

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA GAŠPERLIN

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA GAŠPERLIN

**RAZVOJ OLIGONUKLEOTIDOV ZA RAZVOJ NOVE METODE ZA ZDRAVLJENJE
LUSKAVICE S POMOČJO PROTISMISELNE DNA**

DEVELOPMENT OF OLIGONUCLEOTIDES FOR THE DEVELOPMENT OF A NEW
METHOD FOR PSORIASIS TREATMENT USING ANTISENSE DNA TECHNOLOGY

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja in somentorstvom asist. dr. Matjaža Ravnikarja.

ZAHVALA

Iskrena hvala prof. dr. Borutu Štruklju za mentorstvo, vodenje skozi raziskovalno delo in vse spodbudne besede, ki jih nikoli ni zmanjkalo; asist. dr. Matjažu Ravnikarju za vso strokovno pomoč, posredovano znanje in nenehno razpoložljivost ter vsem sodelavcem Katedre za farmacevtsko biologijo, ki so vedno brez težav priskočili na pomoč.

Hvala vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi te naloge.

Najlepša hvala še moji družini in Tomiju, ki so mi ves čas študija stali ob strani, kar neizmerno cenim.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja in somentorstvom asist. dr. Matjaža Ravnikarja.

KAZALO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | UVOD..... | 1 |
| 1.1 | LUSKAVICA | 1 |
| 1.1.1 | Etiologija in patogeneza luskavice | 1 |
| 1.1.2 | Odziv vrste Th17 pri patogenezi luskavice | 2 |
| 1.2 | ZDRAVLJENJE LUSKAVICE..... | 4 |
| 1.2.1 | Lokalno zdravljenje | 5 |
| 1.2.2 | Fototerapija..... | 6 |
| 1.2.3 | Sistemsko zdravljenje | 7 |
| 1.2.4 | Biološko zdravljenje | 8 |
| 1.3 | TEHNOLOGIJA PROTISMISELNIH OLIGONUKLEOTIDOV..... | 10 |
| 1.3.1 | Mehanizem delovanja..... | 11 |
| 1.3.2 | Kemijske modifikacije oligonukleotidov | 12 |
| 1.3.3 | Dostava oligonukleotidov | 14 |
| 1.3.4 | Učinkovitost in varnost..... | 15 |
| 1.3.5 | Alicaforsen – primer uspešnega protismiselnega oligonukleotida pri zdravljenju luskavice | 16 |
| 2 | NAMEN DELA | 19 |
| 3 | MATERIALI IN METODE | 20 |
| 3.1 | DELO S CELICAMI | 20 |
| 3.1.1 | Vzpostavitev celične linije HaCaT | 21 |
| 3.1.2 | Imunska aktivacija celic | 23 |
| 3.1.3 | Izbira zaporedja protismiselnih oligonukleotidov | 23 |
| 3.1.4 | Transfekcija celic..... | 24 |
| 3.1.5 | Fluorescenčna mikroskopija | 24 |
| 3.2 | DOLOČANJE NIVOJA IZRAŽANJA TARČNIH GENOV..... | 25 |
| 3.2.1 | Izolacija celokupne RNA..... | 26 |
| 3.2.2 | Določitev količine RNA | 27 |
| 3.2.3 | Reverzna transkripcija | 28 |
| 3.2.4 | Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)..... | 29 |
| 3.2.5 | Izvedba reakcije PCR | 31 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4 | REZULTATI | 34 |
| 4.1 | Transfekcija celic HaCaT | 34 |
| 4.2 | Analiza izražanja tarčnih genov | 35 |
| 4.3 | Izbira referenčnega hišnega gena..... | 36 |
| 4.4 | Imunska aktivacija celic..... | 38 |
| 4.5 | Potencialna toksičnost transfekcijskega reagenta | 42 |
| 4.6 | Znižanje izražanja tarčnih genov s protismiselnimi oligonukleotidi | 43 |
| 4.6.1 | IL-23 | 43 |
| 4.6.2 | ICAM-1 | 44 |
| 4.6.3 | TNF- α | 45 |
| 4.6.4 | Keratin 17 | 47 |
| 5 | RAZPRAVA..... | 49 |
| 6 | SKLEP | 55 |
| 7 | LITERATURA | 57 |

POVZETEK

Luskavica je kronična vnetna bolezen kože, ki prizadene 2–3 % belske populacije. Je kompleksna polifaktorska genetska bolezen, katere vzrok še ni znan, na razvoj pa vplivajo številni genski, okoljski in imunski dejavniki. Luskavica močno zmanjšuje kakovost življenja, saj vpliva na funkcionalno, psihološko in sociološko stanje bolnika. Kljub množici zdravil je danes zdravljenje luskavice še vedno le delno uspešno in mnogokrat povezano z resnimi neželenimi učinki. Med najučinkovitejše štejemo zdravljenje z biološkimi zdravili.

Cilj našega raziskovalnega dela je postavitev temeljev za nadaljnji razvoj novega učinkovitega lokalnega biološkega zdravila za luskavico. Z uporabo protismiselnih oligonukleotidov lahko specifično vplivamo na utišanje genov za provnetne citokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17 in IL-23) in druge proteine, udeležene v bolezenskem procesu (ICAM-1 in keratin 17), ki imajo zaradi prevelike produkcije ključno vlogo v patofiziologiji luskavice. Protismiselni oligonukleotidi so kratki enoverižni deoksinukleotidi, dolgi od 18 do 25 baz, ki so komplementarni zaporedju na tarčni mRNA. Po specifični hibridizaciji preprečijo translacijo kodiranega proteina, s čimer se utiša izražanje tarčnega gena, delno pa je tako nastala RNA-DNA hibridna molekula podvržena tudi razgradnji z nukleazami.

Glede na novejša raziskava o ključni vlogi odziva vrste Th17 v imunopatogenem modelu luskavice, smo se osredotočili na citokin IL-23. Kot dodatne tarče smo izbrali še keratin 17, ICAM-1 in TNF- α . Za preizkušanje našega pristopa k zdravljenju smo razvili keratinocitni model luskavice *in vitro*. Po vzpostavitvi in optimizaciji celične linije HaCaT smo celice imunsko aktivirali, jih transfecirali s protismiselnimi oligonukleotidi ter spremljali nivoje tarčnih mRNA z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času.

Uspelo nam je znižati izražanje treh tarčnih genov od štirih. Najuspešnejši smo bili pri zniževanju izražanja IL-23, saj je bilo razmerje njegovega izražanja, glede na imunsko aktivirane celice po tretiranju s protismiselnim oligonukleotidom, le 0,31 v prvem preiskovanem vzorcu in 0,42 v drugem. Uspešno smo znižali še izražanje TNF- α (razmerje 0,60) in keratina 17 (razmerje 0,69), medtem ko nam pri ICAM-1 to ni uspelo (razmerje 1,12), in sicer zaradi eksperimentalno napačno uporabljenega zaporedja.

Glede na podatke v obstoječi literaturi, podkrepljene z našimi spodbudnimi rezultati, bi torej lahko z nadaljnjo optimizacijo pripravili lokalno biološko zdravilo, z učinkovitim in varnim protismiselnim oligonukleotidom, brez sistemske toksičnosti.

Ključne besede: luskavica, biološka zdravila, protismiselni oligonukleotidi, provnetni citokini, IL-23

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease affecting 2-3% of Caucasian population. It is a complex genetic disorder influenced by multiple genetic, environmental and immunologic factors. Its etiology is however yet unknown. Psoriasis drastically reduces the quality of life with its impact on physical, psychological and social wellbeing. Although numerous psoriasis treatments are available the efficiency is frequently non-satisfying and is associated with serious adverse effects. Biological treatment is considered to be the most effective.

The aim of the research is to contribute to the development of an effective topical biological drug for psoriasis treatment. Using antisense oligonucleotides we can specifically silence the over-expressed genes for proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17 and IL-23) and for other proteins involved in the disease process (ICAM-1 and keratin 17) playing a key role in the immunopathogenesis of psoriasis. Antisense oligonucleotides are short single-stranded deoxynucleotides of length 18–25 with their sequence complementary to the target mRNA. After specific hybridization with the target mRNA, the translation of coded protein is inhibited and the formed RNA-DNA hybrid is cleaved by the nucleases.

An increasing body of evidence suggests that the IL-23/Th17 pathway plays a dominant role in psoriasis pathogenesis. Therefore we decided to target IL-23, as well as keratin 17, ICAM-1 and TNF- α . Our study was performed on *in vitro* psoriasis model. Human keratinocyte cell line HaCaT was cultured, incubated with TNF- α for immune activation and then transfected with selected antisense oligonucleotides. Up- and down-regulation of target genes was measured by real-time polymerase chain reaction.

Down-regulation was achieved in three out of four targets with selected antisense oligonucleotides with the one targeting IL-23 being the most effective. Normalized expression ratio of IL-23 gene between the cells following antisense treatment and the immune activated cells was 0.31 in first experimental sample and 0.42 in the second. While we also down-regulated TNF- α (ratio 0.60) and keratin 17 (ratio 0.69), we observed no significant down-regulation by using antisense ICAM-1 oligonucleotide (ratio 1.12) due to error in the used sequence.

Considering the existing research results supported by our own work, further optimised topically applied antisense oligonucleotides can be developed and used in the future for effective and safe treatment of psoriasis, without causing any systemic toxicity.

Key words: psoriasis, biological drugs, antisense oligonucleotides, proinflammatory cytokines, IL-23

RAZLAGA KRATIC

2'-MOE – 2'-O-metoksietilni oligonukleotidi

2'-OME – 2'-O-metilni oligonukleotidi

A_{260nm} – absorbanca pri 260 nm

A_{280nm} – absorbanca pri 280 nm

ACTB – gen za beta aktin

ASO – protismiselni oligonukleotid, angl. *antisense oligonucleotide*

AUC – površina pod krivuljo, angl. *area under the curve*

B2M – gen za β₂ mikroglobulin

CD – označevalec pripadnosti, angl. *cluster of differentiation*

CpG – citozin, ki mu sledi gvanin v zaporedju enoverižne molekule DNA

Ct – prazni cikel, angl. *threshold cycle*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dNTP – deoksinukleotid trifosfat

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

EMA – Evropska agencija za zdravila, angl. *European Medicines Agency*

FBS – fetalni goveji serum

FDA – Ameriška agencija za hrano in zdravila, angl. *Food and Drug Administration*

GAPDH – gen za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazo

HLA – človeški levkocitni antigen, angl. *human leukocyte antigen*

HPRT1 – gen za hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferazo

ICAM-1 – intracelularna adhezijska molekula-1

IFN-γ – interferon-γ

IgG – imunoglobulin G

IGRS – angl. *Investigator's Global Response Score*

IL – interlevkin

IL-13 – interlevkin-23

KER 17 – keratin 17

LNA – premrežene nukleinske kisline

LPS – lipopolisaharid

MF – morfolino fosforoamidati

NICE – National Institute for Health and Care Excellence

NSO – naključni nespecifični oligonukleotid, angl. *nonsense oligonucleotide*

PBS – fosfatni pufer, angl. *phosphate buffered saline*

PCR – verižna reakcija s polimerazo

PNA – peptidne nukleinske kisline

PUVA – psoralen in UVA

qPCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času, angl. *quantitative real time polymerase chain reaction*

PS – fosforotioatni oligonukleotidi

RORC – angl. *RAR-related orphan receptor- γ*

STAT – angl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*

σ – standardni odklon

Tc – citotoksične celice T

TCR – T-celični receptor, angl. *T-cell receptor*

Th – celice T pomagalke, angl. *T helper cells*

TLR – angl. *Toll-like receptor*

TNF- α – dejavnik tumorske nekroze- α

UV – ultravijolično

YWHAZ – gen za protein 14-3-3 zeta/delta

1 UVOD

1.1 LUSKAVICA

Luskavica ali *psoriza* je razširjena kronična vnetna bolezen kože, ki je pogojena s številnim genskimi, imunskimi in okoljskimi dejavniki. Prizadene 2-3 % belske populacije. Klinično se najpogosteje manifestira kot odebeljene, rdečkaste kožne lezije, ki so prekrte s srebrno-belimi luskami, in so lahko boleče in srbeče. To najpogostejšo obliko luskavice, imenovano luskavica v plakah ali *psoriasis vulgaris*, ima od 80 do 90 % vseh bolnikov. Gre za zelo heterogeno bolezen, ki se klinično izraža v različnih oblikah. Poznamo še gutatno, inverzno, pustulozno in eritrodermično luskavico (1).

Luskavične spremembe so okarakterizirane z določenimi histološkimi spremembami, kot so zadebeljen epidermis (akantoza) zaradi hitre proliferacije keratinocitov, stanjšana ali odsotna granularna plast (hipogranuloza) in prisotnost jeder v korneocitih zaradi odsotnosti diferenciacije keratinocitov, dilatacija krvnih žil ter prisotnost vnetnega infiltrata, ki ga predstavljajo skupki CD4+ celic T pomagalk in antigen predstavitevni dendritični celic v dermisu ter skupki CD8+ celic T in nevtrofilcev v epidermisu (2). Glede na obseg spremenjene kože, v primerjavi s celotno telesno površino, ocenimo resnost bolezni, in sicer od blage, zmerne in težje do zelo težke oblike (PGA, *Physician's Global Assessment*). Poleg tega je pomembno tudi mesto kožnih sprememb, kar dodatno upošteva indeks PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) (3). Poleg neprijetnih in bolečih kožnih sprememb bolniki z luskavico, predvsem tisti s težjimi oblikami, pogosto obolevajo še za psoriaznim artritidom in se soočajo z večjim tveganjem za razvoj kardiovaskularnih bolezni, diabetesa in depresije. Zato ima luskavica velik vpliv na funkcionalno, psihološko in socialno kakovost življenja (4).

1.1.1 Etiologija in patogeneza luskavice

Luskavica je kompleksna vnetna bolezen, katere vzrok še ni čisto razjasnjen. Gre za polifaktorsko genetsko bolezen, na razvoj katere vplivajo številni genski, okoljski in imunski dejavniki (2).

Na podlagi dejstva, da so otroci staršev, obolelih za luskavico, pogosteje zboleli za luskavico in da je konkordanca večja pri enojajčnih dvojčkih, so z analizo genske povezanosti ugotovili povezanost luskavice z določenimi genskimi lokusi, PSORS 1–10 (2, 5). Najmočnejša genetska determinanta za pojavnost luskavice je na lokusu 6p21

krajšega kraka kromosoma 6, imenovanem PSORS 1, ki se nahaja znotraj genskega področja poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa oz. regije HLA (angl. *human leukocyte antigen*; človeški levkocitni antigen). Kasneje so z asociacijsko analizo celotnega genoma potrdili povezanost alela HLA-Cw6 z luskavico *tipa I*, za katero je značilno, da se pojavi pred 40. letom starosti, se bolj deduje v družini in se resneje klinično izrazi (2). Vendar pa je penetranca lokusa PSORS 1 ocenjena le na približno 15 %, kar podkrepi razmišljanja, da je v nastanek te bolezni vpletenih več genetskih oz. okoljskih dejavnikov (6). Ostali genski lokusi, ki jih omenjajo v povezavi s pojavnostjo luskavice, so: PSORS 2 (17q25), PSORS 3 (4q34), PSORS 4 (1q21), PSORS 5 (3q21), PSORS 6 (19p13), PSORS 7 (1p32), PSORS 8 (16q), PSORS 9 (4q31) in PSORS 10 (18p11) (2, 7). Odkrili so tudi značilne korelacije z genskimi regijami, ki kodirajo proteine v vnetnih procesih in korelacije z geni, ki kodirajo obrambne proteine v epidermisu (DEFB4 in LCE3C/3D) (2).

Luskavico lahko izzove ali poslabša več okoljskih dejavnikov. Pogosto omenjajo okužbe (npr. s streptokokom, stafilokokom in HIV-om), uporabo določenih zdravil, npr. antagonistov receptorjev β in antimalarikov, pa tudi stres ali poškodbe kože (2).

Klinična slika luskavice je posledica imunskih procesov v koži, zato lahko rečemo, da ima imunski sistem glavno vlogo v njeni patogenezi. Včasih je prevladovalo mnenje, da so celice T pomagalk (Th1, angl. *T helper cells*) odgovorne za začetek in vzdrževanje nenehno potekajočega vnetja. Po nedavnem odkritju njihove nove subpopulacije celic Th17 in njihove ključne vloge v avtoimunskih boleznih, se je prej dobro uveljavljen Th1 imunopatogeni model luskavice dopolnil s potjo IL-23/Th17. Boljše razumevanje poteka vnetnega procesa luskavice pa seveda omogoča tudi nove, učinkovitejše pristope k zdravljenju (7).

1.1.2 Odziv vrste Th17 pri patogenezi luskavice

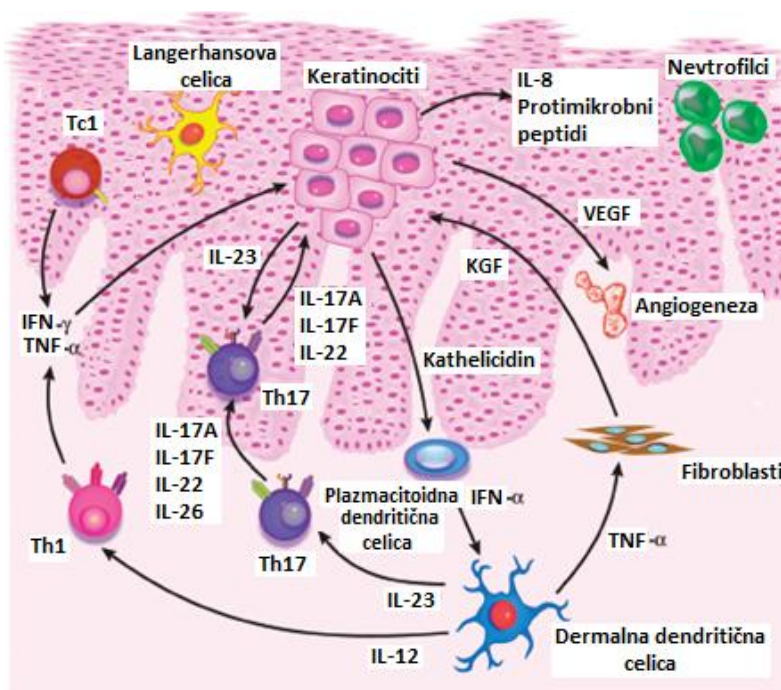
Po diferenciaciji naivnih celic Th v linijo Th17, vezava IL-23 na receptorje, izražene na površinah teh celic, spodbudi proizvodnjo IL-17A in IL-17F, IL-26, IL-6, IL-21, TNF- α ter IFN- γ . Končno diferencirane Th17 celice pa proizvajajo IL-22. Družina citokinov IL-17 šteje šest citokinov, in sicer od IL-17A do IL-17F. Čeprav celice Th17 proizvajajo večino IL-17A, ta nastaja tudi v citotoksičnih CD 8+ celicah T (Tc, angl. *cytotoxic T cells*), nekonvencionalnih limfocitih T z $\gamma\delta$ T-celičnimi receptorji (TCR, angl. T-cell receptor) in naravnih celicah ubijalkah. Citokin IL-17F je podoben IL-17A. Oba delujeta provnetno, saj inducirata izražanje provnetnih citokinov, kemokinov, metaloproteinaz in kolonije stimulirajočih dejavnikov ter stimulirata kemotakso

nevtrofilcev (8, 9). O IL-17B, C in D, ki ne nastajajo v celicah T, pa je le malo znanega. Ugotovili so, da IL-17E, ki so ga sicer preimenovali v IL-25, zavira diferenciacijo Th17. Citokin IL-22 ne deluje na imunske celice, temveč na celice kože, ledvic, prebavnega in respiratornega trakta, ki mejijo na zunanost. Promovira protimikrobno obrambo organizma, ščiti tkiva pred poškodbami in sodeluje pri reorganizaciji epitelija in endotelija (8).

Vloga IL-23, celic Th17 in z njimi povezanih citokinov pri kroničnih vnetnih avtoimunskih boleznih je ključna tudi pri luskavici, kar so potrdili s pomočjo različnih študij *in vitro* ter *in vivo* na miših in na ljudeh. V plakih so našli povečane koncentracije IL-23, IL-17 in IL-22 v primerjavi z zdravo kožo. Intradermalna injekcija IL-23 v miših povzroči simptome luskavice. Citokin IL-23 torej vpliva na epidermalno hiperplazijo, akantozo, hiperparakeratozo in ortohiperkeratozo. Dodaten dokaz za vpletenost tega citokina v imunopatogenezo bolezni predstavljajo študije gena za IL-23R, ki so odkrile določene polimorfizme posameznih nukleotidov, ki so povezani z luskavico. Mutacija, katere posledica je zamenjava arginina z glutaminom na mestu 381, pa ima zaščitno vlogo pri razvoju bolezni. Povečane koncentracije IL-17 so pri pacientih z luskavico zaznali samo v plakih, ne pa tudi v serumu, kar nakazuje na njihovo lokalno proizvodnjo v celicah Th17, infiltriranih v prizadeto kožo (8).

Na podlagi orisanih podatkov se je izoblikoval nov imunopatogenetski model luskavice, ki združuje mehanizme imunskih odzivov Th1 in Th17 (*Slika 1*). Kaj točno sproži vnetje, pa še ni čisto razjasnjeno. Pri dovzetnih posameznikih naj bi že poškodba ali okužba kože stimulirala keratinocite, da začnejo izločati protimikrobno delujoči katelicidin (LL-37), ki aktivira dendritične celice v dermisu (2). Aktivirane dendritične celice proizvajajo IL-23, ki omogoči aktivacijo celic Th17. Aktivirane celice Th17 začnejo nato proizvajati provnetne citokine, kot so IL-17A, IL-17F, IL-22 in IL-26. Prvi trije omenjeni citokini delujejo na keratinocite, tako da sprožijo epidermalno hiperplazijo, akantozo in hiperparakeratozo. Aktivirane dendritične celice sproščajo tudi IL-12, ki vodi v diferenciacijo celic vrste Th1. Tako limfociti Th1 kot Tc1 proizvajajo IFN- γ in TNF- α , ki ravno tako delujeta provnetno. TNF- α stimulira tudi izločanje keratinocitnega rastnega dejavnika iz fibroblastov, kar še dodatno vpliva na hiperproliferacijo keratinocitov. Aktivirani keratinociti pa nadalje proizvajajo IL-23, ki skupaj s tistim iz dendritičnih celic spodbuja sproščanje citokinov iz celic Th17. Pod vplivom celic Th17 keratinociti izločajo še kemokin IL-8 in protimikrobne peptide, ki rekrutirajo nevtrofilce na mesto vnetja, katelicidin za aktivacijo plazmacitoidnih dendritičnih celic ter žilni endoteljski rastni

dejavnik (VEGF), ki spodbuja angiogenezo. Vsi ti procesi torej privedejo do značilne klinične slike luskavice. Signalna pot IL-23/Th17 predstavlja tudi novo terapevtsko tarčo za bolj specifično in bolj učinkovito zdravljenje luskavice (2, 8). Na trgu je dostopno protitelo ustekinumab, usmerjeno proti skupni podenoti p40 IL-23 in IL-12, ki se je za enkrat izkazalo za učinkovito in varno pri zdravljenju srednje hude do hude oblike luskavice (10). Poleg IL-23 lahko neposredno ciljamo IL-17, receptorje IL-17R, druge provnetne molekule vpleteno v odziv Th17 (IL-6, IL-1 β , TNF- α) ali pa specifične transkripcijske dejavnike za Th17 (RORC 2, STAT3) (9).



Slika 1 Shema imunopatogenega modela luskavice. Th – celice T pomagalke, Tc – citotoksične celice T, IL – interlevkin, KGF – keratinocitni rastni dejavnik, VEGF – žilni endotelijski rastni dejavnik, IFN- γ – interferon γ , TNF- α – dejavnik tumorske nekroze α . Povzeto po (8).

1.2 ZDRAVLJENJE LUSKAVICE

Za zdravljenje luskavice oziroma lajšanje težav, ki jih ta povzroča, so na voljo številne različne terapevtskih možnosti, pri čemer pa vse le blažijo simptome in ne odpravljajo bolezenskega stanja. Sam vzrok bolezni pa je še nepoznan. Kljub določenim smernicam zdravljenja, je potrebno to individualizirati glede na klinično sliko luskavice, razširjenost in lokacijo kožnih sprememb, starost in spol, pridružene bolezni in učinkovitost predhodnega zdravljenja. Luskavica ima močan vpliv na kakovost življenja bolnikov, zato je ključno, da zdravnik poišče najprimernejše učinkovito zdravilo ali ustrezno kombinacijo le-teh (4, 11, 12).

Skladno z najnovejšimi smernicami (NICE, 2013) se kot zdravila prvega izbora še vedno uporabljajo dermalni pripravki za lokalno zdravljenje, ki vsebujejo kortikosteroide, vitamin D in njegove analoge, ditranol, salicilate ali katran. Kot zdravljenje drugega izbora uporabljajo fototerapijo in sistemsko zdravljenje z metotreksatom, ciklosporinom ali acitretinom. Med zdravila tretjega izbora pa sodijo novejša biološka zdravila (adalimumab, etanercept, infliksimab in ustekinumab), ki se torej uporabljajo za hujše oblike luskavice in psoriazni artritis (4, 13).

1.2.1 Lokalno zdravljenje

Ameriške smernice za zdravljenje luskavice navajajo, da lahko pri približno 80 % bolnikov, ki trpijo za blago do zmerno obliko bolezni, to lahko zadovoljivo obvladamo z lokalnim zdravljenjem (14). Zaradi prednosti lokalnega zdravljenja pred sistemskim so učinkovine za dermalno uporabo še vedno prvi izbor zdravljenja.

Najpogosteje se uporabljajo analogi vitamina D in kortikosteroidi, ki imajo enako učinkovitost pri zdravljenju kronične luskavice v plakih. Njihovi sinergistični komplementarni učinki doprinesejo k večji učinkovitosti in manjši toksičnosti zdravljenja (15). Vitamin D in njegovi analogi (kalcipotriol, maksakalcitol, takalcitol in kalcitriol) so učinkoviti pri zaviranju proliferacije keratinocitov in spodbujanju njihove diferenciacije, hkrati pa delujejo tudi na imunski sistem. Veliko se uporablja analog kalcipotriol, ki ima enak antipsoriatični učinek kot vitamin D, le da je njegov vpliv na metabolizem kalcija v telesu izrazito manjši (16). Lokalni kortikosteroidi delujejo protivnetno, imunosupresivno, antiproliferativno in vazokonstriktorno, kar skupno prispeva k njihovem antipsoriatičnemu delovanju. Spodbudijo prepisovanje protivnetnih genov in zavirajo prepisovanje provnetnih. Hkrati zavrejo tudi zorenje, diferenciacijo in proliferacijo imunskih celic ter zmanjšajo dilatacijo kapilar. Uporabljamo lahko kortikosteroide z zmernim (alklometazon, hidrokortizonbutirat,...), z močnim (betametazon, mometazon,...) ali z zelo močnim učinkom (klobetazon), odvisno od izražene klinične slike (17). Lokalni neželeni učinki kortikosteroidov niso redki. Najpogosteje se pojavijo atrofija kože, strije in upočasnjeno celjenje ran, neredko pa tudi nenormalna poraščenost telesa, steroidne akne, perioralni dermatitis, rdečica, pikčaste krvavitve in razpokane krvne kapilare v podkožju. Lokalnih kortikosteroidov ne smemo nanašati na okužene plake zaradi njihovega imunosupresivnega delovanja. Pri njihovi pogosti in dolgotrajni uporabi, kot je to pri kroničnem zdravljenju luskavice, pa omenjeni lokalni neželeni učinki predstavljajo resen problem. Hkrati pa pri dolgotrajni uporabi velikih koncentracij kortikosteroidov z močnim učinkom, uporabljenih

na večjih površinah telesa (>10 % telesne površine), lahko pride tudi do sistemske absorpcije in pojava neželenih sistemskih učinkov. Zaradi imunosupresivnega učinka se lahko pojavijo oportunistične in glivične okužbe in izbruhi prej latentnih okužb z virusi. Zaradi delovanja na endokrini sistem se lahko razvije sladkorna bolezen, pride do zaviranja hipotalamične-hipofizne-adrenalne osi, Cushingovega sindroma ali osteoporoze. Neželeni učinki na kardiovaskularni sistem zajemajo hiperkoagulabilno stanje krvi, hipertenzijo in dislipidemijo. Kortikosteroidi lahko povzročijo tudi ponovni izbruh obstoječih psihiatričnih motenj (18). Pri tem moramo upoštevati še dejstvo, da je luskavica povezana s povečano komorbidnostjo kardiovaskularnih boleznih, metabolnega sindroma in depresije, in sicer zaradi nenehnega potekajočega vnetja v telesu (19). Analogi vitamina D za lokalno zdravljenje luskavice imajo veliko ugodnejši varnostni profil kot kortikosteroidi (14). Pri velikih uporabljenih količinah analogov vitamina D (več kot 100 g na teden) lahko pride do hiperkalcemije, čeprav je njihov učinek na metabolizem kalcija precej manjši kot pri vitaminu D (20). V primerjavi z lokalnimi kortikosteroidi pa je verjetnost pojava lokalnih neželenih učinkov, kot sta draženje in pekoč občutek v koži, ob uporabi analogov vitamina D, večja. Veliko bolnikov posledično preneha uporabljati ta zdravila (15).

Ostali lokalni antipsoriatiki, kot so salicilna kislina, ditranol, pripravki iz katrana in tazaroten, pa se precej manj uporabljajo. Salicilna kislina, ki deluje keratinolitično, se uporablja v kombinaciji s kortikosteroidi. Zmanjša namreč povezave med korneociti, kar omogoča učinkovitejši prodor kortikosteroidov v kožo. Ditranol zavira hiperproliferacijo keratinocitov in deluje protivnetno. Gre za radikalski mehanizem, ki deluje na več celičnih struktur (interakcija z DNA, zaviranje encimov in okvara membranskih lipidov). Na obolelo mesto ga nanesemo samo za kratek čas, od 5 do 15 minut, s čimer zmanjšamo možnost vnetja okoliške zdrave kože, ki je posledica agresivnega radikalskega mehanizma delovanja. Katran je najstarejša antipsoriatična učinkovina, uporaba katere pa se opušča zaradi potencialne kancerogenosti. Zavirajo sintezo DNA, s čimer zavirajo hiperproliferacijo keratinocitov (21). Tazaroten, je sintezni analog retinoidov. Deluje tako, da se veže na jedrne retinoidne receptorje in normalizira diferenciacijo keratinocitov, zavira njihovo hiperproliferacijo ter deluje protivnetno. Uporablja se lahko tudi v kombinaciji z lokalnimi kortikosteroidi (22).

1.2.2 Fototerapija

Fototerapija luskavice je že dolgo uporabljana oblika zdravljenja, ki pride v poštev, ko samo lokalno zdravljenje ni uspešno (4). Pri tem uporabljamo žarke UV svetlobe, in

sicer široko pasovno sevanje UVB (290–320 nm, vrh pri 313 nm), nizko pasovno sevanje UVB (311–313 nm) ali pa sevanje UVA (320–400 nm, vrh pri 352 nm) v kombinaciji s psoralenom (PUVA, t.i. *fotokemoterapija*) (23). Po najnovejših smernicah je priporočena uporaba ozko pasovnega sevanja UVB, ki je v primerjavi s sevanjem UVA varnejše (4). Natančen mehanizem fototerapije še ni čisto razjasnjen. Možni mehanizmi so apoptoza keratinocitov, apoptoza limfocitov T, zaviranje povišanega izražanja ICAM-1, zmanjšanje odziva vrste Th17 ali pa znižanje izražanja IL-10 in posledično zmanjšanje IFN- γ signalne poti, skupaj s provnetnimi citokini IL-12, IL-18 in IL-23. Pri fotokemoterapiji PUVA nastane med psoralenom in DNA fotokonjugat, kar vodi v zaviranje sinteze DNA in celične proliferacije. Pri tem nastajajo tudi reaktivne kisikove zvrsti, ki povzročijo apoptozo Langerhansovih celic, keratinocitov in limfocitov (23).

Sevanje UVB je sicer manj učinkovito od zdravljenja PUVA, ampak je precej varnejše in ga zato lahko kombiniramo z ostalimi načini zdravljenja. Sočasna lokalna aplikacija tazarotena pred obsevanjem, lokalna aplikacija kalcipotriola po obsevanju, uporaba emoliensov, kratkotrajna kombinacija s sistemskim metotrekstatom ali kombinacija s sistemskim retinoidom povečajo učinkovitost fototerapije luskavice. Pozorni moramo biti predvsem na seštevanje celokupne fototoksične doze pri večkratnih izpostavitvah sevanju UV (23).

1.2.3 Sistemsko zdravljenje

Za sistemsko zdravljenje z nebiološkimi zdravili se odločimo, ko luskavice ne moremo obvladovati z lokalnim zdravljenjem, ko ta zajame več kot 10 % telesne površine ali se pojavi na nohtih, obrazu, dlaneh, stopalih, lasišču ali genitalijah in ko pomembno vpliva na bolnikovo fizično, psihično in socialno dobro počutje. Primerno je tudi za zdravljenje luskavice, pri kateri s fototerapijo nismo dosegli želene učinkovitosti ali ko pride do hitrega relapsa bolezni. Metotreksat je zdravilo prvega izbora. V primeru kontraindikacij, načrtovanega spočetja (pri ženskah in moških), palmoplantarne pustuloze (t.j. pustulozna oblika luskavice, ki prizadene kožo dlani in podplatov) ali pa če želimo v kratkem času obvladati nenaden izbruh luskavice, pa je zdravilo prvega izbora ciklosporin. Kadar je učinek z metotreksatom nezadosten, preidemo na ciklosporin, in obratno. Uporablja se še acitretin, ko prej omenjeni zdravili nista zadosti učinkoviti ali v primeru pustulozne oblike luskavice (4).

Metotreksat, kot analog folne kisline, kompetitivno zavira encim dihidrofolat-reduktazo, s čimer prepreči redukcijo dihidrofolata v tetrahidrofolat. Posledično sta

onemogočeni *de novo* sinteza DNA in celična delitev. Na ta način prepreči hiperproliferacijo keratinocitov in sproži njihovo apoptozo. Poleg tega deluje imunosupresivno, saj zavira proliferacijo limfocitov T in B, zavira nastanek provnetnih citokinov in inhibira kemotakso nevtrofilcev in monocitov (24). Najpogostejši takojšnji neželeni učinki, kot so slabost, bruhanje in omotičnost, so odvisni od odmerka in jih lahko preprečimo s sočasnim dodajanjem folne kisline. S tem tudi preprečimo njegovi toksično delovanje na kostni mozeg in nastanek megaloplastne anemije. Dolgotrajno jemanje metotreksata poveča verjetnost za nastanek jetrne fibroze, zato moramo pri bolnikih pred začetkom zdravljenja in med njim redno izvajati teste jetrnih funkcij (4, 24).

Ciklosporin je učinkovit imunosupresiv, ki zmanjšuje aktivnost limfocitov. Imunosupresivno deluje z vezavo na citoplazemski protein ciklofilin A, nastali kompleks pa se veže na kalcinevrin, pri čemer zavira njuno aktivnost. Kalcinevrin spodbuja nastanek provnetnih citokinov, predvsem IL-2. Ciklofilin A pa spodbuja kemotakso nevtrofilcev in eozinofilcev. Med resnejše neželene učinke ciklosporina prištevamo nefrotoksičnost in hipertenzijo. Tako kot ostali imunosupresivi poveča verjetnost nastanka kožnega raka in drugih malignih obolenj (25).

Sintetični retinoid acitretin normalizira proliferacijo epidermalnih celic, njihovo diferenciacijo in poroženevanje. Po vezavi na retinoidne jedrne receptorje uravnava izražanje genov, pri čemer vloga acitretina v retinoidni celični poti še ni čisto razjasnjena. Deloval naj bi imunomodulatorno, in sicer preko inhibicije endotelijskih celic in migracije nevtrofilcev. Ker gre za zelo teratogeno učinkovino, se ga ne sme predpisovati ženskam, ki so noseče ali želijo zanositi. Neželeni učinki so suha koža, izsušenost sluznic, fototoksičnost, hepatotoksičnost in hiperlipidemija (26).

Pri uporabi vseh trenutno dostopnih sistemskih zdravil za zdravljenje luskavice so na dolgi rok prisotne določene toksičnosti. Ker gre pogosto za toksičnost, odvisno od odmerka, so priporočljive rotacije zdravljenja, četudi zaenkrat ni dokazov, da lahko na ta način omilimo neželene učinke. Najustreznejše so kombinacije vzdrževalnega lokalnega zdravljenja in sistemskega zdravljenja, ko se bolezensko stanje poslabša (27).

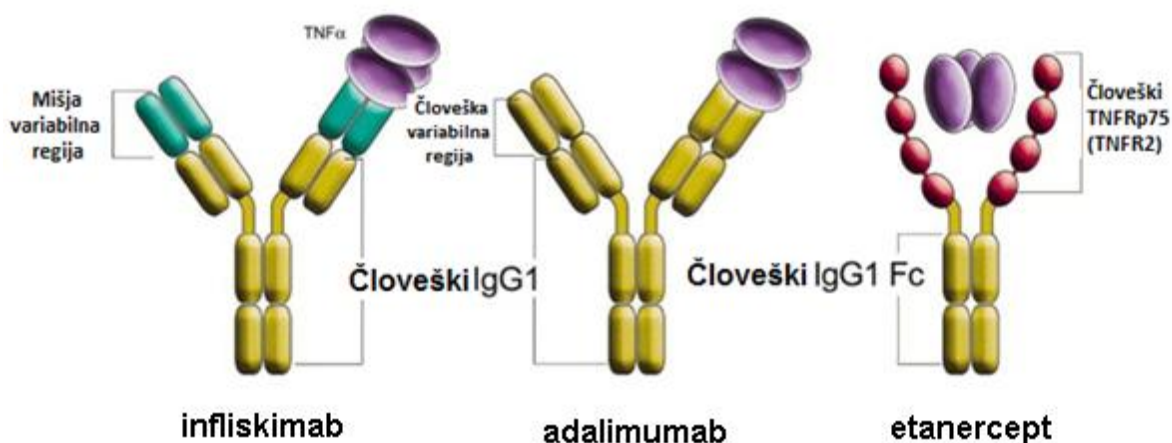
1.2.4 Biološko zdravljenje

Biološka zdravila se uporabljajo za zdravljenje hudih oblik luskavice, ko so vse druge terapijske možnosti neučinkovite ali kontraindicirane. Njihovo delovanje je usmerjeno proti specifičnim imunskim procesom, ki potekajo pri tej bolezni. Zaradi tarčnega delovanja so biološka zdravila učinkovitejša in imajo manj neželenih učinkov.

Trenutno so pri EMA-i odobreni adalimumab (Humira), etanercept (Enbrel), infliksimab (Remicade) in ustekinumab (Stelara) (28).

Adalimumab, infliksimab in etanercept selektivno zavirajo delovanje TNF- α , medtem ko je ustekinumab usmerjen proti IL-12 in IL-23 (29). Adalimumab in infliksimab sta monoklonski protitelesi IgG1, usmerjeni proti TNF- α , pri čemer je prvi rekombinantno človeško, drugi pa himerno človeško-mišje monoklonsko protitelo. Po vezavi na topni TNF- α ga nevtralizirata in preprečita njegovo vezavo na receptorje. Hkrati se vežeta tudi na transmembranski TNF- α , izražen na površini celic, in s tem sprožita s kompleментом povzročeno celično lizo. Etanercept je rekombinantna fuzijska dimerna beljakovina, sestavljena iz dveh domen p75 človeškega receptorja za TNF- α in regije Fc človeškega imunoglobulina IgG1. Veže se na TNF- α in ga s tem inaktivira (30, 31, 32). Ustekinumab je rekombinantno človeško monoklonsko protitelo IgG1, usmerjeno proti proteinski podenoti p40 citokinov IL-12 in IL-23. Po vezavi ustekinumaba na podenoto p40 prepreči vezavo IL-12 in IL-23 na njune receptorje IL-12R β 1 (33).

Učinkovitost bioloških zdravil pri zdravljenju luskavice so potrdili tako klinične študije kot dolgotrajnejša uporaba pri bolnikih. Ker gre za novejša zdravila na trgu, je potrebno pozornejše spremljanje njihovega varnostnega profila. Do sedaj izvedene dolgotrajnejše študije nakazujejo, da so biološka zdravila na splošno dobro tolerirana pri bolnikih z luskavico tudi skozi daljši čas in zato predstavljajo dobro alternativo tradicionalnim sistemskim zdravilom (34).



Slika 2 Shematski prikaz zaviralcev TNF- α : infliksimaba, adalimumaba in etanercepta. Povzeto po Error! Reference source not found..

1.3 TEHNOLOGIJA PROTISMISELNIH OLIGONUKLEOTIDOV

Uporaba protismiselnih oligonukleotidov je eden izmed možnih pristopov k zniževanju izražanja specifičnih genov, s preprečevanjem translacije pripadajoče mRNA. Protismiselni oligonukleotidi (angl. *antisense oligonucleotides*, *ASO*) so kratki enoveržni deoksinukleotidi, dolžine od 18 do 25 baz, ki so komplementarni zaporedjem na tarčnih mRNA. Po specifični hibridizaciji preprečijo translacijo kodiranega proteina, s čimer utišajo izražanje tarčnega gena (36). Po sekvenciranju celotnega človeškega genoma je ta tehnologija pridobila na pomenu, tako na raziskovalnem kot v terapevtskem področju. K razvoju so pripomogle tudi prednosti, kot so: preprostost koncepta, možnost racionalnega načrtovanja utišanja tarčnih genov in razmeroma nizka cena razvoja (37). Protismiselno tehnologijo lahko uporabimo za raziskovanje funkcije specifičnih genov, ugotavljanje njihove vloge v patologiji bolezni, identifikacijo novih tarč, njihovo validacijo in zdravljenje (38). Leta 1998 je Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA, Food and Drug Administration) odobrila prvo takšno zdravilo – fomivirsen (Vitravene, Isis Pharmaceuticals) za zdravljenje citomegalovirusnega retinitisa pri pacientih z AIDSom. Protismiselni oligonukleotidi so uporabni za zdravljenje kateregakoli bolezenskega stanja, pri katerem igra ključno vlogo v patofiziologiji prevelika proizvodnja identificiranega proteina (39). V razvoju in kliničnih študijah je več protismiselnih oligonukleotidov, in sicer za zdravljenje kardiovaskularnih bolezni, rakavih obolenj, virusnih okužb in vnetnih bolezni (36, 40). Lokalno zdravljenje kožnih bolezni, kot je tudi luskavica, je ravno tako privlačno za protismiselno tehnologijo, saj ima mnoge prednosti pred sistemskim zdravljenjem. Tako zdravilo lahko apliciramo neposredno na obolelo mesto, s čimer močno zmanjšamo možnost sistemskih in lokaliziranih neželenih učinkov. Tovrstno zdravljenje lahko tudi enostavno individualiziramo, saj učinkovitost spremljamo vizualno (39).

Za učinkovito zdravljenje s protismiselnimi oligonukleotidi je potrebno premagati več kritičnih faz. S kemijskimi modifikacijami oligonukleotidov zagotovimo odpornost proti njihovi razgradnji z nukleazami. Uporabiti moramo primeren dostavni sistem, da dosežemo vstop oligonukleotidov v celico in njihovo lokalizacijo v jedro. Za učinkovitost in varnost se morajo specifično vezati na tarčno zaporedje in ne vezati na druge sestavine celice, na primer na proteine. Kompleks po hibridizaciji pa mora biti tudi dovolj stabilen.

1.3.1 Mehanizem delovanja

Protismiselni oligonukleotidi se specifično hibridizirajo skladno z modelom Watson-Cricka s tarčnim zaporedjem na mRNA. Nastane mRNA-oligonukleotidni dupleks, ki preprečuje sintezo proteina, kodiranega na tarčnem genu (36). Z veliko verjetnostjo lahko trdimo, da se katerokoli zaporedje, ki je daljše od 17 nukleotidov, v genomu normalno pojavi samo enkrat. Zato z uporabo protismiselnih oligonukleotidov dolžine od 18 do 25 nukleotidov lahko zagotovimo specifičnost vezave na tarčno zaporedje (38).

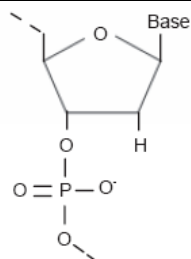
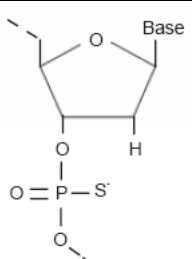
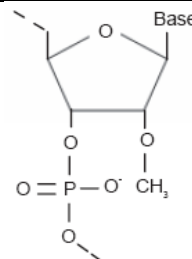
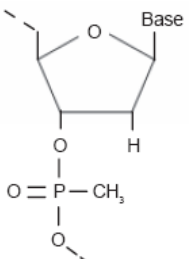
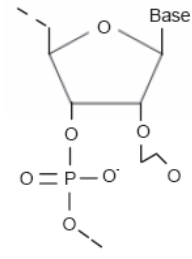
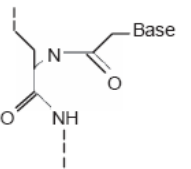
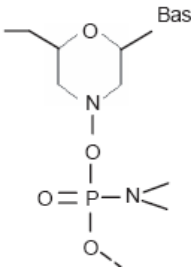
Protismiselni oligonukleotidi lahko interagirajo na katerikoli stopnji sinteze proteina, pri čemer je najpomembnejši mehanizem njenega preprečevanja aktivacija RNaze H, ki razgradi mRNA v nastalem dupleksu po hibridizaciji. Drugi mehanizmi so še sterično preprečevanje translacije ter interakcije v procesu zorenja pre-mRNA. Glede na mehanizem delovanja lahko protismiselne oligonukleotide razdelimo na od RNaze H odvisne in od RNaze H neodvisne. Mehanizem njihovega delovanja določa njihova kemijska struktura (*glejte podpoglavje Kemijske modifikacije oligonukleotidov*). Encim RNaza H aktivirajo fosfodiesterški in fosforotioatni oligonukleotidi, večina drugih njihovih modifikacij pa ne (38).

RNaza H je povsod prisotna endogena nukleaza, ki cepi verigo RNA v heteroduplexih RNA-DNA ter s tem povzroči razgradnjo RNA. V primeru heteroduplexov mRNA-protismiselni oligonukleotid pride do cepitve mRNA, medtem ko protismiselni oligonukleotid ostane ohranjen, se sprostí z RNaze H in se lahko ponovno veže na novo tarčno molekulo mRNA. Recikliranje protismiselnih oligonukleotidov zagotavlja daljši učinek in zmanjšanje učinkovite koncentracije v mikro- in nanomolarno območje. Za učinkovitost protismiselnega zdravljenja, ki je odvisna od RNaze H, moramo zagotoviti lokalizacijo oligonukleotidov v celično jedro, saj je tu glavno mesto aktivnosti nukleaz. Pri tem mehanizmu delovanja je lahko tarčno zaporedje na mRNA poljubno (38).

Od RNaza H neodvisne oligonukleotide lahko glede na mehanizem delovanja zopet razdelimo v dve skupini. V prvo sodijo tisti, ki delujejo preko sterične blokade. Ta onemogoča interakcije mRNA z nukleinskimi kislinami, proteini in drugimi faktorji, potrebnimi za njeno procesiranje ali translacijo v protein. Tarčno zaporedje protismiselnega oligonukleotida je torej lahko mesto izrezovanja intronov, mesto interakcije z izrezovalno-povezovalnim kompleksom v zaporedju pre-mRNA ali translacijsko iniciacijski kodon v zaporedju mRNA. Druga skupina, v katero sodijo od

RNaza H neodvisni oligonukleotidi, pa po vezavi povzročajo destabilizacijo mRNA. Po hibridizaciji na področje 3' ali 5' pre-mRNA onemogočijo pripenjanje 5' kapa ali poliadenilacijo na 3' mRNA, ki sta ključna procesa za doseganje stabilnosti mRNA v procesu njenega zorenja (38).

1.3.2 Kemijske modifikacije oligonukleotidov

| | Prva generacija | Druga generacija | Tretja generacija |
|---------------------------------------|---|--|---|
| Fosfodiesterški oligonukleotid |  |  |  |
| | Fosfodiesterški oligonukleotid | Fosforotioat (PS) | 2'-O-metil (2'-OME) |
| | |  |  |
| | Metilfosfonat | 2'-O-metiloksietil (2'-MOE) | Zaklenjena nukleinska kislina (LNA) |
| | | |  |
| | | | Peptidna nukleinska kislina (PNA) |
| | | |  |
| | | | Morfolino fosforoamidat (MF) |

Slika 3 Kemijske modifikacije protismiselnih oligonukleotidov. Povzeto po (38).

Fosfodiesterški oligonukleotidi niso primerni za uporabo v protismiselni tehnologiji, saj niso odporni na celične nukleaze, so slabo topni in ne prehajajo celičnih membran (38, 41). Eksonukleaze 3'-5' začnejo nemodificirane oligonukleotide razgrajevati v serumu že v roku 10 minut, kar ne zadošča za vstop v celice (39). Zato so naredili različne kemijske modifikacije oligonukleotidov, ki jim omogočajo večjo stabilnost,

biološko uporabnost in afiniteto. Modifikacije pa seveda ne smejo znižati specifičnosti vezave ali zvečati njihovo toksičnost. Kemijska struktura določa tudi mehanizem delovanja protismiselnega oligonukleotida. Glede na modifikacijo jih uvrščamo v tri generacije (41).

Prvi generaciji protismiselnih oligonukleotidov so zagotovili odpornost na nukleaze s spremembo fosfodiesterne vezi. V fosfatni skupini so en kisikov atom, ki ni udeležen v diesterski vezi, zamenjali z žveplom (fosforotioati) ali z metilno skupino (metilfosfonati). S tem so uspeli podaljšati plazemski razpolovni čas, povečati biološko razpoložljivost in ohraniti bioizosterijo molekul. Fosforotioatni oligonukleotidi (PS) so še vedno najpogosteje uporabljeni v protismiselni tehnologiji, saj izkazujejo dobre rezultate, tako *in vitro* kot *in vivo*. Sposobni so aktivirati RNazo H, kar poveča njihovo učinkovitost, imajo ustrezne farmakokinetične lastnosti, so široko dostopni in razmeroma poceni zaradi enostavne sinteze. Fomivirsen in večina drugih oligonukleotidov, ki jih preskušajo v kliničnih študijah so fosforotioati. Fosforotioati izkazujejo nespecifične neželene učinke *in vivo*, npr. imunsko stimulacijo, aktivacijo komplementa in celično toksičnost (*glejte podglavje Učinkovitost in varnost*). Imajo tudi nižjo vezavno afiniteto v primerjavi s fosfodiesterскими oligonukleotidi (41).

Za drugo generacijo je značilna modifikacija sladkorja v oligonukleotidih, in sicer imajo na mestu 2' riboze pripeto alkilno skupino. Najpogosteje uporabljajo 2'-O-metilni (2'-OME) in 2'-O-metoksietilni oligonukleotide (2'-MOE). V primerjavi s prvo generacijo z njimi dosežemo še večjo odpornost na nukleaze, znižamo toksičnost, podaljšamo plazemsko razpolovno dobo in povečamo privzem v celice. Hkrati, zaradi spremenjene konformacije, izboljšamo tudi vezavno afiniteto in stabilnost hibridizacije (38, 42). Učinkovitost protismiselnega zdravljenja pa se kljub temu ne poveča, saj ti oligonukleotidi niso sposobni aktivirati RNaze H (38, 41). Zato so razvili himerne oligonukleotide, imenovane *gapmeri*. V tem primeru so sredinski nukleotidi fosforotioatni in so odgovorni za aktivacijo RNaze H, nukleotidi na koncih pa so 2'-OME ali 2'-MOE in zagotavljajo povečano odpornost na nukleaze, večjo afiniteto in privzem v celice ter zmanjšano toksičnost (38).

Pomembnejši predstavniki tretje generacije so premrežene nukleinske kisline (LNA), peptidne nukleinske kisline (PNA) in morfolino fosforoamidati (MF). Kemijsko so lahko modificirani fosfatna vez, riboza ali pa je namesto furanoznega obroča prisotna popolnoma drugačna kemijska struktura. S tem se zopet povečata stabilnost in vezavna afiniteta, izboljša pa se tudi farmakokinetičen profil. Tudi protismiselni oligonukleotidi tretje generacije niso sposobni aktivacije RNaze H, vendar pa jim visoka afiniteta omogoča

sterično blokado translacije. Gre za nenabite molekule, s čimer se zmanjša verjetnost njihovih nespecifičnih interakcij s proteini in posledično pojavnost stranskih učinkov. Odsotnost vezave na proteine pa tudi skrajša plazemski razpolovni čas *in vivo*, saj se poveča klirens učinkovine. Zaradi elektrostatske nevtralnosti je omejena topnost, kar vpliva na slabši privzem v celice. V več študijah so dokazali njihovo učinkovitost *in vitro*, *ex vivo* ter *in vivo* (38). PNA in MF imajo fosfodiestersko vez zamenjano s peptidno oz. fosforoamidatno, kar predstavlja popolnoma nov pristop za doseganje njihove nukleazne odpornosti. LNA vsebuje metilenski most med 2'-O na ribozi in 4'-C, kar poveča vezavno afiniteto. Razvili so tudi že omenjene *gapmere*, ki imajo na sredini nukleotidne verige protismiselne fosforotioate za aktivacijo RNaze H, na obeh koncih pa LNA za povečanje stabilnosti hibridizacije (41).

Z različnimi kombinacijami modificiranih nukleotidov lahko torej spreminjamo aktivnost, farmakokinetiko, razgradnjo in varnostni profil oligonukleotidov za doseg njihove optimalne učinkovitosti (41).

1.3.3 Dostava oligonukleotidov

Dostava protismiselnih oligonukleotidov v tkiva in nato v celice je še vedno ena izmed večjih omejitev učinkovitosti tovrstnega zdravljenja. Tako nemodificirani kot modificirani oligonukleotidi ne prehajajo nepoškodovanih membran z difuzijo. Za raziskave na celičnih kulturah *in vitro*, za njihovo dostavo uporabljamo kationske lipide ali polimere, ki tvorijo komplekse z oligonukleotidi in tako omogočijo vstop v celice. Ta pristop pa pogosto zaradi velikosti teh delcev in/ali njihove toksičnosti ni primeren za uporabo *in vivo*. V večini študij na živalih in kliničnih študij preizkušajo proste protismiselne oligonukleotide, brez dostavnih sistemov. Veliko raziskav z dostavnimi sistemi pa je pokazalo, da lahko z njihovo uporabo izboljšamo učinkovitost dostave teh učinkovin (43). Dostavni sistem mora zagotoviti zadovoljivo stabilnost, olajšan prehod preko celičnih membran in translokacijo učinkovine na mesto delovanja, ne sme povečati njene toksičnosti, povečati mora plazemsko razpolovno dobo in onemogočiti nespecifično odlaganje (44).

Glavni mehanizem vstopa v celice je endocitoza vseh vrst. Po privzemu mora oligonukleotid uiti iz endosoma in se translocirati na mesto delovanja, torej v citosol ali jedro. Za olajšan privzem lahko pripravimo konjugate z različnimi ligandi. Lahko so to ligandi, ki se vežejo na površinske celične receptorje – oligonukleotid vežemo na protitelo specifično za določen celični receptor, polipeptide ali nizkomolekularne organske

molekule. Ligandi so lahko polikationski peptidi dolžine 9–30 aminokislin, ki se vežejo na površinske glikozaminoglikane in tako olajšajo penetracijo v celice z endocitozo (43). Pogost pristop je tudi konjugacija s holesterolom (44). Za učinkovite dostavne sisteme pa so se izkazali še liposomi in različni mikro- in nanodelci, bodisi na lipidni ali polimerni osnovi (43, 44, 45).

Pri topikalni dostavi učinkovin morajo te prodreti skozi *stratum corneum*, kar predstavlja največjo oviro. Prehod oligonukleotidov skozi normalno kožo je zanemarljiv, saj niso sposobni preiti te lipofilne bariere. Izkazalo pa se je, da je barierna funkcija *stratum corneuma* v plakih pri luskavici oslABLJENA, zato v tem primeru aplicirani modificirani protismiselni oligonukleotidi lahko prehajajo v nižje plasti kože (39). Fluorescenčno označene oligonukleotide so namreč zaznali *ex vivo* v vseh plasteh epidermisa, pa tudi v dermalnih fibroblastih in imunskih celicah kože. Takšne rezultate so dobili v študijah s fosforotioati, morfolino fosforoamidati in C-5 propin modificiranimi oligonukleotidi (39, 46, 47). Enaki rezultati poskusa z neoznačenimi oligonukleotidi, ob kasnejši detekciji s fluorescenčno označenimi specifičnimi protitelesi, so potrdili, da fluorescenčna oznaka ne spremeni farmakokinetike oligonukleotidov (39). Tudi poskusi na miših *in vivo* (imunsko oslABLJENE miši s presajeno človeško kožo) so pokazali uspešno dostavo oligonukleotidov v jedra keratinocitov po njihovi topikalni aplikaciji (47).

1.3.4 Učinkovitost in varnost

V praksi se le del protismiselnih oligonukleotidov hibridizira s tarčno mRNA. Razlog za to je lahko težko dostopno tarčno zaporedje, bodisi zaradi sekundarnih struktur mRNA ali vezanih proteinov na mRNA. Za učinkovitost je torej pomembno ustrezno načrtovanje protismiselnega oligonukleotida in natančna izbira tarčnega zaporedja (37). Ugodne regije mRNA za hibridizacijo so običajno blizu njenega terminalnega dela, in sicer so to zanke, lasnice ali izbokline, iz vsaj 10 zaporednih nukleotidov (48, 49). Učinek je odvisen tudi od mehanizma delovanja – ali gre za od RNaze H odvisno ali neodvisno delovanje. V prvem primeru, ko RNaza H razgradi tarčno mRNA, je učinkovitost utišanja izražanja genov do 85–95 % in je po mnenju mnogih večja kot v primeru izključno steričnega blokiranja (38, 41). Novejše generacije protismiselnih oligonukleotidov pa imajo izboljšane farmakokinetične parametre, ki prispevajo k boljšem učinku. Z načrtovanjem himernih *gapmerov*, lahko dosežemo optimalno učinkovitost (38).

Izvedenih je bilo veliko toksikoloških študij na različnih živalskih modelih (miši, podgane in opice) in ljudeh. Rezultati kažejo na sprejemljiv varnostni profil vseh treh

generacij protismernih oligonukleotidov v terapevtskih koncentracijah. Največ študij je bilo opravljenih s fosforotioati. Njihovi neželeni učinki so posledica nespecifičnih interakcij s proteini, saj so ti oligonukleotidi zaradi kemijske modifikacije bolj negativno nabiti, v primerjavi z nemodificiranimi. Gre za tako imenovane ne-protismislene učinke. Najpogostejši resnejši zapleti akutne toksičnosti, ki preprečujejo odmerjanje oligonukleotidov v večjih koncentracijah, so začasno podaljšanje aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa, aktivacija komplementa, hipotenzija, trombocitopenija in zvišanje serumskih koncentracij transaminaz. Nekateri fosforotioati pa zaradi svojega zaporedja nukleotidov izzovejo ne-protismiselno aktivnost. Če so prisotni več kot štirje zaporedno nanizani gvanozinski ostanki, oligonukleotidi zavzamejo obliko tetraplekov in drugih urejenih konformacij, ki pa so biološko zelo aktivne. To privede do nespecifičnih neželenih učinkov, kot sta inhibicija proliferacije gladkega mišičja in indukcija proliferacije makrofagov. Ravno tako nemetilirani motivi CpG v oligonukleotidih aktivirajo imunski sistem pri sesalcih, saj je ta motiv pogost v bakterijski ali virusni DNA, v genomu gostitelja pa je običajno metiliran. Za sesalce torej to predstavlja signal za nevarnost, ki sproži aktivacijo imunskega sistema. Aktivirajo se naravne celice ubijalke, dendritične celice, makrofagi in limfociti B. Zato se pri načrtovanju zaporedja protismiselnih oligonukleotidov izogibamo motivom GGGG in CpG (38). Poraja se tudi vprašanje genotoksičnosti protismiselnega zdravljenja. Z dosedanjimi standardnimi testiranjem genotoksičnosti so dokazali, da fosforotioati niso genotoksični in se ne vgrajujejo v nosovosintetizirano DNA (38, 50). Študije na primatih in glodalcih tudi niso pokazale teratogenosti ali reproduktivne toksičnosti (38).

Nasteti neželeni učinki se pojavljajo le pri odmerkih, ki so višji od terapevtskih, zato veljajo fosforotioati v svojem terapevtskem območju za varne učinkovine. Pri protismiselnem lokalnem zdravljenju luskavice ni pričakovati pojava sistemskih učinkov, saj v sistemski krvni obtok pride le majhen delež apliciranega odmerka, kar pomeni, da so plazemske koncentracije učinkovine bistveno nižje od toksičnih. Kot pri vseh lokalnih zdravljenjih pa so seveda možna lokalna draženja ali preobčutljivostne reakcije (39).

1.3.5 Alicaforsen – primer uspešnega protismiselnega oligonukleotida pri zdravljenju luskavice

Število kliničnih študij s protismiselnimi oligonukleotidi je v zadnjih letih močno poraslo. Večina vrednoti njihovo intravensko aplikacijo pri rakavih, kardiovaskularnih, vnetnih in avtoimunskih boleznih (51). V podjetju Isis Pharmaceuticals so razvili

Alicaforsen (ISIS 2302), ki ga klinično preizkušajo tudi za topikalno zdravljenje luskavice (52). Rezultati kažejo na optimistično prihodnost za lokalno zdravljenje luskavice s protismiselno tehnologijo.

Alicaforsen je 20 baz dolg fosforotioat (5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'), usmerjen proti adhezijski molekuli ICAM-1, ki je prekomerno izražena pri mnogih vnetnih boleznih, kot so npr. Chronova bolezen, ulcerativni kolitis in luskavica. Leta 2007 so Alicaforsen registrirali pri FDA-ju in EMA-i kot zdravilo siroto za vnetje ilealnega rezervoarja (angl. *pouchitis*), v kliničnih študijah pa je tudi za ostale prej navedene indikacije (51, 52). Leta 2000 se je pričela faza IIa kliničnega preizkušanja topikalne uporabe Alicaforsena za zdravljenje luskavice (52).

V predklinični študiji so pokazali, da topikalno nanesen Alicaforsen v obliki kreme učinkovito zniža izražanje ICAM-1 v človeški koži, presajeni na imunsko oslABLJENE miši. Znižanje nivoja mRNA za ICAM-1 je bilo specifično in koncentracijsko odvisno. Topikalno aplicirane fluorescenčno označene fosforotioate so zaznali tako v epidermisu kot v dermisu, medtem ko so se pri intravenski ali subkutani injekciji akumulirali le v dermisu. V primerjavi z intravensko, se po topikalni aplikaciji v epidermisu koncentracija oligonukleotida poveča za 4000-krat, v dermisu pa za 150-krat. V keratinocitih se fosforotioati akumulirajo predvsem v jedru, kjer je tudi glavno mesto njihovega delovanja, v fibroblastih pa v citoplazmi. Na živalskih modelih so proučevali tudi kinetiko privzema protismiselnih oligonukleotidov. Že po 2 urah so v koži zaznali njihov koncentracijski maksimum, po 24 urah je bilo še vedno prisotnih 50 % aplicirane koncentracije. Eliminacija oligonukleotidov je predvsem posledica njihove redistribucije v okoliška tkiva in absorpcije v sistemski krvni obtok (47).

Klinična študija faze IIa je pokazala skromno učinkovitost intravensko apliciranega Alicaforsena pri zdravljenju luskavice, saj se je v koži akumuliralo premalo učinkovine (53). Zato so pričeli s testiranjem kreme z Alicaforsenom. Dvojno slepa, randomizirana, s placebo nadzorovana klinična študija je vključevala 63 pacientov z zmerno obliko luskavice s plaki in je trajala 12 tednov. Pacienti so si na en plak aplicirali kremo z učinkovino (vsebnosti: 0,03 %; 0,1 %; 0,5 %; 2 % ali 4 %), na drugega pa placebo obliko. Ta študija je prva dokazala, da pri ljudeh protismiselni oligonukleotidi prodirajo skozi plake. Pri koncentracijah 0,5 % ali več se v plakih nahajajo visoke koncentracije oligonukleotida, ki ustrezno naraščajo z naraščajočim vsebnostim v kremi (54). Učinkovitost zdravljenja so ovrednotili s točkovno lestvico od 0 do 5 (IGRS, *Investigator's Global Response Score*). Pri 37,5 % plakov je Alicaforsen izboljšal poroženelost kože za

dve točki ali več. Značilno izboljšanje je bilo vidno po 4 tednih in se stopnjevalo tudi vse do 8 tedna. Glede na poroženelost ali debelino plakov pred zdravljenjem se je v primeru uporabe kreme z učinkovino stanje po 4 in 8 tednih izboljšalo za 31 % (55). Dokazali so korelacijo med večjimi odmerki Alicaforsena in opaznejšim izboljšanjem stanja plakov. Kljub temu pa nobena koncentracija ni zagotovila statistično značilnega izboljšanja, v primerjavi s placebo. Pri uporabi placebo kreme je bil odziv na zdravljenje neobičajen, saj so ugotovili za do 1,1 točke izboljšanja. Glede na prisotnost učinkovine v treh četrtinah biopsiranih plakov, ki so bile tretirane s placebo, so predvidevali, da je bila za rezultate odgovorna napačna aplikacija le-tega. Pri klinični študiji niso opazili nobenih neželenih učinkov (54). Nato so izvedli še drugo dvojno slepo, s placebo nadzorovano klinično študijo faze II, in sicer s 4 % vsebnostjo Alicaforsena v kremi, na 31 pacientih z blago do zmerno luskavico. Rezultati so tokrat pokazali statistično značilno zmanjšanje poroženelosti kože (55).

2 NAMEN DELA

Čeprav za zdravljenje luskavice obstajajo številna zdravljenja, ti pogosto ne dosegajo želene učinkovitosti in so mnogokrat povezani z resnimi neželenimi učinki. Najučinkovitejše je zdravljenje s sistemskimi biološkimi zdravili, ki pa ga zaradi visoke cene in tveganj za pojav neželenih učinkov uporabljajo šele, ko odpovejo vse druge terapijske možnosti. Cilj našega raziskovalnega dela je razvoj genske osnove za nadaljnji razvoj novega učinkovitega lokalnega biološkega zdravila za zdravljenje luskavice, ki temelji na uporabi protismiselnih oligonukleotidov.

Poglavitni namen našega raziskovalnega dela je utišanje genov za provnetne citokine, ki so prekomerno izraženi v luskavičnih plakih in imajo pomembno vlogo v patogenezi luskavice. To nameravamo doseči z aplikacijo protismiselnih oligonukleotidov, usmerjenim proti genom za provnetne citokine. Na ta način namreč preprečimo njihovo izražanje na translacijskem nivoju in zavremo vnetni proces, kar lahko posledično izboljša klinično sliko te bolezni.

Za preskušanje našega pristopa k zdravljenju luskavice bomo razvili keratinocitni model te bolezni *in vitro*. Najprej bomo vzpostavili celično linijo HaCaT in optimizirali pogoje za njihovo rast. Z imunsko aktivacijo celic bomo nato povečali izražanje tarčnih provnetnih citokinov. Optimizirali bomo tudi vnos protismiselnih oligonukleotidov v keratinocite in spremljali utišanje tarčnih genov. Glede na novejša raziskave o ključni vlogi odziva vrste Th17v imunopatogenezi luskavice, se bomo osredotočili na citokin IL-23. Kot tarče bomo dodatno izbrali še keratin 17, ICAM-1 in TNF- α . Z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času bomo merili nivoje tarčnih mRNA po imunski aktivaciji in po aplikaciji protismiselnih oligonukleotidov, v primerjavi s kontrolo, to je intaktna celično linijo.

MATERIALI IN METODE

2.1 DELO S CELICAMI

Materiali

Celična kultura

- Celice HaCaT (The International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trst, Italija)

Kemikalije

- *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) s fenol rdečim
- fetalni goveji serum (FBS)
- raztopina antibiotika (penicilin/streptomycin)
- fosfatni pufer (PBS)
- EDTA/PBS (0,02 %)
- tripsin
- nigrozin (0,2 %)
- TNF- α
- IFN- γ
- LPS
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen, ZDA)

Protismisleni oligonukleotidi (IDT, ZDA)

- ICAM-1: 5'-TGCATCCCCCAGGCCACCAT-3'-fluorofor (47)
- ICAM-1: 5'-TGCATCCCCCAGGCCACCAT-3' (47)
- IL-23: 5'-CATTACAGCTCTGCTCCCCAGCATC-3' (56)
- Keratin 17: 5'-CACCCAAGACAGCAGAAAG-3' (57)
- TNF- α : 5'-CTGACTGCCTGGGCCAGAGGGCTGATTAG-3' (58)
- Negativna kontrola (NSO): 5'-GCGAGCAGCCCATCATCT-3' (57)

Pribor

- sterilne rokavice brez pudra
- nitrilne rokavice
- plastenke za gojenje celic (75 cm²)
- sterilna steklenica (100 mL)
- pipete (0,5–10 μ L, 2–20 μ L, 10–100 μ L, 100–1000 μ L) (Eppendorf, Nemčija)

- pripomoček za pipetiranje Biohit Midi Plus (Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Finska)
- sterilne merilne pipete (5 mL, 10 mL, 25 mL)
- centrifugirke (15 mL)
- hemocitometer
- objektna stekelca
- krovna stekelca
- plošče s 6 vdolbinicami
- plošče z 8 vdolbinicami

Laboratorijska oprema

- zamrzovalnik
- hladilnik
- aseptična komora z laminarnim pretokom zraka Iskra Pio LFVP9 (Iskra Pio, Slovenija)
- centrifuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- svetlobni mikroskop
- inkubator
- fluorescenčni mikroskop Olympus IX81 (Olympus, ZDA)

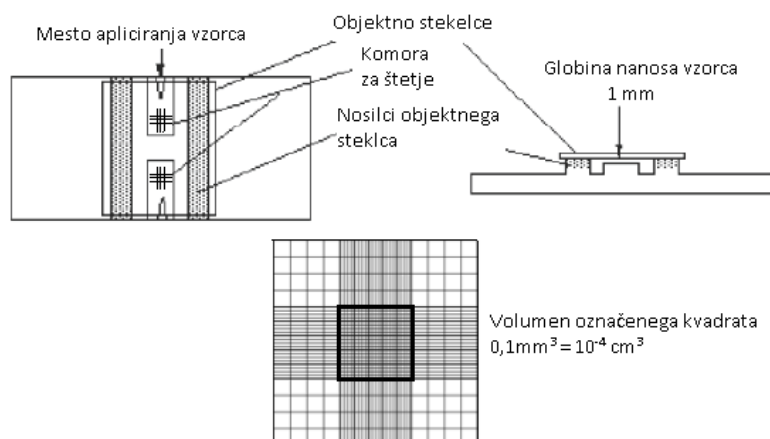
2.1.1 Vzpostavitev celične linije HaCaT

Poskuse smo izvajali na sekundarni keratinocitni liniji HaCaT. Primarne celične kulture kožnih celic, izoliranih iz vzorcev kože, ki sicer najboljše posnemajo naravno tkivo, imajo žal omejen rastni potencial zaradi svoje končne življenjske dobe. Če pa jih imortaliziramo, dobimo sekundarno celično kulturo (58). HaCaT je spontano transformirana človeška keratinocitna celična linija iz kože odraslega človeka, ki ima ohranjen skoraj normalen fenotip (60). Zaradi njene visoke ohranjene sposobnosti diferenciacije in proliferacije *in vitro*, enostavnega razmnoževanja in gojenja v tradicionalnih gojiščih skozi daljše časovno obdobje, so dobro uveljavljen eksperimentalni keratinocitni model *in vitro* (58).

Celice HaCaT (The International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trst, Italija) smo gojili pritrjene v enojnem sloju v sterilnih plastenkah za gojenje celic. Medij za gojenje je bil sestavljen iz 89 % *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) s fenol rdečim, 10 % fetalnega govejega seruma (FBS) in 1 % raztopine

antibiotika (penicilin/streptomycin). Gojili smo jih v inkubatorju pri standardnih pogojih (37 °C, s 5 % CO₂ v zraku). Vso delo s celicami je potekalo v sterilnih pogojih celičnega laboratorija. Medij smo celicam zamenjali vsak tretji dan. Za spiranje smo uporabljali izotonični fosfatni pufer (PBS, angl. *phosphate buffered saline*). Ko je bila dosežena 80 % konfluentnost, smo celice presadili v razmerju 1:10. Najprej smo odstranili medij in celice sprali s 5 mL PBS. Nato smo dodali 5 mL raztopine 0,02 % EDTA v PBS in 50 µL tripsina ter kulturo inkubirali 10 minut pri 37 °C. Tripsin je serinska proteaza, ki odcepi adherirane celice od podlage, da jih lahko nato suspendiramo, EDTA pa kompleksira kalcij in zrahlja tesne stike med celicami, kar omogoči lažje delovanje omenjenega encima. Ko so celice odstopile od podlage, smo jim dodali 5 mL svežega medija za gojenje, s katerim smo nevtralizirali delovanje tripsina. V tej fazi smo odvzeli 100 µL suspenzije za štetje celic s hemocitometrom. Preostalo suspenzijo smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali pri 2000×g 5 minut. Odstranili smo supernatant, dodali svež medij za gojenje, ki smo ga predhodno inkubirali na 37 °C, in ustrezen delež ponovno suspendiranih celic prenesli v nove platenke za gojenje.

Pod svetlobnim mikroskopom smo ves čas opazovali tudi morfologijo celic in spremljali njihovo število, pri čemer smo 100 µL vzorca suspenzije celic dodali 100 µL 0,2 % barvila nigrozin in mešanico nanесли na hemocitometer. To je posebno objektno stekelce, namenjeno štetju celic pod mikroskopom, ki ima točno določene dimenzije in vrezano mrežo. Mreža je razdeljena na 9 kvadratov, pri čemer je volumen vsakega 0,1 mm³ oz. 10⁻⁴ cm³. Pod mikroskopom smo nato prešteli celice v enem kvadratu (označeno na *Sliki 4*). S tehniko barvanja z nigrozinom lahko ločimo mrtve celice od živih, saj se mrtve obarvajo črno. Da dobimo število celic v 1 mL suspenzije, moramo povprečno število celic, prešteti v enem kvadratu, pomnožiti s faktorjem redčenja in deliti z volumnom enega kvadrata (61). V našem primeru smo torej prešteto število pomnožili s faktorjem 2×10⁴.



Slika 4 Shema hemocitometra in mreže za štetje celic. Povzeto po (61).

2.1.2 Imunska aktivacija celic

Pred transfekcijo keratinocitov s protismiselnimi oligonukleotidi smo želeli keratinocite imunsko aktivirati, da bi ustvarili stanje, ki je čim bolj podobno tistemu pri luskavici. Citokina TNF- α in IFN- γ , ki se sproščata iz aktiviranih dendritičnih celic, s svojim provnetnim delovanjem inducirata povišano izražanje provnetnih citokinov (62). Lipopolisaharid (LPS) je endotoksin, ki sproži imunsko aktivacijo preko vezave na receptor TLR4. Ta je izražen tudi na površini celic HaCaT, njegova aktivacija pa prav tako povzroči povišano izražanje provnetnih citokinov (63). Celice HaCaT smo zato inkubirali v prisotnosti različnih koncentracij TNF- α , IFN- γ in LPS ter v njih spremljali nivoje izražanja tarčnih citokinov. Aktivacije smo izvajali v plošči s 6 vdolbinicami. V vsako od njih smo naselili po 1×10^5 celic v po 2 mL medija za gojenje, ki je vseboval bodisi 2,5 $\mu\text{g/mL}$ ali 12,5 $\mu\text{g/mL}$ TNF- α , 250 U/mL IFN- γ bodisi 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ali 2 $\mu\text{g/mL}$ LPS. Celice smo inkubirali pri standardnih pogojih 24 ur, vse do 50 % konfluentnosti. Za imunsko aktivacijo pred transfekcijo s protismiselnimi oligonukleotidi smo nato izbrali optimalno koncentracijo TNF- α 2,5 $\mu\text{g/mL}$, ki je najbolj povišala izražanje genov provnetnih citokinov v gojenih celicah.

2.1.3 Izbira zaporedja protismiselnih oligonukleotidov

Uporabili smo zaporedja protismiselnih oligonukleotidov usmerjenih proti izbranim tarčam, ki so se glede na podatke v literaturi že izkazala za učinkovita (47, 56, 57, 58) (glejte podglavje *Materiali*).

2.1.4 Transfekcija celic

Transfekcijo celic HaCaT s protismiselnimi oligonukleotidi smo izvajali v plošči s 6 vdolbinicami. V vsako smo nasadili po 1×10^5 celic v 2 mL medija. V vdolbinico s kontrolnimi celicami nismo dodali nič drugega, v ostale pa smo za imunsko aktivacijo dodali TNF- α in kulture gojili 24 ur do 50 % konfluentnosti. Nato smo odstranili medij in celice sprali z 2 mL pufra PBS. V epici smo pripravili za vsak vzorec po 1 mL medija brez seruma, dodali 3 μ L transfekcijskega reagenta Lipofectamine (Invitrogen) in 3 μ L protismiselnih oligonukleotidov (1 μ g/ μ L). Transfekcijsko zmes smo 15 minut inkubirali na sobni temperaturi, jo dodali celicam in nato inkubirali 4 ure pri standardnih pogojih. Po končani transfekciji smo celice dvakrat sprali s pufrom PBS, dodali svež medij s serumom in jih gojili 2–48 ur. Nato smo spremljali utišanje genov za tarčne proteine s PCR v realnem času. Da bi potrdili specifičnost učinka, smo naredili še negativno kontrolo z naključnim, nespecifičnim oligonukleotidom, ki se ni vezal na nobeno od zaporedij mRNA tarčnih proteinov. Preverili smo tudi toksičnost transfekcijskega reagenta za naše celice, in sicer z uporabo slepe kontrole (transfekcijska zmes ni vsebovala oligonukleotidov).

2.1.5 Fluorescenčna mikroskopija

Uspešnost transfekcije keratinocitov s protismiselnim oligonukleotidom smo preverjali s fluorescenčno označenim oligonukleotidom za ICAM-1. Pod fluorescenčnim mikroskopom smo transfecirane celice osvetlili s svetlobo valovne dolžine 488 nm. Fluorofor fluorescein izotiocianat, ki je bil pripet na oligonukleotid, je bil dovolj majhen, da ni vplival na distribucijo oligonukleotidov, je absorbiral energijo aplicirane svetlobe in prešel v vzbujeno stanje. Vzbujeni elektron ob prehodu iz višjega na osnovi energetskega nivo odda svetlobo, ki jo detektiramo s fluorescenčnim mikroskopom. Gre za zelo specifično metodo, ki omogoča natančno intracelularno lokalizacijo označenih oligonukleotidov (64).

Transfekcijo smo izvedli tako, kot smo to opisali v prejšnjem poglavju, le da smo zaradi potreb fluorescenčnega mikroskopa uporabili ploščo z 8 vdolbinicami in zato ustrezno manjše količine celic in medija. V vdolbinice smo naselili po 1×10^4 celic v 200 μ L medija, celice smo nato spirali z 200 μ L pufra PBS in jim dodali po 100 μ L transfekcijske zmesi. Za kontrolo transfekcije in postopka spiranja celic smo pripravili zmes označenih protismiselnih oligonukleotidov in medija, brez transfekcijskega reagenta. Celice smo nato po dvakratnem spiranju s po 200 μ L pufra PBS opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom. S tem smo izločili možnost fluorescence, ki bi nastali zaradi

morebitne prisotnosti fluorescenčno označenih oligonukleotidov na površini celične kulture.

2.2 DOLOČANJE NIVOJA IZRAŽANJA TARČNIH GENOV

Materiali

Kemikalije

- RNeasy Mini Kit (Qiagen, Nemčija)
- Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Nemčija)
- Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas, Kanada)
- etanol (70 %)
- voda brez RNaz
- voda brez nukleaz
- začetni oligonukleotidi (Invitrogen, ZDA)

Preglednica 1 Zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov za izvedbo PCR v realnem času.

| | Vodilni ("forward") | Povratni ("reverse") |
|---------------|----------------------------------|---------------------------------|
| KER 17 | 5'-TTGAGGAGCTGCAGAACAAG-3' | 5'-AGTCATCAGCAGCCAGACG-3' |
| IL-23 | 5'-GGACAACAGTCAGTTCTGCTT-3' | 5'-CACAGGGCTATCAGGGAGC-3' |
| TNF- α | 5'-CCAGGCAGTCAGATCATCTTC-3' | 5'-CTGGTTATCTCTCAGCTCCAC-3' |
| ICAM-1 | 5'-TGCTATTCAAACCTGCCCTGATG-3' | 5'-CAGCGTAGGGTAAGGTTCTTG-3' |
| HPRT1 | 5'-ACACTGGCAAACAATGCA-3' | 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3' |
| YWHAZ | 5'-ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA-3' | 5'-CCGCCAGGACAAACCAGTA-3' |
| GAPDH | 5'-GTTCGACAGTCAGCCGCATC-3' | 5'-GGAATTTGCCATGGGTGGA-3' |
| B2M | 5'-TGCCGTGTGAACCATGTGA-3' | 5'-CCAAATGCGGCATCTTCAA-3' |
| ACTB | 5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGTAC-3' | 5'-CACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3' |

Pribor

- pipete (0,5–10 μ L, 2–20 μ L, 10–100 μ L, 100–1000 μ L) (Eppendorf, Nemčija)
- pipete za delo z RNA (0,5–10 μ L, 2–20 μ L, 10–100 μ L, 100–1000 μ L) (Eppendorf, Nemčija)
- sterilni nastavki za pipete ep T.I.P.S. (Eppendorf, Nemčija)
- sterilni nastavki za pipete s filtrom ep Dualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Nemčija)
- epice (1,5 mL, 2 mL)

- epruvete
- optične plošče s 96 vdolbinicami MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, ZDA)
- lepljiva optična folija MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, ZDA)
- sterilne rokavice brez pudra
- nitrilne rokavice

Laboratorijska oprema

- zamrzovalnik
- aseptična komora z laminarnim pretokom zraka Iskra Pio LFVP12 (Iskra Pio, Slovenija)
- centrifuga 5415 R (Eppendorf, Nemčija)
- Thermomixer comfort (Eppendorf, Nemčija)
- Konični stresalnik Lab dancer (IKA, Nemčija)
- spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Slovenija)
- aparat za PCR v realnem času ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, ZDA)

2.2.1 Izolacija celokupne RNA

Za izolacijo celokupne RNA iz celic smo uporabili komplet *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Izolacija temelji na principu vezave RNA, daljše od 200 baznih parov, na silicijevo membrano z vezavno kapaciteto do 100 µg RNA. Izolacijo smo izvedli skladno s protokolom *RNeasy Mini Handbook* (65).

1. Celice, ki smo jih gojili v plastenkah, smo najprej tripsinizirali in jih v vzorcu 100 µL tako nastale suspenzije prešteli (*glejte podpoglavje Vzpostavitev celične linije HaCaT*). Nastalo suspenzijo smo centrifugirali ($2000 \times g$, 5 minut), odstranili ves supernatant in celice resuspendirali v 200 µL pufra PBS, tako da smo zagotovo odstranili ves medij za gojenje. Po ponovnem centrifugiranju in odstranitvi vsega supernatanta so bile celice pripravljene za izolacijo RNA.
2. Celice ($< 5 \times 10^6$) smo lizirali v 350 µL pufra RLT z β-merkaptetanolom (1 %) in lizat 30 sekund homogenizirali s koničnim stresalnikom. β-merkaptetanol deluje kot inhibitor RNaz. Molekule RNA so zelo nestabilne, saj so hitro podvržene

razpadu zaradi zunanjih vplivov in inaktivaciji s povsod prisotnimi RNazami. Kot dodatno zaščito pred razgradnjo z RNazami smo med delom ves čas uporabljali rokavice brez smukca, delali na čisti površini, uporabljali nastavke za pipete, ki so bile brez RNaz in pipete, ki so namenjene izključno za delo z RNA ter vzorce z RNA ves čas shranjevali na ledu.

3. Homogeniziranemu celičnemu lizatu smo dodali 350 μL 70 % etanola in vsebino dobro premešali s pipetiranjem.
4. Celoten vzorec smo nanegli na kolono spin RNeasy, ki smo jo vstavili v 2 mL zbiralno epico in centrifugirali 15 sekund pri $10000\times g$. Vsebinsko zbiralne epice smo nato zavrgli.
5. Na kolono smo nato nanegli 700 μL vezalnega pufra RW1, jo vstavili v isto prazno 2 mL zbiralno epico in centrifugirali 15 sekund pri $10000\times g$. Vsebinsko zbiralne epice smo nato zavrgli.
6. Na kolono smo nanegli 500 μL spiralnega pufra RPE, jo vstavili v isto prazno 2 mL zbiralno epico in centrifugirali 15 sekund pri $10000\times g$. Vsebinsko zbiralne epice smo nato zavrgli.
7. Na kolono smo nanegli 500 μL spiralnega pufra RPE, jo vstavili v isto prazno 2 mL zbiralno epico in centrifugirali 2 minuti pri $10000\times g$. Zbiralno epico z vsebino smo zavrgli. Daljši čas centrifugiranja zagotovi popolno odstranitev etanola z membrane kolone, s čimer preprečimo nadaljnje interference.
8. Kolono smo nato vstavili v novo 2 mL zbiralno epico in jo centrifugirali 1 minuto pri polnih obratih.
9. Kolono smo na koncu vstavili v 1,5 mL zbiralno epico, dodali 50 μL vode brez RNaz neposredno na membrano kolone in centrifugirali 1 minuto pri $10000\times g$. V tem zadnjem koraku smo eluirali celokupno RNA, ki je bila vezana na membrani.

2.2.2 Določitev količine RNA

Količino izolirane RNA smo ocenili z merjenjem absorbance pri 260 nm v spektrofotometru NanoDrop. Vrednost absorbance 1 ustreza koncentraciji RNA 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vode. Čistost izolirane RNA smo ocenili iz razmerja absorbanc pri 230, 260 in 280 nm. Razmerje $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ nam služi za oceno kontaminacije vzorca s proteini in v čistem vzorcu RNA znaša približno 2,0. Pri 230 nm absorbirajo kaotropne snovi, kot sta gvanidinijev izotiocianat in fenol. Razmerje $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ čistega vzorca RNA je v območju 2,0–2,2. Najprej smo za umeritev aparature in za slepi vzorec uporabili vodo. Za

meritev smo na spektrofotometer nanesti 1 μ L vzorca raztopine RNA. Pri vsakem vzorcu smo izvedli tri meritve in izračunali povprečno koncentracijo RNA (66).

2.2.3 Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija je postopek prepisa RNA v enoverižno komplementarno DNA (cDNA) z encimom reverzna transkriptaza. Učinkovitost reakcije je odvisna od kakovosti in količine matrične RNA (67). Dobljeno cDNA nato uporabimo za kvantifikacijo izražanja tarčnih genov z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. cDNA je stabilnejša od RNA, kar omogoča njeno shranjevanje v zamrzovalniku (-20 °C) in morebitne kasnejše analize.

V postopku prepisovanja RNA so poleg reverzne transkriptaze potrebni še oligonukleotidni začetniki, deoksinukleotid-trifosfati (dNTP) in voda. Reverzna transkriptaza združuje DNA polimerazno aktivnost, ki v prvi stopnji omogoča prepis RNA v cDNA, in ribonukleazno H aktivnost, ki v drugi stopnji razgradi RNA, hibridizirano s sintetizirano cDNA. Z oligonukleotidni začetniki določimo, katera RNA v vzorcu naj se prepíše v cDNA. V našem primeru smo za nadaljnjo analizo potrebovali samo prepis mRNA v cDNA. Z uporabo kratkih deoksitimidin-trifosfatnih oligonukleotidnih začetnikov (Oligo-dT) omogočimo prepis samo mRNA molekul, ki so na 3' koncu poliadelirane (67).

Reverzno transkripcijo smo izvedli skladno s proizvajalčevem protokolom *Omniscript Reverse Transcription Handbook*. Sestava reakcijske mešanice je navedena v *Preglednici 2* (67).

Preglednica 2 Sestava reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo.

| Sestavine | Volumen | Končna koncentracija |
|--|-------------------------------|---|
| pufer RT | 2 μ l | |
| mešanica dNTP-jev (po 5 mM posameznega dNTP) | 2 μ l | 0,5 mM vsakega posameznega dNTP |
| začetnik oligo-dT (10 μ M) | 2 μ l | 1 μ M |
| reverzna transkriptaza Omniscript | 1 μ l | 4 U |
| voda brez RNaz | ustrezno preračunana količina | |
| vzorec RNA | ustrezno preračunana količina | do 2 μ g v 20 μ l reakcijske mešanice |
| skupni volumen | 20 μ l | |

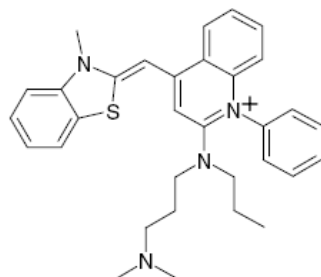
Izolirano RNA smo najprej segreli na 65 °C za natančno 5 minut in jo nato takoj postavili na led za več kot 1 minuto. Z denaturacijo sekundarnih struktur RNA na povišani temperaturi smo zagotovili večjo učinkovitost reakcije prepisovanja. Reakcijska mešanica lahko vsebuje do največ 2 µg v 20 µl. Na podlagi povprečne spektrofotometrično izmerjene koncentracije RNA v vzorcu smo izračunali ustrezen volumen RNA raztopine. Preračunali smo še ustrezen volumen dodatka vode brez RNaz, tako da smo dobili končni želeni volumen reakcijske mešanice, to je 20 µl. Najprej smo vedno dodali pufer RT, dNTP-je, začetnike oligo-dT in vodo (v poljubnem vrstnem redu), nato vzorec RNA in šele čisto na koncu reverzno transkriptazo. S tem smo preprečili nespecifično prepisovanje. Pripravljeno reakcijsko mešanico smo nato inkubirali 60 minut pri 37 °C. Sintetizirano cDNA smo hranili v zamrzovalniku (-20 °C) do nadaljnjih analiz izražanja tarčnih genov.

2.2.4 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (PCR v realnem času, angl. *Real Time Polymerase Chain Reaction*) oziroma kvantitativni PCR temelji na metodi verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki jo uporabljamo za pomnoževanje specifičnih odsekov DNA. PCR v realnem času nam omogoča, da med procesom pomnoževanja DNA sočasno detektiramo in kvantificiramo nastali produkt. Metoda temelji na merjenju fluorescence (68).

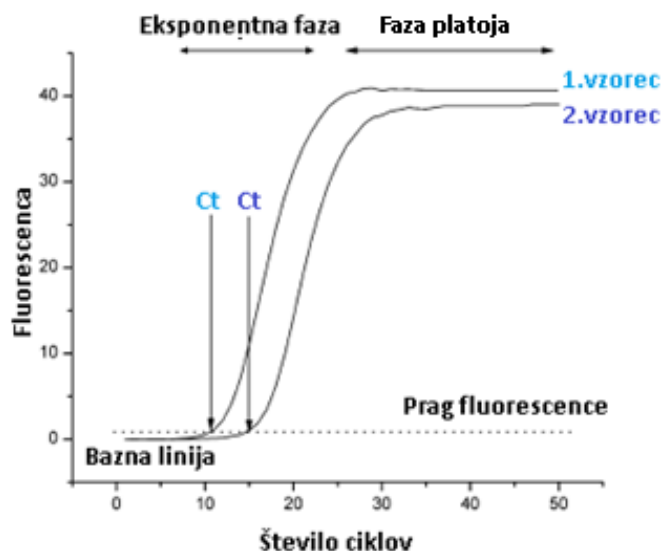
Za pomnoževanje DNA s PCR v realnem času potrebujemo dva začetna oligonukleotida, ki omejujeta odsek DNA, ki ga želimo pomnožiti, dNTP-je kot gradnike za nove verige DNA in termostabilno DNA-polimerazo (običajno *Taq*), v reakcijskem pufru, ki zagotavlja primerno reakcijsko okolje in vsebuje optimalno koncentracijo Mg²⁺ ionov. Reakcija PCR je sestavljena iz treh glavnih korakov, ki se ciklično ponavljajo. V prvem s povišanjem temperature na 95 °C razklenemo dvoverižno DNA, v drugem znižamo temperaturo na 40–60 °C, da se začetni oligonukleotidi lahko priležejo na enoverižne DNA in v tretjem pa temperaturo zopet povišamo na približno 72 °C, da poteče podaljševanje DNA z DNA-polimerazo. Običajno izvedemo 40 ciklov. Teoretično se število kopij matrične DNA v vsakem ciklu podvoji, kar nam predstavlja osnovo za preračun začetnega števila kopij matrične DNA v vzorcu. V realnosti pa se po določenem številu ciklov reaktanti porabijo in reakcija doseže plato. S PCR v realnem času merimo nastajajoči produkt v eksponentni fazi, ko so njegove meritve še sorazmerne začetni količini matrične DNA. Meritve izvedemo po vsakem ciklu, z uporabo interkalirajočih fluorescenčnih barvil ali fluorescenčno obarvanih sond (68).

Med nespecifične metode za detekcijo produkta PCR spada označevanje s fluorescenčnimi barvili, ki se vrinejo v novonastalo dvoverižno DNA. Najpogosteje se uporablja SYBR Green I (*Slika 5*), asimetrični cianin, ki se veže na manjši jarek DNA in pri tem začne oddajati močno fluorescenco. Če je barvilo prosto v raztopini, pa praktično ne fluorescira. Slabost metode je njena nespecifičnost, kar pomeni, da se SYBR Green I veže tudi na nespecifične produkte DNA ter na dimere DNA-oligonukleotidi in oligonukleotidi-oligonukleotidi. Zato moramo z optimizacijo pogojev reakcije preprečiti nastanek dimerov in nespecifičnih produktov PCR. Za specifično detekcijo produkta PCR uporabljamo označene sonde, najpogosteje t.i. sonde Taq-man. Taka sonda se specifično veže na izbrano tarčno zaporedje na DNA in ima na 5' koncu vezano reportersko fluorescenčno barvilo, na 3' pa drugo barvilo, t.i. dušilec. Ko je sonda intaktna, fluorescenco, ki jo oddaja reportersko barvilo, preseže dušilec in zato fluorescence ne zaznamo. Ko pa Taq DNA-polimeraza v stopnji podaljševanja sintetizira novo verigo DNA in pride do mesta vezave sonde, to hidrolizira zaradi eksonukleazne aktivnosti. Pri tem se razdalja med fluorescenčnim barvilom in dušilecem poveča, kar onemogočeni prestrezanje fluorescence, ki jo zato zaznamo. Pri obeh metodah detekcije se torej fluorescenca povečuje sorazmerno z nastajanjem produkta PCR, dokler ta ne doseže platoja (68).



Slika 5 Kemijska struktura fluorescenčnega barvila SYBR Green I.

Z merjenjem fluorescence v vzorcu, v odvisnosti od cikla PCR v realnem času, dobimo graf pomnoževanja matrične DNA (*Slika 6*). Na njem vidimo tri področja, in sicer bazno linijo, eksponentno fazo in plato. Na začetku reakcije PCR v realnem času je fluorescenca signala nižja od ozadja, in to kljub potekajočem pomnoževanju DNA. Tekom nekaj ciklov se nakopiči dovolj produkta, da se signal poveča nad prag fluorescence. Cikel, v katerem se to zgodi, imenujemo prazni cikel (C_t , angl. *threshold cycle*). Vrednost C_t je obratno sorazmerna količini matrične DNA v vzorcu. Torej, če je v vzorcu prisotne več matrične DNA, bo fluorescenca hitreje nad pragom, vrednost C_t bo manjša, in obratno (69).



Slika 6 Graf pomnoževanja matrične DNA s PCR v realnem času: odvisnost fluorescence od števila ciklov. Povzeto po (68).

Pri interpretaciji rezultatov PCR v realnem času lahko uporabimo absolutno ali relativno kvantifikacijo matrične DNA v vzorcu. Pri absolutni kvantifikaciji primerjamo dobljeno vrednost Ct s standardno krivuljo in tako določimo število kopij matrične DNA v vzorcu. Pri relativni kvantifikaciji pa primerjamo količini matrične DNA v dveh vzorcih. Ta metoda je primerna zlasti za primerjalno analizo izražanja genov, saj lahko določamo razmerje izražanja med referenčnim in primerjalnim vzorcem. Pri obeh metodah interpretacije je potrebno rezultate standardizirati glede na število uporabljenih celic za analizo, količino DNA (oboje v primeru absolutne kvantifikacije) ali na izražanje referenčnega gena, ki se izraža konstantno, ne glede na eksperimentalne pogoje (pri relativni kvantifikaciji) (69).

2.2.5 Izvedba reakcije PCR

Uporabili smo PCR v realnem času z nespecifičnim načinom detekcije z barvilom SYBR Green I. Reakcije smo izvedli na optični ploščici z 96 vdolbinicami. V vsako vdolbinico smo odpipetirali najprej po 5 μ l raztopine matrične cDNA, nato po 15 μ l reakcijske mešanice (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), Fermentas) in vse dobro premešali le s pipetiranjem.

Z reakcijo reverzne transkripcije smo dobili cDNA v koncentraciji, ki je bila približno enaka koncentraciji izolirane RNA (skoraj 100 % učinkovitost), kar smo potrdili tudi z meritvami s spektrofotometrom Nano Drop. Iz raztopine, z izmerjeno koncentracijo cDNA, smo nato pripravili delovno raztopino z 2 ng cDNA/ μ L. V vsako vdolbinico smo

torej vnesli po 5 μ l te raztopine, kar znaša 10 ng matrične cDNA. Vsak vzorec smo pripravili v treh ponovitvah.

Uporabljena reakcijska mešanica je vsebovala termostabilno polimerazo DNA (polimeraza DNA Maxima *Hot Start Taq*), dNTP-je, barvilo SYBR Green I in pasivno referenčno barvilo ROX, v optimiziranem reakcijskem pufru za PCR. Referenčno barvilo ROX služi kot interni standard za umeritev fluorescenčnega signala SYBR Greena I. Dodati smo morali le še ustrezna 5' in 3' začetna specifična oligonukleotida, in sicer glede na zaporedje gena, ki smo ga analizirali (*Preglednica 1*). Volumska sestava reakcijske mešanice za PCR je navedena v *Preglednicah 3* in *4*. Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix in raztopine začetnih oligonukleotidov smo shranjevali na -20 °C, zaščitene pred svetlobo. Pred pipetiranjem v vdolbinice optične ploščice smo jih morali počasi odtajati in dobro premešati.

V zadnji dve vdolbinici mikrotitrskeske plošče smo odpipetirali po 5 μ l vode brez nukleaz (namesto cDNA) in 15 μ l reakcijske mešanice za gen, katerega izražanje smo spremljali. To sta bili tudi kontroli za ugotavljanje morebitne kontaminacije reagentov ali vode in nespecifičnega pomnoževanja začetnih oligonukleotidov.

Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice PCR za tarčne gene ICAM-1, IL-23, TNF- α in keratin 17.

| Komponenta | Volumen [μl] |
|--|------------------------------------|
| Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) | 10 |
| 5' začetni oligonukleotid (20 nM) | 0,2 |
| 3' začetni oligonukleotid (20nM) | 0,2 |
| voda brez nukleaz | 4,6 |
| skupni volumen | 15 |

Preglednica 4 Sestava reakcijske mešanice PCR za hišne gene.

| Komponenta | Volumen [μl] |
|--|------------------------------------|
| Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) | 10 |
| 5' začetni oligonukleotid (10 nM) | 0,4 |
| 3' začetni oligonukleotid (10 nM) | 0,4 |
| voda brez nukleaz | 4,2 |
| skupni volumen | 15 |

Na koncu smo optično mikrotitrsko ploščo pokrili z lepljivo optično folijo in jo centrifugirali (1900 obratov/min, 5 min), da smo dobro zmešali reakcijsko mešanico in se znebili morebitnih prisotnih mehurčkov, ki motijo meritve fluorescence. Ploščo smo nato še dodatno prekrili z gumijasto zaščito in jo vstavili v aparat ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, ZDA), v katerem smo predhodno nastavili privzeti program, ki je prikazan v *Preglednici 5*. Na podlagi programa je aparat v določenih časovnih intervalih spreminjal temperaturo in s tem omogočil pomnožitev želenega gena.

Preglednica 5 Temperaturni program za izvedbo reakcije PCR z aparatom ABI Prism 7000 SDS.

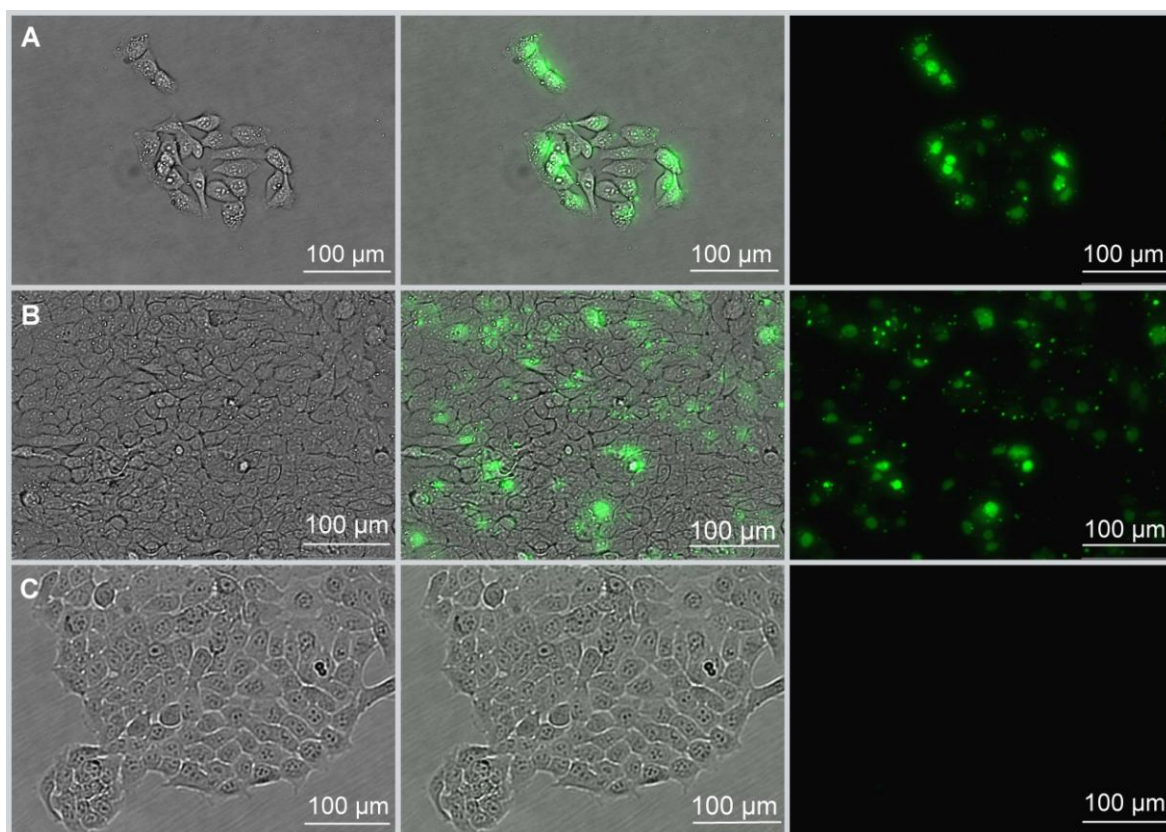
| Stopnja reakcije | Temperatura [°C] | Časovni interval | |
|--|------------------|------------------|---------|
| začetni program | 50 | 2 min | |
| | 95 | 10 min | |
| denaturacija | 95 | 15 s | |
| prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje produkta PCR | 60 | 1 min | 40-krat |

Rezultate reakcije PCR v realnem času smo analizirali s programom SDS (Applied Biosystems, ZDA). Ta nam je izračunal posamezne vrednosti Ct glede na avtomatsko bazno linijo in nastavljeno linijo fluorescenčnega praga (*threshold*), povprečne vrednosti Ct v vzorcu in njihove standardne odklone. Izrisal je tudi graf pomnoževanja produkta PCR, ki predstavlja vrednost fluorescenčnega signala v odvisnosti od števila ciklov PCR.

3 REZULTATI

3.1 Transfekcija celic HaCaT

Uspešnost transfekcije keratinocitov HaCaT smo preverjali s fluorescenčno označenim protismiselnim oligonukleotidom za gen ICAM-1. Jedra celic, ki smo jih transfecirali s transfekcijskim reagentom, so se pod fluorescenčnim mikroskopom obarvala, s čimer smo potrdili uspešen vnos oligonukleotidov v celice in lokalizacijo v celična jedra (*Slika 7*). Da je bila vidna fluorescenca res posledica vnosa oligonukleotidov, smo potrdili s kontrolo (označeni protismiselni oligonukleotidi brez transfekcijskega reagenta), kjer fluorescence ni bilo. S tem smo izključili možnost, da so se celice fluorescenčno obarvale zaradi prijemanja oligonukleotidov na njihove površine. Opazili smo, da smo pri manjši gostoti celic uspeli transfecirati večji odstotek le-teh, kot v primeru njihove večje gostote.



Slika 7 Slika celic HaCaT pod fluorescenčnim mikroskopom po transfekciji s fluorescenčno označenim protismiselnim oligonukleotidom za gen ICAM-1; A) majhna gostota celic in transfekcija v prisotnosti transfekcijskega reagenta, B) velika gostota celic in transfekcija v prisotnosti transfekcijskega reagenta, C) kontrola – transfekcija brez transfekcijskega reagenta.

3.2 Analiza izražanja tarčnih genov

Rezultate izražanja genov s PCR v realnem času smo kvantificirali na relativen način. Za izračun razlik v izražanju genov med kontrolnimi, aktiviranimi in transfeciranimi celicami smo uporabili Livakovo metodo (t.i. metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Standardizirali smo jih na hišni gen *HPRT1*, ki kodira hipokstantin-gvanin fosforibozil transferazo. S tem smo tudi izničili vplive različnega števila analiziranih celic. Predpogoj za uporabo te metode je preverjena 100 % učinkovitost podvojevanja tako tarčnega kot referenčnega gena s PCR v realnem času. Zato moramo predhodno optimizirati pogoje PCR v realnem času. V prvem koraku izračunamo razlike v vrednostih Ct tarčnega in Ct hišnega gena, in sicer tako za testirane kot za umeritvene celice. V drugem koraku pa izračunamo razliko dobljenih razlik. Negativno vrednost te dobljene razlike nato damo v eksponent potence z osnovo 2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Rezultat je razmerje izražanja oz. vrednost za kolikokrat se je zvišalo oz. znižalo izražanje genov, relativno, glede na kalibrator in standardizirano, glede na hišni gen (69).

$$\Delta Ct_{(\text{test})} = Ct_{(\text{tarčni gen, test})} - Ct_{(\text{hišni gen, test})}$$

$$\Delta Ct_{(\text{kalibrator})} = Ct_{(\text{tarčni gen, kalibrator})} - Ct_{(\text{hišni gen, kalibrator})}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{test})} - \Delta Ct_{(\text{kalibrator})}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{standardizirana razlika v izražanju genov}$$

Pri vrednotenju imunske aktivacije keratinocitov smo rezultate tako aktiviranih celic kalibrirali z rezultati kontrolnih. Ko pa smo spremljali znižanje izražanja genov po transfekciji s protismiselnimi oligonukleotidi, smo jih kalibrirali z rezultati imunske aktiviranih celic.

3.3 Izbira referenčnega hišnega gena

Izbira referenčnega hišnega gena je pri relativni kvantifikaciji rezultatov PCR v realnem času ključnega pomena, saj nanj standardiziramo izražanje tarčnih genov. Le tako namreč lahko dobimo zanesljive in med seboj primerljive rezultate. Izražanje hišnega gena mora biti zato stabilno v vseh reakcijskih pogojih. Ovrednotili smo izražanje petih hišnih genov, ki se pogosto uporabljajo pri analizi celične linije keratinocitov HaCaT, in sicer *YWHAZ*, ki kodira protein 14-3-3 zeta/delta; *GAPDH*, ki kodira gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazo; *B2M*, ki kodira β_2 mikroglobulin; *HPRT1*, ki kodira hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferazo in *ACTB*, ki kodira beta aktin (70).

Izražanje hišnih genov smo spremljali v kontrolnih celicah, s $\text{TNF-}\alpha$ imunsko aktiviranih celicah, celicah tretiranih s transfekcijskim reagentom in celicah tretiranih s protismiselnim oligonukleotidom za gen ICAM-1. Pri vseh petih hišnih genih je bilo izražanje dokaj stabilno, saj so bile vrednosti Ct medseboj podobne v vseh pogojih (*Preglednica 6*). Na podlagi izračunanih standardnih odklonov vrednosti Ct v vseh pogojih smo nato izbrali gen *HPRT1*, saj je le-ta med vsemi najmanj variiral ($\sigma = 0,22$).

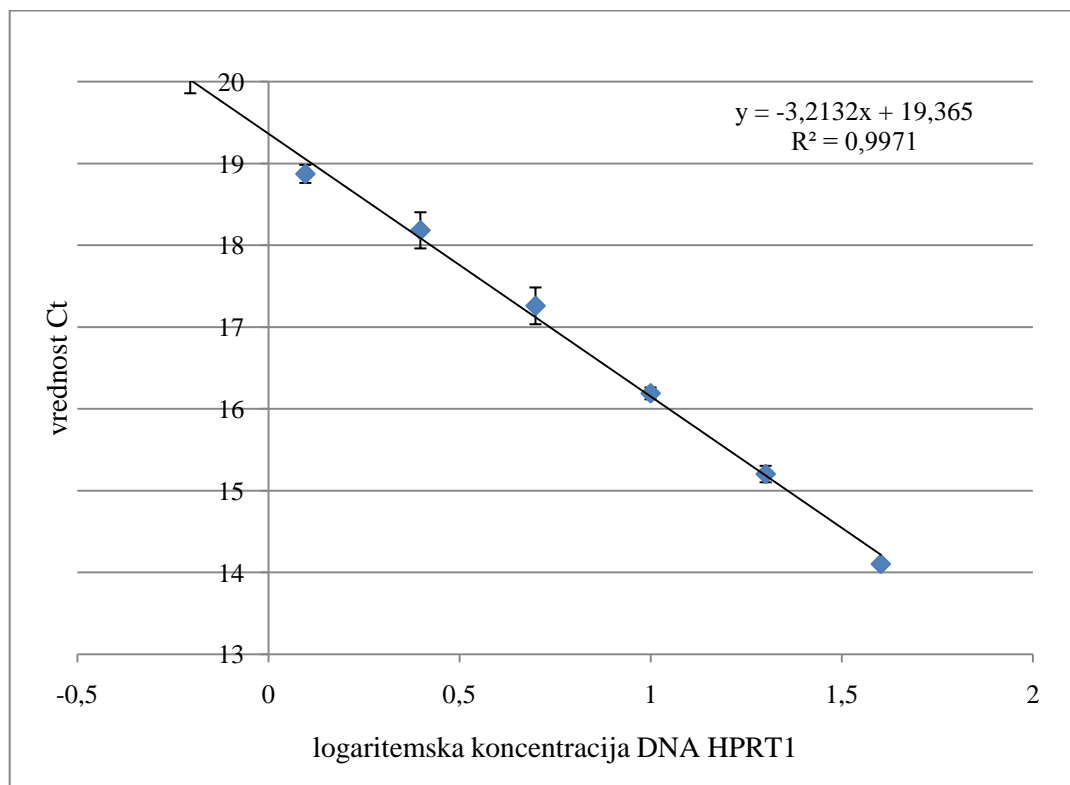
Preglednica 6 Rezultati izražanja hišnih genov (Ct) pri celicah HaCaT, pod različnimi pogoji. Vrednosti Ct so povprečne vrednosti treh paralelk. K – kontrolne celice, $\text{TNF-}\alpha$ – s $\text{TNF-}\alpha$ imunsko aktivirane celice, LIPO – celice tretirane s transfekcijskim reagentom, ICAM-1 ASO – celice tretirane s protismiselnim oligonukleotidom za gen ICAM-1.

| Hišni gen | <i>YWHAZ</i> | <i>GAPDH</i> | <i>B2M</i> | <i>HPRT1</i> | <i>ACTB</i> |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| K | 18,70 ± 0,18 | 16,23 ± 0,16 | 17,27 ± 0,23 | 19,83 ± 0,06 | 15,92 ± 0,28 |
| $\text{TNF-}\alpha$ | 18,09 ± 0,06 | 15,32 ± 0,04 | 16,50 ± 0,36 | 19,84 ± 0,21 | 15,10 ± 0,11 |
| LIPO | 17,89 ± 0,21 | 15,29 ± 0,47 | 16,51 ± 0,11 | 19,56 ± 0,08 | 15,14 ± 0,10 |
| ICAM-1 ASO | 18,58 ± 0,23 | 15,59 ± 0,38 | 17,09 ± 0,38 | 20,11 ± 0,26 | 15,68 ± 0,30 |
| povprečna vrednost Ct | 18,32 | 15,61 | 16,84 | 19,84 | 15,46 |
| standardni odklon | 0,39 | 0,44 | 0,40 | 0,22 | 0,40 |

Povprečna vrednost Ct hišnega gena *HPRT1*, ki smo jo izračunali iz vseh naših poskusov, znaša $20,57 \pm 1,02$ (*Preglednica 7*).

Preglednica 7 Izražanje hišnega gena *HPRT1* v vseh poskusih.

| Poskus | Povprečna vrednost Ct poskusa |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 19,84 ± 0,22 |
| 2 | 19,95 ± 1,12 |
| 3 | 21,36 ± 0,08 |
| 4 | 21,53 ± 0,12 |
| 5 | 19,99 ± 0,36 |
| 6 | 19,34 ± 0,51 |
| 7 | 20,96 ± 0,42 |
| Povprečna vrednost Ct vseh poskusov | 20,57 |
| standardni odklon | 1,02 |



Graf 1 Umeritvena krivulja za izbrani hišni gen *HPRT1*.

3.4 Imunska aktivacija celic

Najprej smo linijo keratinocitov imunsko aktivirali z interferonom gama (IFN- γ , 250 U/mL) in dejavnikom tumorske nekroze alfa (TNF- α , 2,5 μ g/mL). Rezultate izražanja tarčnih genov smo zbrali v *Preglednici 8*. Razmerje izražanja tarčnih genov je bilo večje po aktivaciji celic s TNF- α . Izražanje keratina 17 se je povečalo za kar 10-krat, glede na kontrolne vrednosti, izražanje IL-23 za 7,5-krat, TNF- α za 2,3-krat in ICAM-1 za 1,5-krat. Pri aktivaciji z IFN- γ pa pri ICAM-1 in IL-23 ni prišlo do povišanja izražanja.

Preglednica 8 Primerjava izražanja genov (Ct) po imunski aktivaciji celic z IFN γ in s TNF- α , glede na kontrolo (K).

| Tarčni gen | ICAM-1 | IL-23 | TNF- α | KER 17 | HPRT1 |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| K | 21,46 \pm 0,16 | 24,74 \pm 0,24 | 23,42 \pm 0,09 | 26,76 \pm 0,26 | 17,86 \pm 0,24 |
| IFN- γ | 20,94 \pm 0,01 | 24,24 \pm 0,44 | 21,94 \pm 0,13 | 23,54 \pm 0,21 | 17,58 \pm 0,12 |
| razmerje izražanja gena | 1,17 | 1,16 | 2,30 | 7,61 | |
| TNF- α | 21,17 \pm 0,05 | 22,16 \pm 0,26 | 22,58 \pm 0,07 | 23,75 \pm 0,14 | 18,20 \pm 0,14 |
| razmerje izražanja gena | 1,54 | 7,53 | 2,26 | 10,14 | |

V nadaljevanju smo nato keratinocite aktivirali še s TNF- α in standardnim bakterijskim lipopolisaharidom (LPS) v dveh različnih koncentracijah. Izvedli smo štiri poskuse. Rezultati izražanja tarčnih genov pod temi pogoji so zbrani v *Preglednicah 9–14*.

Preglednica 9 Primerjava izražanja genov (Ct) po imunski aktivaciji celic s TNF- α 2,5 (2,5 μ g/mL), TNF- α 12,5 (12,5 μ g/mL), LPS 0,5 (0,5 μ g/mL) in LPS 2 (2 μ g/mL), glede na kontrolo (K) – poskus 1.

| Tarčni gen | ICAM-1 | IL-23 | TNF- α | KER 17 | HPRT1 |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| K | 23,04 \pm 0,28 | 26,01 \pm 0,15 | 23,31 \pm 0,17 | 27,19 \pm 0,17 | 21,67 \pm 0,13 |
| TNF- α 2,5 | 22,10 \pm 0,29 | 22,22 \pm 0,04 | 22,19 \pm 0,14 | 25,52 \pm 0,10 | 21,60 \pm 0,04 |
| razmerje izražanja gena | 1,84 | 13,24 | 2,08 | 3,05 | |
| TNF- α 12,5 | 22,08 \pm 0,28 | 23,19 \pm 0,14 | 22,48 \pm 0,22 | 26,63 \pm 0,37 | 21,44 \pm 0,16 |
| razmerje izražanja gena | 1,66 | 6,01 | 1,52 | 1,26 | |
| LPS 0,5 | 21,36 \pm 0,04 | 25,06 \pm 0,19 | 22,62 \pm 0,04 | 26,97 \pm 0,34 | 21,45 \pm 0,22 |
| razmerje izražanja gena | 2,77 | 1,66 | 1,40 | 1,01 | |
| LPS 2 | 21,67 \pm 0,31 | 25,58 \pm 0,13 | 23,12 \pm 0,47 | 27,27 \pm 0,16 | 21,38 \pm 0,09 |
| razmerje izražanja gena | 2,12 | 1,10 | 0,93 | 0,78 | |

Preglednica 10 Primerjava izražanja genov (Ct) po imunski aktivaciji celic s TNF- α 2,5 (2,5 $\mu\text{g/mL}$), TNF- α 12,5 (12,5 $\mu\text{g/mL}$), LPS 0,5 (0,5 $\mu\text{g/mL}$) in LPS 2 (2 $\mu\text{g/mL}$), glede na kontrolo (K) – poskus 2.

| Tarčni gen | ICAM-1 | IL-23 | TNF- α | KER 17 | HPRT1 |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| K | 22,46 \pm 0,24 | 25,50 \pm 0,30 | 23,41 \pm 0,03 | 27,00 \pm 0,02 | 21,62 \pm 0,33 |
| TNF- α 2,5 | 22,10 \pm 0,29 | 22,22 \pm 0,04 | 22,19 \pm 0,14 | 25,52 \pm 0,10 | 21,60 \pm 0,04 |
| razmerje izražanja gena | 1,26 | 9,58 | 2,30 | 2,74 | |
| TNF- α 12,5 | 22,08 \pm 0,28 | 23,19 \pm 0,14 | 22,48 \pm 0,22 | 26,63 \pm 0,37 | 21,44 \pm 0,16 |
| razmerje izražanja gena | 1,14 | 4,35 | 1,67 | 1,13 | |
| LPS 0,5 | 21,36 \pm 0,04 | 25,06 \pm 0,19 | 22,62 \pm 0,04 | 26,97 \pm 0,34 | 21,45 \pm 0,22 |
| razmerje izražanja gena | 1,91 | 1,20 | 1,54 | 0,90 | |
| LPS 2 | 21,67 \pm 0,31 | 25,58 \pm 0,13 | 23,12 \pm 0,47 | 27,27 \pm 0,16 | 21,38 \pm 0,09 |
| razmerje izražanja gena | 1,46 | 0,80 | 1,03 | 0,70 | |

Preglednica 11 Primerjava izražanja genov (Ct) po imunski aktivaciji celic s TNF- α 2,5 (2,5 $\mu\text{g/mL}$), TNF- α 12,5 (12,5 $\mu\text{g/mL}$), LPS 0,5 (0,5 $\mu\text{g/mL}$) in LPS 2 (2 $\mu\text{g/mL}$), glede na kontrolo (K) – poskus 3.

| Tarčni gen | ICAM-1 | IL-23 | TNF- α | KER 17 | HPRT1 |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| K | 24,41 \pm 0,10 | 24,56 \pm 0,15 | 24,49 \pm 0,06 | 21,32 \pm 0,43 | 19,72 \pm 0,10 |
| TNF- α 2,5 | 24,02 \pm 0,08 | 23,06 \pm 0,24 | 23,52 \pm 0,13 | 21,69 \pm 0,11 | 20,05 \pm 0,05 |
| razmerje izražanja gena | 1,66 | 3,55 | 2,49 | 0,98 | |
| TNF- α 12,5 | 20,62 \pm 0,33 | 20,95 \pm 0,18 | 19,99 \pm 0,13 | 21,09 \pm 0,15 | 19,09 \pm 0,15 |
| razmerje izražanja gena | 9,00 | 8,88 | 14,69 | 0,76 | |
| LPS 0,5 | 24,37 \pm 0,29 | 24,49 \pm 0,12 | 24,46 \pm 0,14 | 21,56 \pm 0,15 | 20,23 \pm 0,14 |
| razmerje izražanja gena | 1,47 | 1,68 | 1,46 | 1,21 | |
| LPS 2 | 24,20 \pm 0,08 | 25,26 \pm 0,18 | 24,78 \pm 0,22 | 21,76 \pm 0,29 | 19,98 \pm 0,10 |
| razmerje izražanja gena | 1,39 | 0,83 | 0,99 | 0,88 | |

Preglednica 12 Primerjava izražanja genov (Ct) po imunski aktivaciji celic s TNF- α 2,5 (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), TNF- α 12,5 (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS 0,5 (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in LPS 2 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), glede na kontrolo (K) – poskus 4.

| Tarčni gen | ICAM-1 | IL-23 | TNF- α | KER 17 | HPRT1 |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| K | 24,30 \pm 0,15 | 24,27 \pm 0,08 | 23,62 \pm 0,35 | 21,40 \pm 0,20 | 19,98 \pm 0,12 |
| TNF- α 2,5 | 24,02 \pm 0,08 | 23,06 \pm 0,24 | 23,52 \pm 0,13 | 21,69 \pm 0,11 | 20,05 \pm 0,05 |
| razmerje izražanja gena | 1,28 | 2,42 | 1,13 | 0,86 | |
| TNF- α 12,5 | 20,62 \pm 0,33 | 20,95 \pm 0,18 | 19,99 \pm 0,13 | 21,09 \pm 0,15 | 19,09 \pm 0,15 |
| razmerje izražanja gena | 6,95 | 5,39 | 6,70 | 0,67 | |
| LPS 0,5 | 24,37 \pm 0,29 | 24,49 \pm 0,12 | 24,46 \pm 0,14 | 21,56 \pm 0,15 | 20,23 \pm 0,14 |
| razmerje izražanja gena | 1,13 | 1,02 | 0,66 | 1,06 | |
| LPS 2 | 24,20 \pm 0,08 | 25,26 \pm 0,18 | 24,78 \pm 0,22 | 21,76 \pm 0,29 | 19,98 \pm 0,10 |
| razmerje izražanja gena | 1,07 | 0,50 | 0,45 | 0,78 | |

Preglednica 13 Razmerja izražanja genov po imunski aktivaciji celic s TNF- α (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) v štirih poskusih ter njihove povprečne vrednosti in standardni odkloni (σ).

| TNF- α 2,5 | ICAM-1 | IL-23 | TNF- α | KER 17 | TNF- α 12,5 | ICAM-1 | IL-23 | TNF- α | KER 17 |
|----------------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
| | 1,84 | 13,24 | 2,08 | 3,05 | | 1,66 | 6,00 | 1,52 | 1,26 |
| | 1,26 | 9,58 | 2,30 | 2,74 | | 1,14 | 4,35 | 1,67 | 1,13 |
| | 1,66 | 3,55 | 2,49 | 0,98 | | 9,00 | 8,88 | 14,69 | 0,76 |
| | 1,28 | 2,42 | 1,13 | 0,86 | | 6,95 | 5,39 | 6,70 | 0,67 |
| povprečje | 1,51 | 7,20 | 2,00 | 1,91 | | 4,69 | 6,16 | 6,14 | 0,96 |
| σ | 0,28 | 5,11 | 0,60 | 1,15 | | 3,89 | 1,94 | 6,18 | 0,28 |

Preglednica 14 Razmerja izražanja genov po imunski aktivaciji celic z LPS (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) v štirih poskusih ter njihove povprečne vrednosti in standardni odkloni (σ).

| LPS0,5 | ICAM-1 | IL-23 | TNF- α | KER 17 | LPS2 | ICAM-1 | IL-23 | TNF- α | KER 17 |
|----------------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|------|-------------|-------------|---------------|-------------|
| | 2,77 | 1,66 | 1,40 | 1,01 | | 2,12 | 1,10 | 0,93 | 0,78 |
| | 1,91 | 1,20 | 1,54 | 0,90 | | 1,46 | 0,80 | 1,03 | 0,70 |
| | 1,47 | 1,68 | 1,46 | 1,21 | | 1,39 | 0,83 | 0,99 | 0,88 |
| | 1,13 | 1,02 | 0,66 | 1,06 | | 1,07 | 0,50 | 0,45 | 0,78 |
| povprečje | 1,82 | 1,39 | 1,27 | 1,05 | | 1,51 | 0,81 | 0,85 | 0,78 |
| σ | 0,71 | 0,33 | 0,41 | 0,13 | | 0,44 | 0,25 | 0,27 | 0,08 |

Z LPS nismo uspešno aktivirali celic, saj se izražanje tarčnih genov v njih ni značilno povečalo, in to kljub prisotnosti specifičnih vezavnih mest na površini tarčnih celic (TLR4). Povečati smo uspeli le izražanje gena za ICAM-1, in sicer za 1,8-krat oziroma 1,5-krat, medtem ko se je izražanje genov za IL-23, TNF- α in keratin 17 po uporabi LPS 2 celo znižalo, v primerjavi s kontrolo (razmerje izražanja < 1). S TNF- α v višji koncentraciji smo izražanje genov za ICAM-1, IL-23 in TNF- α uspeli bolj zvišati kot z njegovo nižjo koncentracijo, a so rezultati močno variirali. Izražanje gena za keratin 17 pa tudi s TNF- α v višji koncentraciji nismo uspeli povišati. Najboljše rezultate smo torej dobili po uporabi TNF- α 2,5, saj smo zvišali izražanje vseh tarčnih genov. V povprečju smo v vseh izvedenih poskusih izražanje gena za ICAM-1 povečali za $1,65 \pm 0,45$ -krat, gena za IL-23 za $7,20 \pm 5,11$ -krat, gena za TNF- α za $1,84 \pm 0,60$ -krat ter gena za keratin 17 za $2,21 \pm 1,28$ -krat. V nadaljevanju smo zato za imunsko aktivacijo uporabljali le TNF- α v koncentraciji 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

Preglednica 15 Razmerja izražanja tarčnih genov po imunski aktivaciji celic z 2,5 $\mu\text{g/mL}$ TNF- α v vseh poskusih ter njihove povprečne vrednosti in standardni odkloni (σ).

| TNF- α 2,5 | ICAM-1 | IL-23 | TNF- α | KER 17 |
|-------------------|--------|-------|---------------|--------|
| | 1,84 | 13,24 | 2,08 | 3,05 |
| | 1,26 | 9,58 | 2,30 | 2,74 |
| | 1,66 | 3,55 | 2,49 | 0,98 |
| | 1,28 | 2,42 | 1,13 | 0,86 |
| | 2,46 | | 1,96 | 4,07 |
| | 1,42 | | 1,07 | 1,56 |
| povprečje | 1,65 | 7,20 | 1,84 | 2,21 |
| σ | 0,45 | 5,11 | 0,60 | 1,28 |

3.5 Potencialna toksičnost transfekcijskega reagenta

Preverili smo tudi potencialno toksičnost transfekcijskega reagenta (Lipofectamine).

Rezultati so podani v *Preglednicah 16–18*.

Preglednica 16 Izražanje gena za ICAM-1 (Ct) pod vplivom transfekcijskega reagenta (LIPO, Lipofectamine), v primerjavi s kontrolno linijo (K).

| Tarčni gen | ICAM-1 | HPRT |
|--------------------------------|--------------|--------------|
| K | 23,18 ± 0,05 | 19,83 ± 0,06 |
| LIPO | 22,20 ± 0,10 | 19,56 ± 0,08 |
| razmerje izražanja gena | 1,63 | |

Preglednica 17 Izražanje tarčnih genov (Ct) pod vplivom transfekcijskega reagenta (LIPO, Lipofectamine), v prisotnosti TNF- α (TNF- α 2,5 LIPO), v primerjavi z imunsko aktiviranimi celicami (TNF- α 2,5) – poskus 1.

| Tarčni gen | IL-23 | ICAM-1 | TNF- α | KER 17 | HPRT1 |
|--------------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| K1 | 24,56 ± 0,15 | 24,41 ± 0,10 | 24,49 ± 0,06 | 21,32 ± 0,42 | 19,72 ± 0,10 |
| TNF- α 2,5 | 23,06 ± 0,24 | 24,02 ± 0,78 | 23,52 ± 0,13 | 21,69 ± 0,11 | 20,05 ± 0,05 |
| razmerje izražanja gena | 3,55 | 1,66 | 2,49 | 0,98 | |
| TNF- α 2,5 LIPO | 23,68 ± 0,14 | 24,02 ± 0,11 | 23,97 ± 0,17 | 21,43 ± 0,19 | 20,17 ± 0,22 |
| razmerje izražanja gena | 2,48 | 1,78 | 1,95 | 1,25 | |

Preglednica 18 Izražanje tarčnih genov (Ct) pod vplivom transfekcijskega reagenta (LIPO, Lipofectamine), v prisotnosti TNF- α (TNF- α 2,5 LIPO) v primerjavi z imunsko aktiviranimi celicami (TNF- α 2,5) – poskus 2.

| Tarčni gen | IL-23 | ICAM-1 | TNF- α | KER 17 | HPRT1 |
|---------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| K2 | 24,27 ± 0,08 | 24,30 ± 0,15 | 23,62 ± 0,35 | 21,40 ± 0,20 | 19,98 ± 0,12 |
| TNF- α 2,5 | 23,06 ± 0,24 | 24,02 ± 0,78 | 23,52 ± 0,13 | 21,69 ± 0,11 | 20,05 ± 0,05 |
| razmerje izražanja | 2,42 | 1,28 | 1,13 | 0,86 | |
| TNF- α 2,5 LIPO | 23,68 ± 0,14 | 24,02 ± 0,11 | 23,97 ± 0,17 | 21,43 ± 0,19 | 20,17 ± 0,22 |
| razmerje izražanja | 1,69 | 1,38 | 0,89 | 1,10 | |

Morfologija celic se v prisotnosti transfekcijskega reagenta ni spremenila, kar smo preverili s pomočjo svetlobnega mikroskopa. Transfekcijski reagent Lipofectamine pa vpliva na izražanje tarčnih genov, v primerjavi s kontrolno linijo celic, kar smo najprej

ugotovili na primeru izražanja gena za ICAM-1 (večje za 1,6-krat) (*Preglednica 16*). Ob sočasni prisotnosti aktivacijskega reagenta TNF- α (2,5 $\mu\text{g/mL}$) in transfekcijskega reagenta (3 $\mu\text{L/mL}$) so se razmerja izražanja tarčnih genov gibala med vrednostmi od 0,89 do 2,48 (*Preglednici 17 in 18*). V primeru IL-23 in TNF- α je transfekcijski reagent le malo znižal izražanje njunih genov, v primerjavi z aktivacijo s TNF- α . Pri ICAM-1 in keratinu 17 pa je le malo povišal izražanje njunih genov.

3.6 Znižanje izražanja tarčnih genov s protismiselnimi oligonukleotidi

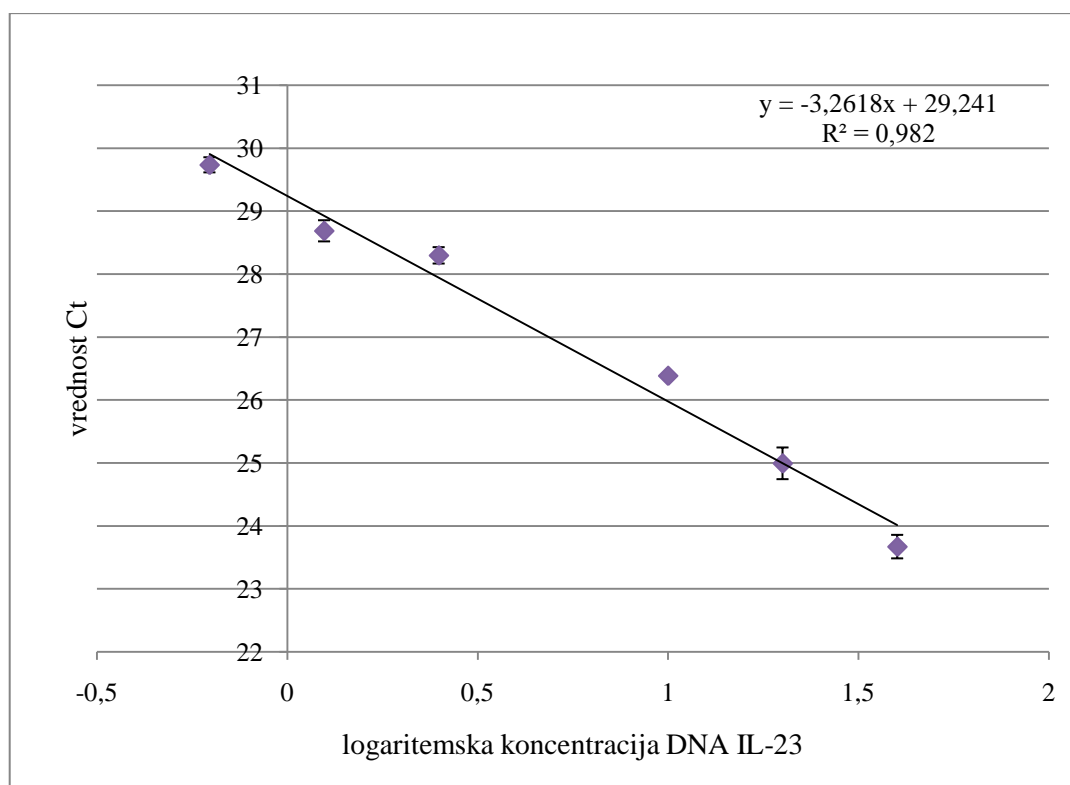
3.6.1 IL-23

Imunsko aktivirane celice smo tretirali s specifičnim protismiselnim oligonukleotidom IL-23, in sicer v dveh ponovitvah ter merili izražanje tarčnega gena za IL-23. Rezultati so prikazani v *Preglednici 19*.

Preglednica 19 Utišanje izražanje gena (Ct) za IL-23 s specifičnim protismiselnim oligonukleotidom. Razmerja izražanja gena v imunsko aktiviranih celicah (TNF- α 2,5) in v celicah, tretiranih s protismiselnim oligonukleotidom (IL-23ASO(1) – prva ponovitev, IL-23 ASO(2) – druga ponovitev).

| Tarčni gen | IL-23 | HPRT1 |
|--|------------------|------------------|
| K1 | 24,56 \pm 0,15 | 19,72 \pm 0,10 |
| TNF- α 2,5 | 23,06 \pm 0,24 | 20,05 \pm 0,05 |
| razmerje izražanja gena glede na kontrolo | 3,55 | |
| IL-23 ASO(1) | 24,71 \pm 0,06 | 20,02 \pm 0,09 |
| razmerje izražanja gena glede na imunsko aktivacijo | 0,31 | |
| IL-23 ASO(2) | 24,42 \pm 0,26 | 20,17 \pm 0,09 |
| razmerje izražanja gena glede na imunsko aktivacijo | 0,42 | |

Izražanje gena za IL-23 smo s protismiselnim oligonukleotidom uspeli znižati. Razmerje izražanja med imunsko aktiviranimi celicami in celicami, tretiranimi tudi s protismiselnimi oligonukleotidi je bilo v prvem vzorcu 0,31, v drugem pa 0,42. Izdelali smo tudi umeritveno krivuljo za izražanje gena za IL-23.



Graf 2 Umeritvena krivulja za izražanje gena za IL-23.

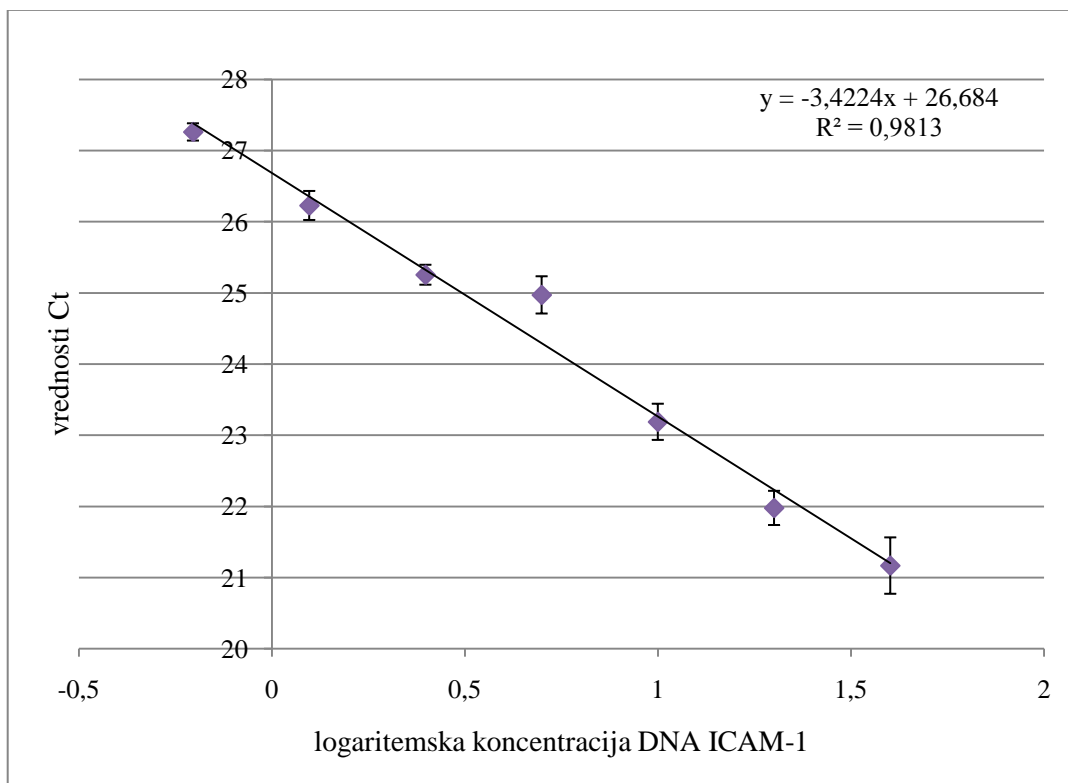
3.6.2 ICAM-1

Imunsko aktivirane celice smo tretirali s specifičnim protismiselnim oligonukleotidom ICAM-1 in merili izražanje tarčnega gena za ICAM-1. Uporabili smo tudi negativno kontrolo z naključnim nespecifičnim oligonukleotidom. Rezultati so prikazani v *Preglednici 20*.

Preglednica 20 Utišanje izražanje gena (Ct) za ICAM-1 s specifičnim protismiselnim oligonukleotidom. Razmerja izražanja gena v imunsko aktiviranih celicah (TNF- α 2,5) in v celicah, tretiranih tudi s protismiselnim oligonukleotidom (ICAM-1 ASO) ter razmerja izražanja gena v imunsko aktiviranih celicah (TNF- α 2,5) in celicah, tretiranih tudi z naključnim nespecifičnim kontrolnim oligonukleotidom (ICAM-1 NSO).

| Tarčni gen | ICAM-1 | HPRT1 |
|--|------------------|------------------|
| K | 24,45 \pm 0,01 | 21,35 \pm 0,22 |
| TNF- α 2,5 | 24,31 \pm 0,17 | 21,73 \pm 0,18 |
| razmerje izražanja gena glede na kontrolo | 1,42 | |
| ICAM-1 ASO | 24,56 \pm 0,16 | 22,14 \pm 0,19 |
| razmerje izražanja gena glede na imunsko aktivacijo | 1,12 | |
| ICAM-1 NSO | 23,83 \pm 0,08 | 22,56 \pm 0,20 |
| razmerje izražanja gena glede na imunsko aktivacijo | 2,48 | |

Izražanja gena za ICAM-1 s protismiselnim oligonukleotidom nismo uspeli znižati, saj je bilo razmerje izražanja v samo imunsko aktiviranih celicah in v celicah, tretiranih tudi s protismiselnimi oligonukleotidi 1,12. Dodatek naključnega nespecifičnega kontrolnega oligonukleotida pa je izražanje gena za ICAM-1 zvišal (razmerje 2,48). Izdelali smo tudi umeritveno krivuljo za izražanje gena za ICAM-1.



Graf 3 Umeritvena krivulja za izražanje gena za ICAM-1.

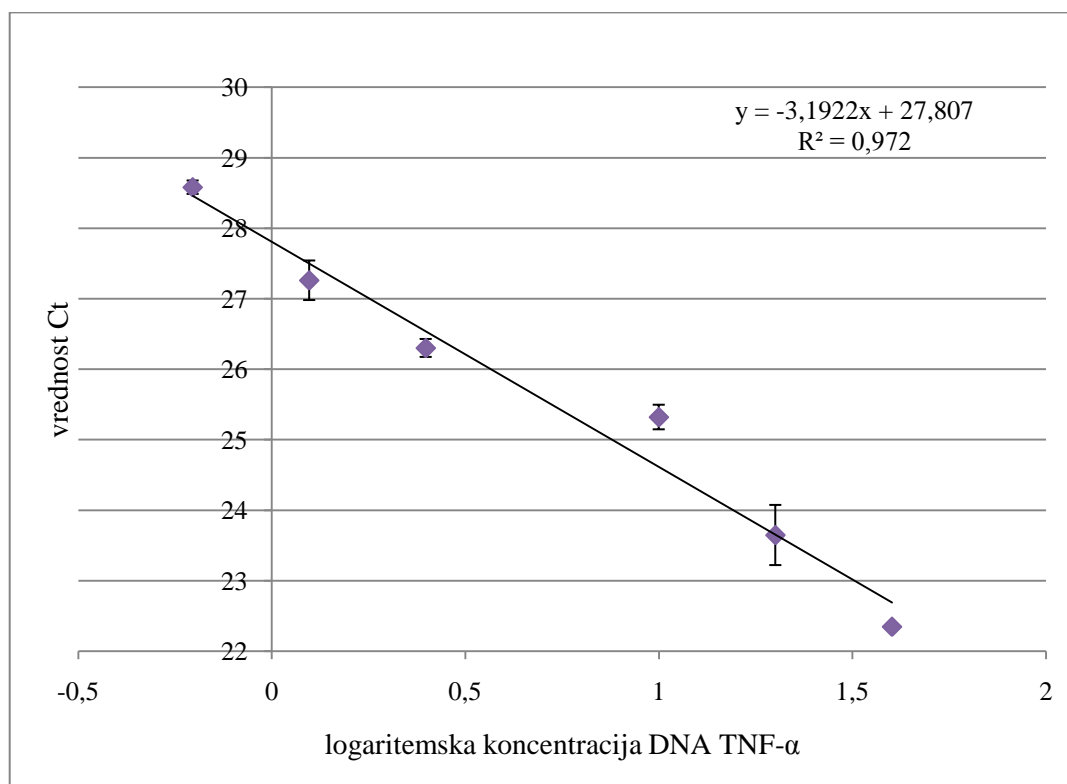
3.6.3 TNF- α

Imunsko aktivirane celice smo tretirali s specifičnim protismiselnim oligonukleotidom TNF- α in merili izražanje tarčnega gena za TNF- α . Uporabili smo tudi negativno kontrolo z naključnim nespecifičnim oligonukleotidom. Rezultati so prikazani v *Preglednici 21*.

Preglednica 21 Utišanje izražanje gena (Ct) za TNF- α s specifičnim protismiselnim oligonukleotidom. Razmerja izražanja gena v imunsko aktiviranih celicah (TNF- α 2,5) in v celicah, tretiranih tudi s protismiselnim oligonukleotidom (TNF- α ASO) ter razmerja izražanja gena v imunsko aktiviranih celicah (TNF- α 2,5) in v celicah, tretiranih tudi z naključnim nespecifičnim kontrolnim oligonukleotidom (TNF- α NSO).

| Tarčni gen | TNF- α | HPRT1 |
|--|------------------|------------------|
| K | 24,26 \pm 0,14 | 21,35 \pm 0,22 |
| TNF- α 2,5 | 24,53 \pm 0,23 | 21,73 \pm 0,18 |
| razmerje izražanja gena glede na kontrolo | 1,07 | |
| TNF- α ASO | 25,33 \pm 0,17 | 21,80 \pm 0,06 |
| razmerje izražanja gena glede na imunsko aktivacijo | 0,60 | |
| TNF- α NSO | 21,85 \pm 0,08 | 22,56 \pm 0,20 |
| razmerje izražanja gena glede na imunsko aktivacijo | 11,43 | |

Izražanje gena za TNF- α smo s protismiselnim oligonukleotidom uspeli znižati. Razmerje izražanja med samo imunsko aktiviranimi celicami in celicami, tretiranimi tudi s protismiselnimi oligonukleotidi je bilo 0,60. Dodatka naključnega nespecifičnega kontrolnega oligonukleotida pa je izražanje gena za TNF- α močno zvišal (razmerje 11,43). Izdelali smo tudi umeritveno krivuljo za izražanje gena za TNF- α .



Graf 4 Umeritvena krivulja za izražanje gena za TNF- α .

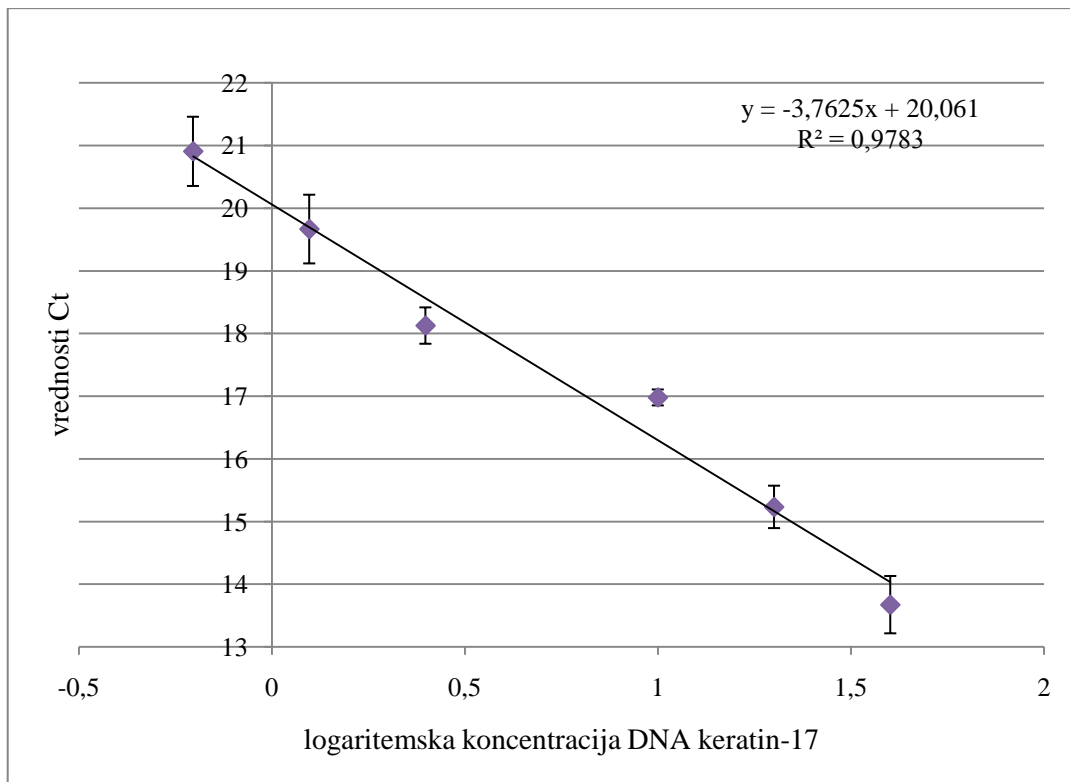
3.6.4 Keratin 17

Imunsko aktivirane celice smo tretirali s specifičnim protismiselnim oligonukleotidom KER 17 in merili izražanje tarčnega gena za KER 17. Uporabili smo tudi negativno kontrolo z naključnim nespecifičnim oligonukleotidom. Rezultati so prikazani v Preglednici 22.

Preglednica 22 Utišanje izražanje gena (Ct) za keratin 17 s specifičnim protismiselnim oligonukleotidom. Razmerja izražanja gena v imunsko aktiviranih celicah (TNF- α 2,5) in v celicah, tretiranih tudi s protismiselnim oligonukleotidom (KER 17 ASO) ter razmerja izražanja gena v imunsko aktiviranih celicah (TNF- α 2,5) in v celicah, tretiranih tudi z naključnim nespecifičnim kontrolnim oligonukleotidom (KER 17 NSO).

| Tarčni gen | KER 17 | HPRT1 |
|--|------------------|------------------|
| K | 25,46 \pm 0,20 | 21,35 \pm 0,22 |
| TNF- α 2,5 | 25,19 \pm 0,17 | 21,73 \pm 0,18 |
| razmerje izražanja gena glede na kontrolo | 1,56 | |
| KER 17 ASO | 26,20 \pm 0,08 | 22,20 \pm 0,21 |
| razmerje izražanja gena glede na imunsko aktivacijo | 0,69 | |
| KER 17 NSO | 24,62 \pm 0,25 | 22,56 \pm 0,20 |
| razmerje izražanja gena glede na imunsko aktivacijo | 2,64 | |

Izražanje gena za keratin 17 smo s protismiselnim oligonukleotidom uspeli znižati. Razmerje izražanja med samo imunsko aktiviranih celicah in v celicah, tretiranih tudi s protismiselnimi oligonukleotidi je bilo 0,69. Dodatek naključnega nespecifičnega kontrolnega oligonukleotida pa je izražanje gena za keratin 17 zvišal (razmerje 2,64). Izdelali smo tudi umeritveno krivuljo za izražanje gena za keratin 17.



Graf 5 Umeritvena krivulja za izražanje gena za keratin 17.

4 RAZPRAVA

Luskavica je pogosta kronična vnetna kožna bolezen, ki zelo zmanjšuje kvaliteto življenja obolelih. Njeno zdravljenje je kljub množici različnih razpoložljivih zdravil pogosto nezadostno uspešno in povezano z resnimi neželenimi učinki. Za vse je značilno, da luskavico zdravijo le simptomatsko. Med najučinkovitejša sodijo sistemska biološka zdravila, ki tarčno zavirajo imunske procese vpletene v patogenezo bolezni. Ker pa so to zelo draga zdravila, ki so ravno tako povezana s tveganji za neželene sistemske učinke, so bolnikom na voljo še, ko odpovedo vse druge možnosti zdravljenja. Razvoj novih učinkovitih in varnih metod za zdravljenje luskavice, z uporabo lokalno apliciranih protismiselnih oligonukleotidov, bi lahko doprinesel k izboljšanju kvalitete življenja tovrstnih bolnikov. Na ta način bi lahko specifično znižali prekomerno izražanje provnetnih citokinov in ostalih prekomerno izraženih proteinov, ki igrajo ključno vlogo pri patogenezi bolezni.

Možnost lokalnega zdravljenja luskavice s specifičnim protismiselnim oligonukleotidom Alicaforsenom so pri podjetju Isis Pharmaceuticals že vrednotili v kliničnih testiranjih (52). Alicaforsen je 20 baz dolg fosforotioat, usmerjen proti genu za molekulo ICAM-1, ki je ravno tako prekomerno izražena v luskavičnih plakih (53). V predklinični študiji so pokazali, da topikalno nanesena učinkovina v kremi učinkovito zniža izražanje ICAM-1 v človeški koži, ki so jo transplantirali na imunsko oslABLJENE miši. Znižanje nivoja mRNA za ICAM-1 je bilo specifično in koncentracijsko odvisno (46). V nadaljnji klinični študiji faze IIa so kot prvi dokazali, da protismiselni oligonukleotidi prodirajo do nižjih plasti kože v plakih tudi pri ljudeh. Ugotovili so zmanjšanje poroženosti kože pri pacientih, kar nakazuje, da imajo topikalno aplicirani protismiselni oligonukleotidi velik terapevtski potencial za zdravljenje luskavice (55).

Odkritje novega imunopatogenega modela luskavice, ki vključuje signalno pot IL-23/Th17, je omogočilo boljše razumevanje bolezenskega procesa in odprlo nove možnosti oziroma tarče zdravljenja (7). Glede na najnovejša spoznanja o imunopatogenezi luskavice, napredek protismiselne tehnologije ter rezultate omenjenih kliničnih testiranj, smo se odločili raziskati možnost utišanja provnetnih citokinov z lokalno nanesenimi specifičnimi protismiselnimi oligonukleotidi. Osredotočili smo se na citokin IL-23, kot druge tarče pa smo si izbrali še keratin 17, ICAM-1 in TNF- α . Za našo raziskavo smo izbrali keratinocitni model HaCaT, ki velja za dobro uveljavljeni model epidermisa *in vitro* (58). Da bi se čim

bolj približali realnemu dogajanju v luskavičnih spremembah kože, smo omenjene celice imunsko aktivirali in s tem povišali raven provnetnih citokinov.

Nivoje izražanja genov smo spremljali s PCR v realnem času. Uporabili smo nespecifično metodo detekcije nastalega produkta s fluorescenčnim barvilom SYBR Green I. Najprej smo s pripravo standardnih krivulj za tarčne in hišne gene preverili, ali je učinkovitost pomnoževanja blizu 100 % (optimalno $R^2 > 0,980$ in naklon $-3,32$). Nato smo rezultate relativno kvantificirali, in sicer z razmerjem izražanja genov v primerjanih celicah. Pri vrednotenju imunske aktivacije keratinocitov smo rezultate tako aktiviranih celic kalibrirali glede na rezultate kontrolnih celic. Pri ugotavljanju znižanja izražanja genov po transfekciji s protismiselnimi oligonukleotidi, pa smo jih kalibrirali glede na rezultate, izmerjene v imunsko aktiviranih celicah. Da bi izničili vplive variabilnosti v količinah analizirane cDNA med posameznimi vzorci in med ponovitvami, smo vse rezultate izražanja genov standardizirali na izbrani hišni gen, katerega izražanje je bilo nespremenjeno v vseh eksperimentalnih pogojih. Najprej smo ovrednotili izražanje petih hišnih genov, ki se pogosto uporabljajo pri analizi celične linije keratinocitov HaCaT – *YWHAZ*, ki kodira protein 14-3-3 zeta/delta; *GAPDH*, ki kodira gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazo; *B2M*, ki kodira β_2 mikroglobulin; *HPRT1*, ki kodira hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferazo in *ACTB*, ki kodira beta aktin (70). Čeprav je bilo izražanje vseh izbranih hišnih genov dokaj stabilno (majhni standardni odkloni vrednosti Ct, izmerjenih pod različnimi pogoji), smo za nadaljnjo standardizacijo izbrali gen *HPRT1*. Ta je imel najmanjšo variabilnost glede na količino mRNA tarčnih genov. Pri izbiranju hišnega gena smo celice predhodno izpostavili $TNF-\alpha$ za imunsko aktivacijo, izbranemu transfekcijskemu reagentu in specifičnemu protismiselnemu oligonukleotidu. Povprečna vrednost Ct za gen *HPRT1* je znašala $19,84 \pm 0,22$. Dodaten razlog za izbor gena *HPRT1* pa so bile absolutno primerljive vrednosti njegovih Ct z vrednostmi Ct tarčnih genov. Tako smo povečali občutljivost metode pri zaznavanju že manjših razlik izražanja genov (71). V nadaljevanju smo z Livakovo metodo vse vrednosti Ct tarčnih genov standardizirali na vrednosti Ct gena *HPRT1*. Povprečna vrednost Ct v vseh izvedenih poskusih za *HPRT1* je bila $20,57 \pm 1,02$.

Keratinocitno linijo smo poskusili aktivirati s $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ in LPS. Prva se sproščata iz aktiviranih dendritičnih celic v koži in s svojim provnetnim delovanjem inducirata povečano nastajanje provnetnih citokinov (62). Lipopolisaharid (LPS), je bakterijski endotoksin, ki sproži imunsko aktivacijo celic preko vezave na receptor TLR4, ki je izražen tudi na površini celic HaCaT. Vezava LPS na receptor TLR4 ravno tako

povzroči povečano nastajanje provnetnih citokinov v teh celicah (63). Pri vrednotenju rezultatov smo vedno upoštevali razmerje izražanja tarčnega, gena glede na kontrolno celično linijo in ga standardizirali na izražanje hišnega gena *HPRT1*. Najprej smo primerjali učinkovitost imunske aktivacije s TNF- α in z IFN- γ . Iz rezultatov je razvidno, da je primernejši reagent za aktivacijo TNF- α , ki je povečal izražanje vseh izbranih tarčnih genov, medtem ko IFN- γ pozitivno vplival le na izražanje genov za keratin 17 in TNF- α . V naslednjem koraku smo primerjali še aktivacijo s TNF- α in z LPS. Pri TNF- α smo uporabili koncentraciji 2,5 $\mu\text{g/mL}$ in 12,5 $\mu\text{g/mL}$, pri LPS pa 0,5 $\mu\text{g/mL}$ in 2 $\mu\text{g/mL}$. Z LPS nismo uspeli v celoti imunsko aktivirati celic, kar je razvidno iz razmerij izražanja tarčnih genov, v primerjavi s kontrolo (razmerje < 1). Vidno je bilo povišano izražanje gena za ICAM-1. S TNF- α v višji koncentraciji smo uspeli izražanje genov za ICAM-1, IL-23 in TNF- α bolj zvišali kot z njegovo nižjo koncentracijo, vendar pa so rezultati močno variirali. Tako smo z uporabo 2,5 $\mu\text{g/mL}$ TNF- α v povprečju v vseh poskusih, izražanje gena za ICAM-1 povečali za $1,65 \pm 0,45$ -krat, gena za IL-23 za $7,20 \pm 5,11$ -krat, gena za TNF- α za $1,84 \pm 0,60$ -krat ter gena za keratin 17 za $2,21 \pm 1,28$ -krat. Od vseh so najbolj variirali rezultati pri IL-23, pri čemer sta problematični dve najvišji vrednosti. Menimo, da dajeta realnejšo sliko nižji vrednosti. Z imunsko aktivacijo keratinocitne celične linije HaCaT z 2,5 $\mu\text{g/mL}$ TNF- α smo torej uspeli pripraviti model luskavice *in vitro*, na katerem smo lahko v nadaljevanju razvijali nov pristop k lokalnemu biološkemu zdravljenju bolezni s protismiselnimi oligonukleotidi.

Dostava protismiselnih oligonukleotidov na mesto delovanja predstavlja še vedno eno izmed večjih ovir, ki omejuje tovrstno zdravljenje v praksi. Z lokalnim zdravljenjem luskavice protismiselne oligonukleotide lažje dostavimo do tarč kot pri sistemskem zdravljenju. Pri luskavici je funkcija lipofilne bariere poroženele plasti kože okrnjena, kar omogoča, da protismiselni oligonukleotidi lahko prehajajo v nižje plasti kože, medtem ko pri zdravi koži to ni mogoče (39, 46, 47). Za dostavo oligonukleotidov v celice smo v naših poskusih *in vitro* lahko uporabili kationski lipidni transfekcijski reagent, ki pa za morebitno nadaljnjo uporabo *in vivo* ni primeren zaradi svoje toksičnosti (43). V kasnejšem razvoju topikalnega pripravka s protismiselnimi nukleotidi, bi bilo zato potrebno poiskati dostavni sistem, s katerim bi izboljšali učinkovitost njihovega vnosa v celico. Velik potencial kažejo liposomi in različni mikro- in nanodelci, ali na lipidni ali polimerni osnovi (43, 44, 45). Za zagotovitev odpornosti protismiselnih oligonukleotidov na celične nukleaze, smo uporabili kemijsko spremenjene oligonukleotide, fosforotioate. Ti se tudi sicer najpogosteje uporabljajo v razvoju protismiselnih učinkovin, in sicer zaradi

njihove, v raziskavah izkazano dobre učinkovitosti, sposobnosti aktivacije RNaze H, ustreznih farmakokinetičnih lastnosti ter široke dostopnosti zaradi enostavne sinteze. Uspešnost transfekcije keratinocitov s protismiselnimi oligonukleotidi smo spremljali s fluorescenčno mikroskopijo. Fluorescenčno označen protismiselni oligonukleotid ICAM-1 smo s transfekcijskim reagentom Lipofectamine uspešno dostavili v celice (*Slika 7*). Oligonukleotidi so se uspešno premestili v jedro, kjer je tudi njihovo mesto delovanja, vezano na glavno mesto aktivnosti RNaze H, ki jo fosforotioati aktivirajo. Uspešnost transfekcije je bila večja pri manjši gostoti celic. Najverjetnejši vzrok za to je bila večja količina transfekcijske zmesi na površino posamezne celice ter lažji dostop do celic, saj so bili celični stiki v tem primeru bolj rahli kot med celicami v večji gostoti. Protokol proizvajalca sicer navaja, da naj se transfekcija izvaja pri večji gostoti celic, ker s tem povečamo učinkovitost in zmanjšamo pojav upočasnjene celične rasti, ki se lahko pojavi zaradi preobsežne transfekcije (72). V naših poskusih smo transfekcijo izvajali pri 50 % celični konfluentnosti. Transfekcijski reagent sicer za keratinocite ni toksičen, saj pod mikroskopom nismo opazili vidnih morfoloških sprememb celic po inkubaciji z njim. Tudi delež mrtvih celic (obarvane z nigrozinom) se ni razlikoval od tistega v kontrolnih celicah. Uporabljeni reagent pa je imel manjši vpliv na izražanje tarčnih genov, v primerjavi s kontrolno celično linijo. Pri imunsko aktiviranih celicah, v prisotnosti aktivacijskega reagenta TNF- α (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), je rahlo zmanjšal razmerje izražanja genov za IL-23 in TNF- α in rahlo povečal izražanje genov za ICAM-1 in keratinu 17 (*Preglednici 17 in 18*). Kljub temu je bilo izražanje tarčnih genov še vedno večje kot v kontrolnih celicah.

Po uspešni dostavi učinkovine na mesto delovanja se pojavi vprašanje njene učinkovitosti, torej ali dejansko zniža izražanje tarčnih genov in ali je to znižanje specifično. Učinkovitost je v veliki meri odvisna od izbire zaporedja protismiselnega oligonukleotida in njegovega mesta hibridizacije na tarčni mRNA. Zato je bilo prav načrtovanje zaporedja izjemno pomemben korak v raziskavi. Glede na to, da smo postavljali genske osnove za razvoj nove metode za zdravljenje luskavice, smo se odločili za tista zaporedja, ki so se v predhodno objavljenih študijah že izkazala za učinkovita (47, 56, 57, 58). V nadaljevanju raziskave pa bi lahko z načrtovanjem novih zaporedij in njihovim presejanjem poiskali še učinkovitejše protismiselne oligonukleotide.

Z uporabljenimi protismiselnimi oligonukleotidi nam je uspelo znižati izražanje treh tarčnih genov od štirih v keratinocitnem modelu luskavice *in vitro*. Najuspešnejši smo bili pri zniževanju izražanja gena za IL-23, saj je bilo razmerje njegovega izražanja, glede na imunsko aktivirane celice, po tretiranju s protismiselnim oligonukleotidom le 0,31 v prvi

paraleli ter 0,42 v drugi paraleli. S predhodno imunsko aktivacijo smo zelo uspešno aktivirali celice, saj so te izražale skoraj štiri krat več IL-23 kot kontrolne celice (razmerje 3,55). Torej je prišlo do velikega znižanja izražanja tega gena tudi v absolutnem merilu, saj smo ga uspeli vrnili na svoj bazalni nivo nastajanja, ki smo ga izmerili v kontrolnih keratinocitih. Naši rezultati glede znižanja izražanja gena za IL-23 so skladni z študijo na dozorelih dendritičnih celicah *in vitro*, kjer so uporabili enako zaporedje protismiselnega oligonukleotida IL-23 in dosegli 65–70 % znižanje nastajanja tega citokina (56).

IL-23 kot osrednji citokin, ki vodi v aktivacijo odziva vrste Th17 in nadaljnje spodbujanje izražanja pro-vnetnih citokinov v celicah Th17 v dermisu in epidermisu, predstavlja zelo pomembno novo terapevtsko tarčo pri zdravljenju luskavice. Z značilnim specifičnim znižanjem nastajanja IL-23 v plakih s protismiselnim oligonukleotidom bi torej lahko posredno zmanjšali tudi obseg nastajanja drugih pro-vnetnih citokinov v vnetni kaskadi, predvsem IL-17. Posledično pa bi z zaviranjem kroničnega vnetnega procesa v obolelih mestih kože tudi izboljšali klinično sliko luskavice.

V nadaljevanju smo pod enakimi pogoji v keratinocite HaCaT vnesli še protismiselne oligonukleotide usmerjene proti preostalim trem izbranim tarčam. Uspešno smo znižali izražanje genov za TNF- α in keratin 17, med tem ko nam to ni uspelo pri ICAM-1. Pri slednjemu je bilo razmerje izražanja gena glede na imunsko aktivirane celice 1,12, kar pomeni, da je bilo izražanje v obeh primerih približno enako. Z aktivacijo smo uspeli malo povečati njegovo izražanje (razmerje glede na kontrolo je 1,42). S specifičnim protismiselnim oligonukleotidom TNF- α smo znižali izražanje njegovega gena (razmerje je bilo 0,60 glede na imunsko aktivacijo), vendar pa predhodno tega nismo uspešno zvišali s samo imunsko aktivacijo (razmerje 1,07 glede na kontrolne celice). Čeprav smo pri večini poskusov sicer dosegli povišanje izražanja njegovega gena po imunski aktivaciji celic s TNF- α , bi lahko bil v tem primeru vzrok za neuspešno aktivacijo negativna povratna zanka regulacije izražanja endogenega TNF- α v keratinocitih. Pri keratinu 17 pa smo dosegli najprej želeno zvišanje izražanja po imunski aktivaciji (razmerje, glede na kontrolo, je 1,56), nato pa tudi znižanje izražanja njegovega gena po tretiranju s protismiselnim oligonukleotidom (razmerje, glede na samo imunsko aktivirane celice, je bilo 0,69).

Glede na to da smo na primeru uporabe specifičnega protismiselnega oligonukleotida za ICAM-1 dokazali, da take učinkovine res vstopajo v celico, smo sklepali, da bi lahko bil vzrok za neuspešno znižanje izražanja gena za ICAM-1 neuspešna hibridizacija na tarčno mRNA. Ugotovilo smo, da smo pomotoma uporabili napačno oligonukleotidno zaporedje. Preskušali smo protismiselni oligonukleotid 5'-TGCATCCCCCAGGCCACCAT-3', ki je

komplementaren mišji mRNA za ICAM-1, namesto prvotno načrtovanega 5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3', ki je ustreza človeški mRNA za ICAM-1 (47). Po uspešnem vstopu protismiselnih oligonukleotidov v celice HaCaT zato ni prišlo do hibridizacije in posledičnega znižanja izražanja tarčnega gena. Kljub temu lahko nespremenjeno izražanje ICAM-1 (razmerje 1,12) uporabimo za potrditev specifičnega mehanizma delovanja protismiselnih oligonukleotidov. Uporabljeni protismiselni oligonukleotid je torej v našem poskusu dejansko deloval kot naključni oligonukleotid, brez specifičnega mesta hibridizacije na mRNA izbranih tarčnih genov.

Prav nespecifična vezava na ostale sestavine celic je ena izmed omejitev protismiselne tehnologije, saj lahko vodi v nespecifičen učinek. Z načrtovano uporabo naključnega oligonukleotida kot negativna kontrola smo nedvoumno pokazali, da je doseženo znižano izražanje tarčnih genov res posledica specifičnega delovanja izbranih protismiselnih oligonukleotidov. Pri uporabi naključnega nespecifičnega kontrolnega oligonukleotida se je izražanje tarčnih genov vedno celo rahlo povečalo. Najizrazitejše povišanje izražanja gena po aplikaciji naključnega nespecifičnega kontrolnega oligonukleotida smo ugotovili pri TNF- α , in sicer za kar 11,43-krat, pri ICAM-1 in keratinu 17 pa za 2,5- oziroma 2,6-krat glede na njihovo izražanje v kontrolnih, imunsko aktiviranih celicah. Na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo izključiti možnosti, da tudi naši protismiselni oligonukleotidi delujejo nespecifično, in s tem lahko tako še dodatno imunsko aktivirajo keratinocite, pa je njihova ugotovljena učinkovitost zniževanja izražanja tarčnih genov še toliko večja.

5 SKLEP

Učinkovito in varno zdravilo za tarčno lokalno zdravljenje luskavice bi lahko bistveno pripomoglo k izboljšanju kvalitete življenja pacientov. Glede na rezultate že izvedenih kliničnih študij imajo protismiselni oligonukleotidi velik terapevtski potencial na področju vnetnih bolezni, kamor sodi tudi luskavica, saj lahko z njimi zelo specifično učinkovito zaviramo prekomerno izražanje genov, ki so ključni v imunopatofiziologiji bolezni. Glavna prednost lokalnega biološkega zdravljenja je odsotnost sistemske toksičnosti, ki je pogosto omejitveni dejavnik ostalih trenutno uporabljenih metod zdravljenja. Dokazali so že, da lahko topikalno aplicirani protismiselni oligonukleotidi uspešno prehajajo v globlje plasti kože v plakih, saj je barierna funkcija poroženele plasti kože zaradi luskavice oslABLJENA.

Tudi rezultati naše predklinične raziskave, z uporabo protismiselnih oligonukleotidov na uspešno vzpostavljenem keratinocitnem modelu luskavice *in vitro*, so zelo spodbudni. Za dokončne sklepe bi bilo seveda potrebno nadaljevati z raziskovanjem, nam pa je uspelo postaviti temelje za razvoj tovrstne nove metode zdravljenja, saj smo na dobri poti optimizacije vnosa protismiselnih oligonukleotidov v keratinocite, kar velja predvsem za tarčni gen za IL-23. Z izbranim specifičnim protismiselnim oligonukleotidom smo namreč uspeli specifično znižati njegovo izražanje in ga skoraj povrniti na bazalni nivo, izmerjen v intaktnih keratinocitih. Prav citokin IL-23 naj bi, glede na novejša dognanja o bolezenskem procesu luskavice, igral ključno vlogo v razvoju te imunsko posredovane bolezni. Zato je IL-23 pomembna tarča za zdravljenje luskavice. Poleg tega smo z novim pristopom uspešno znižali še izražanje genov za keratin 17 in TNF- α , pri čemer ostajajo možnosti za izboljšanje vnosa protismiselnih oligonukleotidov v celice še odprte. Z uporabo naključnega nespecifičnega oligonukleotida smo dokazali specifičnost znižanja nivojev tarčnih mRNA. S protismiselnimi oligonukleotidi torej lahko ciljano zmanjšamo proizvodnjo proteinov, ki so prekomerno izraženi v plakih, rezultat pa naj bi bila izboljšana klinična slika luskavice.

V nadaljevanju bi lahko z načrtovanjem novih zaporedij protismiselnih oligonukleotidov in nadaljnjim presejanjem poiskali še učinkovitejše učinkovine. Preverili bi lahko tudi njihovo sinergistično delovanje v kombinaciji protismiselnih oligonukleotidov, usmerjenih proti različnim genskim tarčam. Pred realizacijo ideje o lokalnem biološkem zdravilu za zdravljenje luskavice s protismiselnimi oligonukleotidi, pa bi morali izbrati ustrezen dostavni sistem, s katerim bi zagotovili učinkovit vnos v

keratinocyte *in vivo*, pripraviti primerno amfifilno podlago ter dokazati odsotnost citotoksičnosti, genotoksičnosti, akutne toksičnosti in fotosenzibilnosti takšnega zdravila.

6 LITERATURA

1. Crow JM. Psoriasis uncovered. *Nature* 2012; 492 (7429): 50–1.
2. Nograles KE, Davidovici B, Krueger JG. New Insights in the Immunologic Basis of Psoriasis. *Semin Cutan Med Surg* 2010; 29 (1): 3–9.
3. Capalleri JC, Bushmakina AG, Harness J, Manolo C. Psychometric validation of the physician global assessment scale for assessing severity of psoriasis disease activity. *Qual Life Res* 2013. Dostopno preko: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11136-013-0384-y>. Dostop: 29.7.2013.
4. NICE clinical guideline 153: Psoriasis: the assessment and management of psoriasis. NICE 2012. <http://guidance.nice.org.uk/CG153>. Dostop: 29.7.2013.
5. Capon F, Munro M, Barker J, Trembath R. Searching for the Major Histocompatibility Complex Psoriasis Susceptibility Gene. *J Invest Dermatol* 2002; 118 (5):745–51.
6. Liu Y, Krueger JG, Bowcock AM. Psoriasis: genetic associations and immune system. *Genes Immun* 2007; 8 (1): 1–12.
7. Pašić A, Lipozenčić J, Čeović R, Kostović K. The Genetics of Psoriasis – Selected Novelties in 2008. *Acta Dermatovenerol Croat* 2009; 17 (3): 176–81.
8. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 2009; 129 (6): 1339–50.
9. Strzępa A, Szczepanik M. IL-17-expressing cells as a potential therapeutic target for treatment of immunological disorders. *Pharmacol Rep* 2011; 63 (1): 30–44.
10. Van de Kerkhof PC. Novel biologic therapies in development targeting IL-12/IL-23. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24 Suppl 6: 5–9.
11. Miljković J. Luskavica: etiologija in zdravljenje. *Farm Vestn* 2006; 57: 106–9.
12. Parrish L. Psoriasis: symptoms, treatments and its impact on quality of life. *Br J Community Nurs* 2012; 17 (11): 524–8.
13. Weigle N, McBane S. Psoriasis. *Am Fam Physician* 2013; 87 (9): 626–33.
14. Oquendo M, Abramovits W, Morrell P. Topical vitamin D analogs available to treat psoriasis. *Skinmed* 2012; 10 (6): 356–60.
15. Mason AR, Mason J, Cork M, Dooley G, Hancock H. Topical treatments for chronic plaque psoriasis. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 3: CD005028.

16. Trémezaygues L, Reichrath J. Vitamin D analogs in the treatment of psoriasis: Where are we standing and where will we be going? *Dermatoendocrinol* 2011; 3 (3): 180–6.
17. Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Antunes J, Cruz D, Ferreira J, Filipe P. Mechanisms of Action of Topical Corticosteroids in Psoriasis. *Int J Endocrinol* 2012; 2012: 561018.
18. Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 2002; 96 (1): 23– 43.
19. Gottlieb AB, Chao C, Dann F. Psoriasis comorbidities. *J Dermatolog Treat* 2008; 19 (1): 5–21.
20. Nguyen T, Zuniga R. Skin conditions: new drugs for managing skin disorders. *FP Essent* 2013; 407: 11–6.
21. Kristl J. Prevladujoče učinkovine za zdravljenje luskavice. *Farm Vestn* 2006; 57: 196–202.
22. Guenther LC. Optimizing treatment with topical tazarotene. *Am J Clin Dermatol* 2003; 4 (3): 197–202.
23. Osório F, Magina S. Phototherapy and Photopheresis: Old and New Indications. *Expert Rev Dermatol* 2011; 6 (6): 613–23.
24. Dogra S, Mahajan R. Systemic methotrexate therapy for psoriasis: past, present and future. *Clin Exp Dermatol* 2013; 38 (6): 573–88.
25. Prodanovic EM, Korman NJ. Traditional systemic therapy I: methotrexate and cyclosporine. In: Wienberg JM. *Milestones in Drug Therapy; Treatment of Psoriasis*. Birkhäuser Basel, 2008: 103–20.
26. Ormerod AD, Campalani E, Goodfield MJD. British Association of Dermatologists guidelines on the efficacy and use of acitretin in dermatology. *Br J Dermatol* 2010; 162 (5): 952–63.
27. European Medicines Agency. CHMP Guideline on clinical investigation of medicinal products indicated for the treatment of psoriasis (CHMP/EWP/2454/02 corr). 2004. Dostopno preko: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003329.pdf. Dostop: 29.7.2013.
28. European Medicines Agency. www.ema.europa.eu. Dostop: 29.7.2013.

29. Galvan-Banqueri M, Marín Gil R, Santos Ramos B, Bautista Paloma FJ. Biological treatments for moderate-to-severe psoriasis: indirect comparison. *J Clin Pharm Ther* 2013; 38 (2): 121–30.
30. European Medicines Agency. Enbrel, Povzetek glavnih značilnosti zdravila (12.4.2103).
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000262/human_med_000764.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Dostop: 29.7.2013.
31. European Medicines Agency. Humira, Povzetek glavnih značilnosti zdravila (15.4.2013).
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000481/human_med_000822.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Dostop: 29.7.2013.
32. European Medicines Agency. Remicade, Povzetek glavnih značilnosti zdravila (11.6.2013).
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000240/human_med_001023.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Dostop: 29.7.2013.
33. European Medicines Agency. Stelara, Povzetek glavnih značilnosti zdravila (14.3.2013).
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000958/human_med_001065.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Dostop: 29.7.2013.
34. Rustin MHA. Long-term safety of biologics in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: review of current data. *Br J Dermatol* 2012; 167 Suppl 3: 3–11.
35. Anderson PJ. Tumor necrosis factor inhibitors: clinical implications of their different immunogenicity profiles. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 34 (5 Suppl1): 19–22.
36. Vidal L, Blagden S, Attard G, de Bono J. Making sense of antisense. *Eur J Cancer* 2005; 41 (18): 2812–8.
37. Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2002; 1 (5): 347–55.

38. Mansoor M, Melendez AJ. Advances in antisense oligonucleotide development for target identification, validation, and as novel therapeutics. *Gene Regul Syst Bio* 2008; 2: 275–95.
39. White PJ, Atley LM, Wraight CJ. Antisense oligonucleotide treatments for psoriasis. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4 (1): 75–81.
40. Isis Pharmaceuticals. Therapeutic Areas. <http://www.isispharm.com/Pipeline/Therapeutic-Areas/index.htm>. Dostop: 29.7.2013.
41. Chen X, Dudgeon N, Shen L, Wang JH. Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development. *Drug Discov Today* 2005; 10 (8): 587–93.
42. Prakash TP. An overview of sugar-modified oligonucleotides for antisense therapeutics. *Chem Biodivers* 2011; 8 (9): 1616–41.
43. Juliano R, Alam MR, Dixit V, Kang H. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2008; 36 (12): 4158–71.
44. Zhu L, Mahato RI. Lipid and polymeric carrier-mediated nucleic acid delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2010; 7 (10): 1209–26.
45. Fattal E, Barratt G. Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA. *Br J Pharmacol* 2009; 157 (2): 179–94.
46. White PJ, Gray AC, Fogarty RD, Sinclair RD, Thumiger SP, Werther GA, Wraight CJ. C-5 propyne-modified oligonucleotides penetrate the epidermis in psoriatic and not normal human skin after topical application. *J Invest Dermatol* 2002; 118 (6): 1003–7.
47. Mehta RC, Stecker KK, Cooper SR, Templin MV, Tsai YJ, Condon TP, Bennett CF, Hardee GE. Intercellular adhesion molecule-1 suppression in skin by topical delivery of anti-sense oligonucleotides. *J Invest Dermatol* 2000; 115 (5): 805–12.
48. Chan JH, Lim S, Wong WS. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33 (5-6): 533–40.
49. Aartsma-Rus A, van Vliet L, Hirschi M, Janson AA, Heemskerk H, de Winter CL, de Kimpe S, van Deutekom JC, 't Hoen PA, van Ommen GJ. Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms. *Mol Ther* 2009; 17 (3): 548–53.

50. European Medicines Agency. CHMP SWP Reflection paper on the assessment of the genotoxic potential of antisense oligodeoxynucleotides (EMA/CHMP/SWP/199726/2004). 2005. Dostopno preko: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003149.pdf. Dostop: 29.7.2013.
51. Singh J, Kaur H, Kaushik A, Peer S. A Review of Antisense Therapeutic Interventions for Molecular Biological Targets in Various Diseases. *Int J Pharmacol* 2011; 7: 294–315.
52. EvaluatePharma. Isis Begins Phase Iia Studies Of ISIS 2302 For Psoriasis. <http://www.evaluatepharma.com/Universal/View.aspx?type=Story&id=2301>. Dostop: 29.7.2013.
53. Shanahan WR Jr. ISIS 2302, an antisense inhibitor of intercellular adhesion molecule 1. *Expert Opin Investig Drugs* 1999; 8 (9): 1417–29.
54. EvaluatePharma. Phase II Clinical Trial Of ISIS 2302 Suggests Topical Antisense Drug Penetrates and Reduces Thickness in Patients' Psoriatic Plaques. <http://www.evaluatepharma.com/Universal/View.aspx?type=Story&id=18074>. Dostop: 29.7.2013.
55. The Free Library. Isis Pharmaceuticals Reports Phase II Study Results Of Topical Alicaforfen, ISIS 2302, in Psoriasis. [http://www.thefreelibrary.com/Isis Pharmaceuticals Reports Phase II Study Results Of Topical...-a083230649](http://www.thefreelibrary.com/Isis+Pharmaceuticals+Reports+Phase+II+Study+Results+Of+Topical...-a083230649). Dostop: 29.7.2013.
56. Vaknin-Dembinsky A, Balashov K, Weiner HL. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol* 2006; 176 (12): 7768–74.
57. Chang T, Sun L, Wang Y, Wang D, Li W, Li C, Gao T, Liu Y, Wang G. Inhibition of keratin 17 expression with antisense and RNAi strategies: exploring novel therapy for psoriasis. *Exp Dermatol* 2011; 20 (7): 555–60.
58. Chandrasekar B, Mummidi S, Valente AJ, Patel DN, Bailey SR, Freeman GL, Hatano M, Tokuhisa T, Jensen LE. The pro-atherogenic cytokine interleukin-18 induces CXCL16 expression in rat aortic smooth muscle cells via MyD88, interleukin-1 receptor-associated kinase, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, c-Src, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, c-Jun N-terminal kinase, and activator protein-1 signaling. *J Biol Chem*. 2005; 280 (28): 26263-77.

59. Deyrieux AF, Wilson VG. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology* 2007; 54 (2): 77–83.
60. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; 106 (3): 761–71.
61. Minnesota State University Moorhead. Counting Cells with a Hemocytometer: Protocol. <http://web.mnstate.edu/provost/CountingCellsHemocytometer.pdf>. Dostop: 29.7.2013.
62. Takahashi H, Tsuji H, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Cell proliferation and cytokine induction by tnf-alpha of psoriatic keratinocytes are not different from normal keratinocytes in vitro. *Indian J Dermatol* 2009; 54 (3): 237–9.
63. Pivarsci A, Bodai L, Réthi B, Kenderessy-Szabó A, Koreck A, Széll M, Beer Z, Bata-Csörgő Z, Magócsi M, Rajnavölgyi E, Dobozy A, Kemény L. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* 2003; 15 (6): 721–30.
64. Nobel Prize. The Fluorescence Microscope. <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence/index.html>. Dostop: 29.7.2013.
65. Qiagen, RNeasy® Mini Handbook Fourth Edition, 2006. Dostopno preko: <http://www.qiagen.com>. Dostop: 29.7.2013.
66. Thermo Fisher Scientific. Assessment of Nucleic Acid Purity. <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>. Dostop: 29.7.2013.
67. Qiagen, Omniscript® Reverse Transcription Handbook, 2010. Dostopno preko: <http://www.qiagen.com>. Dostop: 29.7.2013.
68. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27 (2-3): 95–125.
69. Real-Time PCR Applications Guide, Bio-Rad Laboratories, 2006. Dostopno preko: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>. Dostop: 29.7.2013.
70. Allen D, Winters E, Kenna PF, Humphries P, Farrar GJ. Reference gene selection for real-time rtPCR in human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2008; 49 (3): 217–25.

71. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 33.
72. Lipofectamine 2000 Invitrogen life technologies. Dostopno preko: <http://www.bristol.ac.uk/biochemistry/stephens/lipofectamine2000.pdf>. Dostop: 29.7.2013.