartlett s sodelavci je v svoji raziskavi sicer uporabil maligne tumorje, od katerih jih je bilo 70 % (53/76) pozitivnih za EGFR. Da maligni tumorji izražajo EGFR, so namreč ugotovili z detekcijo lise pri omenjeni dolžini baznih parov (44).

Mi smo prvi, ki smo uporabljali keratinocite, v katere bi želeli vnesti gene in ne drugih učinkovin. Ostali raziskovalci so namreč uporabili druge celice. Ugotovili so že, da različne celice na svoji površini izražajo EGFR in Tfr. Preko teh dveh receptorjev so v celice vnesli zdravilne učinkovine (39, 40, 45,). Mi smo potrdili izražanje omenjenih receptorjev na keratinocitnih celicah. Na podlagi že objavljenih raziskav lahko sklepamo, da obstaja tudi možnost vnosa genov preko EGFR in Tfr v keratinocitne celice.

## 4.2 Internalizacija nitastih bakteriofagov s prikazanimi peptidi z afiniteto do TfR

### 4.2.1 Priprava bakteriofagov in mikrobiološka titracija

Preglednica IV: Število modro obarvanih plakov na agarnem gojišču LB/IPTG/X-gal pri posamezni redčitvi in izračunana koncentracija bakteriofagov po pomnoževanju in izolaciji.

Bakteriofag	Faktor redčenja	Število plakov	Koncentracija bakteriofagov [pfu/mL]
T12	$10^6$	/	$1,13 \times 10^{12}$
	$10^7$	1514	
	$10^8$	74	
TUP	$10^6$	/	$1,89 \times 10^{12}$
	$10^7$	1353	
	$10^8$	242	
C34	$10^7$	671	$6,07 \times 10^{11}$
	$10^8$	55	
	$10^9$	6	
NL8	$10^7$	602	$1,3 \times 10^{12}$
	$10^8$	109	
	$10^9$	22	
L4	$10^7$	/	$6,38 \times 10^{12}$
	$10^8$	635	
	$10^9$	64	
M2	$10^8$	1022	$7,04 \times 10^{12}$
	$10^9$	69	
	$10^{10}$	4	

Bakteriofage smo pomnožili v bakterijah *E. coli* ER2738, izolirali iz gojišča in z mikrobiološko titracijo določili njihove koncentracije. Rezultati so podani v preglednici 4. Uporabili smo bakteriofagne klone: TUP, T12, C34, M2, NL8 in L4. TUP ima na svoji

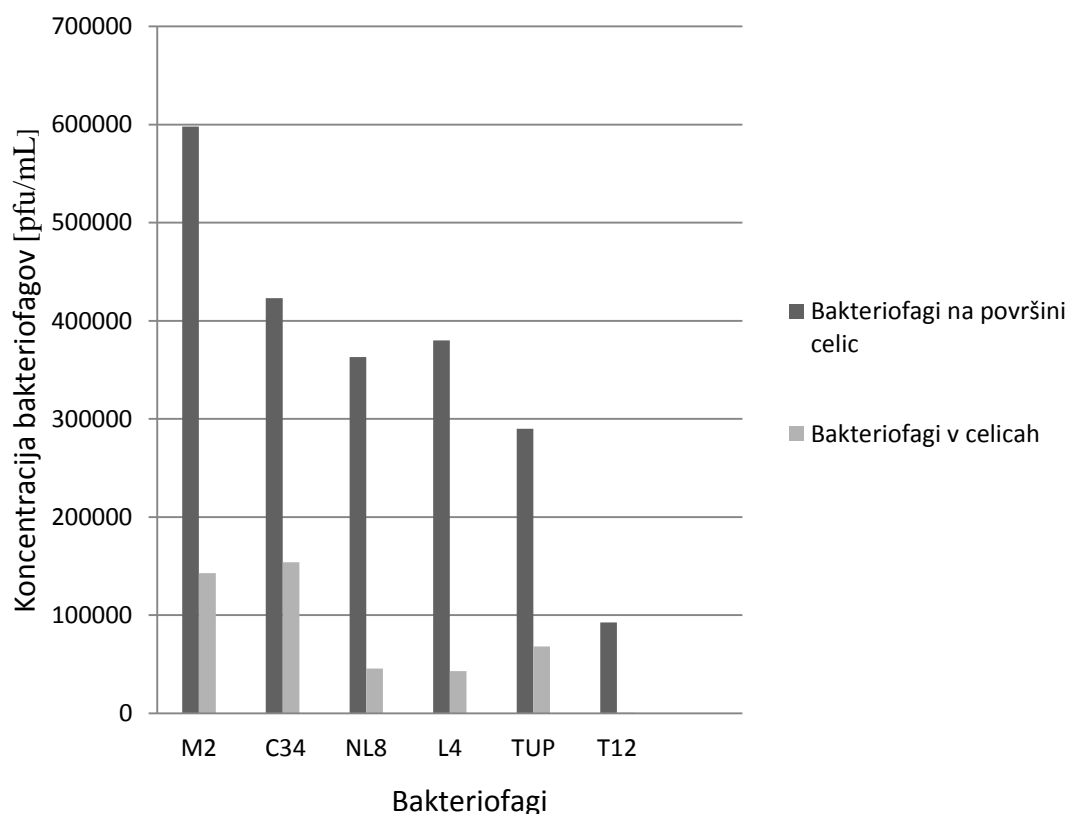
površini prikazan peptid HAIYPRH, T12 pa peptid THRPPMWSPVWP. Oba se vežeta na Tfr. C34, M2, NL8 in L4 smo uporabili kot negativne kontrole. C34 na svoji površini nima prikazanega peptida, M2 ima prikazan peptid CRMQMPSSC, NL8 peptid GLVDVLF in L4 peptid ASVQERK.

#### 4.2.2 Vezava bakteriofagov na površino in prehod v celice

Preglednica V: Koncentracija bakteriofagov v eluatih kislega spiranja (pokazatelj vezave na površino celic) in lizatih celic (pokazatelj prehoda v celico).

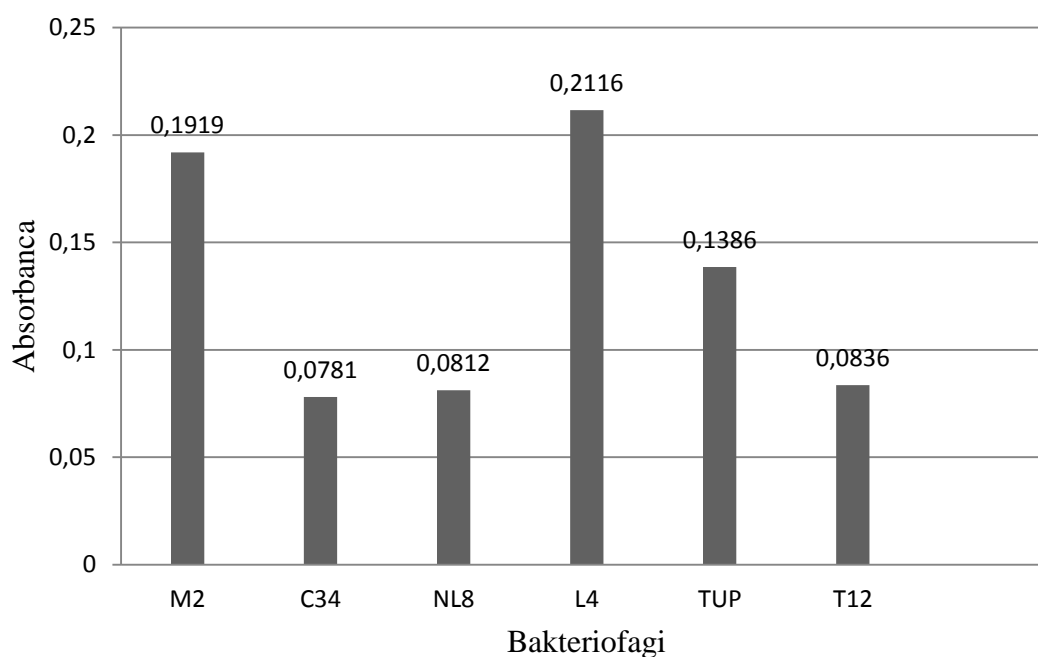
Bakteriofag	Bakteriofagi na površini celic			Bakteriofagi v celicah		
	Faktor redčenja	Število plakov	Konc. bakteriofagov [pfu/mL]	Faktor redčenja	Število plakov	Konc. bakteriofagov [pfu/mL]
M2	10 <sup>1</sup>	435	5,98×10 <sup>5</sup>	10 <sup>1</sup>	125	1,43×10 <sup>5</sup>
	10 <sup>2</sup>	66		10 <sup>2</sup>	16	
	10 <sup>3</sup>	7		/	/	
C34	10 <sup>1</sup>	559	4,23×10 <sup>5</sup>	10 <sup>1</sup>	167	1,54×10 <sup>5</sup>
	10 <sup>2</sup>	41		10 <sup>2</sup>	14	
	10 <sup>3</sup>	3		/	/	
NL8	10 <sup>1</sup>	339	3,63×10 <sup>5</sup>	10 <sup>1</sup>	41	4,55×10 <sup>4</sup>
	10 <sup>2</sup>	25		10 <sup>2</sup>	5	
	10 <sup>3</sup>	5		/	/	
L4	10 <sup>1</sup>	551	3,80×10 <sup>5</sup>	10 <sup>1</sup>	46	4,3×10 <sup>4</sup>
	10 <sup>2</sup>	39		10 <sup>2</sup>	4	
	10 <sup>3</sup>	2		/	/	
TUP	10 <sup>1</sup>	251	2,90×10 <sup>5</sup>	10 <sup>1</sup>	96	6,8×10 <sup>4</sup>
	10 <sup>2</sup>	32		10 <sup>2</sup>	4	
	10 <sup>3</sup>	3		/	/	
T12	10 <sup>1</sup>	48	9,27×10 <sup>4</sup>	10 <sup>1</sup>	1	5×10 <sup>2</sup>
	10 <sup>2</sup>	3		10 <sup>2</sup>	0	
	10 <sup>3</sup>	2		/	/	

Zanimalo nas je, ali se bakteriofaga z afiniteto do Tfr (TUP in T12) vežeta na površino keratinocitov in ali morda tudi prehajata v notranjost z receptorsko endocitozo. To smo preučevali s poskusom, v katerem smo bakteriofage (vse v enaki koncentraciji  $10^{10}$  pfu/vdolbinico) inkubirali v prisotnosti celic, nevezane bakteriofage sprali in tiste, ki so se vezali na površino celic, eluirali s kislim pufrom. Tako spiranje ni uničilo celic, zato smo v nadaljevanju istega poskusa celice še lizirali in s tem izolirali tiste bakteriofage, ki so prešli v notranjost celice. Število bakteriofagov, vezanih na površino (eluat, ki smo ga dobili s pufrom z nizkim pH) in v notranjosti celice (lizat celic), smo določili z mikrobiološko titracijo. Za primerjavo smo uporabili tudi negativne kontrole, bakteriofage, za katere smo pričakovali, da se ne bodo vezali na celice. Površina celic je zelo heterogena z vezavnimi proteini za številne molekule, zato je obstajala možnost, da bi se bakteriofag z naključno izbranim kontrolnim peptidom vezal na neznano vezavno mesto na celici. Da bi se temu izognili, smo v istem poskusu uporabili štiri različne negativne kontrole, kar nam je omogočilo, da smo za naslednje poskuse izbrali tistega z najnižjo afiniteto do celic.



Slika 8: Koncentracija vezanih bakteriofagov na površini celic in koncentracija bakteriofagov v celicah.

Izmed štirih bakteriofagov, ki smo jih uporabili za negativno kontrolo, smo najnižje koncentracije v eluatu in celičnem lizatu določili pri klonih L4 in NL8. Klona C34 in M2 sta izkazovala zelo visoko afiniteto, zato ju v nadaljnjih poskusih nismo več uporabljali. Pri klonu TUP smo zaznali nizko število bakteriofagov, vezanih na površino, vendar pa je bila koncentracija bakteriofagov v celičnem lizatu večja kot pri negativnih kontrolah L4 in NL8. To nakazuje boljši prehod tega bakteriofaga v celico, vendar pa je bila razlika manjša od pričakovane. Povsem nepričakovano pa smo zaznali precej nižje titre bakteriofaga T12. V istem poskusu smo bakteriofage, vezane na površino celice, detektirali tudi s protitelesi, pri absorbanci 450 nm. Višja kot je izmerjena absorbanca, več bakteriofagov je vezanih na površino celic. Rezultati, ki so prikazani v preglednici 6, niso povsem v skladu z rezultati mikrobioloških titracij. V tem primeru sta z močnim signalom izstopala klona M2 in L4. NL8 se je ponovno izkazal kot ustrezna negativna kontrola, zato smo v naslednjih poskusih uporabili tega. Signal bakteriofagnega klona TUP je bil v pričakovanem območju, T12 pa je ponovno nepričakovano izstopal z zelo nizkim signalom.



Slika 9: Vrednosti izmerjenih absorbanc za posamezne vzorce bakteriofagov.

Rezultati dobljeni s T12 in TUP se niso ujemali s podatki v literaturi, saj naj bi se oba klona močno vezala na Tfr, za katerega smo predhodno dokazali, da se izraža v uporabljeni celični liniji. Možen vzrok za odstopanja bi lahko bila napaka pri določanju koncentracije zaloge bakteriofagov in posledično napačne količine bakteriofagov v poskusih. Ponovili

smo titracije in ugotovili netočnost pri določanju koncentracije klonov T12 in TUP. Ponovno določene koncentracije so podane v preglednici 6.

Iz dosedanjih literaturnih podatkov vemo, da bakteriofaga TUP in T12 prehajata v celice. Ugotovili smo, da je možen tudi prehod ostalih bakteriofagov, ki so bili sicer mišljeni kot negativne kontrole in naj ne bi prehajali v celice. Možen vzrok je lahko prisotnost ostalih receptorjev na površini HaCaT celic, ki omogočajo njihov prehod v notranjost. Prav tako bi lahko na dobljene rezultate vplival razpad celic, kar bi pomenilo lažji vstop bakteriofagov, ki običajno ne bi prehajali v celice.

Preglednica VI: Ponovno določanje koncentracije zaloge bakteriofagov TUP in T12.

<b>Bakteriofag</b>	<b>Faktor redčenja</b>	<b>Število plakov</b>	<b>Koncentracija bakteriofagov [pfu/mL]</b>
T12	$10^7$	702	$4,34 \times 10^{11}$
	$10^8$	50	
	$10^9$	1	
TUP	$10^7$	1065	$1,38 \times 10^{12}$
	$10^8$	147	
	$10^9$	16	

### **4.3 Določanje prehajanja bakteriofagov v celice pri visoki in nizki gostoti**

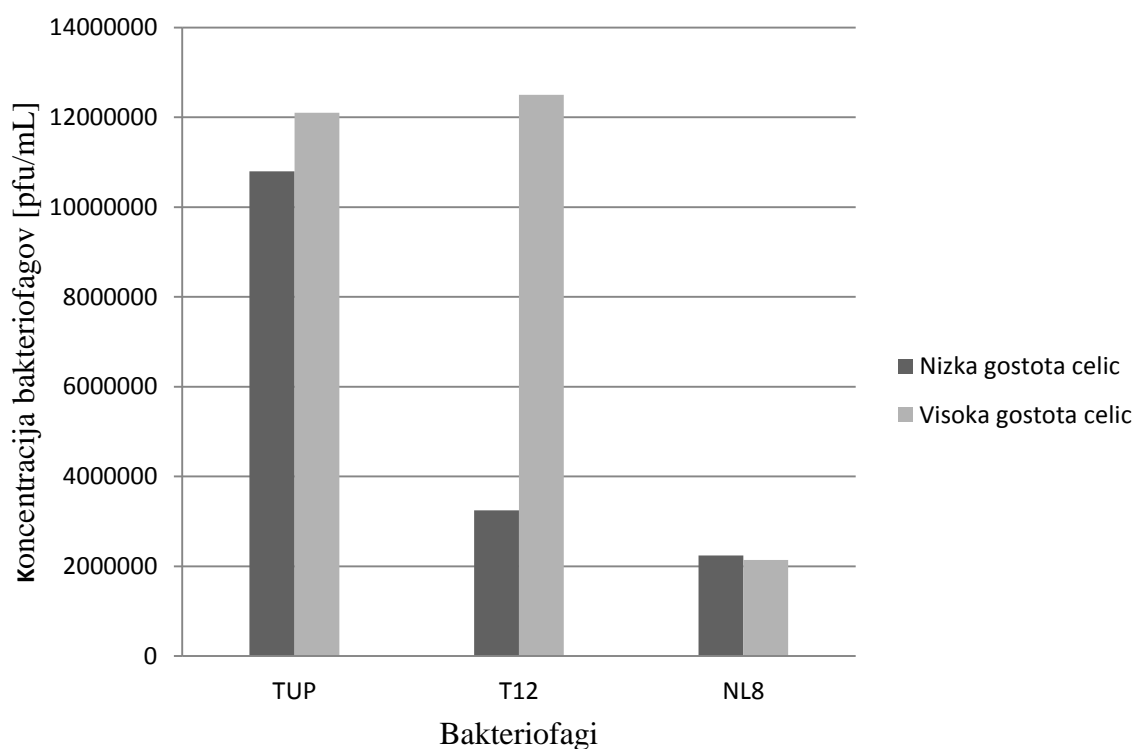
V drugem poskusu smo z mikrobiološko titracijo primerjali prehod bakteriofagov TUP, T12 in NL8 v celice HaCaT. Ugotavljali smo tudi, kako število celic HaCaT vpliva na vezavo bakteriofagov. Uporabili smo ploščo s šestimi vdolbinicami, v katerih smo predhodno namnožili celice v visoki (celice skoraj konfluentne) in nizki gostoti (posamične celice). Rezultati so predstavljeni v preglednici 7.

Ugotovili smo, da v celico prehaja veliko več bakteriofagov TUP kot pa kontrolnih bakteriofagov NL8. Pri tem gostota celic HaCaT ne igra bistvene vloge. Pri obeh je bila koncentracija bakteriofagov v celičnem lizatu praktično enaka pri visoki in pri nizki gostoti celic. Po drugi strani pa je bila razlika med T12 in NL8 precej manjša, se je pa močno

povečala pri visoki gostoti celic, kjer je v celico prešlo veliko več bakteriofaga T12 kot NL8. S tem smo potrdili, da lahko bakteriofaga TUP in T12 prehajata v celice HaCaT in da gostota celic vpliva na prehod T12, ne pa tudi na TUP.

Preglednica VII: Število bakteriofagov pri nizki in visoki gostoti HaCaT celic.

Bakteriofag	Nizka gostota celic			Visoka gostota celic		
	Faktor redčenja	Število plakov	Konc. bakteriofagov [pfu/mL]	Faktor redčenja	Število plakov	Konc. bakteriofagov [pfu/mL]
TUP	10 <sup>1</sup>	/	1,08×10 <sup>7</sup>	10 <sup>1</sup>	/	1,21×10 <sup>7</sup>
	10 <sup>2</sup>	1080		10 <sup>2</sup>	1208	
T12	10 <sup>1</sup>	1395	3,25×10 <sup>6</sup>	10 <sup>1</sup>	/	1,25×10 <sup>7</sup>
	10 <sup>2</sup>	511		10 <sup>2</sup>	1253	
NL8	10 <sup>1</sup>	1296	2,24×10 <sup>6</sup>	10 <sup>1</sup>	1409	2,14×10 <sup>6</sup>
	10 <sup>2</sup>	318		10 <sup>2</sup>	288	



Slika 10: Koncentracija bakteriofagov pri nizki in visoki gostoti celic HaCaT.



## 5 SKLEP

Odkriti učinkovit in varen dostavni sistem, s katerim bi v celice vnesli gene za zmanjšanje vnetja, bi pripomoglo k izboljšanju kvalitete življenja posameznikov z luskavico. Na naslednji stopnji pa moramo razmišljati, na kakšen način bi želene gene dostavili na tarčno mesto. V okviru diplomske naloge smo preučili le nekaj parametrov, ki pa bi bili lahko v pomoč v nadaljnjih študijah kompleksnega procesa.

Kot model smo uporabili celično linijo človeških keratinocitov HaCaT. Za začetek smo ugotovili, da omenjene celice na svoji površini izražajo EGFR in Tfr, na kar smo sklepali preko izražanja receptorjev na genskem nivoju. Preko omenjenih receptorjev bi lahko po mehanizmu receptorske endocitoze v celice dostavili želene gene za zmanjšanje vnetja. Pri tem smo kot primeren dostavni sistem preučevali šest različnih klonov (TUP, T12, C34, M2, NL8 in L4). TUP in T12 se vežeta na receptorja na površini celic in prehajata v njih, medtem ko so ostali (C34, M2, NL8 in L4) služili kot negativne kontrole. V eluatu, ki smo ga sprali s kislim pufrom, smo najnižje koncentracije ugotovili pri klonu NL8, zato smo ga v nadaljnjih poskusih uporabili kot najprimernejšo negativno kontrolo. Ugotovili smo, da v celice najboljše prehaja klon TUP, saj je bilo število bakteriofagov vezanih na površino tukaj najnižje. Z merjenjem absorbanca pri 450 nm smo potrdili, da je NL8 ustrezna negativna kontrola, saj je bila izmerjena absorbanca nizka. Prav tako se je izkazalo, da TUP najboljše prehaja v celice, saj smo tukaj izmerili najvišjo absorbanco. Ugotavljali smo tudi, kako število celic vpliva na prehod bakteriofagov v celice. Izkazalo se je, da lahko bakteriofaga TUP in T12 prehajata v celice HaCaT. Prav tako pa smo ugotovili, da gostota celic vpliva na prehod T12, ne pa tudi na TUP.

Z majhnim delom, narejenim v okviru diplomske naloge, smo prispevali k nadaljnjim študijam na področju zdravljenja luskavice. Z vnosom ustreznega gena za zmanjšanje vnetja pri luskavici v genom bakteriofaga in proučevanjem njegovega izražanja v tarčnih celicah bi lahko nadaljevali delo na tem področju. Za končno uspešno zdravljenje luskavice na omenjen način je potrebnih še veliko študij, katerim bodo znanstveniki v prihodnosti nedvomno namenili še veliko pozornosti.

## 6 VIRI

(1) Laws PM, Young HS: Current and emerging systemic treatment strategies for psoriasis. *Drugs* 2012; 72, 1867-1876.

(2) Arzenšek J: Eritematoskvamozne dermatoze. In: *Kožne in spolne bolezni*, Ljubljana, Združenje slovenskih dermatologov, 2002: 196–203.

(3) Christophers E: Psoriasis – epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 314–20.

(4) Langley RGB, Krueger GG, Griffiths CEM: Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2005; 64, 18-23.

(5) Day MS, Phil M, Nam D, Goodman S, Su EP, Figgie M: Psoriatic Arthritis. *American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2012; 20, 28-37.

(6) Christophers E, Mrowietz U. Psoriasis, In: Freedberg IM, Eisen AZ, eds, *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, Vol 1, New York, McGraw-Hill 1999: 495–521.

(7) Murphy G, Reich K: In touch with psoriasis: topical treatments and current Guidelines. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2011; 25, 3–8.

(8) Miljković J: Luskavica: etiologija in zdravljenje, *Farm vestn* 2006, 57: 106–9.

(9) Gottlieb AB: Psoriasis. Immunopathology and immunomodulation, *Dermatol Clin* 2001; 19: 649–57.

(10) Zhanga L, Yangb XQ, Chengc J, Huic RS, Gao TW: Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3+ Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clinical Immunology* 2010; 135:108–117.

- (11) Kristl J: Prevladujoče učinkovine za zdravljenje luskavice. Farm vestn 2006; 57: 196–202.
- (12) Cornell RC, Stoughton RB: Correlation of the vasoconstriction assay and clinical activity in psoriasis, Arch Dermatol 1985; 121: 63–7.
- (13) Perez A, Raab R, Chen TC, Turner A, Holick MF: Safety and efficacy of oral calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) for the treatment of psoriasis, Br J Dermatol 1996; 134: 1070–8.
- (14) Thomas J: Psoriasis: A closer look, Jaypee brothers medical publishers (P) Ltd., New Delhi, Indija, 2014: 76-86.
- (15) Chandraratna RA: Tazarotene—first of a new generation of receptor-selective retinoids, Br J Dermatol 1996; 135(Suppl 49): 18–25.
- (16) Japelj B, Pečar S: Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja, Farm Vestn 2006; 57: 131-139.
- (17) Perera GK, Ainali C, Semenova E, Hundhausen C, Barinaga, Kassen GD, Williams AE, Mirza MM, Balazs M, Wang X, Rodriguez RS, Alendar A, Barker J, Tsoka S, Ouyang W, Nestle FO: Integrative biology approach identifies cytokine targeting strategies for psoriasis. Science Translational Medicine 2014; 6: 1-11.
- (18) Vincent N, Ramya DD, Vedha HBN: Progress in psoriasis therapy via novel drug delivery systems. Dermatology reports 2014; 6: 14-18.
- (19) Cuatrecasas P, Roth T: Receptor-Mediated Endocytosis, Chapman and Hall Ltd, London, 1983: 145-146.
- (20) Haglund K, Dikic I: The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. Journal of Cell Science, 2012; 125: 265-275.

- (21) Deyrieux AF, Wilson VG: In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology* 2007; 54:77–83.
- (22) Heitner T, Moor A, Garrison JL, Marks C, Hasan T, Marks JD: Selection of cell binding and internalizing epidermal growth factor receptor antibodies from a phage display library. *Journal of Immunological Methods* 2001; 248 : 17–30.
- (23) Overbeck TR, Griesinger F: Two cases of psoriasis responding to erlotinib: time to revisiting inhibition of epidermal growth factor receptor in psoriasis therapy?. *Dermatology* 2012; 225:179–182.
- (24) Carpenter G, Cohen S: Epidermal growth factor. *The Journal of Biological Chemistry* 1990; 265: 7709-7712.
- (25) Stoll SW, Benedict M, Mitra R, Hiniker A, Elder JT, Nun G: EGF receptor signaling inhibits keratinocyte apoptosis: evidence for mediation by Bcl-XL. *Oncogene* 1998; 16:1493-1499.
- (26) Bazley LA, Gullick WJ: The epidermal growth factor receptor family. *Society for Endocrinology* 2005; 12: 17-27.
- (27) Goodsell DS: The Molecular Perspective: Epidermal Growth Factor. *The oncologist* 2003; 8: 496-497
- (28) Ferguson, K. M. A structure-based view of Epidermal Growth Factor Receptor regulation. *Annual Review of Biophysics* 2008, 37, 353-373.
- (29) Chen J, Gamou S, Takayanagi A, Shimizu N: A novel gene delivery system using EGF receptor-mediated endocytosis. *FEBS letters* 1994; 338: 167-169.
- (30) Larocca D, Witte A, Johnson W, Pierce GF, Baird A: Targeting bacteriophage to mammalian cell surface receptors for gene delivery. *Human Gene Therapy* 1998; 9: 2393-2399.

- (31) Larocca D, Burg MA, Jensen-Pergakes K, Prenn-Ravey E, Gonzalez AM, Beird A: Evolving Phage Vectors for Cell Targeted Gene Delivery. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2002; 3:45-57.
- (32) Larocca D, Jensen-Pergakes K, Burg MA, Baird A: Receptor-targeted gene delivery using multivalent phagemid particles. *Molecular Therapy* 2001; 3: 476-484.
- (33) Harford JB: *The molecular basis of blood diseases*, Stamatoyannopoulos, Philadelphia; 1994; 351-378.
- (34) Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, Woolston RE, Mason DY: Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *Journal of Clinical Pathology* 1983; 36: 539-545.
- (35) Milstone LM, Adams BD, Zhou J, Bruegel Sanchez VL, Shofner J: Stratum-Specific Expression of Human Transferrin Receptor Increases Iron in Mouse Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 2006; 126, 648-652.
- (36) Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, Holler E, Ljubimova JY, Helguera G, Penichet ML: The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1820: 291-317.
- (37) Reyes-López M, Piña-Vázquez C, Serrano-Luna J: Transferrin: endocytosis and cell signaling in parasitic protozoa. *BioMed Research International* 2014; 2015: 1-12.
- (38) Mackenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y: Intracellular Iron Transport and Storage: From Molecular Mechanisms to Health Implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10: 997–1030.
- (39) Lee JH, Engler JA, Collawn JF, Moore BA: Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor. *Eur J Biochem*. 2001; 268: 2004-2012.

- (40) Oh S, Kim BJ, Singh NP, Lai H, Sasaki T: Synthesis and anti-cancer activity of covalent conjugates of artemisinin and a transferrin-receptor targeting peptide. *Cancer Lett.* 2009; 274:33-9.
- (41) Bratkovič T, Preželj A: Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi. *Farm vestn* 2008; 59: 129-134
- (42) Gašperlin M, Lužar K: Utišanje genov za proznetne cytokine v keratinocitni celični liniji. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2012; 23-24.
- (43) Milstone ML, Adams BD, Zhou J, Bruegel-Sanchez VL, Shofner J: Stratum-specific expression of human transferrin receptor increases iron in mouse epidermis. *Journal of investigative dermatology* 2006; 126: 648-652.
- (44) Bartlett JMS, Langdon SP, Simpson BJB, Stewart M, Katsaros D, Sismondi P, Love S, Scott WN, Williams ARW, Lessels AM, Macleod KG, Smyth JF, Miller WR: The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer. *British journal of cancer* 1996; 73: 301-306.
- (45) Han L, Huang R, Liu S, Huang S, Jiang C: Peptide-conjugated PAMAM for targeted doxorubicin delivery to transferrin receptor over-expressed tumors. *Molecular Pharmaceutics* 2010; 7:2156-2165.