

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

GREGOR VIDOVIČ

MAGISTRSKO DELO

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

LJUBLJANA, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

GREGOR VIDOVIČ

**TESTIRANJE PLAZMIDNE DNA S KOLAGENSKIM PROMOTORJEM ZA
VNOS GENOV V IZBRANO TKIVO**

**TESTING OF PLASMID DNA CONTAINING COLLAGEN PROMOTER FOR
GENE DELIVERY TO SELECTED TISSUE**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

LJUBLJANA, 2015

Magistrsko delo sem opravljal na Oddelku za eksperimentalno onkologijo, Onkološkega Inštituta Ljubljana pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja in somentorstvom prof. dr. Gregorja Serše. Delovni mentor je bila Špela Kos. Soglasje za poskuse na živalih je dalo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (dovoljenje št. 34401-4/2012/4).

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Gregorju Serši, da mi je omogočil opravljanje magistrskega dela na Oddelku za eksperimentalno onkologijo in za vodstvo pri magistrskem delu. Hvala delovni mentorici Špeli Kos za vso pomoč in nasvete v laboratoriju.

Hvala prof. dr. Borutu Štruklju za vse nasvete pri pisanju naloge. Hvala prof. dr. Julijani Kristl in asist. dr. Simoni Mencej Bedrač za strokoven pregled magistrske naloge.

Rad bi se zahvalil tudi staršem za vso podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof. dr. Boruta Štruklja in somentorja prof. dr. Gregorja Serše.

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|------|
| 1 POVZETEK | VI |
| 2 ABSTRACT | VIII |
| 3 SEZNAM OKRAJŠAV | X |
| 4 UVOD..... | 1 |
| 4.1 RAK..... | 1 |
| 4.1.1 Kancerogeneza..... | 1 |
| 4.1.2 Osnovne lastnosti rakastih celic | 1 |
| 4.1.3 Pristopi pri zdravljenju | 2 |
| 4.2 GENSKO ZDRAVLJENJE | 2 |
| 4.2.1 Pristopi pri raku | 3 |
| 4.2.2 Plazmidna DNA..... | 4 |
| 4.3 DOSTAVNI SISTEMI..... | 5 |
| 4.3.1 Biološki sistemi | 6 |
| 4.3.1.1 Virusni vektorji..... | 6 |
| 4.3.1.2 Bakterijski vektorji | 6 |
| 4.3.2 Nebiološki sistemi | 6 |
| 4.3.2.1 Nosilni sistemi | 7 |
| 4.3.2.2 Metode za povečevanje vnosa DNA | 7 |
| 4.4 GENSKI VNOS V KOŽO | 7 |
| 4.4.1 Terapevtske možnosti genskega vnosa v kožo | 8 |
| 4.5 DOSEGANJE CELIČNE SPECIFIČNOSTI..... | 9 |
| 4.5.1 Tkivno specifični promotorji..... | 10 |
| 4.5.1.1 Kolagenski promotor <i>COL1A2</i> | 11 |
| 5 NAMEN DELA..... | 12 |
| 6 MATERIALI IN METODE | 14 |
| 6.1 IZOLACIJA PLAZMIDOV..... | 14 |
| 6.2 OVREDNOTENJE PLAZMIDOV | 16 |
| 6.2.1 Absorbanca | 16 |
| 6.2.2 Restrikcija..... | 17 |
| 6.2.3 Agarozna gelska elektroforeza | 19 |
| 6.3 ELEKTROPORACIJA | 21 |
| 6.3.1 Elektroporacija (<i>in vitro</i>) | 23 |

| | |
|---|----|
| 6.3.1.1 Priprava celic na elektroporacijo | 23 |
| 6.3.1.2 Elektroporacija..... | 26 |
| 6.3.1.3 Pretočna citometrija..... | 28 |
| 6.3.2 Elektroporacija (<i>in vivo</i>) | 31 |
| 7 REZULTATI | 34 |
| 7.1 PREVERJANJE ČISTOSTI IN SPECIFIČNOSTI PLAZMIDOV | 34 |
| 7.1.1 Določanje čistosti in koncentracije plazmidov | 34 |
| 7.1.2 Preverjanje istovetnosti plazmidov..... | 34 |
| 7.2 GENSKI VNOS PLAZMIDOV <i>IN VITRO</i> V CELICE | 35 |
| 7.2.1 Delež transficiranih celic | 35 |
| 7.2.1.1 Rezultati fluorescenčne mikroskopije | 35 |
| 7.2.1.2 Uspešnost transfekcije glede na vrsto celičnih linij..... | 38 |
| 7.2.2 Intenziteta fluorescence | 39 |
| 7.3 TRANSFEKCIJA KOŽE <i>IN VIVO</i> | 42 |
| 8 RAZPRAVA..... | 44 |
| 8.1 REZULTATI <i>IN VITRO</i> POSKUSOV | 44 |
| 8.1.1 Testiranje tkivne specifičnosti | 44 |
| 8.1.2 Testiranje intenzitete izražanja | 45 |
| 8.1.3 Izbira elektroporacije..... | 46 |
| 8.1.4 Uporaba različnih napetosti | 46 |
| 8.2 REZULTATI <i>IN VIVO</i> TESTIRANJA INTENZITETE IN TRAJANJA IZRAŽANJA V KOŽI MIŠI..... | 46 |
| 8.3 MOŽNOSTI NADALJNJEGA DELA | 47 |
| 9 SKLEP | 49 |
| 10 LITERATURA | 50 |

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Slika 1: Lastnosti, ki jih mora pridobiti celica, da postane rakasta | 2 |
| Slika 2: Zgradba plazmidne DNA | 5 |
| Slika 3: Shematski prikaz plasti kože | 8 |
| Slika 4: Način razmazovanja trajne kulture bakterij na trdno gojišče | 15 |
| Slika 5: Označena mesta DNA, kjer režejo encimi, ki smo jih izbrali za izvedbo restrikcije | 17 |
| Slika 6: Primer elektroforezne banjice z elektrodama in gelom..... | 19 |
| Slika 7: Prehod makromolekul v celico med elektroporacijo..... | 21 |
| Slika 8: Shema celice v električnem polju in prikaz celice po sprejemu kemoterapevtika in DNA | 22 |
| Slika 9: Princip štetja s hemocitometrom | 24 |
| Slika 10: Princip merjenja s pretočnim citometrom | 28 |
| Slika 11: Prikaz prednjega in stranskega sipanja | 28 |
| Slika 12: Primer razporeditve števila celic glede na prednje (abscisa) in stransko sipanje (ordinata) ter glede na fluorescenco | 29 |
| Slika 13: Koraki pri <i>in vivo</i> elektrotransferju v kožo miši | 32 |
| Slika 14: Uporabljene elektrode in elektroporator | 32 |
| Slika 15: Potek električnih pulzov v uporabljenih elektrodah (komunikacijska sekvenca) in mere posamezne elektrode..... | 33 |
| Slika 16: Rezultat izvedene elektroforeze | 35 |
| Slika 17: Fibroblasti L929 2 dni po elektroporaciji z napetostjo 100 V slikani pod vidno svetlobo in pod valovno dolžino, ki zazna protein dsRED | 36 |
| Slika 18: Fibroblasti L929 2 dni po elektroporaciji z napetostjo 120 V slikani pod vidno svetlobo in pod valovno dolžino, ki zazna protein dsRED | 36 |

| | |
|--|----|
| Slika 19: Endotelijske celice SVEC 2 dni po elektroporaciji z napetostjo 100 V slikane pod vidno svetlobo in pod valovno dolžino, ki zazna protein dsRED | 37 |
| Slika 20: Endotelijske celice SVEC 2 dni po elektroporaciji z napetostjo 120 V slikane pod vidno svetlobo in pod valovno dolžino, ki zazna protein dsRED | 37 |
| Slika 21: Rezultati analize s pretočnim citometrom za celično linijo L929 | 40 |
| Slika 22: Rezultati analize s pretočnim citometrom za celično linijo SVEC. | 41 |
| Slika 23: Izražanje plazmidov v urah po elektroporaciji pod vidno svetlobo (prvi stolpec) in pod invertnim fluorescenčnim mikroskopom..... | 42 |

KAZALO GRAFOV

| | |
|--|----|
| Graf 1: Prikaz deleža celic, ki so izražale protein dsRED po elektroporaciji z napetostjo 100 V | 38 |
| Graf 2: Prikaz deleža celic, ki so izražale protein dsRED po elektroporaciji z napetostjo 120 V | 39 |
| Graf 3: Prikaz količnika intenzitete izražanja proteina dsRED glede na kontrolo za posamezne skupine celic pri 100 V. | 40 |
| Graf 4: Prikaz količnika intenzitete izražanja proteina dsRED glede na kontrolo za posamezne skupine celic pri 120 V. | 41 |
| Graf 5: Prikaz intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa po vnosu izbranih plazmidov v kožo miši z elektroporacijo | 43 |

KAZALO TABEL

| | |
|--|----|
| Tabela I: Sestava tekočega LB gojišča. | 15 |
| Tabela II: Uporabljeni reagenti pri prvi kombinaciji encimov za restrikcijo (restrikcijska mešanica 1). | 18 |
| Tabela III: Uporabljeni reagenti pri drugi kombinaciji encimov za restrikcijo (restrikcijska mešanica 2). | 18 |

| | |
|---|----|
| Tabela IV: Sestava agaroznega gela..... | 20 |
| Tabela V: Prikaz sestave poskusov za celično linijo L929 oz. SVEC | 26 |

1 POVZETEK

Gensko zdravljenje se je v več študijah izkazalo za uspešno, a lahko pri terapiji pride tudi do neželenih učinkov (insercijska mutagenaza in imunogenost na vektorje vnosa). Varnost bi lahko povečali z uporabo tkivno specifičnih promotorjev, ki bi izražanje genov omejili samo na določeno tkivo. V naši raziskavi smo testirali kolagenski promotor (*COL1A2*) na tkivno specifičnost za kožo in merili njegovo aktivnost.

V *in vitro* delu raziskave smo kožno specifičnost promotorja testirali z vnosom plazmidne DNA s kolagenskim promotorjem (pCOL1A2dsRED) v fibroblaste L929 (model za kožne celice) in v endotelijske celice SVEC (model za ne-kožne celice) z elektroporacijo. Merili smo delež transfekcije in intenziteto fluorescence reporterskega proteina po genskem vnosu in iz primerjave rezultatov med obema vrstama celic sklepali na tkivno specifičnost kolagenskega promotorja. Za reporterski gen smo uporabili gen, ki kodira rdeč fluorescenten protein dsRED, kot referenčni promotor pa močan konstitutivni promotor CMV (plazmid pCMVdsRED). V fibroblastih je bil izmerjen delež transfekcije po vnosu pCOL1A2dsRED primerljiv z deležem transfekcije, ki smo ga dosegli s pCMVdsRED, medtem ko v endotelijskih celicah po vnosu pCOL1A2dsRED razlike v deležu transfekcije glede na kontrolo nismo izmerili. Specifičnost kolagenskega promotorja za fibroblaste smo *in vitro* potrdili tudi z merjenjem intenzitete fluorescence proteina dsRED v transficiranih celicah. V fibroblastih je bila po vnosu pCOL1A2dsRED intenziteta fluorescence primerljiva z intenziteto, ki smo jo izmerili po vnosu pCMVdsRED, medtem ko v endotelijskih celicah po vnosu pCOL1A2dsRED razlike glede na kontrolo nismo izmerili.

V drugem delu raziskave smo vnašali pCOL1A2dsRED *in vivo* v kožo miši. Pokazali smo, da se pCOL1A2dsRED uspešno izraža v koži, vendar z nižjo intenziteto v primerjavi s pCMVdsRED. V študiji nam ni uspelo natančno ovrednotiti trajanja izražanja pCOL1A2dsRED zaradi relativno močne avtofluorescence, ki je zakrivala signal proteina dsRED.

V raziskavi smo pokazali, da je kolagenski promotor aktiven v fibroblastih L929 in ne v endotelijskih celicah SVEC ter da je njegova aktivnost v koži miši v primerjavi s promotorjem CMV nizka.

KLJUČNE BESEDE: kolagenski promotor, *COL1A2*, tkivno specifični promotorji, gensko zdravljenje, elektroporacija.

2 ABSTRACT

Various studies have confirmed the effectiveness of gene therapy, but it can unfortunately cause adverse effects (insertional mutagenesis, immunogenicity to delivery vectors). Safety could be improved with the use of tissue-specific promoters to limit gene expression to a specific tissue. In our study a promoter for collagen (*COL1A2*) was tested for skin-specificity and efficiency.

In the *in vitro* part of our study skin-specificity of plasmid DNA containing promoter *COL1A2* (pCOL1A2dsRED) was tested by transfecting fibroblasts L929 (a model for skin cells) and endothelial cells SVEC (a model for non-skin cells) using electroporation. Percentage of transfection and intensity of fluorescence of the reporter protein were measured after gene delivery and the results were used to assess skin-specificity of promoter *COL1A2*. Red fluorescent protein dsRED was chosen as the reporter protein, and the promoter CMV was chosen as the promoter of reference (plasmid pCMVdsRED). In fibroblasts the percentage of transfection after delivery of pCOL1A2dsRED was comparable to the percentage of transfection obtained with pCMVdsRED, whereas in endothelial cells the percentage of transfection after delivery of pCOL1A2dsRED was not greater than the percentage of transfection in control cells. Additionally specificity of pCOL1A2dsRED was confirmed by measuring the intensity of fluorescence of protein dsRED after transfection. In fibroblasts the intensity of fluorescence after delivery of pCOL1A2dsRED was comparable to the intensity of fluorescence after delivery of pCMVdsRED, whereas in endothelial cells delivery of pCOL1A2dsRED resulted in no increase in intensity of fluorescence against the control cells.

In the second part of our study pCOL1A2dsRED was delivered *in vivo* to mouse skin. We have shown that pCOL1A2dsRED effectively expresses itself in mouse skin, but that the level of expression is low in comparison to pCMVdsRED. We were unable to accurately assess the duration of pCOL1A2dsRED expression due to relatively strong autofluorescence which masked the weak fluorescence of the plasmid.

Taken together we have shown that the collagen promoter is active in fibroblasts L929 and not in endothelial cells SVEC and that its activity in mouse skin is low in comparison to promoter CMV.

KEYWORDS: collagen promoter, *COL1A2*, tissue-specific promoters, gene therapy, electroporation.

3 SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|--------------|--|
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| RNA | ribonukleinska kislina |
| IL-4 | interlevkin 4 |
| TLR | Toll-like receptor; angleško: Tollu podoben receptor |
| IL-10 | interlevkin 10 |
| IL-12 | interlevkin 12 |
| TNF-alfa | dejavnik tumorske nekroze alfa |
| VEGF | žilni endotelijski rastni dejavnik |
| bFGF | bazični fibroblastni rastni dejavnik |
| KGF | keratinocitni rastni dejavnik |
| TGF | transformirajoči rastni dejavnik |
| IFN γ | interferon gama |
| IgG | imunoglobulin G |
| IgE | imunoglobulin E |
| Bax | protein |
| p53 | protein |
| HSV-TK | timidin kinaza virusa herpesa simpleksa |
| DOTMA | N-[1-(2, 3-dioleiloksi)propil]-N,N,N- trimetilamonijev klorid |
| HIV | virus humane imunske pomanjkljivosti |
| hTERT | človeška telomerazna reverzna transkriptaza |
| CMV | citomegalovirus |
| E1B | adenovirusni protein |
| CD11c | protein |
| LB | Luria-Bertani |
| miliQ | prečiščena voda z odstranjenim endotoksinom |
| Ssp1 | encim |

| | |
|----------------|---|
| Sal1 | encim |
| Mun1 (Mfe1) | encim |
| PBS | s fosfatom pufrana solna raztopina |
| FBS | fetalni goveji serum |
| ANOVA | test analize varianc |
| PCR | verižna reakcija s polimerazo |
| angl. | angleško |
| TAE | tris-acetat-EDTA |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia Coli</i> |
| rpm | revolutions per minute; angleško: obratov na minuto |
| A260/A280 | razmerje absorbcanc pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm |

4 UVOD

4.1 RAK

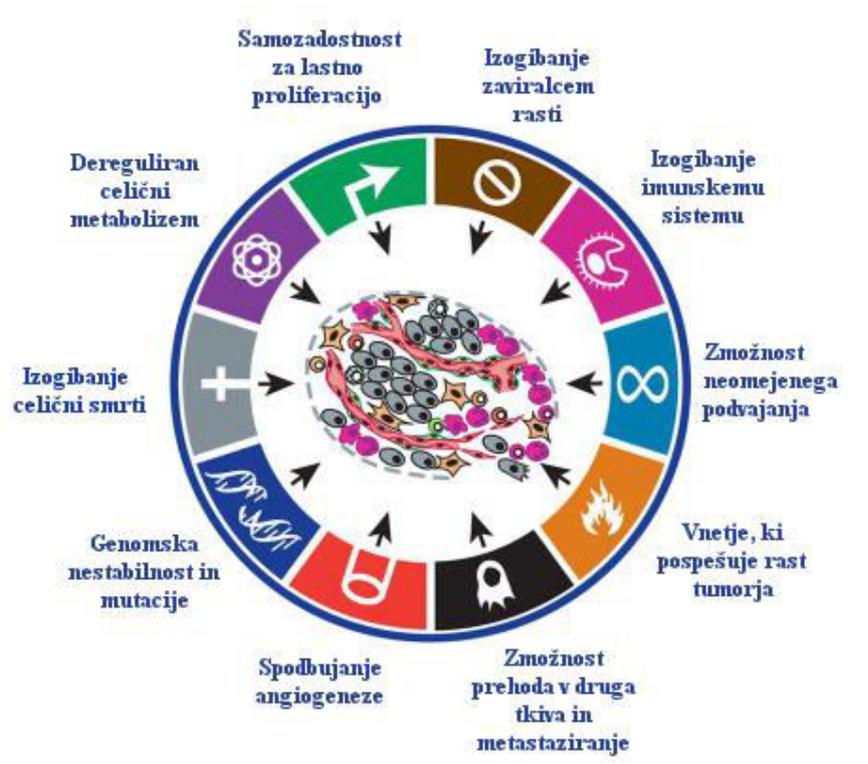
Maligne bolezni spadajo med glavne vzroke smrti v svetu in predstavljajo veliko breme tako za bolnika kot za družbo. V letu 2012 so zabeležili 14 milijonov novih primerov raka, tega leta pa je za njim umrlo 8,2 milijona ljudi [1]. Raki, zaradi katerih umre največ ljudi, so rak pljuč, rak jeter in rak želodca. Kljub temu da bolezen vsako leto bolj bremeni človeštvo, pa postaja, zaradi razvoja novih načinov zdravljenja, tudi v vedno več primerih ozdravljiva [2]. V zadnjem času je bil velik napredek dosežen na področju genskega zdravljenja. Pri tem poskušamo bolezen zdraviti z vnosom genskih konstruktov v celice. Kljub temu da se tak pristop v terapiji raka (kot drugih bolezni) redko uporablja, pa ima velik potencial. Glavna ovira t.i. genskih zdravil so nizka učinkovitost genskega vnosa ter možni neželeni učinki (insercijska mutageneza in imunogenost na vektorje vnosa). Z razvojem metod, s katerimi bi nukleinske kisline v celice vnašali na varnejši način, bi se neželenim učinkom izognili, s tem pa v boju proti raku naredili korak naprej [3].

4.1.1 Kancerogeneza

Maligne bolezni imajo izvor v spremenjenem genomu in nastanejo kot posledica poškodbe DNA, pri čemer že prisotne genske okvare vodijo do nastanka novih. Proces kancerogeneze je analogen Darwinovi evoluciji, kjer celica skozi vrsto genetskih sprememb, pridobi določene prednosti pred ostalimi, zaradi česar se bolj razmnožuje. Predpostavljamo, da se rak razvije iz ene spremenjene celice, ki z delitvijo spremenjen genom prenaša na potomke [4].

4.1.2 Osnovne lastnosti rakastih celic

Čeprav je sprememba genoma potreben pogoj za nastanek rakastih celic, pa niso vse celice s spremenjenim genomom rakaste. Celica velja za rakasto, ko je genom spremenjen tako, da se lahko nekontrolirano deli in širi v sosednja tkiva. Da se celica lahko nekontrolirano deli, mora v procesu kancerogeneze pridobiti lastnosti prikazane na *sliki 1* [5, 6].



Slika 1: Lastnosti, ki jih mora pridobiti celica, da postane rakasta. Povzeto po: [6]

4.1.3 Pristopi pri zdravljenju [5]

Zdravljenje raka je posebej težavno, ker je za ozdravitev potrebno odstraniti vse rakaste celice – do ponovitve lahko pride že zaradi samo ene preživele celice. Tradicionalne načine zdravljenja delimo na lokalne in na sistemske. Pri **lokalnih pristopih** tumor zdravimo samo na njegovem mestu, ostala tkiva pa pri tem ostanejo neprizadeta. Med te pristope spadata kirurško odstranjevanje tumorja in radioterapija. Pri **sistemskih pristopih** učinkovine potujejo po krvnem obtoku, pri čemer je udeleženo celotno telo. Med te pristope prištevamo kemoterapijo, hormonsko zdravljenje, imunomodulatorje in **tarčna zdravila**. Tarčna zdravila delujejo specifično na molekule, ki nastajajo v rakastih celicah ali pa ki nastajajo v rakastih celicah v drugačni meri. Primer tarčnega zdravila predstavlja dostavni sistem s protitelesi (npr. rituksimab-om), ki se vežejo samo na antigen izražen na določenih rakastih celicah. V zadnjem času se hitro razvija še en način tarčnega zdravljenja: gensko zdravljenje.

4.2 GENSKO ZDRAVLJENJE

Pri genskem zdravljenju uporabljamo za zdravljenje ali preprečevanje bolezni nukleinske kisline (DNA ali RNA), ki jih vnašamo v celice bolnika. Izbrana nukleinska kislina lahko

1) nosi gen za terapevtski protein, ki je v celici okvarjen ali manjkajoč (informacijska RNA, plazmidna DNA) ali pa 2) preprečuje nastanek škodljivega produkta (mala interferenčna RNA, protismiselna RNA) [7, 8]. Pri terapiji raka se poslužujemo obeh vrst nukleinskih kislin.

4.2.1 Pristopi pri raku [9]

Z vnašanjem nukleinskih kislin v celice rakavega bolnika želimo, ne glede na vrsto genskega materiala ali način vnosa, doseči isti rezultat – zmanjševanje tumorja ali popolno ozdravitev. To lahko dosežemo na naslednje načine:

- Z indukcijo apoptoze v rakastih celicah: apoptozo lahko induciramo z vnosom genov, katerih produkti celice vodijo v celično smrt. Primeri takih genov so geni za kaspaze, Bax in p53.
- Z inhibicijo angiogeneze: brez angiogeneze (nastajanja novega žilja) se čvrsti tumorji težko širijo in redko presežejo velikost 2-3 mm. Rakaste celice izločajo žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF), bazični fibroblastni rastni dejavnik (bFGF) in transformirajoči rastni dejavnik (TGF), ki povzročijo tvorbo novih žil in omogočijo rast tumorja. Pri genskem zdravljenju lahko angiogenezo inhibiramo npr. z uporabo protismiselne in kratke interferenčne RNA, s čimer utišamo VEGF.
- Z onkolitsko viroterapijo: pri tem gensko spremenimo virus tako, da napada samo tumorske celice. Zdravilo ONYX-015 je npr. adenovirus, ki so mu odstranili gen za protein E1B. Zaradi tega lahko napada samo celice brez proteina p53, kar je značilno za 80 % tumorjev.
- S samomorilskimi geni: z vnosom samomorilskih genov v celice povzročimo smrt teh celic. Primer uporabe samomorilskega gena je uporaba timidin kinaze virusa herpesa simpleksa (HSV-TK) v kombinaciji z ganciklovirjem. HSV-TK (za razliko od človeških timidin kinaz) lahko monofosfatganciklovir dovolj učinkovito fosforilizira v trifosfatganciklovir, ta pa se lahko kot lažni substrat vključuje v DNA polimerazo, zaradi česar celica propade.

- Z imunoterapijo: pri tem v celice vnašamo gene, ki proti tumorjem usmerijo imunski odziv. Primera na tem področju sta vnos genov za citokine (npr. interleukin 12) in genska cepiva. Pri genskih cepivih v celice vnašamo genski material, ki kodira za proteinski antigen, ki je značilen za raka. Tako se v transficiranih celicah *de novo* sintetizira antigen, kar sproži protitelesni in celični imunski odziv ter izzove imunost na protein. Pri konvencionalnih cepivih spremlja uporabo nekaj tveganj: 1) imunosupresivno delovanje; 2) nezadostna oslabitev, ki lahko vodi do razvoja bolezni; 3) prekomerna oslabitev, ki lahko vodi v izgubo imunogenih lastnosti - teh tveganj pri genskih cepivih ni.

Kljub vsem možnostim pa raka le redko zdravimo z gensko terapijo. Več genskih zdravil je trenutno v fazi kliničnega preizkušanja, eno pa je že prisotno na tržišču (zdravilo Gendicine® na Kitajskem). Zdravilo Gendicine® se uporablja za zdravljenje melanoma, z njim pa so zdravili že več kot 10.000 ljudi, pri čemer še niso poročali o nobenem hujšem neželenem učinku [7]. Druga genska zdravila se žal še niso izkazala za tako varna.

4.2.2 Plazmidna DNA

DNA, ki jih vnašamo v celice, pa ne vsebujejo zapisa samo za terapevtski protein (gen), ampak morajo vsebovati tudi regijo, ki sproži prepisovanje gena in regijo, ki nosi zapis za podvajanje (*Slika 2*). Delu, odgovornemu za sprožitev prepisovanja, pravimo promotor. Če želimo namnožiti zadostno količino DNA za terapijo, mora DNA vsebovati tudi del, ki nosi zapis za podvajanje. V ta namen DNA, ki vsebuje samo promotor in gen za želen produkt, rekombinantno združimo z DNA, ki vsebuje informacijo za podvajanje (klonirnim vektorjem). To naredimo tako, da obe DNA režemo z encimi endonukleazami. Endonukleaze režejo DNA na točno določenih mestih in tako ustvarijo primerna (komplementarna) mesta za združitev obeh DNA z encimom DNA ligazo [10].



Slika 2: Zgradba plazmidne DNA. Poleg promotorja, gena in dela, ki nosi zapis za podvajanje, vstavimo v plazmidno DNA pogosto tudi gen za antibiotično rezistenco. Povzeto po: [11]

Ko imamo plazmidno DNA enkrat pripravljeno, jo je potrebno namnožiti do količine, ki bo zadostovala za terapijo. To naredimo tako, da DNA v procesu transformacije vnesemo v gostiteljski organizem (npr. bakterijo *Escherichia Coli*). S tem, ko se bo gostiteljski organizem razmnoževal, se bo razmnoževala tudi plazmidna DNA [12]. Ko ocenimo, da se je namnožila dovolj, jo lahko izoliramo in uporabimo za gensko zdravljenje.

4.3 DOSTAVNI SISTEMI [13-15]

Dostavne sisteme oz. vektorje za vnos DNA lahko razdelimo na biološke in na nebiološke. Idealen vektor bi genski material dostavljal specifično samo za določeno vrsto celic, bil sposoben sprejeti tuj genski material v zadostni količini, dosegal stopnjo in čas izražanja, potrebna za zdravljenje, transficiral tako deleče se kot nedeleče se celice, genski material vnašal na točno določeno mesto na kromosomu ali obstajal kot episom v jedru in bil neimunogen ter varen. Poleg tega bi moral biti preprost za izdelavo, s čimer bi bila omogočena proizvodnja za komercialne namene [16].

4.3.1 Biološki sistemi

4.3.1.1 Virusni vektorji

Večina genskih vnosov se izvaja s pomočjo virusov. V tem primeru postopek vnašanja genskega materiala imenujemo „transdukcija“. Virusi že po naravi v celice vnašajo genski material, z manipulacijo njihovega genskega zapisa pa lahko to lastnost obrnemo nam v prid. Pred uporabo določen del virusne DNA zamenjamo z DNA, ki kodira za terapevtski protein. Naslednjič, ko bo tak virus napadel celico, bo vanjo vnesel terapevtski gen. *In vivo* uporaba virusov na žalost zaenkrat s seboj prinaša tveganja. Med temi velja izpostaviti njihovo imunogenost in insercijsko mutagenozo. Najpogosteje uporabljamo retroviruse, adenoviruse, adenoasociacijske viruse, herpesviruse in bakuloviruse. Nekateri med njimi so integrirajoči, drugi pa neintegrirajoči. Prvi (npr. retrovirusi) lahko svoj genski zapis integrirajo v človeški genom, medtem ko pri drugih (npr. adenovirusih) genski zapis ostane v jedru brez integracije v genom (njihov genski zapis se tako s časom in s celičnimi delitvami izgubi).

4.3.1.2 Bakterijski vektorji

Že v 19. stoletju so opazili, da se določeni tumorji ob streptokoknih in klostridijskih okužbah zmanjšajo. Danes poznamo dva načina uporabe bakterij kot vektorjev: 1) za tumorje specifična replikacija bakterij in 2) prenos plazmida v celico (t. i. baktofekcija). Pri prvem pristopu v bakterije, ki se razmnožujejo samo v tumorjih, vnesemo gen za terapevtski protein, ki se bo posledično izražal in izločal samo na mestu tumorja. Pri drugem pristopu (baktofekciji) pa genski zapis vnašamo v celice tako, da celotna bakterija vstopi v tarčno celico. Posebnost baktofekcije je, da lahko genski zapis dostavljamo v celice tudi kot RNA, s čimer se izognemo potrebi po dostavi genskega materiala v jedro [17].

4.3.2 Nebiološki sistemi

Če pri vnosu uporabljamo katero od ne-virusnih metod, postopku pravimo „transfekcija“. Nebiološke vektorje odlikujejo enostavnejša izdelava, lažji prenos proizvodnje v večje merilo, večja prilagodljivost glede obsega nukleinskih kislin, večja varnost in manjša imunogenost v *in vivo* pogojih. Med nebiološke sistemi za vnos DNA sodijo različni kemični nosilni sistemi in fizikalne metode za povečevanje vnosa DNA.

4.3.2.1 Nosilni sistemi

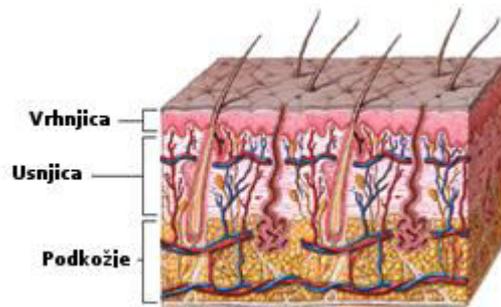
Nosilni sistemi, ki jih uporabljamo za vnos DNA so kationski lipidi, polikationski polimeri in peptidi. Skupen jim je kationski značaj, saj tako lažje sprejmejo DNA, ki je negativno nabita. Komplekse, ki nastanejo s povezavo kationskih polimerov (npr. kolagena, poli(lizina)-a, poli(etilenimin)-a, poli(propilenimin)-a, hitosana) in DNA imenujemo polipleksi. Težava pri uporabi polipleksov je njihova toksičnost za celice, ki jo poskušajo rešiti s sintezo novih, manj toksičnih polimerov. Druga možnost uporabe kemičnih nosilcev so kationski lipidi – najpogosteje liposomi. Kationski lipidi so amfifilne molekule z lipofilnim repom in s kationsko glavo. S kompleksiranjem kationskih lipidov (npr. DOTMA) in DNA nastanejo t.i. lipopleksi, ki ob stiku z celično membrano v celico vnesejo DNA. Gene lahko v celice vnašamo tudi s peptidi. Takšni peptidi morajo biti sposobni preiti tako celično kot jedrno membrano.

4.3.2.2 Metode za povečevanje vnosa DNA

Vnos DNA v celice lahko povečamo z **mikroinjiciranjem, hidroporacijo, elektroporacijo, ultrazvokom** in **biolističnim vnosom** (gensko pištolo). Pri mikroinjiciranju genski material injiciramo neposredno v celično jedro ali citoplazmo posamične celice. Druga metoda je hidroporacija, kjer v membrani povzročimo nastanek por in posledično olajšan vstop DNA v celico. Pri tem pore ostanejo odprte 10 minut. Pri ultrazvoku povzročimo nastanek por z visokofrekvenčnimi zvoki v kombinaciji z mikromehurčki. Pri genski pištoli delce zlata prekrijemo s plazmidom in jih ustrelimo v tkivo. Novejše naprave lahko delce ustrelijo tudi skozi več plasti kože. Podobno kot pri hidroporaciji ali ultrazvoku, pore nastanejo tudi pri elektroporaciji, le da se tukaj, namesto hidrodinamike ali visokofrekvenčnih valov, poslužujemo elektrike. Metoda elektroporacije je opisana v poglavju 6.3.

4.4 GENSKI VNOS V KOŽO

Koža je zaradi dostopnosti in raznolikosti celičnih vrst eden najprimernejših kandidatov za genski vnos. Sestavljajo jo vrhnjica (epidermis), usnjica (dermis), pod njo pa je podkožje (subkutis) (*Slika 3*).



Slika 3: Shematski prikaz plasti kože. Povzeto po: [18]

V vrhnjici so večinoma plasti keratinocitov, melanocitov in antigen predstavitvenih Langerhansovih celic. Keratinociti se pomikajo v smeri od bazalne plasti proti površini, pri čemer izgubljajo „celičnosti“ in končajo kot ploščata, debela in s keratinom bogata poroženela plast (stratum corneum). Pod bazalno plastjo je usnjica, ki vsebuje vezivno tkivo s fibroblasti in antigen predstavitvenimi celicami. Pod usnjico leži podkožje, ki ga sestavljata vezivno in maščobno tkivo [19]. Raznolikost celic v njihovi razvojni stopnji je pomembna pri genskem zdravljenju, ker lahko s transfekcijo različnih celic dosežemo različno izražanje plazmida. Transfekcija kratkoživih keratinocitov npr. ima lahko za posledico drugačno izražanje plazmida kot transfekcija dlje živečih fibroblastov [20].

4.4.1 Terapevtske možnosti genskega vnosa v kožo

Koža je primeren organ za vnos genov za različne terapevtske proteine, ki lahko delujejo lokalno in – zaradi velikega krvnega pretoka v usnjici – tudi sistemsko. Kot organ je zanimiva v naslednjih primerih: i) v zdravljenju lokalnih obolenj kot sta melanom in psoriza; ii) pri cepivih proti infekcijskim boleznim, kot sta HIV in malarija; iii) v zdravljenju sistemskih in metaboličnih obolenj, kot sta anemija in kronična ledvična bolezen [21]. Primer specifičnih proteinov, ki bi jih lahko uporabljali pri genskem zdravljenju, so rastni dejavniki – med drugim žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF), keratinocitni rastni dejavnik (KGF) in transformirajoči rastni dejavnik (TGF). Rastni dejavniki so kot terapevtska možnost pomembni, ker pospešijo celjenje ran in angiogenezo. Z uporabo VEGF bi npr. lahko spodbujali nastanek novih žil ter tako zdravili več ishemičnih kardiovaskularnih motenj (npr. akutni srčni infarkt, kronično srčno ishemijo, periferno arterijsko bolezen ali kap) [22]. Druga skupina pomembnih terapevtskih proteinov so citokini (npr. interleukin 12). Interleukin 12 (IL-12) aktivira tako prirojeni kot pridobljeni imunski odziv. Med drugim stimulira dejavnost citokina interferon

gama (IFN γ), ki deluje protitumorno (tudi antiangiogeno) ter spodbuja IgG/zavira IgE proizvodnjo v B celic. Zaradi tega bi ga lahko uporabljali v imunoterapiji malignega melanoma [23]. Poudariti velja še imunološke lastnosti kože in zmožnost antigen predstavitvenih celic, da izzovejo imunski odziv na antigen, zaradi česar je koža pomembna tudi pri genskih cepivih (npr. proti HIV-u ali raku) [21, 24].

4.5 DOSEGANJE CELIČNE SPECIFIČNOSTI

Ko z dostavnimi sistemi vnašamo nukleinske kisline v tkiva, se transficirajo različne vrste celic. Proteini, ki jih kodirajo nukleinske kisline, se bodo tako prevajali v različnih celicah ali celo tkivih. Pri nekaterih terapijah je takšno vsesplošno izražanje zaželeno, pri drugih pa lahko povzroči neželene učinke. Tak primer je vnos samomorilskih genov, kjer želimo učinek čimbolj omejiti samo na rakaste celice, ne da bi pri tem prizadeli normalne celice. V takšnih primerih bi bilo koristno vnos omejiti samo na določeno vrsto celic. Zaenkrat poznamo pet načinov omejevanja genskega vnosa na samo določene celice [25]:

- **Fizična dostava do tarčnega organa:** primer je vnos DNA z elektroporacijo, pri čemer plazmid injiciramo ter elektrode vstavimo v usnjico. Pri tem bodo primarno transficirane celice usnjice. Podobno se pri transfekciji s pomočjo lipidov, zaradi načina dostave (preko krvi), večinoma transficirajo endotelijske celice.
- **Spreminjanje parametrov elektroporatorja:** pri tem načinu se poslužujemo dejstva, da celice različnih velikosti, oblik in sestave, postanejo za makromolekule prepustne pri različnih napetostih. Večje celice npr. postanejo prepustne pri nižji napetosti. Če se celice v velikosti dovolj razlikujejo, lahko z elektroporacijo ciljamo samo večjo vrsto celic. Adipociti v maščobnem tkivu so npr. več kot 5 krat večji od okoliških celic, zaradi česar lahko s primerno nastavitvijo elektroporatorja ciljamo samo njih.
- **Vključevanje ligandov ali protiteles za zunajcelične receptorje, ki so močnejše izraženi pri določeni celični vrsti raka:** tak pristop uporabljamo npr. pri terapiji raka. Iz telesa pacienta najprej pridobimo limfocite T ter jim *ex vivo* vstavimo gen za protitelo, ki se veže na zunajcelične receptorje, ki so močnejše izraženi pri tumorju (npr. raku prostate).

- **Uporaba celično specifičnih zaporedij za prehod v jedro:** v času, ko se celica ne deli, je obseg znotrajceličnega transporta plazmidne DNA v jedro odvisen od zaporedja baz na plazmidu. Določena zaporedja DNA se v nekaterih celicah v jedro transportirajo bolje kot v drugih. To dejstvo lahko izkoriščamo pri genskem zdravljenju. Z vključitvijo zaporedij, ki v jedro v celicah, ki jih želimo transficirati, prehajajo bolje, lahko preferenčno delujemo nanje.
- **Uporaba celično specifičnih promotorjev:** po navadi pri genski terapiji uporabljamo močne konstitutivne promotorje (npr. citomegalovirusni promotor). Konstitutivni promotorji so aktivni v vseh celicah ne glede na tkivo, s čimer so povezani neželeni učinki. Nekateri promotorji pa so aktivni samo v določenih celicah: tako je npr. telomerazni hTERT-promotor veliko dejavnejši v tumorskih celicah [26]. Gen, ki ga uravnava tak promotor, se bo posledično bolj izražal v tumorskih celicah. Dodaten primer so tkivno specifični promotorji.

4.5.1 Tkivno specifični promotorji

Tkivno specifični promotorji sprožijo prepisovanje gena samo v določenem tkivu (npr. v koži). Na ta način lahko izražanje gena in delovanje njegovega produkta omejimo. To je prednost, ker ima lahko nek protein v enem tkivu terapevtski učinek, v drugem pa neželene učinke [27-29]. Primer teoretične uporabe je gen, ki kodira za sistemsko toksičen dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α). Njegovo toksičnost lahko omejimo tako, da uporabimo tkivno specifičen promotor za npr. kožo. Tak gen se bo potem izražal samo v koži. Primera kožno specifičnih promotorjev sta promotorja CD11c in *COLIA2*. Dosedanje študije kažejo, da je slabost tkivno specifičnih promotorjev ta, da imajo zelo majhno aktivnost pri *in vivo* vnosu. V primerjavi s konstitutivnim citomegalovirusnim promotorjem (CMV) dosegajo približno 1 % aktivnosti promotorja CMV. Kljub veliko manjši aktivnosti, pa je terapevtski učinek lahko primerljiv s promotorjem CMV [30, 31]. Razlog za to je, da so ti promotorji evkariontski in za razliko od močnih virusnih promotorjev niso tako podvrženi utišanju in inaktivaciji. Tako je z njimi mogoče dosegati, sicer šibkejše, a dlje trajajoče izražanje transgena [32]. Kožno specifične promotorje so testirali tudi za uporabo v genskih cepivih, kjer se je izkazalo, da bi jih lahko uporabljali za zdravljenje bolezni ali patogenov, ki zahtevajo celični imunski odziv in ne protitelesnega [31].

4.5.1.1 Kolagenski promotor *COL1A2*

COL1A2 gen kodira alfa 2 podenoto kolagena tipa 1. Kolagen tipa 1 je pomemben sestavni del hrustančnega, kostnega, kožnega in kitnega tkiva, kjer je odgovoren za strukturo tkiva. Pomemben je tudi v brazgotinjenju. Izražanje gena *COL1A2* je odvisno od tkiva v katerem se nahaja. Tako so v raziskavah potrdili povečano izražanje v kosteh, kitah in v koži, medtem ko je aktivnost v drugih tkivih bila nižja [33]. Njegovo transkripcijo uravnava promotor *COL1A2*. Ta promotor vsebuje v proksimalnem delu cis- in trans- delujoče elemente, ki uravnava njegovo konstitutivno, citokinsko pogojeno in tkivno specifično aktivnost [34]. Tako aktivnost promotorja *COL1A2* poveča npr. interleukin 4 (IL-4) [35]. Dodaten primer vpliva na aktivnost promotorja je bakterija *Escherichia Coli* (*E. Coli*), ki promotorjevo aktivnost poveča preko vezave na Tollu podoben receptor (TLR) 4 na fibroblastih [36]. V literaturi nismo zasledili raziskav, ki bi ovrednotile tkivno specifičnost ali aktivnost promotorja *COL1A2* po genskem vnosu v celice. Če bi se izkazalo, da je promotor *COL1A2* dovolj specifičen za kožo, bi ga potencialno lahko uporabljali v ciljni genski terapiji, za omejevanje izražanja genov samo na kožo.

5 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je ovrednotiti specifičnost promotorja *COLIA2* za kožne celice *in vitro* in *in vivo* ter izmeriti intenziteto izražanja plazmida s promotorjem *COLIA2* (pCOL1A2dsRED) v kožnih celicah.

Hipoteza 1: Promotor *COLIA2* je aktiven v fibroblastih, ne pa v endotelijskih celicah (je specifičen za kožo).

Specifični cilji:

- Izolacija plazmidov s tkivno specifičnim in konstitutivnim promotorjem (pCOL1A2dsRED in pCMVdsRED) z metodo MegaPrep® in ovrednotenje izoliranih plazmidov z encimsko restrikcijo in agarozno gelsko elektroforezo.
- Vnos izoliranih plazmidov v celični liniji L929 (fibroblasti) in SVEC (endotelijske celice) z metodo elektroporacije pri dveh različnih nastavitvah napetostih: 100 V in 120 V.
- Statistično ovrednotenje in primerjava deleža transfekcije in intenzitete izražanja proteina dsRED med plazmidoma s tkivno specifičnim in konstitutivnim promotorjem.

Hipoteza 2: Promotor *COLIA2* se *in vivo* uspešno izraža v koži.

Specifični cilji:

- *In vivo* genski vnos izoliranih plazmidov s tkivno specifičnim in konstitutivnim promotorjem v kožo miši z elektroporacijo po predhodnem intradermalnem injiciranju plazmidov.

- Slikanje miši pod fluorescenčnim mikroskopom vsak dan po genskem vnosu, dokler je opazno izražanje proteina dsRED.
- Statistično ovrednotenje in primerjava rezultatov intenzitete in trajanja izražanja proteina dsRED v koži miši med plazmidoma s tkivno specifičnim in konstitutivnim promotorjem.

6 MATERIALI IN METODE

6.1 IZOLACIJA PLAZMIDOV

Oprema:

- Bakterijska kultura *E. coli* JM107, transformirana s plazmidno DNA (pCMVdsRED/pCOL1A2dsRED)
- Trdno LB gojišče
- Mikrovalovna pečica
- 50 ml sterilne plastične falkonke
- 10 cm² sterilne petrijevke
- Antibiotik kanamicin koncentracije 50 mg/ml
- Pipete, sterilni tipsi, plastična posoda za odpad
- 1,5 ml sterilne plastične epice
- Cepilna zanka
- Plinski gorilnik
- 100 ml avtoklavirane steklene erlenmajerice
- 1 l avtoklavirane steklene erlenmajerice

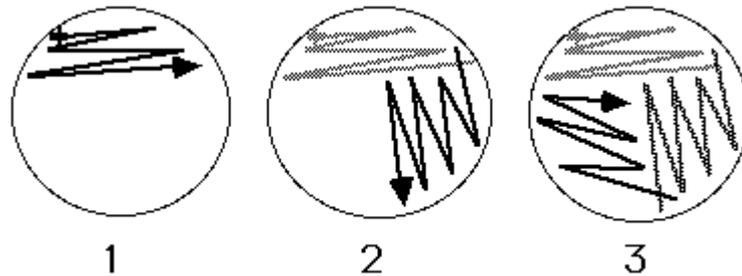
Reagenti:

- Tripton (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija)
- Ekstrakt za gojenje bakterij (*Select Yeast Extract*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija)
- NaCl
- Destilirana voda (dH₂O)
- Set za izolacijo DNA MegaPrep JetStar (Genomed GmbH, Löhne, Nemčija)

Postopek izolacije in ovrednotenja plazmida je opisan za primer pCOL1A2dsRED. Plazmid pCMVdsRED je bil predhodno izoliran po enakem postopku in ustrezno ovrednoten.

Za izvedbo poskusov smo najprej potrebovali zadostno količino plazmida. Dovolj plazmida smo dobili tako, da smo s plazmidom pCOL1A2dsRED predhodno

transformirane bakterije *E. coli* namnožili in iz njih izolirali plazmid. Najprej smo nekaj trajne kulture *E. coli* iz zamrzovalne skrinje (-80 °C) nacepili na trdno Luria-Bertani (LB) gojišče z antibiotikom kanamicin (50 mg/ml) (Slika 4) in bakterije inkubirali 16 ur na 37 °C. Z dodatkom antibiotika h gojišču smo zagotovili, da so na gojišču zrastle samo transformirane bakterije, ki vsebujejo gen za rezistenco na kanamicin. Zrasle bakterije smo uporabili za pripravo pred-inocumuma.



Slika 4: Način razmazovanja trajne kulture bakterij na trdno gojišče, ki smo ga uporabili pri gojenju bakterij. Povzeto po: [37]

Eno kolonijo bakterij zraslih na trdnem LB gojišču smo s cepilno zanko prenesli v 10 ml tekočega LB gojišča z nižjo vsebnostjo soli (angl. Low salt), ki smo mu dodali 10 µl antibiotika (kanamicin) (tako smo pripravili t.i. pred-inocumum). Kulturo smo inkubirali 8 ur na 37 °C (vodna kopel) in stresali (300 rpm). Sestava tekočega LB gojišča je podana v Tabeli I. Sterilnost gojišča smo zagotovili z naknadnim avtoklaviranjem.

Tabela I: Sestava tekočega LB gojišča.

| | |
|------------------------------|--------|
| Tripton | 10 g |
| Ekstrakt za gojenje bakterij | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| dH ₂ O | do 1 l |

500 µl kulture iz pred-inocumuma smo prenesli v 1 l novega tekočega LB gojišča (sestava enaka kot v Tabeli I), ki smo mu predhodno dodali 250 µl antibiotika kanamicin. Kulturo smo inkubirali 16 ur na 37 °C na vodni kopeli ob stresanju (300 rpm).

Po tem, ko smo namnožili dovolj bakterij smo iz njih izolirali plazmid. Za izolacijo smo uporabili metodo MegaPrep JetStar po navodilih proizvajalca. Megaprep se uporablja za izolacijo velikih količin (v miligramih) plazmidne DNA na osnovi anionske izmenjave. Metoda temelji na lizi bakterij in vezavi plazmidne DNA na kolono. Pri tem se negativno nabite fosfatne skupine v DNA vežejo na pozitivno nabite skupine na koloni. Pri zmerni ionski moči ostane DNA vezana na nosilec, medtem ko se RNA, proteini, ogljikovi hidrati in ostale nečistoče sperejo. Sledi eluiranje DNA s kolone ter obarjanje (t.j. koncentriranje) plazmida z dodatkom etanola [38].

6.2 OVREDNOTENJE PLAZMIDOV

Da bi preverili ustreznost izoliranih plazmidov smo jim izmerili absorbanco in določili razmerje absorbanc pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm (A_{260}/A_{280}). Ustreznost smo dodatno ovrednotili z restrikcijo in ločitvijo fragmentov z gelsko elektroforezo.

6.2.1 Absorbanca

Z merjenjem absorbance lahko določimo koncentracijo in čistost plazmidov. Merimo jo s spektrofotometrom. Pri tem se poslužujemo dejstva, da DNA svetlobo določene valovne dolžine absorbira v drugačni meri kot druge molekule. Iz količine absorbirane/transmitirane svetlobe lahko iz Beer-Lambertovega zakona izračunamo koncentracijo DNA v tekočini. DNA maksimalno absorbira svetlobo valovne dolžine 260 nm, zato njeno koncentracijo merimo pri tej valovni dolžini. Na drugi strani proteini maksimalno absorbirajo svetlobo valovne dolžine 280 nm, kar je razlog, da je razmerje A_{260}/A_{280} indikator za čistost DNA. Razmerje pri čistem vzorcu je okrog 1,8.

Beer-Lambertov zakon:

$A = \epsilon lc$; ϵ = molarni ekstinkcijski koeficient, l = dolžina poti žarkov, c = koncentracija

Oprema:

- Spektrofotometer (*Epoch Microplate Spectrophotometer, Take3™ Micro-Volume Plate*, BioTek, Bad Friedrichshall, Nemčija),
- Program Take3 Session® (BioTek, Bad Friedrichshall, Nemčija)
- Izolirana DNA (pCOL1A2dsRED/pCMVdsRED)

- Prečiščena voda z odstranjenim endotoksinom (miliQ)

Na ploščo za nanos vzorca smo nanесли posebej 2 μ l medija, v katerem smo plazmid raztopili (miliQ) in 2 μ l vzorca. Vrednosti absorbance smo merili s pomočjo programa Take3 Session®, ki nam poda koncentracijo DNA in razmerje A260/A280.

6.2.2 Restrikcija

Restrikcija je postopek, ki nam pomaga pri ovrednotenju izolirane DNA. Pri tem na točno določenih mestih z izbranimi encimi režemo DNA, pri čemer nastanejo fragmenti DNA različnih velikosti. Ker je velikost fragmentov za določen plazmid značilna, lahko iz velikosti fragmentov iz vzorca sklepamo na identiteto DNA. *Slika 5* prikazuje mesta restrikcij za encime, ki smo jih uporabili v naši raziskavi.



Slika 5: Označena mesta DNA, kjer režejo encimi, ki smo jih izbrali za izvedbo restrikcije. Povzeto po: [39]

Oprema:

- Spletna aplikacija Double Digest Finder (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>)
- Epice
- Pipete

Reagenti:

- Restrikcijski encimi Sal1, Ssp1, Mun1 (Mfe1) (Fermentas Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA)

Restrikcijo smo izvedli s tremi encimi (Sal1, Ssp1 in Mun1), pri čemer smo uporabili dve kombinaciji encimov:

- 1) Pri prvi kombinaciji smo v epico odpipetirali encim Ssp1, pufer Tango in plazmidno DNA ter z destilirano vodo dopolnili do želenega volumna (30 μ l). Po eni uri smo dodali še encim Sal1 in Tango. Restrikcija je potekala pri 37 °C. Uporabljeni volumni so podani v *Tabeli II*:

Tabela II: Uporabljeni reagenti pri prvi kombinaciji encimov za restrikcijo (restriksijska mešanica 1).

| | |
|----------------|---------------------------|
| Ssp1 | 1 μ l |
| Tango (prvič) | 3 μ l |
| DNA | 0,579 μ l (1 μ g) |
| dH2O | do 30 μ l |
| Sal1 | 2 μ l |
| Tango (drugič) | 4 μ l |

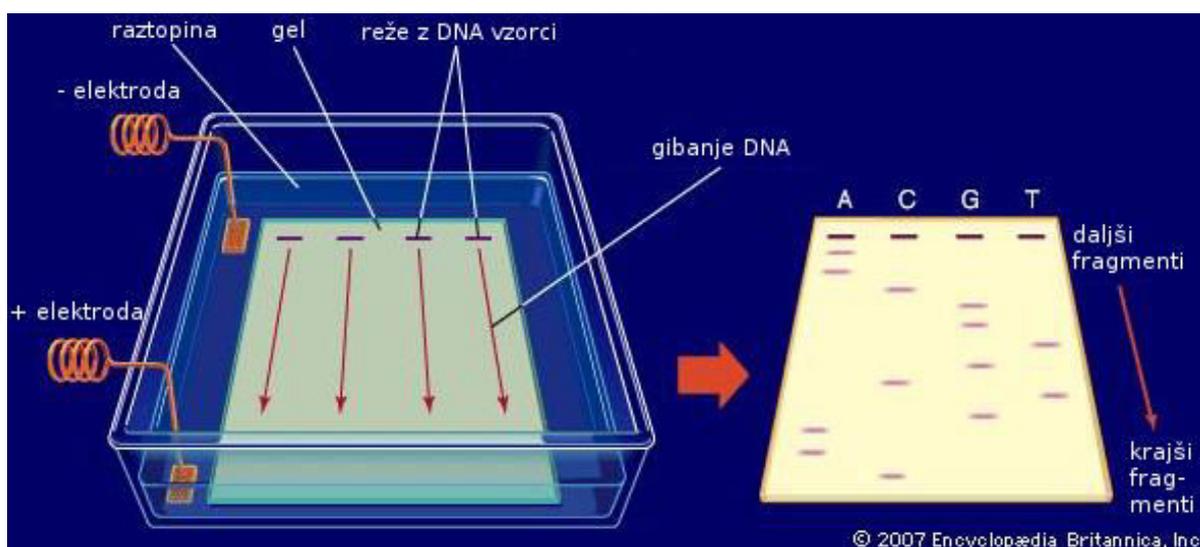
- 2) Pri drugi kombinaciji smo v epico odpipetirali encim Mun1, Tango in plazmidno DNA ter z destilirano vodo dopolnili do želenega volumna. Po eni uri smo dodali encim Sal1 in Tango. Restrikcija je potekala pri 37 °C. Uporabljeni volumni so podani v *Tabeli III*. Fragmente DNA nastale pri obeh restrikcijah smo ločili z gelsko elektroforezo.

Tabela III: Uporabljeni reagenti pri drugi kombinaciji encimov za restrikcijo (restriksijska mešanica 2).

| | |
|----------------|---------------------------|
| Mun1 | 1 μ l |
| Tango (prvič) | 3 μ l |
| DNA | 0,579 μ l (1 μ g) |
| dH2O | do 30 μ l |
| Sal1 | 2 μ l |
| Tango (drugič) | 4 μ l |

6.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je metoda, ki jo uporabljamo za ločevanje delcev v gelu. Delci se pod vplivom električnega polja gibljejo glede na njihov električni naboj, glede na uporabljen gel pa se ločujejo tudi po velikosti. DNA je negativno nabita molekula in se zato giblje iz smeri negativne elektrode proti pozitivni. Čeprav se vse molekule DNA gibljejo v isti smeri, pa se vse ne gibljejo enako hitro. Hitrost premikanja je odvisna od gela, v katerem potujejo – v primeru agarozne gelske elektroforeze se manjše molekule lažje prebijajo skozi agarozo in zato potujejo hitreje (Slika 6). Na ta način je fragmente DNA glede na velikost možno ločiti zelo natančno. Fragmentom lahko velikost določamo z uporabo standarda – označevalca velikosti, ki ga nanesejo vzporedno z vzorcem. Identiteto lis v označevalcu velikosti poznamo, iz tega pa lahko glede na hitrost potovanja sklepamo na identiteto lis iz vzorca. V agaroznih ali akrilaminskih gelih lahko DNA vizualiziramo z molekulami, ki interkalirajo z DNA - npr. z etidijevim bromidom ali s SYBR SAFE-om.



Slika 6: Primer elektroforezne banjice z elektrodama in gelom. V žepke za nanos DNA s pipeto odmerimo vzorec in skozi elektrode spustimo tok, zaradi česar se fragmenti DNA začnejo glede na dolžino proti pozitivni elektrodi gibati različno hitro. Povzeto po: [40]

Oprema:

- Tehnica
- Pipetor za pipete
- Pipete

- Mikrovalovna pečica
- Erlenmajerica
- Nosilec za gel
- Kalup za vlivanje
- Glavnik
- Banjica
- Epice
- Generator električne napetosti z ustreznimi kanali
- Komora z UV kamero (*G:BOX*, Syngene, Frederick, ZDA)

Reagenti:

- Agarozna
- 1-kratni TAE pufer
- Barvilo za obarvanje DNA (*SYBR SAFE*, Life Technologies, Carlsbad, ZDA)
- Destilirana voda
- 6-kratni nanašalni pufer
- Označevalec velikosti (*MassRuler DNA Ladder, Mix, ready-to-use*, Fermentas Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA)

Pri elektroforezi smo uporabili 1,5 % agarozni gel. Pripravili smo ga tako, da smo najprej agarozo raztopili v 1-kratnem TAE (TRIS-acetat-EDTA) pufru. Agarozna pri sobni temperaturi polimerizira, zaradi česar smo jo pred nadaljnjim delom raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici ter – ko se je ohladila do te mere, da smo erlenmajerico lahko držali z rokami – dodali barvilo za obarvanje DNA. Vsebino smo vliji v kalup in počakali, da je agarozna polimerizirala. Sestava pripravljenega agaroznega gela je podana v *Tabeli IV*:

Tabela IV: Sestava agaroznega gela.

| | |
|--------------------------|-----------|
| Agarozna | 0,75 g |
| TAE pufer | 50 ml |
| Barvilo za obarvanje DNA | 5 μ l |

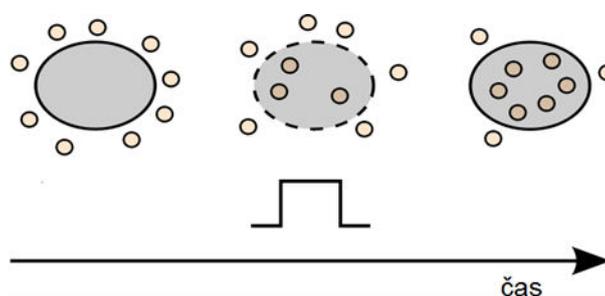
Vzorca za nanašanje smo pripravili tako, da smo v epici z restrikcijskima mešanicama dodali po 6 μ l nanašalnega pufra z dodanim barvilom. V prvi žepki v gelu smo odpipetirali 12 μ l označevalca velikosti, v preostala žepka pa vzorca iz obeh kombinacij restrikcij. Banjico smo pokrili in priključili na napetost 100 V. Pustili smo priključeno 1 uro.

Ločitev fragmentov smo preverili s slikanjem v komori z UV kamero. Dodano barvilo za obarvanje DNA (SYBR SAFE) interkalira z verigo DNA, zato lahko rezane fragmente zaznamo z UV svetlobo. Iz ujemanja velikosti fragmentov pri potovanju v gelu lahko sklepamo na istovetnost plazmida.

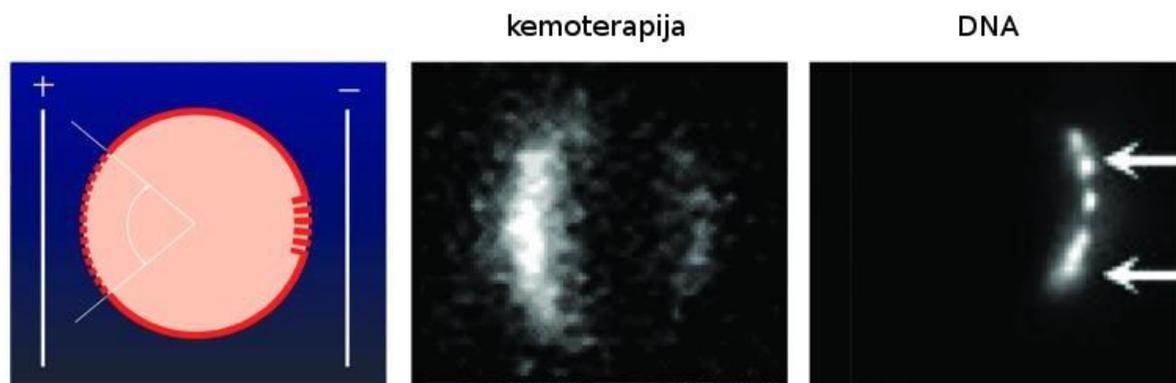
6.3 ELEKTROPORACIJA

Ko smo namnožili zadostno količino plazmidov (pCMVdsRED in pCOL1A2dsRED) ter potrdili njuno istovetnost in ustrezno čistost, smo nadaljevali z vnosom DNA v celice *in vitro* ter v kožo miši *in vivo*. Izbrana metoda za vnos DNA je bila elektroporacija.

Elektroporacija je ena izmed fizikalnih metod vnosa nukleinskih kislin v celice. Pri tem celice izpostavimo električnemu polju, zaradi česar v membranah nastanejo pore, hkrati pa se, zaradi elektroforeznega gibanja, pospeši prehajanje DNA v celice (Slika 7). Pore ostanejo odprte tako dolgo, dokler apliciramo električni tok. Tako lahko v celice vnašamo molekule, ki sicer skozi celično membrano ne bi mogle preiti. Med takšne molekule sodijo npr. kemoterapevtiki - pa tudi plazmidna DNA. Ker je DNA velika molekula, prehaja skozi membrano težje kot manjše molekule in moramo za prehod doseči večjo prepustnost membrane kot pri kemoterapevtikih (Slika 8).



Slika 7: Prehod makromolekul v celico med elektroporacijo. Zaradi aplikacije električnega toka v celični membrani nastanejo pore, ki so dovolj velike, da lahko v celice prehajajo tudi večje molekule.



Slika 8: Shema celice v električnem polju in prikaz celice po sprejemu kemoterapevtika in DNA. Levi del slike prikazuje celico v električnem polju. Ker je notranjost celice negativna, celica postane najbolj prepustna na strani, ki je bližje pozitivni elektrodi. Manjše območje prepustnosti nastane tudi na strani proti negativni elektrodi. Sredinski del slike prikazuje celico v električnem polju ob prisotnosti majhne molekule (kemoterapevtika). V desnem delu slike vidimo, da DNA kot velika molekula težje vstopa v celico. DNA kot negativno nabita molekula v celico vstopa v smeri proti pozitivni elektrodi, ki jo privlači, in v smeri v stran od negativne elektrode, ki jo odbija. Povzeto po: [20]

Pore, ki nastanejo pri elektroporaciji, so posledica vdora vodnih molekul v lipidni dvosloj, zaradi česar se lipidi v membrani reorientirajo in obrnejo proti vodnim molekulam. Električno polje visoke napetosti olajša vdor vodnih molekul v lipidni dvosloj in tako omogoči hiter nastanek velikega števila stabilnih por. Polmer nastalih por je največ nekaj nanometrov, zaradi česar jih ne moremo opazovati pod svetlobnim mikroskopom. Zaradi zahtevnega pripravljanja vzorcev in s tem povezane težavne ohranitve lipidnega dvosloja, jih ne moremo opazovati niti pod elektronskim mikroskopom. Membrana se nekaj minut po elektroporaciji zapre in ravnovesje se ponovno vzpostavi.

Elektroporacija je primerna za vnos genov v različna tkiva: najpogosteje v mišico, učinkovita pa je tudi pri vnosu v roženico, pljuča, jetra, ledvici, mehur, testise, tumorje in v kožo. Učinkovitost transfekcije je močno odvisna od tkiva [41], velja pa, da je manjša kot pri virusih [42]. Prednosti elektroporacije pred virusnimi metodami genskega vnosa so:

- 1) nizka cena in enostavnost izvedbe [43];
- 2) nizka imunogenost: pri elektroporaciji delamo z golo DNA, ki je manj imunogena kot virusi;
- 3) varnost: z vnosom gole DNA se izognemo nevarnosti mutageneze, ki je pri vnosu z virusi posebej problematična;
- 4) možnost vpliva na trajanje izražanja gena: trajanje izražanja gena lahko nadziramo, ker pride do transfekcije samo na mestu, kjer plazmid injiciramo in kjer apliciramo električni

tok. Ko transficiramo npr. mišično celico, je izražanje lahko dolgotrajno, ker se mišična vlakna redko delijo, medtem ko transfekcija kože – posebej, če so transficirani keratinociti – zaradi hitrejšega obnavljanja kože (turn-over-a) da kratkotrajnejšo transfekcijo [25]; 5) dejstvo, da nima omejitev glede velikosti gena, ki ga lahko vnesemo [44]: vnašamo lahko gene poljubnih velikosti, kar pri virusih zaradi njihove majhnosti ni mogoče

6.3.1 Elektroporacija (*in vitro*)

6.3.1.1 Priprava celic na elektroporacijo

Oprema:

- Pipete, sterilni tipsi, plastična posoda za odpad
- Celični liniji L929 in SVEC
- Laminar
- 50 ml sterilne plastične falkonke
- 1,5 ml sterilne plastične epice
- Stiroporna škatla z zdrobljenim ledom
- Hemocitometer
- Svetlobni mikroskop (*Zeiss Primo Vert*, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Nemčija)
- Centrifuga (*Thermo Heraeus Multifuge 1S-R*, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, ZDA)

Reagenti:

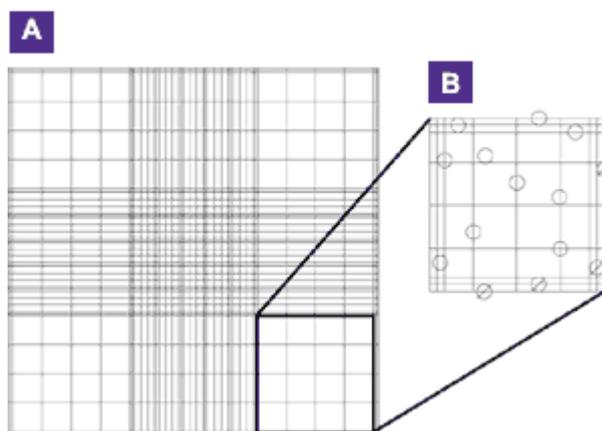
- Sterilno gojišče ADMEM (*Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Grand Island, ZDA) obogateno s 5 % fetalnega govejega seruma (FBS)
- Sterilno gojišče AMEM (*Advanced Minimum Essential Medium*, Gibco, Grand Island, ZDA) obogateno s 5 % FBS
- Sterilen 0,25 % tripsin z EDTA v Hankoven pufru
- Sterilen fosfatni pufer (PBS; *Phosphate Buffered Saline*, Merck Millipore, Darmstadt, Nemčija)
- Sterilen elektroporacijski pufer (125 mmol/l saharoze, 10 mmol/l K_2HPO_4 , 2,5 mmol KH_2PO_4 , 2 mmol/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ pri 4 °C)
- Plazmidna DNA (pCOL1A2dsRED/pCMVdsRED; 1 $\mu g/\mu l$)

- MiliQ

V *in vitro* delu naše raziskave smo plazmida pCOL1A2dsRED in pCMVdsRED vnašali v dve celični liniji: fibroblaste L929 in endotelijske celice SVEC.

Celice, ki smo jih uporabili v poskusih, smo najprej nacepili na plošče z ustreznim gojiščem (celice SVEC na gojišče ADMEM in celice L929 na gojišče AMEM). Ko so se namnožile do zadostnega števila smo iz petrijevk odstranili gojišča ter petrijevke sprali s sterilnim fosfatnim pufrom (PBS). Celice – ki ostanejo prilepljene na dnu – smo odlepili s tripsinom. Počakali smo nekaj trenutkov, tripsin nevtralizirali z za celično linijo specifičnim gojiščem (ADMEM ali AMEM) z dodanim fetalnim govejim serumom (FBS) ter vsebino petrijevk prenesli v falkonke. Preostanek celic smo sprali z dodatkom PBS. Falkonke smo centrifugirali 5 minut pri 1.500 rpm in sobni temperaturi. Supernatant smo zavrgli, peleti pa resuspendirali v hladnem (4 °C) elektroporacijskem pufru in ponovno centrifugirali 5 minut pri 1.500 rpm. Ponovno smo supernatant zavrgli, celice pa resuspendirali v 150-200 µl (za cca. 5-10 milijonov celic) hladnega elektroporacijskega pufra in jih dali na led.

Tako pripravljeni celični suspenziji smo ovrednotili s štetjem celic na hemocitometru (Slika 9). Rezultat štetja nam pove število celic v celični suspenziji v enem mililitru suspenzije (koncentracijo suspenzije). Enak postopek smo ponovili pri obeh celičnih linijah. Ovrednoteni celični suspenziji smo uporabili za pripravo elektroporacijskih suspenzij.



Slika 9: Princip štetja s hemocitometrom. Pri ovrednotenju celičnih suspenzij preštujemo celice v vseh štirih B kvadratih znotraj večjega kvadrata A ter število delimo s štiri. Če to število pomnožimo z 10.000 dobimo koncentracijo celic v 1 ml vzorca. Povzeto po: [45]

Elektroporacijsko suspenzijo sestavljajo celična suspenzija, elektroporacijski pufer (EP) in plazmid. Pripravili smo 12 elektroporacijskih suspenzij.

Najprej smo – iz s štetjem na hemocitometru pridobljenih koncentracij – izračunali volumna celičnih suspenzij, v katerih je milijon celic. K temu smo dodali toliko EP, da je skupen volumen posamezne celične suspenzije in EP v eni elektroporacijski suspenziji znašal 44 μ l. Vsebino smo hranili na ledu. Tik pred elektroporacijo smo dodali še 11 μ l glede na vrsto poskusa izbranega plazmida (CMV, *COL1A2* ali miliQ) ter vsebino dobro premešali. Skupen volumen v epici je tako znašal 55 μ l.

Izbrana plazmida smo z elektroporacijo vnašali v dve celični liniji: SVEC in L929. Celična linija SVEC (kratica za angl. Simian-virus-40-transformed endothelial cell line) so endotelijske celice, medtem ko je celična linija L929 klon fibroblastov (kožnih celic), pridobljenih iz adipoznega tkiva. Pri vsaki celični liniji smo opravili 6 poskusov:

Poskus 1: Negativna kontrola. Pri tem smo na petrijevko nanesti samo celice iz izbrane celične linije ne da bi jim dodali plazmid ali jih elektroporirali. S poskusom smo želeli ugotoviti če in kakšen fluorescenčni signal dajejo celice že same po sebi.

Poskus 2: K celicam iz izbrane celične linije smo dodali plazmid pCMVdsRED ter jih elektroporirali. Rezultat poskusa nam pove delež transfekcije in intenziteto izražanja pCMVdsRED v celični liniji.

Poskus 3: K celicam iz izbrane celične linije smo dodali plazmid pCOL1A2dsRED ter jih elektroporirali. Rezultat poskusa nam pove delež transfekcije in intenziteto izražanja pCOL1A2dsRED v celični liniji.

Poskus 4: Kontrola. K celicam iz izbrane celične linije smo dodali miliQ ter jih elektroporirali. S poskusom smo želeli ugotoviti če in v kolikšni meri sama elektroporacija brez vnosa gena za dsRED vpliva na fluorescenco celic.

Poskus 5: Kontrola. K celicam iz izbrane celične linije smo dodali plazmid pCMVdsRED ne da bi jih elektroporirali. S poskusom smo želeli ugotoviti če in v kolikšni meri sam plazmid pCMVdsRED vpliva na fluorescenco.

Poskus 6: Kontrola. K celicam iz izbrane celične linije smo dodali plazmid pCOL1A2dsRED ne da bi jih elektroporirali. S poskusom smo želeli ugotoviti če in v kolikšni meri sam plazmid pCOL1A2dsRED vpliva na fluorescenco. Sestava posameznih poskusov je ponovno podana v *Tabeli V*.

Tabela V: Prikaz sestave poskusov za celično linijo L929 oz. SVEC.

| L929/SVEC | Plazmid 1 (pCMVdsRED) | Plazmid 2 (pCOL1A2dsRED) | miliQ | Elektroporacija |
|------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------|-----------------|
| 1. poskus – kontrola 1 | - | - | - | - |
| 2. poskus | DA | - | - | DA |
| 3. poskus | - | DA | | DA |
| 4. poskus – kontrola 2 | - | - | DA | DA |
| 5. poskus – kontrola 3 | DA | - | - | - |
| 6. poskus – kontrola 4 | - | DA | - | - |

Pri poskusih, pri katerih smo elektroporacijsko suspenzijo elektroporirali, smo opravili 3 elektroporacije na petrijevko, vsakič s po 50 µl elektroporacijske suspenzije (milijon celic). Pri poskusih, pri katerih elektroporacijske suspenzije nismo elektroporirali, pa smo na petrijevke nanegli enkrat 50 µl suspenzije.

6.3.1.2 Elektroporacija

Oprema:

- Pipete, sterilni tipsi, plastična posoda za odpad
- Laminar
- 6 cm² petrijevke
- Elektroporator (Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija)

- Elektrode (razdalja med elektrodama 2 mm)
- 70 % alkohol
- Sterilne gaze
- Invertni fluorescenčni mikroskop (*Olympus IX-70*, Olympus, Hamburg, Nemčija)
- Program cellSens (Olympus, Hamburg, Nemčija)

Reagenti:

- Sterilen fetalni goveji serum (FBS; *Fetal Bovine Serum*, Gibco, Grand Island, ZDA)
- Sterilno gojišče ADMEM (*Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Grand Island, ZDA) obogateno s 5 % FBS
- Sterilno gojišče AMEM (*Advanced Minimum Essential Medium*, Gibco, Grand Island, ZDA) obogateno s 5 % FBS

Elektroporirali smo pri naslednjih nastavitvah:

- Napetost: 100 V/120 V
- Število pulziranj: 8
- Trajanje pulza: 5000 μ s
- Pavza: 199 (5 Hz)

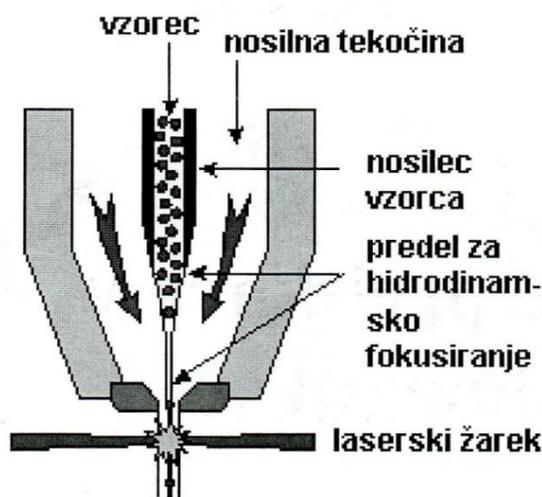
Poskuse smo izvedli pri dveh različnih napetostih (100 V in 120 V), s čimer smo želeli določiti optimalno napetost, pri kateri se transficira največji delež celic ob hkratnem čim večjem preživetju.

Elektroporirali smo tako, da smo po 50 μ l elektroporacijske suspenzije odpipetirali med vzporedni ploščati elektrodi iz nerjavečega jekla z vmesno razdaljo 2 mm ter spustili tok. Uporabili smo 8 pravokotnih pulzov z napetostjo 100 V/120 V na poracijo (600 V/cm). Suspenzijo smo po elektroporiranju stresli v petrijevko in ji dodali 100 μ l FBS. 5 min po elektroporaciji smo dodali še 5 ml primerne gojišča (AMEM ali ADMEM) ter petrijevko dali v inkubator (37 °C) za 48 ur. Med elektroporacijami smo elektrodi čistili z alkoholom.

Uspešnost transfekcije in intenziteto izražanja proteina dsRED smo opazovali pod invertnim fluorescentnim mikroskopom 48 ur po elektroporaciji in ju kvantificirali s pretočno citometrijo.

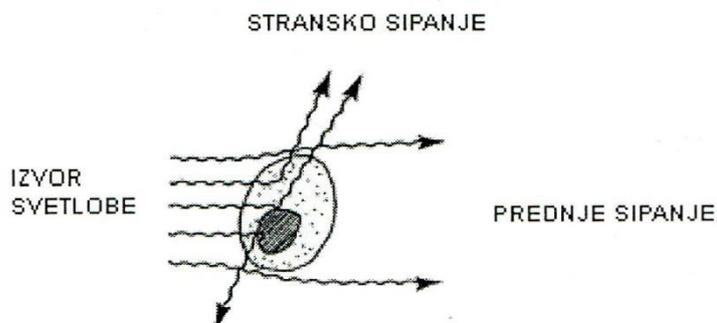
6.3.1.3 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je metoda za merjenje lastnosti celic, ko se le-te gibljejo v toku. Celice (ki jih predhodno suspendiramo v določenem mediju) posamično potujejo skozi izvor laserske svetlobe pri čemer se svetloba glede na lastnosti celic značilno odbija in dvema fotodetektorjema omogoči opredelitev lastnosti celic (*Slika 10*).



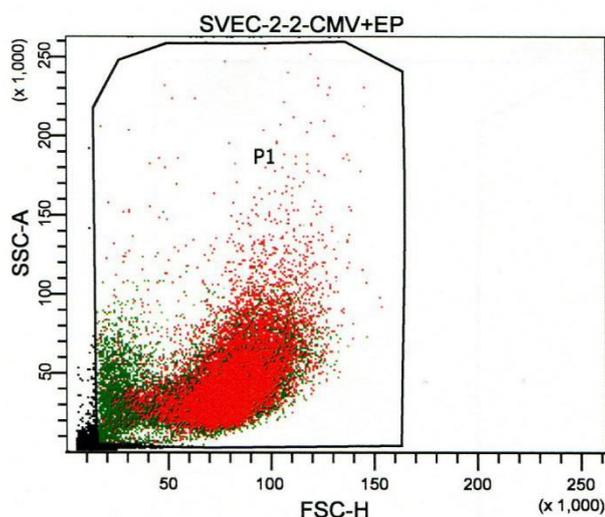
Slika 10: Princip merjenja s pretočnim citometrom. Merimo lahko lastnosti vsake celice posebej, kar nam omogoča razlika v hitrostih med injektiranim vzorcem in nosilno tekočino. Povzeto po: [46]

Ločimo dve vrsti sipanja svetlobe: prvo je t.i. »prednje sipanje«, drugo pa t.i. »stransko sipanje« (*Slika 11*). Prednje sipanje je posledica odboja svetlobe od celične membrane in opisuje velikost celice – večja kot je celica večje je sipanje. Stransko sipanje je posledica odboja svetlobe od organelov znotraj celice in opisuje granuliranost celic – več kot je membranskih struktur, večje je stransko sipanje. Celice lahko ločujemo glede na velikost, granuliranost in izražanje biomarkerja.



Slika 11: Prikaz prednjega in stranskega sipanja. Povzeto po: [46]

Pretočni citometri so lahko opremljeni s fluorescenčnimi detektorji, ki omogočajo merjenje reflektirane svetlobe, ki ima večjo valovno dolžino kot laserska svetloba. Na antigene na posameznih podvrstah celic lahko tako vežemo npr. protitelesa, ki so označena s fluorokromi in jih ločimo od celic, ki tega antigena nimajo. Podobno lahko glede na fluorescenco ločimo celice, ki so pri genskem vnosu sprejele genski material od tistih, ki ga niso (Slika 12). To dosežemo tako, da v genski zapis dodamo gen za fluorescenten protein (npr. dsRED), ki se v transformiranih celicah izraža, v ostalih pa ne.



Slika 12: Primer razporeditve števila celic glede na prednje (abscisa) in stransko sipanje (ordinata) ter glede na fluorescenco. Vsaka pika predstavlja eno celico. Z rdečo barvo so označene celice, ki v tem primeru izražajo fluorescentni protein dsRED.

Oprema:

- Pipete, sterilni tipsi, plastična posoda za odpad
- Laminar
- 15 ml sterilne plastične falkonke
- 5 ml sterilne steklene epruvete
- Invertni fluorescenčni mikroskop (*Olympus IX-70*, Hamburg, Nemčija)
- Centrifuga
- Pretočni citometer (*FACSCanto II*, BD Biosciences, San Jose, ZDA)
- Program BD FACS DivaV6.1.2 (BD Biosciences, San Jose, ZDA)
- Program cellSens (Olympus, Hamburg, Nemčija)

Reagenti:

- Sterilno gojišče ADMEM (*Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Grand Island, ZDA)
- Sterilno gojišče AMEM (*Advanced Minimum Essential Medium*, Gibco, Grand Island, ZDA)
- Sterilen tripsin
- Sterilen fosfatni pufer (PBS; *Phosphate Buffered Saline*, Merck Millipore, Darmstadt, Nemčija)

Za merjenje s pretočnim citometrom smo morali pripraviti suspenzije celic v PBS. V ta namen smo iz petrijevk s celicami odstranili gojišča ter petrijevke sprali s PBS. Nato smo v petrijevke dodali tripsin, ga po nekaj trenutkih nevtralizirali s primernim gojiščem (AMEM ali ADMEM) in vsebino prenesli v male falkonke. Preostanek celic smo sprali s PBS. Falkonke smo centrifugirali 5 minut pri 1.500 rmp in sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo supernatant odstranili, peleto pa resuspendirali v 5 ml PBS ter ponovno centrifugirali. Ponovno smo supernatant odstranili, peleto pa tokrat resuspendirali v 200 μ l PBS. Tako pripravljene celične suspenzije smo prenesli v steklene epruvete in jih prekrili z alufolijo.

Za merjenje na pretočnem citometru smo uporabili PE-A filter. PE ali R-Fitocoeritrin je indikator, s katerim lahko merimo fluorescenco. Pridobiva se iz rdečih alg. Pri merjenju smo zajeli 20.000 celic ter glede na prednje in stransko sipanje opredelili populacijo mrtvih in živih celic in iz meritev izločili mrtve celice. Določiti smo morali tudi raven fluorescence (kontrolno mejo), pri kateri za celice predpostavljamo, da so transficirane. To smo naredili tako, da smo s pretočnim citometrom izmerili fluorescenco celic iz kontrole in mejo postavili tja, kjer bi fluoresciralo maksimalno 5 % celic iz populacije kontrole.

S programom BD FACS DivaV6.1.2 smo pridobili rezultate o deležu transficiranih celic in mediani intenzitete izražanja proteina dsRED. Rezultatom za delež transficiranih celic smo odšteli vrednosti iz kontrole (5 %), mediano intenzitete izražanja dsRED pa podajamo kot razmerje meritev vzorca in kontrole. Rezultate smo statistično ovrednotili s testom ANOVA.

6.3.2 Elektroporacija (*in vivo*)

Oprema:

- Elektroporator (*Cliniporator*, IGEA S.r.l., Carpi, Italija)
- Aparat za anestezijo
- Elektrode (Istra Medical, Podnart, Slovenija)
- 5 Balb/c miši (Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija) – samice starosti 12 tednov ter obrite in depilirane na mestih za elektroporacijo
- Injekcijske igle Myjector®, U-100 insulin (Terumo Medical Corporation, Tokio, Japonska)
- Mikroskop (*Zeiss Lumar.V12*, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Nemčija)
- Program AxioVision (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Nemčija)
- Program SigmaPlot - različica 12 (Systat Software Inc.®, London, Velika Britanija)

Reagenti:

- Izofluran (Nicholas Piramal India LTD, London, Velika Britanija)
- Kisik
- Plazmidna DNA (pCOL1A2dsRED/pCMVdsRED; 2 µg/µl)

In vivo smo plazmida pCOL1A2dsRED in pCMVdsRED testirali z vnosom v kožo miši s pomočjo elektroporacije. Za izvedbo poskusov na miših smo se odločili, ker so miši sesalska vrsta in lahko rezultate v veliki meri prenesemo na človeka.

Delo s poskusnimi mišmi je izvedel izvajalec poskusov na živalih. Poskusi so bili izvedeni v skladu z dovoljenjem za izvajanje poskusov na živalih št. 34401-4/2012/4 Ministrstva za kmetijstvo in okolje Republike Slovenije. Prostor, kjer smo hranili miši, je imel stalno temperaturo 21 °C, vlažnost 55 % in nadzorovan dnevno-nočni cikel (12/12 ur). Živali so bile pred izvedbo poskusov 10 dni v karanteni.

Nastavitve na elektroporatorju:

- Število pulzov: 24
- Napetost: 570 V

- Trajanje pulza: 100 μ s

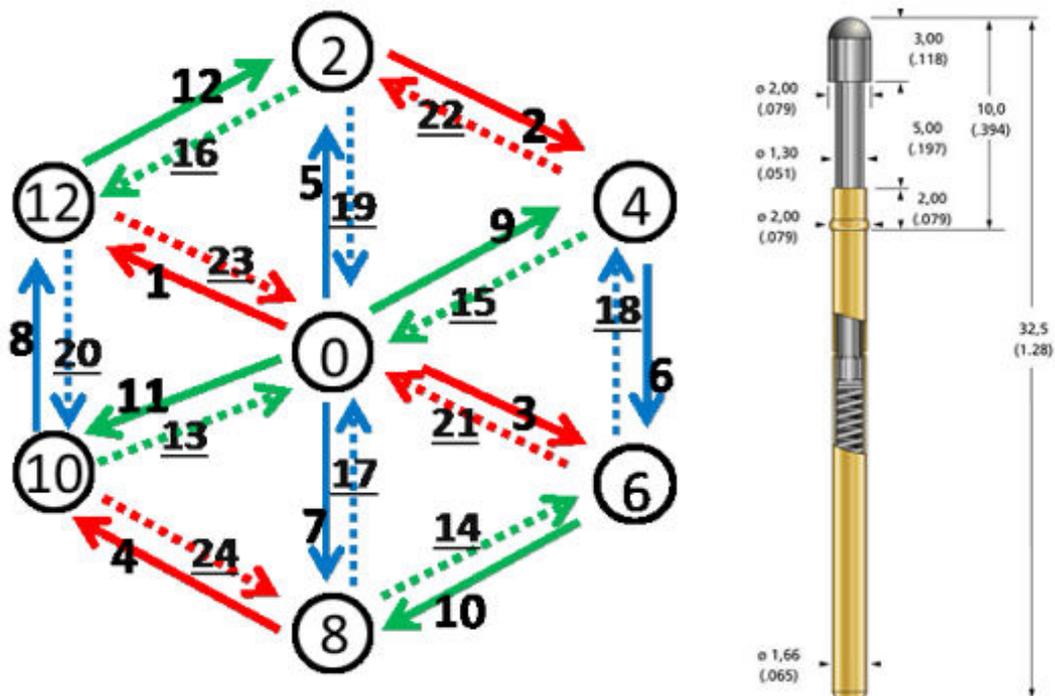
En dan pred poskusom smo miši obrili in depilirali. Miši smo najprej uspavali z mešanico 2 % izoflurana v kisiku in jim označili tretirana mesta. Z injekcijsko iglo smo jim intradermalno injicirali 50 μ l suspenzije izoliranega plazmida (pCMVdsRED ali pCOL1A2dsRED), nastavili elektrode in spustili tok (*Slika 13*). Uporabili smo napetost 570 V dolžine 100 μ s. S takšnimi nastavitvami so raziskovalci v prejšnjih poskusih dosegli učinkovit vnos DNA, ki hkrati ne povzroča poškodb. Uporabili smo 7 ne-invazivnih igličnih elektrod razporejenih v krogu z eno na sredini (*Slika 14*). Upornost posamezne elektrode je 20 m Ω , maksimalen tok, ki ga lahko prenašajo pa 4 A. Elektroda naenkrat omogoči širjenje 24 različnih pulzov (po 2 pulza med vsakim pinom) (*Slika 15*).



Slika 13: Koraki pri *in vivo* elektrotransferju v kožo miši. Najprej smo miši anestezirali, na koži označili mesta injiciranja, plazmid injicirali, nastavili elektrode ter spustili električni tok.



Slika 14: Uporabljene elektrode in elektroperator.



Slika 15: Potek električnih pulzov v uporabljenih elektrodah (komunikacijska sekvenca) in mere posamezne elektrode (desno). Skupno je omogočeno hkratno širjenje 24 različnih pulzov (po 2 med vsakim pinom).

Čas izražanja proteina dsRED smo merili z vsakodnevnim opazovanjem miši pod fluorescenčnim mikroskopom, dokler se protein ni nehal izražati. Intenziteto izražanja dsRED smo merili tako, da smo miši vsak dan slikali pod fluorescenčnim mikroskopom ter intenziteto iz slik izmerili s programom AxioVision. Podatke smo statistično ovrednotili s testom ANOVA ($p=0,05$).

7 REZULTATI

7.1 PREVERJANJE ČISTOSTI IN SPECIFIČNOSTI PLAZMIDOV

7.1.1 Določanje čistosti in koncentracije plazmidov

Čistost in koncentracijo izoliranih plazmidov smo določili z merjenjem s spektrofotometrom. Razmerje A260/A280 (merilo za čistost vzorca) je bilo v primeru obeh plazmidov (pCOL1A2dsRED in pCMVdsRED) približno 1,8 in s tem ustrezno. Koncentracija izoliranih plazmidov je bila po redčenju 1 µg/µl oz. 2 µg/µl odvisno od vrste poskusa, za katerega smo ju izolirali.

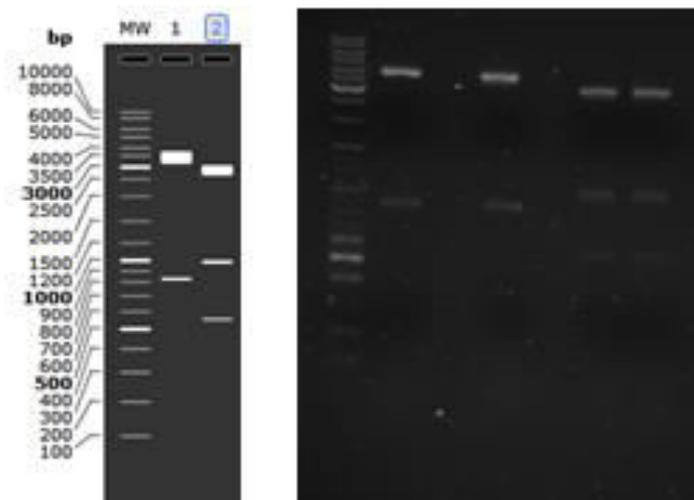
7.1.2 Preverjanje istovetnosti plazmidov

Podani so rezultati za plazmid pCOL1A2dsRED. Plazmid pCMVdsRED je bil z restrikcijo in agarozno gelsko elektroforezo predhodno potrjen na Onkološkem inštitutu.

Istovetnost določenega plazmida pri agarozni gelski elektroforezi potrdimo, če pri restrikciji nastanejo fragmenti ustreznih velikosti. Zato smo najprej iz znanega zaporedja plazmida pCOL1A2dsRED določili pričakovano velikost fragmentov, ki nastanejo po restrikciji z izbranimi encimi. Ugotovljene velikosti so bile:

- za kombinacijo encimov Ssp1 in Sal1: 3500 bp in 900 bp
- za kombinacijo encimov Mun1 in Sal1: 3000 bp, 1000 bp in 500 bp

Z agarozno gelsko elektroforezo smo potrdili, da so velikosti fragmentov nastalih po restrikciji izoliranega plazmida enake velikostim fragmentov značilnih za plazmid pCOL1A2dsRED (t.j. izolirani plazmid je res plazmid pCOL1A2dsRED) (*Slika 16*).



Slika 16: Rezultat izvedene elektroforeze. Leva slika prikazuje računalniško simulacijo, medtem ko je na desni rezultat izvedene elektroforeze. Kolona označena z MW je označevalec velikosti. Druga kolona je simulacija nanosa izoliranega plazmida rezanega z encima Ssp1 in Sal1, tretja kolona pa simulacija nanosa izoliranega plazmida rezanega z encimoma Mun1 in Sal1. Iz primerjave je razvidno, da je izoliran plazmid res plazmid pCOL1A2dsRED.

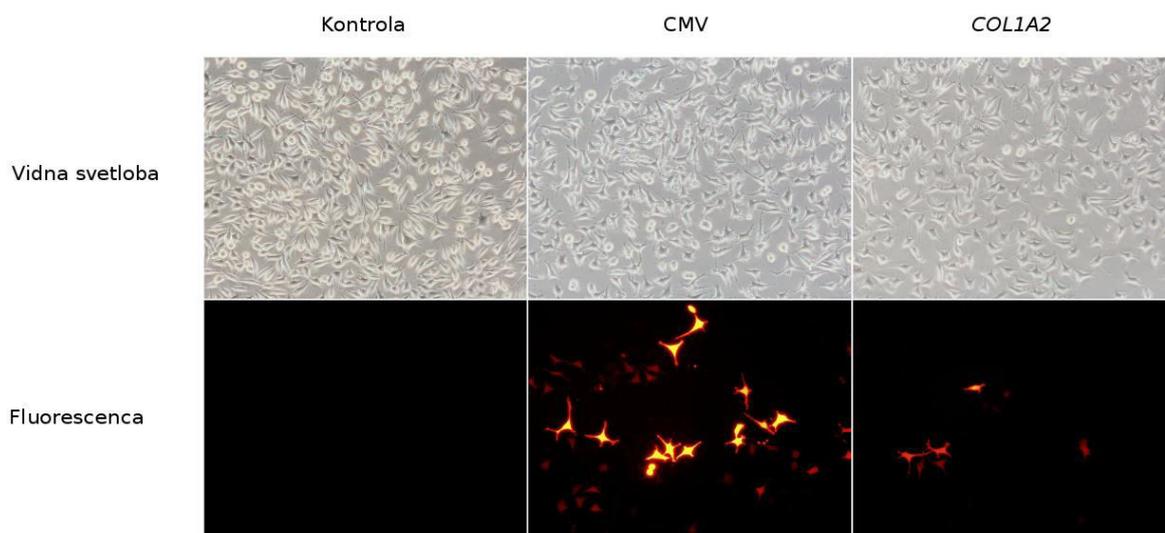
7.2 GENSKI VNOS PLAZMIDOV *IN VITRO* V CELICE

Po izolaciji in ovrednotenju plazmidov, ki vsebujeta promotor CMV oz. promotor *COL1A2*, smo uspešnost transfekcije in intenziteto njunega izražanja merili z genskim vnosom vsakič v dve celični liniji: fibroblaste L929 in endotelijske celice SVEC. Poskuse smo opravili pri dveh različnih napetostih: 100 V in 120 V.

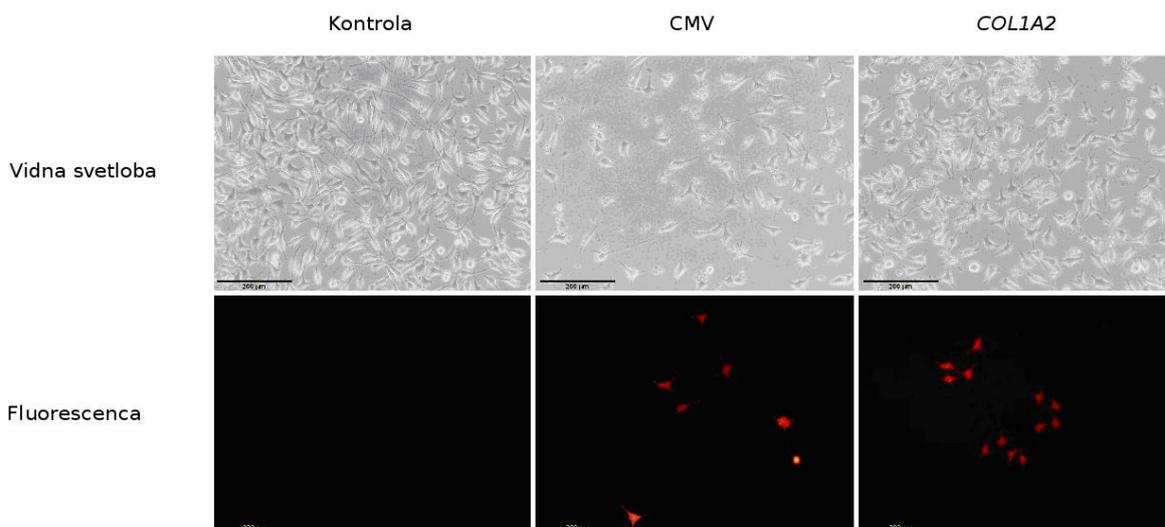
7.2.1 Delež transficiranih celic

7.2.1.1 Rezultati fluorescenčne mikroskopije

2 dni po elektroporaciji smo celice najprej ovrednotili s fluorescenčno mikroskopijo. Rezultati so pri obeh uporabljenih napetostih (100 V in 120 V) podobni. Pri celični liniji L929 (fibroblasti) je največ celic fluoresciralo po transfekciji s plazmidom pCMVdsRED, manj fluorescirajočih celic je bilo po transfekciji s plazmidom pCOL1A2dsRED, pri kontrolah pa fluorescence nismo zaznali (*Slika 16, Slika 17*).



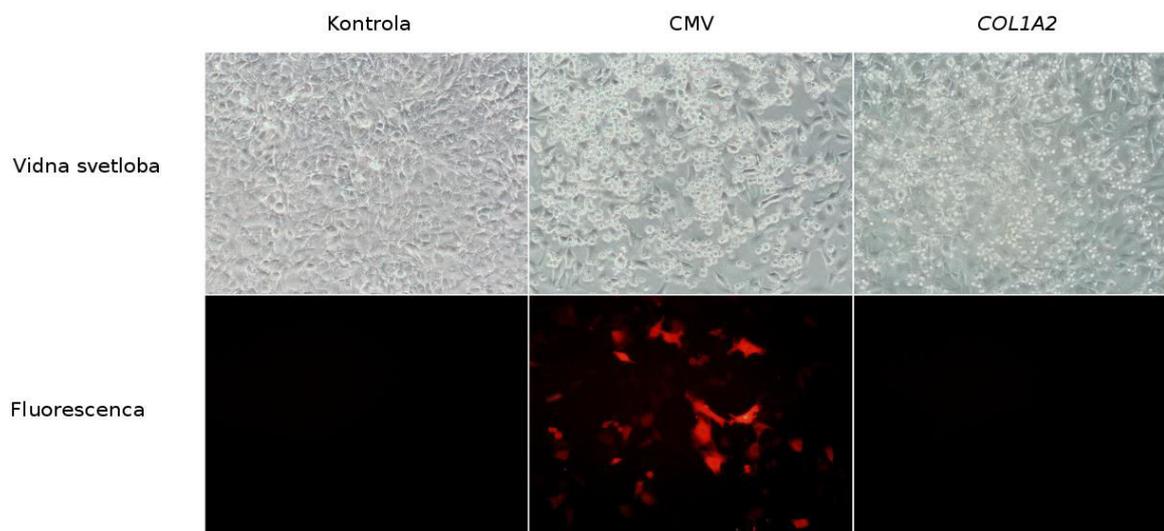
Slika 17: Fibroblasti L929 2 dni po elektroporaciji z napetostjo 100 V slikani pod vidno svetlobo in pod valovno dolžino, ki zazna protein dsRED. Ekspozicija: 1000 ms; povečava: 10-krat. Pri kontroli fluorescirajočih celic nismo zaznali; pri celicah transficiranih s plazmidom pCMVdsRED je fluoresciralo največ celic; pri celicah transficiranih s plazmidom pCOL1A2dsRED je fluoresciralo določen delež celic.



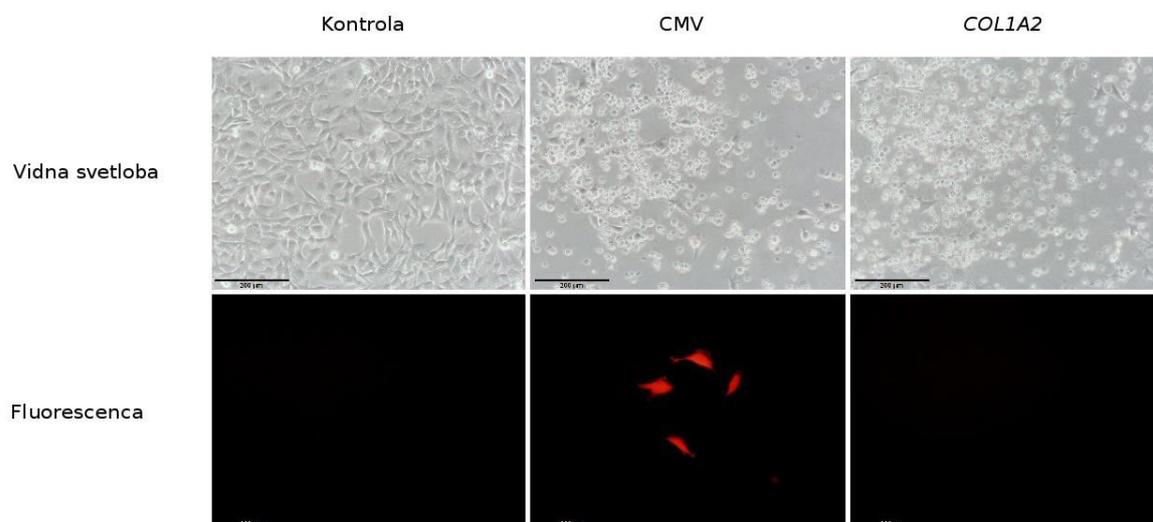
Slika 18: Fibroblasti L929 2 dni po elektroporaciji z napetostjo 120 V slikani pod vidno svetlobo in pod valovno dolžino, ki zazna protein dsRED. Ekspozicija pri kontroli in COL1A2: 1000 ms; ekspozicija pri CMV: 150 ms; povečava: 10-krat. Pri kontroli fluorescirajočih celic nismo zaznali; pri celicah transficiranih s plazmidom pCMVdsRED je fluoresciralo največ celic; pri celicah transficiranih s plazmidom pCOL1A2dsRED je fluoresciralo določen delež celic. POZOR: celice transficirane s pCMVdsRED smo v tem primeru zaradi velike intenzitete fluorescence slikali pod ekspozicijo 150 ms.

Drugačne rezultate smo dobili za celično linijo SVEC (endotelijske celice). Pri tej je še vedno veliko celic fluoresciralo po transfekciji s plazmidom pCMVdsRED, a za razliko od fibroblastov pri endotelijskih celicah po transfekciji s plazmidom pCOL1A2dsRED

fluorescence nismo zaznali. Negativne so bile tudi kontrole (*Slika 18, Slika 19*). Pomembna razlika med uporabljenima napetostima je v preživetju celic pri obeh celičnih linijah. Pri elektroporaciji z napetostjo 100 V je elektroporacijo preživelo več celic kot pri elektroporaciji z napetostjo 120 V.



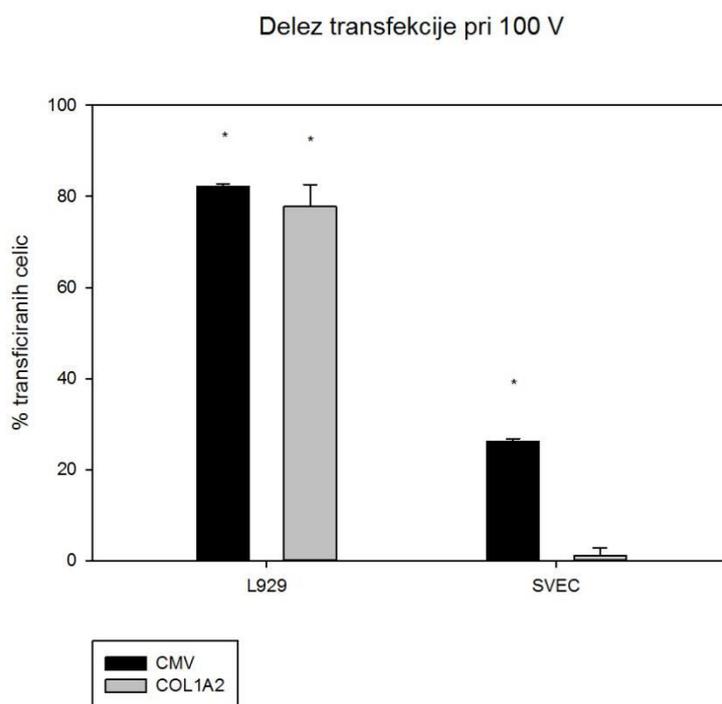
Slika 19: Endotelijske celice SVEC 2 dni po elektroporaciji z napetostjo 100 V slikane pod vidno svetlobo in pod valovno dolžino, ki zazna protein dsRED. Ekspozicija: 1000 ms; povečava: 10-krat. Pri kontroli in pri skupini celic transficiranih s plazmidom pCOL1A2dsRED fluorescirajočih celic nismo zaznali; pri skupini celic transficiranih s plazmidom pCMVdsRED je fluoresciral določen delež celic.



Slika 20: Endotelijske celice SVEC 2 dni po elektroporaciji z napetostjo 120 V slikane pod vidno svetlobo in pod valovno dolžino, ki zazna protein dsRED. Ekspozicija: 1000 ms; povečava: 10-krat. Pri kontroli in pri skupini celic transficiranih s plazmidom pCOL1A2dsRED fluorescirajočih celic nismo zaznali; pri skupini celic transficiranih s plazmidom pCMVdsRED je fluoresciral določen delež celic.

7.2.1.2 Uspešnost transfekcije glede na vrsto celičnih linij

Rezultate pridobljene s fluorescenčno mikroskopijo smo potrdili in kvantificirali s pretočno citometrijo. Po elektroporaciji z napetostjo 100 V smo pri celični liniji L929 tako po transfekciji s plazmidom pCMVdsRED kot s plazmidom pCOL1A2dsRED izmerili enak delež fluorescirajočih celic (~80 %). Drugačni so bili rezultati za celično linijo SVEC. Pri tej smo po transfekciji s plazmidom pCMVdsRED še vedno izmerili visok delež celic, ki so fluorescirale ($26,1 \pm 0,7$ %), po transfekciji s plazmidom pCOL1A2dsRED pa fluorescence nismo izmerili (*Graf 1*).

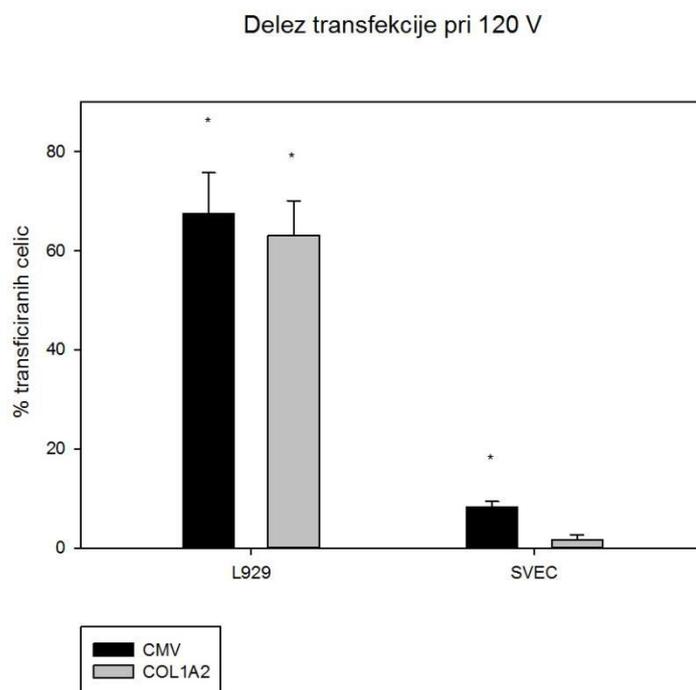


Graf 1: Prikaz deleža celic, ki so izražale protein dsRED po elektroporaciji z napetostjo 100 V.

Promotor *COL1A2* je aktiven samo v fibroblastih, medtem ko smo aktivnost promotorja CMV izmerili tudi pri endotelijskih celicah. * statistično pomembna razlika glede na kontrolo netretiranih celic. n=3 ponovitve za posamezno celično linijo.

Druga nastavitev napetosti pri kateri smo v izbrani celični liniji vnašali plazmida, je bila 120 V. Tudi pri tej napetosti smo pri celični liniji L929 izmerili relativno visok delež fluorescirajočih celic (~65 %) tako po elektroporaciji s plazmidom pCOL1A2dsRED kot s plazmidom pCMVdsRED. Pri celični liniji SVEC smo značilno večji delež transfekcije izmerili samo po transfekciji s plazmidom pCMVdsRED. Po genskem vnosu plazmida

pCOL1A2dsRED v celice SVEC povečanega deleža transfekcije glede na kontrolo nismo izmerili (*Graf 2*).



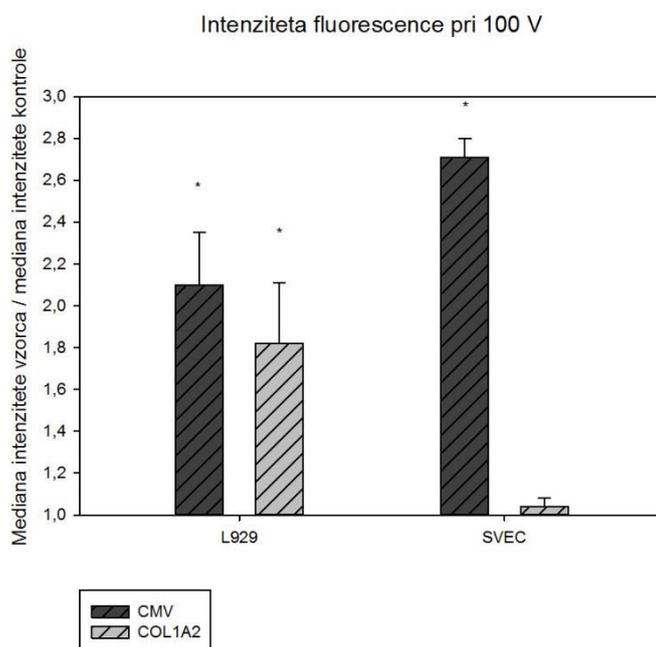
Graf 2: Prikaz deleža celic, ki so izražale protein dsRED po elektroporaciji z napetostjo 120 V.

Promotor *COL1A2* je aktiven samo v fibroblastih, medtem ko smo aktivnost promotorja CMV izmerili tudi pri endotelijskih celicah. * statistično pomembna razlika glede na kontrolo netretiranih celic. n=3 ponovitve za posamezno celično linijo.

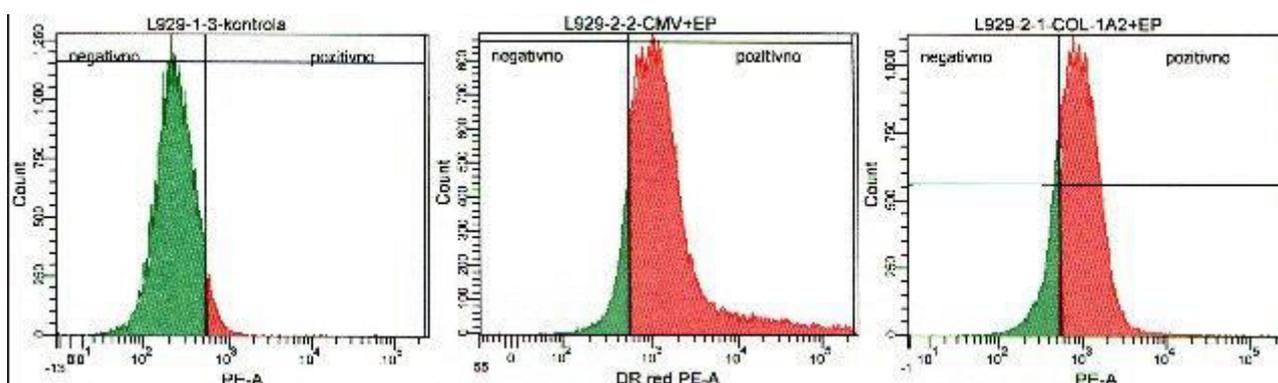
7.2.2 Intenziteta fluorescence

Poleg deleža transfekcije smo s pretočnim citometrom merili tudi mediano intenzitete izražanja proteina dsRED. Rezultate meritev smo delili z mediano intenzitete fluorescence pri kontroli, da smo dobili podatek o povečanju fluorescence pri posamezni meritvi. Najprej podajamo rezultate pri napetosti 100 V, ki so prikazani na *Grafu 3* in podani v *Tabeli VIII*. Pri celični liniji L929 sta tako plazmid pCMVdsRED kot plazmid pCOL1A2dsRED značilno povečala mediano intenzitete izražanja proteina dsRED (t.j. mediano fluorescence). Mediana je bila pod pCMVdsRED $2,10 \pm 0,25$ krat večja kot pri kontroli, pod pCOL1A2dsRED pa $1,82 \pm 0,29$ krat večja kot pri kontroli. Drugačni so rezultati za celično linijo SVEC. Pri tej smo po transfekciji s plazmidom pCMVdsRED še vedno izmerili značilno povečanje mediane intenzitete fluorescence ($2,71 \pm 0,09$ krat), po transfekciji s plazmidom pCOL1A2dsRED pa značilnega povečanja nismo izmerili. *Slika*

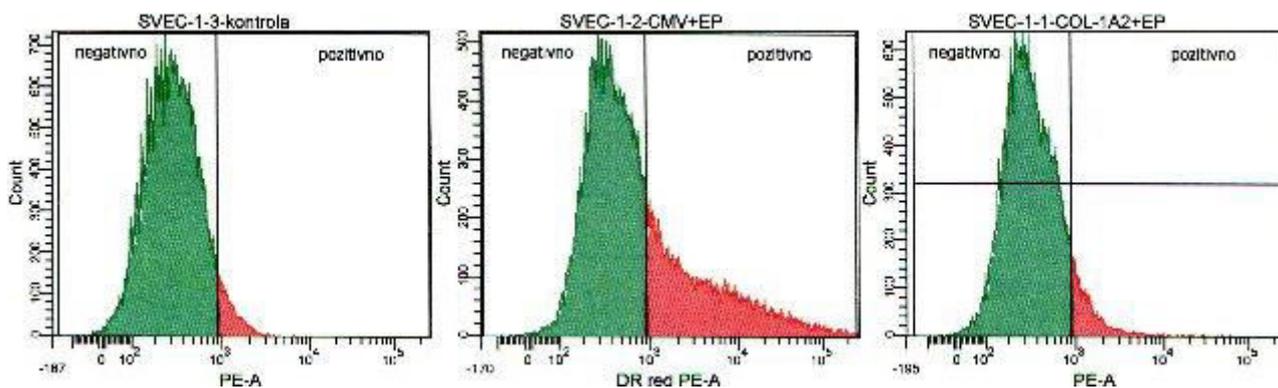
21 in Slika 22 prikazujeta izpis, ki nam ga je pri merjenju s pretočnim citometrom podal program BD FACS DivaV6.1.2 za celice elektroporirane pri 100 V.



Graf 3: Prikaz količnika intenzitete izražanja proteina dsRED glede na kontrolo za posamezne skupine celic pri 100 V. Po transfekciji s plazmidom pCMVdsRED je intenziteta izražanja značilno večja kot pri kontroli tako pri celični liniji L929 kot SVEC. pCOL1A2dsRED se značilno bolj kot v kontroli izraža samo pri celični liniji L929. * statistično pomembna razlika glede na kontrolo netretiranih celic. n=3 ponovitve za posamezno celično linijo.



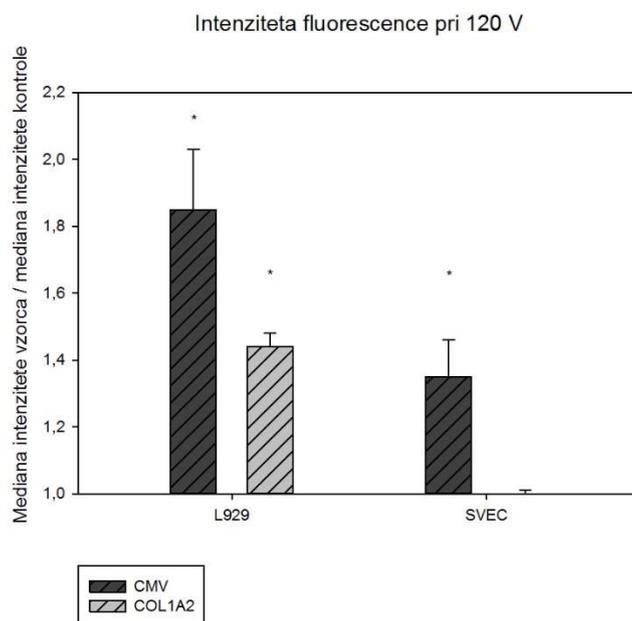
Slika 21: Rezultati analize s pretočnim citometrom za celično linijo L929. Tako pri celicah transficiranih s plazmidom pCMVdsRED kot pri celicah transficiranih s plazmidom pCOL1A2dsRED je opazen značilno različen pomik mediane intenzitete izražanja v desno.



Slika 22: Rezultati analize s pretočnim citometrom za celično linijo SVEC. Pri celicah transficiranih s plazmidom pCMVdsRED je opazen značilen pomik mediane intenzitete izražanja dsRED v desno.

Pri celicah transficiranih s plazmidom pCOL1A2dsRED značilno različne razlike nismo izmerili.

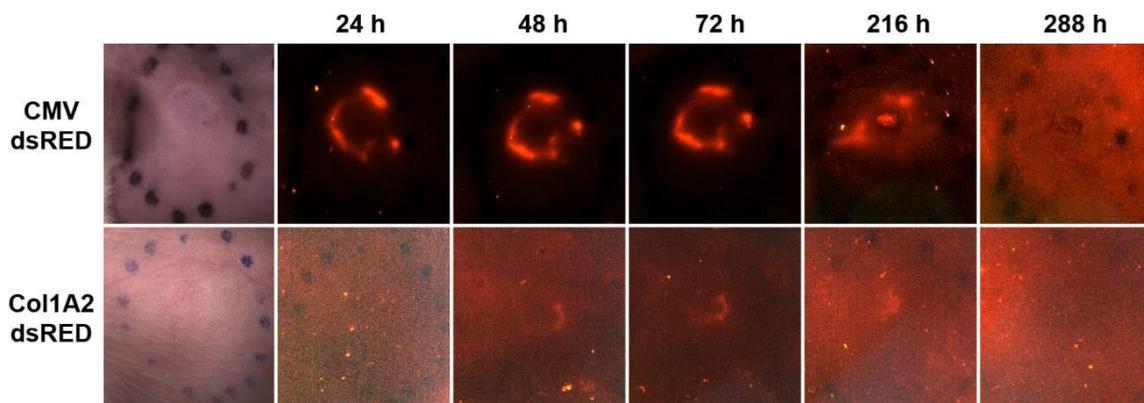
Tudi pri napetosti 120 V smo pri celični liniji L929 tako za plazmid pCOL1A2dsRED kot za plazmid pCMVdsRED izmerili značilno povečanje mediane intenzitete izražanja. Na drugi strani smo pri celični liniji SVEC značilno povečanje izmerili samo pri plazmidu pCMVdsRED. Genski vnos plazmida s promotorjem *COL1A2* (pCOL1A2dsRED) tudi pri tej napetosti v celicah SVEC ni povečal mediane intenzitete fluorescence (*Graf 4*).



Graf 4: Prikaz količnika intenzitete izražanja proteina dsRED glede na kontrolo za posamezne skupine celic pri 120 V. Rezultati so podobni rezultatom pridobljenim pri 100 V. Pod pCMVdsRED je intenziteta izražanja značilno večja kot pri kontroli tako pri celični liniji L929 kot SVEC. pCOL1A2dsRED se značilno bolj kot v kontroli izraža samo pri celični liniji L929. * statistično pomembna razlika glede na kontrolo netretiranih celic. n=3 ponovitve za posamezno celično linijo.

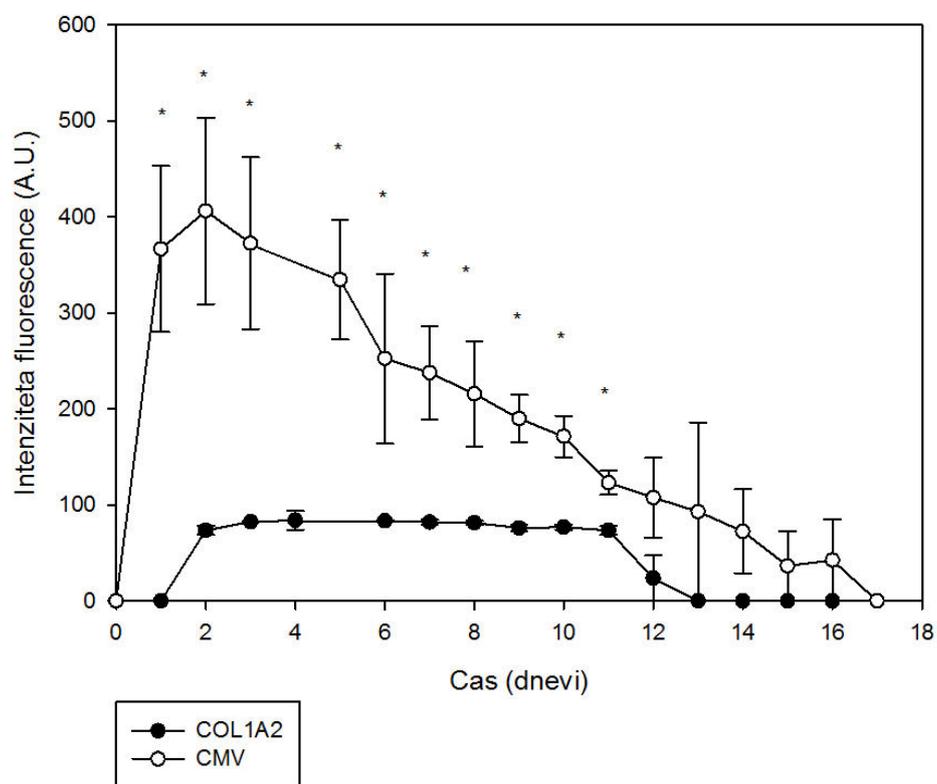
7.3 TRANSFEKCIJA KOŽE *IN VIVO*

Po intradermalnem injiciranju plazmidov in elektroporaciji smo vsak dan merili izražanje proteina dsRED v koži miši (Slika 23). Pri plazmidu s promotorjem CMV je bilo izražanje izrazito že 24 ur po elektroporaciji, vrh pa je doseglo po 48 urah. Izražanje proteina smo lahko opazovali še 2 tedna. Pri vnosu plazmida s promotorjem *COL1A2* je bilo izražanje značilno manjše. Izražanje smo prvič opazili 48 ur po elektroporaciji, merili pa smo ga lahko en teden. Po tem času signala, ki izvira od proteina dsRED nismo več mogli ločiti od ozadja zaradi prisotne avtofluorescence. Intenziteta izražanja je bila ves čas večja pri promotorju CMV (Graf 5). 48 ur po elektroporaciji je bila izmerjena intenziteta fluorescence za plazmid s promotorjem CMV približno 4 krat večja kot pri plazmidu s promotorjem *COL1A2*.



Slika 23: Izražanje plazmidov v urah po elektroporaciji pod vidno svetlobo (prvi stolpec) in pod invertnim fluorescenčnim mikroskopom.

Primerjava izražanja plazmidov pCOL1A2dsRED in pCMVdsRED



Graf 5: Prikaz intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa po vnosu izbranih plazmidov v kožo miši z elektroporacijo. Promotor CMV je bil ves čas nekajkrat bolj aktiven kot promotor *COL1A2*.

8 RAZPRAVA

Namen magistrskega dela je bil testirati tkivno specifičnost in intenziteto izražanja plazmida s kolagenskim promotorjem v koži, s čimer bi doprinesli k razvoju genske terapije raka in drugih bolezni na koži. Tkivno specifični promotorji za kožo in koža kot organ so v genski terapiji pomembni zaradi edinstvene zgradbe kože in njene lahke dostopnosti. Pri koži lahko namreč uporabljamo več pristopov zdravljenja bolezni in več načinov vnašanja genov, ki pa jih zaenkrat, zaradi neželenih učinkov terapije na druga tkiva, ne moremo izkoriščati v polnosti. S tkivno specifičnimi promotorji bi izražanje genov lahko omejili samo na kožo ter se s tem izognili neželenemu izražanju genskih produktov v drugih tkivih. Takšni promotorji bi bili še posebej uporabni pri genskih cepivih, kjer ciljamo antigen predstavitvene celice in pri terapiji raka, kjer v celice vnašamo gene za toksične produkte in želimo zajeti samo rakaste celice. Raziskave so pokazale, da je dodatna prednost tkivno specifičnih promotorjev ta, da so aktivni dlje kot konstitutivni promotorji, kar nam lahko pomaga pri doseganju kontroliranega zdravljenja. Zaenkrat so v študijah potrdili kožno specifičnost več promotorjev. Med promotorje z znano kožno-specifičnostjo spadajo promotor za keratin 14 (specifičen za keratinocite), promotor CD11c (specifičen za dendritične celice) ali promotor za fascin (specifičen za zrele dendritične celice). Z uporabo promotorja za keratin 14 in promotorja za fascin je raziskovalcem že uspelo izzvati imunski odziv, kar kaže na potencial kožno specifičnih promotorjev za zdravljenje več obolenj [31, 47]. V naši raziskavi smo ugotovili, da je kožno specifično izražanje mogoče doseči tudi z uporabo promotorja *COLIA2*.

8.1 REZULTATI *IN VITRO* POSKUSOV

8.1.1 Testiranje tkivne specifičnosti

V *in vitro* delu magistrskega dela smo plazmid s tkivno specifičnim promotorjem *COLIA2* (plazmid pCOL1A2dsRED) vnašali v dve celični liniji: L929 in SVEC. L929 so fibroblasti in smo jih v raziskavi uporabili kot model za kožne celice, medtem ko so celice SVEC endotelijske in so nam služile kot model za druge (t.j. ne-kožne) celice. Iz primerjave deleža celic, ki so po elektroporaciji izražale protein dsRED v obeh celičnih linijah, smo sklepali na celično specifičnost promotorja *COLIA2*. Tako s fluorescenčno mikroskopijo kot s pretočno citometrijo smo potrdili hipotezo, da se protein dsRED po vnosu plazmida pCOL1A2dsRED z elektroporacijo izraža v fibroblastih (~80 % celic; $P > 0,050$), ne pa v

endotelijskih celicah ($P > 0,050$). Plazmid pCMVdsRED se je pričakovano izražal tako v fibroblastih kot v endotelijskih celicah. Rezultat kaže na to, da je promotor *COLIA2* specifičen za kožne celice.

Preverili smo tudi, če je izmerjena razlika v deležu transfekcije posledica različne kompetence celičnih linij. Možno bi namreč bilo, da plazmid pri elektroporaciji lahko prodre skozi membrano ene vrste celic, druge pa ne. V tem primeru nam podatek o deležu celic, ki izražajo protein dsRED, ne bi povedal ničesar o aktivnosti promotorja znotraj celic (tkivni specifičnosti), saj plazmida ne bi uspeli niti vnesti v celice. To možnost in s tem lažno negativen rezultat smo izključili iz podatkov pridobljenih s testiranjem aktivnosti konstitutivnega promotorja CMV, za katerega vemo, da se izraža v vseh sesalskih celicah. Promotor CMV (uporabljen plazmid: pCMVdsRED) je pri fibroblastih aktiviral gen za protein dsRED pri 80 % celic ($P > 0,050$). Pri endotelijskih celicah pa smo po transfekciji s plazmidom pCMVdsRED izmerili, da je protein dsRED izražalo 26 % celic ($P < 0,050$). Iz rezultatov je razvidno, da lahko z elektroporacijo uspešno transficiramo tako fibroblaste kot endotelijske celice in da je za razliko v izražanju proteina dsRED v poskusih odgovorna različna aktivnost promotorjev znotraj celic.

8.1.2 Testiranje intenzitete izražanja

Dodatno smo *in vitro* merili intenziteto izražanja proteina dsRED v posamezni celici oz. kako močno se promotor *COLIA2* aktivira v posamezni celici. Ta podatek nam pove, kako močno izražanje genskega produkta lahko dosegamo pri genskem zdravljenju s tkivno specifičnim promotorjem *COLIA2* v primerjavi s konstitutivnim promotorjem CMV. Pri plazmidu s promotorjem *COLIA2* je bila mediana intenzitete izražanja večja kot pri kontroli samo po transfekciji v fibroblaste ($P > 0,050$) in ne po transfekciji v endotelijske celice ($P > 0,050$). Izražanje v fibroblastih je bilo enako močno kot pri plazmidu s promotorjem CMV ($P < 0,050$). Iz tega lahko zaključimo, da je aktivnost promotorja *COLIA2* v fibroblastih primerljiva z aktivnostjo promotorja CMV, da pa v endotelijskih celicah promotor *COLIA2* ni aktiven.

Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom o izražanju proteina dsRED smo poskuse zasnovali z več kontrolami. Pri prvi kontroli smo na plošče nanесли samo celice ne da bi jim dodali plazmid ali jih elektroporirali. Pri drugi kontroli smo namesto plazmidne DNA celicam dodali miliQ (prečiščeno vodo z odstranjenim endotoksinom), jih elektroporirali in

nanesli na plošče. S tem smo preverili, če je sam postopek elektroporacije vzrok za fluorescenco. Pri tretji in četrti kontroli pa smo k celicam dodali enkrat plazmid pCMVdsRED in drugič plazmid pCOL1A2dsRED ne da bi celice elektroporirali. S tem smo preverili, če se protein dsRED izraža tudi brez elektroporacije. Vse kontrole so bile negativne iz česar lahko sklepamo, da je v poskusih izmerjena fluorescenca res posledica vnosa DNA v celice z elektroporacijo.

8.1.3 Izbira elektroporacije

Kot metodo za genski vnos smo izbrali elektroporacijo. Za namen naše študije je elektrotransfer primerna izbira, saj je raziskovalcem z njim v preteklosti uspelo v celice uspešno vnesti tako reporterske kot terapevtske gene ter *in vivo* doseči nazadovanje tumorja [48]. Pri *in vivo* vnosu genov smo uporabili multi-array elektrodo, ki se je v preteklih poskusih izkazala za uspešno [49].

8.1.4 Uporaba različnih napetosti

Elektroporacijo celic smo izvedli pri dveh nastavitvah napetosti: 100 V in 120 V. Tako smo želeli ugotoviti, pri kateri napetosti lahko celice najboljše transformiramo, t.j. vnesemo DNA v čim več celic ne da bi odmrle. Načeloma velja, da se celice lažje transficirajo pri višjih napetostih, a jih pri višjih napetostih tudi več odmre [32]. Zaradi tega je potrebno najti napetost, ki daje najboljši kompromis med odmrlimi in transficiranimi celicami. Pričakovano je več celic preživelu pri nižji napetosti (100 V), hkrati pa je pri tej napetosti bil izmerjen delež transfekcije večji. Tako smatramo rezultate pridobljene pri napetosti 100 V za boljše. Sicer pa rezultati pri obeh napetostih dajejo isto splošno sliko o kožni specifičnosti promotorjev in njuni intenziteti izražanja.

8.2 REZULTATI *IN VIVO* TESTIRANJA INTENZITETE IN TRAJANJA IZRAŽANJA V KOŽI MIŠI

Študije so pokazale, da imajo plazmidi s tkivno specifičnimi promotorji *in vivo* šibkejše izražanje, a da je to izražanje daljše kot pri plazmidih s konstitutivnimi promotorji. Naši rezultati intenzitete izražanja plazmidov pCOL1A2dsRED in pCMVdsRED po intradermalnem injiciranju in elektroporaciji na miših kažejo na manjšo intenziteto izražanja in tudi na kratkotrajnejše izražanje plazmida s promotorjem *COL1A2*. Izražanje

smo pri pCMVdsRED lahko merili 14 dni, pri pCOL1A2dsRED pa samo 7 dni. Trajanje izražanja je v resnici verjetno daljše, a ga zaradi prisotne avtofluorescence nismo več mogli meriti. Protein dsRED namreč fluorescira pri isti valovni dolžini kot določeni deli mišje kože, zaradi česar po 14 dneh nismo več mogli ločiti – sicer vidno še prisotne – fluorescence proteina dsRED od avtofluorescence. Onemogočeno detekcijo zaradi avtofluorescence bi lahko izboljšali z uporabo drugih tehnik, kot so PCR ali z uporabo drugega reporterskega proteina.

V raziskavi smo potrdili hipotezo, da se plazmid s tkivno specifičnim promotorjem *COL1A2* izraža šibkeje kot plazmid s konstitutivnim promotorjem CMV. 48 ur po elektroporaciji je tako plazmid s promotorjem *COL1A2* dosegal približno 25 % izražanja plazmida s promotorjem CMV. V primerjavi z rezultati, ki so jih za kožno specifične promotore dobili Vandermeulen in sodelavci (manj kot 4 % izražanja plazmida s promotorjem CMV po 48 urah) je to izražanje relativno močno. Možno, da je del razlike posledica uporabe različnih metod: kot reporterski protein so Vandermeulen in sodelavci uporabili luciferazo, pri elektroporaciji pa ploščate elektrode in drugačne nastavitve elektroporatorja [31].

Kljub temu da se plazmidi s tkivno specifičnimi promotorji izražajo šibkeje kot plazmidi s konstitutivnimi promotorji, pa to ne pomeni nujno manjšega terapevtskega učinka. Znano je namreč, da se konstitutivni promotor CMV v celicah metilira in s tem inaktivira, za tkivno specifične promotore pa predpostavljamo, da se ne metilirajo v tolikšni meri in ostanejo aktivni dlje časa [3]. Daljša aktivnost promotorjev nam omogoča zdravljenje z manjšimi odmerki skozi daljše časovno obdobje – t.j. kontrolirano gensko terapijo.

8.3 MOŽNOSTI NADALJNJEGA DELA

V naši raziskavi smo *in vitro* poskuse izvedli na samo dveh celičnih linijah (L929 in SVEC) ter potrdili hipotezo, da se promotor *COL1A2* aktivira v kožnih celicah L929 (fibroblastih), ne pa v ne-kožnih celicah SVEC (endotelijskih celicah). Tega spoznanja ne moremo prevesti na vse celice v telesu. Za potrditev tkivne specifičnosti bi bili potrebni dodatni testi na več celičnih linijah. Podobno smo v *in vivo* delu raziskave poskuse izvedli samo na miših in rezultatov, zaradi različnih dejavnikov, ki aktivirajo gene, ne moremo neposredno prevesti na ljudi. Če se bo promotor *COL1A2* kdaj uporabljal v kliniki, bo prehodno potrebno določiti aktivnost promotorja tudi na ljudeh. Dodatna možnost

nadaljnega dela je, da bi promotor *COLIA2* vezali na terapevtski gen (npr. za IL-12) ter s tem preverili, če je učinek terapije s tkivno specifičnim promotorjem primerljiv s terapijo s konstitutivnimi promotorji. Raziskava z uporabo terapevtskega gena bi bila smiselna, ker rezultatov pridobljenih z uporabo reporterskih proteinov ne moremo vedno prevesti na učinek terapije s terapevtskimi proteini [31].

9 SKLEP

V sklopu magistrskega dela smo:

- dokazali, da kolagenski promotor sproži prepisovanje genov v fibroblastih in ne v endotelijskih celicah
- potrdili *in vivo* izražanje plazmida s kolagenskim promotorjem v kožnem tkivu z metodo elektroporacije in
- potrdili pričakovano nižjo intenziteto izražanja genskega produkta, ne pa tudi daljšega zadrževanja transgenega produkta v kožnih celicah

10 LITERATURA

1. *Cancer* (Dostopno 19.8.2014)
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
2. *Za javnost in bolnike* (Dostopno 19.8.2014)
http://www.onko-i.si/za_javnost_in_bolnike/.
3. Papadakis E.D., Nicklin S.A., Baker A.H. in White S.J.: *Promoters and control elements: designing expression cassettes for gene therapy*. *Current Gene Therapy*, 2004; **4**(1): 89-113.
4. Novaković S., Hočevar M., Jezeršek Novaković B., Strojan P. in Žgajnar J.: *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. Mladinska knjiga Založba, Ljubljana, 2009; str.: 24, 25.
5. Novaković S., Hočevar M., Jezeršek Novaković B., Strojan P. in Žgajnar J.: *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. Mladinska knjiga Založba, Ljubljana, 2009; str.: 26-28.
6. Hanahan D. in Weinberg R.A.: *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011; **144**(5): 646-74.
7. Kaufmann K.B., Büning H., Galy A., Schambach A. in Grez M.: *Gene therapy on the move*. *EMBO Molecular Medicine*, 2013; **5**(11): 1642-61.
8. Gothelf A. in Gehl J.: *Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives*. *Current Gene Therapy*, 2010; **10**(4): 287-99.
9. Štrukelj B. in Kos J.: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007; str.: 611-614.
10. Štrukelj B. in Kos J.: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007; str.: 61-64, 72.
11. *What is a Plasmid* (Dostopno 14.11.2014)
http://www.addgene.org/mol_bio_reference/plasmid_background/.
12. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore P. in Darnell J.: *Molecular Cell Biology*. 4. izdaja. W. H. Freeman, New York, 2000; 4. poglavje, *Recombinant DNA and genomics*. Dostopno na:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21712/>.
13. Mali S.: *Delivery systems for gene therapy*. *Indian Journal of Human Genetics*, 2013; **19**(1): 3-8.

14. Štrukelj B.: *Razvoj genskega zdravljenja pri glioblastomu. Farmaceutski vestnik.* Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2014; str.: 355.
15. Štrukelj B. in Kos J.: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine.* Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007; str.: 210-243.
16. *Properties of the ideal gene therapy vector* (Dostopno 1.3.2015)
http://www.nature.com/nrg/journal/v1/n2/box/nrg1100_091a_BX1.html.
17. Baban C.K., Cronin M., O'Hanlon D., O'Sullivan G.C. in Tangney M.: *Bacteria as vectors for gene therapy of cancer.* Bioengineered Bugs, 2010; **1**(6): 385-94.
18. Skin Anatomy (Dostopno 19.8.2014)
<http://dermatology.about.com/cs/skinanatomy/a/anatomy.htm>
19. *Structure and Function of the Skin* (Dostopno 28.02.2015)
http://www.merckmanuals.com/home/skin_disorders/biology_of_the_skin/structure_and_function_of_the_skin.html.
20. Gothelf A. in Gehl J.: *What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines.* Human Vaccines and Immunotherapeutics, 2012; **8**(11): 1694-702.
21. Guo S., Donate A., Basu G., Lundberg C., Heller L. in Heller R.: *Electro-gene transfer to skin using a noninvasive multielectrode array.* Journal of Controlled Release, 2011; **151**(3): 256-62.
22. Giacca M. in Zacchigna S.: *VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond.* Gene Therapy, 2012; **19**(6): 622-9.
23. Lasek W., Zagożdżon R. in Jakobisiak M.: *Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy?* Cancer Immunology, Immunotherapy, 2014; **63**(5): 419-35.
24. Shedlock D.J. in Weiner D.B.: *DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity.* Journal of Leukocyte Biology, 2000; **68**(6): 793-806.
25. Dean D.A.: *Cell-specific targeting strategies for electroporation-mediated gene delivery in cells and animals.* The Journal of Membrane Biology, 2013; **246**(10): 737-44.
26. Sekaran V., Soares J. in Jarstfer M.B.: *Telomere maintenance as a target for drug discovery.* Journal of Medical Chemistry, 2014; **57**(3): 521-38.
27. Griscelli F., Opolon P., Chianale C., Di Falco N., Franz W.M., Perricaudet M. idr.: *Expression from cardiomyocyte-specific promoter after adenovirus-mediated gene*

- transfer in vitro and in vivo*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III, 1997; **320**(2): 103-12.
28. Franz W.M., Rothmann T., Frey N. in Katus H.A.: *Analysis of tissue-specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters*. Cardiovascular Research, 1997; **35**(3): 560-6.
 29. Xu Z., Tao Z., Xu Z., Yang Y., Wang H., Wang L. idr.: *Cardiac-specific expression of the hepatocyte growth factor (HGF) under the control of a TnIc promoter confers a heart protective effect after myocardial infarction (MI)*. Current Gene Therapy, 2014; **14**(1): 63-73.
 30. Nakamura S., Watanabe S., Ohtsuka M., Maehara T., Ishihara M., Yokomine T. idr.: *Cre-loxP system as a versatile tool for conferring increased levels of tissue-specific gene expression from a weak promoter*. Molecular Reproduction and Development, 2008; **75**(6): 1085-93.
 31. Vandermeulen G., Richiardi H., Escriou V., Ni J., Fournier P., Schirmacher V. idr.: *Skin-specific promoters for genetic immunisation by DNA electroporation*. Vaccine, 2009; **27**(32): 4272-7.
 32. Tešić N. in Čemažar M.: *In vitro targeted gene electrotransfer to endothelial cells with plasmid DNA containing human endothelin-1 promoter*. The Journal of Membrane Biology, 2013; **246**(10): 783-91.
 33. Niederrheither K., D'Souza R.N. in de Crombrughe B.: *Minimal DNA sequences that control the cell lineage-specific expression of the pro alpha 2(I) collagen promoter in transgenic mice*. The Journal of Cell Biology, 1992; **119**(5): 1361-70.
 34. *COL1A2 (collagen, type 1, alpha 2)* (Dostopno 19.8.2014) <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/COL1A2ID411ch7q22.html>.
 35. Büttner C., Skupin A. in Rieber E.P.: *Transcriptional activation of the type I collagen genes COL1A1 and COL1A2 in fibroblasts by interleukin-4: analysis of the functional collagen promoter sequences*. Journal of Cellular Physiology, 2004; **198**(2): 248-58.
 36. Miyazaki H., Kobayashi R., Ishikawa H., Awano N., Yamaqoe S. idr.: *Activation of COL1A2 promoter in human fibroblasts by Escherichia coli*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2012; **65**(3): 481-7.
 37. Isolation of Bacteria (Dostopno 19.8.2014) <http://barry-b.tripod.com/microl11.html>

38. *JetStar Plasmid DNA Megaprep and Gigaprep Purification Kits* (Dostopno 5.9.2014)
http://www.genomedna.com/pdf/7015018_JetStar%20Plasmid%20Mega,%20Giga%20Manual,%202022%20Apr%202010_print.pdf.
39. *Double Digest Finder* (Dostopno 13.10.2014)
<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>.
40. *Gel Electrophoresis* (Dostopno 19.8.2014)
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/681927/gel-electrophoresis>.
41. Yarmush M.L., Goldberg A., Serša G., Kotnik T. in Miklavčič D.: *Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2014; **16**: 295-320.
42. Escoffre J.M., Teissié J. in Rols M.P.: *Gene transfer: how can the biological barriers be overcome?* The Journal of Membrane Biology, 2010; **236**(1): 61-74.
43. Xu R., Li H., Tse L.Y., Kung H.F., Lu H. in Lam K.S.: *Diabetes gene therapy: potential and challenges*. Current Gene Therapy, 2003; **3**(1): 65-82.
44. Reed S.D. in Li S.: *Electroporation advances in large animals*. Current Gene Therapy, 2009; **9**(4): 316-26.
45. *Determining the Viability of a Cell Culture* (Dostopno 19.8.2014)
<http://www40.homepage.villanova.edu/nicholas.falco/pd2.htm>.
46. Avberšek-Lužnik I., Čelhar T., Karas Koželički N., Milek M. in Pajič T.: *Vaje iz klinične kemije I*. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010; Str.: 22-24.
47. Lin M.T., Wang F., Uitto J. in Yoon K.: *Differential expression of tissue-specific promoters by gene gun*. British Journal of Dermatology, 2001; **144**(1): 34-9.
48. Marrero B., Shirley S. in Heller R.: *Delivery of interleukin-15 to B16 melanoma by electroporation leads to tumor regression and long-term survival*. Technology in Cancer Research and Treatment, 2014; **13**(6): 551-60.
49. Reberšek M., Corović S., Serša G. in Miklavčič D.: *Electrode commutation sequence for honeycomb arrangement of electrodes in electrochemotherapy and corresponding electric field distribution*. Bioelectrochemistry, 2008; **74**(1): 26-31.