

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Boštjan MARKELC

**VPLIV ELEKTROGENSKE TERAPIJE Z UTIŠANJEM  
*K-RAS* NA CELICE IN TUMORJE KARCINOMA  
DEBELEGA ČREVESA LoVo**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Boštjan MARKELC

**VPLIV ELEKTROGENSKE TERAPIJE Z UTIŠANJEM *K-RAS* NA  
CELICE IN TUMORJE KARCINOMA DELEGA ČREVEVA LoVo**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF ELECTROGENE THERAPY WITH SILENCING OF  
*K-RAS* IN LoVo COLON CARCINOMA CELLS AND TUMORS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

*Očetu v spomin in Mami v veselje.*

Diplomsko delo je zaključek študija biologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta Ljubljana.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Majo Čemažar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Kristina Sepčič

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Maja Čemažar

(mentorica) Onkološki Inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo

Članica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

(recenzentka) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo

Datum zagovora: 11. 06. 2009

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Boštjan Markelc

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	616-006:611.34:621.3(043.2)=163.3
KG	siRNA/miRNA/ <i>K-ras</i> /rak debelega črevesa LoVo/elektroporacija/ elektrogenska terapija/plazmid
AV	MARKELC, Boštjan
SA	ČEMAŽAR, Maja (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo
LI	2009
IN	VPLIV ELEKTROGENSKE TERAPIJE Z UTIŠANJEM <i>K-RAS</i> NA CELICE IN TUMORJE KARCINOMA DEBELEGA ČREVESA LoVo
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	IIIIIIII, 90 str., 6 pregl., 27 sl., 12 pril., 153 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Rak debelega črevesa se po incidenci uvršča med najpogostejše vrste raka. Mutacija gena <i>K-ras</i> se pojavlja kar pri 30–60 % odkritih primerov. Kadar je <i>K-ras</i> mutiran, je odgovoren za nekontrolirano delitev in dediferenciacijo celic ter nastanek tumorja in metastaziranje, standardni načini zdravljenja pa so neučinkoviti. Zato predstavlja utišanje izražanje <i>K-ras</i> s pomočjo specifičnih nukleotidnih zaporedij privlačen nov način zdravljenja raka debelega črevesa. V naši raziskavi smo želeli preveriti delovanje različnih siRNA in miRNA molekul na utišanje izražanja gena <i>K-ras</i> pri celicah in tumorjih karcinoma debelega črevesa LoVo in njihovo potencialno uporabnost v terapevtske namene. Poleg tega smo preverjali tudi uporabnost elektroporacije kot metode vnosa plazmidne DNA, ki je kodirala za miRNA- <i>K-ras</i> (pmiRNA- <i>K-ras</i> ), v celice in tumorje karcinoma debelega črevesa LoVo (elektrogenska terapija). Rezultati naše raziskave so pokazali, da je elektrogenska terapija s pmiRNA- <i>K-ras</i> zmanjšala tako količino mRNA, ki kodira za <i>K-ras</i> in količino proteinov <i>K-ras</i> , kot viabilnost in preživetje celic. Količina proteinov se je <i>in vitro</i> zmanjšala za 95 % glede na kontrolno, netretirano skupino, medtem ko se je količina mRNA, ki kodira za <i>K-ras</i> , zmanjšala za 28 %. Pri pogojih <i>in vivo</i> se je količina mRNA, ki kodira za <i>K-ras</i> , zmanjšala za 76 %, količina proteinov <i>K-ras</i> pa za 95 % po elektrotransfekciji s pmiRNA – <i>K-ras</i> . Ravno tako je bil opazen zaostanek v rasti tumorjev, ki je znašal osem dni glede na kontrolno skupino. Pokazali smo tudi, da je elektroporacija enostavna in učinkovita metoda za lokalni vnos molekul pmiRNA- <i>K-ras</i> v tumorje karcinoma debelega črevesa LoVo in da nima nobenih stranskih učinkov. Dobljeni rezultati kažejo na možnost uporabe elektrogenske terapije z molekulami miRNA- <i>K-ras</i> kot dopolnitvene metode standardnim načinom zdravljenja raka debelega črevesa, kadar je prisotna mutacija gena <i>K-ras</i> .

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ŠD Dn  
 DK 616-006:611.34:621.3(043.2)=163.3  
 CX siRNA/miRNA/*K-ras*/colorectal cancer LoVo/electroporation/  
 electrogene therapy/plasmid  
 AU MARKELC, Boštjan  
 AA ČEMAŽAR, Maja (supervisor)  
 PP SI-1000, Ljubljana, Večna pot 111  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology  
 PY 2009  
 TI THE EFFECT OF ELECTROGENE THERAPY WITH *K-RAS*  
 SILENCING ON LoVo COLON CARCINOMA CELLS AND TUMORS  
 DT Graduation thesis (University studies)  
 NO IVIV, 90 p., 6 tab., 27 fig., 12 ann., 153 ref  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AI Colorectal carcinomas are among the most common types of cancer and in 30 – 60 % of diagnosed cases mutations of *K-ras* are found. They are believed to be associated with tumor initiation, tumor progression and metastasis formation and, when present, standard treatments are ineffective. Therefore, silencing of mutant *K-ras* expression with specific nucleotide sequences can be an attractive therapeutic strategy for colorectal cancer treatment. The aim of our study was to investigate the effect of siRNA and miRNA molecules directed against *K-ras* (si/miRNA-*K-ras*) on the expression level of *K-ras* and on the growth of colorectal carcinoma cell line LoVo *in vitro* and *in vivo*. In addition, we evaluated electroporation as a gene delivery method for transfection of LoVo cells and tumors with plasmid DNA encoding miRNA-*K-ras* (pmiRNA-*K-ras*) – electrogene therapy. The results of our study showed that si/miRNAs targeting *K-ras* efficiently reduced *K-ras* expression at the level of mRNA and protein as well as cell survival after *in vitro* electrotransfection of LoVo cells with pmiRNA-*K-ras*. Protein levels were 95 % lower than in the untreated control group and mRNA expression was decreased for 28 %. *In vivo*, *K-ras* expression was reduced for 76 % as well as tumor growth was delayed for 8 days compared to control untreated tumor. The effect of electrotransfection was also evident on expression of *K-ras* protein where we observed 95% lower levels than in the untreated control group. In addition, electroporation proved to be a simple and efficient delivery method for local administration of pmiRNA-*K-ras* molecules into LoVo tumor and no side effects related to the therapy were observed. The obtained results demonstrate that electrogene therapy with miRNA-*K-ras* molecules can be a potential therapeutic strategy for adjuvant treatment of colorectal cancers harboring *K-ras* mutations.

## KAZALO

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO TABEL .....</b>	<b>XI</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 Namen dela in delovna hipoteza .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 Vrste raka .....	5
2.2 Pojavnost raka.....	6
2.3 Zdravljenje .....	6
<b>2.3.1 Klasične metode .....</b>	<b>6</b>
2.3.1.1 Kirurgija .....	6
2.3.1.2 Radioterapija .....	7
2.3.1.3 Kemoterapija .....	7
<b>2.3.2 Novejše metode .....</b>	<b>7</b>
2.3.2.1 Imunoterapija.....	7
2.3.2.1.1 Aktivna imunoterapija.....	7
2.3.2.1.2 Pasivna imunoterapija.....	8
2.4 Genska terapija raka .....	8
<b>2.4.1 Vnosni sistemi.....</b>	<b>9</b>
2.5 Elektroporacija.....	10
<b>2.5.1 Uporaba elektroporacije v onkologiji .....</b>	<b>13</b>
2.5.1.1 Elektrokemoterapija.....	13
2.5.1.1.1 Predklinične raziskave elektrokemoterapije .....	13
2.5.1.1.2 Klinične raziskave elektrokemoterapije .....	14
<b>2.5.2 Elektrogenska terapija.....</b>	<b>14</b>
2.5.2.1 Predklinične raziskave elektrogenske terapije raka.....	15
2.5.2.1.1 Električno posredovan vnos genov v tumorje.....	16
2.5.2.2 Klinične raziskave elektrogenske terapije raka.....	17
2.6 RNA interferenca (RNAi) .....	17

<b>2.6.1</b>	<b>Odkritje interferenčne RNA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Mehanizem delovanja RNAi</b> .....	<b>18</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Pomen RNAi v naravi</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6.4</b>	<b>Uporaba RNAi</b> .....	<b>20</b>
2.6.4.1	Perspektiva tehnologije RNAi pri zdravljenju raka .....	21
2.6.4.1.1	Genska terapija z RNA interferenco proti <i>K-ras</i> .....	21
2.6.4.2	Načini vnosa interferenčnih molekul v tarčne celice oz. tkiva .....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b> .....	<b>24</b>
3.1	Izbira molekul siRNA, specifičnih za onkogen <i>K-ras</i> .....	24
3.2	Priprava plazmidnih vektorjev .....	25
<b>3.2.1</b>	<b>Plazmidne DNA</b> .....	<b>25</b>
3.2.1.1	pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR .....	25
3.2.1.2	pcDNATM6.2-GW/miR-ctrl .....	26
<b>3.2.2</b>	<b>Namnožitev in izolacija plazmidne DNA</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Ugotavljanje koncentracije in čistosti DNA</b> .....	<b>27</b>
3.2.3.1	Spektrofotometrija .....	27
3.2.3.2	Agarozna elektroforeza .....	28
3.3	Priprava plazmidne DNA z zapisom za miRNA- <i>K-ras</i> .....	28
3.4	Poskusi na rakavih celičnih linijah <i>in vitro</i> .....	29
<b>3.4.1</b>	<b>Celične linije</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Elektroporator</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Potek in vitro raziskav</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Gojenje celičnih linij</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4.5</b>	<b>Lipofekcija <i>in vitro</i></b> .....	<b>31</b>
<b>3.4.6</b>	<b>Elektrotransfekcija in vitro</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4.7</b>	<b>Merjenje viabilnosti celic</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4.8</b>	<b>Določanje preživetja celic</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.9</b>	<b>Odkrivanje in kvantifikacija izražanja transgenov</b> .....	<b>34</b>
3.4.9.1	Fluorescentna mikroskopija.....	34
3.4.9.2	Pretočna citometrija.....	34
3.4.9.3	Merjenje fluorescence .....	35
3.4.9.4	Izolacija RNA iz celic, reverzna transkripcija (RT) in kvantitativni PCR v realnem času .....	36



3.4.9.5	Izolacija proteinov iz celic in analiza po Westernu.....	40
3.5	Poskusi na tumorskih modelih v pogojih <i>in vivo</i> .....	43
<b>3.5.1</b>	<b>Poskusne živali .....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Tumorski modeli .....</b>	<b>44</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Elektroporator .....</b>	<b>44</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Potek raziskav <i>in vivo</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>3.5.5</b>	<b>Nasaditev podkožnih tumorjev .....</b>	<b>45</b>
<b>3.5.6</b>	<b>Elektrotransfekcija <i>in vivo</i> .....</b>	<b>45</b>
3.5.6.1	Vnos plazmidne DNA v tumorje in elektroporacija.....	45
<b>3.5.7</b>	<b>Detekcija in kvantifikacija izražanja transgenov .....</b>	<b>46</b>
3.5.7.1	Izolacija mRNA iz tkiva, reverzna transkripcija in kvantitativni PCR v realnem času .....	46
3.5.7.2	Izolacija proteinov iz tkiva in analiza po Westernu .....	46
3.5.7.3	Imunohistokemija .....	46
<b>3.5.8</b>	<b>Spremljanje rasti tumorjev .....</b>	<b>47</b>
3.6	Statistična analiza rezultatov .....	48
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>49</b>
4.1	Utišanje onkogenega <i>K-ras</i> z molekulami siRNA/miRNA .....	49
<b>4.1.1</b>	<b>Poskusi <i>in vitro</i> .....</b>	<b>49</b>
4.1.1.1	Izbira ustreznih molekul siRNA za uspešno utišanje gena <i>K-ras</i> .....	49
4.1.1.2	Učinek molekul siRNA-K-ras53 in siRNA-K-ras393 na viabilnost celic LoVo .....	50
4.1.1.3	Učinek molekul siRNA-K-ras53 in siRNA-K-ras393 na preživetje celic LoVo .....	53
4.1.1.4	Učinek molekul siRNA-K-ras53 in siRNA-K-ras393 na izražanje proteina K-ras .....	54
4.1.1.5	Preverjanje plazmidne DNA z zapisom za miRNA-K-ras .....	55
4.1.1.6	Učinkovitost transfekcije s plazmidno DNA z zapisom za miRNA-K-ras v celicah LoVo .....	57
4.1.1.7	Učinek plazmidne DNA z zapisom za miRNA-K-ras na izražanje <i>K-ras</i> v celicah LoVo .....	60
4.1.1.8	Učinek plazmidne DNA z zapisom za miRNA-K-ras na viabilnost celic LoVo .....	61
4.1.1.9	Učinek plazmidne DNA z zapisom za miRNA-K-ras na preživetje celic LoVo .....	62

4.1.1.10	Učinek plazmidne DNA z zapisom za miRNA- <i>K-ras</i> na izražanje proteina <i>K-ras</i> .....	63
<b>4.1.2</b>	<b>Poskusi <i>In vivo</i></b> .....	<b>64</b>
4.1.2.1	Učinek utišanja onkogenega <i>K-ras</i> na rast humanih podkožnih tumorjev adenokarcinoma debelega črevesa (LoVo) .....	64
4.1.2.2	Učinek električno posredovanega vnosa pmiRNA- <i>K-ras</i> v podkožne tumorje LoVo na nivo mRNA za <i>K-ras</i> in proteinov <i>K-ras</i> v tumorjih .....	68
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>71</b>
5.1	Utišanje onkogenega <i>K-ras</i> v celicah adenokarcinoma debelega črevesa LoVo .....	71
5.2	Sklepi.....	76
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>79</b>
<b>ZAHVALA</b>		
<b>PRILOGE</b>		

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Paralelne poti nastanka tumorja (Hanahan in Weinberg, 2000) .....	4
Slika 2: Stopnje v razvoju tumorja (Čemažar, 2005).....	5
Slika 3: Shematski prikaz mehanizma RNAi (Szweykowska - Kulinska in sod., 2003) .....	19
Slika 4: Primer izpisa sekvenc siRNA v programu »BLOCK-iT™ RNAi DESIGNER – Invitrogen«, ki po zagotovilih proizvajalca v 90 % primerov vodijo do 70 % utišanja tarčnega gena. ....	24
Slika 5: pcDNA™6,2-GW/EmGFP-miR.....	26
Slika 6: pcDNA™6,2-GW/miR-ctrl.....	27
Slika 7: Struktura MTS tetrazolijeve soli in nastalega produkta, formazana.....	33
Slika 8: Shema reakcije v proteinskem vzorcu z bikinkoninsko kislino (BCA) (Pierce). ....	41
Slika 9: Delež nivoja mRNA za <i>K-ras</i> v celicah LoVo po inkubaciji z lipofektaminom in po lipofekciji celic LoVo s posameznimi molekulami siRNA- <i>K-ras</i> (53, 111 in 393) oz. kontrolnimi molekulami siRNA-ctrl (53, 111, 393) glede na kontrolno skupino celic LoVo. ....	50
Slika 10: Viabilnost celic LoVo po inkubaciji z lipofektaminom (LF) ter po lipofekciji celic z siRNA- <i>K-ras</i> 53 oz. kontrolno molekulo siRNA-ctrl53.. ....	51
Slika 11: Viabilnost celic LoVo po inkubaciji z lipofektaminom (LF) ter po lipofekciji celic z siRNA- <i>K-ras</i> 393 oz. kontrolno molekulo siRNA-ctrl393. ....	52
Slika 12: Preživetje celic LoVo po inkubaciji z lipofektaminom (LF) ter po lipofekciji celic s posameznimi molekulami siRNA- <i>K-ras</i> (53, 393) oz. kontrolnimi molekulami siRNA-ctrl (53, 393).. ....	54
Slika 13: Analiza po Westernu proteina <i>K-ras</i> in aktina v celicah LoVo .....	55
Slika 14: Plazmidna DNA, označena z etidijevim bromidom po agarozni elektroforezi .....	56
Slika 15: pcDNA™6,2-GW/EmGFP-miR z vstavljeno nukleotidno sekvenco izbrane siRNA- <i>K-ras</i> 393.....	56
Slika 16: Slike celic pod fluorescentnim mikroskopom (spodnja vrstica) in pod vidno svetlobo (zgornja vrstica) po različnih skupinah.....	58
Slika 17: Učinkovitost elektrotransfekcije celic LoVo s plazmidoma pmiRNA- <i>K-ras</i> oz. pmiRNA-ctrl, določena s pomočjo pretočnega citometra. ....	59
Slika 18: Povprečna relativna intenziteta fluorescence po elektrotransfekciji s pmiRNA- <i>K-ras</i> oz. pmiRNA-ctrl.....	59
Slika 19: Nivo izražanja mRNA v celicah LoVo po inkubaciji s plazmidoma pmiRNA- <i>K-ras</i> ali pmiRNA-ctrl, samim ali v kombinaciji z elektroporacijo in po obdelavi samo z elektroporacijo.....	60

Slika 20: Viabilnost celic LoVo po inkubaciji s plazmidoma pmiRNA-K-ras ali pmiRNA-ctrl samim ali v kombinaciji z elektroporacijo in po obdelavi samo z elektroporacijo. ....	62
Slika 21: Preživetje celic LoVo po obdelavi s plazmidoma pmiRNA-K-ras393 ali pmiRNA-ctrl samim ali v kombinaciji z elektroporacijo in po obdelavi samo z elektroporacijo. ....	63
Slika 22: Western blot analiza proteina K-ras in aktina v celicah LoVo.....	64
Slika 23: Rastne krivulje adenokarcinoma debelega črevesa LoVo po različnih terapijah.....	66
Slika 24: Imunohistokemično barvane tumorske rezine adenokarcinoma LoVo z monoklonskim primarnim protitelesom za K-ras po različnih terapijah. ....	67
Slika 25: Tumorske rezine adenokarcinoma LoVo, barvane s hematoksilin-eozinskim barvilom po različnih terapijah.....	68
Slika 26: Analiza mRNA-K-ras s qRT-PCR v tumorjih LoVo po različnih terapijah ....	69
Slika 27: Western blot analiza proteina K-ras in aktina v tumorjih LoVo po različnih terapijah.....	69

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Osnovna raztopina za RT .....	36
Tabela 2: Seznam uporabljenih sond Taqman Gene Expression Assays – Inventoried .....	38
Tabela 3: Osnovna zmes za PCR.....	38
Tabela 4: Seznam uporabljenih primarnih protiteles .....	42
Tabela 5: Uporabljena sekundarna poliklonska protitelesa .....	43
Tabela 6: Učinek elektrogenske terapije z molekulami miRNA- <i>K-ras</i> na rast podkožnih tumorjev adenokarcinoma debelega črevesa LoVo.....	65

**SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV**

B16F1	mišji model melanoma
Ct	ang. treshold cycle – cikel, v katerem amplifikacijska krivulja seka prazno vrednost
$\Delta\Delta Ct$	delta delta Ct
CMV	promotor
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EGFR	epidermalni rastni dejavnik – ang. Epidermal growth factor
EP	elektroporacija
FAM	fluorescentno barvilo 6-karboksifluorescein, reporter
GFP	ang. green fluorescence protein – zeleno fluorescirajoči protein
IFN	Interferon
IL	Interlevkin
<i>K-ras</i>	Onkogen
LF	Lipofektamin
LoVo	humani adenokarcinom debelega črevesa
mRNA	ang. messenger RNA – informacijska ribonukleinska kislina
miRNA	mikroribonukleinska kislina
P	stopnja značilnosti
PCR	ang. polimerase chain reaction – verižna reakcija s polimerazo
pIL	plazmidna DNA, ki kodira interlevkin
qRT-PCR	ang. quantitative real time PCR – kvantitativni PCR v realnem času
R	korelacijski koeficient
RdRP	ang. RNA dependent RNA polymerase – od RNA odvisne RNA polimeraze

RISC	ang. RNA induced silencing complex – z RNA sprožen kompleks utišanja
RNAi	ang. RNA interference – RNA interferenca
RT	reverzna transkripcija
SCID	ang. severe combined immunodeficiency – imunsko oslABLjene miši
siRNA	ang. small interference RNA – mala interferenčna RNA
shRNA	ang. short hairpin RNA – kratka RNA z zanko

## 1 UVOD

Pri karcinomu debelega črevesa, ki je po incidenci med najpogostejšimi vrstami raka v Sloveniji, je gen *K-ras* mutiran v 30–60 % primerov, zato predstavlja ta gen potencialno terapevtsko tarčo. Uporaba tehnologije RNA interference (RNAi), pri kateri s kratkimi dvoverižnimi nukleotidnimi zaporedji (siRNA, miRNA itd.) ciljamo željeni gen, je nova, specifična in kot taka zanimiva za uporabo v terapevtske namene. V kombinaciji z elektroporacijo kot načinom vnosa plazmidne DNA, ki kodira za miRNA-*K-ras* (pmiRNA-*K-ras*) v celice (elektrogenska terapija), lahko dosežemo tako lokalni vnos molekul kot njihovo specifično delovanje.

### 1.1 Namen dela in delovna hipoteza

Namen diplomskega dela je preveriti delovanje različnih molekul siRNA in miRNA na utišanje izražanja gena *K-ras* in njihovo potencialno uporabnost v terapevtske namene.

Naša hipoteza je, da elektrogenska terapija z molekulami miRNA učinkovito utiša izražanje gena *K-ras* in deluje citotoksično in protitumorsko na celice in tumorje karcinoma debelega črevesa LoVo.



## 2 PREGLED OBJAV

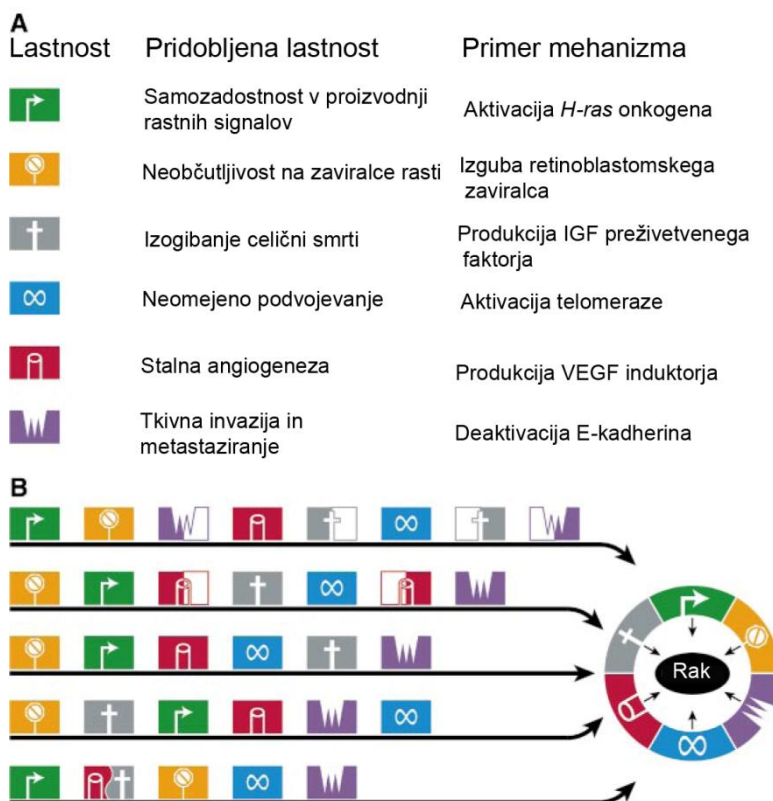
Rak je bolezen, ki spremlja človeštvo že dolgo časa. Zdravniki v mnogih starodavnih civilizacijah so dokumentirali primere nenavadnih tvorbo v telesu pacientov, katerim takrat še niso znali pojasniti izvora in načina nastanka. Kljub temu je že Hipokrat 400 let pr. n. št. pravilno predpostavljal, da ima bolezen naravni vzrok in ni iskal razlage v delovanju bogov. Z razcvetom arheologije je postalo jasno, da je rak obstajal tudi že pri Egipčanih, saj imajo nekatere mumije jasne znake rakavih obolenj. Šele pozneje, v srednjem veku, so ugotovili, da se rak lahko prenaša s staršev na potomce, ker so obstajale nekatere družine, v katerih je veliko članov umrlo zaradi takrat še neimenovane bolezni. Proti koncu osemnajstega stoletja so ugotovili, da lahko dolgotrajna izpostavljenost nekaterim snovem sproži nastanek raka, kar je pripeljalo do začetka poglobljenega raziskovanja o njegovem nastanku in razvoju. Danes vemo, da je rak bolezen, pri kateri so zelo pomembne dinamične spremembe v genomu, ki se dogajajo zaradi mutacij določenih, za normalno delovanje celice, pomembnih genov. Te gene so znanstveniki poimenovali protoonkogeni in so v normalni, nemutirani obliki prisotni v vseh celicah. Mnogokrat so lahko različni regulatorji rasti ali receptorji regulatorjev rasti (npr. *Her2/neu*, *PDGF*), nekateri znotrajcelični prenašalci signalov (npr. *ras*, *src*), prepisovalni dejavniki (npr. *ras*, *myc*, *fos*, *jun*) in geni, ki so vpleteni pri celični smrti (npr. *bcl2*, *mdm2*). Nevarni postanejo šele po mutaciji, ki jim lahko spremeni, prepreči ali poveča njihovo delovanje. Pri razvoju raka imajo pomembno vlogo tudi tumor supresorski geni (*p53*, *Rb*, *APC*, *BRCA 1,2*, idr.). Ti kontrolirajo procese v celici, ki ustavijo celico v celičnem ciklusu ali pa sprožijo celično smrt. V primeru mutacije teh genov se izgubi kontrola nad celičnim ciklusom, kar lahko vodi v nekontrolirano rast in dediferenciacijo celic. V zadnjem času so ugotovili, da so lahko tudi mutacije v regijah molekule DNA, ki kodirajo za mikro RNA (miRNA), eden izmed dejavnikov nastanka raka (Tannock in sod., 2005). Te miRNA uravnavajo izražanje proteinov na posttranslacijskem nivoju in na nivoju razgradnje sporočilne RNA (mRNA). Če so vpletene v kontrolo izražanja protoonkogenov ali tumor supresorskih genov v primeru mutacije predstavljajo

potencialno nevarnost za razvoj raka. V procesu karcinogeneze je najpomembnejša prva faza, kjer pride do irreverzibilne spremembe na DNA (mutacije) in s tem nastane inicirana celica, ki se pod vplivom dodatnih mutacij ali promocijskih dejavnikov lahko razvije v tumor, saj so vedno vse celice v tumorju potomke ene same, začetne celice.

Leta 2000 sta Hanahan in Weinberg (Hanahan in Weinberg, 2000) predstavila model (slika 1), v katerem trdita, da mora vsaka celica na svoji poti transformacije iz normalne, nenevarne celice pridobiti šest lastnosti, da postane potencialno nevarna. Vsak rak je pravzaprav skupek celic, ki se nenormalno delijo in s tem prevzemajo prostor in hranilne snovi ostalim normalnim celicam ter se mnogokrat tudi širijo naprej. Da lahko celica izstopi iz ustaljenega načina delovanja in kontrole v organizmu mora pridobiti naslednje lastnosti:

1. samozadostnost v proizvodnji rastnih signalov;
2. neobčutljivost na zaviralce rasti;
3. izogibanje celični smrti;
4. pridobitev zmožnosti neomejenega podvojevanja;
5. vzpostavitev stalne tvorbe žil, potrebnih za rast tumorja;
6. sposobnost invazije v tkiva in metastaziranja (tvorbe zasevkov preko celic, ki se odcepijo od glavnega tumorja in na različne načine potujejo po organizmu).

Zaporedje pridobivanja teh lastnosti ni določeno in se lahko zelo razlikuje med različnimi tipi raka (slika 1).

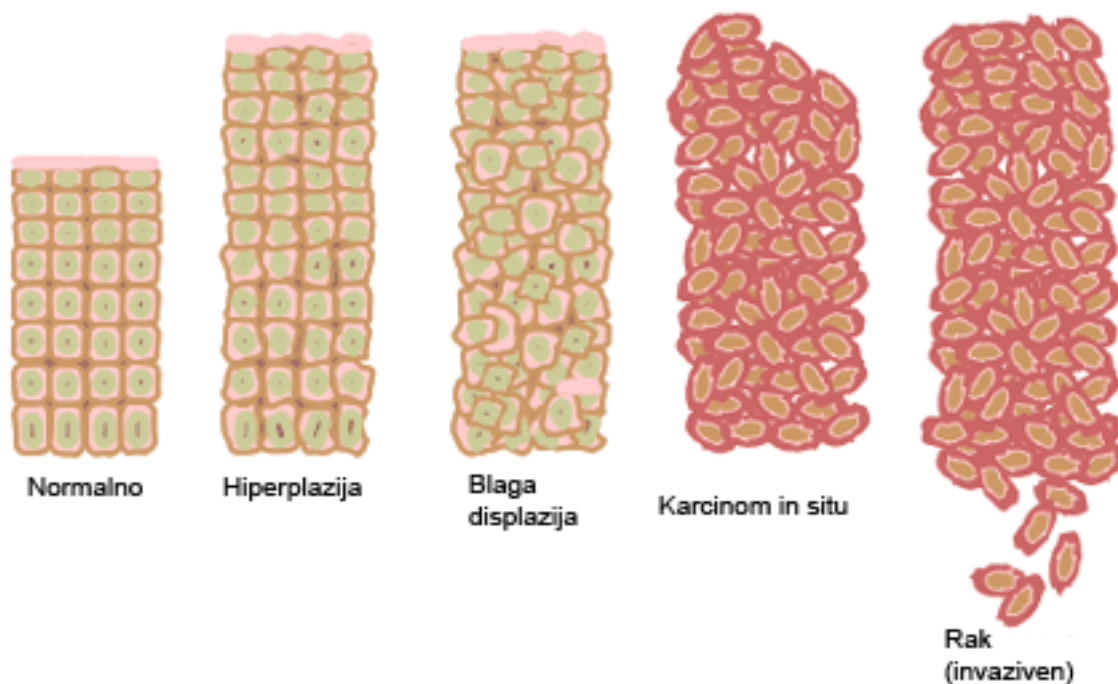


Slika 1: Paralelne poti nastanka tumorja (Hanahan in Weinberg, 2000)

V trenutku, ko se začne celica nekontrolirano deliti in tvoriti tumor, se lahko na podlagi histologije določi stopnjo napredovanja raka, ker so v sami strukturi tako celice kot tkiva vidne spremembe. Lahko se spremenijo velikost celičnega jedra, oblika in velikost celic, izgubijo se nekatere funkcije, ki so se razvile v času diferenciacije, ravno tako se na nivoja tkiva opazi hitra rast, izguba oblike in nejasnost meje tumorja. Med razvojem rakave celice v čvrsti tumor so vidne štiri značilne stopnje (Čemazar, 2005) (slika 2):

- hiperplazija, kjer je opazna spremenjena, nekontrolirana celična delitev, vendar so celice še normalne; hiperplazija se še lahko povrne v prvotno stanje;
- displazija, kjer celice niso več normalne, tkivo lahko izgubi svojo organiziranost, rast in delitev celic je zelo povečana in nenormalna, vendar je pri displaziji še vedno možen povratek v normalno stanje;

- karcinom in situ, kjer je opazna dediferenciacija celic, vendar so še vedno na enem samem mestu;
- rak, kjer je opazna invazija v sosednje tkivo in metastaziranje (zasevanje).



Slika 2: Stopnje v razvoju tumorja (Čemažar, 2005)

## 2.1 Vrste raka

Poznamo dve vrsti tumorjev, in sicer maligne (rakave) in benigne (nerakave). Samo v prvem primeru obstaja resna nevarnost za organizem, saj se lahko maligni tumorji hitro širijo v sosednja tkiva, z metastaziranjem tvorijo nove tumorje na oddaljenih lokacijah in postanejo življenjsko nevarni. Za maligne tumorje je značilno, da so vse celice potomke ene same začetne celice, ki je pridobila vse potrebne lastnosti za razvoj raka, zato lahko poimenujemo tipe raka glede na izvor te celice. Tako poznamo hematološke tipe raka (npr. levkemija, limfomi), ki izvirajo iz krvnih celic in kostnega mozga; sarkome, ki izvirajo iz vezivnega tkiva; melanome, ki nastanejo iz melanocit; teratome, ki so potomci spremenjenih zarodnih celic, in karcinome, ki

izvirajo iz epitelnih celic (Čemažar, 2005). Poleg tega pri poimenovanju upoštevamo tudi mesto nastanka primarnega tumorja, tako da dobimo sestavljeno ime (npr. karcinom debelega črevesa), ki nam pove tako vrsto celic, iz katere se je tumor razvil, kot njegovo mesto nastanka.

## 2.2 Pojavnost raka

Incidenca ali pojavnost raka narašča s starostno dobo, kar danes, ko se pričakovana življenjska doba podaljšuje, pomeni vedno več primerov te bolezni. Leta 2006 je bilo v Sloveniji odkritih 11046 novih primerov raka (Incidenca raka v Sloveniji 2006, 2009), napovedi za prihodnost pa predvidevajo samo še povečanje tega števila, kar kaže, da je danes rak še kako prisoten med nami. V celotni slovenski populaciji so najpogostejše maligne neoplazme kože (brez melanoma), na drugem mestu je rak na sapniku, sapnici in pljučih, na tretjem pa je že rak debelega črevesa (Incidenca raka v Sloveniji 2006, 2009).

## 2.3 Zdravljenje

### 2.3.1 Klasične metode

#### 2.3.1.1 Kirurgija

Prva metoda, ki se je razvila za zdravljenje raka, je bila kirurgija. Z izrezovanjem rakavega tkiva iz organizma se še vedno najlažje in tudi najučinkovitejše odstrani maligne tumorje. Problem nastopi, kadar se je rak razvil že do stopnje, ko se začne širiti v sosednja tkiva in metastazirati, saj je potem težko odstraniti popolnoma vse rakave celice (metastaze), ki so se razvile na večih mestih v telesu.

### 2.3.1.2 Radioterapija

Drugi pristop k zdravljenju predstavlja uporaba radioaktivnega sevanja v terapevtske namene (radioterapija), poskušamo lokalno dovesti radioaktivne žarke z zadostno energijo, ki lahko direktno ali pa s prostimi radikali nastalimi zaradi sevanja povzročijo poškodbe DNA, (Tannock in sod., 2005). Cilj radioterapije je poškodovati čim več rakavih celic in povzročiti čim manjšo škodo okoliškemu tkivu. Metoda je mnogokrat učinkovitejša od kirurgije, kadar je rak že napredoval do te stopnje, da se je začel širiti v okoliška tkiva in metastazirati.

### 2.3.1.3 Kemoterapija

Kot zadnjo klasično metodo zdravljenja se uporablja kemoterapijo, pri kateri sistemsko vnesemo zdravilo, ki preprečuje podvajanje DNA ali pa določene procese med delitvijo celic (Tannock in sod., 2005). Sicer kemoterapija učinkuje na vse celice v organizmu, vendar je večji vpliv pri rakavih celicah, ker je pri njih hitrost delitve celic hitrejša kot pri normalnih celicah. Dobra stran kemoterapije je, da deluje tudi na mikrometastaze, ki se jih pri pacientu ne da odkriti z obstoječimi slikovno diagnostičnimi metodami.

## 2.3.2 Novejše metode

### 2.3.2.1 Imunoterapija

#### 2.3.2.1.1 Aktivna imunoterapija

Pri aktivni imunoterapiji se poskuša vzpodbuditi organizmu lasten protitumorski odziv *in vivo* z vnosom letalno poškodovanih rakavih celic ali pa vnosom antigen

predstavitvenih celic, ki organizmu predstavijo tumorske antigene, da jih lahko imunski sistem prepozna pri rakavih celicah (Tannock in sod., 2005).

#### 2.3.2.1.2 Pasivna imunoterapija

Pri pasivni imunoterapiji poskušamo z *in vitro* proizvedenimi monoklonskimi protitelesi, citokini ipd. vplivati na odgovor telesa na rakave celice (Tannock in sod., 2005).

### 2.4 Genska terapija raka

Gensko zdravljenje/terapija pomeni način zdravljenja z odpravo vzroka neke genetske bolezni. Danes je v teku več kot 1000 kliničnih študij genske terapije, od tega kar 67 % za zdravljenje raka (<http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical>).

Pri genski terapiji raka poskušamo z vnosom terapevtskega gena v tarčno tkivo sprožiti izražanje tumor supresorskih genov, utišati izražanje dominantnih onkogenov, spodbuditi imunski odziv oz. sprožiti imunogenost tarčnega tkiva, aktivirati delovanje encimov za nastanek citotoksičnih produktov, delovati antiangiogeno ali onkolitično. Med terapevtske gene, ki so se izkazali za zelo učinkovite v predkliničnih raziskavah in so prešli v klinične raziskave, sodijo (Kesmodel in Spitz, 2003; Palmer in sod., 2006).

- tumor supresorski gen *p53*;
- anti-sense oligonukleotidi in siRNA-molekule, ki s specifično vezavo na tarčno mRNA onkogeno inhibirajo njegovo izražanje (npr. *Her-2/neu*, *cyclin-E*, *c-myc*);

- geni za interlevkine (*IL-2*, *IL-4*, *IL-12*), *HLA-B7* in *MHC*, ki spodbudijo protirakavi imunski odgovor;
- gen za timidin kinazo virusa *Herpes simplex*, ki v tarčnih celicah aktivira sistemsko vnesen ganciklovir (GCV), aktiven GCV pa vpliva na inhibicijo sinteze DNA v delečih se celicah; ter
- onkolitični adenovirus ONYX-015 in virus *Herpes simplex* G207, ki z delitvami samo v tumorskih celicah povzročita lizo celic, spodbudita imunski odziv na tumorske celice ali med delitvijo sprožita nastanek toksičnih produktov.

Večina kliničnih študij z omenjenimi terapevtskimi geni je v fazi I, I/II ali II kliničnih raziskav (Edelstein in sod., 2007)

Trenutno naše zadovoljevanje zahtev genske terapije raka (Mitrovic, 2003; Nishikawa in Huang, 2001; Rochlitz, 2001) še ni dovolj dobro, da bi le-ta lahko postala del splošne klinične prakse. Zahteve, katerim je potrebno ustrezno zadovoljiti, so:

- direkten, tkivno specifičen vnos genov z visokim nivojem transfekcije;
- regulacija izražanja vnesenega gena;
- terapevtska učinkovitost ter
- minimalna toksičnost za normalna tkiva.

#### **2.4.1 Vnosni sistemi**

Pri izpolnjevanju zahtev genske terapije ima pomembno vlogo način vnosa terapevtskega gena. Do danes je bilo razvitih že veliko različnih vnosnih sistemov, ki pa imajo vsak svoje prednosti, pa tudi pomanjkljivosti.

Poznamo virusne in nevirusne načine vnosa. Med virusnimi načini vnosa se uporabljajo vektorji, ki niso zmožni podvojevanja (retrovirusni, lentivirusni,



adenovirusni in adenovirusu sorodnimi vektorji), ter onkolitični vektorji (podvojevanja zmožni adenovirusni vektorji in Herpes simplex virus (HSV)). Pri uporabi virusnih vektorjev lahko računamo na visoko specifičnost in učinkovitost vnosa ter možnost stabilne vgradnje v genom inficiranih celic. Seveda pa imajo tudi določene slabosti, kot sta možnost nastanka insercijske mutageneze in aktivacija gostiteljevega imunskega sistema (Kesmodel in Spitz, 2003; Mitrovič, 2003).

Kljub manjši specifičnosti in slabši učinkovitosti vnosa v tarčna tkiva predstavljajo z vidika zdravstvene varnosti bolnikov nevirusni načini vnosa genov boljše alternativo. Za nevirusni vnos genov se uporabljajo gole nukleinske kisline (plazmidna DNA, oligonukleotidi, kratke interferenčne RNA (siRNA), dvovertična DNA), za boljše zaščito genskega materiala pred serumskimi nukleazami in za boljše interakcijo s celično površino pa še pogosteje uporabljajo poliplekse (kompleksi nukleinskih kislin in polikationskih polimerov, kot so polilizini, polietilenamini ali poliamidoaminski dendrimeri), lipoplekse (kompleksi nukleinskih kislin in kationskih lipidov) in nanoplekse (kompleksi nukleinskih kislin in nanodelcev, kot so nanocevke, liposomi, dendrimeri, superparamagnetni nanodelci) (Pathak in Katiyar, 2007; Russ in Wagner, 2007). K povečanju specifičnosti nevirusnih načinov vnosa pripomorejo kemične modifikacije prenašalnih molekul ter fizikalne metode, kot so elektroporacija, magnetofekcija, ultrazvok, hipertermija in tehnika »gene gun« (Niidome in Huang, 2002; Russ in Wagner, 2007).

## 2.5 Elektroporacija

Vsako celico obdaja celična membrana iz lipidnega dvosloja, ki je polprepustna in omogoča selektivno izmenjavo med celico in okoljem majhnim nepolarnim molekulam in tistim snovem, za katere obstaja specifičen mehanizem transporta s proteinskimi nosilci, črpalkami ali molekulskimi izmenjevalci. Ugotovili so, da izpostavitve celic električnemu polju dovolj visoke jakosti privede do strukturnih

sprememb celične membrane in s tem do povečanja njene prepustnosti tudi za snovi, ki drugače ne morejo vstopati v celico. Pojav so poimenovali elektropermeabilizacija oz. elektroporacija (Neumann in sod., 1982; Neumann in Rosenheck, 1972). Še vedno ni jasno, ali je povečanje prepustnosti membrane posledica nastanka por v membrani, kar sicer potrjujejo tako teoretične razlage kot tudi simulacije molekularne dinamike lipidnih dvoslojev (Kakorin in sod., 1996; Neumann in sod., 2000; Tarek, 2005; Tieleman, 2004; Weaver in Chizmadzhev, 1996) ali česa drugega.

Z izpostavitvijo celic električnemu polju visoke jakosti lahko vnašamo v celice tudi molekule, ki slabo ali ne prehajajo skozi membrano. Učinkovitost vnosa molekul je odvisna od velikosti molekul in od učinkovitosti elektroporacije, na katero vplivajo tako električni parametri kot tudi lastnosti celic in zunajceličnega okolja. Kaj se zgodi pri elektroporaciji, lahko poenostavljeno opišemo z enačbo (1), ki pravi, da je velikost spremembe transmembranske potencialne razlike ( $\Delta V_m$ ) odvisna od oblike celic ( $f$ ), prevodnosti medija  $g$  ( $\lambda$ ), velikosti celice ( $r$ ), jakosti zunanjskega električnega polja ( $E$ ) (razmerje med amplitudo in razdaljo med elektrodama v homogenem celičnem sistemu) ter kosinusa kota ( $\theta$ ) med smerjo električnega polja ter daljico, ki povezuje središče celice in obravnavano točko na membrani (Bernhardt in Pauly, 1973; Teissie in sod., 2008).

$$\Delta V_m = f \times g(\lambda) \times r \times E \times \cos \theta \quad \dots (1)$$

Prepustnost in prevodnost celične membrane se močno povečata šele, ko jakost zunanjskega električnega polja  $E$  preseže kritično vrednost, ki v različnih pogojih znaša med 200 mV in 1 V. V primeru previsokega električnega polja nastopi trajna destabilizacija celične membrane in s tem smrt celic (ireverzibilna elektroporacija). Kadar želimo vnesti v celice različne molekule, težimo k temu, da pri izpostavitvi celic električnemu polju elektroporiramo čim večje število celic in hkrati ohranimo njihovo viabilnost (reverzibilna elektroporacija). Intenzivnost elektroporacije nadzorujemo s

pravokotnimi električnimi pulzi, s katerimi poleg amplitude pulza definiramo tudi trajanje, število ter ponovitveno frekvenco pulzov (Kotnik in sod., 2005).

Teoretične in praktične raziskave na nivoju ene same celice so pokazale, da je vsiljena transmembranska napetost na različnih delih membrane različna, kritična vrednost, ki privede do elektroporacije, pa je najprej presežena na straneh celice, ki ležijo v smeri proti elektrodama ( $\theta = 0$  in  $\theta = 180^\circ$ ) (Rols, 2006a). Ugotovili so tudi, da je v primerjavi z manjšimi celicami povečana prepustnost membrane večjih celic dosežena pri nižjih jakostih električnega polja (Teissie in sod., 1999). V homogenem celičnem sistemu, kot je celična suspenzija, je električno polje skoraj homogeno porazdeljeno. Njegova jakost je približno enaka razmerju med napetostjo in razdaljo med elektrodama, vendar pa pri dani vrednosti električne poljske jakosti število elektroporiranih celic upada z naraščajočo gostoto celic, kar je posledica interakcij med celicami (Pavlin in sod., 2002; Pucihar in sod., 2007; Susil in sod., 1998). Na učinkovitost elektroporacije celic v suspenziji vplivata tudi oblika in orientacija celic. Elektroporacija podolgovatih celic je večja, kadar so orientirane tako, da daljša stranica leži vzporedno s smerjo električnega polja (Valic in sod., 2003).

V kompleksnejših in manj urejenih celičnih sistemih, kot so tkiva in organi, na učinkovitost elektroporacije dodatno vplivajo še električna prevodnost tkiva, velikost in strukturne lastnosti tkiva, razporeditev in jakost električnega polja v nehomogenem tkivu, pa tudi interakcije celic s komponentami ekstracelularnega matriksa (Mesojednik in sod., 2007; Miklavčič in Puc, 2006).

Elektroporacija je dandanes razširjena metoda, ki se uporablja v mnoge različne aplikativne namene, in sicer za transfekcijo genov, pripravo monoklonskih protiteles, za vnos specifičnih inhibitorjev, znotrajcelične encimske aktivnosti ter zdravilnih učinkovin (Miklavčič in Puc, 2006). Zadnje čase je elektroporacije zelo uporabna v onkologiji pri zdravljenju kožnih in podkožnih metastaz (Serša in sod., 2008a; Serša in sod., 2008b).

## 2.5.1 Uporaba elektroporacije v onkologiji

### 2.5.1.1 Elektrokemoterapija

Izkazalo se je, da nekateri zelo citotoksični kemoterapevtiki težko ali sploh ne prehajajo skozi membrano celic, zato so za doseg citotoksičnega učinka na rakavih celicah potrebne večje doze, kar pa ima neželene učinke tudi na normalne, zdrave celice. Elektroporacija se je izkazala kot odlična rešitev za vnos tovrstnih kemoterapevtikov v celice tumorja, saj se na mestu, kamor dovedemo električne pulze, njihova citotoksičnost večkrat poveča, s tem pa se poveča tudi njihova protitumorska učinkovitost. Vnos kemoterapevtikov v celice s pomočjo elektroporacije imenujemo elektrokemoterapija.

#### 2.5.1.1.1 Predklinične raziskave elektrokemoterapije

Prvi poskusi elektrokemoterapije segajo v konec 80-ih let, ko so Okino in Mohri ter leto kasneje Mir in sodelavci pokazali, da na mestu delovanja električnih pulzov pride do povečanega vnosa kemoterapevtika bleomicina v celice, s čimer je dosežen povečan citotoksičen učinek tega kemoterapevtika na celice tako *in vitro* kot tudi *in vivo* (Mir in sod., 1988; Okino in Mohri, 1987).

V času raziskav se je izkazalo, da sta citostatika bleomicin in cisplatin med najbolj primernimi molekulami za učinkovito elektrokemoterapijo. Citotoksičen učinek bleomicina v *in vitro* pogojih je bil do nekaj 1000× višji, cisplatina pa do 80× višji po elektroporaciji celic v primerjavi z delovanjem samega citostatika na celice brez uporabe elektroporacije (Čemažar in sod., 1998; Gehl in sod., 1998; Jaroszeski in sod., 2000; Melvik in sod., 1986; Orlowski in sod., 1988; Serša in sod., 1995). Raziskave *in vivo* so pokazale, da je elektrokemoterapija učinkovita pri zdravljenju nasajenih ali spontanah tumorjev, zraslih v podkožju, v mišicah, v možganih ali v jetrih eksperimentalnih živali (Mir in sod., 1995; Rols in sod., 2002; Serša, 2000).

#### 2.5.1.1.2 Klinične raziskave elektrokemoterapije

Po uspešnih predkliničnih raziskavah je prva klinična raziskava elektrokemoterapije potekala na bolnikih s kožnimi metastazami tumorjev glave in vratu (Mir in sod., 1991b). Rezultati te raziskave so pokazali učinkovit protitumorski učinek bleomicina v kombinaciji z elektroporacijo, kar je h kliničnim raziskavam na tem področju spodbudilo tudi mnoge druge raziskovalce, ki so poskušali aplicirati elektrokemoterapijo tudi na druge vrste raka (Belehradek in sod., 1993; Domenge in sod., 1996; Glass in sod., 1996; Glass in sod., 1997; Heller, 1995; Heller in sod., 1996; Heller in sod., 1998; Kubota in sod., 1998; Mir in sod., 1991a; Rodriguez-Cuevas in sod., 2001; Rols in sod., 2000; Rudolf in sod., 1995; Serša in sod., 1998; Serša in sod., 2000a; Serša in sod., 2000b).

Današnja elektrokemoterapija je omejena na zdravljenje kožnih in podkožnih metastaz različnih vrst tumorjev in se v teh primerih uspešno uporablja kot del splošne klinične prakse, ko so standardne vrste zdravljenja izčrpane.

#### 2.5.2 Elektrogenska terapija

Po uspehih z elektrokemoterapijo so začeli razmišljati o uporabi elektroporacije kot metode za vnos genov v tarčne celice. V zadnjem času je to področje zelo aktualno, saj je v teku mnogo predkliničnih raziskav elektrogenske terapije raka. Največkrat se z elektroporacijo vnaša gola plazmidna DNA, saj se je izkazalo, da je učinkovitost električno posredovanega vnosa genskega materiala v kombinaciji z lipopleksi ali poliplexi manjša (Čemažar in sod., 2002; Wells in sod., 2000).

### 2.5.2.1 Predklinične raziskave elektrogenske terapije raka

Prvi uspešen vnos genov s pomočjo elektroporacije (elektrotransfekcija) v celice *in vitro* je bil že leta 1982 (Neumann in sod., 1982), za vnos genov *in vivo* pa se uporablja od leta 1991 (Titomirov in sod., 1991). Predklinične raziskave elektrotransfekcije potekajo na nivoju ene same celice, v celičnih suspenzijah in na različnih tarčnih tkivih eksperimentalnih živali. Za lažje spremljanje učinkovitosti transfekcije se uporabljajo reporterski geni (gen za zeleno fluorescirajoči protein GFP, luciferazo,  $\beta$ -galaktozidazo), fluorescentno označena DNA, v zadnjem času pa se vnašajo tudi že terapevtski geni (Čemažar in sod., 2006; Čemažar in Serša, 2007; Golzio in sod., 2002; Hirons in sod., 1994; Rols, 2006a).

Raziskave so pokazale, da DNA v električnem polju ne prehaja skozi celično membrano po principu difuzije, temveč da nanjo deluje elektroforetska sila, s pomočjo katere se prenese skozi membrano in difundira proti jedru celice (Golzio in sod., 2002; Rols, 2006a). Učinkovitost vnosa DNA v celični suspenziji je tako odvisna predvsem od učinkovitosti elektroporacije, ta pa je odvisna od različnih dejavnikov: prevodnosti medija, parametrov električnih pulzov ter od velikosti, oblike, orientacije in gostote celic (Golzio in sod., 2004). Učinkovitost elektrotransfekcije je ponavadi med 10–30 %, postopek pa preživi 50–70 % celic, odvisno od tipa ter velikosti celic in količine vnesene DNA (Čemažar in sod., 2002; Čemažar in sod., 2003; Rols in sod., 1998b). Kadar elektrotransfekcijo uporabljamo na tkivih, na učinkovitost vnosa DNA v celice vplivata tudi razporeditev DNA v tkivu ter prisotnost DNaz. Elektrotransfekcijo so raziskovali že na različnih tkivih, in sicer na mišicah, tumorjih, koži, jetrih, vranici, testisih, roženici in hrustancu (Prud'homme in sod., 2006).

### 2.5.2.1.1 Električno posredovan vnos genov v tumorje

Vnos genov v tumorsko tkivo s pomočjo elektroporacije je učinkovit, kar so pokazale raziskave z reporterskimi in terapevtskimi geni (Bettan in sod., 2000; Čemažar in sod., 2002; Heller in sod., 2000; Lohr in sod., 2001; Rols in sod., 1998a). Izražanje vnesenih genov v večini primerov traja le od enega do dveh tednov, kar je verjetno posledica hitrodelečih se tumorskih celic. Kljub temu so raziskave s terapevtskimi geni za interlevkine (*IL-12*, *IL-18*, *IL-2*), *INF- $\alpha$* , *timidin kinazo*, *p53*, ter genov, ki specifično utišajo onkogene ali mutirane tumor supresorske gene, dokazale, da je elektrogenska terapija z intratumorskim vnosom plazmidne DNA učinkovita metoda za zdravljenje raka. Rezultati teh raziskav govorijo o protitumorskem učinku omenjenih terapevtskih genov, kar se v večini primerov odraža v zaustavitvi rasti tumorjev, nekatere raziskave pa poročajo celo o njihovi popolni ozdravitvi (Čemažar in sod., 2003; Grošel in sod., 2006; Heller in sod., 2006; Mir in sod., 2005).

Mnenja raziskovalcev o optimalnih električnih parametrih za uspešen intratumorski vnos genskega materiala s pomočjo elektroporacije so zelo različna, kar je verjetno posledica uporabe različnih protokolov in materiala. V raziskavi iz leta 1998 so v mišji model melanoma B16F1 intratumorsko injicirali 12  $\mu\text{g}$  plazmidne DNA za  $\beta$ -galaktozidazo, nato pa uporabili 10 zaporednih 5 ms dolgih električnih pulzov s frekvenco 1 Hz, pri napetosti 700–900 V/cm. Delež transfeciranih celic (uspešnost transfekcije) je bila najvišja pri 800 V/cm, kjer je bilo 4 % tumorskih celic transfeciranih (Rols in sod., 1998a), medtem ko so v raziskavi Čemažarjeve in sodelavcev na štirih različnih tumorskih modelih (mišji melanom B16F1, podganji karcinosarkom P22, mišji sarkom SaF in humani karcinom mehurja T24) dosegli 1–3 % učinkovitost transfekcije po intratumorskem vnosu 50  $\mu\text{g}$  plazmidne DNA, ki kodira gen za zeleno fluorescirajoči protein (GFP), ob uporabi 8 zaporednih pulzov jakosti 600 V/cm, dolžine 5 ms, s frekvenco 1 Hz (Čemažar in sod., 2002). Iz rezultatov teh raziskav je razvidno, da je potrebno prilagoditi pogoje elektrotransfekcije izbranemu tumorskemu modelu in vnesenemu genu.

### 2.5.2.2 Klinične raziskave elektrogenske terapije raka

Kolikor vemo, trenutno potekata dve klinični raziskavi elektrogenske terapije z intratumorskim vnosom plazmidnih DNA, ki nosijo zapis za terapevtska gena *IL-12* (pIL-12) oz. *IL-2* (pIL-2) (<http://clinicaltrials.gov>). Obe raziskavi sta v fazi I kliničnih raziskav, v kateri se spremljajo varnost, toleranca in učinek nove terapije. Klinična raziskava elektrogenske terapije s pIL-12 poteka od leta 2003 in na podlagi dobrih vmesnih rezultatov iz raziskav faze I že načrtujejo prehod k raziskavam klinične faze II (Daud in sod., 2008). V drugi raziskavi elektrogenske terapije s pIL-2, ki je potekala od leta 2005, so dokazali, da je terapija varna in dobro tolerirana pri bolnikih, ki so bili predhodno uspavani, vendar ker odgovori na terapijo ne dosegajo kriterijev RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), trenutno še ne razmišljajo o nadaljevanju kliničnih raziskav v fazo II ([http://www.vical.com/products/cancer\\_therapies/other\\_cancer\\_programs.htm](http://www.vical.com/products/cancer_therapies/other_cancer_programs.htm)).

## 2.6 RNA interferenca (RNAi)

### 2.6.1 Odkritje interferenčne RNA

Prve raziskave, ki so pripeljale do odkritja interferenčne RNA, so bile izvedene na petunijah leta 1990, ko sta si Napoli in Jorgensen prizadevala vzgojiti močno vijolične petunije. V ta namen sta v rastlinske celice vnesla večje količine gena za halkon sintazo, ki je ključni encim v biosintetski poti vijoličnega pigmenta za barvo cvetov, kar je povzročilo nastanek petunij z belimi cvetovi (Napoli in sod., 1990). Ozadje te zgodbe sta leta 1998 razkrila Fire in Mello, ki sta s poskusi na *Caenorhabditis elegans* primerjala učinkovitost utišanja tarčne mRNA s kratkimi nasprotismiselnimi RNA (antisense RNA), smiselnimi oz. kodirajočimi RNA (sense RNA) in dvoverižnimi RNA (dsRNA, double strand RNA) z ujemajočimi se (homolognimi) nukleotidnimi zaporedji glede na tarčno mRNA. Ugotovila sta, da je učinkovitost utišanja tarčne mRNA z dsRNA 10-100× večja od utišanja z enoverižnimi molekulami RNA (ssRNA,

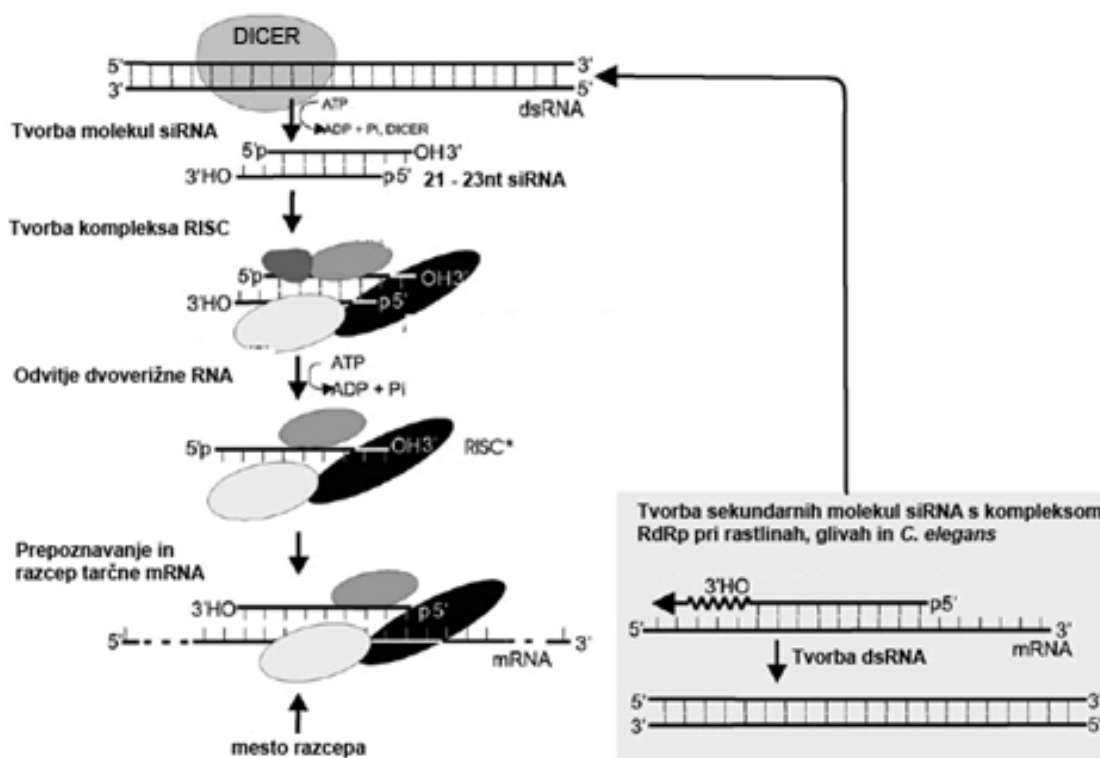


single strand RNA), in da je delovanje ssRNA možno le, kadar sta obe homologni ssRNA injicirani v celice ena za drugo, kar zopet vodi v nastanek dsRNA (Fire in sod., 1998). Temu odkritju je v prihodnjih letih sledilo odkrivanje mehanizma delovanja utišanja molekul mRNA preko dsRNA. Andrew Z. Fire in Craig C. Mello sta za svoje delo – odkritje dsRNA vpletenih v t. i. mehanizem RNAi (ang. RNA interference) – leta 2006 prejela Nobelovo nagrado na področju fiziologije oz. medicine.

### 2.6.2 Mehanizem delovanja RNAi

Delovanje RNAi se sproži s prisotnostjo dvoverižne RNA v citoplazmi celice (slika 3). Takšno RNA molekulo prepozna encim Dicer, ki sodi v družino RNA endonukleaz III. Dicer razreže dvoverižno RNA molekulo na 21–25 nukleotidov dolge fragmente, ki se imenujejo kratke interferenčne RNA molekule (siRNA – ang. short interference RNA), le-te se vežejo na ribonukleazni kompleks RISC (RNA sprožen utiševalni kompleks – ang. RNA induced silencing complex), ki se aktivira z razvitjem dsRNA in odstranitvijo ene od obeh verig dsRNA. Pri tem se porablja energija v obliki molekul ATP. Druga veriga RNA se veže na kompleks in služi kot vodič, ki privede kompleks RISC do homologne tarčne mRNA. RNA nukleaza ob vezavi protismiselne siRNA na tarčno mRNA v okviru kompleksa RISC razcepi tarčno mRNA, novonastale manjše kose mRNA (oligonukleotide) pa nato razgradijo druge nukleaze. S tem je preprečena biosinteza proteinov, katerih zapis so nosile razgrajene tarčne mRNA. Po razgradnji mRNA kompleks RISC-RNA razpade na proteinske podenote in protismiselno RNA. Proteini kompleksa RISC se lahko ponovno uporabijo v novem ciklu, protismiselna RNA pa ima glede na vrsto organizma različno usodo. Pri sesalcih in vinskih mušicah se lahko ponovno vgradi v kompleks RISC in nadaljuje z delovanjem, pri rastlinah, glivah in glistah pa se najprej pomnoži, in sicer tako, da se poveže z encimom RdRP (od RNA odvisne RNA polimeraze – ang. RNA dependent RNA polymerase) in s tarčno mRNA, od tu naprej encim na matrični mRNA podaljšuje protismiselno RNA tako, da nastane dolga dvoverižna RNA. Tako nastale

dvoverižne RNA prepozna encim Dicer in jih razreže na nove fragmente siRNA, ki so specifični za različne dele iste tarčne mRNA. Ta pomnožitveni korak omogoča širjenje siRNA v sosednje celice in s tem povzroči specifično in dolgotrajno utišanje tarčnega gena v večini celic organizma (Agami, 2002; Novina in Sharp, 2004; Szweykowska-Kulinska in sod., 2003). S tem odkritjem je postalo jasno, kako je lahko vstavljanje dodatnih kopij gena, ki kodira encim za proizvodnjo pigmenta, v rastlinske celice petunij povzročilo nastanek belih namesto močno vijoličnih cvetov petunij. Z dodajanjem genov za povečanje pigmenta v celicah petunij je nastala večja količina mRNA, encimski kompleks RdRP pa je ustvaril dsRNA, ki so utišale izražanje endogenov in na novo vpeljanih genov ter tako zmanjšale količino pigmentov v cvetovih petunij. Encimskega kompleksa RdRP pri višje razvitih organizmih (vretenčarjih) niso odkrili, prav tako pa raziskave kažejo, da interferenčni učinek na sesalskih celicah ni dolgotrajen – največ 4 do 5 dni po vnosu molekul siRNA v celice (Bartlett in Davis, 2006; Chiu in Rana, 2002).



Slika 3: Shematski prikaz mehanizma RNAi (Szweykowska - Kulinska in sod., 2003)

### 2.6.3 Pomen RNAi v naravi

RNAi je evolucijsko star mehanizem, prisoten v večini evkariontskih organizmov (Chapman in Carrington, 2007). Njegova vloga je pomembna pri obrambi organizma pred invazivnim učinkom tujkov, tako eksogenih (virusi) kot tudi endogenih (transpozoni) (Haasnoot in sod., 2003; Ketting in sod., 1999), kar je bilo dokazano pri rastlinah (Vance in Vaucheret, 2001; Voinnet, 2001; Waterhouse in sod., 1998) in tudi pri nižje razvitih živalih (Lu in sod., 2005; Wang in sod., 2006; Wilkins in sod., 2005; Zamboni in sod., 2006). Trenutno še ni znano, kako pomemben je ta mehanizem za vretenčarje, ki so tekom evolucije razvili kompleksen imunski obrambni sistem. Na sesalskih celičnih modelih je bilo celo ugotovljeno, da vnos dolge dsRNA sproži z interferoni posredovan imunski odgovor. Kljub temu je mehanizem RNAi dokazano prisoten tudi pri vretenčarjih, le da ga sprožijo interferenčne RNA molekule, ki so krajše od 30 nukleotidov – t. i. molekule siRNA in miRNA (mikro RNA) (Downward, 2004). Ena izmed prednosti molekul miRNA je, da lahko ciljajo več različnih, delno homolognih molekul mRNA, kar ne vodi v razgradnjo, temveč v inhibicijo translacije (Agami, 2002). Molekule miRNA so vpletene tudi v predtranskripcijsko utišanje izražanja genov preko metilacije histonov in DNA (Kawasaki in Taira, 2004; Morris in sod., 2004; Ronemus in Martienssen, 2005). Najnovejše raziskave delovanja miRNA pri človeku pa nakazujejo tudi na njihovo vlogo pri nastanku tumorjev ter deregulaciji celičnega cikla. Dokazano je bilo, da lahko miRNA pri človeku delujejo kot onkogeni ali kot tumor supresorski geni (Stahlhut Espinosa in Slack, 2006; Zhang in sod., 2007).

### 2.6.4 Uporaba RNAi

Prednost uporabe tehnologije RNAi v primerjavi s predhodnimi tehnikami utišanja tarčnih genov (ribocimi, antisense nukleotidi) je izrazita specifičnost delovanja ter možnost uporabe kombinacije različnih molekul siRNA hkrati, kar omogoča študij kompleksnih vzorcev izražanja genov v normalnem in bolezenskem stanju (Cullen in

Arndt, 2005; Ge in sod., 2005; Huesken in sod., 2005; Janitz in sod., 2006). Tehnologija RNAi se danes uporablja za zdravljenje in raziskovanje bolezni, kot so možganske motnje (Huntingtonova in Alzheimerjeva bolezen), vnetja (arthritis), sladkorne bolezni, smrtonosne virusne infekcije ter rak, pri katerih lahko z utišanjem odgovornih genov preprečimo bolezni ali ustavimo njeno napredovanje (Haasnoot in sod., 2003; Jana in sod., 2004; Ryther in sod., 2005; Scherer in Rossi, 2004).

#### 2.6.4.1 Perspektiva tehnologije RNAi pri zdravljenju raka

Bistvena prednost tehnologije RNAi v primerjavi s klasičnimi metodami zdravljenja raka je v specifičnosti delovanja na tarčne celice tkiva ali organa, kar je pri klasičnih metodah zdravljenja raka težko doseči.

Poleg specifičnosti delovanja je zanimiva tudi možnost uporabe več različnih molekul siRNA hkrati, s čimer lahko ciljamo različne gene, vpletene v nastanek in razvoj raka. Rezultati številnih raziskav so v pogojih *in vitro* pokazali zmanjšano rast in preživetje tumorskih celic zaradi z RNAi posredovanega utišanja različnih onkogenov in tumor-spodbujevalnih genov, kot so rastni in angiogeni faktorji ter njihovi receptorji (žilni endotelijski rastni faktor – VEGF, receptorji epidermalnega rastnega faktorja), telomeraz (hTR, hTERT), virusnih onkogenov (papiloma virusa E6 in E7) ali translokacijskih onkogenov (BCR-*abl*) (Izquierdo, 2005; Pai in sod., 2006; Ryther in sod., 2005). Ravno tako pa so dokazali učinkovitost delovanja RNAi tudi *in vivo*, kjer je delovanje RNAi vidno kot zaustavitev rasti tumorjev (Meyer in Wagner, 2006).

##### 2.6.4.1.1 Genska terapija z RNA interferenco proti *K-ras*

*K-ras* je membranski protein, ki v celici skrbi za prenos signala z receptorja za epidermalni rastni dejavnik (EGFR), do drugih proteinov, ki sodelujejo pri delitvi, apoptozi in diferenciaciji celic. Aktivira se le začasno, in sicer kot odgovor na signale EGFR. Pri mutirani različici gena *K-ras* je protein *K-ras* trajno aktiviran, kar vodi v

nekontrolirano delitev celic, dediferenciacijo celic, nastanek tumorja in metastaziranje (Salomon in sod., 1995).

Ugotovljeno je bilo, da ima pri raku trebušne slinavke kar 80 % bolnikov mutiran gen *K-ras* (Rozenblum in sod., 1997), pri raku črevesa in danke 30–60 % bolnikov (Brink in sod., 2003), pri nedrobnoceličnem raku pljuč 10 % (Suzuki in sod., 2006) ter pri ploščatoceličnem raku glave in vratu 5 % bolnikov (Weber in sod., 2003). S tega vidika je *K-ras* pomembna tarča za razvoj novih zdravil za zdravljenje raka (Downward, 2003). Brummelkamp je s sodelavci na humanem rakavem modelu trebušne slinavke v razmerah *in vitro* pokazal, da lahko pravilno izbrane molekule siRNA, katerih sekvenca sovpada z mutirano obliko *K-ras*, specifično utišajo onkogen *K-ras*, pri čemer pa ne vplivajo na izražanje divjega tipa *K-ras* (Brummelkamp in sod., 2002). Leta 2005 so Fleming in sodelavci predstavili fenotipske in molekularne spremembe rakavih celic trebušne slinavke *in vitro* po transfekciji z molekulami siRNA, specifičnimi za onkogen *K-ras*. Na dveh humanih celičnih linijah adenokarcinoma trebušne slinavke (Panc-1 in MiaPaca-2) so pokazali zmanjšano delitev rakavih celic (75 %), zmanjšano migracijo celic (70 %) ter zmanjšan potencial angiogeneze po utišanju onkogenega *K-ras* (Fleming in sod., 2005). Terapevtski učinek molekul siRNA, specifičnih za onkogen *K-ras* so pokazali tudi v študiji *in vivo* na humanih subkutanih in ortotopičnih tumorjih trebušne slinavke (Rejiba in sod., 2007). Trenutno še ni bilo objavljenih nobenih raziskav utišanja onkogenega *K-ras* pri drugih tipih raka.

#### 2.6.4.2 Načini vnosa interferenčnih molekul v tarčne celice oz. tkiva

Ker je učinkovitost utišanja tarčnih genov z molekulami siRNA odvisna od učinkovitosti vnosa interferenčnih molekul v tarčne celice, se testirajo različni načini vnosa. Raziskave so bile narejene z virusnimi (retrovirusni, adenovirusni in SV40 vektorji) in nevirusnimi načini vnosa (liposomi, polietilenamini, elektroporacija ter

nanodelci) (Bantounas in sod., 2004; Chiu in Rana, 2002; Devi, 2006; Grayson in sod., 2006; Thomas, 2005).

Poleg učinkovitosti vnosa je pomembno tudi trajanje delovanja vnesenih molekul. Utišanje tarčnih genov z molekulami siRNA je sicer zelo učinkovito (~ 90 %), vendar kratkotrajno (do en teden), kar je posledica njihove encimske razgradnje in razredčitve po več celičnih delitvah. Kratkotrajen učinek je možno delno preprečiti z uporabo sintetičnih shRNA ali miRNA, saj posnemajo endogene miRNA molekule, ki se nahajajo v jedru celice. Za vnos sintetičnih molekul shRNA ali miRNA v jedro je potreben virusni ali nevirusni vektor (plazmidna DNA). Prednost vektorsko posredovanega vnosa shRNA in miRNA v celice je ta, da vektor vstopi skozi citoplazmo v jedro, kjer se lahko tudi pomnožuje in se na ta način prenaša na hčerinske celice. Z uporabo vektorsko posredovanega vnosa miRNA ali shRNA lahko dosežemo dolgotrajnejše utišanje tarčnega gena, kar potrjujejo tudi številne raziskave tako *in vitro* kot tudi *in vivo* (Birmingham in sod., 2007; Brummelkamp in sod., 2002; Cullen, 2006; McAnuff in sod., 2007; McManus in sod., 2002; Mesojednik in sod., 2008; Paddison in sod., 2002).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 Izbira molekul siRNA, specifičnih za onkogen *K-ras*

Primerne kratke dsRNA (siRNA) nukleotidne sekvence za utišanje tarčnega gena smo izbrali s pomočjo programa na spletni strani Invitrogen (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) (slika 4). Na podlagi pristopne številke za tarčni gen program ponudi več potencialno učinkovitih molekul siRNA za utišanje tarčnega gena. Izbrali smo tri različne molekule siRNA (53, 111, 393) in jih testirali na celičnih linijah *in vitro*.

**Recommended siRNA**

Gene Name: KRAS      Accession: [BC013572.2](#)      GI: 34190317  
 Organism: Homo sapiens      Length: 1333      ORF Region: 148-714  
 Definition: Homo sapiens v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog,mRNA (cDNA clone MGC:8977 IMAGE:3878884), complete cds.  
 Sequence: BC013572.2

           Sort By: Start

**10 siRNA Sequences** (Up to 10 top scoring siRNA sequences are reported, sorted by the Start position and ranked as ★★★★★ to ★★☆☆☆ to indicate knockdown probability). Select the sequence to order and click "Continue".

Select	No.	Start	Sequence(DNA)	Region	GC%	Tuschl's pattern match <sup>*</sup>	Rank <sup>1</sup>
<input type="checkbox"/>	1	191	GCAAGAGTGCCTTGACGAT	ORF	52.64		★★★★★
<input type="checkbox"/>	2	199	GCCTTGACGATACAGCTAA	ORF	47.37		★★★★★
<input type="checkbox"/>	3	200	CCTTGACGATACAGCTAAT	ORF	42.11		★★★★★
<input type="checkbox"/>	4	247	CCAACAATAGAGGATTCT	ORF	42.11		★★★★★
<input type="checkbox"/>	5	258	GGATTCTACAGGAAGCAA	ORF	47.37	B	★★★★★
<input type="checkbox"/>	6	312	TCTCGACACAGCAGGTCAT	ORF	52.64		★★★★★
<input type="checkbox"/>	7	322	GCAGGTCATGAGGAGTACA	ORF	52.64	B	★★★★★
<input type="checkbox"/>	8	343	GCAATGAGGGACCACTACA	ORF	52.64		★★★★★
<input type="checkbox"/>	9	351	GGACCAGTACATGAGGACT	ORF	52.64		★★★★★
<input type="checkbox"/>	10	375	GGGCTTCTTTGTGATTT	ORF	36.85	BCD	★★★★★

Slika 4: Primer izpisa sekvenc siRNA v programu »BLOCK-iT™ RNAi DESIGNER – Invitrogen«, ki po zagotovilih proizvajalca v 90 % primerov vodijo do 70 % utišanja tarčnega gena.

## 3.2 Priprava plazmidnih vektorjev

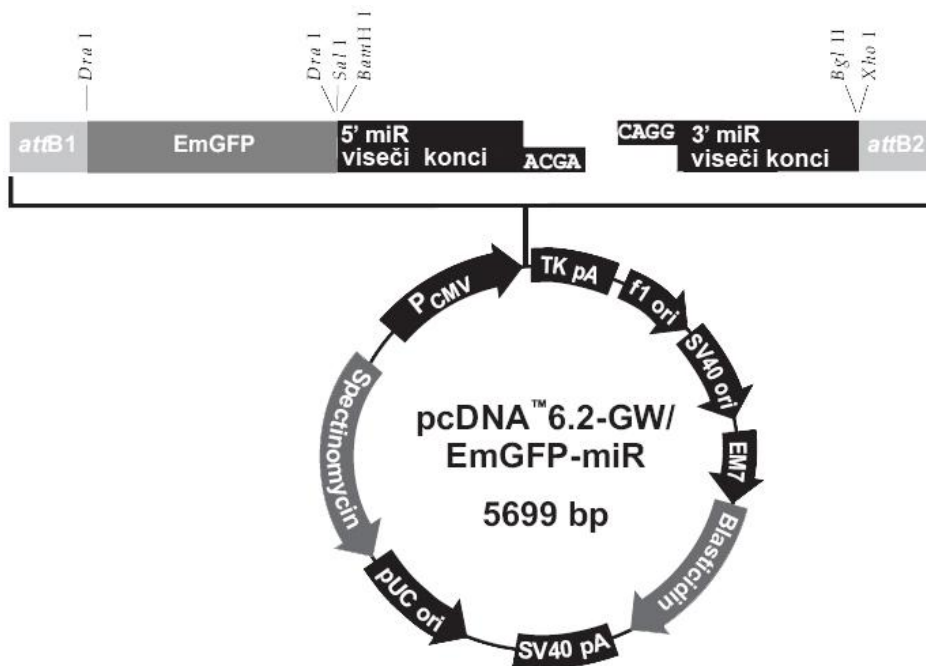
### 3.2.1 Plazmidne DNA

Kot vektorski sistem za vnos želenih genov v tarčne celice smo uporabili plazmidno DNA. Za ugotavljanje učinka delovanja terapevtskih molekul siRNA na rakave celice smo uporabili plazmidni vektor pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen, San Diego, ZDA), ki je v našem primeru kodiral za *K-ras* specifično miRNA. Kot negativno kontrolo smo uporabili plazmidni vektor pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/miR-ctrl (Invitrogen).

#### 3.2.1.1 pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR

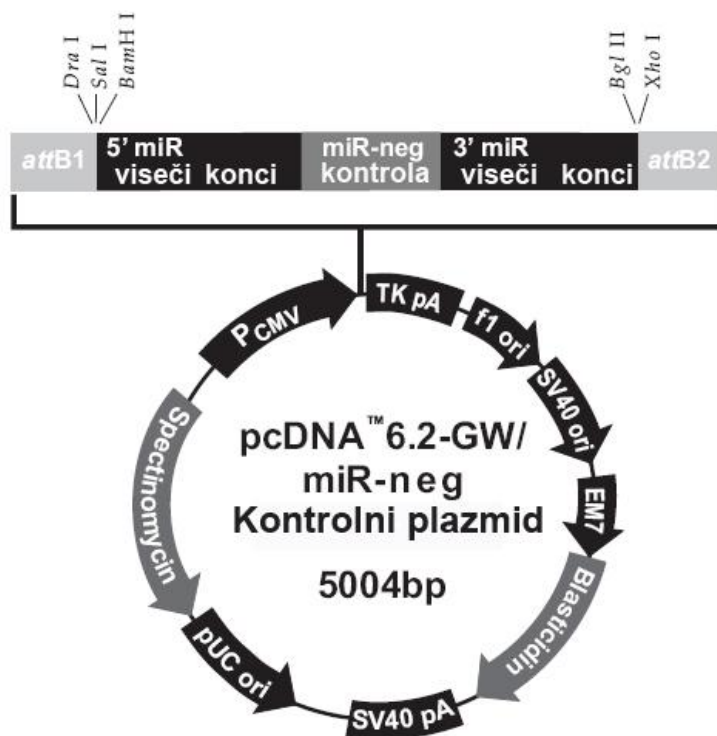
Komercialno dostopen plazmidni vektor pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen) pod kontrolo promotorja CMV kodira sintezo GFP in želenih molekul miRNA. GFP služi za spremljanje uspešnosti transfekcije, medtem ko molekule miRNA z izbranim nukleotidnim zaporedjem specifično delujejo na tarčne mRNA. Vektor vključuje nukleotidno sekvenco za rezistenco na spektinomycin, kar omogoča selekcijo v bakterijski kulturi (slika 5).



Slika 5: pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/EmGFP-miR

### 3.2.1.2 pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/miR-ctrl

Komercialno dostopen kontrolni plazmidni vektor pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/miR-ctrl (Invitrogen) pod kontrolo promotorja CMV kodira sintezo GFP in kontrolnih molekul miRNA. GFP služi za spremljanje uspešnosti transfekcije, medtem ko kontrolne molekule miRNA nosijo nukleotidno zaporedje, ki se ne prilega nikamor v genomu. Vektor vključuje nukleotidno sekvenco, ki kodira rezistenco na spektinomycin, kar omogoča rezistenco v bakterijski kulturi (slika 6).



Slika 6: pcDNA™6,2-GW/miR-ctrl

### 3.2.2 Namnožitev in izolacija plazmidne DNA

Za pridobivanje velikih količin plazmidne DNA (2,5 - 5,0 mg) smo bakterijske seve *E. coli* čez noč namnožili v 1,0 litru tekočega medija LB, kateremu smo dodali ustrezen antibiotik (spektinomycin: 50 µg/mL). Za izolacijo plazmidne DNA iz bakterij smo uporabili komplet *EndoFree Plasmid Mega Kit* (Qiagen, Hilden, Nemčija).

### 3.2.3 Ugotavljanje koncentracije in čistosti DNA

#### 3.2.3.1 Spektrofotometrija

Koncentracijo izolirane plazmidne DNA smo določali spektrofotometrično, z merjenjem absorbcije svetlobe pri valovni dolžini 260 nm. Ena enota absorbance

predstavlja 50 µg/mL dsDNA, iz česar sledi, da je koncentracija plazmidne DNA v vzorcu (µg/mL) enaka  $50 \times A_{260}$ . Prisotnost proteinov v vzorcih plazmidne DNA smo ovrednotili s primerjanjem absorbance pri 260 nm in 280 nm, pri čemer je vrednost  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$  predstavljala primerno čistost vzorcev.

### 3.2.3.2 Agarozna elektroforeza

Uspešnost izolacije in pravilno velikost plazmidne DNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (Priloga A). V jamice agaroznega gela smo nanесли 1 µg standarda λDNA/HindIII (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švica) ter po 0,5 µg plazmidne DNA, in sicer nerazrezane ter z restrikcijskim encimom *Hind* III (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA) razrezane plazmidne DNA (restrikcija: 0,5 µg plazmidne DNA, 1 µl HindIII, 10 µl restrikcijskega pufru, dH<sub>2</sub>O do končnega volumna 20 µl; inkubacija 3 ure pri 37°C). Elektroforeza je potekala v 1× TAE pufru pri napetosti 80 V. Po elektroforezi smo gel 20 minut inkubirali v raztopini z etidijevim bromidom (0,5 µg/mL). Na koncu smo gel izpostavili ultravijolični svetlobi valovne dolžine 300 nm in ga dokumentirali s kamero (BioRad, Hercules, ZDA). Na dobljeni gelski sliki smo iz velikosti fragmentov standarda preverili velikost nerazrezane in razrezane plazmidne DNA, pri čemer smo upoštevali, da se nerazrezana plazmidna DNA pojavlja v treh oblikah: kot superzvita, odprti krog in linearna oblika. Preverili smo tudi morebitno onesnaženje vzorca s kromosomsko DNA bakterij, ki se na sliki vidi kot temna sled poti vzorca.

## 3.3 Priprava plazmidne DNA z zapisom za miRNA-K-ras

S pomočjo programa »BLOCK-iT™ RNAi DESIGNER – Invitrogen« smo na osnovi izbrane sekvence siRNA za učinkovito utišanje onkogenega *K-ras*, izbrali enakovredno sekvenco dsDNA. Po postopku, opisanem v protokolu, priloženemu h kompletu BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen), smo pripravili 10 nM

dsDNA, jo ligirali s plazmidnim vektorjem pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/EmGFP-miR (iz kompleta BLOCK-iT<sup>TM</sup> Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen) v molarnem razmerju 15:1 ter ligacijsko mešanico transformirali v kompetentne bakterije *E. coli* TOP10. Kolonije, zrasle iz transformiranih bakterij na LB agarju z dodanim antibiotikom spektinomycin, smo namnožili v tekočem gojišču LB z dodanim spektinomycinom in izolirali plazmidno DNA s pomočjo kompleta *EndoFree Plasmid Mega Kit* (Qiagen).

Z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov (primerjev), priloženih kompletu BLOCK-iT<sup>TM</sup> Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen), in z metodo PCR smo v posameznih vzorcih pomnožili genski vključek, ki smo ga vstavili. Uspešnost pomnožitve in pravilno velikost posameznih PCR produktov smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Pred začetkom sekvenčne reakcije smo vzorce encimsko očistili z reagentom ExoSAP IT (USB, Cleveland, ZDA). S pomočjo kompleta »DNA 1000 Assay Kit« (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija) smo izmerili koncentracijo in določili čistost PCR produkta. Za sekvenčno reakcijo smo uporabili očiščen PCR produkt, primer (5'-3' ("forward primer") ali 3'-5' ("reverse primer")) in komplet »ABI PRISM Big Dye Terminator v1.1« (Applied Biosystems, Foster city, ZDA), ki poleg navadnih nukleotidov vsebuje različno fluorescentno označene dideoksinukleotide. Posamezne vzorce smo analizirali na sekvenatorju ABI 310 (Applied Biosystems). Izpis sekvence DNA vključka smo primerjali s sekvenco, dobljeno v bazi podatkov NCBI pod pristopno številko BC013572.2.

### 3.4 Poskusi na rakavih celičnih linijah *in vitro*

#### 3.4.1 Celične linije

V raziskavah *in vitro* smo uporabili rakavo celično linijo humanega adenokarcinoma debelega črevesa LoVo (ATTC, Rockville, ZDA; <http://www.lgcpromochem-atcc.com/>)

### 3.4.2 Elektroporator

Za elektroporacijo celic *in vitro* smo uporabljali elektroporator GT-1, ki je bil izdelan na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani.

### 3.4.3 Potek *in vitro* raziskav

V raziskavah smo spremljali učinkovitost delovanja molekul si/miRNA na tarčno mRNA, ki kodira *K-ras*, po lipotransfekciji z siRNA-*K-ras* in po električno posredovanem vnosu plazmidne DNA, ki kodira miRNA-*K-ras* (pmiRNA-*K-ras*). Na podlagi podatkov iz literature o pogostosti prisotnih mutacij gena *K-ras* pri raku debelega črevesa (v 30–60 % primerih) (Andreyev in sod., 1997; Minamoto in sod., 2000; Poehlmann in sod., 2007) smo kot tumorski model izbrali humano rakavo celično linijo debelega črevesa LoVo. Po podatkih, objavljenih v literaturi, se pri celični liniji LoVo mutacija gena *K-ras* pojavlja na kodonu 13 (Deng in sod., 2004; Gayet in sod., 2001; Ogino in sod., 2005). V nadaljevanju smo najprej testirali tri različne molekule siRNA (poglavje 3.1), ki smo jih z lipofektaminom posamično vnesli v celice LoVo. Potencialne molekule siRNA, ki učinkovito utišajo izražanje gena *K-ras*, smo izbrali na osnovi nivoja izražanja mRNA-*K-ras*. Učinkovitost delovanja izbranih molekul siRNA po lipofekciji smo preverili še z določanjem količine proteina *K-ras* z analizo po Westernu, s testom preživetja celic ter testom viabilnosti celic. Na osnovi dobljenih rezultatov smo izbrali najučinkovitejšo sekvenco siRNA za utišanje onkogenega *K-ras*. Nato smo po postopku, opisanem v poglavju 3.3, pripravili plazmidno DNA z zapisom za miRNA-*K-ras* in GFP. Tako pripravljeno plazmidno DNA smo v celice LoVo vnesli s pomočjo elektroporacije. Učinkovitost elektrotransfekcije celic LoVo smo določili z merjenjem fluorescence GFP s pretočnim citometrom in čitalcem mikroplošč Infinite 200 (Tecan, Männendorf, Švica). Učinkovitost utišanja gena *K-ras* z molekulami miRNA smo določili z merjenjem nivoja mRNA-*K-ras* v celicah LoVo s qRT-PCR.

#### 3.4.4 Gojenje celičnih linij

V poskusih *in vitro* smo celice LoVo gojili v Petrijevih posodah v gojišču F12 (HAM) (Gibco, Grand Island, ZDA). Gojišče smo obogatili s fetalnim telečjim serumom (FBS; Gibco) v končni koncentraciji 10 %, mu dodali glutamin (10 mM; Gibco) ter antibiotika kristacilin (1mL/l) (Pliva d.d., Zagreb, Hrvaška) ter gentamicin (350  $\mu$ l/l) (Krka, Novo mesto, Slovenija). Celice smo gojili v inkubatorju Heraeus (tip B EK/CO<sub>2</sub>; Heraeus, Hanau, Nemčija) pri 37 °C in 5 % atmosferi CO<sub>2</sub>, z rutinskim presajanjem dvakrat na teden (z uporabo 0,025 % raztopine tripsina z dodatkom 0,75 mM EDTA) (Sigma Aldrich). Za poskuse smo uporabljali celice v eksponentni fazi rasti.

#### 3.4.5 Lipofekcija *in vitro*

Tri dni pred poskusom smo v Petrijevo posodo (premer 10 cm) nasadili  $5 \times 10^5$  celic. Gosto zraslim, pritrjenim celicam smo odstranili gojišče, celice sprali s PBS-om (Priloga B) in jih inkubirali v 10 mL tripsina, da so se odlepili od podlage. Delovanje tripsina smo po eni minuti inhibirali z dodatkom 10 mL gojišča s serumom, a brez antibiotikov. Celice smo z enakim gojiščem sprali s plošče in jih zbrali v konični centrifugirki (50 mL). Po centrifugiranju (5 minut pri 1500 obratih/min in 4 °C) smo supernatant previdno odlili, celice pa sprali z 10 mL gojišča brez seruma in brez antibiotikov. Nato smo celice prešteli pod mikroskopom z uporabo hemocitometra.

Na »Ultra Low Attachment« ploščo s šestimi jamicami smo v 1,5 mL gojišča brez seruma in antibiotikov nasadili  $1,4 \times 10^6$  celic na jamico. Celicam, razen kontrolnim, smo nato dodali samo lipofektamin ali mešanico lipofektamina in molekul siRNA s končno koncentracijo molekul siRNA 50 nM. Mešanico lipofektamina in molekul siRNA smo pripravili po postopku, opisanem v protokolu proizvajalca (Lipofektamin RNAiMAX, Invitrogen). Po štirih urah inkubacije pri 37 °C in 5 % atmosferi CO<sub>2</sub> smo

celice prenesli v gojišče s serumom ter antibiotiki in jih nasadili na Petrijevo posodo (premer 10 cm).

### 3.4.6 Elektrotransfekcija in vitro

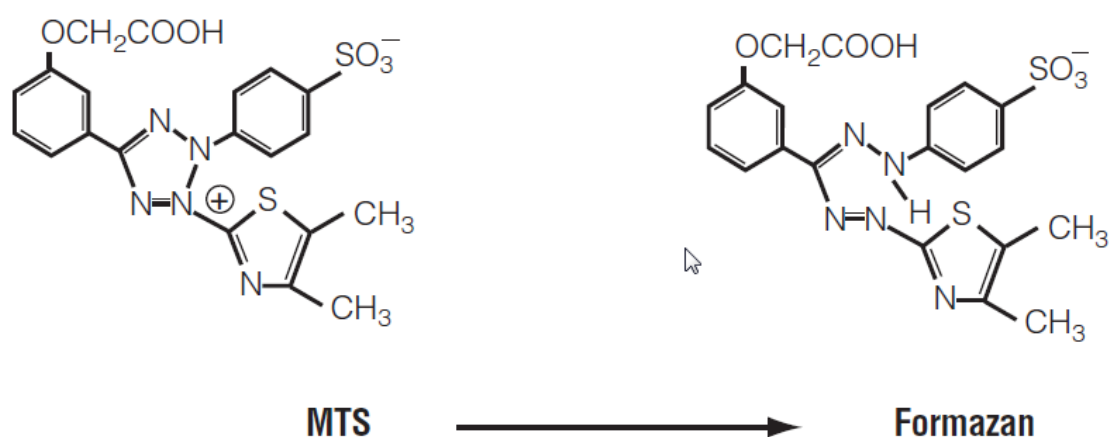
Tri dni pred poskusom smo na Petrijevo posodo (premer 15 cm) nasadili  $5 \times 10^5$  celic. Na dan poskusa smo pritrjenim celicam odstranili gojišče, celice sprali s PBS-om in jih eno minuto inkubirali v 10 mL tripsina, da so se odlepili od podlage. Delovanje tripsina smo po eni minuti inhibirali z dodatkom 10 mL gojišča s serumom in antibiotiki. Celice smo z enakim gojiščem sprali s plošče in jih zbrali v konični centrifugirki (50 mL). Po centrifugiranju (5 minut pri 1500 obratih/min in 4 °C) smo supernatant odlili, celice pa sprali z 10 mL hladnega elektroporacijskega pufra (priloga C). Po ponovnem centrifugiranju smo s štetjem pod mikroskopom (s pomočjo hemocitometra) določili gostoto celic v vzorcih. Nato smo v vse vzorce dodali potreben volumen elektroporacijskega pufra, tako da smo dosegli izhodiščno koncentracijo  $2,5 \times 10^7$  celic/mL.

Pripravili smo mešanico  $1,0 \times 10^6$  celic v elektroporacijskem pufu (40  $\mu$ l) in 10  $\mu$ g plazmidne DNA, raztopljene v vodi (10  $\mu$ l), nato smo jo odpipetirali (50  $\mu$ l) med vzporedni ploščati elektrodi iz nerjavečega jekla z vmesno razdaljo med elektrodama 2,0 mm. Sledilo je generiranje osmih pravokotnih električnih pulzov z amplitudo/razdaljo med elektrodama 700 V/cm, dolžino pulza 5 ms in ponovitveno frekvenco 1 Hz. Po končani elektroporaciji smo celice 5 minut inkubirali na sobni temperaturi ter jim nato dodali 1,0 mL gojišča s serumom in z antibiotiki.

### 3.4.7 Merjenje viabilnosti celic

Viabilnost celic smo določili s testom MTS (CellTiter96®AQ<sub>ueous</sub> Assay; Promega Corporation, Madison, ZDA), kjer posredno preko absorbcije svetlobe pri valovni

dolžini 490 nm določamo količino nastalega formazana, ki nastane ob prisotnosti encimov dehidrogenaz v živih metabolno aktivnih celicah iz MTS tetrazolijeve soli (slika 7). Iz vsakega vzorca celic v poskusu, smo na »Ultra Low Attachment«, ploščo s 96 jamicami, nasadili po 6000 celic v jamico za preverjanje viabilnosti po treh dneh in po 3000 celic za preverjanje viabilnosti po šestih dneh od poskusa. V vsako jamico smo dodali tolikšen volumen gojišča, da smo dosegli skupni volumen 100  $\mu$ L. Po treh oziroma šestih dneh od poskusa smo izvedli test po navodilih proizvajalca (Promega Corporation).



Slika 7: Struktura MTS tetrazolijeve soli in nastalega produkta, formazana.

### 3.4.8 Določanje preživetja celic

Preživetje celic smo določali s testom klonogenosti, ki temelji na delitveni sposobnosti celic oz. na sposobnosti tvorbe celičnih kolonij. Iz vzorca celic, ki je bil izpostavljen lipofekciji in siRNA ali elektroporacijiposkusu, smo na Petrijeve posode (premer 6 cm) v treh paralelkah nasadili po 500 celic. Kolonije, ki so zrasle iz reproduktivno sposobnih celic, smo po 12–14 dneh fiksirali in obarvali s kristal vijoličnim barvilom (Sigma), raztopljenim v absolutnem etanolu. Podobno smo naredili pri kontrolni skupini celic, le da smo v Petrijeve posode nasadili le po 250 celic. Po štetju makroskopsko vidnih kolonij (več kot 50 celic/kolonijo) smo iz razmerja med številom zraslih kolonij in številom nasajenih celic določili uspešnost nasaditve celic (PE = ang. plating efficiency) (2). Vsako skupino v poskusu smo



primerjali s kontrolno in iz razmerja uspešnosti nasaditve določili delež preživelih celic (SF = ang. surviving fraction) (3).

$$PE (\%) = (n_{zraslih\ kolonij} / n_{nasajenih\ celic}) \times 100 \quad \dots (2)$$

$$SF = PE_{retirana\ skupina} / PE_{kontrola} \quad \dots (3)$$

Poskus smo ponovili trikrat in podatke združili.

### 3.4.9 Odkrivanje in kvantifikacija izražanja transgenov

#### 3.4.9.1 Fluorescentna mikroskopija

S fluorescentnim invertnim mikroskopom (Olympus, Hamburg, Nemčija) smo opazovali celice, elektrotransfecirane s plazmidno DNA, ki kodira GFP. S spremljanjem izražanja GFP v celicah smo določali učinkovitost elektrotransfekcije ter intenziteto in trajanje izražanja transgena. Pri tem smo neposredno spremljali izražanje GFP ali pa smo posredno spremljali izražanje siRNA molekul, ki so delovale na izražanje GFP.

#### 3.4.9.2 Pretočna citometrija

S pretočnim citometrom (BD FACSCalibur; BD Biosciences, San Jose, ZDA) smo merili fluorescenco GFP v celicah LoVo, predhodno elektrotransfecirane s plazmidno DNA, ki kodira GFP (pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/EmGFP-miR in pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/miR-ctrl). Pri pretočni citometriji celice v curku tekočine tečejo mimo laserja, ki oddaja svetlobo

samo ene valovne dolžine. Ko celica potuje mimo tega žarka svetlobe, za trenutek prekine njegovo pot in odbije nekaj svetlobe od svoje površine, kar zaznajo senzorji, ki so postavljeni nasproti in pravokotno na laser, ki oddaja svetlobo. Na tak način lahko določimo velikost in obliko vsake celice, ki potuje mimo laserja. Ob uporabi fluorescentne svetlobe pa lahko ločimo tudi celice, ki oddajajo fluorescentno svetlobo od tistih, ki je ne. Merili smo fluorescenco GFP vsake posamezne celice, ki v nizu, druga za drugo, tečejo mimo merilne točke v aparatu. Na ta način smo med seboj zanesljivo razlikovali celice, ki so izražale GFP (GFP pozitivne celice), od celic, ki GFP niso izražale (GFP negativne celice). S spremljanjem izražanja GFP v celicah (štetjem GFP pozitivnih in GFP negativnih celic med trajanjem poskusa) smo tako izmerili učinkovitost elektrotransfekcije. Pri tem smo neposredno spremljali izražanje samega GFP, iz česar smo posredno sklepali na izražanje molekul miRNA, ki so delovale na izražanje GFP.

#### 3.4.9.3 Merjenje fluorescence

S čitalcem mikroplošč Infinite 200 (Tecan, Männendorf, Švica) smo merili intenziteto fluorescence GFP pri celicah LoVo. Te smo predhodno elektrotransfecirali s plazmidno DNA, ki kodira GFP (pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/EmGFP-miR in pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/miR-ctrl). Merili smo fluorescenco  $5 \cdot 10^4$  celic, ki smo jih nasadili na plošče s 96-timi jamicami s prozornim dnom. Intenziteta fluorescence v jamici je linearno sovpadala s številom celic, ki so izražale GFP. S spremljanjem izražanja GFP v celicah smo določali učinkovitost elektrotransfekcije ter intenziteto in trajanje izražanja transgena. Pri tem smo neposredno spremljali izražanje samega GFP, iz česar smo posredno sklepali na izražanje miRNA molekul, ki so delovale na izražanje GFP.

### 3.4.9.4 Izolacija RNA iz celic, reverzna transkripcija (RT) in kvantitativni PCR v realnem času

Učinek delovanja molekul siRNA in miRNA na mRNA-K-ras v humani celični liniji LoVo smo ugotavljali z merjenjem količine mRNA-K-ras v celicah. Molekule mRNA smo iz celic izolirali drugi dan po poskusu.

Celično linijo LoVo smo nasadili v Petrijeve posode (premer 10 cm). Iz  $1 \times 10^6$  celic smo z uporabo kompleta *TRIzol<sup>®</sup> Plus RNA Purification Kit* (Invitrogen) izolirali celokupno RNA. Koncentracijo izolirane RNA smo izmerili spektrofotometrično, z merjenjem absorbcije svetlobe pri valovni dolžini 260 nm. Prisotnost proteinov v vzorcih mRNA smo ovrednotili s primerjanjem absorbance pri 260 nm in 280 nm, pri čemer je vrednost  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$  predstavljala primerno čistost vzorcev, prisotnost fenolov pa s primerjanjem razmerja absorbance pri 230 nm in 260 nm, pri čemer je vrednost  $A_{230}/A_{260} \geq 2$  predstavljala primerno čistost vzorcev.

Za reverzno transkripcijo (RT) RNA v cDNA smo uporabili komplet *SuperScript<sup>®</sup> VILO<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen) ter sledili navodilom proizvajalca (tabela 1).

Tabela 1: Osnovna raztopina za RT

Kemikalija	Volumen za 20 $\mu$ l reakcijsko zmes [ $\mu$ l]
5 $\times$ VILO <sup>™</sup> reakcijska mešanica	4
10 $\times$ SuperScript <sup>®</sup> encimska mešanica	2
RNA (2 $\mu$ g)	x
H <sub>2</sub> O (DEPC)	do 20

Temperaturni program za RT:

1. stopnja: 25°C, 10 min
2. stopnja: 42°C, 120 min
3. stopnja: 85°C, 5 min
4. stopnja: ohlajanje na ledu.

Vzorce smo do nadaljnjega shranili pri -20 °C.

Za določanje količine tarčne cDNA smo izvedli kvantitativni PCR v realnem času (qRT-PCR) z uporabo naprave Real-Time PCR System 7300 (Applied Biosystems) v ustreznih mikrotitrnih ploščah s 96 jamicami (Applied Biosystems).

Za qRT-PCR smo uporabili reakcijsko mešanico *Taqman Universal PCR Master Mix (2×)* z dodanim *AmpErase UNG* ter reagente iz kompleta *Taqman Gene Expression Assay Inventoried Products* (Applied Biosystems) (tabeli 2 in 3). Komplet je poleg dveh začetnih oligonukleotidov vseboval še tretji oligonukleotid – sondo, ki je bila na 5'-koncu označena z reporterskim fluorescentnim barvilom FAM, na 3'-koncu pa z nefluorescentnim dušilcem (NFQ). Po prileganju sonde na komplementarno verigo amplikona in začetku podaljševanja je eksonukleazna aktivnost polimeraze v smeri 5'-3' povzročila hidrolizo sonde, obe barvili pa sta se sprostili v raztopino. Ko sta bili barvili ločeni, je prišlo do ireverzibilnega porasta fluorescence reporterja FAM. Fluorescenca reporterja je tako naraščala sorazmerno z nastajanjem produkta PCR.

Tabela 2: Seznam uporabljenih sond Taqman Gene Expression Assays – Inventoried

IME GENA	ID	REPORTERSKO BARVILO- TAQMAN MGB SONDA- QUENCHER	SPECIFIČNOST
<i>K-ras</i>	Hs00364282_m1	FAM-GCGGGAGAGAGGCCTGCTGAAAATG-NFQ	<i>Homo sapiens</i>
18S rRNA	Hs99999901_s1	FAM-TGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG-NFQ	<i>Homo sapiens</i>

Tabela 3: Osnovna zmes za PCR

Kemikalija	Volumen za 20 $\mu$ l reakcijsko zmes [ $\mu$ l]
Taqman™ Universal Master Mix (2 $\times$ )	10
Taqman Gene Expression Assay (20 $\times$ ) = Začetni oligonukleotidi (18 $\mu$ M) + sonda (5 $\mu$ M)	1
cDNA (konc., 10 $\times$ redčitev, 100 $\times$ redčitev)	2
H <sub>2</sub> O (DEPC)	7

Temperaturni program za qRT-PCR:

1. stopnja: 50 °C, 2 min
  2. stopnja: 95 °C, 10 min
  3. stopnja: 95 °C, 15 s
  4. stopnja: 60 °C, 1 min
- } 50 ciklov

Med procesom pomnoževanja je računalnik zbiral podatke o fluorescenci in jih s pomočjo programa na koncu prikazal v grafični obliki. Po končanem procesu

pomnoževanja smo določili bazno linijo v začetnih fazah pomnoževanja, ko je fluorescenca produkta nižja od fluorescence ozadja (prvih 3-10 ciklov). V eksponentni fazi pomnoževanja, ko je intenziteta fluorescence značilno različna od fluorescence ozadja, smo določili linijo prazne vrednosti (ang. treshold). Nato smo za vsak vzorec določili cikel, ko krivulja preseže linijo prazne vrednosti (t. i. vrednost Ct). Na osnovi vrednosti Ct smo primerjali podatke med seboj. Vrednost Ct je obratno sorazmerna z začetnim številom kopij tarčne mRNA, in tako večzačetne mRNA pomeni, da fluorescenca vzorca preseže fluorescenco ozadja pri nižjem številu ciklov.

Za analizo podatkov smo uporabili metodo relativne kvantifikacije, s katero smo določili razmerje med številom kopij oz. količino gena, ki smo ga analizirali (*K-ras*), in referenčnim genom (18s rRNA). Pri izračunih smo uporabljali dva načina: metodo  $\Delta\Delta Ct$  in kvantifikacijo s pomočjo krivulje.

#### Metoda $\Delta\Delta Ct$

Pri metodi  $\Delta\Delta Ct$  število kopij/količino gena v vzorcu normaliziramo glede na eno kopijo/enoto količine referenčnega gena (4). Uporabili smo tudi kalibracijski vzorec (kalibrator), na katerega smo primerjali vsak neznani vzorec.

$$\text{Razmerje} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \dots (4)$$

Pri tem velja:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (vzorca) -  $\Delta Ct$  (kalibratorja),  $\Delta Ct$  pa je razlika vrednosti Ct med tarčnim in referenčnim genom. Pri uporabi te metode morata biti učinkovitosti pomnoževanja (E) tarčnega in referenčnega gena enaki (enačba 5).

$$E = [10^{(1/\text{naklon krivulje})}] \quad \dots (5)$$

### Kvantifikacija s pomočjo krivulje

V primeru, da učinkovitosti pomnoževanja amplikonov tarčnega in referenčnega gena nista bili enaki, smo uporabili enačbo krivulj za tarčni in referenčni gen, dobljenih s serijskem redčenjem enega vzorca. Krivulja odraža linearno razmerje med vrednostmi Ct in logaritmskimi vrednostmi količin, ki smo si jih izmislili, pri čemer smo upoštevali redčitveno lestvico. Rezultati tako niso predstavljeni z vrednostmi Ct, ampak kot količina tarčnega in referenčnega gena v vsakem vzorcu. Količino gena v vzorcu smo normalizirali glede na enoto količine referenčnega gena. Uporabili smo tudi kalibracijski vzorec, glede na katerega smo primerjali vsak neznani vzorec.

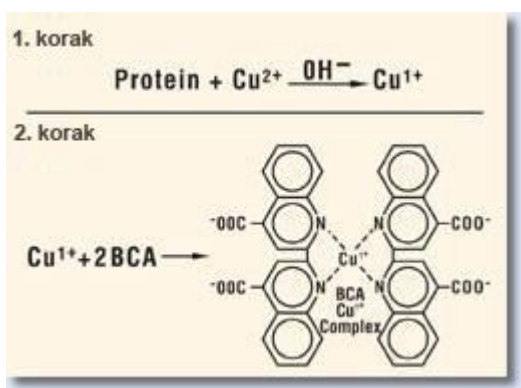
#### 3.4.9.5 Izolacija proteinov iz celic in analiza po Westernu

Učinek delovanja molekul siRNA na tarčne proteine v humani celični liniji LoVo smo določali na osnovi količine proteina K-ras. Proteine smo iz celic izolirali tretji dan poposkusu. Na izolirane proteine se specifično vežejo primarna protitelesa; v našem primeru so se vezala samo na K-ras. Nato se na primarna protitelesa vežejo sekundarna protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo, ki ob dodatku primerne substrata le-tega razgrajuje in ob tem povzroča oddajanje svetlobe, kar lahko slikamo s fotografskim filmom. Večja kot je količina proteinov, več primarnih protiteles je vezanih na te proteine in posledično je več sekundarnih protiteles vezanih na primarna protitelesa, kar nam da močnejši signal.

Za izolacijo proteinov iz posameznih celičnih linij smo na podlago pritrjene celice dvakrat sprali z ledeno hladnim PBS. Celicam smo nato dodali 600  $\mu$ l ledeno hladnega pufra za lizo celic (RIPA; Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, ZDA), kateremu smo predhodno dodali inhibitorje proteaz in fosfataz (priloga Č). Celice v pufri za lizo smo 30 minut inkubirali na ledu. Lizirane celice smo po inkubaciji na ledu s pomočjo strgala zbrali skupaj in lizate prenesli v 1.8 mL centrifugirke. Ploščo smo še enkrat sprali s 300  $\mu$ l ledeno hladnega pufra za lizo celic in zbrani lizat sonificirali (15 sekund). Nato smo lizat ponovno 30 minut inkubirali na ledu in po končani inkubaciji 10 minut centrifugirali pri  $10000 \times g$  in  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatante smo

skoncentrirali s pomočjo vakumskega koncentratorja 5301 (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) do tretjine volumna. Do analize koncentracije proteinov smo vzorce zamrznili in shranili pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Celotno koncentracijo proteinov v vzorcih smo določili z uporabo kompleta *BCA*<sup>TM</sup> (Pierce, Rockford, ZDA) po metodi na osnovi bikinkoninske kisline (BCA), kjer je absorbcija vzorca povezana s količino nastalih kompleksov med bakrovimi  $1^{+}$  ioni in bikinkoninsko kislino (slika 8). Količina bakrovih  $1^{+}$  ionov pa je odvisna od količine proteinov v vzorcu, ki reagirajo z bakrovimi  $2^{+}$  ioni in jih ob tem reducirajo do bakrovih  $1^{+}$  ionov.



Slika 8: Shema reakcije v proteinskem vzorcu z bikinkoninsko kislino (BCA) (Pierce).

Za analizo koncentracije proteinov v vzorcih smo pripravili  $25\times$  in  $50\times$  razredčitve vzorcev. Standardne raztopine s koncentracijami  $100\text{-}2000\text{ }\mu\text{g/mL}$  smo pripravili iz govejega serumskega albumina (ang. bovine serum albumine, BSA; Pierce). V epruvete smo odpipetirali po  $100\text{ }\mu\text{l}$  standardov oz. vzorcev in dodali po  $1\text{ mL}$  raztopine AB, pripravljene po navodilih proizvajalca ( $A : B = 50 : 1$ ). Po 30-minutni inkubaciji pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  smo vzorcem spektrofotometrično odčitali absorbcijo pri  $560\text{ nm}$ . Koncentracije proteinov v vzorcih smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje na osnovi standardov.



Glede na izmerjene koncentracije proteinov v vzorcih smo za analizo po Westernu vzorce umerili na enake izhodne koncentracije proteinov (25–75  $\mu\text{g/vzorec}$ ) in jim dodali po 1,25  $\mu\text{l}$   $\beta$ -merkaptoetanolu ter nanašalni (Laemmelijev) pufer (priloga D) do končnega volumna 25  $\mu\text{l}$ . Vzorce smo nato štiri minute inkubirali pri 95 °C.

Za elektroforetsko ločevanje proteinov smo uporabili 10 % SDS-poliakrilamidni gel (priloga E).

Pripravljene vzorce smo nanесли v nanašalne jamice elektroforetskega gela. Kot proteinske standarde smo uporabljali označevalec *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas, Burlington, Kanada). Elektroforeza je tekla 90 minut pri napetosti 120 V v 1 $\times$  pufru za elektroforezo, pripravljenim iz 10 $\times$  pufra za elektroforezo (priloga F).

Za prenos proteinov po Westernu smo uporabljali PVDF membrano (Pierce). Plosni prenos proteinov na membrano je potekal 45 minut v pufru za prenos proteinov (priloga G) pri toku 0,8 mA /cm<sup>2</sup> membrane.

Membrano smo po prenosu sprali z 1 $\times$  TBS pripravljenega iz 10 $\times$  TBS (Priloga H) in Tween-20 (0,1 %). Nato smo membrano spirali 1,5 ure pri sobni temperaturi z raztopino za preprečevanje nespecifičnih vezav (priloga I), zatem pa jo preko noči inkubirali v raztopini s primarnimi protitelesi (priloga J, tabela 4).

Tabela 4: Seznam uporabljenih primarnih protiteles

PROTITELO	KAT. ŠT.	VIR	PROIZVAJALEC
$\beta$ -aktin IgG <sub>1</sub> - monoklonska	C4 : sc-47778	miš	Santa Cruz Biotechnology
K-ras IgG <sub>2a</sub> - monoklonska	F234:sc-30	miš	Santa Cruz Biotechnology

Naslednji dan smo membrano spirali v 1 $\times$  TTBS (3-krat po 15 minut), zatem pa jo 45 minut inkubirali pri sobni temperaturi v raztopini s sekundarnimi protitelesi (priloga K, tabela 5), konjugiranimi s hrenovo peroksidazo (HRP).

Tabela 5: Uporabljena sekundarna poliklonska protitelesa

PROTITELO	KAT. ŠT.	VIR	PROIZVAJALEC
HRP-IgG <sub>2a</sub> proti mišjim	Sc-2061	govedo	Santa Cruz Biotechnology, ZDA

Sledilo je ponovno spiranje membrane v 1x TTBS (petkrat po 10 minut).

Specifične proteine smo določali s kompletom *ECL Western Blotting Detection Reagent and Analysis System* (Santa Cruz Biotechnology). Raztopino substrata za HRP smo pripravili po navodilih proizvajalca, jo razlili preko membrane ter pustili delovati eno minuto. Membrano smo zatem položili v kaseto, tako da je stran s proteini gledala navzgor, ter jo v temi prekrili s prozorno folijo za živila in s filmom. Membrano smo izpostavili filmu (ekspozicija 1–20 minut) ter film razvili v razvijalni (Kodak, Rochester, ZDA) in fiksirni raztopini (Kodak). Iz dobljene slike smo z uporabo programa ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, ZDA) izračunali optično gostoto tarčnega proteina pri posameznih vzorcih, tako da smo pomnožili povprečno intenziteto in površino slikovnih pik za ta protein ter vrednosti produktov primerjali med vzorci.

### 3.5 Poskusi na tumorskih modelih v pogojih *in vivo*

#### 3.5.1 Poskusne živali

Dovoljenje za izvajanje poskusov na miših v znanstveno-raziskovalne namene je izdala Veterinarska uprava Republike Slovenije (323-02-632/2005/6). V raziskavah smo uporabili miši (samice) SCID-C.B-17/lcrHsd-Prkdc<sup>scid</sup> (Harlan, Videm, Italija). Miši za poskuse so bile stare 6–8 tednov in težke 20–23 g. SCID miši so bile izbrane, ker so imunsko oslABLJENE in kot take omogočajo rast humanih tumorjev. Miši so bile ves čas poskusa v okolju brez patogenov, z zagotovljeno stalno temperaturo 21 °C in

v 12 urnem dnevno/nočnem ritmu. Hrana in tekočina sta bili zagotovljena *ad libitum*. Poskusi so bili izvedeni v skladu s Pravilnikom o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (UL RS 88, 18. 8. 2006) in Pravilnikom o načinih usmrtitve poskusnih živali (UL RS 14072006, 19. 12. 2006). Vse poskuse z živalmi so opravile osebe z ustreznim dovoljenjem za delo z laboratorijskimi živalmi.

### 3.5.2 Tumorski modeli

V raziskavah smo uporabili tumorski model humanega adenokarcinoma LoVo (ATTC) za nasaditev podkožnih tumorjev na imunsko oslABLjenih miših SCID (C.B-17/1crHsd-Prkdc<sup>scid</sup>).

### 3.5.3 Elektroporator

Za elektroporacijo tumorjev *in vivo* smo uporabljali elektroporator Jouan GHT 1287 (Jouan, Saint Herblain, Francija).

### 3.5.4 Potek raziskav *in vivo*

V raziskavah smo v podkožno nasajenih tumorjih LoVo spremljali učinkovitost delovanja molekul miRNA na tarčno mRNA za *K-ras* po električno posredovanem vnosu plazmidne DNA, ki kodira miRNA-*K-ras* (pmiRNA-*K-ras*). Učinkovitost utišanja gena *K-ras* v tumorjih LoVo z molekulami miRNA smo določili z merjenjem zaostanka rasti tumorjev ter z merjenjem nivoja mRNA s qRT-PCR in proteinov *K-ras* z analizo po Westernu.

### 3.5.5 Nasaditev podkožnih tumorjev

Za poskuse *in vivo* smo celice LoVo vzgojili v inkubatorju Heraeus (tip B EK/CO<sub>2</sub>; Heraeus) pri temperaturi 37 °C in 5 % atmosferi CO<sub>2</sub>. Za nasaditev podkožnih tumorjev smo pripravili celično suspenzijo humanega adenokarcinoma LoVo s koncentracijo  $2,5 \times 10^6$  celic/100 µl 0,9 % NaCl.

Suspenzijo celic, gojenih v inkubatorju, smo pripravili tako, da smo celice ločili od rastne podlage s tripsinom. V konični centrifugirki (50 mL) smo zbranim celicam dodali s FBS obogateno gojišče, celično suspenzijo centrifugirali, odlili supernatant ter pripravili primerno koncentracijo celic v 0,9 % NaCl. Po 100 µl celične suspenzije smo injicirali pod kožo na obritem desnem boku miši. Ko so tumorji dosegli prostornino približno 40 mm<sup>3</sup> (med osmim in dvanajstim dnevom po presaditvi celic), smo živali naključno razdelili v eksperimentalne skupine.

### 3.5.6 Elektrotransfekcija *in vivo*

#### 3.5.6.1 Vnos plazmidne DNA v tumorje in elektroporacija

V poskusih *in vivo* smo uporabljali plazmidne DNA pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/EmGFP-miR in pcDNA<sup>TM</sup>6,2-GW/miR-ctrl. Plazmidno DNA, raztopljeno v vodi (50 µg/50 µl), smo z injekcijsko brizgo in iglo 25 G vbrizgali v sredino tumorja. Po desetih minutah od vbrizganja plazmidne DNA smo tumor izpostavili osmim pravokotnim električnim pulzom. Uporabili smo 2 × 4 pulze v dveh med seboj pravokotnih smereh z amplitudo/razdaljo 600 V/cm, s trajanjem enega pulza 5 ms ter ponovitveno frekvenco 1 Hz. Razdalja med elektrodama je znašala 6 mm. Za nemoteno prevajanje električnih pulzov skozi tumorsko tkivo smo stik med elektrodo in kožo pred elektroporacijo namazali z gelom za ultrazvok (Kameleon d.o.o, Maribor, Slovenija).

### 3.5.7 Detekcija in kvantifikacija izražanja transgenov

#### 3.5.7.1 Izolacija mRNA iz tkiva, reverzna transkripcija in kvantitativni PCR v realnem času

Pri določanju terapevtskega učinka molekul miRNA, specifičnih za *K-ras*, vnesenih v podkožne tumorje humanega adenokarcinoma LoVo s pomočjo plazmidne DNA in elektroporacije, smo v tumorjih ovrednotili nivo izražanja mRNA za onkogen *K-ras*. RNA smo iz vzorcev izolirali šesti dan po terapiji. V ta namen smo žrtvovani miši izrezali tumor, ga homogenizirali v tekočem dušiku z uporabo terilnice in iz homogenata izolirali celokupno RNA s pomočjo kompleta *TRIzol<sup>®</sup> Plus RNA Purification Kit* (Invitrogen). Ves nadaljnji postopek je potekal, kot je opisano v poglavju 3.4.9.2.

#### 3.5.7.2 Izolacija proteinov iz tkiva in analiza po Westernu

Pri določanju terapevtskega učinka molekul miRNA, specifičnih za *K-ras*, vnesenih v podkožne tumorje humanega adenokarcinoma LoVo s pomočjo plazmidne DNA in elektroporacije, smo v tumorjih ovrednotili tudi nivo izražanja proteina K-ras. Proteine smo iz tumorjev izolirali šesti dan po terapiji. V ta namen smo žrtvovani miši izrezali tumor, ga homogenizirali v tekočem dušiku z uporabo terilnice in iz homogenata izolirali celotno količino proteinov. Analizo po Westernu smo izvedli po postopku, opisanem v poglavju 3.4.9.3.

#### 3.5.7.3 Imunohistokemija

Pri določanju nivoja izražanja proteina K-ras v podkožnih tumorjih humanega adenokarcinoma LoVo smo šesti dan po terapiji odvzeli po enega do dva tumorja na skupino in tumorje 24 ur fiksirali v formalinu. Nato smo tumorje prenesli v etanol in

pripravili parafinske rezine (1 rezina na tumor). Tumorske rezine smo barvali s hematoksilin-eozinom in imunohistokemično z zajčjimi monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti *K-ras* (Abcam, Cambridge, ZDA). Uporabili smo klasično dvostopenjsko imunohistokemično barvanje (Stirling, 1994). Protein *K-ras* smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom (Olympus) pri 40× in 600× povečavi ter slike posneli s CCD kamero DP70. Na dobljenih slikah smo z uporabo programa ImageJ (National Institute of Health) določili površinski delež rezine s pozitivno reakcijo za *K-ras* ter površinski delež nekroze v rezini. Nekroza je bila vidna kot področja na preparatu, kjer so bili pri celicah prisotni piknoza (ireverzibilna kondenzacija kromatina v jedru), izguba celične strukture, kondenzacija perinuklearne citoplazme in pojav množice veziklov ob robovih celic. Ravno tako so bila nekatera področja že brez prisotnih celic.

### 3.5.8 Spremljanje rasti tumorjev

Uspešnost zdravljenja podkožnih LoVo tumorjev s terapevtskimi molekulami miRNA-*K-ras* smo določali s testom zaostanka rasti tumorjev. Pri tem testu smo časovno spremljali dolžino, širino in višino nasajenih tumorjev ter iz teh podatkov izračunali njihove prostornine (6):

$$V = a \times b \times c \times \pi/6 \quad \dots (6)$$

Velikosti tumorjev smo merili vsak 3. do 4. dan. Premere smo merili z digitalnim kljunastim merilom. Za vsak dan merjenja smo posameznim skupinam izračunali aritmetično sredino prostornin tumorjev s pripadajočo standardno napako. Za vsak tumor v posamezni skupini smo izračunali podvojitveni čas (DT – ang. doubling time), ki pomeni čas, v katerem tumor zraste na dvakratnik prostornine ob začetku poskusa.

Pri določanju učinkovitosti elektrogenske terapije humanega adenokarcinoma LoVo z molekulami miRNA, specifičnimi za *K-ras*, smo izračunali zaostanek v rasti vsakega posameznega tumorja v zdravljeni skupini. Zaostanek v rasti (GD – ang.: growth delay) vsakega tumorja v določeni skupini smo izračunali kot razliko med podvojitvenim časom tumorja zdravljene skupine in aritmetično sredino podvojitvenih časov tumorjev v kontrolni skupini. Iz zaostankov v rasti vseh tumorjev smo nato izračunali povprečje.

Pri določanju terapevtske učinkovitosti smo izračunali tudi delež pobitih celic v tumorjih po terapiji glede na kontrolno skupino tumorjev. Pri tem smo uporabili enačbo, ki jo je definiral Corbett (7) (Corbett, 1992).

$$\log_{10} \text{pobitih celic} = GD / 3,32 \times DT \quad \dots (7)$$

Pri tem velja, da je 3,32 število celičnih podvojitvev na log rasti tumorjev.

### 3.6 Statistična analiza rezultatov

Za vsako proučevano skupino smo preverili, ali so podatki normalno porazdeljeni. Če so bili podatki porazdeljeni, smo za vsako proučevano skupino izračunali aritmetično sredino in njeno standardno napako. Več skupin smo med sabo primerjali z enosmerno analizo varianc; v primeru, da so bile statistično značilno različne, smo razlike med posameznimi skupinami primerjali po Holm-Sidakovi metodi. Pri statistični obdelavi podatkov smo uporabljali program Sigma Stat (Systat Software Inc., London, VB).

## 4 REZULTATI

### 4.1 Utišanje onkogenega *K-ras* z molekulami siRNA/miRNA

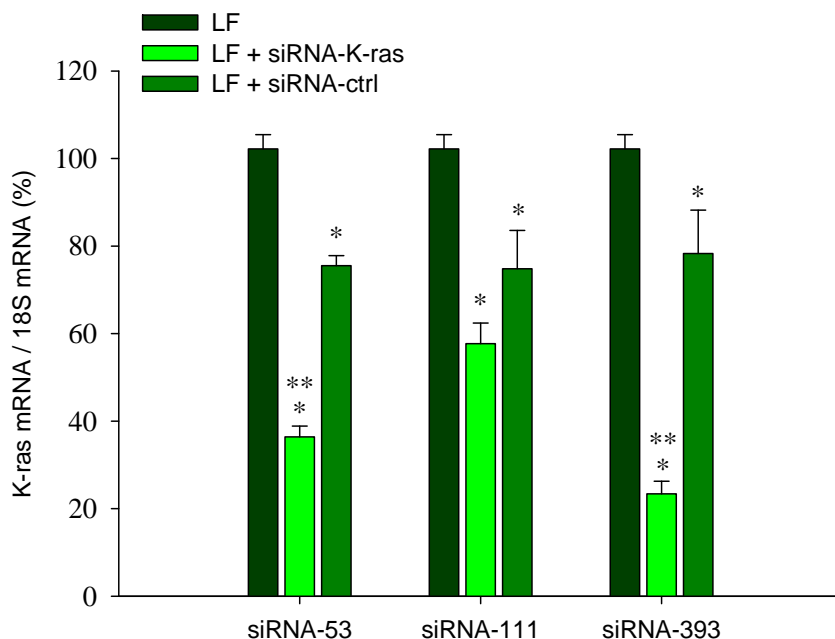
#### 4.1.1 Poskusi *in vitro*

##### 4.1.1.1 Izbira ustreznih molekul siRNA za uspešno utišanje gena *K-ras*

Uspešnost utišanja tarčnih molekul mRNA z molekulami siRNA je odvisna od mesta prileganja molekul siRNA na tarčni mRNA. V naši raziskavi smo izbirali med tremi sekvenčno različnimi molekulami siRNA, ki so komplementarne molekulam mRNA gena *K-ras* (siRNA-K-ras53, siRNA-K-ras111 in siRNA-K-ras393). Za kontrolne molekule smo izbrali molekule siRNA s sekvenčnimi zaporedji, ki se ne prilegajo nikamor v genomu. Za učinkovit vnos molekul siRNA v celice LoVo (humani adenokarcinom debelega črevesa) v *in vitro* poskusih smo uporabili lipofektamin (Invitrogen). Učinek delovanja posameznih molekul siRNA na tarčno mRNA smo določili drugi dan po lipofekciji s kvantitativno analizo količine mRNA (qRT-PCR).

Po lipofekciji celic LoVo z različnimi molekulami siRNA-K-ras se je nivo mRNA za *K-ras* v primerjavi s skupino, kjer je bil celicam dodan samo lipofektamin, statistično značilno znižal. Le molekule siRNA-K-ras53 in siRNA-K-ras393 so v primerjavi z učinkom kontrolnih molekul siRNA kazale statistično značilno nižje vrednosti mRNA za *K-ras*, zato smo le-te uporabljali v nadaljnjih raziskavah (slika 9).





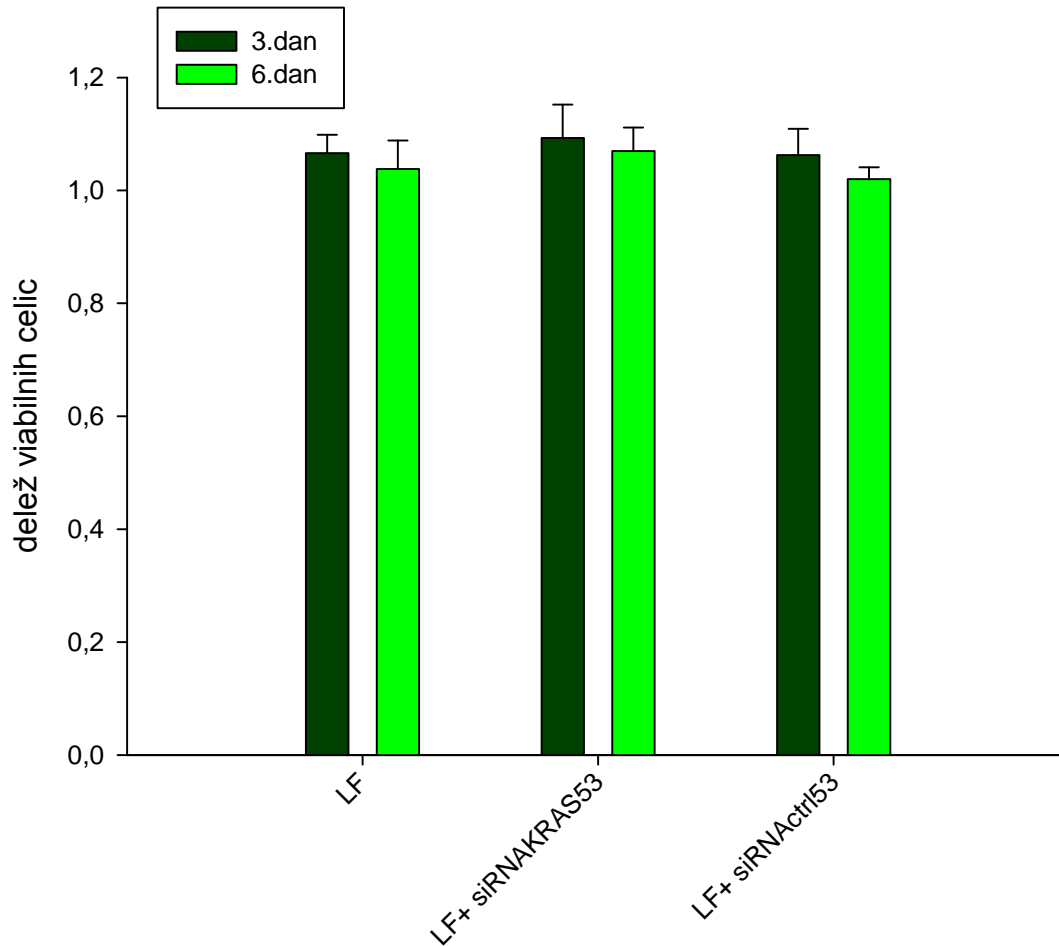
Slika 9: Delež nivoja mRNA za *K-ras* v celicah LoVo po inkubaciji z lipofektaminom in po lipofekciji celic LoVo s posameznimi molekulami siRNA-K-ras (53, 111 in 393) oz. kontrolnimi molekulami siRNA-ctrl (53, 111, 393) glede na kontrolno skupino celic LoVo. Količino mRNA v celicah smo določali s qRT-PCR drugi dan po poskusu. Stolpci prikazujejo srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake (n=3). \* $P < 0.05$  proti skupini celic, tretirani samo z lipofektaminom; \*\* $P < 0.05$  proti skupinam celic, inkubiranimi z lipofektaminom in kontrolnimi molekulami siRNA-ctrl (53, 111, 393).

#### 4.1.1.2 Učinek molekul siRNA-K-ras53 in siRNA-K-ras393 na viabilnost celic LoVo

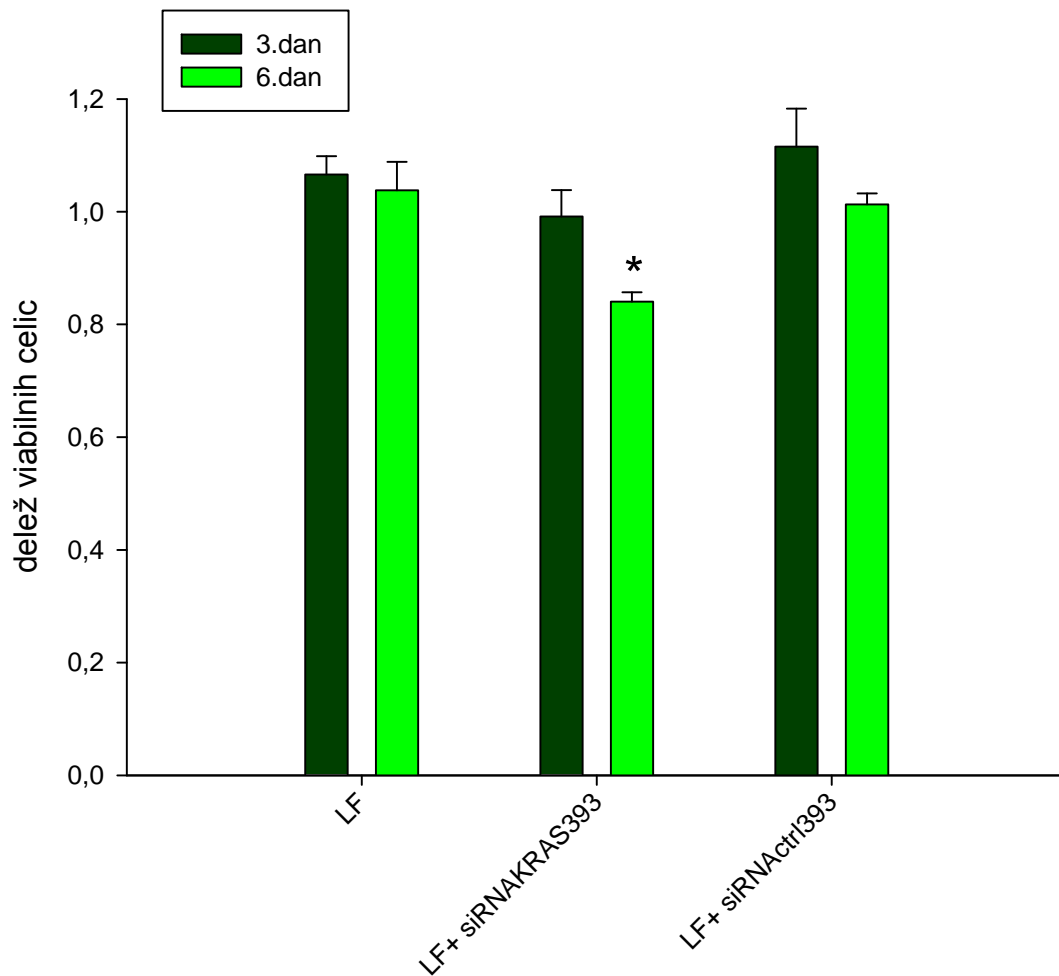
Za oceno uporabnosti izbranih molekul siRNA-K-ras53 in siRNA-K-ras393 smo naredili test viabilnosti celic. Za učinkovit vnos molekul siRNA v celice *in vitro* smo uporabili lipofektamin (LF) (Invitrogen). Viabilnost celic smo merili tretji in šesti dan po lipofekciji celic z molekulami siRNA.

Viabilnost celic LoVo po lipofekciji z siRNA-K-ras53 se glede na skupino, kjer je bil dodan samo lipofektamin, ni statistično značilno spremenila (slika 10). Po lipofekciji

celic LoVo z siRNA-K-ras393 se je viabilnost šesti dan glede na ostale skupine statistično značilno zmanjšala (slika 11).



Slika 10: Viabilnost celic LoVo po inkubaciji z lipofektaminom (LF) ter po lipofekciji celic z siRNA-K-ras53 oz. kontrolno molekulo siRNA-ctrl53. Stolpci prikazujejo relativne srednje vrednosti viabilnosti celic in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino.

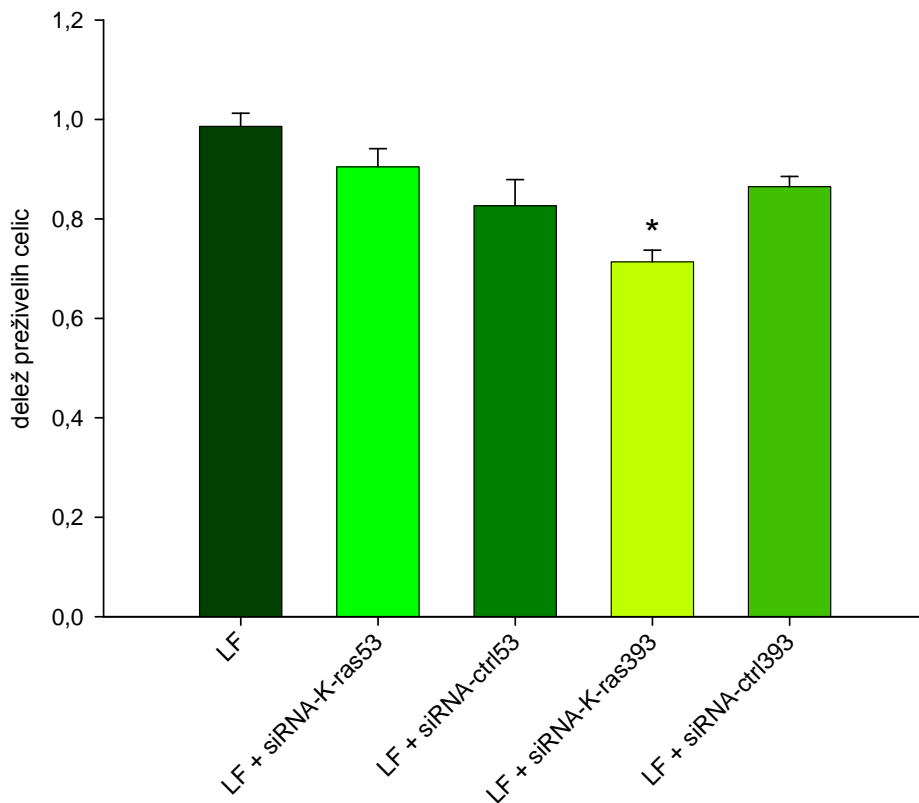


Slika 11: Viabilnost celic LoVo po inkubaciji z lipofektaminom (LF) ter po lipofekciji celic z siRNA-*K-ras*393 oz. kontrolno molekulo siRNA-ctrl393. Stolpci prikazujejo relativne srednje vrednosti viabilnosti celic in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino. \* $P < 0,01$  proti skupini celic, tretiranih samo z lipofektaminom, in skupini celic, inkubiranih z lipofektaminom in s kontrolno siRNA.

#### 4.1.1.3 Učinek molekul siRNA-K-ras53 in siRNA-K-ras393 na preživetje celic LoVo

Za oceno uporabnosti izbranih molekul siRNA-K-ras53 in siRNA-K-ras393 smo naredili tudi test klonogenosti celic. Za učinkovit vnos molekul siRNA v celice *in vitro* smo uporabili lipofektamin (Invitrogen). Preživetje celic smo določili štirinajsti dan po lipofekciji celic z molekulami siRNA.

Preživetje celic LoVo po lipofekciji z siRNA-K-ras53 se glede na skupino, kjer je bil dodansamo lipofektamin, ni statistično značilno spremenilo. Po lipofekciji z siRNA-K-ras393 se je preživetje celic zmanjšalo bolj kot po lipofekciji s kontrolno siRNA. Med relativnima deležema preživelih celic po lipofekciji z siRNA-K-ras393 in kontrolno siRNA je bila statistično značilna razlika (slika 12). Na podlagi teh in predhodnih rezultatov smo sklepali, da so molekule siRNA-K-ras393 pri utišanju izražanja *K-ras* med izbranimi tremi najučinkovitejše.

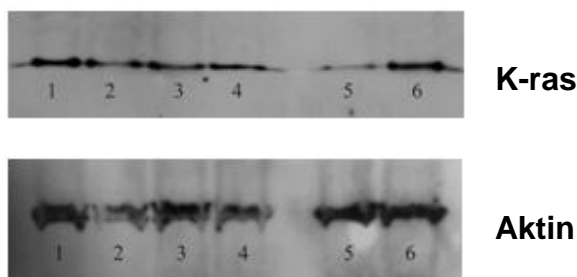


Slika 12: Preživetje celic LoVo po inkubaciji z lipofektaminom (LF) ter po lipofekciji celic s posameznimi molekulami siRNA-K-ras (53, 393) oz. kontrolnimi molekulami siRNA-ctrl (53, 393). Stolpci prikazujejo relativne srednje vrednosti preživetja celic in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino. \* $P < 0,01$  proti skupini celic, inkubiranih samo z lipofektaminom, in skupini celic, inkubiranih z lipofektaminom in s kontrolno siRNA.

#### 4.1.1.4 Učinek molekul siRNA-K-ras53 in siRNA-K-ras393 na izražanje proteina K-ras

Analizo po Westernu smo naredili za določitev učinka molekul siRNA na izražanje proteina K-ras v celicah LoVo. V primerjavi s skupino, ki je bila tretirana le z lipofektaminom, se je po lipofekciji z molekulami siRNA-K-ras53 oz. siRNA-K-ras393 znižal nivo proteinov K-ras. Molekule siRNA-K-ras393 so se v primerjavi z molekulami siRNA-K-ras53 izkazale za učinkovitejše, saj so znižale izražanje K-ras

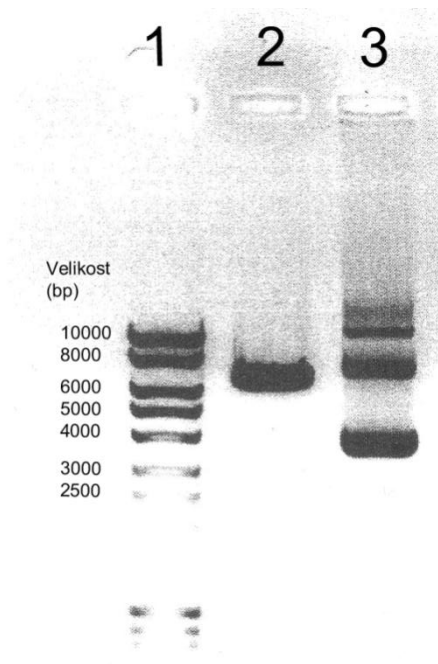
za 74 %, medtem ko je bilo izražanje *K-ras* po lipofekciji s siRNA-*K-ras*53 zmanjšano le za 15 %. Kontrolne molekule siRNA niso bistveno vplivale na izražanje proteina *K-ras*. Molekule siRNA-*K-ras*-53 in siRNA-*K-ras*-393 pri uporabljeni celični liniji niso vplivale na nivo izražanja aktina, kar dokazuje o specifičnosti njihovega delovanja na mRNA za *K-ras* (slika 13).



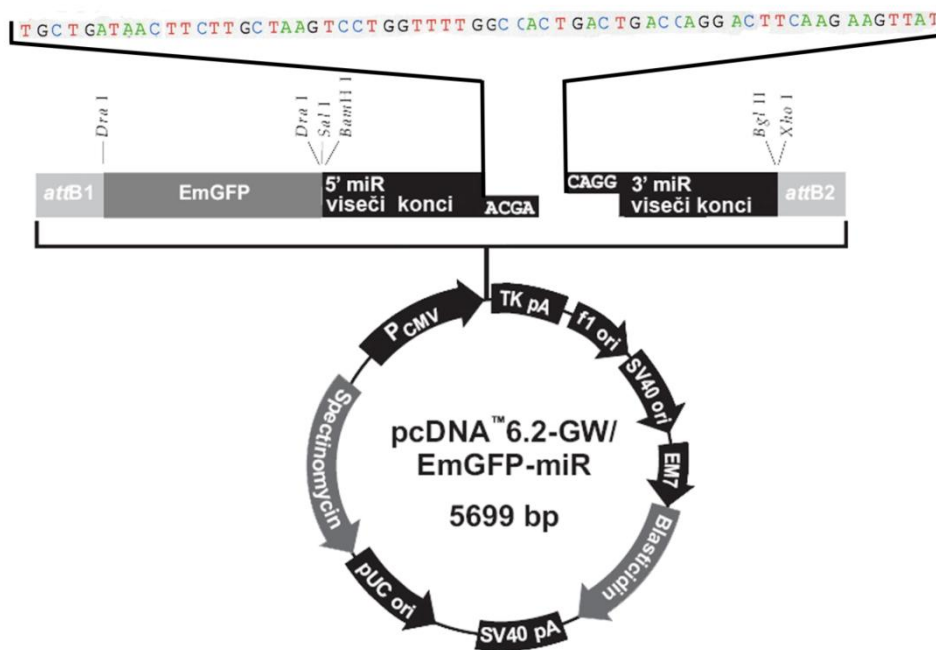
Slika 13: Analiza po Westernu proteina *K-ras* in aktina v celicah LoVo: (1) kontrolna skupina; (2) lipofektamin (LF); (3) LF + siRNA-*K-ras*53; (4) LF + siRNA-ctrl53; (5) LF + siRNA-*K-ras*393; (6) LF + siRNA-ctrl393.

#### 4.1.1.5 Preverjanje plazmidne DNA z zapisom za miRNA-*K-ras*

Za konstrukcijo plazmidne DNA z zapisom za miRNA-*K-ras*, pridobljene po postopku, opisanem v poglavju 4.3, smo izbrali nukleotidno zaporedje molekule siRNA-*K-ras*393. Dobljeno plazmidno DNA smo razrezali z encimom *Hind* III (Sigma) in dobljeni produkt preverili na agarozni elektroforezi (slika 14), s katero smo ugotovili, da je plazmid pravilne velikosti (približno 6000 bp) in ne vsebuje druge bakterijske DNA. Ravno tako smo s sekvencioniranjem preverili zaporedje nukleotidov genskega vključka (slika 15) in ugotovili, da je zaporedje pravilno.



Slika 14: Plazmidna DNA, označena z etidijevim bromidom po agarozni elektroforezi: (1) standard; (2) linearizirani plazmid; (3) različne oblike plazmida: odprti krog, linearna oblika in superzvita oblika (po vrsti od vrha proti dnu)

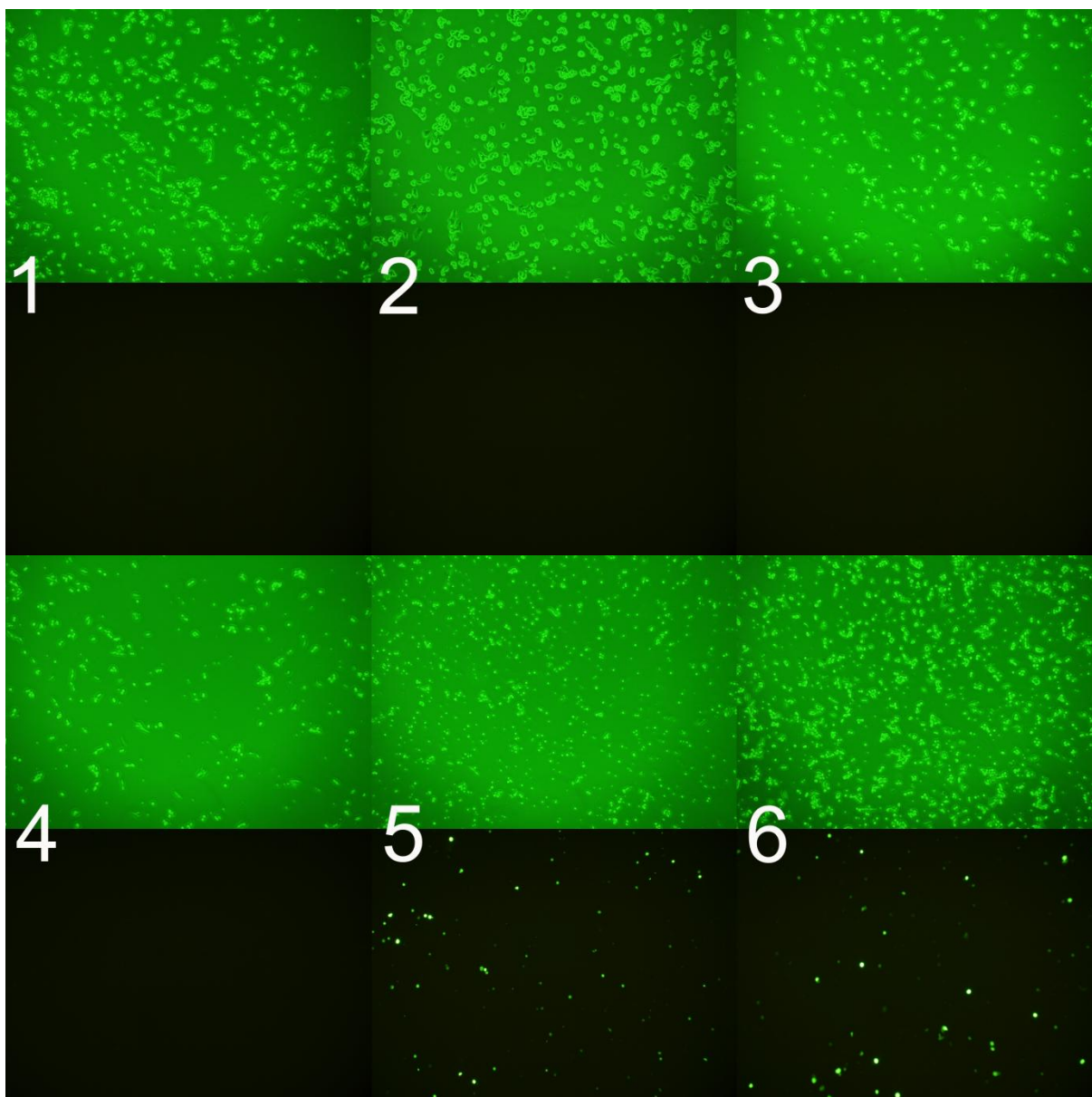


Slika 15: pcDNA<sup>™</sup>6,2-GW/EmGFP-miR z vstavljeno nukleotidno sekvenco izbrane siRNA-K-ras393.

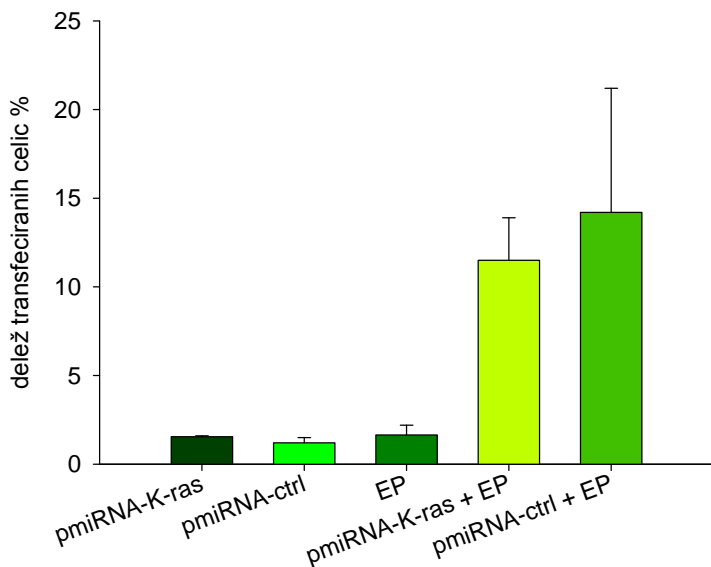
#### 4.1.1.6 Učinkovitost transfekcije s plazmidno DNA z zapisom za miRNA-K-ras v celicah LoVo

Na celični liniji LoVo smo v pogojih *in vitro* testirali učinkovitost transfekcije s plazmidno DNA z zapisom za miRNA-K-ras in miRNA-scr. Pri slikanju pod fluorescentnim mikroskopom so bile samo pri skupinah, tretiranih s pmiRNA-K-ras ali s pmiRNA-ctrl, vidne celice, ki so svetile (slika 16). Učinkovitost elektrotransfekcije celic LoVo smo določili s pomočjo pretočne citometrije, tako da smo izmerili delež celic, ki so izražale GFP. Pri optimalni napetosti električnih pulzov za celice LoVo (700 V/cm) je bila uspešnost elektrotransfekcije tako s pmiRNA-K-ras kot s kontrolnim plazmidom pmiRNA-ctrl višja kot pri ostalih skupinah (slika 17). Z merjenjem intenzitete fluorescence celičnih kultur na bralniku mikroplošč Infinite 200 (Tecan) smo spremljali časovni potek izražanja GFP po električno posredovanem vnosu plazmidne DNA. Pri optimalni napetosti električnih pulzov za celice LoVo (700 V/cm) je povprečna relativna intenziteta fluorescence po elektrotransfekciji naraščala do drugega dne, ko je bila tako pri skupini, elektrotransfecirani s pmiRNA-K-ras, kot pri skupini, elektrotransfecirani s pmiRNA-ctrl, najvišja in tudi statistično značilno različna od vseh ostalih skupin. Četrty dan pa je povprečna relativna intenziteta fluorescence v primerjavi z drugim dnem že padla, vendar je bila pri skupinah, elektrotransfeciranih s pmiRNA-K-ras ali pmiRNA-ctrl, še vedno statistično značilno različna od vseh ostalih skupin (slika 18).

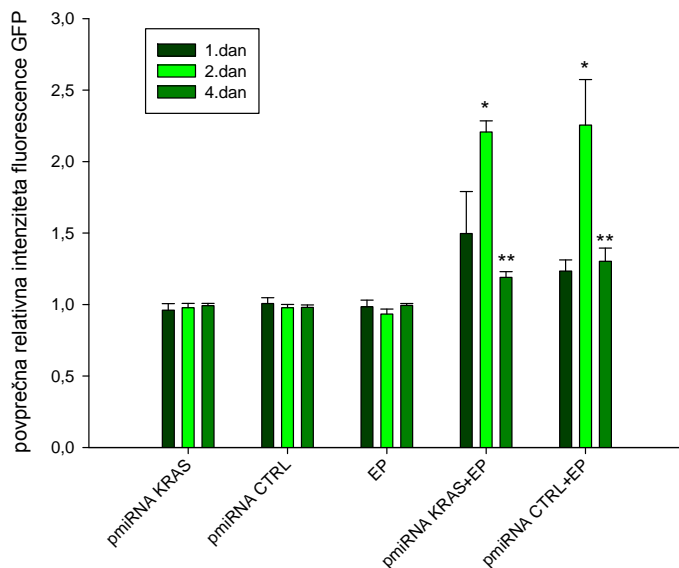




Slika 16: Slike celic pod fluorescentnim mikroskopom (spodnja vrstica) in pod vidno svetlobo (zgornja vrstica) po različnih skupinah: (1) kontrolnaskupina; (2) pmiRNA-K-ras; (3) pmiRNA-ctrl; (4) elektroporacija (EP); (5) pmiRNA-K-ras+EP; (6) pmiRNA-ctrl+EP.



Slika 17: Učinkovitost elektrotransfekcije celic LoVo s plazmidoma pmiRNA-K-ras oz. pmiRNA-ctrl, določena s pomočjo pretočnega citometra. Celice smo elektroporirali pri napetosti 700 V/cm. Stolpci prikazujejo srednje vrednosti učinkovitosti elektrotransfekcije in njim pripadajoče standardne napake.

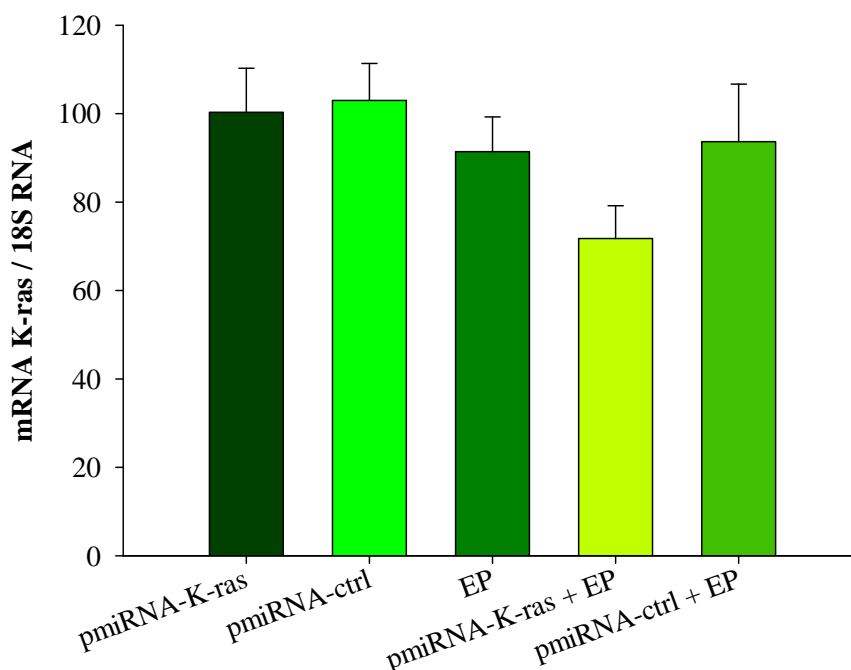


Slika 18: Povprečna relativna intenziteta fluorescence po elektrotransfekciji s pmiRNA-K-ras oz. pmiRNA-ctrl. Stolpci prikazujejo relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. \*P < 0,01 proti ostalim poskusnim skupinam celic.. \*\*P < 0,01 proti ostalim poskusnim skupinam celic.

#### 4.1.1.7 Učinek plazmidne DNA z zapisom za miRNA-*K-ras* na izražanje *K-ras* v celicah LoVo

Na celični liniji LoVo smo v pogojih *in vitro* testirali učinkovitost utišanja onkogenega *K-ras* po električno posredovanem vnosu plazmidne DNA, ki nosi zapis za miRNA, specifično za mRNA gena *K-ras*.

Pri učinkovitosti elektrotransfekcije celic z molekulami pmiRNA-*K-ras*, ki smo jo predhodno določili, smo s qRT-PCR izmerili manjšo količino mRNA za *K-ras* kot v kontrolni, kontrolni skupini. Sama elektroporacija je ravno tako znižala nivo mRNA-*K-ras*, a za manjši delež kot pri skupini elektrotransfecirani s pmiRNA-*K-ras*. Podoben učinek je imela tudi elektrotransfekcija celic LoVo s kontrolno plazmidno DNA (pmiRNA-ctrl) (slika 19).

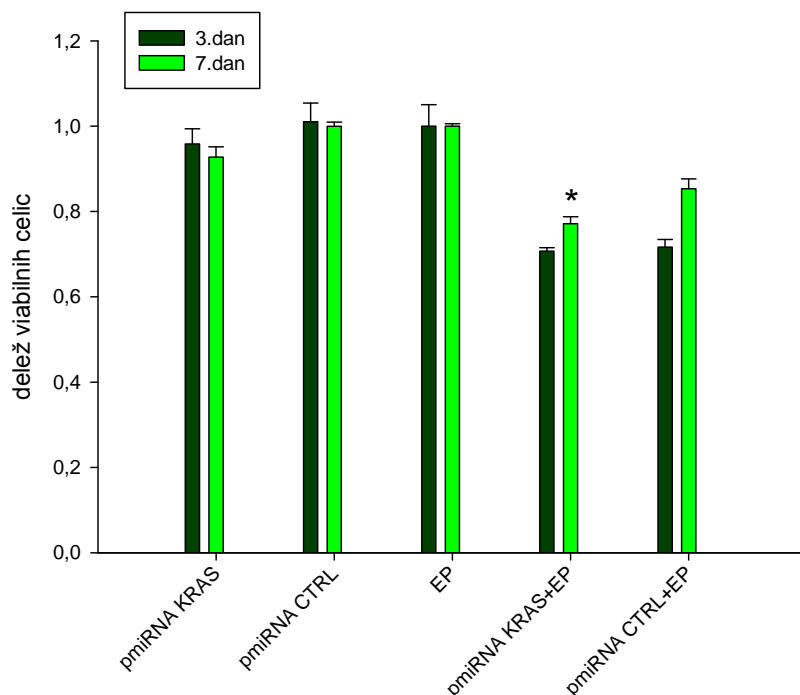


Slika 19: Nivo izražanja mRNA v celicah LoVo po inkubaciji s plazmidoma pmiRNA-*K-ras* ali pmiRNA-ctrl, samim ali v kombinaciji z elektroporacijo in po obdelavi samo z elektroporacijo. Stolpci prikazujejo relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic.

#### 4.1.1.8 Učinek plazmidne DNA z zapisom za miRNA-K-ras na viabilnost celic LoVo

Za oceno uporabnosti plazmidne DNA z zapisom za miRNA-K-ras smo naredili test viabilnosti celic. Za učinkovit vnos plazmidne DNA v celice *in vitro* smo uporabili elektroporacijo. Viabilnost celic smo merili tretji in sedmi dan po elektrotransfekciji celic s plazmidno DNA.

Viabilnost celic LoVo po elektrotransfekciji se je v skupini, ki smo jo elektrotransfecirali s pmiRNA-K-ras393 glede na kontrolno skupino zmanjšala tako tretji kot sedmi dan,. Sedmi dan je bilo zmanjšanje statistično značilno različno od vseh ostalih skupin. V skupini, ki smo jo elektrotransfecirali s pmiRNA-ctrl, se je viabilnost celic LoVo ravno tako zmanjšala tretji dan in sedmi dan glede na kontrolno skupino. Viabilnost pri skupini, ki smo jo elektrotransfecirali s pmiRNA-K-ras393, je bila tretji dan sicer manjša kot pri skupini elektrotransfecirani s pmiRNA-ctrl, vendar razlike niso bile statistično značilno različne, kar kaže na toksičnost plazmidne DNA, medtem ko se sedmi dan že pozna delovanje vnesene pmiRNA-K-ras393, ki deluje na tarčni gen (slika 20).



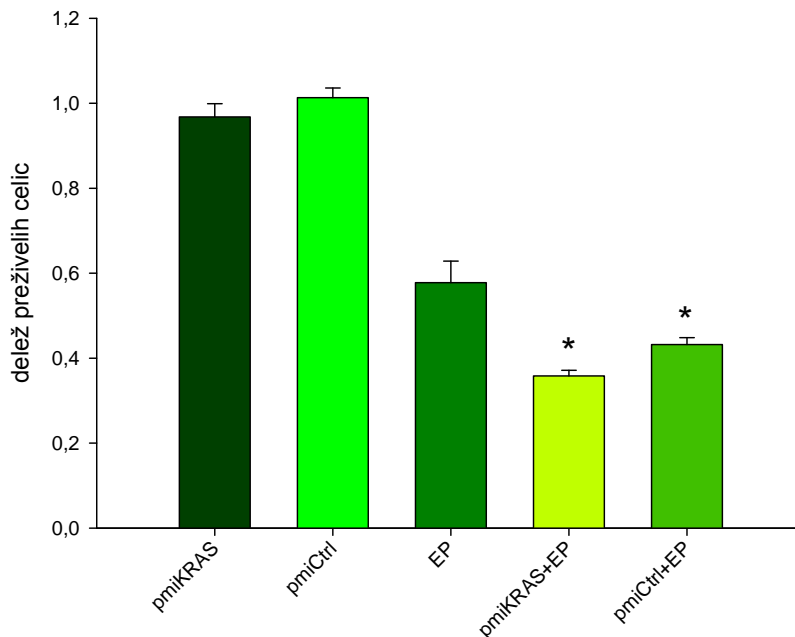
Slika 20: Viabilnost celic LoVo po inkubaciji s plazmidoma pmiRNA-K-ras ali pmiRNA-ctrl samim ali v kombinaciji z elektroporacijo in po obdelavi samo z elektroporacijo. Stolpci prikazujejo relativne srednje vrednosti viabilnosti celic in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino. \* $P < 0,01$  proti vsem ostalim skupinam.

#### 4.1.1.9 Učinek plazmidne DNA z zapisom za miRNA-K-ras na preživetje celic LoVo

Za oceno uporabnosti molekul miRNA-K-ras po elektrotransfekciji celic LoVo s pmiRNA-K-ras smo naredili test preživetja celic. Preživetje celic smo določili štirinajsti dan po poskusu.

Preživetje celic v skupini, ki smo jo samo elektroporirali, se je glede na kontrolno skupino zmanjšalo, kljub temu pa je bilo preživetje celic v skupini, ki smo jo elektrotransfecirali s pmiRNA-K-ras393, statistično značilno nižje kot v skupini, ki smo

jo samo elektroporirali. Nižje je bilo tudi v primerjavi s skupino celic, ki smo jo elektrotransfecirali s kontrolnim plazmidom pmiRNA-ctrl, vendar vrednosti niso bile statistično značilno različne, kar kaže na toksičnost plazmidne DNA (slika 21).

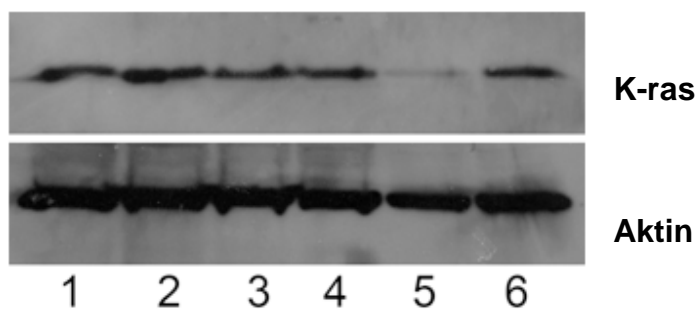


Slika 21: Preživetje celic LoVo po obdelavi s plazmidoma pmiRNA-K-ras393 ali pmiRNA-ctrl samim ali v kombinaciji z elektroporacijo in po obdelavi samo z elektroporacijo. Stolpci prikazujejo relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. \* $P < 0,01$  proti skupinam celic LoVo, ki smo jih samo elektroporirali ali dodali samo pmiRNA-K-ras oz. pmiRNA-ctrl.

#### 4.1.1.10 Učinek plazmidne DNA z zapisom za miRNA-K-ras na izražanje proteina K-ras

Analizo po Westernu smo naredili za določitev učinka elektrotransfekcije s plazmidno DNA na izražanje proteina K-ras v celicah LoVo. V primerjavi s skupino, ki ni bila tretirana, se je po elektrotransfekciji s pmiRNA-K-ras393 znižal nivo proteinov K-ras

za 90 %. Kontrolna plazmidna DNA pmiRNA-ctrl ni bistveno vplivala na izražanje proteina K-ras. Plazmidna DNA pmiRNA-K-ras393 pri uporabljeni celični liniji ni vplivala na nivo izražanja aktina, kar dokazuje o specifičnosti njihovega delovanja na mRNA za K-ras (slika 22).



Slika 22: Western blot analiza proteina K-ras in aktina v celicah LoVo: (1) kontrolna skupina; (2) pmiRNA-K-ras393; (3) pmiRNA-ctrl; (4) elektroporacija (EP); (5) pmiRNA-K-ras393+EP; (6) pmiRNA-ctrl+EP.

#### 4.1.2 Poskusi *In vivo*

##### 4.1.2.1 Učinek utišanja onkogenega *K-ras* na rast humanih podkožnih tumorjev adenokarcinoma debelega črevesa (LoVo)

Da bi določili terapevtski potencial utišanja onkogenega *K-ras* z molekulami miRNA-K-ras za zdravljenje adenokarcinoma debelega črevesa (LoVo), smo SCID mišim nasadili humane podkožne tumorje LoVo. Ko so tumorji dosegli velikost 40 mm<sup>3</sup> (približno 14 dni po nasaditvi tumorjev), smo začeli s terapijo. V sredino tumorjev smo vbrizgali po 50 µg plazmida pmiRNA-K-ras in jih po desetih minutah izpostavili električnim pulzom. Odziv tumorjev na terapijo smo spremljali z merjenjem njihove velikosti pred poskusom in 28 dni po njem, na vsake tri dni. Te odzive smo primerjali z odzivi tumorjev v kontrolnih skupinah, ki smo jih elektrotransfecirali s kontrolnim plazmidom pmiRNA-ctrl, pa tudi s kontrolno skupino tumorjev in skupinami, ki smo

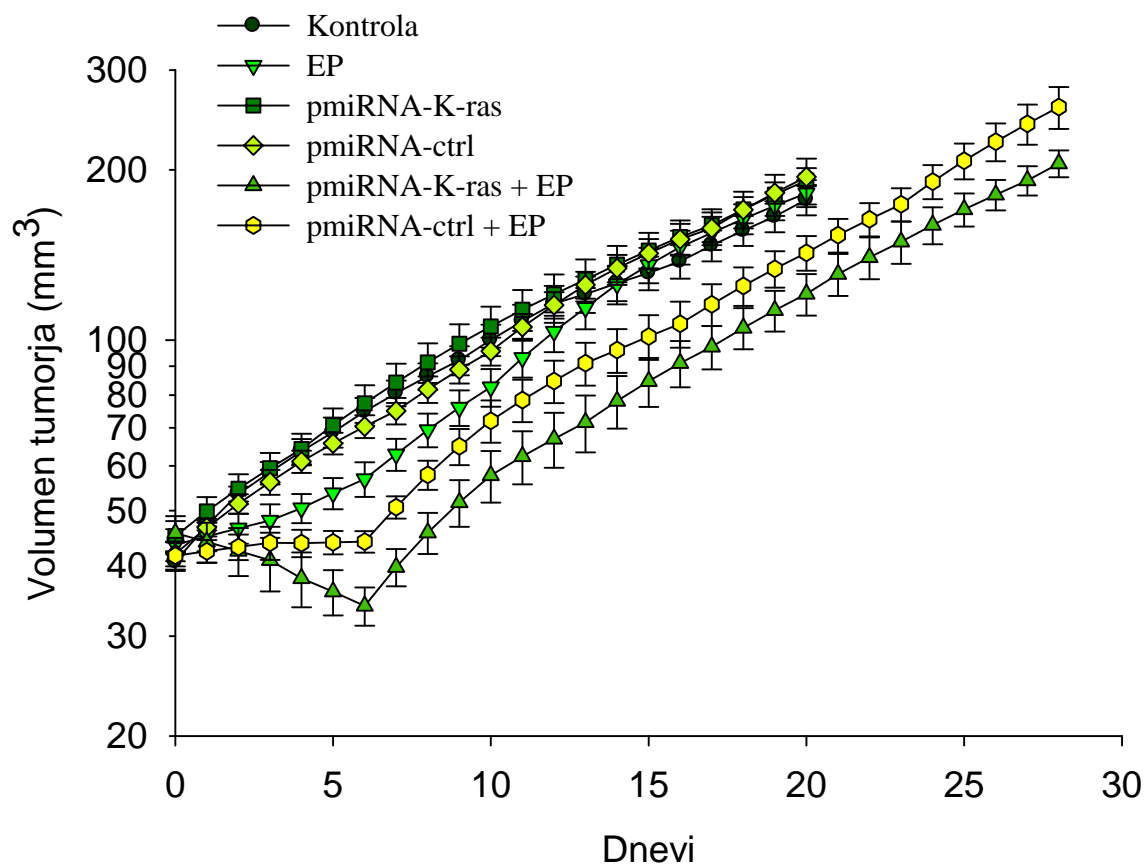
jih samo elektroporirali ali pa smo jim vbrizgali samo pmiRNA-K-ras oz. pmiRNA-ctrl brez naknadne elektroporacije.

Intratumorsko vbrizganje samo terapevtske (pmiRNA-K-ras) oz. kontrolne plazmidne DNA (pmiRNA-ctrl), pa tudi samo elektroporacija, niso bistveno vplivali na rast tumorjev adenokarcinoma LoVo, če jih primerjamo s kontrolno skupino tumorjev. Razlike v podvojitvenih časih rasti tumorjev pri teh treh skupinah se glede na kontrolno skupino niso izkazale za statistično značilno različne. Po elektrotransfekciji s terapevtskimi pmiRNA-K-ras so se tumorji prvih šest dni zmanjševali, nato pa se je njihova rast nadaljevala z enako hitrostjo rasti kot v kontrolnih skupinah. Podvojitveni čas je bil statistično značilno daljši, če ga primerjamo s skupinami tumorjev, kjer smo uporabili samo električne pulze ali samo pmiRNA-K-ras ali pmiRNA-ctrl. Podvojitveni čas je bil daljši tudi v primerjavi s skupino tumorjev, ki smo jo elektrotransfecirali s kontrolnimi molekulami pmiRNA-ctrl, vendar zaradi majhnega števila živali v poskusu ni dosegel statistično značilne razlike (tabela 6 in slika 23).

Tabela 6: Učinek elektrogenske terapije z molekulami miRNA-K-ras na rast podkožnih tumorjev adenokarcinoma debelega črevesa LoVo: a – podvojitveni čas tumorjev ( $AM \pm SE$ ), b – zaostanek v rasti tumorjev, c – logaritemske vrednosti deleža pobitih celic v posameznih tumorjih.

Skupina	n	DT (dnevi) <sup>a</sup>	GD (dnevi) <sup>b</sup>	$\log_{10}$ pobitih celic <sup>c</sup>
kontrola	7	7,51 ± 1,07		0
EP	7	10,44 ± 0,62	2,93	0,11
pmiRNA-K-ras	8	8,12 ± 0,88	0,61	0,02
pmiRNA-ctrl	7	8,31 ± 1,09	0,8	0,03
pmiRNA-K-ras + EP	7	15,78 ± 1,04	8,27	0,33
pmiRNA-ctrl + EP	7	12,25 ± 1,32	4,74	0,19



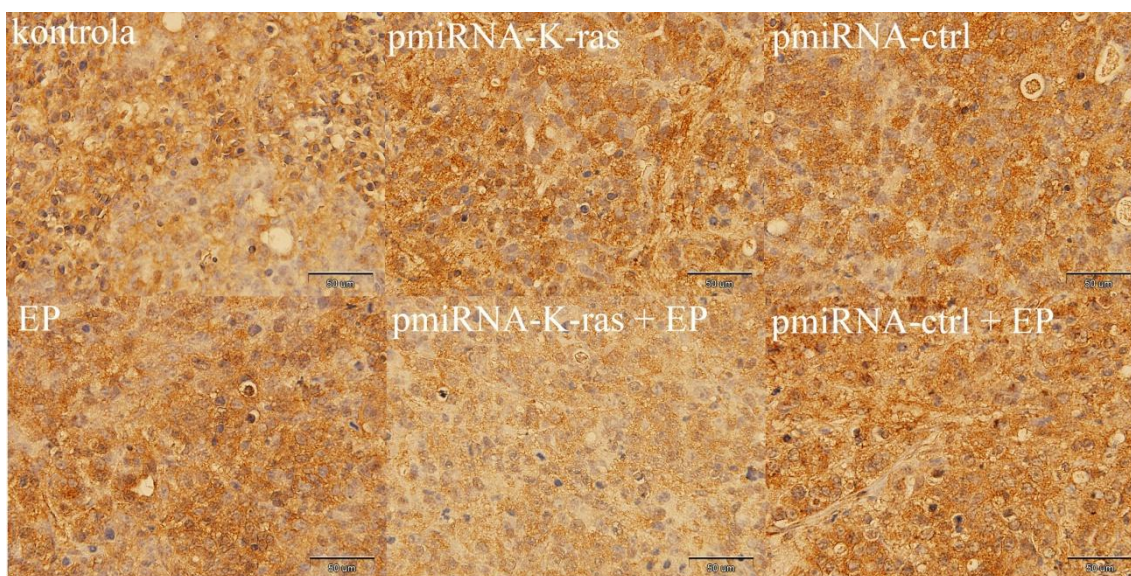


Slika 23: Rastne krivulje adenokarcinoma debelega črevesa LoVo po različnih terapijah: kontrola, elektroporacija (EP), pmiRNA-K.ras, pmiRNA-ctrl, pmiRNA-K-ras + EP in pmiRNA-ctrl + EP. Posamezna točka na rastni krivulji predstavlja aritmetično sredino najmanj sedmih tumorjev v posamezni eksperimentalni skupini ter njej pripadajočo standardno napako.

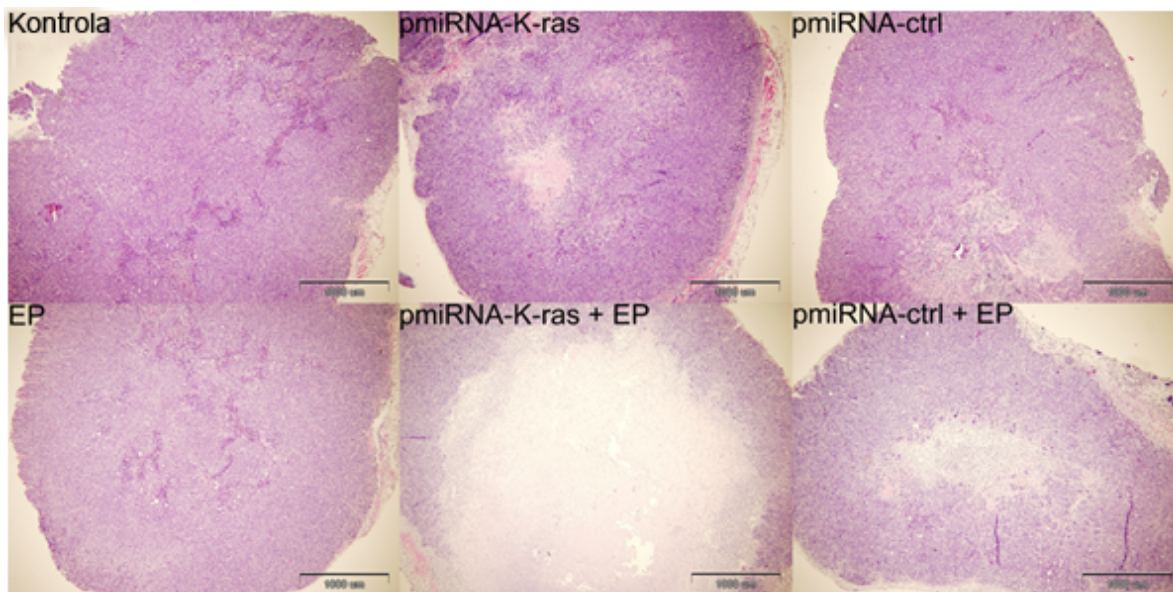
Izračuni logaritmskih vrednosti deleža pobitih celic (z uporabo enačbe 7) v tumorjih po posameznih terapijah so glede na kontrolno skupino pokazali, da je bil delež pobitih celic v skupini, ki smo jo elektrotransfecirali s pmiRNA-K-ras, 3-krat večji, kot v skupini, ki smo jo samo elektroporirali, in 1,7-krat večji kot v skupini, ki smo jo elektrotransfecirali s kontrolnim plazmidom (tabela 6).

Prisotnost proteina K-ras v tumorjih LoVo po različnih terapijah smo določali z imunohistokemičnim barvanjem tumorskih rezin z monoklonskim primarnim protitelesom za K-ras. Histološke preparate smo opazovali s svetlobnim

mikroskopom (Olympus), opremljenim s kamero CCD, pri 40× in 600× povečavi. Pri tem so rjava področja na imunohistokemično pobarvanih rezinah tumorjev predstavljala pozitivno reakcijo s proteini *K-ras*. S slike 24 je razvidno, da je reakcija s *K-ras* najšibkejša na tumorski rezini tumorja, ki smo ga elektrotransfecirali s pmiRNA-*K-ras*, kar kaže na to, da so molekule miRNA-*K-ras* utišale izražanje *K-ras*. Ker utišanje izražanja *K-ras* privede do celične smrti, smo pod 40× povečavo določili delež nekroze. Delež nekroze tumorjev pri posameznih eksperimentalnih skupinah smo analizirali s programom ImageJ (National Institute of Health). Pri tumorjih, elektrotransfeciranih s pmiRNA-*K-ras*, smo ugotovili večji delež nekroze kot pri ostalih eksperimentalnih skupinah. Nekroza je pri tej skupini obsegala približno 60 % površine histološke rezine tumorja, medtem ko je pri ostalih eksperimentalnih skupinah delež nekroze obsegal od 0 do 30 % površine histološkega preparata (slika 25).



Slika 24: Imunohistokemično barvane tumorske rezine adenokarcinoma LoVo z monoklonskim primarnim protitelesom za *K-ras* po različnih terapijah: kontrola, pmiRNA-*K.ras*, pmiRNA-ctrl, elektroporacija (EP), pmiRNA-*K-ras* + EP in pmiRNA-ctrl + EP. Histološke preparate smo opazovali s svetlobnim mikroskopom (Olympus), opremljenim s kamero CCD, pri 600× povečavi. Merilo: 50 µm. Rjava področja predstavljajo pozitivno reakcijo za protein *K-ras*.

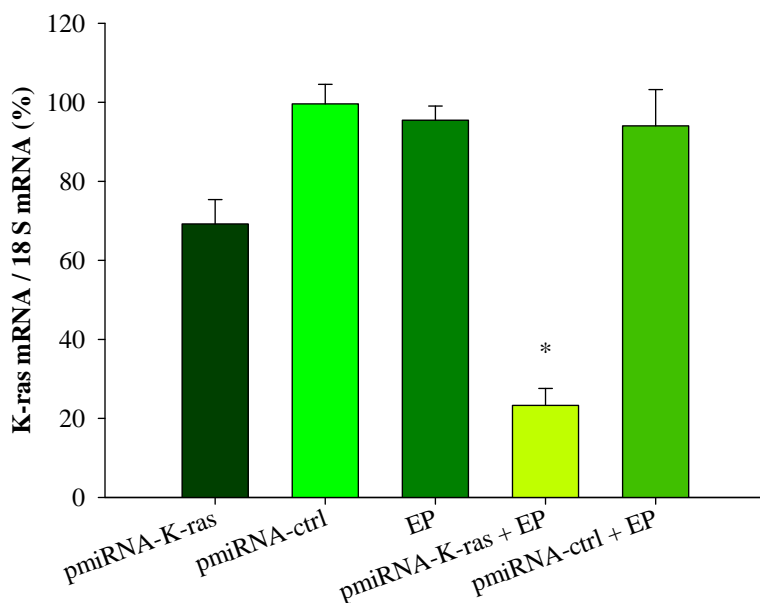


Slika 25: Tumorske rezine adenokarcinoma LoVo, barvane s hematoksilin-eozinskim barvilom po različnih terapijah: kontrola, pmiRNA-K.ras, pmiRNA-ctrl, elektroporacija (EP), pmiRNA-K-ras + EP in pmiRNA-ctrl + EP. Histološke preparate smo opazovali s svetlobnim mikroskopom (Olympus), opremljenim s kamero CCD, pri 40× povečavi. Merilo: 1000 µm. Manj intenzivno obarvana področja predstavljajo nekrozo tkiva.

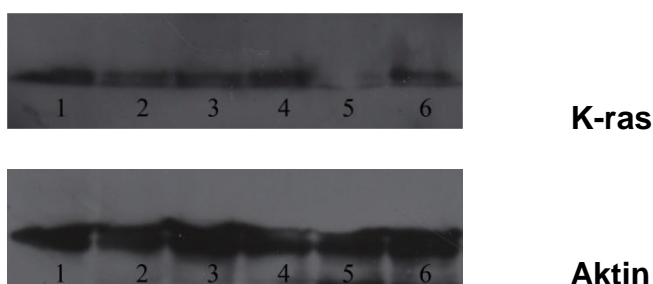
#### 4.1.2.2 Učinek električno posredovanega vnosa pmiRNA-K-ras v podkožne tumorje LoVo na nivo mRNA za *K-ras* in proteinov K-ras v tumorjih

Da bi preverili učinkovitost delovanja miRNA-K-ras na izražanje onkogenega *K-ras* po elektrotransfekciji tumorjev adenokarcinoma debelega črevesa (LoVo) s plazmidno DNA, ki kodira miRNA-K-ras, smo šesti dan po terapiji v vsaki eksperimentalni skupini odvzeli po dva do štiri tumorje ter ugotovili nivo mRNA za *K-ras* s qRT-PCR in vsebnost proteina K-ras v tumorjih z analizo po Westernu. Elektrotransfekcija tumorjev s pmiRNA-K-ras je statistično značilno znižala nivo mRNA za *K-ras* v primerjavi z vsemi ostalimi skupinami (slika 26). Analiza proteinov po Westernu je pokazala, da so molekule miRNA-K-ras tretji dan po elektrotransfekciji znižale izražanje K-ras za 95 % glede na kontrolno skupino, medtem ko je bilo izražanje K-ras po elektrotransfekciji tumorjev s kontrolno miRNA zmanjšano za 12 %, podobno kot po sami elektroporaciji (10 %). Molekule miRNA-K-ras niso vplivale na nivo

izražanja aktina, kar dokazuje o specifičnosti njihovega delovanja na mRNA za *K-ras* (slika 27).



Slika 26: Analiza mRNA-K-ras s qRT-PCR v tumorjih LoVo po različnih terapijah. Stolpci prikazujejo relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. \* $P < 0,01$  proti vsem ostalim skupinam.



Slika 27: Western blot analiza proteina K-ras in aktina v tumorjih LoVo po različnih terapijah: (1) kontrolna skupina; (2) pmiRNA-K-ras393; (3) pmiRNA-ctrl; (4) elektroporacija (EP); (5) pmiRNA-K-ras393+EP; (6) pmiRNA-ctrl+EP.

V naših raziskavah smo pokazali, da ima elektrotransfekcija celic humanega adenokarcinoma debelega črevesa (celična linija LoVo) s plazmidno DNA, ki kodira za *K-ras* specifične molekule miRNA, terapevtski potencial, kar se je poleg

zmanjšanja količine mRNA, ki kodira *K-ras*, in proteinov K-ras izrazilo tudi v zmanjšanem preživetju in viabilnosti celic LoVo v pogojih *in vitro*. V pogojih *in vivo* pa se je zmanjšala količina mRNA, ki kodira *K-ras*, in proteinov K-ras, poleg tega je bil opazen zaostanek rasti nasajenih podkožnih tumorjev LoVo.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Namen diplomske naloge je bil preveriti učinkovitost elektrogenske terapije raka z molekulami siRNA/miRNA v pogojih *in vitro* ter *in vivo*. Kot tarčni gen smo izbrali *K-ras* in ugotovili, ali ima utišanje onkogenega *K-ras* z molekulami miRNA v humanih adenokarcinomskih tumorjih debelega črevesa LoVo protitumorski učinek. Postavljeno hipotezo, da elektrogenska terapija z molekulami miRNA učinkovito utiša izražanje gena *K-ras* in deluje citotoksično in protitumorsko na celice in tumorje karcinoma debelega črevesa LoVo, smo potrdili, ker smo ugotovili manjšo količino tako proteina *K-ras* kot mRNA, ki kodira *K-ras*. Ravno tako smo ugotovili zmanjšano preživetje in viabilnost celic po terapiji ter zaostanek v rasti tumorjev.

### 5.1 Utišanje onkogenega *K-ras* v celicah adenokarcinoma debelega črevesa LoVo

Namen naše raziskave, narejene na adenokarcinomu debelega črevesa (celična linija LoVo), je bil ugotoviti vpliv utišanja onkogenega *K-ras* na preživetje in viabilnost celic LoVo *in vitro* kot tudi na rast podkožnih tumorjev adenokarcinoma debelega črevesa *in vivo*. Ravno tako nas je v obeh primerih zanimalo izražanje mRNA, ki kodira za *K-ras* in samo izražanje proteina *K-ras*. Celična linija LoVo je bila izbrana, ker ima mutirani gen za *K-ras* (Deng in sod., 2004; Gayet in sod., 2001; Ogino in sod., 2005). Pri mutirani različici gena *K-ras* je protein *K-ras* trajno aktiviran, kar vodi v nekontrolirano delitev celic, dediferenciacijo celic, nastanek tumorja in metastaziranje (Salomon in sod., 1995). Zato smo v okviru naše raziskave predpostavili, da utišanje izražanja mutiranega gena *K-ras* z molekulami siRNA/miRNA, specifičnimi za *K-ras*, deluje protitumorsko in citotoksično na celice karcinoma debelega črevesa LoVo.

V Sloveniji vsako leto zabeležijo po 1100 novih primerov raka debelega črevesa (Incidenca raka v Sloveniji 2006, 2009), ki je bolezen z visoko stopnjo umrljivosti, kar kaže na dejstvo, da so poleg klasičnih oblik zdravljenja (kirurška odstranitev tumorjev, kemoterapija, radioterapija) potrebne nove strategije zdravljenja, ki bi pripomogle k učinkovitejšemu zdravljenju te bolezni.

Raziskave kažejo, da se v 30–60 % primerov raka debelega črevesa pojavlja mutacija v genu *K-ras* (Andreyev in sod., 1997; Brink in sod., 2003; Minamoto in sod., 2000; Poehlmann in sod., 2007), le-ta je zato potencialna tarča za razvoj novih zdravil. Eden izmed obetavnejših novih načinov zdravljenja je uporaba interferenčnih molekul RNA, ki specifično utišajo *K-ras* izražanje. To je bilo dokazano v več *in vitro* in *in vivo* raziskavah, narejenih na tumorskih modelih trebušne slinavke (Brummelkamp in sod., 2002; Fleming in sod., 2005; Rejiba in sod., 2007; Wang in sod., 2005), in tudi v naši raziskavi, narejeni na tumorskem modelu raka debelega črevesa. V raziskavi na dveh celičnih linijah adenokarcinoma trebušne slinavke (Panc-1 in MiaPaca-2) v pogojih *in vitro* so pokazali, da utišanje izražanja onkogenega *K-ras* z molekulami siRNA, specifičnimi za *K-ras*, vodi do zmanjšane sposobnosti delitve ter migracije celic. Spremembe so bile opazne tudi na molekularnem nivoju, tako v povezavi s sposobnostjo migracije celic (zmanjšanje količine fibronektin-vezavnega proteina  $\alpha 5\beta 1$ ) kot tudi v zmanjšanem potencialu angiogeneze (zmanjšanje količine žilnega endotelijskega rastnega dejavnika VEGF in povečanje količine inhibitorja angiogeneze TSP-1) ter spremenjeni metabolni aktivnosti celic (Fleming in sod., 2005). V raziskavi na celičnih linijah adenokarcinoma trebušne slinavke (Panc-1 in Capan-1) v pogojih *in vivo* so pokazali, da utišanje izražanja onkogenega *K-ras* z molekulami siRNA ali shRNA, specifičnimi za *K-ras*, povzroči zaostanek v rasti tako podkožnih kot tudi ortotopičnih tumorjev (Rejiba in sod., 2007). V naši raziskavi na celični liniji adenokarcinoma debelega črevesa (LoVo) v pogojih *in vitro* ter *in vivo* smo ravno tako dokazali terapevtski potencial molekul siRNA in miRNA, specifičnih za onkogen *K-ras*.

V predhodnih raziskavah so dokazali, da molekule siRNA ali shRNA, ki so komplementarne mutiranemu delu onkogenega *K-ras*, utišajo izražanje samo mutiranega gena in ne tudi divjega tipa gena *K-ras*, s čimer je delovanje teh molekul omejeno samo na tumorske celice (Brummelkamp in sod., 2002; Fleming in sod., 2005; Rejiba in sod., 2007). V naši raziskavi smo izbirali med tremi različnimi potencialnimi terapevtskimi molekulami siRNA, katerih specifičnost je bila vezana na kodirajoči del gena za *K-ras*, ni pa zajemala same mutacije gena, zato je bilo v pogojih *in vivo* pomembno, da smo molekule vnesli lokalno – samo v tumorske celice, kar smo dosegli z uporabo elektroporacije kot načinom vnosa.

Izmed treh začetnih molekul siRNA-*K-ras* (53, 111 in 393) smo si glede na dobljene rezultate na celični liniji LoVo v pogojih *in vitro* izbrali najučinkovitejšo za nadaljevanje raziskav. Za najučinkovitejše so se izkazale molekule siRNA-*K-ras*393. Količina mRNA, ki kodira za protein *K-ras*, se je drugi dan po lipofekciji celic LoVo z molekulami siRNA-*K-ras*393 glede na kontrolno skupino zmanjšala za 77 %, kar je bilo statistično značilno nižje v primerjavi z ostalimi skupinami. Nivo proteina *K-ras* je bil tretji dan po lipofekciji za 74 % nižji v primerjavi s kontrolnima skupinama, kjer je bil uporabljen samo lipofektamin ali pa lipofektamin in kontrolne molekule siRNA. Glede na kontrolno skupino sta se v terapevtski skupini, zmanjšala tudi preživetje celic, in sicer za 28 %, ter viabilnost celic, ki se je šesti dan zmanjšala za 16 %. To je bilo v primerjavi s skupinama, kjer je bil uporabljen samo lipofektamin ali pa lipofektamin in kontrolne molekule siRNA, statistično značilno nižje. Rezultati so primerljivi s predhodno raziskavo na celičnih linijah adenokarcinoma trebušne slinavke Panc-1 in MiaPaca-1 v pogojih *in vitro*, kjer je bilo preživetje celic po lipofekciji z molekulami siRNA, specifičnimi za *K-ras*, zmanjšano. Njihov učinek se je kazal tudi v zmanjšanju količine tarčnega proteina *K-ras*. Ker je razpolovna doba molekul siRNA relativno kratka (Bartlett in Davis, 2006; Dykxhoorn in sod., 2006), smo pripravili plazmidno DNA z vključkom za GFP in miRNA (miRNA-*K-ras*), ki je bila po sekvenci identična najbolj učinkoviti molekuli siRNA za utišanje onkogenega *K-ras* (siRNA-*K-ras*393). Velikost pripravljenega plazmidnega vektorja smo preverili na agarozni elektroforezi in potrdili nukleotidno zaporedje vstavljenega DNA zaporedja



za utišanje izražanja *K-ras* z molekulami miRNA-*K-ras*. V celice LoVo smo plazmidni vektor vnesli z elektroporacijo ter tako dosegli 12–14 % učinkovitost transfekcije (izmerjeno preko fluorescence izraženega GFP) in drugi dan po elektrotransfekciji statistično značilno povečano relativno intenziteto fluorescence za 120–125 % (izmerjeno preko fluorescence izraženega GFP) glede na kontrolno, netretirano skupino, v primerjavi s skupinami, ki niso bile elektroporirane ali pa niso imele vnesenega plazmidnega vektorja. Viabilnost celic se je sedmi dan po elektroporaciji glede na kontrolno skupino zmanjšala za 23 %, kar je bilo statistično značilno manjše od vseh ostalih skupin; ravno tako je bilo preživetje celic manjše za 35 %. Vpliv utišanja je bil opazen tudi v zmanjšanju količine mRNA *K-ras* v celicah za 28 % in v zmanjšanju količine proteina *K-ras* za 95 % glede na kontrolno, netretirano skupino. K zmanjšanju preživetja celic je prispevala tudi toksičnost plazmidne DNA, saj je po elektrotransfekciji s kontrolnim plazmidom preživel 78 % celic glede na skupino, ki je bila samo elektroporirana.

Raziskavo smo nadaljevali s poskusi *in vivo* na humanih podkožnih tumorjih adenokarcinoma debelega črevesa (LoVo), s katerimi smo želeli dokazati učinkovitost elektrogenske terapije z molekulami miRNA-*K-ras*. Dokazali smo, da električno posredovan vnos plazmidne DNA, ki kodira miRNA-*K-ras*, vpliva na zaustavitev rasti tumorjev. Rast tumorjev smo spremljali 28 dni in v tem času eksperimentalne živali niso kazale znakov stranskih učinkov, s čimer smo dokazali, da je bila elektrogenska terapija z molekulami miRNA-*K-ras* lokalno delujoča. Elektrogenska terapija nasajenih podkožnih tumorjev adenokarcinoma debelega črevesa s plazmidno DNA, ki je kodirala miRNA-*K-ras*, je učinkovito zaustavila rast tumorjev, saj se je njihova velikost zmanjševala od prvega do šestega dne po elektrotransfekciji, nato pa so tumorji ponovno začeli rasti približno enako hitro kot v kontrolni skupini. Iz podvojitvenih časov rasti tumorjev po elektrogenski terapiji smo izračunali zaostanek v rasti, ki je bil v primerjavi s kontrolno skupino osem dneven. Podobno kot v poskusih z miRNA-*K-ras* v pogojih *in vitro* je tudi v tem sklopu poskusov v pogojih *in vivo* k zaustavitvi rasti tumorjev poleg molekul miRNA-*K-ras* prispevala toksičnost same plazmidne DNA, kar je razvidno iz zaostanka v rasti

tumorjev, ki so bili elektrotransfecirani s kontrolnim plazmidom (pmiRNA-ctrl). Tega ne moremo pripisati imunskemu odzivu (Heller in Coppola, 2002), saj smo v raziskavi uporabili miši, pri katerih je prisotna mutacija, zaradi katere predhodniki limfocitov ne dozoriijo. Mutacija se pojavlja v genih, ki kodirajo za DNA odvisno proteinsko kinazo, ali pa v genih, ki aktivirajo rekombinazo, ravno tako so lahko okvarjeni celični receptorji za interleukin (Perryman, 2004). Zaradi tega miši, ki imajo to mutacijo (SCID miši), ne morejo odgovoriti na vdor tujka z lastnim imunskim odgovorom, kar je idealno za poskuse s humanimi tumorskimi modeli. V skupini, ki je bila elektrotransfecirana s kontrolnim plazmidom (pmiRNA-ctrl), se prvih šest dni po terapiji hitrost rasti tumorjev ni spreminjala, nato pa so začeli rasti s podobno hitrostjo kot v kontrolni skupini. Ugotovili smo, da enkratna elektrotransfekcija tumorjev z molekulami miRNA-*K-ras* ne zaustavi rasti tumorjev popolnoma, kljub temu pa lahko trdimo, da ima utišanje izražanja onkogene *K-ras* znaten terapevtski učinek, saj je bil delež pobitih celic v tumorjih, elektrotransfeciranih s pmiRNA-*K-ras*, 1,7× večji, kot pri tumorjih, elektrotransfeciranih s kontrolnim plazmidom pmiRNA-ctrl, kar je glede na to, da smo v tumorjih adenokarcinoma debelega črevesa ciljali samo eno mutacijo, veliko. Delež pobitih celic smo izračunali po enačbi 7 (7), ki smo jo lahko uporabili, ker je bila krivulja rasti po ponovnem izrastu tumorjev vzporedna krivulji rasti kontrolne skupine. Avtorji so v drugih raziskavah pokazali, da je učinkovitost in trajanje delovanja molekul siRNA/shRNA/miRNA po nevirusnem načinu vnosa v tkivo možno povečati z več zaporednimi terapijami (Nakai in sod., 2007; Rejiba in sod., 2007; Takahashi in sod., 2006; Zhang in sod., 2008). Rezultati naše raziskave se skladajo z raziskavo elektrogenske terapije na nasajenih podkožnih tumorjih adenokarcinoma trebušne slinavke s plazmidno DNA, ki je kodirala shRNA-*K-ras* (Rejiba in sod., 2007). Tudi v tej raziskavi utišanje izražanja onkogene *K-ras* ni vodilo v popolno zaustavitev rasti tumorjev, zaostanek rasti po dveh zaporednih elektrotransfekcijah (druga elektrotransfekcija z zamikom sedmih dni) pa je glede na kontrolno skupino znašal 15 dni (Rejiba in sod., 2007). V naši raziskavi v pogojih *in vivo* smo potrdili utišanje izražanja onkogene *K-ras* v tumorjih z molekulami miRNA-*K-ras* tudi z analizo s qRT-PCR in z analizo po Westernu, s katerima smo izmerili za 76 % nižji nivo mRNA za *K-ras* ter za 95 % nižji nivo proteinov *K-ras* glede na kontrolno skupino.

Naši rezultati, skupaj z drugimi do zdaj objavljenimi raziskavami, dokazujejo, da so interferenčne molekule RNA (siRNA/shRNA/miRNA), ki utišajo mutirano različico gena *K-ras* v tumorjih, potencialne terapevtske molekule za zdravljenje različnih oblik raka (Brummelkamp in sod., 2002; Fleming in sod., 2005; Rejiba in sod., 2007). Kolikor nam je znano, doslej ni bila narejena še nobena raziskava, v kateri bi terapijo z interferenčnimi molekulami RNA in uporabo elektroporacije preizkusili na adenokarcinomu debelega črevesa, prav tako pa za utišanje onkogenega *K-ras* do sedaj še niso uporabili molekul miRNA. Elektroporacija se je izkazala kot učinkovita metoda za lokalni vnos plazmidne DNA, ki kodira miRNA-*K-ras*, v tumorje adenokarcinoma debelega črevesa. Na podlagi dobljenih rezultatov so možne nadaljnje raziskave elektrogenske terapije raka debelega črevesa s kombinacijo več različnih molekul siRNA/miRNA, ki bi naenkrat ciljale več mutacij, kot pomožne terapije standardnim načinom zdravljenja.

## 5.2 Sklepi

V diplomski nalogi smo ugotovili, da ima elektrotransfekcija celic humanega adenokarcinoma debelega črevesa (celična linija LoVo) s plazmidno DNA, ki kodira molekule miRNA, specifične za *K-ras*, terapevtski potencial, kar se kaže v zmanjšanju količine tarčnega proteina *K-ras* in preživetju celic v pogojih *in vitro*, odraža pa tudi v pogojih *in vivo* v zaostanku rasti nasajenih podkožnih tumorjev LoVo in zmanjšanju količine tarčnega proteina *K-ras*.

## 6 POVZETEK

Rak debelega črevesa se po incidenci uvršča med najpogostejše vrste raka. Mutacija gena *K-ras* se pojavlja kar pri 30–60 % odkritih primerov. Kadar je *K-ras* mutiran, je odgovoren za nekontrolirano delitev in dediferenciacijo celic ter nastanek tumorja in metastaziranje, standardni načini zdravljenja pa so neučinkoviti. Zato predstavlja utišanje izražanje *K-ras* s pomočjo specifičnih nukleotidnih zaporedij privlačen nov način zdravljenja raka debelega črevesa.

V naši raziskavi smo izbirali med tremi različnimi potencialnimi terapevtskimi molekulami siRNA, katerih specifičnost je bila vezana na kodirajoči del gena za *K-ras*, ni pa zajemala same mutacije gena, zato je bilo v pogojih *in vivo* pomembno, da smo molekule vnesli lokalno – samo v tumorske celice, kar smo dosegli z uporabo elektroporacije kot načinom vnosa. Izmed treh začetnih molekul siRNA-*K-ras* (53, 111 in 393) smo si glede na dobljene rezultate na celični liniji LoVo v pogojih *in vitro* izbrali najučinkovitejšo za nadaljevanje raziskav. Za najučinkovitejše so se izkazale molekule siRNA-*K-ras*393. Pripravili smo plazmidno DNA z vključkom za GFP in miRNA (miRNA-*K-ras*), ki je bila po sekvenci identična najučinkovitejši molekuli siRNA za utišanje onkogenega *K-ras* (siRNA-*K-ras*393). Po elektrotransfekciji celic in tumorjev karcinoma debelega črevesa LoVo s pmiRNA-*K-ras* se je zmanjšala tako količina mRNA, ki kodira za *K-ras*, in količina proteinov *K-ras* kot viabilnost in preživetje celic. Količina proteinov se je pri pogojih *in vitro* zmanjšala za 95 % glede na kontrolno, netretirano skupino, medtem ko se je količina mRNA, ki kodira za *K-ras*, zmanjšala za 28 %. Pri pogojih *in vivo* se je količina mRNA, ki kodira za *K-ras*, po elektrotransfekciji s pmiRNA –*K-ras* zmanjšala za 76 %, količina proteinov *K-ras* pa za 95 %. Ravno tako je bil opazen zaostanek v rasti tumorjev, ki je znašal osem dni glede na kontrolno neelektrotransfecirano skupino. Elektroporacija se je izkazala kot učinkovita metoda za lokalni vnos plazmidne DNA, ki kodira za miRNA-*K-ras*, v tumorje adenokarcinoma debelega črevesa.

Na podlagi dobljenih rezultatov so priporočljive nadaljnje raziskave elektrogenske terapije raka debelega črevesa s kombinacijo več različnih molekul siRNA/miRNA, ki bi naenkrat ciljale več mutacij, kot dodatne terapije standardnim načinom zdravljenja.

## 7 VIRI

<http://clinicaltrials.gov>

<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>

<http://www.lgcpromochem-atcc.com/>

[http://www.vical.com/products/cancer\\_therapies/other\\_cancer\\_programs.htm](http://www.vical.com/products/cancer_therapies/other_cancer_programs.htm)

<http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical>

Agami, R. 2002. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, 6, 6: 829–834

Andreyev, H. J., Tilsed, J. V., Cunningham, D., Sampson, S. A., Norman, A. R., Schneider, H. J., Clarke, P. A. 1997. K-ras mutations in patients with early colorectal cancers. *Gut*, 41, 3: 323–329

Bantounas, I., Phylactou, L. A., Uney, J. B. 2004. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J.Mol.Endocrinol.*, 33, 3: 545–557

Bartlett, D. W. in Davis, M. E. 2006. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res.*, 34, 1: 322–333

Belehradek, M., Domenge, C., Luboinski, B., Orłowski, S., Behraderk, J., Jr., Mir, L. M. 1993. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer*, 72, 12: 3694–3700

Bernhardt, J. in Pauly, H. 1973. On the generation of potential differences across the membranes of ellipsoidal cells in an alternating electrical field. *Biophysik.*, 10, 3: 89–98

Bettan, M., Ivanov, M. A., Mir, L. M., Boissiere, F., Delaere, P., Scherman, D. 2000. Efficient DNA electrotransfer into tumors. *Bioelectrochemistry*, 52, 1: 83–90

Birmingham, A., Anderson, E., Sullivan, K., Reynolds, A., Boese, Q., Leake, D., Karpilow, J., Khvorova, A. 2007. A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. *Nat.Protoc.*, 2, 9: 2068–2078

Brink, M., de Goeij, A. F., Weijnenberg, M. P., Roemen, G. M., Lentjes, M. H., Pachen, M. M., Smits, K. M., de Bruine, A. P., Goldbohm, R. A., van den Brandt, P. A. 2003. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*, 24, 4: 703–710

- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., Agami, R. 2002. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, 2, 3: 243–247
- Čemažar, M. 2005. Tumor Biology. Electroporation based Technologies and Treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course, Ljubljana 2005, Ljubljana, Kramar, P., Miklavčič, D., Faculty of Electrical Engineering: 71--75
- Čemažar, M., Golzio, M., Serša, G., Rols, M. P., Teissie, J. 2006. Electrically-assisted nucleic acids delivery to tissues in vivo: where do we stand? *Curr.Pharm.Des*, 12, 29: 3817–3825
- Čemažar, M., Grošel, A., Glavac, D., Kotnik, V., Skobrne, M., Kranjc, S., Mir, L. M., Andre, F., Opolon, P., Serša, G. 2003. Effects of electrogenetherapy with p53wt combined with cisplatin on curvival of human tumor cell lines with different p53 status. *DNA Cell Biol.*, 22, 12: 765–775
- Čemažar, M., Miklavčič, D., Serša, G. 1998. Intrinsic sensitivity of tumor cells to bleomycin as an indicator of tumor response to electrochemotherapy. *Jpn.J.Cancer Res.*, 89, 3: 328–333
- Čemažar, M. in Serša, G. 2007. Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues. *Curr.Opin.Mol.Ther.*, 9, 6: 554–562
- Čemažar, M., Serša, G., Wilson, J., Tozer, G. M., Hart, S. L., Grošel, A., Dachs, G. U. 2002. Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques: electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector. *Cancer Gene Ther.*, 9, 4: 399–406
- Chapman, E. J. in Carrington, J. C. 2007. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat.Rev.Genet.*, 8, 11: 884–896
- Chiu, Y. L. in Rana, T. M. 2002. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol.Cell*, 10, 3: 549–561
- Cullen, B. R. 2006. Induction of stable RNA interference in mammalian cells. *Gene Ther.*, 13, 6: 503–508
- Cullen, L. M. in Arndt, G. M. 2005. Genome-wide screening for gene function using RNAi in mammalian cells. *Immunol.Cell Biol.*, 83, 3: 217–223
- Daud, A. I., DeConti, R. C., Andrews, S., Urbas, P., Riker, A. I., Sondak, V. K., Munster, P. N., Sullivan, D. M., Ugen, K. E., Messina, J. L., Heller, R. 2008. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J.Clin.Oncol.*, 26, 36: 5896–5903

- Deng, G., Bell, I., Crawley, S., Gum, J., Terdiman, J. P., Allen, B. A., Truta, B., Sleisenger, M. H., Kim, Y. S. 2004. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin.Cancer Res.*, 10, 1 Pt 1: 191–195
- Devi, G. R. 2006. siRNA-based approaches in cancer therapy. *Cancer Gene Ther.*, 13, 9: 819–829
- Domenge, C., Orłowski, S., Luboinski, B., De, B. T., Schwaab, G., Belehradek, J., Jr., Mir, L. M. 1996. Antitumor electrochemotherapy: new advances in the clinical protocol. *Cancer*, 77, 5: 956–963
- Downward, J. 2004. RNA interference. *BMJ*, 328, 7450: 1245–1248
- Downward, J. 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat.Rev.Cancer*, 3, 1: 11–22
- Dykxhoorn, D. M., Palliser, D., Lieberman, J. 2006. The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther.*, 13, 6: 541–552
- Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Wixon, J. 2007. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J.Gene Med.*, 9, 10: 833–842
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 6669: 806–811
- Fleming, J. B., Shen, G. L., Holloway, S. E., Davis, M., Brekken, R. A. 2005. Molecular consequences of silencing mutant *K-ras* in pancreatic cancer cells: justification for *K-ras*-directed therapy. *Mol.Cancer Res.*, 3, 7: 413–423
- Gayet, J., Zhou, X. P., Duval, A., Rolland, S., Hoang, J. M., Cottu, P., Hamelin, R. 2001. Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene*, 20, 36: 5025–5032
- Ge, G., Wong, G. W., Luo, B. 2005. Prediction of siRNA knockdown efficiency using artificial neural network models. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 336, 2: 723–728
- Gehl, J., Skovsgaard, T., Mir, L. M. 1998. Enhancement of cytotoxicity by electroporation: an improved method for screening drugs. *Anticancer Drugs*, 9, 4: 319–325
- Glass, L. F., Jaroszeski, M., Gilbert, R., Reintgen, D. S., Heller, R. 1997. Intralesional bleomycin-mediated electrochemotherapy in 20 patients with basal cell carcinoma. *J.Am.Acad Dermatol.*, 37, 4: 596–599



- Glass, L. F., Pepine, M. L., Fenske, N. A., Jaroszeski, M., Reintgen, D. S., Heller, R. 1996. Bleomycin-mediated electrochemotherapy of metastatic melanoma. *Arch.Dermatol.*, 132, 11: 1353–1357
- Golzio, M., Rols, M. P., Teissie, J. 2004. In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. *Methods*, 33, 2: 126–135
- Golzio, M., Teissie, J., Rols, M. P. 2002. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A.*, 99, 3: 1292–1297
- Grayson, A. C., Doody, A. M., Putnam, D. 2006. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro. *Pharm.Res.*, 23, 8: 1868–1876
- Grošel, A., Serša, G., Kranjc, S., Čemažar, M. 2006. Electrogene therapy with p53 of murine sarcomas alone or combined with electrochemotherapy using cisplatin. *DNA Cell Biol.*, 25, 12: 674–683
- Haasnoot, P. C., Cupac, D., Berkhout, B. 2003. Inhibition of virus replication by RNA interference. *J.Biomed.Sci.*, 10, 6 Pt 1: 607–616
- Hanahan, D. in Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 1: 57–70
- Heller, L., Jaroszeski, M. J., Coppola, D., Pottinger, C., Gilbert, R., Heller, R. 2000. Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas in vivo. *Gene Ther.*, 7, 10: 826–829
- Heller, L., Merkler, K., Westover, J., Cruz, Y., Coppola, D., Benson, K., Daud, A., Heller, R. 2006. Evaluation of toxicity following electrically mediated interleukin-12 gene delivery in a B16 mouse melanoma model. *Clin.Cancer Res.*, 12, 10: 3177–3183
- Heller, L. C. in Coppola, D. 2002. Electrically mediated delivery of vector plasmid DNA elicits an antitumor effect. *Gene Ther.*, 9, 19: 1321–1325
- Heller, R. 1995. Treatment of cutaneous nodules using electrochemotherapy. *J.Fla.Med Assoc.*, 82, 2: 147–150
- Heller, R., Jaroszeski, M. J., Glass, L. F., Messina, J. L., Rapaport, D. P., DeConti, R. C., Fenske, N. A., Gilbert, R. A., Mir, L. M., Reintgen, D. S. 1996. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. *Cancer*, 77, 5: 964–971
- Heller, R., Jaroszeski, M. J., Reintgen, D. S., Puleo, C. A., DeConti, R. C., Gilbert, R. A., Glass, L. F. 1998. Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin. *Cancer*, 83, 1: 148–157

- Hirons, G. T., Fawcett, J. J., Crissman, H. A. 1994. TOTO and YOYO: new very bright fluorochromes for DNA content analyses by flow cytometry. *Cytometry*, 15, 2: 129–140
- Huesken, D., Lange, J., Mickanin, C., Weiler, J., Asselbergs, F., Warner, J., Meloon, B., Engel, S., Rosenberg, A., Cohen, D., Labow, M., Reinhardt, M., Natt, F., Hall, J. 2005. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat.Biotechnol.*, 23, 8: 995–1001
- Incidenca raka v Sloveniji 2006, Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Register raka Republike Slovenije, 2009
- Izquierdo, M. 2005. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.*, 12, 3: 217–227
- Jana, S., Chakraborty, C., Nandi, S., Deb, J. K. 2004. RNA interference: potential therapeutic targets. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 65, 6: 649–657
- Janitz, M., Vanhecke, D., Lehrach, H. 2006. High-throughput RNA interference in functional genomics. *Handb.Exp.Pharmacol.*, 173: 97–104
- Jaroszski, M. J., Dang, V., Pottinger, C., Hickey, J., Gilbert, R., Heller, R. 2000. Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation in vitro. *Anticancer Drugs*, 11, 3: 201–208
- Kakorin, S., Stoylov, S. P., Neumann, E. 1996. Electro-optics of membrane electroporation in diphenylhexatriene-doped lipid bilayer vesicles. *Biophys.Chem.*, 58, 1–2: 109–116
- Kawasaki, H. in Taira, K. 2004. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature*, 431, 7005: 211–217
- Kesmodel, S. B. in Spitz, F. R. 2003. Gene therapy for cancer and metastatic disease. *Expert.Rev.Mol.Med.*, 5, 17: 1–18
- Ketting, R. F., Haverkamp, T. H., van Luenen, H. G., Plasterk, R. H. 1999. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell*, 99, 2: 133–141
- Kotnik, T., Macek-Lebar, A., Kanduser, M., Pucihar, G., Pavlin, M., Valic, B., Miklavčič, D. 2005. Elektroporacija celiene membrane: teorija ter poizkusi *in vitro*. *Med.Razg.*, 44, 81–90
- Kubota, Y., Mir, L. M., Nakada, T., Sasagawa, I., Suzuki, H., Aoyama, N. 1998. Successful treatment of metastatic skin lesions with electrochemotherapy. *J.Urol.*, 160, 4: 1426

- Lohr, F., Lo, D. Y., Zaharoff, D. A., Hu, K., Zhang, X., Li, Y., Zhao, Y., Dewhirst, M. W., Yuan, F., Li, C. Y. 2001. Effective tumor therapy with plasmid-encoded cytokines combined with in vivo electroporation. *Cancer Res.*, 61, 8: 3281–3284
- Lu, R., Maduro, M., Li, F., Li, H. W., Broitman-Maduro, G., Li, W. X., Ding, S. W. 2005. Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 436, 7053: 1040–1043
- McAnuff, M. A., Rettig, G. R., Rice, K. G. 2007. Potency of siRNA versus shRNA mediated knockdown in vivo. *J.Pharm.Sci.*, 96, 11: 2922–2930
- McManus, M. T., Petersen, C. P., Haines, B. B., Chen, J., Sharp, P. A. 2002. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA.*, 8, 6: 842–850
- Melvik, J. E., Pettersen, E. O., Gordon, P. B., Seglen, P. O. 1986. Increase in cis-dichlorodiammineplatinum (II) cytotoxicity upon reversible electroporation of the plasma membrane in cultured human NHK 3025 cells. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.*, 22, 12: 1523–1530
- Mesojednik, S., Kamensek, U., Čemažar, M. 2008. Evaluation of shRNA-mediated gene silencing by electroporation in LPB fibrosarcoma cells. *Radiol.Oncol.*, 42, 82–92
- Mesojednik, S., Pavlin, D., Serša, G., Coer, A., Kranjc, S., Grošel, A., Tevz, G., Čemažar, M. 2007. The effect of the histological properties of tumors on transfection efficiency of electrically assisted gene delivery to solid tumors in mice. *Gene Ther.*, 14, 17: 1261–1269
- Meyer, M. in Wagner, E. 2006. Recent developments in the application of plasmid DNA-based vectors and small interfering RNA therapeutics for cancer. *Hum.Gene Ther.*, 17, 11: 1062–1076
- Miklavčič, D. in Puc, M. 2006. Electroporation. *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*, New York, John Wiley & Sons
- Minamoto, T., Mai, M., Ronai, Z. 2000. K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers--a review. *Cancer Detect.Prev.*, 24, 1: 1–12
- Mir, L. M., Banoun, H., Paoletti, C. 1988. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: direct access to the cytosol. *Exp.Cell Res.*, 175, 1: 15–25
- Mir, L. M., Belehradek, M., Domenge, C., Orlowski, S., Poddevin, B., Belehradek, J. Jr., Schwaab, G., Luboinski, B., Paoletti, C. 1991a. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial. *C R Acad Sci III*, 313, 613–618

- Mir, L. M., Moller, P. H., Andre, F., Gehl, J. 2005. Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. *Adv.Genet.*, 54, 83–114
- Mir, L. M., Orłowski, S., Belehradek, J. Jr., Teissie, J., Rols, M. P., Serša, G., Miklavčič, D., Gilbert, R., Heller, R. 1995. Biomedical applications of electric pulses with special emphasis on antitumor electrochemotherapy. *Bioelectroch.Bioener.*, 38, 203–207
- Mir, L. M., Orłowski, S., Belehradek, J., Jr., Paoletti, C. 1991b. Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur.J.Cancer*, 27, 1: 68–72
- Mitrovič, T. 2003. Gene transfer systems. *Medicine and Biology*, 10, 3: 101–105
- Morris, K. V., Chan, S. W., Jacobsen, S. E., Looney, D. J. 2004. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, 305, 5688: 1289–1292
- Nakai, N., Kishida, T., Shin-Ya, M., Imanishi, J., Ueda, Y., Kishimoto, S., Mazda, O. 2007. Therapeutic RNA interference of malignant melanoma by electrotransfer of small interfering RNA targeting *Mitf*. *Gene Ther.*, 14, 4: 357–365
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, 2, 4: 279–289
- Neumann, E., Kakorin, S., Toensing, K. 2000. Principles of membrane electroporation and transport of macromolecules. *Methods in Molecular Medicine*, 37, 1–35
- Neumann, E. in Rosenheck, K. 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J.Membr.Biol.*, 10, 3: 279–290
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P. H. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.*, 1, 7: 841–845
- Niidome, T. in Huang, L. 2002. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther.*, 9, 24: 1647–1652
- Nishikawa, M. in Huang, L. 2001. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum.Gene Ther.*, 12, 8: 861–870
- Novina, C. D. in Sharp, P. A. 2004. The RNAi revolution. *Nature*, 430, 6996: 161–164
- Ogino, S., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Yan, L., Cantor, M., Namgyal, C., Minokudson, M., Lauwers, G. Y., Loda, M., Fuchs, C. S. 2005. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J.Mol.Diagn.*, 7, 3: 413–421

- Okino, M. in Mohri, H. 1987. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *Jpn.J.Cancer Res.*, 78, 12: 1319–1321
- Orlowski, S., Belehradek, J., Jr., Paoletti, C., Mir, L. M. 1988. Transient electroporation of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem.Pharmacol.*, 37, 24: 4727–4733
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., Conklin, D. S. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.*, 16, 8: 948–958
- Pai, S. I., Lin, Y. Y., Macaes, B., Meneshian, A., Hung, C. F., Wu, T. C. 2006. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther.*, 13, 6: 464–477
- Palmer, D. H., Young, L. S., Mautner, V. 2006. Cancer gene-therapy: clinical trials. *Trends Biotechnol.*, 24, 2: 76–82
- Pathak, P. in Katiyar, V. K. 2007. Multi-Functional Nanoparticles and Their Role in Cancer Drug Delivery – A Review. *Journal of Nanotechnology Online*, 3, 3: 1–17
- Pavlin, M., Pavselj, N., Miklavčič, D. 2002. Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system. *IEEE Trans.Biomed.Eng.*, 49, 6: 605–612
- Perryman, L. E. 2004. Molecular pathology of severe combined immunodeficiency in mice, horses, and dogs. *Vet.Pathol.*, 41, 2: 95–100
- Poehlmann, A., Kuester, D., Meyer, F., Lippert, H., Roessner, A., Schneider-Stock, R. 2007. K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathol.Res.Pract.*, 203, 7: 489–497
- Prud'homme, G. J., Glinka, Y., Khan, A. S., Draghia-Akli, R. 2006. Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. *Curr.Gene Ther.*, 6, 2: 243–273
- Pucihar, G., Kotnik, T., Teissie, J., Miklavčič, D. 2007. Electroporation of dense cell suspensions. *Eur.Biophys.J.*, 36, 3: 173–185
- Rejiba, S., Wack, S., Aprahamian, M., Hajri, A. 2007. K-ras oncogene silencing strategy reduces tumor growth and enhances gemcitabine chemotherapy efficacy for pancreatic cancer treatment. *Cancer Sci.*, 98, 7: 1128–1136
- Rochlitz, C. F. 2001. Gene therapy of cancer. *Swiss.Med.Wkly.*, 131, 1–2: 4–9

- Rodriguez-Cuevas, S., Barroso-Bravo, S., manza-Estrada, J., Cristobal-Martinez, L., Gonzalez-Rodriguez, E. 2001. Electrochemotherapy in primary and metastatic skin tumors: phase II trial using intralesional bleomycin. *Arch.Med Res.*, 32, 4: 273–276
- Rols, M. P. 2006a. Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 1758, 3: 423–428
- Rols, M. P. 2006b. Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 1758, 3: 423–428
- Rols, M. P., Bachaud, J. M., Giraud, P., Chevreau, C., Roche, H., Teissie, J. 2000. Electrochemotherapy of cutaneous metastases in malignant melanoma. *Melanoma Res.*, 10, 5: 468–474
- Rols, M. P., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S., Teissie, J. 1998a. In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat.Biotechnol.*, 16, 2: 168–171
- Rols, M. P., Delteil, C., Golzio, M., Teissie, J. 1998b. In vitro and ex vivo electrically mediated permeabilization and gene transfer in murine melanoma. *Bioelectroch.Bioener.*, 47, 129–134
- Rols, M. P., Tamzali, Y., Teissie, J. 2002. Electrochemotherapy of horses. A preliminary clinical report. *Bioelectrochemistry*, 55, 1-2: 101–105
- Ronemus, M. in Martienssen, R. 2005. RNA interference: methylation mystery. *Nature*, 433, 7025: 472–473
- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S. A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S. N., Sohn, T. A., Hruban, R. H., Yeo, C. J., Kern, S. E. 1997. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.*, 57, 9: 1731–1734
- Rudolf, Z., Štabuc, B., Čemažar, M., Miklavčič, D., Vodovnik, L., Serša, G. 1995. Electrochemotherapy with bleomycin: the first clinical experience in malignant melanoma patients. *Radiol.Oncol.*, 29, 229–235
- Russ, V. in Wagner, E. 2007. Cell and tissue targeting of nucleic acids for cancer gene therapy. *Pharm.Res.*, 24, 6: 1047–1057
- Ryther, R. C., Flynt, A. S., Phillips, J. A., III, Patton, J. G. 2005. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther.*, 12, 1: 5–11
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., Normanno, N. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 19, 3: 183–232

- Scherer, L. in Rossi, J. J. 2004. Recent applications of RNAi in mammalian systems. *Curr.Pharm.Biotechnol.*, 5, 4: 355–360
- Serša, G. 2000. Electrochemotherapy: Animal work review. In: Jaroszeski, M.J., Heller, R., Gilbert, R. editors. *Electrochemotherapy, electrogenetherapy and transdermal drug delivery. Electrically mediated delivery of molecules to cells.* Totowa. Humana Press, 119–136
- Serša, G., Čemažar, M., Miklavčič, D. 1995. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice. *Cancer Res.*, 55, 15: 3450–3455
- Serša, G., Cufer, T., Čemažar, M., Rebersek, M., Zvonimir, R. 2000a. Electrochemotherapy with bleomycin in the treatment of hypernephroma metastasis: case report and literature review. *Tumori*, 86, 2: 163–165
- Serša, G., Jarm, T., Kotnik, T., Coer, A., Podkrajšek, M., Šentjurc, M., Miklavčič, D., Kadivec, M., Kranjc, S., Secerov, A., Čemažar, M. 2008a. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *Br.J.Cancer*, 98, 2: 388–398
- Serša, G., Miklavčič, D., Čemažar, M., Rudolf, Z., Pucihar, G., Snoj, M. 2008b. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *Eur.J.Surg.Oncol.*, 34, 2: 232–240
- Serša, G., Štabuc, B., Čemažar, M., Jančar, B., Miklavčič, D., Rudolf, Z. 1998. Electrochemotherapy with cisplatin: potentiation of local cisplatin antitumour effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *Eur.J.Cancer*, 34, 8: 1213–1218
- Serša, G., Štabuc, B., Čemažar, M., Miklavčič, D., Rudolf, Z. 2000b. Electrochemotherapy with cisplatin: the systemic antitumour effectiveness of cisplatin can be potentiated locally by the application of electric pulses in the treatment of malignant melanoma skin metastases. *Melanoma Res.*, 10, 4: 381–385
- Stahlhut Espinosa, C. E. in Slack, F. J. 2006. The role of microRNAs in cancer. *Yale J.Biol.Med.*, 79, 3–4: 131–140
- Stirling, R. W. 1994. *Immunocytochemistry.* 263–287
- Susil, R., Semrov, D., Miklavčič, D. 1998. Electric field induced transmembrane potential depends on cell density and organization. *Electro.Magnetobiol.*, 17, 391–399
- Suzuki, M., Shigematsu, H., Iizasa, T., Hiroshima, K., Nakatani, Y., Minna, J. D., Gazdar, A. F., Fujisawa, T. 2006. Exclusive mutation in epidermal growth factor receptor gene, HER-2, and KRAS, and synchronous methylation of nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 106, 10: 2200–2207

- Szweykowska-Kulinska, Z., Jarmolowski, A., Figlerowicz, M. 2003. RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression. *Acta Biochim.Pol.*, 50, 1: 217–229
- Takahashi, Y., Nishikawa, M., Takakura, Y. 2006. Suppression of tumor growth by intratumoral injection of short hairpin RNA-expressing plasmid DNA targeting beta-catenin or hypoxia-inducible factor 1alpha. *J.Control Release*, 116, 1: 90–95
- Tannock, I. F., Hill, R. P., Bristow, G. R., Harrington, L. 2005. *The Basic Science of Oncology*. Fourth edition, New Baskerville, The McGraw-Hill Companies
- Tarek, M. 2005. Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. *Biophys.J.*, 88, 6: 4045–4053
- Teissie, J., Escoffre, J. M., Rols, M. P., Golzio, M. 2008. Time dependence of electric field effects on cell membranes. A review for a critical selection of pulse duration for therapeutical applications. *Radiol.Oncol.*, 42, 4: 196–206
- Teissie, J., Eynard, N., Gabriel, B., Rols, M. P. 1999. Electropermeabilization of cell membranes. *Adv.Drug Deliv.Rev.*, 35, 1: 3–19
- Thomas, L. 2005. A non-viral vector for in vivo gene delivery. *Lancet Neurol.*, 4, 10: 602
- Tieleman, D. P. 2004. The molecular basis of electroporation. *BMC.Biochem.*, 5, 10
- Titomirov, A. V., Sukharev, S., Kistanova, E. 1991. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim.Biophys.Acta*, 1088, 1: 131–134
- Valic, B., Golzio, M., Pavlin, M., Schatz, A., Faurie, C., Gabriel, B., Teissie, J., Rols, M. P., Miklavčič, D. 2003. Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur.Biophys.J.*, 32, 6: 519–528
- Vance, V. in Vaucheret, H. 2001. RNA silencing in plants--defense and counterdefense. *Science*, 292, 5525: 2277–2280
- Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.*, 17, 8: 449–459
- Wang, W., Wang, C. Y., Dong, J. H., Chen, X., Zhang, M., Zhao, G. 2005. Identification of effective siRNA against K-ras in human pancreatic cancer cell line MiaPaCa-2 by siRNA expression cassette. *World J.Gastroenterol.*, 11, 13: 2026–2031



- Wang, X. H., Aliyari, R., Li, W. X., Li, H. W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., Ding, S. W. 2006. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science*, 312, 5772: 452–454
- Waterhouse, P. M., Graham, M. W., Wang, M. B. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95, 23: 13959-13964
- Weaver, J. C. in Chizmadzhev, Y. A. 1996. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41, 2: 135-160
- Weber, A., Langhanki, L., Sommerer, F., Markwarth, A., Wittekind, C., Tannapfel, A. 2003. Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncogene*, 22, 30: 4757-4759
- Wells, J. M., Li, L. H., Sen, A., Jahreis, G. P., Hui, S. W. 2000. Electroporation-enhanced gene delivery in mammary tumors. *Gene Ther.*, 7, 7: 541-547
- Wilkins, C., Dishongh, R., Moore, S. C., Whitt, M. A., Chow, M., Machaca, K. 2005. RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 436, 7053: 1044-1047
- Zambon, R. A., Vakharia, V. N., Wu, L. P. 2006. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cell Microbiol.*, 8, 5: 880-889
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., Anderson, T. A. 2007. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev.Biol.*, 302, 1: 1-12
- Zhang, L., Gao, L., Li, Y., Lin, G., Shao, Y., Ji, K., Yu, H., Hu, J., Kalvakolanu, D. V., Kopecko, D. J., Zhao, X., Xu, D. Q. 2008. Effects of plasmid-based Stat3-specific short hairpin RNA and GRIM-19 on PC-3M tumor cell growth. *Clin.Cancer Res.*, 14, 2: 559-568

## ZAHVALA

Največja zahvala gre dr. Suzani Vidic, ki me je vpeljala v čudoviti svet znanstvenega raziskovanja, s svojim neizmernim optimizmom in iskreno navdušenostjo nad znanostjo vedno skrbela za dobro vzdušje in dobre rezultate, ter za štiriperesno deteljico v moj jagodni zvezek.

Hvala mentorici doc. dr. Maji Čemažar za vložen trud in nasvete pri delu in pregledovanju diplomske naloge.

Hvala prof. dr. Gregorju Serši za vzpodbudne besede in zanimanje za moje delo.

Za vse plošče polne celic in uvod v laboratorijski humor velika hvala Miri Lavrič. Dr. Gregorju Tevžu, dr. Simoni Kranjc in Urški Kamenšek hvala za menjavanje mleka ob poznih večernih urah in izjemno vzdušje, ki ste ga pripravili na Oddelku za eksperimentalno onkologijo. Ostalim članom oddelka (Alešu, Mireille in Sari) hvala zato, ker ohranjate kontinuiteto dobrih odnosov in kolegialnosti.

Za pomoč pri histoloških rezinah in barvanju, hvala izr. prof. dr. Andreju Coeru.

Za uvod v delovanje in kasnejšo uporabo sekvenatorja ter ostalih naprav na Oddelku za molekularno diagnostiko hvala Petri Cerkovnik in dr. Vidi Stegel.

Na koncu še hvala moji družini, ker me že toliko časa prenaša.

## PRILOGE

### Priloga A

#### Agarozna elektroforeza

##### Agarozni gel:

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
agaroz	0,8 g	Sigma Aldrich
1×TAE	do 100 ml	

##### 50 × TAE:

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
tris	242 g	Sigma Aldrich
ledocetna kislina	57,1 ml	Merck, Darmstadt, Nemčija
0,5 M EDTA	100 ml	Sigma Aldrich
destilirana voda	do 1 l	

##### 6× nanašalni pufer:

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina (w/v)</b>	<b>Proizvajalec</b>
barvilo brom fenol modro	0,25 %	Sigma Aldrich
barvilo ksilen-cianol	0,25 %	Sigma Aldrich
saharoz	40 %	Kemika, Zagreb, Hrvaška

## Priloga B

### 10x PBS

#### PBS 10x

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
NaCl	80 g	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,	11,5 g	Kemika
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	2 g	Kemika
KCl	2 g	Merck
destilirana voda	do 1 l	

## Priloga C

### Elektroporacijski pufer:

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
saharoza	42,78 g	Kemika
K <sub>2</sub> HPO <sub>2</sub> ,	1,74 g	Kemika
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	0,34 g	Kemika
MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub>	0,43 g	Merck
destilirana voda	do 1 l	

## Priloga Č

### Sestavine lizirajočega pufru RIPA (sc-24948; Santa Cruz Biotechnology)

Kemikalija	Količina
1 × TBS	100 µl / 1 × 10 <sup>6</sup> celic
nonidet P-40	1 %
natrijev deoksiholat	0,5 %
SDS	0,1 %
natrijev azid	0,004 %
PMSF (inhibitor serinskih proteaz)	1 mM
koktail inhibitorjev proteaz	10 µl / 1 ml TBS
natrijev ortovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	10 µl / 1 ml TBS

## Priloga D

### 4-kratni nanašalni (Laemmeli) pufer

Kemikalija	Količina	Proizvajalec
1 M Tris-HCl, pH= 6,8	2,5 ml	Sigma Aldrich
glicerol	4,0 ml	Sigma Aldrich
SDS	0,8 g	Sigma Aldrich
bromfenolmodro (1mg/ml)	0,4 ml	Sigma Aldrich

## Priloga E

### SDS-poliakrilamidni gel

	<b>dH<sub>2</sub>O</b>	<b>1 M Tris-HCl</b>	<b>30 % akrilamid</b>	<b>10 % SDS</b>	<b>Temed</b>	<b>Amonijev persulfat</b>
<b>nanašalni gel</b>	6,1 ml	2,5 ml pH=6,8	1,3 ml	0,1 ml	10 µl	50 µl
<b>ločitveni gel</b>	4,1 ml	2,5 ml pH=8,8	3,3 ml	0,1 ml	5 µl	50 µl

\*Vse kemikalije so od proizvajalca Sigma Aldrich.

## Priloga F

### 10 × pufer za elektroforezo (pH 8,8):

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
tris	30 g	Sigma Aldrich
glicin	144 g	Sigma Aldrich
SDS	10 g	Sigma Aldrich
destilirana voda	do 1 l	

## **Priloga G**

### **Pufer za prenos proteinov:**

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
glicin	2,9 g	Sigma Aldrich
tris	5,8 g	Sigma Aldrich
SDS	0,37 g	Sigma Aldrich
metanola	200 ml	Merck
destilirana voda	do 1l	

## **Priloga H**

### **10 × TBS (pH 7,6)**

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
tris	2,42 g	Sigma Aldrich
NaCl	8 g	Merck
1 M HCl	3,8 ml	Merck
destilirana voda	do 1l	

## **Priloga I**

### **Raztopina za preprečevanje nespecifičnih vezav:**

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
BSA	1 %	Sigma Aldrich
mleko v prahu	5 %	Pomurske mlekarne, Murska Sobota, Slovenija
1 × TTBS	30 ml	

## **Priloga J**

### **Raztopina s primarnimi protitelesi:**

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
BSA	1 %	Sigma Aldrich
mleko v prahu	3 %	Pomurske mlekarne
primarno protitelo	po priporočilu proizvajalca	Santa Cruz Biotechnology
1 × TTBS	30 ml	



## Priloga K

### Raztopina s sekundarnimi protitelesi:

<b>Kemikalija</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
BSA	1 %	Sigma Aldrich
mleko v prahu	3 %	Pomurske mlekarne
sekundarno protitelo	po priporočilu proizvajalca	Santa Cruz Biotechnology
1 × TTBS	30 ml	