

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRENEJ JERIČ

**RAZVOJ NOVE METODE ZA VNOS
OLIGONUKLEOTIDOV V SESALSKE CELICE S
POMOČJO KEMOPORACIJE**

Enoviti magistrski študij farmacija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRENEJ JERIČ

**RAZVOJ NOVE METODE ZA VNOS OLIGONUKLEOTIDOV V SESALSKE
CELICE S POMOČJO KEMOPORACIJE**

**DEVELOPMENT OF NEW METHOD FOR OLIGONUCLEOTIDE INSERTION
INTO MAMMALIAN CELLS BY USING CHEMOPORATION**

Ljubljana, 2013

“There is nothing like looking, if you want to find something.” J.R.R. Tolkien, The Hobbit

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof.dr. Boruta Štruklja in asist.dr Matjaža Ravnikarja.

Zahvale

Borutu za priložnost in vizijo,

Matjažu za neskončno potrpežljivost in nesebično pomoč,

Janji za vzdrževanje moje homeostaze,

vsem ostalim za vse ostalo.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof.dr. Boruta Štruklja in somentorja asist.dr. Matjaža Ravnikarja.

Ljubljana, 2013

Lastnoročni podpis:

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Uroš Urleb

Član diplomske komisije/mentor: prof. dr. Borut Štrukelj

Član diplomske komisije: doc. dr. Robert Roškar

Član diplomske komisije/somentor: asist. dr. Matjaž Ravnikar

VSEBINA

1 UVOD.....	1
1.1 VNOS GENSKÉ INFORMACIJE V CELICO	1
1.2 GENSKO ZDRAVLJENJE	2
1.2.1 Strategije	3
1.2.2 Potencialne bolezni, primerne za zdravljenje z gensko terapijo	4
1.2.2.1 Dedne bolezni	4
1.2.2.2 Rak.....	4
1.2.2.3 Luskavica.....	5
1.2.3 Protismiselni oligonukleotidi	7
1.3 METODE VNOSA GENSKEGA MATERIALA.....	10
1.3.1 Virusne metode vnosa	10
1.3.1.1 Retrovirusni vektorji.....	11
1.3.1.2 Lentivirusni vektorji	11
1.3.1.3 Adenovirusni vektorji.....	11
1.3.1.4 Adeno-asociacijski virusi (AAV)	11
1.3.2 Ne-virusne metode vnosa.....	12
1.3.2.1 Mikroinjiciranje	12
1.3.2.2 Elektroporacija	12
1.3.2.3 Genska pištola/biolistika	13
1.3.2.4 Kationski liposomi.....	13
1.4 KEMOPORACIJA.....	14
1.4.1 Saponini.....	15
1.4.2 Holati.....	15
1.4.3 Epigalokatehin – 3 - galat	15
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI IN APARATURE	17
3.1.1 Raztopine in gojišča	18
3.1.1.1 Raztopine saponinov in sterolov.....	18
3.1.2 Biološki materiali	19

3.1.2.1 Plazmidi	19
3.2 METODE	19
3.2.1 Vzpostavitev celične linije HaCaT	19
3.2.1.1 Odmrznitev celic	19
3.2.1.2 Gojenje celic	20
3.2.2 Transformacija	21
3.2.3 Meritev izražanja genov	22
3.2.3.1 Izolacija RNA	22
3.2.3.2 Določanje koncentracije z Nanodrop-om	22
3.2.3.3 Reverzna transkripcija	23
3.2.3.4 qPCR	24
3.2.3.5 Analiza izražanja	25
3.2.3.6 TEST MTS	26
4 REZULTATI	27
4.1 KEMOPORACIJA	29
4.1.1 Vpliv različnih koncentracij kemoporantov na preživetje celic	29
4.1.2 Vpliv različnih časovnih izpostavitvev	30
4.1.3 Vnos segmentov DNA	33
4.1.3.1 Vnos protismiselnih oligonukleotidov	33
4.1.3.2 Plazmid	35
4.2 UTIŠANJE IZRAŽANJA	36
5 DISKUSIJA	40
6 SKLEPI	42
7 LITERATURA	43

POVZETEK

Gensko zdravljenje nam omogoča nadomestitev okvarjenih ali odsotnih genov in regulacijo njihovega izražanja. Prednosti takšnega zdravljenja sta možnost trajne ozdravitve prej neozdravljivih bolezni ali vsaj daljše in bolj kakovostno življenje pacienta. Do junija leta 2012 je bilo v teku, opravljenih ali odobrenih že več kot 1800 kliničnih preizkušanj. Potencialne bolezni, ki bi jih lahko na ta način zdravili so: dedne bolezni, nekatere vrste raka in avtoimunske bolezni (na primer luskavica).

Bistven korak za uspešno gensko terapijo je vnos genske informacije v celico. Proces ne sme biti toksičen za celice, transfekcija mora biti hitra in ne sme aktivirati imunskega sistema. V ta namen so razvite številne metode, ki pa so večinoma drage, kompleksne, z nizko stopnjo preživetja celic in mnogokrat neprimerne za široko uporabo. Alternativno metodo bi lahko predstavljala kemoporacija, dodatek snovi, za katere je znano, da povzročijo reverzibilno prepustnost bakterijskih membran in omogočajo vnos genskega materiala v bakterije.

Namen našega raziskovalnega dela je razvoj nove metode za vnos oligonukleotidov v sesalske celice s pomočjo kemoporacije. Metodo smo preizkusili na keratinocitni celični liniji HaCaT ter optimizirali koncentracijo kemoporantov in čas izpostavitve. Nato smo celice transficirali s fluorescenčno označenimi protismiselnimi oligonukleotidi za interlevkin 23 ter pod fluorescenčnim mikroskopom opazovali uspešnost transfekcije. Z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času smo spremljali utišanje izražanja gena za interlevkin 23, ki je pogosto prekomerno izražen pri vnetnih procesih (na primer luskavici). Ugotovili smo, da izbrani kemoporanti lahko celo povečajo stopnjo metabolne aktivnosti celic (ki je merilo preživetja celic) v primerjavi z netretiranimi celicami. Izjema je escin, ki jo znižuje. Kot najboljši kemoporant se je izkazal CHAPS. V primerjavi z lipofektaminom, katerega čas izpostavitve je 4-24h, je transformacija s kemoporacijo mnogo hitrejša, za uspešno transformacijo zadostuje deset minut. S kemoporacijo smo v keratinocite uspeli vnesti protismiselne oligonukleotide. S tem smo dokazali, da je s to metodo možno transficirati sesalske celice. Z nadaljnjo optimizacijo bi kemoporacija lahko predstavljala alternativno znanim metodam vnosa genskega materiala v sesalske celice.

Ključne besede: kemoporacija, genska terapija, protismiselni oligonukleotidi, IL-23

ABSTRACT

The process of introducing genes into cells in order to substitute or replace the defective or missing gene is called gene therapy. Gene therapy has a great potential for permanent reparation of deficient genes or at least for enabling longer life and better quality of living. Amongst diseases, suitable for treatments are: genetic diseases, certain types of cancer and autoimmune diseases (such as psoriasis). An essential step in gene therapy treatment is successful introduction of genetic information into cells. The process itself should not show any toxicity towards cells, transfection must be quick and without any immune response. For this purpose, a wide variety of methods have been introduced, yet vast majority of them tends to be too complex, costly, with low cell survival rate, and often unsuitable for widespread use. Chemoporation could represent an alternative method. By adding a substance, which is known to cause reversible permeability of bacterial membranes (chemoporants), we can already introduce genetic material into competent bacterial cells. The purpose of our research is development of a new method which would use chemoporation for oligonucleotides introduction into mammalian cells. The method was tested on the keratinocyte cell line HaCaT. We have optimized concentration of chemoporants and exposure time. Then the cells were transfected with the fluorescent labeled antisense oligonucleotides of the interleukin 23. Transfection efficiency was monitored with fluorescent microscope. The polymerase chain reaction in real time has been used to monitor the antisense oligonucleotide's effect on expression of interleukin 23 gene, which is often over-expressed in inflammatory processes (for example, psoriasis). We have found that the selected chemoporants can increase the level of metabolic activity of cells (which is a measure of cell survival) when compared with untreated cells. The exception is escin, which lowers the survival. CHAPS proved to be the best chemoporant. Chemoporation is much faster than transfection with lipofectamine. We successfully introduced antisense oligonucleotides into keratinocytes by chemoporation. Thus we have shown that this method can be used for transfection of mammalian cells. With further optimization chemoporation may represent an alternative approach to the known methods for the introduction of genetic material into mammalian cells.

Key words: chemoporation, Gene therapy, antisense oligonucleotides, IL-23

SEZNAM OKRAJŠAV

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

2'-OME – 2'-O-metilni oligonukleotidi

A_{260nm} – absorbanca pri 260 nm

A_{280nm} – absorbanca pri 280 nm

AAV- adeno-asociacijski virus

ACTB – gen za beta aktin, angl. *Beta-actin gene*

CD 4⁺T – antigen 4 na površini levkocita T

CD 8⁺T – antigen 8 na površini levkocita T

CHAPS- 3-[(3-holamidopropil)dimetilamonijev]-1-propansulfonat

Ct – pražni cikel, angl. *threshold cycle*

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - dimetilsulfoksid

DNA - deoksiribonukleinska kislina

dNTP – deoksinukleotid trifosfat

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

EGCG-epigalokatehin-3-galat

FBS – fetusni serum goveda, angl. *fetal bovine serum*

G-gravitacijski pospešek, angl. *standard gravity*

GM-CSF - granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik, angl. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GAPDH – gen za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazo, angl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene*

HaCaT- nesmrtna človeška linija keratinocitov

HPRT1 – gen za hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferazo, angl. *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene*

HSV-tk- encim timidin kinaza herpes simplex virusa, angl. *Herpes Simplex thymidine kinase*

IFN- γ - interferon gama

IL – interlevkin

kV- kilovolt

LAF- laminarni pretok zraka, angl. *laminar air flow*

MDR-1 – gen za multiplo rezistenco na zdravila, angl. *multidrug resistance gen*

mRNA – sporočilna RNA, angl. *messenger RNA*

MTS - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol

ORI – mesto začetka podvojevanja, angl. *origin of replication*

p-53 – protein 53

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

PCR – verižna reakcija s polimerazo

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

RNA – ribonukleinska kislina

Tc – citotoksične celice T, angl. *cytotoxic T cells*

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

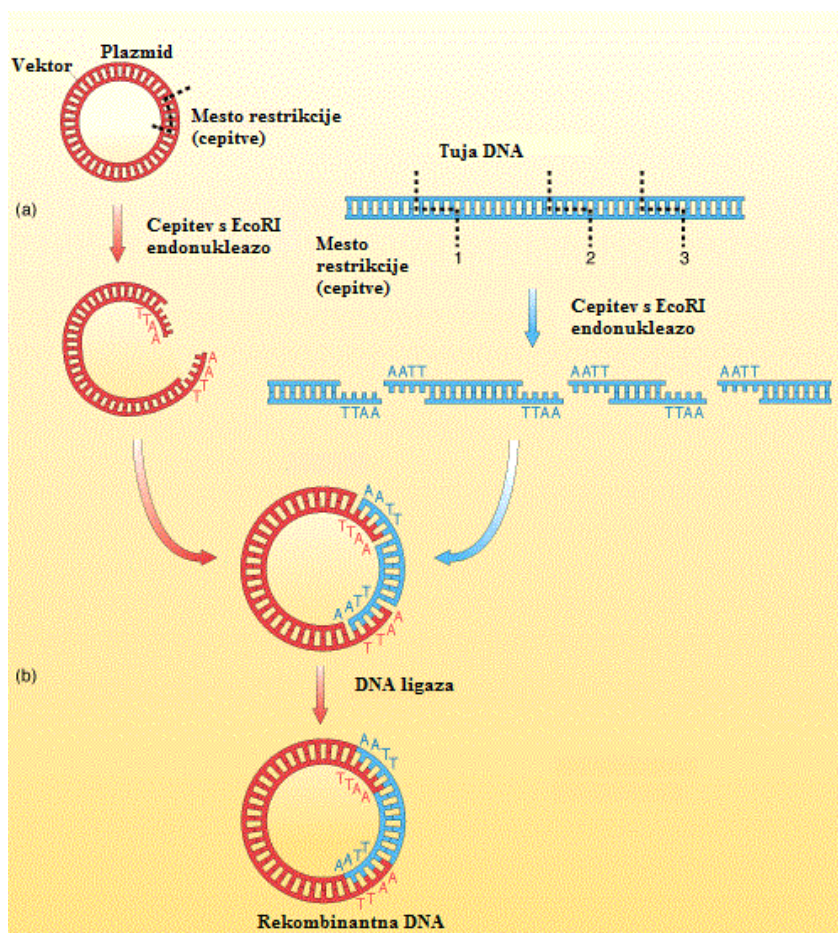
TNF α – alfa faktor tumorske nekroze, angl. *tumor necrosis factor alpha*

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

1 UVOD

1.1 VNOS GENSKJE INFORMACIJE V CELICO

Deoksiribonukleinska kislina (*DNA*) je nosilka genske informacije, potrebne za razvoj in delovanje vseh živih organizmov (edino znano izjemo predstavljajo RNA virusi, vendar le-te ne prištevamo k živim organizmom). Njena vloga je shranjevanje in prenos informacije iz generacije v generacijo. DNA je bila prvič izolirana leta 1896 (Friedrich Messer) (1). Kasneje je Avery-MacLeod-McCarty-jev eksperiment pokazal da DNA sestavlja gene (2), 1952 sta Hershey in Chase potrdila, da je DNA nosilka genskega zapisa (3), leta 1953 pa je bila odkrita dvovijačna struktura molekule DNA (Watson, Crick) (4). Odkritji strukture in DNA restrikcijskih endonukleaz (Arber, Nathans in Smith, 1970) sta omogočila hiter razvoj področja rekombinantne tehnologije (slika 1) (5).

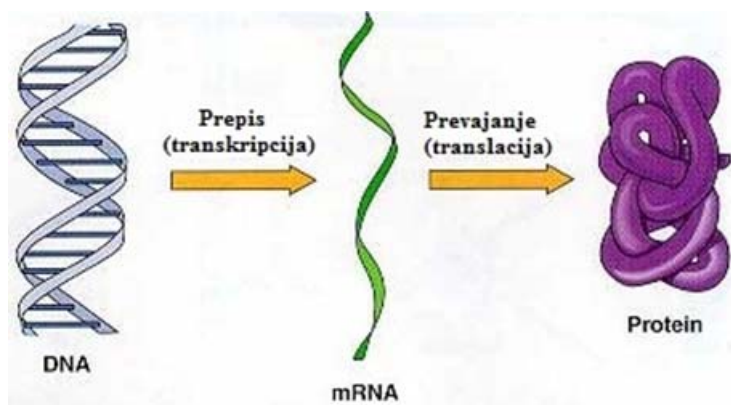


Slika 1: Shematski prikaz tvorbe rekombinantne DNA. Povzeto po <http://goo.gl/CCC7HZ>

Tehnologija rekombinantne DNA (genski inženiring) je pomenila velikanski premik na področju molekularne biologije. Z njeno pomočjo lahko identificiramo celotne genome in posamična DNA zaporedja, potrebna za normalno delovanje genov oziroma za preučevanje posledic mutacij, ki se lahko izrazijo kot genske bolezni (6). Identificirali so že precej genskih okvar, ki so vzrok dednih bolezni. V bližnji prihodnosti pričakujemo, da nam bo razumevanje bolezni na molekularnem nivoju omogočilo omilitev poteka, če ne celo popolno ozdravitev bolezni, s pomočjo vnosa genov v celice pacienta. Ta postopek se imenuje gensko zdravljenje.

1.2 GENSKO ZDRAVLJENJE

Gen je odsek molekule DNA, specifično zaporedje baz, ki kodira navodilo za sestavo proteina (slika 2). Nahajajo se na kromosomih in so osnovna enota dedovanja.



Centralna dogma izražanja genov

Preko nastanka mRNA (transkripcija) in sinteze proteina (translacija) se izrazi genska informacija iz DNA.

Slika 2: Centralna dogma izražanja genov. Povzeto po http://apbiomaedahs.weebly.com/uploads/1/8/4/0/18405139/732474262_orig.jpg

Do genske bolezni pride zaradi okvare gena, katere posledica je lahko nedelujoč protein ali protein s spremenjenimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi in posledično spremenjenim fiziološkim delovanjem. V kolikor pa gre za okvaro na nekodirajočem delu gena ali v območju medgenskih elementov, pa lahko pride do kvantitativne spremembe v izražanju proteina. Možno je tudi, da ne nastane nobena sprememba.

Pri genskem zdravljenju v telo vnesemo gene, s katerimi kompenziramo nedelujoče ali omogočimo izdelavo terapevtsko učinkovitih proteinov. V primeru izražanja proteina, ki je

vzrok bolezni, pa lahko v celico vnesemo genske segmente, ki zmanjšujejo izražanje proteina, odgovornega za bolezensko stanje (7). Glede na tip celice, na katerih izvajamo gensko terapijo, ločimo različne strategije.

1.2.1 Strategije

Tako rekoč vse celice v človeškem telesu vsebujejo gene, kar jih dela potencialne tarče za gensko terapijo. Delimo jih na somatske celice in zarodne celice (jajčeca in spermiji).

Genska terapija na zarodnih celicah se izrazi kot trajna sprememba, ki se prenese na potomce. Če prenos genov izvedemo v zgodnji fazi embrionalnega razvoja, na primer med *predimplantantno* diagnozo ali pri zunajtelesni oploditvi, lahko transficiramo vse celice razvijajočega se zarodka. Prednosti genskega zdravljenja zarodnih celic je možnost trajnega terapevtskega učinka za vse, ki podedujejo tarčni gen. Uspešna terapija ponuja možnost odstranitve nekaterih družinskih bolezni in njihovo trajno eliminacijo iz populacije.

Somatske celice niso reproduktivne, zato se gensko zdravljenje slednjih smatra za bolj konservativen in varen pristop, saj se morebitne spremembe ne prenašajo na potomce. Vendar tudi ta tip zdravljenja ni brez izzivov, na katere znanost vztrajno išče odgovore. Ena izmed njih je kratkotrajnost učinka. Velika večina celic sčasoma odmre in je nadomeščena z novimi, zato je potrebno terapijo ponoviti. Naslednji izziv je specifičen transport genskega materiala v tarčno celico ali tkivo. Navkljub temu pa je gensko zdravljenje somatskih celic primerno za mnoge bolezni, kot na primer: cistično fibrozo, mišično distrofijo, nekatere vrste raka in določene infekcije. Možna je tudi terapija »in utero«, s katero popravimo ali zdravimo življenjsko ogrožajoče okvare, ki bi nezdravljene škodile otrokovemu zdravju in razvoju.

Glavna razlika med opisanimi tipoma je v tem, da pri genski terapiji na somatskih celicah ni prenosa terapevtskega gena na potomce. Vsa genska zdravljenja se zaenkrat izvajajo na somatskih celicah, zdravljenje na zarodnih celicah je v večini držav prepovedano.

Somatsko gensko terapijo lahko razdelimo na zunajtelesno (»ex vivo«) ali znotrajtelesno (»in vivo«). Razlika je v tem, da pri zunajtelesni terapiji iz pacienta izoliramo celice (npr.: kostnega mozga), jih nagojimo, vanje vnesemo želeni gen in celice vrnemo v telo (8).

1.2.2 Potencialne bolezni, primerne za zdravljenje z gensko terapijo

1.2.2.1 Dedne bolezni

Pri genskem zdravljenju dednih bolezni vstavimo nepoškodovano različico gena v celice organov, kjer se bolezen manifestira. Primeri: hematopoetski sistem pri pomanjkanju adenozin deaminaze, dihalne poti pri cistični fibrozi, jetrne celice pri družinski hiperholesterolemiji. Za zdravljenje teh okvar moramo zagotoviti stabilno ekspresijo vstavljenih genov, kar dosežemo s pomočjo vgraditve terapevtskega gena v genom gostiteljske celice ali s uporabo episomalnega ekspresijskega vektorja. V primeru vgraditve v genom se rekombinantna DNA podvoji skupaj s celično (v S fazi celične delitve). Pri uporabi episomalnega vektorja, ki vsebuje ORI mesto, se le-ta podvojuje episomalno.

1.2.2.2 Rak

Najpogostejši pristopi genskega zdravljenja rakavih celic zajemajo:

- Vnos genov za citokine (rastni faktorji, kemokini, interlevkini, interferoni) (npr.: GM-CSF, IFN- γ , IL-2) v tumorske celice, kjer sprožijo lokalno vnetje, ki uniči večji del tumorja. Stranski učinek vnetja je indukcija imunskega sistema, ki dokončno uniči preostale maligne celice primarnega tumorja in morebitne metastaze.

- vnos samomorilskih genov, na primer gena za timidin kinazo herpes simplex virusa (HSV-tk). Ta encim fosforilira sistemsko vneseno predzdravilo ganciklovir (nukleotidni analog). Fosforilirana učinkovina se vgradi v DNA, prekine njeno podaljševanje in posledično povzroči celično smrt. Ganciklovir bo deloval tudi na okolico celice, ki izraža HSV-tk, zato ni potrebno transducirati vsake celice. Moč tega »učinka okolice« variira med različnimi tumorji. Trenutna razlaga je ta, da fosforiliran ganciklovir preide iz HSV-tk izražajočih celic v okoliške preko presledkovnih stikov.

- vnos tumor-supresorskih genov (gena p53, ki zavira rast tumorja), ki so mutirani pri večini rakavih obolenj.

- varovanje hematopoetskih matičnih celic pred toksičnimi učinki kemoterapije z vnosom genov za odpornost na zdravila, npr.: gen za multiplo rezistenco na zdravila MDR-1. Tega izoliramo iz tumorjev, ki so razvili sistem za izločanje učinkovine iz celice.

Genska terapija s citokini omogoča zdravljenje primarnih tumorjev in metastaz, samomorilski in supresorski geni povzročijo direktno citotoksično in antiproliferativno delovanje in so učinkoviti pri lokalnem zdravljenju. MDR-1 gen pa bo omogočil večjo toleranco pacientov na večje odmerke pri terapiji s kemoterapevtiki, kar bo izboljšalo učinkovitost zdravljenja (9).

Do junija leta 2012 je bilo v teku, opravljenih ali odobrenih več kot 1800 kliničnih preizkušanj genskih terapij. Zamenjava ali nadomeščanje odsotne informacije lahko trajno popravi vse okvare in pacientom zagotovi daljše in kakovostnejše življenje.

1.2.2.3 Luskavica

V sklopu našega raziskovanja smo iskali alternativne pristope za utišanje genske ekspresije provnetnih citokinov pri luskavici, predvsem interlevkina 23. Luskavica je kronična, imunsko-pogojena, sistemska okvara, ki primarno prizadene kožo in sklepe. Ocenjujejo da za njo trpi 1-3% odrasle svetove populacije. Poznanih je mnogo fenotipov, vsak s specifičnimi kliničnimi znaki. Najbolj pogosta, v kar 80% vseh primerov, se pojavlja luskavica v plakih (psoriasis vulgaris) (10). Za njo so značilne ponavljajoče se epizode rdečih, luskastih kožnih plakov, katere sprožijo raznovrstni faktorji: od zdravil (beta-blokatorji, antimalariki), stresa, fizičnih poškodb kože (Koebnerjev učinek) do infekcij.

Med razvojem lezij lahko opazimo štiri histološka stanja:

- 1.) Akantozna – zadebelitev epidermisa, ki nastane kot posledica povečane proliferacije keratinocitov.
- 2.) Hipogranuloza – znižanje ali odsotnost granularne plasti, ter
Parakeratozo – prisotnost jeder v korneocitih, oboje kot posledico odsotne diferenciacije keratinocitov.
- 3.) Razširitev žil, ki povzroči značilno rdečico.
- 4.) Prisotnost vnetnega infiltrata, katerega tvorijo skupki $CD4^+$ T celice pomagalke in antigen predstavljajoče dendritične celice v dermisu, ter $CD8^+$ T celice in nevtrofilci v epidermisu (11).

Stopnjo luskavice (blaga, srednja, huda) določimo na različne načine, na primer kot površino spremenjene kože glede na celotno telesno površino. Določeni indeksi pa kot dodaten faktor upoštevajo še mesto, na katerem je prišlo do spremembe (12).

Simptomi luskavice so sami po sebi redko smrtni, navkljub temu pa lahko pogosto ponavljanje povzroči znatno fizično neugodje. Pri hudi obliki je pogost tudi pojav psoriatičnega artritisa, poveča se možnost kardiovaskularnih zapletov in diabetesa. Pri bolnikih s hudo obliko luskavice predstavlja velik problem dolgotrajno sistemsko zdravljenje in ponavljajoče fototerapije, ki so znane po svoji kumulativni toksičnosti. Vse to izdatno vpliva na bolnikovo samopodobo, možen je pojav depresije (10, 13).

Za razvoj luskavice ni odgovoren en sam dejavnik, ampak vpliv večih, med seboj prepletajočih se faktorjev: od genov in okolja do imunskih dejavnikov (10). Glavni vzrok klinične slike luskavice so imunski procesi v koži, katere smo do nedavno pripisovali T celicam pomagalkam Th1. Pred kratkim odkrita populacija celic pomagalk Th 17 in njena vloga pri avtoimunskih boleznih pa je dopolnila obstoječi model luskavice s potjo IL-23/Th17 in omogočila nove načine zdravljenja (13).

Th17 celice

CD4⁺ T celice pomagalk, podskupina belih krvnih celic limfocitov, so pomembni mediatorji celičnega imunskega odziva. Na podlagi izražanja citokinov smo jih dolgo časa delili na liniji Th1 in Th2, vendar so pri podrobnejših analizah odkrili, da je za proizvodnjo citokina IL-17A odgovorna posebna podskupina, poimenovana Th17. Ta se lahko razvije neodvisno od prej omenjenih celičnih linij. Fiziološka vloga Th17 celic je obramba pred zunajceličnimi patogeni. Delujejo kot posredniki, ki privabijo nevtrofilce in makrofage k vnetemu tkivu. Nepravilno delovanje Th17 celic lahko igra pomembno vlogo pri patogenezi mnogih vnetih in avtoimunskih boleznih (14).

Th 17 celice nastanejo z diferenciacijo naivnih T celic pomagalk. Th17 celice izražajo receptorje za interlevkin-23. Vezava povzroči izražanje interlevkina-17A in mnogih drugih citokinov (TNF α , INF- γ , IL-17F, IL-21) (15).

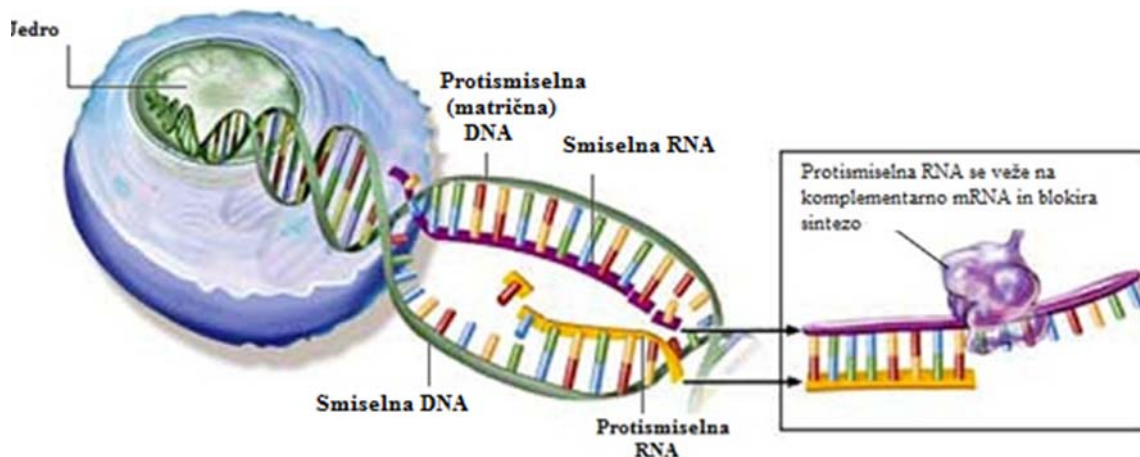
Ključno vlogo IL-23 in Th17 celic pri nastanku luskavice potrjujejo številni eksperimenti tako na ljudeh kot tudi na živalih. Intradermalna injekcija IL-23 ali povečano izražanje IL-12 se na mišjih keratinocitih odraža kot luskavica. Prav tako je dokazano, da se IL-23 v prekomerno izraža v lezijah, utišanje izražanja IL-23 pa izboljša klinično sliko pacienta (16).

Eden od sodobnejših načinov utišanja izražanja genov pa je tudi vnos protismiselnih oligonukleotidov v tarčne celice.

1.2.3 Protismiselni oligonukleotidi

Oligonukleotidi so kratki (10-100 baz), enoverižni odseki DNA ali RNA, s širokim območjem uporabe: od verižne reakcije s polimerazo (PCR), določanja DNA zaporedja (DNA sekvencioniranja), izdelave cDNA knjižnic, do genske terapije s protismiselnimi oligonukleotidi (17).

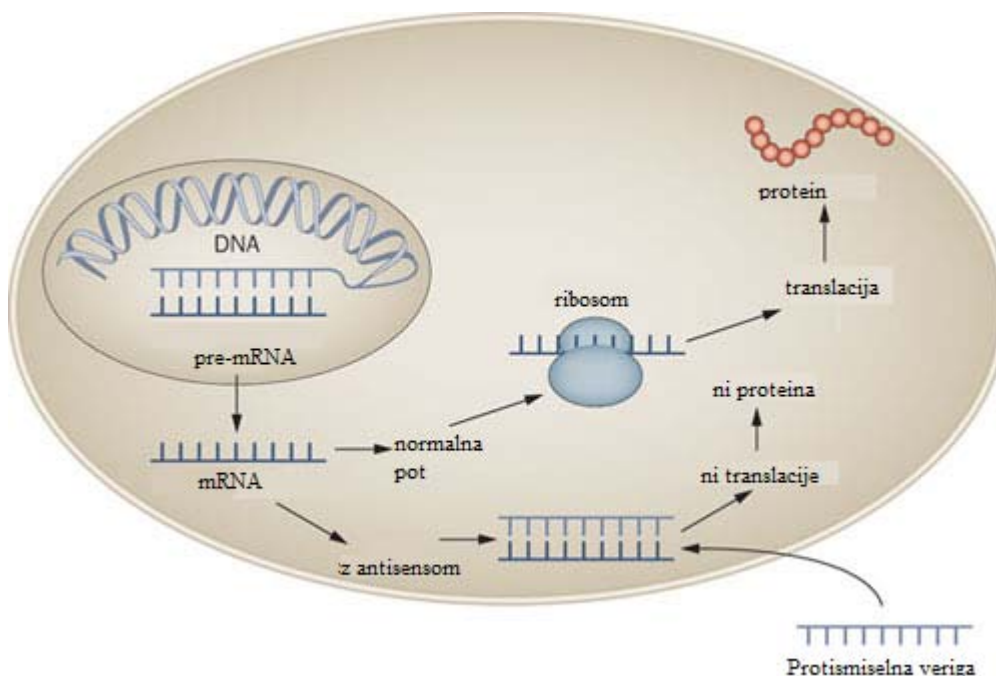
Med prepisom se DNA razpre v dve verigi: smiselno (njeno nukleotidno zaporedje je enako tistemu, ki ga ima mRNA) in protismiselno (komplementarna smiselni). RNA polimeraza tvori komplementarno verigo RNA. Protismiselna veriga služi kot model (matrica) za tvorbo smiselne RNA molekule, ki lahko prenese informacijo iz DNA do ribosoma, kjer nastane protein (slika 2). Včasih pa se zgodi, da tudi smiselna DNA veriga služi kot kalup za RNA: nastali produkt imenujemo protismiselna RNA. Takšno zaporedje so opazili v naravi in ugotovili, da smiselna in protismiselna RNA tvorita dvojno verigo, ki rezultira v znižanju genske ekspresije (slika 3, 4) (1,9).



Slika 3: Sinteza smiselne in protismiselne RNA. Povzeto po: <http://www.detectingdesign.com/pseudogenes.html>

Odkritju naravne regulacije ekspresije je sledilo logično vprašanje: kako regulirati izražanje v korist pacientov? Iskanje odgovora je privedlo do eksperimentov s eksogenimi protismiselnimi oligonukleotidi, ki delujemo na mRNA v citoplazmi (slika 4) ali na njen prekursor v jedru. Izdelani so tako, da specifično uravnavajo izražanje genske informacije.

Večina deluje na od RNaze H odvisnem mehanizmu. RNaza H je vseprisoten encim, ki hidrolizira RNA verigo v RNA/DNA dupleksu (ko protismiselna DNA reagira s mRNA) ali RNA/RNA dupleksu (protismiselna RNA reagira s mRNA). Znižanje izražanja je lahko zelo učinkovito (80-95%) (18).



Slika 4: Sinteza proteina in blokada translacije s protismiselno verigo. Povzeto po: http://www.nature.com/nrcardio/journal/v8/n5/fig_tab/nrcardio.2011.2_F1.html

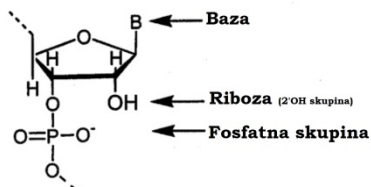
Glede na mehanizem delovanja jih razdelimo na:

- Od RNaze H-odvisni oligonukleotidi: inducirajo delovanje encima RNaze H, ki cepi mRNA
- Oligonukleotidi, ki povzročajo sterično oviranost: z vezavo fizično preprečijo/ovirajo rezanje ali prevajanje (18)

Protismiselni učinek s pomočjo sintetičnega oligonukleotida so prvič uspešno demonstrirali leta 1970 (Zamecnik in Stephenson). Kmalu pa so ugotovili, da bo za njihovo praktično uporabo potrebno odpraviti dve pomanjkljivosti, ki omejujeta njihov terapevtski potencial: prva je hitra razgradnja, ki jo katalizirajo vseprisotne nespecifične endonukleaze. Te prepoznajo sintetične oligonukleotide kot tujke in jih nemudoma hidrolizirajo. Produkti razgradnje izgubijo specifičnost in biološko aktivnost. Druga slabost pa je negativen naboj fosfatnih skupin, ki tvorijo zunanost vijačnice in omejuje pasivno

difuzijo skozi celično in jedrno membrano. Kemijske prilagoditve in razvoj novih načinov vnosa so v veliki meri odpravili slabosti (18).

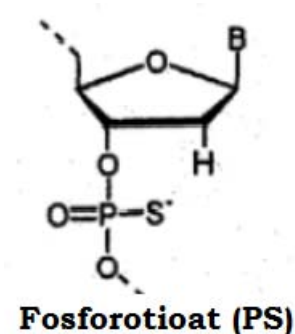
Na DNA in RNA nukleotidih lahko modificiramo bazo ali fosfatno skupino, pri RNA pa še OH skupino na mestu 2' (slika 5).



Slika 5: Primerna mesta za kemijsko modifikacijo RNA. Povzeto po (20).

Namen kemijske modifikacije je uvesti spremembo, ki bo varovala pred nukleazno aktivnostjo in hkrati ohraniti specifičnost in delovanje protismiselnega oligonukleotida.

Pri prvi generaciji modificiranih nukleotidov so nadomestili kisikov atom, ki ni udeležen v diesterski vezi, z žveplom (slika 6).



1. generacija

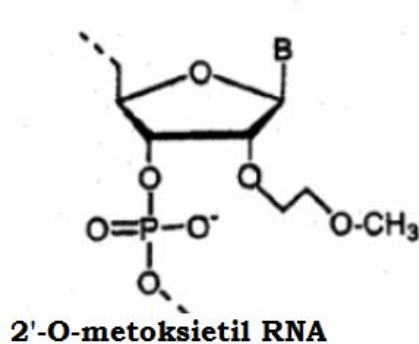
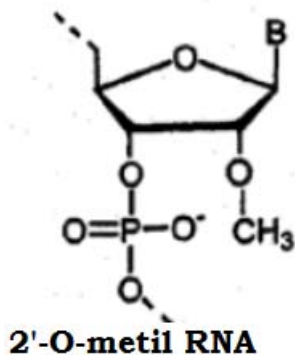
- + podaljšan razpolovni čas (1h-->10h)
- + uspešno zavrli podvojevanje virusa HIV in vitro

- nižja kinetika hibridizacije
- pri visoki koncentraciji nespecifična vezava s proteini-citotoksičnost

Fosfortioat (PS)

Slika 6: Prva generacija modificiranih nukleotidov. Povzeto po (20).

Druga generacija je odpravila slabosti prve, vanjo pa spadajo RNA nukleotidi z alkilno modifikacijo na mestu 2 sladkorne enote (riboze). Najbolj pomembni sta 2'-O-metil (OMe) in 2'-O-metoksi-etil (MOE) (slika 7).



2. generacija

+ odpornost na nukleaze

+ nižja toksičnost

+ rahlo povišana aktivnost hibridizacije

- ni na voljo najboljšega protismiselnega mehanizma
(cepitev z RNazo H)

Slika 7: Druga generacija modificiranih nukleotidov. Povzeto po (20).

Ta elementa delujeta preko mehanizma steričnega oviranja. Ker je cepitev z RNazo H najboljši mehanizem za protismiselni učinek in 2'-O-alkilna modifikacija ugodna z vidika podaljšane obstojnosti, so izdelali hibridni oligonukleotid v obliki gapmer. Ta je sestavljen iz sredinskega dela deoksinukleotidov, ki sprožijo cepitev z RNazo H, zunanja dela pa vsebujeta 2'-metil ribonukleotide, ki ščitijo sredico pred razgradnjo.

Med predstavnike tretje generacije pa štejemo peptidne nukleinske kisline (PNA) in zaklenjene nukleinske kisline. Njihove prednosti so povečanje stabilnosti in vezavne afinitete. Sicer ne morejo aktivirati cepitve z RNazo H, a jim visoka afiniteta vezave omogoča blokado translacije. Njihove pomanjkljivosti pa so slaba topnost in slab vstop v celice (19).

Za uspešno utišanje izražanja genov pa moramo oligonukleotide vnesti v celico. To dosežemo s pomočjo dostavnih sistemov, imenovanih vektorji.

1.3 METODE VNOSA GENSKEGA MATERIALA

Vektor je vehikel, ki omogoča dostavo genskega materiala v celico. Idealen vektor bi v celico specifično dostavil točno določeno število kopij gena, brez aktivacije imunskega sistema in toksičnosti za celico. Vnos segmentov DNA v celico je kritičen korak genske terapije. Proces ne sme biti toksičen za celico, transfekcija pa mora biti hitra in visoko učinkovita. Metode vnosa genskega materiala v celico glede na vektor delimo na virusne in ne-virusne (1).

1.3.1 Virusne metode vnosa

Prenos genov s pomočjo virusnega vektorja se imenuje transdukcija. Virusi so tekom evolucije razvili učinkovite načine vnosa DNA v gostiteljsko celico. Inficirane celice zelo učinkovito sintetizirajo virusne proteine, včasih celo za ceno nižje proizvodnje lastnih. Kot vektorje uporabljamo modificirane viruse, ki niso sposobni prenosa lastnih genov ter

posledično samopomnoževanja. Kot virusne vektorje najpogosteje uporabljamo retroviruse, adenoviruse, adeno-asociacijske viruse ter lentiviruse (1).

1.3.1.1 Retrovirusni vektorji

Genom retrovirusnega vektorja sestavljata dve kopiji enoverižne RNA. Po infekciji celice se RNA prepíše v dvoverižno virusno DNA in vgradi v celični genom. Prednosti retrovirusov so visoka stopnja vnosa (transdukcije) in učinkovita ter dolgotrajna modifikacija kot posledica stabilne integracije v kromosom. Med njihove slabosti prištevamo: majhno velikost kodirajoče regije, sposobni so inficirati le celice v stopnji delitve. Njihova največja pomanjkljivost pa je možna »aktivacija« proto-onkogenov v onkogene (5).

1.3.1.2 Lentivirusni vektorji

Po lastnostih so zelo podobni retrovirusnim vektorjem. Njihova prednost je vnos terapevtskih genov tudi v neproliferirajoče celice in stabilna vgradnja v genom. Ta kombinacija jih dela privlačne za »ex vivo« modifikacije zarodnih celic in »in vivo« modifikacije celic živčevja (nevralnih celic).

1.3.1.3 Adenovirusni vektorji

Genom adenovirusov sestoji iz dvovijačne DNA. Po infekciji terapevtski gen vstopi v jedro, a se ne vgradi v kromosom, zato se genska informacija s časoma izgubi. So najpogosteje uporabljeni virusni vektorji za znotrajtelesno (»in vivo«) transdukcijo različnih somatskih celic, tudi neproliferirajočih. Njihovi prednosti sta vnos daljših odsekov, ker se ti ne vgradijo v genom, niso onkogeni.

1.3.1.4 Adeno-asociacijski virusi (AAV)

Spadajo v družino parvovirusov. Njihov genom sestavlja enoverižna DNA. »Divji tip« AAV se lahko podvaja le v prisotnosti adeno virusa ali herpes virusa. Zaenkrat ga ne povezujemo z nobeno znano boleznijo. Ima zelo omejeno velikost kodirajoče regije.

Viruse odlikuje visoka učinkovitost in specifičnost v primerjavi z ne-virusnimi vektorji. Njihova prednost je še stabilna vgraditev v genom. Navkljub temu pa so tehnično izredno zahtevni za delo in proizvodnjo, ter potencialno toksični. Zato se je razvoj vektorjev usmeril v iskanje učinkovitih nevirusnih alternativ.

1.3.2 Ne-virusne metode vnosa

Prenos genskega materiala z ne-virusnimi metodami imenujemo transfekcija. Te so enostavnejše za uporabo, posledično tudi cenejše. Delimo jih na dve podskupini: kemične in fizikalne metode. Med kemične spadajo: kemoporacija, transfekcija s kalcijevim fosfatom, liposomski prenos. K fizikalnim pa prištevamo: elektroporacijo, mikroinjiciranje, toplotni šok, sonoporacijo, mikrobombardiranje (biolistiko).

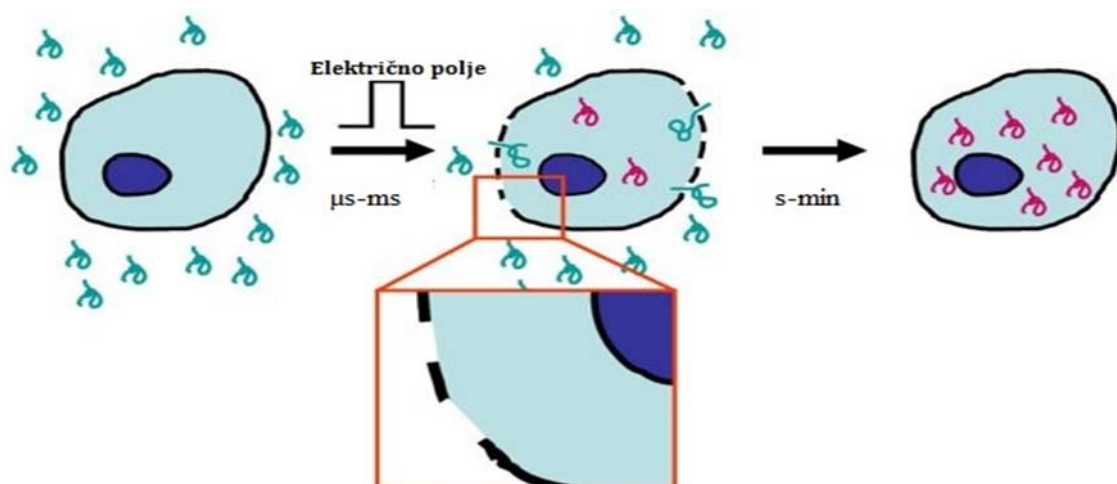
1.3.2.1 Mikroinjiciranje

Metoda mikroinjiciranja je učinkovit postopek dostave eksogenih proteinov, cDNA konstruktov, peptidov, zdravil in delcev v posamične celice. Omogoča natančno kontrolirano dostavo in doziranje. Uporablja se pri študijah na primarnih celičnih linijah, pri vzgoji transgenih živali, umetnih oploditvah in RNA vpletanju (interferenci).

Mikroinjiciranje je proces, pri katerem s stekleno mikropipeto na mikroskopskem nivoju vstavimo želeno substanco v živo celico. Z iglo premera 0.5-5 mikrometra prebodemo celično membrano in/ali jedro ovojnice. Želeno vsebino vbrizgamo v izbran podcelični oddelek. Mikroinjiciranje je pogosto uporabljen postopek za vstavitve genskega materiala na področju genskega inženiringa. Uporablja se tudi pri kloniranju organizmov in v študijah biologije celice ter virusov. Med njene slabosti prištevamo zahtevnost, visoko ceno, časovno potratnost, ter običajno nizko uspešnost vnosa. Novejše tehnike so časovno bolj učinkovite, a za enkrat še zelo drage (5).

1.3.2.2 Elektroporacija

Med elektroporacijo izpostavimo celice ali tkiva visoko napetostnemu polju (do 1kV). Kratki, hitri pulzi povzročijo odprtje por v membrani, kar omogoči vnos DNA (slika 8). Slabost te metode je velik delež mrtvih celic in nizka stopnja transfekcije (5,25).



Slika 8: Shema elektroporacije. Povzeto po: <http://www.utwente.nl/ewi/bios/research/Cellsonchips/cell%20electroporation.doc/cell%20electroporation-1.jpg>

1.3.2.3 Genska pištola/biolistika

Pri tej tehniki zlate, volframove ali srebrove mikrodelfce prevlečemo z DNA in jih s pomočjo inertnega potisnega plina (npr.: helij) izstrelimo v tarčno tkivo. Prednosti te metode so, da ni potrebe so vezavnem receptorju, saj izstreljeni delci prebodejo celično steno ali membrano. Velikost DNA ni problematična, saj je proces oblaganja enostaven za izvedbo. Med njene slabosti prištevamo: večjo verjetnost za močan imunski odziv kot v primerjavi z mikroinjiciranjem, nizko stopnjo transfekcije in velik delež mrtvih celic (22).

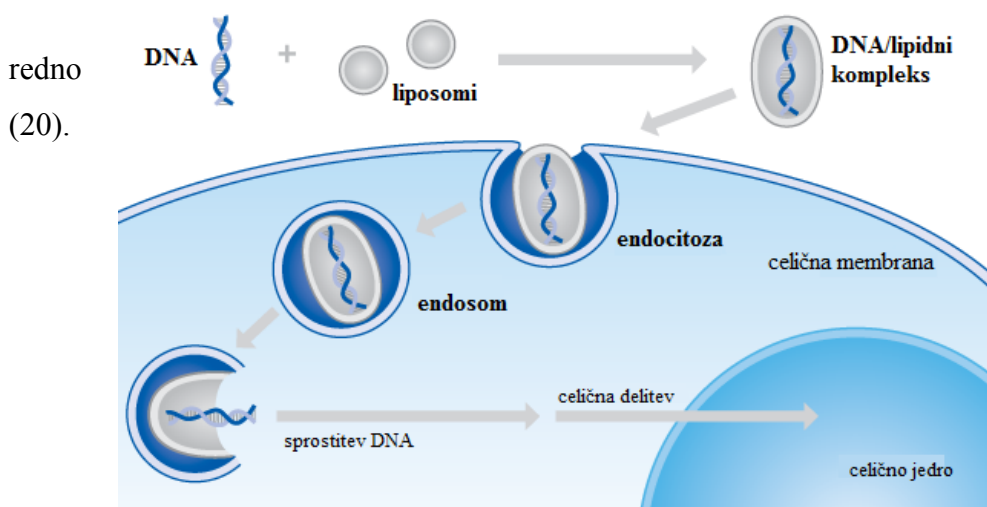
1.3.2.4 Kationski liposomi

Že dolgo je znano, da kationski liposomi tvorijo komplekse z DNA, a v široko uporabo so prišli šele tekom projekta Človeški genom (20). Kompleks pozitivnega liposoma in negativne DNA mora imeti celokupni naboj rahlo pozitiven, da pride do stika s tarčno celico, ki je ponavadi negativna. Vezavi na površino sledi endocitoza (slika 9).

Prednosti ne-virusnih vektorjev v primerjavi z virusnimi so: varnost, možnost vnosa večjih odsekov DNA, ter nizka imunogenost. Slednja omogoča večkratno aplikacijo terapevtskega gena.

Med njihove slabosti pa spadajo nizka stopnja prenosa iz citosola v jedro, nizka tkivna in celična specifičnost in nezmožnost vgradnje terapevtskega gena v genom. Posledično je

potrebno
terapijo
ponavljati



Slika 9: Transfekcija s kationskimi liposomi. Povzeto po: http://www.biontexp.com/con_4_6_4/cms/upload/bilder/Transfektion3_en.png

Nova dognanja in potrebe po učinkovitejših, cenejših, hitrejših in enostavnejših metodah se kažejo v razvoju novih metod, na primer kemoporaciji.

1.4 KEMOPORACIJA

Izraz »kemoporacija« je bil poimenovan na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani na osnovi lastnih izvirnih rezultatov. Dokazano je bilo, da dodatek določenih snovi (kemoporantov) sproži kratkotrajno tvorbo por v bakterijskih membranah in s tem omogoči vnos dednega materiala. Transformacijo sprožimo s analogi holnih kislin ali s saponini, ki najverjetneje povzročijo reverzibilno prepustnost celične membrane.

Kemoporacija močno skrajša čas vnosa genskega materiala v celico (iz enega dne na pol ure) in ima v primerjavi z metodo vnosa s pomočjo temperaturnega stresa zanemarljivo izgubo transfekcijske učinkovitosti (21).

1.4.1 Saponini

Saponini so prisotni v naravi kot sekundarni rastlinski metaboliti. Izkazujejo površinsko aktivnost, njihove vodne raztopine se dobro penijo. Zaradi njihovih »čistilnih« lastnosti so se tekom zgodovine uporabljali kot čistila/detergenti. Glede na strukturo jih delimo na steroidne saponine in triterpenske glikozide. Uporabljajo se kot: substrati pri polsintezi steroidnih učinkovin, v kozmetični industriji (detergenti), raziskuje se tudi njihove farmakološke lastnosti (antitusično, ekspektorativno, antibakterijsko, protivnetno delovanje). Njihova sposobnost povečanja prepustnosti membrane se že uporablja pri lažšanju vnosa peptidov in proteinskih molekul (na primer: protiteles) v celico (23).

1.4.2 Holati

Žolčne kisline so skupina vodotopnih steroidov, ki nastajajo pri razgradnji holesterola v jetrih. So močni fiziološki detergenti, ki olajšajo absorpcijo in prenos lipidov in v maščobi topnih vitaminov. Mehanizem delovanja (interakcije) na biološke membrane ostaja nepojasnen (21). Znano je, da v vodnih raztopinah spontano tvorijo micele (23).

1.4.3 Epigalokatehin – 3 - galat

EGCG je najpogostejši katehin v zelenem čaju (*Camellia sinensis*): predstavlja kar 50-80% od skupaj 200-300 mg vseh katehinskih polifenolov na skodelico. Študije so pokazale, da so katehinski polifenoli glavni nosilci preventivnega učinka zoper raka, ki ga izkazuje zeleni čaj. EGCG se je izkazal kot učinkovit tudi v povezavi z diabetesom, Parkinsonovo boleznijo, Alzheimerjevo boleznijo, možgansko kapjo (24).

2 NAMEN DELA

Z napredkom na področju genskega zdravljenja se je povečala potreba po razvoju novih metod, ki bi zagotovile poceni, enostaven, hiter in učinkovit vnos genskega materiala v celice. Kemoporacija bi v prihodnosti lahko predstavljala alternativno metodo transfekcije celic.

Namen magistrskega dela je:

- razviti nov način vnosa dednega materiala v sesalske celice s pomočjo kemoporacije
- ovrednotiti toksičnost kemoporantov na sesalsko celično linijo
- z metodo kemoporacije vnesti kratke fragmente protismiselne DNA

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI IN APARATURE

Kemikalije	Proizvajalec
Hitosan.....	Sigma-Aldrich
Natrijev tripolifosfat	Sigma-Aldrich
Escin.....	Sigma-Aldrich
Epigalokatehin-3-galat.....	Sigma-Aldrich
Natrijev tauroholat hidrat.....	Sigma-Aldrich
CHAPS.....	Sigma-Aldrich
Triton.....	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco's phosphate buffered saline).....	Sigma-Aldrich
DMEM+(89 mL DMEM, 1 mL penicilin/streptomycin, 10 mL fetalni goveji serum)	
Trypsin (10x redčen).....	Sigma-Aldrich
0,02% Nigrozin.....	Sigma-Aldrich
CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (test MTS).....	PROMEGA
Plazmid pEGFP-N2.....	BiosciencesClontech
DMSO.....	Sigma-Aldrich
LB BROTH	Sigma-Aldrich
Kanamicin sulfat.....	Sigma-Aldrich

LB AGAR.....	Sigma-Aldrich
Lipofektamin 2000.....	Invitrogen
SYBRGreen.....	Thermo Scientific

Aparature	Proizvajalec
Avtomatske pipete in nastavki.....	Biohit in Eppendorf AG
Avtoklav.....	Systemec
Avtoklav.....	Kambič
Centrifuga.....	Sorvall RC5C
Hladilnik (4° C).....	Gorenje
Inkubatorji.....	Equip
LAF komora.....	Iskra
Namizna centrifuga.....	Daihan Labtech
Spektrofotometer (UV/VIS).....	Nanodrop in Perking Elmer
Zamrzovalnik (-20° C).....	Gorenje
Zamrzovalnik (-40° C).....	Sanyo

3.1.1 Raztopine in gojišča

3.1.1.1 Raztopine saponinov in sterolov

Delovne raztopine smo pripravili tako, da smo zatehtali 5 mg posameznega kemoporanta in raztopili v 5 mL bidestilirane vode. Raztopino smo do uporabe hranili v hladilniku na 4° C. Pred uporabo smo raztopine dobro premešali.

3.1.2 Biološki materiali

3.1.2.1 Plazmidi

Pri našem delu smo uporabljali vodne raztopine plazmida pEGFP-N2. Ta izraža odpornost na kanamicin in neomicin. Pri delu smo uporabljali vodno raztopino plazmida s koncentracijo 176 ng/ μ L (3 μ g/transfekcijsko mešanico).

Proizvajalec: BD Bioscience Clontech

3.2 METODE

3.2.1 Vzpostavitev celične linije HaCaT

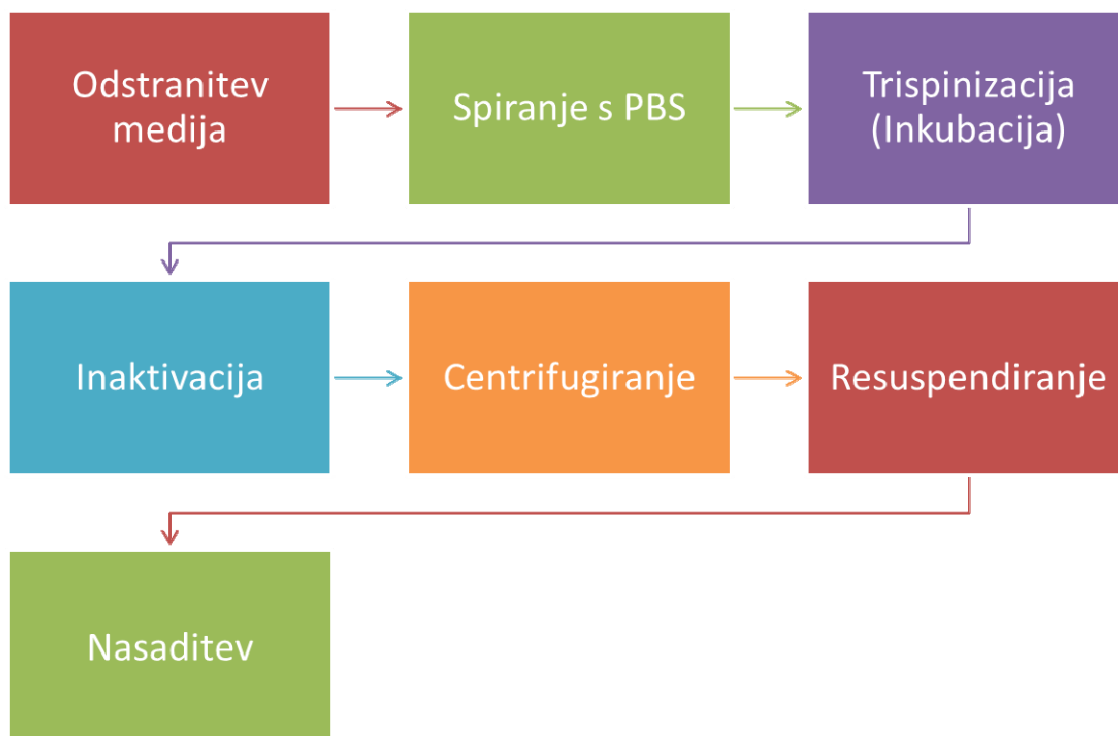
3.2.1.1 Odmrznitev celic

Iz kriobanke smo vzeli kriovialo z HaCaT celicami in jo za 30 sekund postavili v vodo, segreto na 37° C. Hkrati smo v vialo dodajali topel (37°C) medij DMEM+. Vsebino krioviale smo prenesli v epruveto s 10 mL toplega medija DMEM+ in centrifugirali 5 minut pri hitrosti 1000 G. Na dnu epruvete smo dobili čep celic. Odstranili smo medij in dispergirali celice v 1 mL svežega medija DMEM+. 200 μ L suspenzije smo prenesli v gojilno posodo, dodali 2 mL medija DMEM+ in postavili v inkubator.

Gojenje sesalskih celic poteka pri aseptičnih pogojih, zato poleg osnovnih varnostnih protokolov (nošenje rokavic, varnostnih očal in halje) upoštevamo še dodatne ukrepe: rokavice razkužimo s 70% etanolom, z njim prav tako prebrišemo vsak vsebnik in pripomoček, preden ga postavimo v laminar.

3.2.1.2 Gojenje celic

Pasažo smo izvedli dvakrat tedensko, ko so celice dosegle 70-90% preraščenost. Iz gojilne posode smo odstranili medij, spirali z 2 ml fosfatnega pufra (PBS-a) in dodali 2 mL PBS z 0,02% EDTA v katerega smo nato odpipetirali 20 μ L encima tripsina. Gojilno posodo smo rahlo premešali in inkubirali 20 minut na 37° C. V tem času je encim sprostil pritrjene celice. Po inkubaciji smo encim inaktivirali z dodatkom 2 mL DMEM+, ogretega na 37° C. Suspenzijo celic smo prenesli v epruveto in jih centrifugirali 5 minut pri hitrosti 2000 g. Po centrifugiranju smo na dnu epruvete dobili čep celic. Odstranili smo supernatant in celice dispergirali v 1 mL svežega medija. Vzeli smo 50 μ L suspenzije celic, dodali 50 μ L barvila nigrozina in premešali. Ustrezno količino smo prenesli na ploščico za štetje in pod svetlobnim mikroskopom prešteli celice. Rezultat smo nato preračunali na celoten volumen suspenzije. Vzeli smo nov gojilna posoda, v katerega smo nasadili 5×10^4 celic (ponavadi od 100-200 μ L suspenzije celic), dodali 2 mL medija, nežno pomešali in postavili v inkubator. V primeru da smo izvajali transfekcijo smo celice, namesto v gojilna posodica, nasadili v posodico s šestimi vdolbinicami. Na vdolbinico smo nasadili 5×10^4 celic in do 2 mL dopolnili s DMEM+. Celice smo po potrebi aktivirali z ustrezno količno TNF α (slika 10).



Slika 10: Shematski prikaz postopka gojitve celic.

3.2.2 Transformacija

Celice smo nasadili v posodo s šestimi vdolbinami in jim dodali različne koncentracije kemoporantov ter fluorescenčno označeni protismiselni oligonukleotid za interleukin 23. Za transformacijo smo uporabili kemoporante, površinsko aktivne snovi, ki povzročijo reverzibilen nastanek por v celični membrani. Delali smo z raztopinami CHAPS-a, escina, tauroholat-a, tritona in epigalokatehin-3-galata. Koncentracije delovnih raztopin so bile enake, 1 mg/mL. V 200 μ L medija s celicami smo dodali od 2,5-80 μ L.

Po izpostavitvi smo celice spirali in inkubirali 24 ur, uspeh transfekcije pa potrdili pod fluorescenčnim mikroskopom: če so fluorescenčno označeni oligonukleotidi prišli v celico, smo to videli kot zeleno svetleče se celice.

Za negativno kontrolo smo vzeli medij s serumom brez celic, pozitivno kontolo pa je predstavljal medij s celicami, brez dodanega kemoporanta. Za kontrolo spiranja smo v eno vdolbinico dodali protismiselni oligonukleotid. S tem smo hkrati izključili možnost pasivnega vnosa protismiselnih oligonukleotidov v celico.

Z testom MTS smo ovrednotili vpliv kemoporantov na preživetje celic. Dobljene rezultate smo uporabili za optimizacijo časovne izpostavitve in koncentracije kemoporantov.

A) Vpliv na morfološke lastnosti in preživetje celic

Morfološke lastnosti celične linije smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom. Preživetje celic smo določali s pomočjo testa MTS. V vsak vdolbinico smo dodali 10 μ L MTS reagenta in po eni uri pomerili absorbanco pri 486 nm. Višja absorbanca pomeni višjo stopnjo preživetja celic. Dobljene vrednosti smo primerjali s pozitivno kontrolo (same celice), slepo vrednost pa nam je predstavljala negativna kontrola (medij brez celic).

B) Vrednotenje in optimizacija časovne izpostavitve in različnih koncentracij kemoporantov

Preverili smo vpliv različnih koncentracij in časovnih intervalov izpostavitve kemoporantov na preživetje celic.

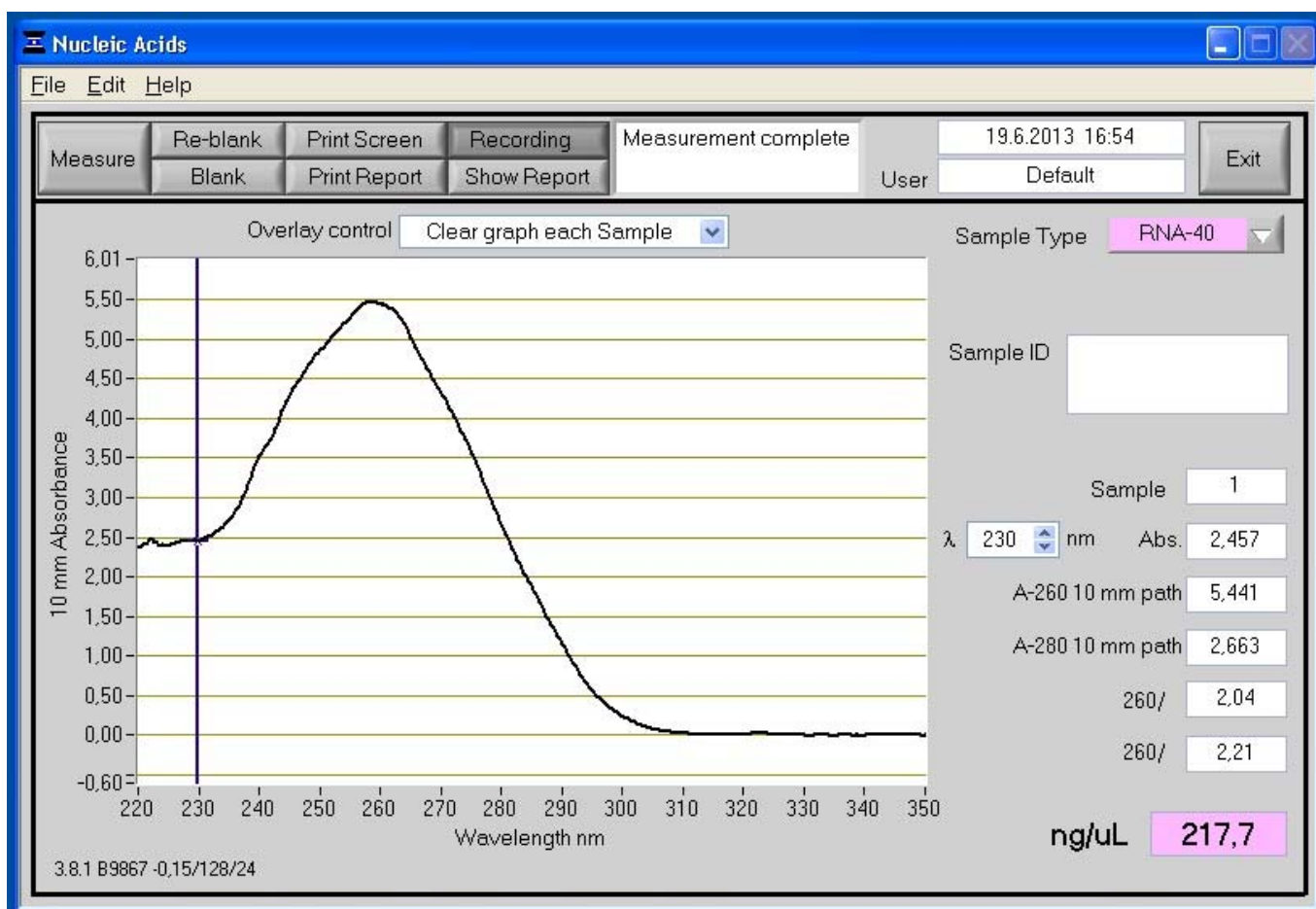
3.2.3 Meritev izražanja genov

3.2.3.1 Izolacija RNA

Za izolacijo smo uporabili RNeasy Mini Kit (za 50 reakcij). Postopek izolacije smo izvedli po navodilih proizvajalca (QIAGEN).

3.2.3.2 Določanje koncentracije z Nanodrop-om

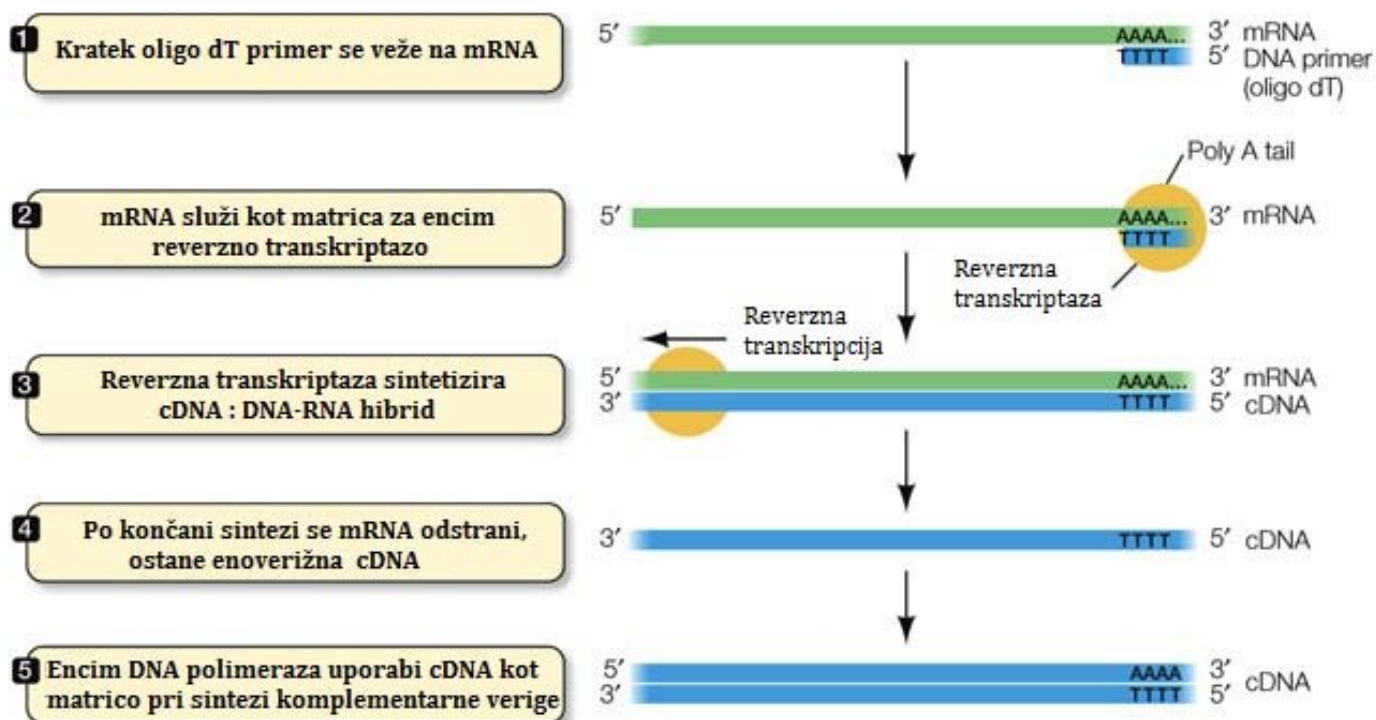
Količino izolirane RNA smo ocenili s merjenjem absorbance na spektrofotometru pri 260 nm (Nanodrop, slika 11). Čistost vzorca smo ocenili iz razmerja absorbanc pri 260 in 280 nm. Razmerje $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ je pri čistem RNA vzorcu enako vrednosti 2. Višje vrednosti kažejo na kontaminacijo vzorca s proteini, nižje pa na prisotnost DNA v vzorcu.



Slika 11: RNA profil, posnet na spektrofotometru NanoDrop-u. Maksimum absorbcije RNA je pri 260 nm. Koncentracija RNA v vzorcu je 217,1 ng/μL. Razmerje absorbanc valovnih dolžin $A_{260}/A_{280} = 2,04$ nam pove, da naš vzorec ni kontaminiran s proteini (100% čist vzorec RNA ima razmerje $260/280 = 2$).

3.2.3.3 Reverzna transkripcija

Za reverzno transkripcijo smo uporabili Omniscript RT Kit (za 200 reakcij). Postopek smo izvedli po navodilih proizvajalca (QIAGEN, slika 12).



LIFE 8e, Figure 16.12

LIFE: THE SCIENCE OF BIOLOGY, Eighth Edition © 2007 Sinauer Associates, Inc. and W. H. Freeman & Co.

Slika 12: Shema prepisa mRNA v cDNA s encimom reverzno transkriptazo. Povzeto po:

<http://www.vi.cl/foro/topic/10-71-apuntes-de-biologia-y-quimica/page-43>

3.2.3.4 qPCR

Za qPCR smo uporabili mikrotitrsko ploščico s 96-imi vdolbinicami. V vsako smo odpipetirali 15 μL reakcijske zmesi (Master Mix 200 nM) in 5 μL raztopine cDNA. Koncentracija raztopine cDNA je bila 2 ng/ μL , tako da smo v vsaki vdolbinici imeli 10 ng matrične DNA. Sestava Master Mixa za hišni gen se razlikuje od sestave za tarčni gen v različni koncentraciji začetnih oligonukleotidov (preglednica I in II). Za vsak vzorec smo delali po dve ali tri zaporedne ponovitve, kot negativno kontrolo pa smo reakcijski zmesi namesto vzorca dodali vodo. Na ta način smo potrdili čistost reagentov.

Preglednica I: Sestava Master Mix-a hišnega gena

Komponenta	Volumen (μL)
<i>SYBR GREEN</i>	10
<i>5' začetni oligonukleotid (10 nM)</i>	0,4
<i>3' začetni oligonukleotid (10 nM)</i>	0,4
<i>Voda brez RNA</i>	4,2
Skupni volumen	15

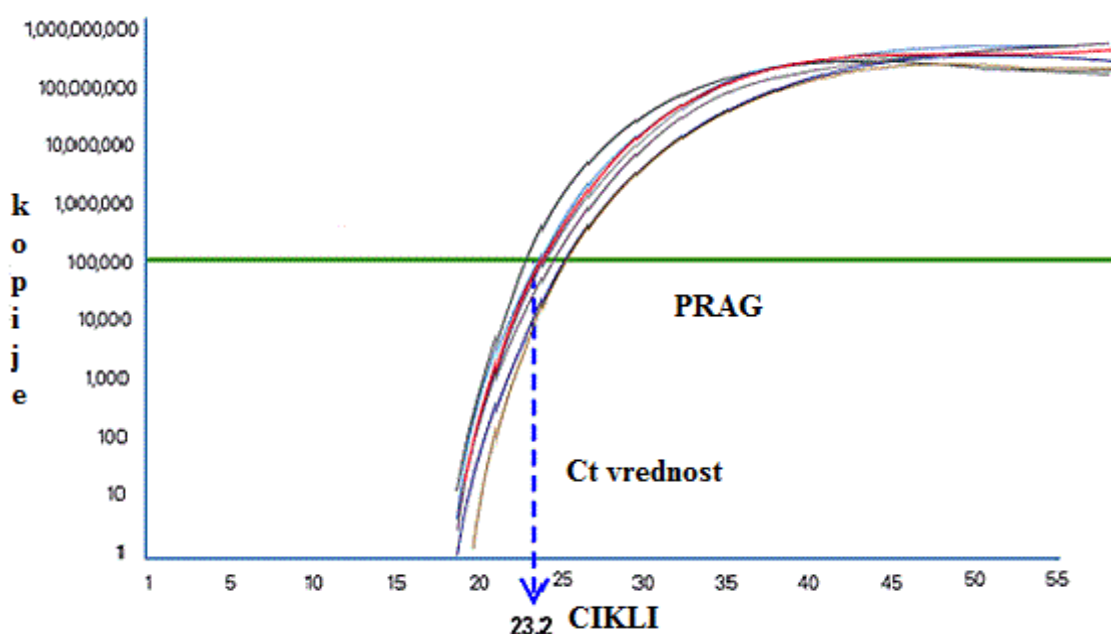
Preglednica II: Sestava Master Mix-a tarčnega gena

Komponenta	Volumen (μL)
<i>SYBR GREEN</i>	10
<i>5' začetni oligonukleotid (10 nM)</i>	0,2
<i>3' začetni oligonukleotid (10 nM)</i>	0,2
<i>Voda brez RNA</i>	4,6
Skupni volumen	15

Pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo prekrili z optično lepljivo prevleko. Nato smo jo 5 minut centrifugirali pri 1900 obratih/minuto. S tem smo poskrbeli, da se je reakcijska zmes dobro premešala in da smo odstranili zračne mehurčke, ki motijo PCR. Ploščo smo prekrili z gumijasto zaščito in jo vstavili v aparat ABI Prism 7000 SDS, kjer smo predhodno nastavili program, naveden v preglednici III. Rezultate nam je program podal kot krivulje pomnoževanja (slika13) in kot prazne cikle (Ct).

Preglednica III: Nastavitve programa za pomnoževanje DNA

Stopnja reakcije	Temperatura (°C)	Časovni interval	Cikli
Začetni program	50	2 min	1-krat
	95	10 min	
Denaturacija	95	15 s	40 -krat
Prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje	60	1 min	



Slika 13: Krivulja pomnoževanja qPCR. Na mestu kjer se sekata krivulja signala in črta praga, potegnemo pravokotnico na X os. Dobljena vrednost predstavlja Ct: število ciklov, potrebnih za doseg vrednosti praga (v tem primeru signala 100.000 kopij). Večja kot je začetna koncentracija DNA, ki jo pomnožujemo, manj podvojitev (ciklov) bo potrebnih za doseg praga, torej bo Ct vrednost nižja. Povzeto po: <http://goo.gl/fKGbVZ>

3.2.3.5 Analiza izražanja

Uporabili smo Livakovo metodo (metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$), s pomočjo katere smo kvantificirali relativno izražanje genov. Rezultate smo standardizirali na hišni gen HPRT1, s čimer smo izničili vpliv različnega števila analiziranih celic.

Postopek: Pri koraku A izračunamo razliko v Ct-ju tarčnega gena in Ct-ju hišnega gena, tako za testirane kot za kalibratorske celice. V koraku B izračunamo razliko razlik. V zadnjem koraku (C) vrednost B pomnožimo z minus 1, dobljeno vrednost pa potenciramo na 2. Rezultat je relativno razmerje izražanja gena na kalibrator in standardizirano na hišni gen(26).

$$A: \quad \Delta Ct(\text{test}) = Ct(\text{tarčni gen, test}) - Ct(\text{hišni gen, test})$$

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

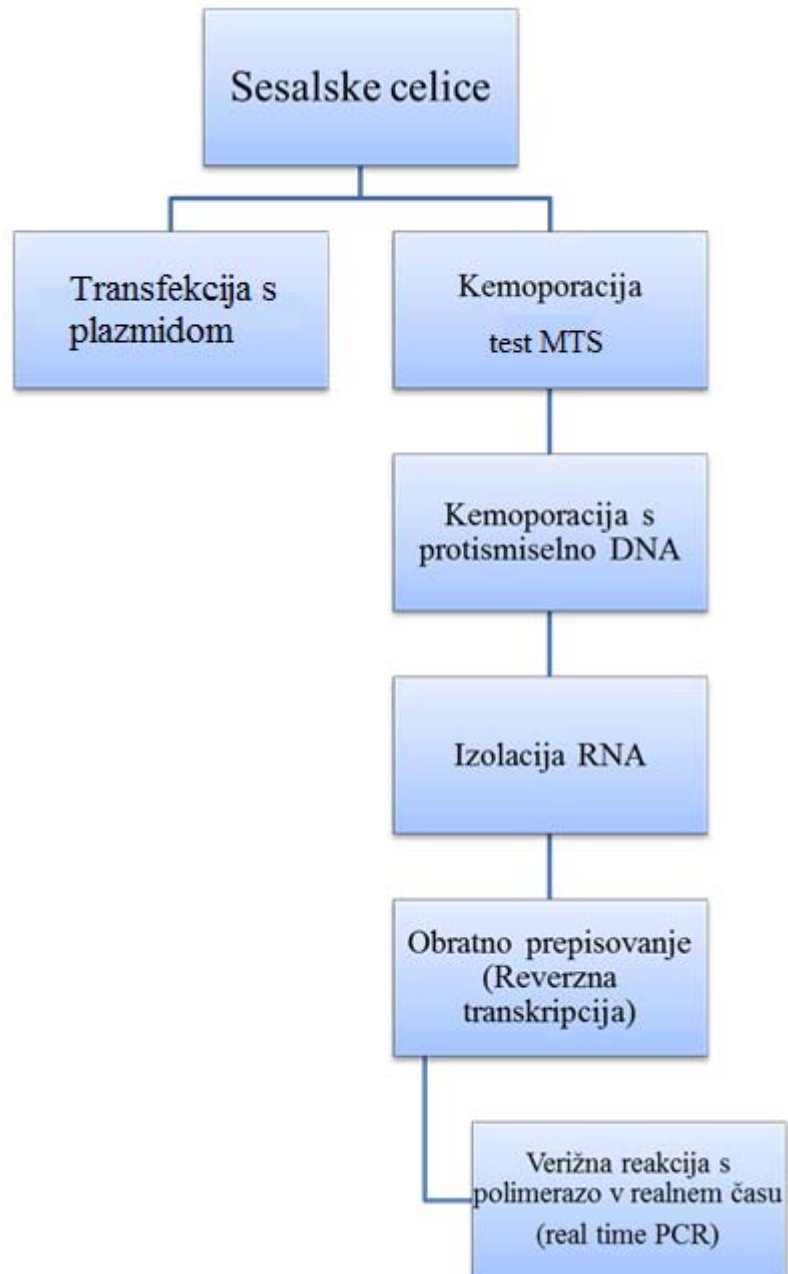
$$B: \quad \Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{test}) - \Delta Ct(\text{kalibrator})$$

$$C: \quad = \text{standardizirana razlika v izražanju genov}$$

Rezultate transficiranih celic smo kalibrirali z rezultati kontrolnih. Rezultat pove, za kolikokrat se je zvišalo ali znižalo izražanje genov, glede na izbran kalibrator. Rezultat je standardiziran na izbran hišni gen (v našem primeru HPRT1).

3.2.3.6 TEST MTS

Za test MTS smo uporabili CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, delali smo po navodilih proizvajalca (PROMEGA)



4 REZULTATI

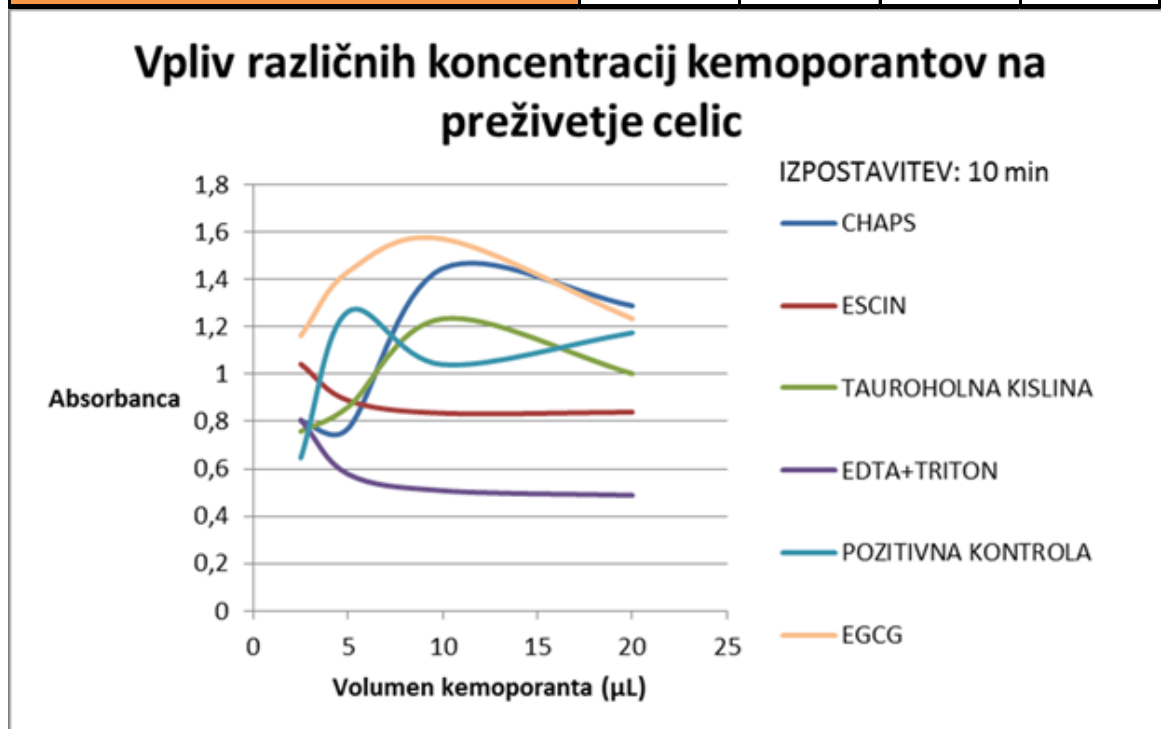
Slika 14: Shema poteka eksperimentov

4.1 KEMOPORACIJA

4.1.1 Vpliv različnih koncentracij kemoporantov na preživetje celic

Preglednica IV: Rezultati testa MTS. Čas izpostavitve celic kemoporantom: 10 minut.

Vcel=200 μ L, 18.04.2013	Izpostavitev: 10 min			
	20 μ L	10 μ L	5 μ L	2,5 μ L
CHAPS	1,2885	1,4468	0,7711	0,8024
ESCIN	0,8394	0,8348	0,8884	1,0420
TAUROHOLNA KISLINA	1,0016	1,2338	0,8619	0,7582
EDTA+TRITON	0,4881	0,5078	0,5770	0,8067
POZITIVNA KONTROLA	1,1745	1,0400	1,2648	0,6468
EGCG	1,2338	1,5707	1,4325	1,1624



Slika 15: Graf vpliva različnih koncentracij kemoporantov na preživetje celic, desetminutna izpostavitve.

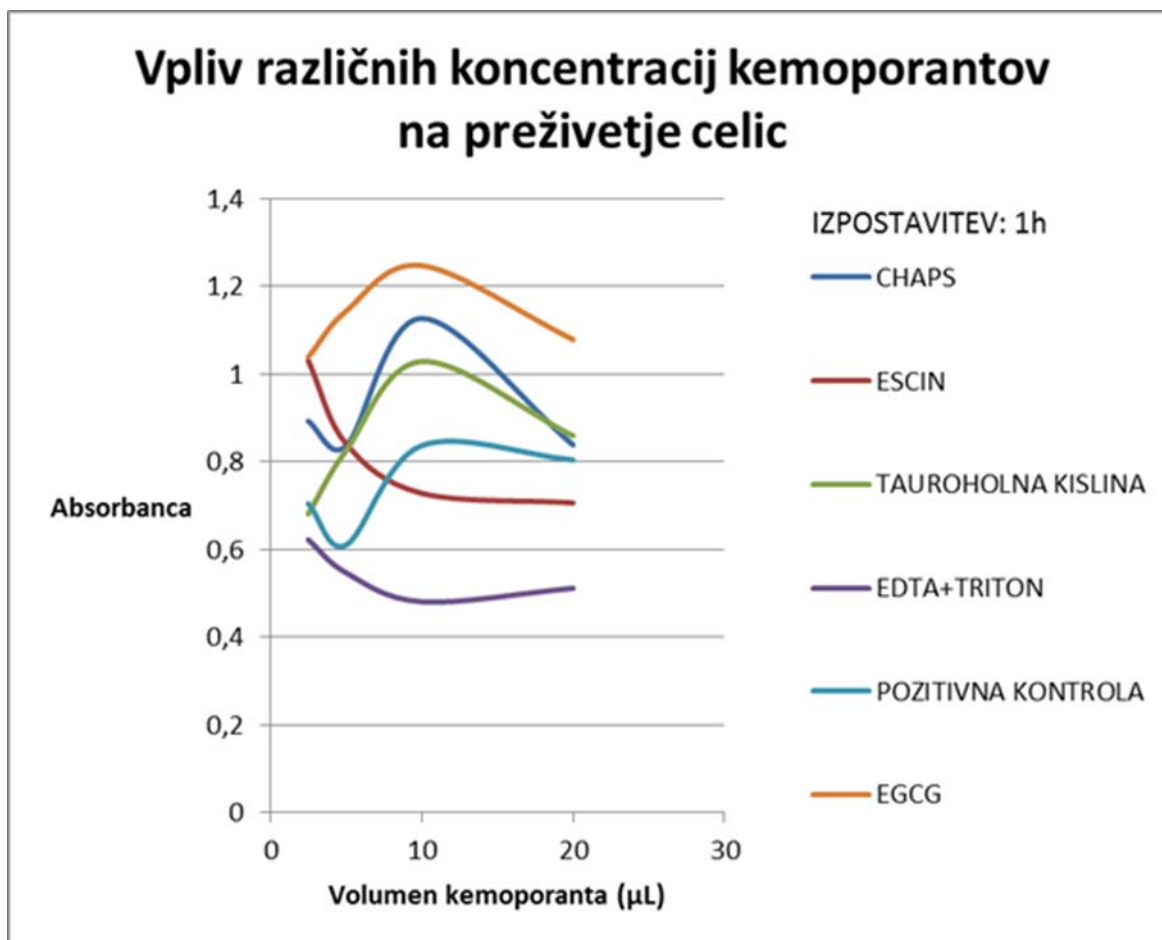
Celice smo izpostavili različnim koncentracijam kemoporantov in s pomočjo testa MTS določili stopnjo preživetja celic (višja absorbanca pomeni več živih celic). Z izjemo escina,

vsi kemoporanti povečajo stopnjo preživetja celic. Za najbolj primernega se je izkazal epigalokatehin-3-galat, ki pri vseh koncentracijah poveča stopnjo metabolne aktivnosti v primerjavi s pozitivno kontrolo (slika 15).

4.1.2 Vpliv različnih časovnih izpostavitvev

Preglednica V: Rezultati testa MTS. Čas izpostavitve celic kemoporantom: 1 ura.

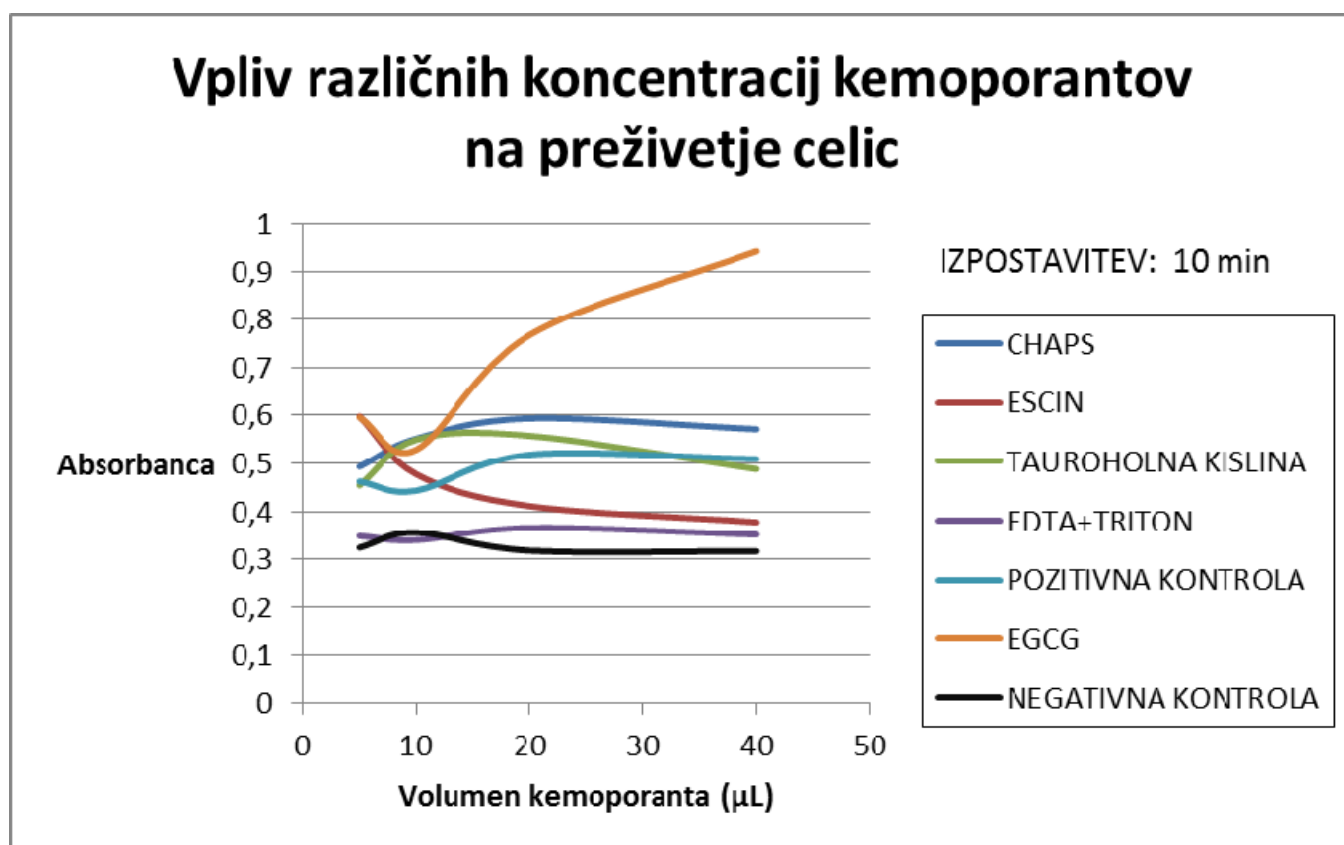
Vcel=200 μ L, 18.04.2013	Izpostavitvev: 1h			
	20 μ L	10 μ L	5 μ L	2,5 μ L
CHAPS	0,8390	1,1275	0,8363	0,8929
ESCIN	0,7068	0,7285	0,8411	1,0314
TAUROHOLNA KISLINA	0,8595	1,0293	0,8260	0,6818
EDTA+TRITON	0,5120	0,4812	0,5472	0,6227
POZITIVNA KONTROLA	0,8044	0,8373	0,6106	0,7049
EGCG	1,0790	1,2479	1,1438	1,0392



Slika 16: Graf vpliva različnih koncentracij kemoporantov na preživetje celic, enurna izpostavitvev: absorbanca je v primerjavi z desetminutno izpostavitvijo manjša, a še vedno višja, kot pri pozitivni kontroli (celice brez kemoporanta).

Preglednica VI: Ponovitev testa MTS. Časovna izpostavitve celic kemoporantom: 10 minut.

Vcel=200 μ L, 08.05.2013	Izpostavitev: 10 min			
	40 μ L	20 μ L	10 μ L	5 μ l
CHAPS	0,5716	0,5939	0,5515	0,4931
ESCIN	0,3779	0,4113	0,4776	0,5986
TAUROHOLNA KISLINA	0,4881	0,5577	0,5495	0,4541
EDTA+TRITON	0,3516	0,3659	0,3403	0,3487
POZITIVNA KONTROLA	0,5093	0,5185	0,4432	0,4624
EGCG	0,9413	0,7672	0,5287	0,5962
NEGATIVNA KONTROLA	0,3169	0,3183	0,3561	0,3246

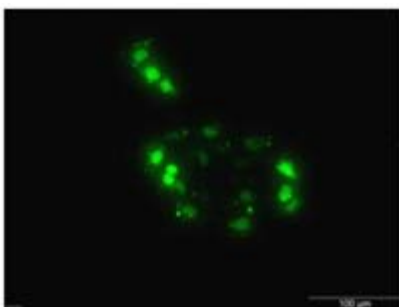


Slika 17: Graf vpliva različnih koncentracij kemoporantov na preživetje celic, desetminutna izpostavitve: ponovili smo eksperiment in dodali še negativno kontrolo (medij brez celic).

4.1.3 Vnos segmentov DNA

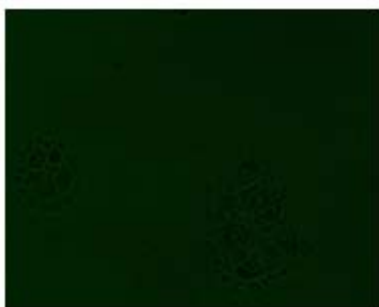
4.1.3.1 Vnos protismiselnih oligonukleotidov

Preden smo začeli z eksperimentom smo morali potrditi, da spiranje odstrani vse nevesene oligonukleotide. Kot pozitivno kontrolo smo vzeli transfekcijo s pomočjo lipofektamina, za katero je dokazan uspešen vnos protismiselnih oligonukleotidov za ICAM-1 (27) (slika 18).



Slika 18: Slika HaCaT celic pod fluorescenčnim mikroskopom po transfekciji s fluorescenčno označenim protismiselnim oligonukleotidom za ICAM-1 (FITC filter). Povzeto po (27).

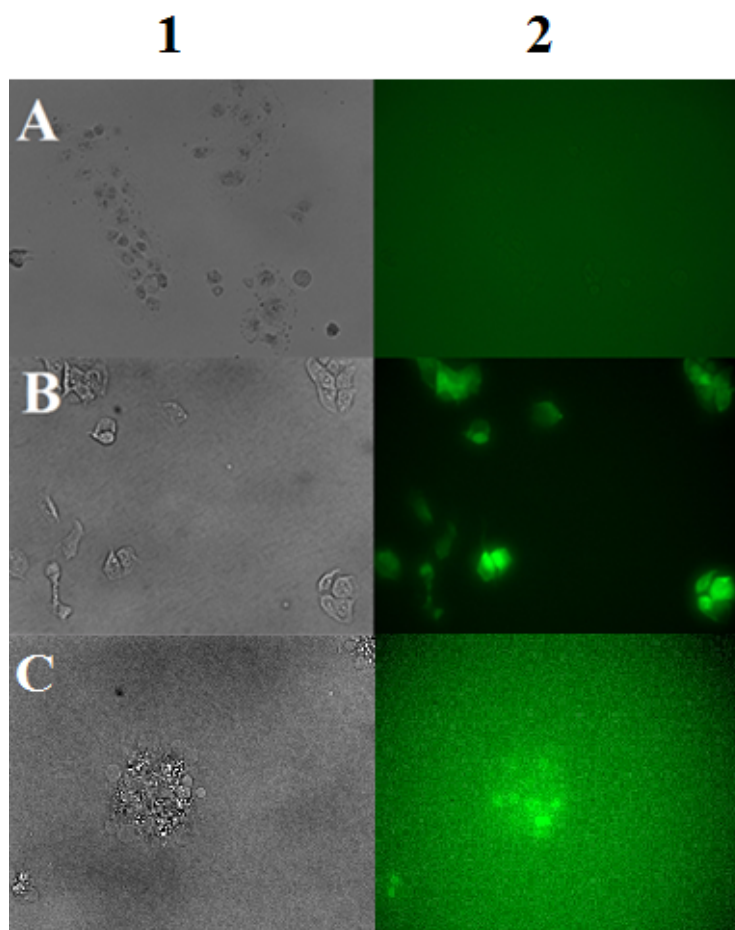
Kontrolnim celicam smo dodali označene oligonukleotide brez kemoporanta. Po spiranju smo celice pogledali pod fluorescenčnim mikroskopom. Odsotnost fluorescence je potrdila uspešnost spiranja (slika 19).



Slika 19: Slika HaCaT celic z dodanimi fluorescenčno označenimi protismiselnimi oligonukleotidi po spiranju pod fluorescenčnim mikroskopom (FITC filter).

V celice smo s kemoporacijo vnesli fluorescentno označene protismiselne oligonukleotide za IL-23 in transfekcijo opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom. Zelena svetloba je znak, da so se oligonukleotid uspešno prenesli v celice. Učinkovitost kemoporantov smo ocenili glede na število transficiranih (svetlečih) celic v vzorcu.

Celice kontrole, katerim nismo dodali ne kemoporanta ne protismiselnega oligonukleotida (slika 20 A), same po sebi ne svetijo (opomba: zelena svetloba na sliki 20 A2 je posledica podaljšanega časa odprtja zaslone kamere, angl. camera exposure time). Na sliki 20 B2 vidimo uspešen vnos oligonukleotidov s kemoporantom CHAPS, ki se je vizualno izkazal za najbolj učinkovitega. Na sliki 20 C pa vidimo transfekcijo s pomočjo epigalokatehin-3-galata. S escinom in tauroholatom nismo uspeli transficirati celic.

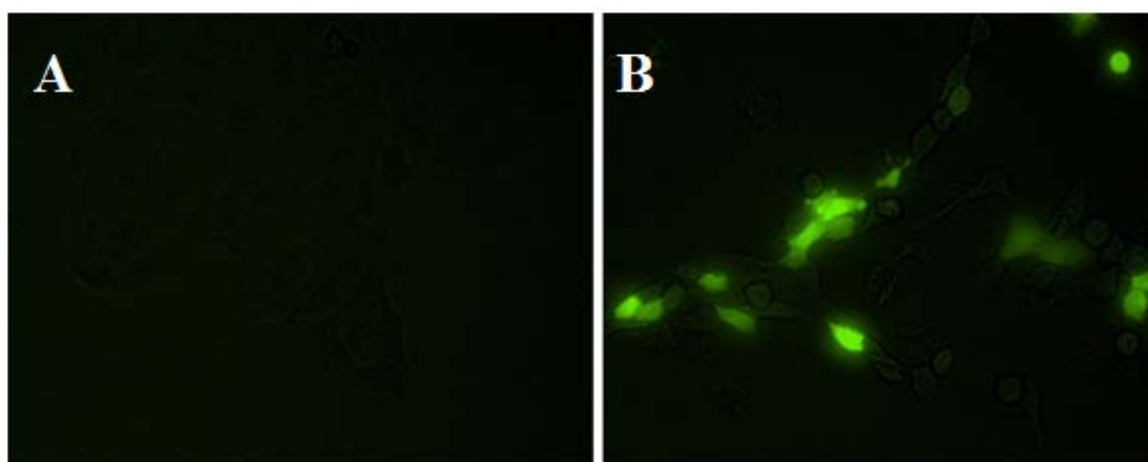


Slika 20: HaCaT celice pod fluorescenčnim mikroskopom. V stolpcu 1 so celice osvetljene z »običajno« (belo) svetlobo, v stolpcu 2 pa z vzbujevalno svetlobo valovne dolžine 492 nm (FITC filter) A) Celice kontrole brez kemoporanta in protismiselnega oligonukleotida.

B) vnos protismiselnega oligonukleotida za IL-23 ob prisotnosti kemoporanta CHAPS C) vnos protismiselnega oligonukleotida za IL-23 ob prisotnosti kemoporanta EGCG

4.1.3.2 Plazmid

Z lipofektaminom smo v celice vnesli plazmid z genom za zeleno fluorescirajoči protein in transfekcijo opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom. Za pozitivno kontrolo smo vzeli transfekcijo s pomočjo lipofektamina, kot kontrolo pa smo celicam dodali samo plazmid. Na sliki je lepo razvidna uspešna transfekcija z lipofektaminom (slika 21 B), medtem ko celice kontrole ne svetijo (slika 21 A). Plazmida nam s pomočjo kemoporantov EGCG in CHAPS-a ni uspelo vnesti.



Slika 21: Slika HaCaT celic pod fluorescenčnim mikroskopom po transfekciji (FITC filter)
A) kontrolne celice, B) transfekcija s pomočjo lipofektamina

4.2 UTIŠANJE IZRAŽANJA

V celice smo s kemoporacijo vnesli protismiselni oligonukleotid za interlevkin 23. Nato smo izolirali RNA, ga prepisali v cDNA, ter pomnožili s pomočjo reakcije z verižno polimerazo. Rezultati so zbrani v preglednici VII.

Preglednica VII: PCR rezultati. Uporabili smo oligonukleotidne začetnike za tri hišne gene (ACTB, GAPD in HPRT-1), ter enega tarčnega (interlevkin 23). Hišne gene smo uporabili za standardizacijo dobljenih rezultatov. Dobljene vrednosti predstavljajo prazne cikle, UNDET pa pomeni, da je koncentracija DNA v vzorcu pod mejo zaznave.

12.7.2013	KONTROLA		VODA	AKTIVIRANE CELICE		VODA
ACTB	21,42	21,33	UNDET	18,13	16,85	UNDET
GAPDH	20,61	20,84	34,05	18,24	18,91	37,53
HPRT 1	23,94	23,05	UNDET	22,54	22,62	UNDET
IL 23	25,41	25,6	UNDET	27,8	28,54	38,23
12.7.2013	AKTIVIRANE CELICE+CHAPS+ANTISENS		VODA	KONTROLA + ANTISENS		VODA
ACTB	23,17	20,07	UNDET	16,89	19,41	UNDET
GAPDH	24,3	18,2	UNDET	19,02	19,18	UNDET
HPRT 1	26,14	18,8	UNDET	23,47	23,71	UNDET
IL 23	27,93	26,55	35,33	31,38	28,27	UNDET
12.7.2013	AKTIVIRANE CELICE+ANTISENS		VODA	AKTIVIRANE+CHAPSO		VODA
ACTB	16,99	17,8	UNDET	17,22	19,05	30,42
GAPDH	17,18	20,72	29,44	17,88	16,61	34,31
HPRT 1	24	22,77	30,31	21,05	22,14	33,81
IL 23	29,49	34,55	UNDET	27,27	27,4	UNDET

Utišanje izražanja

Preglednica VIII: Primerjava izražanja gena za IL-23. Razmerje izražanja med transficiranimi celicami in celicami kontrole.

Aktivirane celice+CHAPS+protismiselni oligonukleotidi (Števila predstavljajo Ct vrednosti)	
<i>HPRT1</i>	<i>IL-23</i>
26,14	27,93
18,8	26,55
Celice kontrole	
<i>HPRT1</i>	<i>IL-23</i>
23,94	25,41
23,05	25,6

Povprečje transficiranih celic: HPRT1: 22,47 IL-23: 27

Povprečje celic kontrole: HPRT1: 23,495 IL-23: 25,505

ΔCt transficiranih celic = 4,77

ΔCt celic kontrole = 2,01

$\Delta\Delta Ct = 2,76$

= 0,1476

Rezultat nam pove, da se je izražanje gena za IL-23 v transficiranih celicah znižalo za 85% v primerjavi s kontrolnimi celicami.

Preglednica IX: Primerjava izražanja gena za IL-23. Razmerje izražanja med imunsko aktiviranimi celicami (kalibratorske) celice in transficiranimi (testne) celice

Aktivirane celice+CHAPS+protismiselni oligonukleotidi (transficirane) (Števila predstavljajo Ct vrednosti)	
<i>HPRT1</i>	<i>IL-23</i>
26,14	27,93
18,8	26,55
Aktivirane celice	
<i>HPRT1</i>	<i>IL-23</i>
22,54	27,8
22,62	28,54

Povprečje aktiviranih: HPRT1: 22,58 IL-23: 28,17

Povprečje transficiranih: HPRT1: 22,47 IL-23: 27,24

ΔCt aktiviranih = 5,59

ΔCt transficiranih = 4,77

$\Delta\Delta Ct = - 0,82$

= 1,765

Rezultat nam pove, da je v transficiranem vzorcu 76,5% višje izražanje IL-23 glede na imunsko aktivirane celice.

5 DISKUSIJA

Genske bolezni so posledica okvare genov, ki lahko močno znižajo kvaliteto in trajanje življenja. Čeprav imamo na voljo veliko različnih metod vnosa genov v celice, pa je uspeh genskega zdravljenja pogosto kratkotrajen, možen pa je pojav zelo resnih neželenih učinkov. Za zdravljenje se zato odločimo le pri zelo resnih boleznih. Metode so v primerov večini zelo drage, pri vnosu izzovejo močan imunski odziv in so težavne za masovno proizvodnjo. Razvoj cenejše, enostavnejše, bolj varne metode, ki ne bi premočno aktivirala imunski sistem bi lahko pozitivno vplivala na razvoj in uporabnost genske terapije. Kemoporacija se lahko uporablja za transfekcijo kompetentnih bakterij. Kemoporanti so telesu znane in lastne snovi (saponini in holati), metoda kemoporacije pa hiter in relativno enostaven način vnosa genov.

Na podlagi teh podatkov smo se odločili preveriti vpliv koncentracije in časovne izpostavitve kemoporantov na stopnjo preživetja celic ter primernost metode za vnos kratkih in dolgih odsekov DNA v sesalske celice. Uporabili smo celično linijo HaCaT, ki predstavlja dober in vitro model epidermisa.

Kor kemoporante smo uporabili raztopine CHAPS-a, escina, tauroholne kisline in epigalokatehin-3-galata. Preučili smo vpliv različnih koncentracij in časovnih intervalov izpostavitve kemoporantom na stopnjo preživetja celic. Razen escina vsi kemoporanti izboljšajo stopnjo preživetja. Še posebej izstopa epigalokatehin-3-galat. (slike 15, 16, 17) Koncentracija escina in stopnja preživetja celic sta obratno sorazmerni. Ti rezultati kažejo, da so sesalske celice sposobne preživeti kratkotrajno izpostavitve koncentraciji kemoporantov, ki je pri bakterijskih celicah omogočila vnos dednega materiala v celice.

Čas je pomemben faktor pri izbiri metode vnosa dednega materiala v celice. Prednost kemoporacije je možnost zelo kratkega časa izpostavitve (10 minut) v primerjavi z kationskimi liposomi (minimalno 4 do 6 ur, do enega dneva za keratinocite). Krajša izpostavitve pomeni manjšo obremenitev za celice in posledično višjo stopnjo preživetja. Iz preglednic 4 in 5 je razvidno, da je daljša izpostavitve praviloma znižala stopnjo preživetja glede na krajšo. Navkljub temu pa preživetje tudi po enourni izpostavitvi ostaja višja kot pri pozitivni kontroli (sliki 16). Ker pa število celic med posameznimi vdolbinami

variira, bi za boljšo primerjavo potrebovali enako število celic na vdolbino. To bi lahko dosegli s pomočjo avtomatskega nanosa celic na ploščo s 96-imi vdolbinami.

Fluorescenčno označen protismiselni oligonukleotid za IL-23 smo s pomočjo kemoporacije uspeli vnesti v celice (slika 20 B). S tem smo dokazali, da je metoda primerna za vnos krajših segmentov genskega materiala v sesalske celice. Kot najboljši kemoporant se je izkazal CHAPS (slika 20 B).

Plazmidi so velikosti od 1-1000 kilobaznih parov, kar pomeni da bo njihov vnos v celico predstavljal velik izziv. S kemoporacijo nam ni uspelo izvesti uspešnega vnosa plazmida v celice. Za pozitivno kontrolo smo izvedli vnos plazmida z lipofektaminom. Ta metoda vnosa se je izkazala za uspešno (slika 21 B). Možne spremembe parametrov, ki bi lahko omogočile boljšo transfekcijo so: podaljšan čas izpostavitve, višje koncentracije kemoporantov in plazmida. Lahko bi uporabili tudi kombinacijo različnih kemoporantov, na primer epigalokatehin-3-galata in CHAPS-a. Določitev mehanizma kemoporacije bi pripomogla k oceni optimalne velikosti segmentov: če gre za mehanizem odpiranja por, katerih premer je 10^{-8} m, to oteži vnos večjih segmentov.

Uspešno vneseni protismiselni oligonukleotidi se komplementarno vežejo na mRNA, nastale duplekse razgradijo nukleaze, kar vodi v znižano izražanje proteina. V celice smo vnesli protismiselni oligonukleotid za interlevkin 23, izolirali RNA, ga prepisali v cDNA in jo pomnožil z verižno reakcijo s polimerazo. V primerjavi s celicami kontrole se je izražanje gena za IL-23 v transficiranih celicah znižalo (preglednica VIII). Eden glavnih vzrokov za neuspešno utišanje izražanja glede na aktivirane celice, je neuspešna imunska aktivacija celic (preglednica IX). Možno je, da delovanje protismiselne DNA zavira rast celic, kar bi lahko razložilo nižje koncentracije izolirane RNA pri transficiranih vzorcih.

6 SKLEPI

Razvoj cenejših, enostavnejših in varnejših metod vnosa genske informacije v celico lahko bistveno pripomore k nadaljnjemu razvoju in široki uporabi genske terapije. Dokazali so že, da lahko z metodo kemoporacije uspešno transficiramo kompetentne bakterijske celice. Tekom naše raziskave smo s kemoporacijo uspešno vnesli krajše segmente DNA v človeške kožne celice (keratinocite). S tem smo dokazali, da je metoda primerna za transfekcijo sesalskih celic. Ovrednotili smo časovni in koncentracijski vpliv kemoporantov na stopnjo preživetja HaCaT celične linije. Večina kemoporantov po izpostavitvi kaže trend povečanja stopnje preživetja celic. Izjema je escin, ki skladno z naraščujočo koncentracijo znižuje stopnjo preživetja. Z daljšim časom izpostavitve se stopnja preživetja pri višjih koncentracijah zniža, pri manjših pa razlike niso tako očitne.

Kot najboljši kemoporant se je izkazal CHAPS. Uspešno transformacijo celic lahko dosežemo že po desetminutni izpostavitvi. Plazmidov nam s kemoporacijo pri naših eksperimentalnih pogojih ni uspelo vnesti v celice. Z nadaljnjo optimizacijo časa izpostavitve in koncentracije plazmida ter lipofektamina bi morda lahko dosegli uspešen vnos tudi večjih segmentov. Zanimiva bi utegnila biti tudi kombinacija in morebiten sinergistični učinki kemoporantov, na primer: epigalokatehin -3-galata in CHAPS-a ali tauroholne kisline.

Med posameznimi vdolbinicami je prihajalo do manjših odstopanj v številu in gostoti celic, kar bi lahko vplivalo na stopnjo uspešnosti transfekcije. Pri nadaljnjem raziskovanju bi zato lahko nanos avtomatizirali. Na koncu bi veljalo ponoviti še merjenje izražanja genov. Ker transfekcija močno zniža koncentracijo RNA, ki jo prepisemo v cDNA in pomnožimo s qPCR, bi bilo smiselno nasaditi več celic v posamezno vdolbinico. Namesto dveh bi na PCR ploščo nanесли tri ponovitve za vsak vzorec. Na ta način bi dobili bolj zanesljive rezultate.

Z nadaljnjo optimizacijo bi lahko metoda kemoporacija predstavljala alterantivo že uveljavljenim metodam transformacije celic.

7 LITERATURA

1. B. Štrukelj, J. Kos: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1.izd. , Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 592, 26, 63
2. O. T. Avery; C. M. MacLeod, M. McCarty: "Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III" ". Journal of Experimental Medicine 79 (2) 1944: 137–158
3. A. D. Hershey, M Chase: Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. The Journal of General Physiology, 36 (1), 1952, 39
Dostopno preko: <http://jgp.rupress.org/cgi/content/abstract/36/1/39> Dostop: 27.08.2013
4. J.D Watson, F.H.C Crick: "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid", Nature 171 (4356), 1953, 737–738.
5. M. Shrikant: Delivery systems for gene therapy, Indian Journal of Human Genetics, 19(1) 2013, 3–8
6. K. E. Davies: The application of DNA recombinant technology to the analysis of the human genome and genetic disease, Human Genetics, 58, 1981, 351-357
7. R. D. Lele: Epigenetics - Gene Silencing, Journal of the Association of Physicians of India, 57, 2009, 60-66
8. M. C. Coutts: Human Gene Therapy, Kennedy Institute of Ethics Journal, 4, 1994, 63-83
9. D.J.A. Crommelin, R.D. Sindelar: Pharmaceutical Biotechnology An introduction for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists, 2nd edition, Taylor & Francis, ZDA in Kanada, 2002, 155-159, 11, 1, 175-180
10. C. S Baker, P. A. Foley, A. Braue: Psoriasis uncovered – measuring burden of disease impact in a survey of Australians with psoriasis, Australasian Journal of Dermatology, 54, 2013, 1–6
11. K. E. Nogales, B. Davidovici, J. G. Krueger: New insights in the Immunologic Basis of Psoriasis, Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery, 2010, 29 (1), 3-9
Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2868373/> Dostop: 14.08.2013

12. J. C. Capalleri, A. G. Bushmakin, J. Harness, C. Manolo: Psychometric validation of the physician global assessment scale for assessing severity of psoriasis disease activity, *Quality of Life Research*, 2013 Dostopno na: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11136-013-0384-y#page-1> Dostop: 09.08.2013
13. NICE clinical guideline 153: Psoriasis: the assessment and management of psoriasis. NICE 2012. <http://guidance.nice.org.uk/CG153>. Dostop: 05.08.2013.
14. <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/cell-type/th17-cells.htm>
15. D. A. Cesare, P. Meglio, FO Nestle: The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis, *Journal of Investigative Dermatology*, 2009; 129 (6): 1339–50.
16. PD Meglio, FO Nestle: The role of IL-23 in the immunopathogenesis of psoriasis, *F1000 Biology Reports*, 2010; 2, 40
17. <http://en.wikipedia.org/wiki/Oligonucleotide>
18. N. Dias, C. A. Stein: Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2002, 1, 347
19. Antisense Technologies. V knjigi: *Integrated DNA Technologies*, 2005 (ponatis 2011), 1-8
20. O. Kayser, R.H. Mueller: *Pharmaceutical Biotechnology: Drug discovery and clinical applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004, 231-261 232, 253, 261, 236-238
21. M. Ravnikar, A. Irman, N. Radic, M. Lunder, B. Strukelj: Chemoporation using saponins or cholates: an alternative method for transformation of bacterial cells. *Biotechnology Letters* 31(12), 2009, 1943–1946
22. J Bruneton et al.: *Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants intercept*, 2nd ed, Lavoisier, 1999, 672
23. G.J. Jenkins, L. Hardie: *Bile Acids, Toxicology and Bioactivity*, *Issues in Toxicology*, 1st ed, RSC Publishing, Cambridge, 2009, 8
24. BN Singh, S. Shankar, R. K. Srivastava: Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications, *Biochemical Pharmacology* 82(12), 2011, 1807-21
25. H. Potter: Transfection by Electroporation. *Current Protocols in Neuroscience*, 2001 1:A.1E.1–A.1E.5.

26. <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>

Dostop: 25.09.2013.

27. M. Gašperlin, K. Lužar, Utišanje genov za provnetne citokine v keratinocitni celični liniji, Ljubljana 2012