

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Romana VANTUR

**VPLIV GENSKEGA ELEKTROPRENOSA NA
IZRAŽANJE GENOV ZA CITOSOLNE SENZORJE
DNA V MELANOMSKIH CELICAH *IN VITRO* IN *IN
VIVO***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Romana VANTUR

**VPLIV GENSKEGA ELEKTROPRENOSA NA IZRAŽANJE GENOV
ZA CITOSOLNE SENZORJE DNA V MELANOMSKIH CELICAH *IN*
VITRO IN *IN VIVO***

Magistrsko delo
Magistrski študij – 2. stopnja

**THE EFFECTS OF GENE ELECTROTRANSFER ON DNA SENSORS
GENE EXPRESSION IN MELANOMA CELLS *IN VITRO* AND *IN*
*VIVO***

M. Sc. Thesis
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Strukturna in Funkcionalna biologija. Delo je bilo opravljeno na Onkološkem Inštitutu Ljubljana, na Oddelku za eksperimentalno onkologijo v Ljubljani in na Fakulteti za vede o zdravju v Izoli.

Študijska komisija je dne 21. 2. 2014 odobrila temo in naslov magistrskega dela in za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Majo Čemažar in za recenzenta prof. dr. Gregorja Serša.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Maja ČEMAŽAR
Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo

Član: prof. dr. Gregor SERŠA
Onkološki Inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo

Datum zagovora: 8. 4. 2016

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Romana Vantur

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 591:577(043.2)=163.6
KG	genski elektroprenos/elektroporacija/transfekcija/citosolni DNA senzorji/plazmid gWizBlank/proliferacija/citotoksičnost/melanomske celice B16F10/povečano izražanje senzorjev/interferonski imunski odziv
AV	VANTUR, Romana, dipl. biol. (UN)
SA	ČEMAŽAR, Maja (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
LI	2016
IN	Vpliv genskega elektroprenosa na izražanje genov za citosolne senzorje DNA v melanomskih celicah <i>in vitro</i> in <i>in vivo</i>
TD	Magistrsko delo (magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XIII, str. 75, 9 pregl., 22 sl., 55 vir.
IJ	Sl
JJ	sl/en
AI	Genska terapija je eden izmed sodobnejših pristopov zdravljenja raka. Kot dostavni sistem za vnos genov, se vse bolj uveljavlja fizikalna metoda elektroporacija, ki začasno destabilizira celično membrano in omogoči prehod v notranjost celic tudi molekulam, ki običajno v celico ne morejo vstopiti. Tuja DNA v celicah aktivira številne citosolne senzorje DNA, ki lahko v organizmu sprožijo imunski odziv. Namen naše raziskovalne naloge je bil, da s pomočjo elektroporacije in z vnosom plazmida brez zapisa za protein gWiz Blank v melanomske celice B16F10 ugotovimo, ali lahko že v <i>in vitro</i> sistemu zaznamo povečano izražanje citosolnih senzorjev DDX-60 in RIG-1 ter citokina, interferona 1 β (IFN-1 β). Enako smo v nadaljevanju preverili tudi v <i>in vivo</i> sistemu, kjer smo s pomočjo elektroporacije vnesli enak plazmid v tumorske celice mišjega melanoma. Določili smo faktorje povišanega izražanja (FPI) citosolnih senzorjev DNA in IFN-1 β glede na kontrolo, v <i>in vitro</i> ter v <i>in vivo</i> sistemu, pri čemer smo se osredotočili na interferonski imunski odziv. Rezultati so pokazali, da genski elektroprenos privede do povečanega izražanja citosolnih senzorjev in citokina IFN-1 β predvsem v <i>in vitro</i> sistemu, medtem ko v <i>in vivo</i> sistemu ne pride do statistično značilnega povečanja izražanja citosolnih senzorjev, temveč le citokina IFN-1 β . Genski elektroprenos praznega plazmida je v <i>in vitro</i> sistemu zmanjšal proliferacijo celic in povečal citotoksičnost plazmida na celice. V obeh sistemih je bila vrednost FPI najvišja pri skupini, kjer smo s pomočjo elektroporacije v celice ali tumor vnesli plazmid gWiz Blank. Najvišji FPI je bil zabeležen pri IFN-1 β , sledil je senzor DDX-60. Senzor RIG-1 ni bil zaznan v nobenem sistemu. Povečano izražanje IFN-1 β smo opazili v obeh sistemih in je posledica povečanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60, ki nadalje povzroči povečano izražanje IFN-1 β , kar v <i>in vivo</i> sistemu vodi v interferonski imunski odgovor.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND	Du2
DK	UDK 591:577(043.2)=163.6
CG	gene electrotransfer/electroporation/transfection/cytosolic DNA sensors/plasmid gWizBlank/proliferation/cytotoxicity/melanoma cells B16F10/increased sensors expression/interferone immune response
AU	VANTUR, Romana, dipl. biol. (UN)
AA	ČEMAŽAR, Maja (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme of Structural and functional biology
PY	2016
TI	The effects of gene electrotransfer on DNA sensors gene expression in melanoma cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO	XIII, p. 75, 9 tab., 22 fig., 55 ref.
LA	SI
AL	sl/en
AB	Gene therapy is one of the newest approaches in the treatment of cancer diseases. For the introduction of genetic material, electroporation, a non-viral, physical method, which causes transient permeabilisation of cell membrane, is used. Foreign DNA in cell cytosol can activate many cytosolic DNA sensors, which may further lead to immune response. The aim of our study was to determine, whether increased expression of cytosolic DNA sensors, DDX-60 and RIG-1, and also cytokine interferon 1 β (IFN-1 β), is already obtained in <i>in vitro</i> system after gene electrotransfer of plasmid gWiz Blank, a plasmid without gene for therapeutic protein, into murine melanoma B16F10 cells. Further we defined the factors of increased expression (FIE) of cytosolic DNA sensors and IFN-1 β , normalized to control in <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> systems, where we focused on the interferon immune response. The results have shown, that there is an increased expression of mRNA for cytosolic sensor DDX-60 and cytokine IFN-1 β especially in <i>in vitro</i> system, while in <i>in vivo</i> system, only cytokine IFN-1 β is significantly increased. Gene electrotransfer reduced cell proliferation and increased cytotoxicity of introduced plasmid in <i>in vitro</i> system. In both systems, the highest FIE is recorded in the presence of gene electrotransfer of gWiz Blank: the most increased is IFN-1 β , followed by DDX-60. RIG-1 is not detected in any of the two systems. Increased expression of IFN-1 β is observed in both systems and is a result of increased expression of cytosolic sensor DDX-60, which further leads to increased expression of IFN-1 β and therefore to interferon immune response in <i>in vivo</i> system.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
SLOVARČEK.....	XII
1 UVOD.....	1
1.2 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.3 CILJI MAGISTRSKEGA DELA	2
1.4 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RAK.....	3
2.1.1 Vzroki za nastanek in karcinogeneza	3
2.1.2 Značilnosti maligne celice	6
2.1.3 Tumorsko mikrokolje.....	7
2.2 ZDRAVLJENJA RAKAVIH OBOLENJ.....	8
2.2.1 Gensko zdravljenje raka	9
2.2.2 Metoda elektroporacije	10
2.2.3 Genski elektroprenos ali genska elektrotransfekcija	13
2.3 IMUNSKI SISTEM IN IMUNSKI ODZIV	14
2.3.1 Celice in molekule prirojenega imunskega sistema	15
2.3.2 Celice in molekule pridobljenega imunskega sistema	16
2.3.3 Tumorska imunologija	17
2.4 IMUNSKO ZAZNAVANJE NUKLEINSKIH KISLIN	18
2.5 BIOLOŠKI DNA SENZORJI.....	20
2.5.1 Citosolni senzor RIG-1	21
2.5.2 Citosolni senzor DDX-60.....	23
2.6 CITOKINI.....	25
2.6.1 Interferoni tipa I in IFN-β.....	25

2.6.2	Tip I interferonski imunski odgovor	26
3	MATERIALI IN METODE	27
3.1	CELICE MIŠJEGA MELANOMA IN MIŠJI TUMORJI	27
3.2	PLAZMID gWIZ BLANK	27
3.3	GENSKI ELEKTROPRENOS	28
3.3.1	Genski elektroprenos <i>in vitro</i>.....	28
3.3.2	Genski elektroprenos <i>in vivo</i>	30
3.4	TEST PROLIFERACIJE.....	31
3.5	TEST CITOTOKSIČNOSTI PLAZMIDA	33
3.6	POVEČANO IZRAŽANJE CITOSOLNIH SENZORJEV DNA IN IFN-1 β	34
3.6.1	Povečano izražanje citosolnih senzorjev DNA in IFN-1β v <i>in vitro</i> sistemu ..	34
3.6.2	Povečano izražanje citosolnih senzorjev DNA in IFN-1β v <i>in vivo</i> sistemu ...	41
3.7	STATISTIČNE ANALIZE	42
4	REZULTATI	43
4.1	DELEŽ TRANSFEKCIJE CELIC V <i>IN VITRO</i> SISTEMU.....	43
4.2	TEST PROLIFERACIJE.....	44
4.3	TEST CITOTOKSIČNOSTI PLAZMIDA	47
4.4	CITOSOLNI SENZORJI DNA IN IFN-1 β V <i>IN VITRO</i> SISTEMU	49
4.4.1	Faktor povišanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60 (<i>in vitro</i>)	51
4.4.2	Faktor povišanega izražanja citokina IFN-1β (<i>in vitro</i>).....	52
4.5	CITOSOLNI SENZORJI DNA IN IFN-1 β V <i>IN VIVO</i> SISTEMU.....	53
4.5.1	Faktor povišanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60 (<i>in vivo</i>)	55
4.5.2	Faktor povišanega izražanja citokina IFN-1β (<i>in vivo</i>).....	56
4.6	KORELACIJA POVEČANEGA IZRAŽANJA CITOSOLNEGA SENZORJA DDX-60 IN IFN-1 β MED <i>IN VITRO</i> IN <i>IN VIVO</i> SISTEMOMA.....	57
5	RAZPRAVA.....	59
6	SKLEPI	65
7	POVZETEK.....	68
8	VIRI.....	71
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Sl. 1: Večstopenjski proces karcinogeneze.....	5
Sl. 2: Deset glavnih značilnosti malignih tumorskih celic.	6
Sl. 3: Tumorsko mikrookolje.....	7
Sl. 4: Prehod snovi v notranjost celice po EP.....	11
Sl. 5: Mehanizem DNA cepljenja oziroma transfekcija celic.	19
Sl. 6: Zgradba RIG-1.	22
Sl. 7: Pregled mehanizmov zaznavanja nukleinskih kislin.....	24
Sl. 8: Shema mikrotitrne testne plošče za test proliferacije in test citotoksičnosti.	32
Sl. 9: Shema poteka ekperimentalnega dela v <i>in vitro</i> sistemu.	33
Sl. 10: Shema mikrotitrne testne plošče za qPCR.....	39
Sl. 11: Sigmoidno oblikovan diagram produktov qPCR.	40
Sl. 12: Rezultati deleža transfkcije celic v <i>in vitro</i> sistemu.....	43
Sl. 13: Proliferacijske krivulje B16F10 celic s standardnimi napakami.....	44
Sl. 14: Stolpični diagram proliferacije celic B16F10 s standardnimi napakami za dan 4.....	45
Sl. 15: Krivulji preživetja celic s standardnimi napakami.....	47
Sl. 16: Stolpični diagram povečanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60 (<i>in vitro</i>).	51
Sl. 17: Stolpični diagram povečanega izražanja citokina IFN-1 β (<i>in vitro</i>).	52
Sl. 18: Diagram rasti tumorja v <i>in vivo</i> sistemu	53
Sl. 19: Stolpični diagram povečanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60 (<i>in vivo</i>).	55
Sl. 20: Stolpični diagram povečanega izražanja citokina IFN-1 β (<i>in vivo</i>).	56
Sl. 21: Diagram korelacije povečanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60 in IFN-1 β med <i>in vitro</i> in <i>in vivo</i> sistemoma.....	57
Sl. 22: Shema signalizacijskih poti in interferonski imunski odgovor.....	66

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Načini zdravljenja rakavih obolenj in njihove glavne značilnosti.	8
Pregl. 2: Celice prirojenega imunskega sistema in njihove glavne značilnosti ter funkcije. ...	15
Pregl. 3: Celice specifičnega imunskega sistema in njihove glavne značilnosti ter funkcije. .	16
Pregl. 4: Biološki senzorji.	20
Pregl. 5: Eksperimentalne skupine pri <i>in vitro</i> sistemu.	30
Pregl. 6: Ekperimentalne skupine pri <i>in vivo</i> sistemu.	31
Pregl. 7: Primerji uporabljeni pri qPCR.	38
Pregl. 8: Faktorji povišanega izražanja citosolnih senzorjev DNA in IFN-1 β (<i>in vitro</i>).	49
Pregl. 9: Faktorji povišanega izražanja citosolnih senzorjev DNA in IFN-1 β (<i>in vivo</i>).	54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ab	protitelo
Ag	antigen
AIM-2	protein AIM2 (angl. <i>Absent in melanoma 2</i>)
AMEM	gojišče, medij (angl. <i>Minimum Essential Medium Alpha Medium</i>)
APC	antigen predstavitvena celica
BA	beta aktin (angl. <i>Beta-actin</i>)
BCR	B-celični receptor
CD	označevalec pripadnosti (angl. <i>Cluster of Differentiation</i>)
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>Complementary DNA</i>)
C _T	pražni cikel (angl. <i>Threshold cycle</i>)
DAMP	molekularni vzorci povezani z nevarnostjo (angl. <i>Damage Associated Molecular Patterns</i>)
DC	dendritična celica
DDX	proteini z domeno DexD/H-box (angl. <i>DEAD-box proteins</i>)
DDX-60	DexD/H-box-polipeptid 60 (angl. <i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide 60</i>)
DEPC	dietil pirokarbonat (angl. <i>Diethylpyrocarbonate</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dsRNA/DNA	dvovijačna RNA/DNA (angl. <i>Double-stranded RNA/DNA</i>)
ECM	ekstracelularni matriks (angl. <i>Extracellular matrix</i>)
EP	Elektroporacija
FBS	fetalni goveji serum (angl. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FPI	faktor povišanega izražanja
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (angl. <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
GET	genski elektroprenos (angl. <i>Gene Electrotransfer</i>)
GFP	plazmid GFP (angl. <i>Green fluorescence protein</i>)
IDO	encim indoleamin-2,3-dioksidogenaza (angl. <i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>)
IFN	interferon
IFN-1 β	interferon ena beta
IFNAR	interferon alfa/beta receptor (angl. <i>Interferon-α/β receptor</i>)
IL	Interlevkin

IRF3/7/8/9	faktor regulacije interferona 3/7/8/9 (angl. <i>Interferon Regulatory Factor 3/7/8/9</i>)
IPS1	interferon beta promotor stimulator 1 (angl. <i>Interferon-beta Promoter Stimulator</i>)
IS	imunski sistem
ISGF3	faktor stimulacije interferona 3 (angl. <i>Interferon-stimulated gene factor 3</i>)
ISRE	element stimulacije interferonskega odgovora (angl. <i>Interferon stimulated response element</i>)
JAK1	kinaza janus 1 (angl. <i>Janus Kinase 1</i>)
"knock out"	organizem z izbitim/onesposobljenim genom za določen protein
LAF	komora z laminarnim pretokom zraka (angl. <i>Laminar air flow chamber</i>)
LGP2	receptor LGP2 (angl. <i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i>)
MAVS	mitohondrijski protivirusno signalizirajoči protein (angl. <i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>)
MDA5	receptor MDA5 (angl. <i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>)
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti (angl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MICA/B	proteina MICA in MICB (angl. <i>Major histocompatibility class I chain-related proteins A and B</i>)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (angl. <i>messenger RNA</i>)
miRNA	mikro ribonukleinska kislina (angl. <i>microRNA</i>)
NF-κB	jedrni faktor kapa B (angl. <i>Nuclear factor kappa B</i>)
NK-celica	celica naravna ubijalka (angl. <i>Natural killer cell</i>)
NTC	Vdolbinica/well na mikrotitrski ploči brez dodanega vzorca (angl. <i>Non template control</i>)
Onc	onkogen (angl. <i>Oncogene</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>Polymerase chain reaction</i>)
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. <i>Quantitative Real-time polymerase chain reaction</i>)
PAMP	patogenom pridruženi molekularni vzorci (angl. <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>)
PBS	izotonični fosfatni pufer (angl. <i>phosphate buffered saline</i>)
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije oksonijevih ionov H30 ⁺
PRR	receptorji za prepoznavo molekularnih vzorcev (angl. <i>Pattern Recognition Receptors</i>)

RIG-1	receptor RIG-1 (angl. <i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>)
RLRs	RIG-1 podobni receptorji (angl. <i>RIG-I-like receptors</i>)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. <i>Ribonucleic acid</i>)
ssRNA/DNA	enovijačna RNA/DNA (angl. <i>Single-stranded RNA/DNA</i>)
STAT1/2	pretvornik signala in aktivator transkripcije 1/2 (angl. <i>Signal transducer and activator of transcription 1/2</i>)
STING	protein- stimulator interferonskih genov (angl. <i>Stimulator of interferon genes protein</i>)
TAA	s tumorjem povezan antigen (angl. <i>Tumor-associated antigen</i>)
TBK1	TANK vezavna kinaza 1 (angl. <i>TANK-Binding Kinase 1</i>)
Tc	citotoksični limfocit T (angl. <i>Cytotoxic T lymphocyte/cell</i>)
TCR	T-celični receptor
Th	celica pomagalka T (angl. <i>T-helper cells</i>)
TLR	toll podobni receptorji (angl. <i>Toll-Like receptors</i>)
TMO	tumorsko mikrookolje (angl. <i>Tumor microenvironment</i>)
Treg	regulatorne celice T (angl. <i>Regulatory T cells</i>)
TRIF	adaptorni protein TRIF (angl. <i>TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta</i>)
TSA	tumor specifični antigen (angl. <i>Tumor-specific antigen</i>)
TSG	tumor-supresorski gen (angl. <i>Tumor Suppressor Gene</i>)
TYK2	tirozin kinaza 2 (angl. <i>Tyrosine Kinase 2</i>)

SLOVARČEK

Ablacija	Operativna, poškodbeno ali medikamentna odstranitev dela telesa ali manjše patološke tvorbe ali tujka, običajno s površja telesa ali organa.
Acetilacija	Kemična reakcija pri kateri se na heteroatom veže acetilna skupina.
Agonist	Spojina, ki z vezavo na celične receptorje izzove enak biološki odziv kot vezava naravnega substrata.
Antigen	Katerakoli telesu tuja snov, ki je sposobna izzvati imunski odziv in reagirati npr. z antigensko specifičnimi protitelesi in/ali aktiviranimi limfociti T.
APC	Antigen predstavitvena celica, ki je specializirana fagocitna celica z antigeni na svoji površini, ki jih prepoznavajo limfociti T s svojimi antigenskimi receptorji in pri tem sprožijo imunski odziv.
Avtoimunost	Pridobljena humoralna in/ali celično posredovana imunost proti telesu lastnim antigenom, normalno izraženim na celicah in tkivih.
Avtologen	Tkivo, celice ali organ, ki jih presadimo istemu osebk, ki jih je daroval. Nanaša se lahko tudi na proteine, če jih presadimo istemu osebk, ki jih je daroval. »Avtologna uporaba« je uporaba tkiv in celic, odvzetih in uporabljenih pri isti osebi.
CD	Površinski označevalci celic. Gre za sistem enotne označitve antigenov celične površine celic (predvsem levkocitov) z monoklonskimi protitelesi.
Citostatiki	Citotoksične učinkovine, uporabljene pri zdravljenju raka s kemoterapijo, ki delujejo protitumorsko na vse hitro deleče se celice. Rakave celice ubijejo tako, da poškodujejo DNA, se vključijo v sintezo DNA ali zavirajo celično delitev.
Ekspresija	Zaznaven učinek gena, pri katerem se informacija, ki jo gen vsebuje, pokaže kot fenotipska značilnost. Sinonim za ekspresijo gena je izražanje gena, pri čemer se DNA najprej prepíše v mRNA-molekulo (transkripcija), ta pa se prevede v proteine v celici ali na njeni površini (translacija).
Ekstravazacija	Izstop ali izliv telesnih tekočin (npr. krvi, limfe, urina) iz žil ali izvodil.
Elektroporacija	Metoda vnosa tuje DNA, pri kateri celice izpostavimo električnemu polju, zaradi katerega pride v fosfolipidnem dvosloju celične membrane do nastanka vodnih por, skozi katere v notranjost celic vstopijo molekule, ki sicer skozi ne morejo prehajati.

Fenotip	Skupek vidnih in biokemično določljivih znakov, ki se razvijejo pri kakem organizmu zaradi njegovega genotipa in vpliva okolja.
Genotip	Celotni genom ali samo določen del genetske sestave organizma ali celice.
Inflamasom	Multiproteinski citoplazemski kompleks, ki aktivira kaspaze in s tem vodi v procesiranje in izločanje proinflammatoryh (provnetnih) citokinov.
Kemoterapevtki	Naravno ali umetno pridobljena spojina s protitumorskih učinkom.
Lokalno zdravljenje	Zdravljene raka z uporabo kirurgije ali radioterapije (obsevanje), ki je lokalizirano na en organ v organizmu, kjer se pojavijo rakave celice.
Metilacija	Kemijska reakcija pri kateri se na heteroatom veže metilna skupina.
NKT-celice	Heterogena populacija T celic, ki si delijo lastnosti dveh tipov celic: limfocitov T in celic naravnih ubijalk (T).
Onc	Onkogeni ali geni, ki lahko sprožijo nastanek maligne celice in so pogosto mutirani protoonkogeni.
Plastičnost	Sposobnost matičnih celic, da se diferencirajo v različne celične vrste
Progresija	Napredovanje oziroma večanje tumorja, rast malignega tkiva in slabšanje bolezni.
Protoonkogeni	Katerikoli normalni gen, ki je vključen v nadzor celične rasti in delitve ter se z mutacijo lahko spremeni v onkogen.
Regresija	Nazadovanje oziroma manjšanje tumorskega tkiva.
Signalosom	Multifunkcionalni proteinski kompleks, udelež pri regulaciji razgradnje proteinov.
Sistemsko zdravljenje	Zdravljenje s protitumorskimi učinkovinami katerega namen je delovati na čisto vse rakave celice v organizmu, posredno ali neposredno. Deli se glede na različne mehanime delovanja zdravil: kemoterapija, hormonsko zdravljenje, zdravljenje s tarčnimi zdravili in imunoterapija.
Toleranca	Imunska toleranca je stanje specifične imunske neodzivnosti, ki jo inducirajo antigenske snovi, sinonim je imunotoleranca.
Transfekcija	Vnašanje tuje DNA molekule v celico, čemur lahko sledi ekspresija enega ali več genov iz te DNA oziroma prenos tuje DNA v celice evkariontskega prejemnika. DNA se inkorporira v kromosomsko DNA. Tujo DNA lahko vnesemo z elektroporacijo, raznimi vektorji, fizikalno in s kemikalijami.
TSG	Tumor-supresorski geni ali geni, ki zavirajo nastanek maligne celice.

1 UVOD

Gensko zdravljenje predstavlja sodobnejši pristop pri zdravljenju bolezni, med katere sodijo tudi številna rakasta obolenja. Genska terapija ali genska transfekcija je proces vstavljanja tujega genskega materiala oziroma nukleinske kisline v celico gostitelja z namenom pridobitve terapevtskega učinka (popravilo obstoječe okvare, pridobitev celic z novimi funkcijami, npr. izločanje terapevtskega proteina ipd.).

Ena od nevirusnih metod genske transfekcije, ki se v današnjem času vse bolj in zelo uspešno uporablja je metoda elektroporacije. Gre za fizikalno metodo, pri kateri se celice ali tkivo izpostavi dovolj visokemu zunanemu električnemu polju, ki začasno povzroči destabilizacijo celične membrane. Zaradi destabilizacije postane le-ta bolj prepustna za molekule, ki sicer ne morejo prehajati preko nje. Elektroporacija se kot dostavni sistem uporablja pri številnih kliničnih študijah, predvsem za zdravljenje kožnih tumorjev (Serša in sod., 2009), ter v zadnjem času tudi globoko ležečih tumorjev, kot npr. jetrnih metastaz kolorektalnega raka (Edhemovic in sod., 2014).

1.2 OPREDELITEV PROBLEMA

Tuja DNA v celicah ali tkivih aktivira številne citosolne senzorje DNA, ki lahko pri živih organizmih vodijo do aktivacije imunskega sistema. Poznane so številne poti aktivacije imunskega sistema in ena izmed njih vodi tudi do nastajanja interferonov tipa I (IFN-I). Z raziskavo v sklopu te magistrske naloge smo želeli preveriti, ali lahko po električno posredovanem vnosu plazmidne DNA molekule v celice že v *in vitro* sistemu pride do povečanega izražanja citosolnih DNA senzorjev, DDX-60 in RIG-1 ter interferona 1 β (IFN-1 β). V nadaljevanju smo ugotavljali povečanje ekspresije/izražanja oziroma faktor povišanega izražanja citosolnih DNA senzorjev glede na kontrolov v obeh, *in vitro* ter v *in vivo* sistemu, pri čemer nas je zanimal predvsem interferonski imunski odziv. V ta namen smo v melanomske celice (*in vitro*) in v tumorsko tkivo mišjega melanoma (*in vivo*) vnesli plazmid, ki nima zapisa za protein, gWiz Blank.

1.3 CILJI MAGISTRSKEGA DELA

Cilji magistrske naloge so ugotoviti, ali vnos plazmida, ki nima zapisa za protein, z genskim elektroprenosom (elektroporacijo) v melanomske celice B16F10 aktivira citosolne senzorce DNA in posledično sproži interferonski imunski odgovor oziroma poveča izražanje IFN-1 β že v *in vitro* sistemu ter ali je povečanje izražanja citosolnih sensorjev DNA odvisno od koncentracije vnesene molekule plazmidne DNA. Cilj naloge je tudi določiti viabilnost celic po vnosu molekule plazmidne DNA z elektroporacijo ter faktor povišanega izražanja (FPI) citosolnih sensorjev DNA in interferonski imunski odziv po elektroporaciji v *in vivo* sistemu.

1.4 DELOVNE HIPOTEZE

Delovne hipoteze, ki smo si jih zastavili so sledeče:

- Vnos plazmida, ki nima zapisa za protein, v melanomske celice, aktivira citosolne senzorce DNA in sproži interferonski imunski odgovor oziroma poveča izražanje IFN-1 β , pri čemer je povečanje izražanja odvisno od koncentracije vnesene plazmidne DNA.
- Vnos plazmida, ki nima zapisa za protein, z elektroporacijo v melanomske celice, zmanjša proliferacijo celic.
- Vnos plazmida, ki nima zapisa za protein, z elektroporacijo v melanomske tumorje *in vivo*, poveča izražanje citosolnih sensorjev DNA, kar se posledično kaže v interferonskem imunskem odzivu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAK

Rak je bolezen oziroma skupina bolezni, za katere je značilna predvsem nekontrolirana rast celic različnih tkiv v različnih organih, ki za ta organ nimajo nobene fiziološke funkcije (Serša, 2009). Beseda izhaja iz grške besede "*karkinos*". To poimenovanje je prvič uporabil Hipokrat, antični zdravnik, ki ga je ožilje tumorske tvorbe spominjalo na rakove klešče (Novaković in sod, 2009).

Tumor je novotvorba, ki je lahko benigna ali maligna. Benigna novotvorba je neinvazivna, z lokalno omejeno rastjo, maligna novotvorba pa je invazivna in ima metastatski potencial – sposobnost vdiranja v druga tkiva in organe. Sinonim za tumor je neoplazma, ki označuje vsako abnormalno maso tkiva, ki raste nekontrolirano in neodvisno od primarnega tkiva ter od dejavnika, ki jo je izzval. Rak je skupno ime za vse maligne tumorje, prehodna oblika med benigno in maligno obliko pa se imenuje premaligna oblika ali displazija (Weinberg, 2007).

Poznanih je več vrst tumorjev. Karcinomi ali epitelni tumorji nastanejo iz epitelnih celic ali celic vrhnjice. Sarkomi ali tumorji mezenhimatskih tkiv zrastejo iz celic opornih tkiv in se nahajajo v vezivu, maščevju, kosteh in hrustancu. Hematopoetske malignosti ali levkemije so rakasta obolenja krvi in krvotvornih organov. Nevroektodermalni tumorji so tumorji živčnih tkiv. Poleg omenjenih pa poznamo še limfome, to so rakasta obolenja limfatičnih tkiv ter mešane tumorje, ki prizadenejo več tkiv hkrati (Novaković in sod., 2009; Weinberg, 2007).

2.1.1 Vzroki za nastanek in karcinogeneza

Rak nastane kot posledica postopnega kopičenja genetskih sprememb, ki jih celični popravljalni mehanizmi ne morejo več popraviti in se kot take prenašajo na naslednje generacije. Te spremembe večinoma predstavljajo različne nepravilnosti v delovanju

specifičnih genov, predvsem pomnoževanje in prekomerno delovanje onkogenov (Onc) ter delecije oziroma nedelovanje tumor-supresorskih genov (TSG) (Tannock, 2013).

Karcinogeni so vsi rakotvorni dejavniki, ki povzročijo prvo poškodbo DNA in nadalje povečujejo frekvenco mutacij v genih. Poznamo eksogene in endogene dejavnike karcinogeneze. Med eksogene dejavnike spadajo vsi zunanji dejavniki, kot so življenjski slog, prehrana ter snovi, ki smo jim izpostavljeni (UV in ionizirajoče sevanje, radiacija, kemikalije itd.). Endogeni dejavniki pa poleg poškodb DNA, dednih napak, hormonov in metabolizma, vključujejo še tumorsko mikrookolje. Karcinogeni delujejo direktno na DNA ali indirektno na prokarcinogene, ki se posledično spremenijo v karcinogene (Weinberg, 2007).

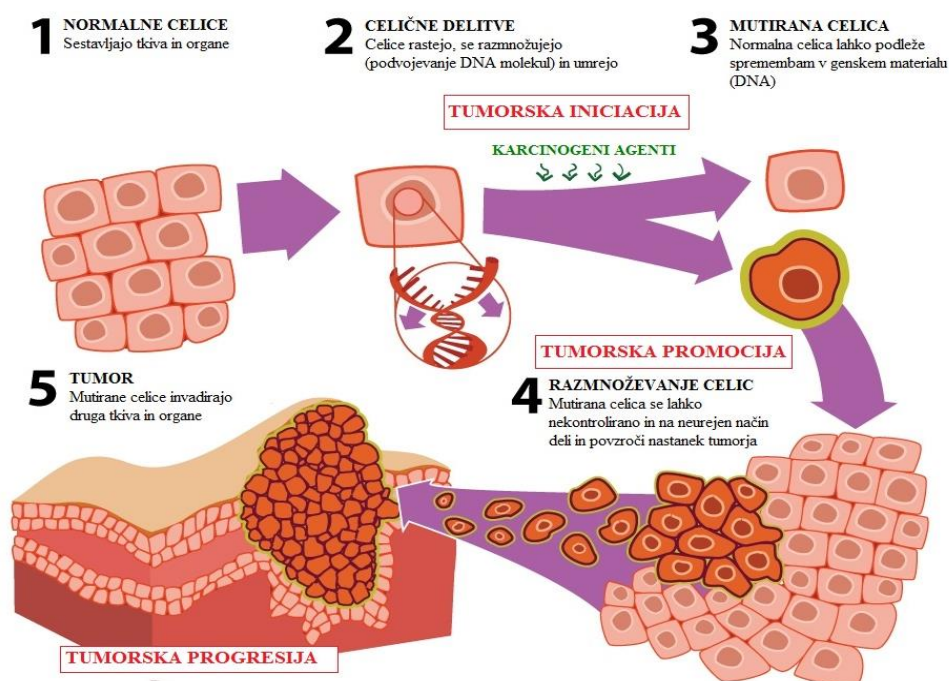
Genetske spremembe se zgodijo zaradi različnih vzrokov. Ti so: eksogena izpostavitve UV sevanju in genotoksičnim kemikalijam, endogene spremembe DNA ter napake DNA-polimeraze, oziroma napake v popravljalnih mehanizmih. Številne epigenetske spremembe pa vplivajo na transkripcijo genov in s tem povzročijo spremembe celičnih proteinov. Sem spadajo metilacija nukleotidov, acetilacija in metilacija histonov ter regulacija molekul mikroRNA (Tannock in sod., 2013).

Na nastanek tumorjev vplivajo tudi številni tumorski virusi. RNA tumorski virusi prenašajo transformirajoče gene – Onc, ki transformirajo normalno celico v tumorsko ali spremenijo njeno gensko ekspresijo. DNA tumorski virusi pa vplivajo na TSG oziroma na njihovo transkripcijo. Ti virusi vstavijo svoj genom v celičnega in na tak način producirajo svoje lastne gene, virusni proteini pa se potem vežejo na TSG in jih inaktivirajo. Posledici sta liza in transformacija celic (Weinberg, 2007).

Karcinogeneza je večstopenjski proces, kjer maligno transformacijo povzročajo različni karcinogeni dejavniki. V osnovi gre za pretvorbo normalne celice v transformirano maligno, ki je odvisna predvsem od skupnega delovanja mutagenih dejavnikov – iniciatorjev in nemutagenih dejavnikov – promotorjev. Skupaj vplivajo na gensko ekspresijo, stimulirajo celično proliferacijo in spodbujajo delitev celic s poškodovano

DNA. Proces tumorske karcinogeneze je sestavljen iz treh stopenj: iniciacije, promocije in progresije oziroma malignosti (Hanahan in Weinberg, 2011).

Tumorska iniciacija vključuje interakcije reaktivnih kemičnih snovi z DNA, zaradi katerih pride do poškodbe. Poškodbe ponavadi lahko popravijo popravljalni mehanizmi celice. V primeru, ko te poškodbe niso popravljene pred naslednjo celično delitvijo, pa to vodi v napačno podvajanje DNA in fiksacijo mutacije v genom posamezne celice (Tannock in sod., 2013).



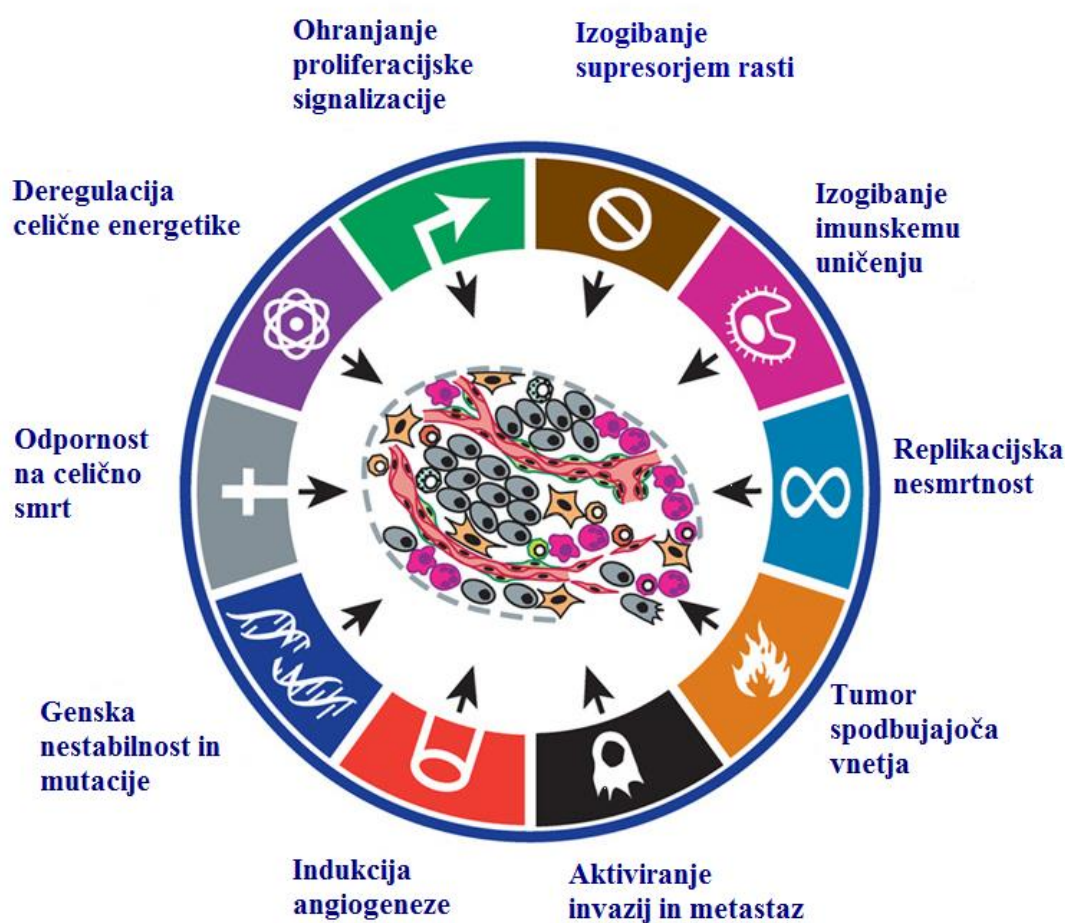
Slika 1: Večstopenjski proces karcinogeneze (povzeto po <http://www.ihoba.com.br/orientacoes-ao-cliente/o-cancer/>)

Tumorska promocija je druga stopnja, kjer različni promotorji vplivajo na proliferacijo celic. Promotorji so lahko specifične kemične snovi, hormoni, vnetni citokini in toksini (Weinberg, 2007). Na tej stopnji pride do klonalne ekspanzije mutiranih iniciacijskih celic, ki so vzrok za dodatno genetsko nestabilnost in dodatne mutacije (Novaković in sod., 2009). Zgodijo se ključne spremembe v delovanju Onc in TSG: Onc se aktivirajo, TSG pa inaktivirajo (Weinberg, 2007).

Končna stopnja je progresija, kjer pride do izražanja pridobljenih lastnosti malignega fenotipa (Novaković in sod., 2009). Beningni tumor se spremeni v malignega. Aktivirajo se angiogeni faktorji, ki sprožijo proces angiogeneze – tumor se ožili. Tumor postane sposoben vdiranja v druga tkiva, prisotni so številni vnetni procesi, ki pospešijo bolezen. Nadaljno metastaziranje tumorja poteka po dveh glavnih poteh: preko limfnih ali krvnih žil (Tannock in sod., 2013).

2.1.2 Značilnosti maligne celice

Maligna celica je spremenjena celica, ki se po svojih značilnostih močno razlikuje od normalne. Ima spremenjeno morfologijo (oblika celice, refraktilnost), je sposobna rasti neodvisno od pritrdišča, ima visoko saturacijsko gostoto in ima povsem spremenjene metabolne poti ter energetske potrebe (Tannock in sod., 2013; Weinberg, 2007).

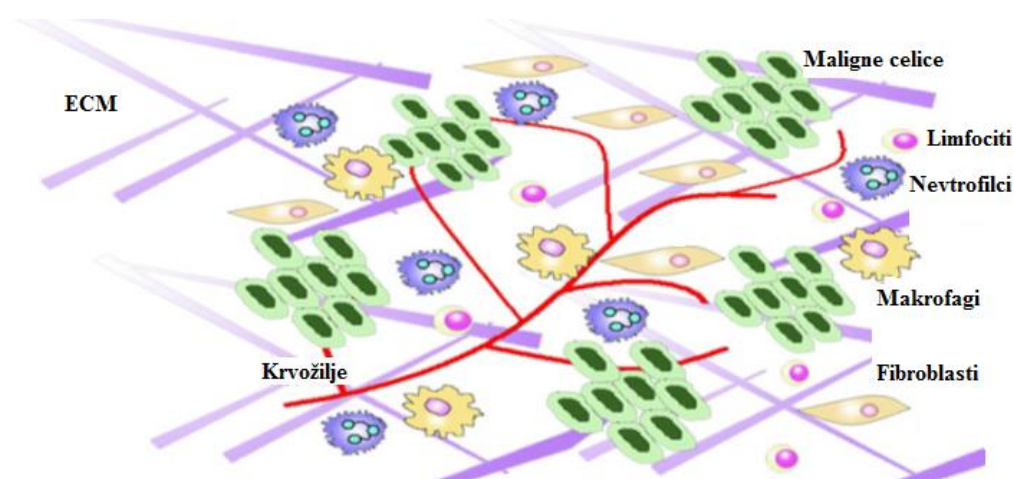


Slika 2: Deset glavnih značilnosti malignih tumorskih celic (Hanahan in Weinberg, 2011)

2.1.3 Tumorsko mikrookolje

Tumor je kompleksno tkivo, sestavljeno iz malignih celic in celic strome. Tumorsko mikrookolje (TMO) je dinamično, interaktivno in nenehno spreminjajoče se območje, ki omogoča širjenje malignih celic v globlja in bolj oddaljena območja (Tarin, 2012). TMO se razlikuje od mikrookolij normalnih tkiv. Zanj so značilni: hipoksija ali pomanjkanje kisika, nizke vrednosti (kisle) pH ter povišan tlak intersticijskih tekočin (Tannock, 2013).

TMO je sestavljeno iz netransformiranih stromalnih celic, kot so endotelijske celice, fibroblasti in različne imunske celice ter iz kompleksnega ekstracelularnega matriksa (ECM), ki ga izločajo tako normalne kot neoplastične celice, vključene vanj. Interakcije tako med malignimi in endotelijskimi celicami kot tudi med drugimi stromalnimi in vnetnimi celicami ter ECM so pomembne pri samem procesu karcinogeneze (Ding in sod, 2012). Ena od ključnih komponent TMO so še molekule mikroRNA (miRNA). To so kratki, nekodirajoči fragmenti RNA-molekule (18-25 nukleotidov), ki regulirajo izražanja različnih pomembnih genov, vključno z geni, ki uravnavajo celično delitev, razvoj in diferenciacijo ter tudi gene, nujne za apoptozo (Schavioni in sod., 2013).



Slika 3: Tumorsko mikrookolje (povzeto po Ding in sod., 2012)

Hipoksija ali pomanjkanje kisika je posledica izgube homeostatskih mehanizmov. Zaradi hitre proliferacije tumorskih celic potreba po kisiku preseže oskrbo z njim. Razvijajoče se ožilje je nezmožno dohajati potrebe rastočega tumorja in okoli krvnih žil se ustvari

gradient kisika, posledica katerega je prehodna hipoksija. Poleg tega k stanju hipoksije prispevajo še prehodne spremembe v perfuziji (prekrvavljenosti) tumorskega žilja. Tumorske žile so nezrele, bolj prepustne nimajo gladkomišičnih celic in vsebujejo strukturne nepravilnosti (slepe konce žil, spojke arterij in ven), ki pripomorejo k nestabilnem krvnem pretoku (Tannock in sod., 2013).

Rezultat neravnovesja med proizvodnjo in porabo metabolnih kislin (mlečna in ogljikova kislina) je nizka vrednost zunajceličnega nivoja pH ($\text{pH} < 7$). Tumorji prav tako nimajo funkcionalnih limfnih sistemov, zaradi česar se v zunajceličnem prostoru kopičijo tekočine, kar vodi v povišan intersticijski tlak. V TMO je spremenjena tudi koncentracija nutrientov. Nivo glukoze je nizek, nivo odvečnih produktov pa povišan (predvsem laktata). TMO ima drugačne vzorce metabolizma, ki so rezultat genetskih sprememb v Onc in TSG ter celičnih odgovorov na zunajcelične parametre. Tumorske celice imajo spremenjen metabolizem ogljikovih hidratov, proteinov, lipidov in nukleinskih kislin ter povečano glikolizo (Tannock in sod., 2013).

2.2 ZDRAVLJENJA RAKAVIH OBOLENJ

Vsi pristopi zdravljenja raka temeljijo na enotnem načelu, da je treba tumorsko tkivo odstraniti ali uničiti. Ključnega pomena so testi za določevanje poškodb normalnih tkiv ter terapevtski indeksi. Ti nam povedo, koliko je neko zdravljenje specifično za tumor oziroma določajo odgovor tumorja pri točno določeni poškodbi normalnega tkiva. Večje kot so vrednosti terapevtskega indeksa, bolj uspešna je terapija in obratno (Serša, 2009).

Preglednica 1: Načini zdravljenja rakavih obolenj in njihove glavne značilnosti (povzeto po Novaković in sod., 2009; Serša, 2009; Tannock in sod., 2013)

Način zdravljenja	Glavne značilnosti	Kombinacije z drugimi načini zdravljenja
Kirurgija - lokalni način	hitra odstanitev tumorske mase pri čvrstih, dostopnih tumorjih, brez metastaz	obsevanje, kemoterapija (pozni stadiji in metastaze)

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 1. Načini zdravljenja rakavih obolenj in njihove glavne značilnosti

Radioterapija – lokalen način	uporaba ionizirajočih sevanj (gama, X-žarki, elektroni), ki poškodujejo TC (prelomi DNA) pri nedostopnih tumorjih	kirurgija, kemoterapija (pozni stadiji in metastaze)
Kemoterapija – sistemsko zdravljenje	uporaba citostatikov stranski učinki - delovanje na vse hitro deleče se celice, tudi normalne zdravljenje v ciklusih s prekinitvami (za regeneracijo normalnih tkiv) delovanje na mikrometastaze	samostojno zdravljenje limfomov in levkemij uporaba kombinacije citostatikov – različni citostatiki različne tarče
Hormonska terapija – sistemsko zdravljenje	vnos zdravil, ki vplivajo na endokrini sistem – preprečujejo nastanek ali aktivnost določenih hormonov - zmanjšanje nivoja hormonov, ki pospešujejo izražanje genov in rast TC	uporaba z namenom zmanjšanja stranskih učinkov drugih zdravljenj: kemoterapija
Tarčna Zdravila – sistemsko zdravljenje	selektivno zaviranje tarče v TC učinkovanje na začetku razvoja tumorja (nekontrolirana rast celic, nizka toksičnost TC) najpogostejša tarčna zdravila: monoklonska protitelesa in zaviralni tirozin kinaz	uspešna uporaba v kombinaciji s citostatiki
Imunoterapija – sistemsko zdravljenje	spodbujanje IS k odstranjevanju TC specifična aktivacija oziroma povečevanje antitumorskih lastnosti limfocitov T uporaba številnih imunoterapevtskih agensov: vakcine, interferoni in interleukini	učinkovitost imunoterapije najboljša v kombinaciji s kemoterapijo

* TC (tumorske celice), IS (imunski sistem)

2.2.1 Gensko zdravljenje raka

Gensko zdravljenje je novejši pristop zdravljenja raka, kjer gre za uporabo oziroma vnosa specifičnega gena v celice z namenom selektivnega vpliva na tumorske celice (Serša, 2009).

Uporabljajo se različni pristopi: nespecifično vstavljanje delujočega gena za zamenjavo nedelujočega, zamenjava nedelujočega gena z delujočim po principu homologne rekombinacije, popravilo nedelujočega gena z reverzno mutacijo in spremembe v uravnavanju delujočega gena. Z genskim zdravljenjem lahko zamenjamo TSG, onemogočimo izražanje določenega Onc ali sprožimo smrt tarčnih tumorskih celic. Ključnega pomena je dostava terapevtskega gena v celice, ki poteka na dva načina: *in vivo*

(gen je vstavljen direktno v tarčno tkivo) ali *ex vivo* (gen je vstavljen v celice zunaj – *ex vivo*, modificirane celice pa so presajene nazaj v tarčno tkivo) (Kočevar in sod., 2010).

Poznamo dva tipa genskih terapij: somatsko (vnos genov v somatske celice) in zarodno (vnos genov v zarodne celice pred fertilizacijo oziroma v oplojeno jajčno celico pred diferenciacijo). Metode prenosa genov v tarčne celice ali tkiva delimo na virusne in nevirusne (Nayerossadat in sod., 2012).

Med virusnimi dostavnimi sistemi se uporabljajo virusni vektorji, ki so laboratorijsko spremenjeni; odstranjene imajo gene za patogenost. So učinkovitejši kot nevirusni, vendar imajo še vedno nekaj slabosti: imunogenost, proizvodnja toksinov in omejena velikost vključka. Kot virusni vektorji se največkrat uporabljajo adenovirusi, retrovirusi, itd. (Kočevar in sod., 2010). Nevirusni dostavni sistemi obsegajo vse ostale fizikalne in kemične sisteme, ki se lahko uporabljajo kot vektorji. Učinkovitost teh je v primerjavi z virusnimi manjša, vendar imajo številne prednosti: stroškovno ugodnejši, dostopnost, manjša indukcija imunskega odziva in neomejenost glede velikosti vključka. Kemične metode dostavnih sistemov so kationski lipomeri in polimeri, fizikalne pa vnos z gensko pištolo (biolistika), elektroporacija, uporaba ultrasond, magnetofekcija in vnos gole DNA (Nayerossadat in sod., 2012).

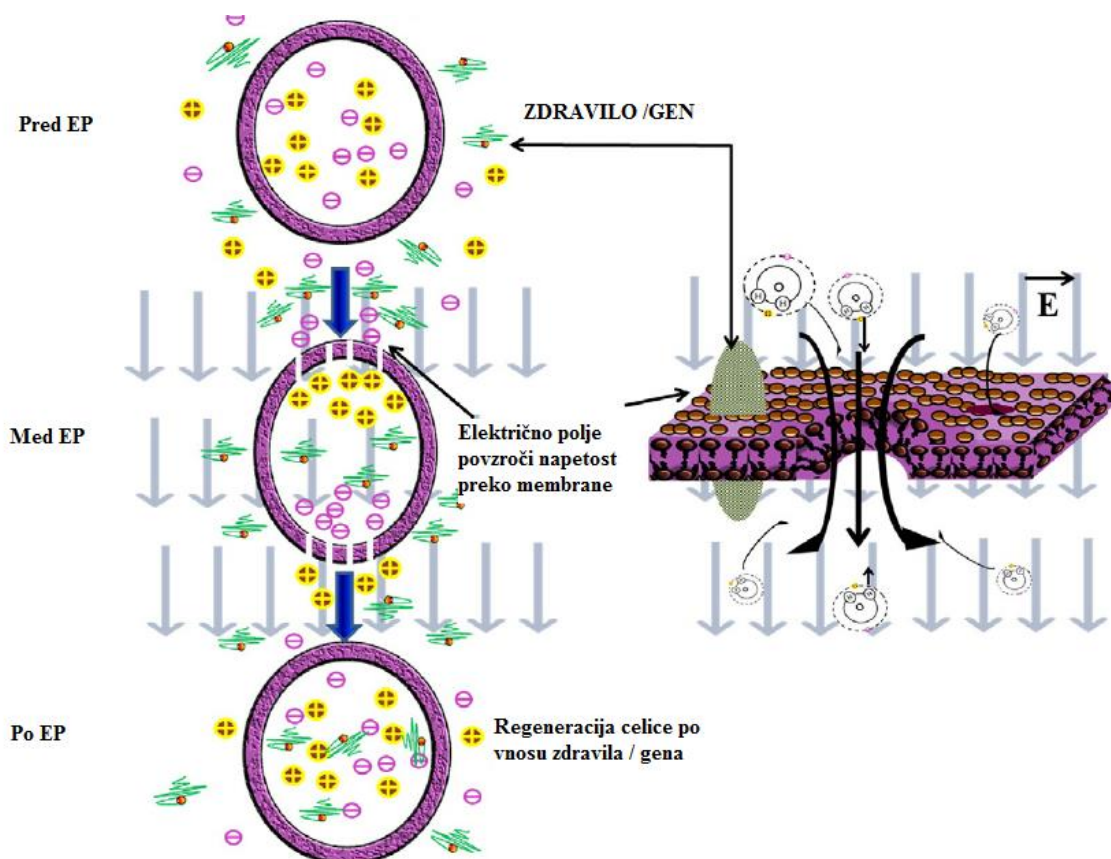
Za gensko zdravljenje raka se najpogosteje uporabljajo gola DNA, kationski lipidi in polimeri. Učinkovita metoda vnosa, ki postaja vse bolj zanimiva zaradi svoje uporabe tudi v *in vivo* sistemih (npr. kationski lipidi se ne morejo uporabljati *in vivo*) pa je metoda elektroporacije (Kočevar in sod., 2010).

2.2.2 Metoda elektroporacije

Elektroporacija je fizikalna metoda, ki s pomočjo zunanega električnega polja spremeni permeabilnost celične membrane in omogoči vstop molekulam, ki v nasprotnem primeru v celico ne bi mogle vstopiti (Čemažar in sod., 2015).

2.2.2.1 Princip delovanja metode

Pri elektroporaciji pride do nastanka hidrofilnih por v fosfolipidnem dvosloju celične membrane. S penetracijo vodnih molekul v lipidni dvosloj celične membrane se tvorijo strukture, imenovane vodni prsti. Ti povzročijo, da se lipidi v bližini reorientirajo s polarnimi glavami proti nastalim strukturam in tako tvorijo nestabilne pore, preko katerih lahko v celico vstopajo različne molekule (Čemažar in sod., 2015).



Slika 4: Prehod snovi v notranjost celice po elektroporaciji (EP), skozi nastale hidrofilne pore v fosfolipidnem dvosloju celične membrane (E, električno polje) (povzeto po Lakshmanan in sod., 2014)

Po izpostavitvi celic zunanjim električnim pulzom električno polje povzroči premik naboja na celični membrani. Razlog za to je kopičenje transmembranske napetosti, ki je višja od normalne ali mirovnega membranskega potenciala. Na območjih, kjer transmembranska napetost preseže določeno vrednost, se ustvari dovolj močno električno polje, ki vodi v

nastanek por, te pa omogočajo prehod vodnih molekul, molekul z nabojem in večjih molekul (Miklavčič in sod., 2014).

Izpostavljenot električnemu polju poveča verjetnost tvorbe por. V povprečju se pore tvorijo pogosteje in imajo daljšo življenjsko dobo kot pore, ki se tvorijo v odsotnosti električnega polja. Zaradi visoke transmembranske napetosti se poveča membranska permeabilnost za molekule, ki sicer skozi membrano ne morejo prehajati (Čemažar in sod., 2015).

Uspešnost metode je odvisna od amplitude in trajanja električnega polja. Nizke amplitude in kratka izpostavljenost nimata vpliva na povečan transport, medtem ko pri zmerni amplitudi in električnemu polju pride do reverzibilne elektroporacije. To pomeni, da se pore po prenehanju izpostavljenosti postopoma zaprejo, celice pa ostanejo viabilne (Čemažar in sod., 2015). Pri protokolih reverzibilne elektroporacije se uporabljajo pravokotni pulzi (1–8 pulzov), z dolžino posameznega pulza od 1 μ s do 1 ms ter amplitudo, ki ustvari jakost električnega polja do nekaj 100 V/cm (Rems in Miklavčič, 2014).

Pri višjih amplitudah in/ali ob daljši izpostavljenosti je elektroporacija ireverzibilna. Takrat je transport skozi membrano preobsežen in pride do izplavljanja znotrajcelične vsebine, zapiranje por pa je prepočasno. Posledica je celična smrt. V primeru še višje amplitude in/ali še daljše izpostavljenosti pa pride do toplotnih poškodb tako celice kot molekul, ki se sproščajo iz nje (Čemažar in sod., 2015). Ireverzibilna elektroporacija se uporablja za ablacijo tumorskih celic in za inaktivacijo bakterij v vodi in tekoči hrani (Rems in Miklavčič, 2014).

2.2.2.2 Uporabnost metode

Elektroporacija se uporablja na številnih področjih tako v *in vitro* kot *in vivo* sistemih. Uporabna je pri elektrozlivanju, elektrovstavljanju, elektrosterilizaciji, ekstrakciji, genskem elektroprenosu ter pri elektrokemoterapiji.

Pri optimizaciji elektrozlivanja celic s pomočjo elektroporacije nastanejo hibridne celice, ki se tvorijo z zlitjem več različnih celic skupaj. Nastanek por je namreč vzrok, da celična

membrana postane fuzogena. Najbolj razširjen primer je zlivanje limfocitov B in mielomskih celic v hibridome, ki proizvajajo monoklonska protitelesa (Rems in Miklavčič, 2014).

Elektrovstavljanje je naslednje področje, kjer se molekule s pomočjo elektroporacije vstavljajo v fosfolipidni dvosloj celične membrane. Molekularno elektrovstavljanje se razlikuje od transporta ionov in molekul skozi membrano. Prehodne odprtine, nastale vodne pore omogočijo makromolekulam, da delno vstopijo skozi in ostanejo ujete v celični dvosloj membrane, ko se nastale pore skrčijo nazaj oziroma zaprejo (Barnes in Greenbaum, 2007). V primeru amfipatičnih molekul, ostanejo le-te stabilno vključene v celični dvosloj. Primer tega so transmembranski proteini, CD4-receptorji in glikoforin A (Miklavčič in Kotnik, 2004).

Elektroporacija se uporablja tudi na področju biotehnologije za deaktivacijo mikroorganizmov v hrani in vodi (elektrosterilizacija) ter pri ekstrakciji specifičnih molekul iz celic oziroma tkiv, kot je na primer ekstrakcija soka iz sladkorne pese (Haberl in sod., 2013).

Na področju zdravljenja pa se elektroporacija uporablja pri genskem elektroprenosu in elektrokemoterapiji. Pri elektrokemoterapiji s pomočjo električnih pulzov v tumorske celice dostavimo zdravila, ki ne prehajajo celične membrane (Haberl in sod., 2013). Tako pri *in vitro* kot *in vivo* študijah, sta se kot najbolj primerna izkazala bleomicin in cisplatin. Elektroporacija celic v *in vitro* sistemu poveča citotoksičnost bleomicina do nekaj 1000-krat in cisplatina do 70-krat (Čemažar in sod., 2015).

2.2.3 Genski elektroprenos ali genska elektrotransfekcija

Genski elektroprenos (GET) predstavlja pomembno področje biomedicine. Ta nevirusna metoda vnosa DNA molekule v celice, se uporablja bodisi za DNA cepljenja proti infekcijskim boleznim bodisi za zdravljenja raka, kjer so terapije usmerjene direktno na tumorske celice ali pa je njihov cilj povečati imunski odziv organizma (Čemažar in sod., 2015).

GET celic z namenom spremembe njihovih bioloških funkcij je bil prvotno uporabljen za zdravljenja genetskih okvar imunskega sistema. Natančen molekularni mehanizem GET v celoti še ni pojasnjen. Gre za proces, ki je kompleksnejši od enostavne difuzije DNA skozi pore, nastale zaradi izpostavljenosti električnemu polju. Glavna ovira pri uporabi GET za zdravljenje tumorjev je počasna difuzija DNA skozi ECM. Predlagana rešitev je uporaba encimov, ki delno razgradijo ECM. Za učinkovit GET pa so ključni: način dostave DNA, velikost in oblika elektrod, parametri električnih pulzov ter oblika DNA (Haberl in sod., 2013).

GET terapevtskih genov v tumor, omogoča lokalno znotraj tumorsko proizvodnjo terapevtskega proteina, omogoča zadostno terapevtsko koncentracijo ter s tem terapevtski učinek. V predkliničnih raziskavah na miših so zelo visok protitumorski učinek izkazali citokini. Največji potencial za zdravljenja raka so izkazali: interlevkini (IL-2, IL-12, IL-18) in interferon IFN- α . GET se lahko uporablja kot samostojna terapija ali v kombinaciji z drugimi metodami zdravljenja: kirurgijo, radioterapijo ter v kombinaciji z elektrokemoterapijo (Čemažar in sod., 2015).

2.3 IMUNSKI SISTEM IN IMUNSKI ODZIV

Imunski sistem (IS) je organski sistem, ki ga sestavljajo številne specializirane celice in organi, katerih ključna naloga je obramba telesa pred vdori tujkov, patogenov in drugih telesu škodljivih faktorjev (Lydyard in sod., 2011). Imunost je odpornost na bolezni, imunski odziv pa predstavljajo usklajene reakcije celic in molekul IS na infekcijske mikrobe. Fiziološka funkcija IS je preprečevanje in odpravljanje povzročenih okužb (Abass in sod., 2012). Med povzročitelje okužb spadajo: virusi, bakterije, glive in številni paraziti (MacPherson in Austyn, 2012).

IS je sestavljen iz prirojenega in pridobljenega IS. Prirojena (naravna) imunost je prisotna pri zdravih posameznikih vse od rojstva in je v nenehni pripravljenosti za reakcijo proti vdirajočim mikrobom. Ta obramba deluje hitro, ima določeno specifičnost in nima imunskega spomina. Pridobljena (specifična ali adaptivna) imunost pa se pogosto aktivira, kadar prirojeni IS ne more sam odpraviti vdirajočih mikrobov. Pridobljeni IS je visoko

specifičen, ima imunski spomin, vendar se razvije počasneje. Obe vrsti IS med seboj komunicirata in sodelujeta preko direktnih celičnih stikov ali preko interakcij, ki vključujejo kemične mediatorje, citokine in kemokine (Abbas in sod., 2012; Lydyard in sod., 2011).

Celice IS so organizirane v limfne organe ali žleze, sposobne so migracije, med njimi pa poteka intenzivna komunikacija preko celične površine in molekul, ki jih izločajo v okolico (npr. citokinov) (Lydyard in sod., 2011).

2.3.1 Celice in molekule prirojenega imunskega sistema

Celice prirojenega IS prepoznavajo povzročitelje okužb preko posebnih receptorjev za prepoznavo molekularnih vzorcev ali PRR-jev (angl. *Pattern recognition receptors*). Ti receptorji prepoznavajo specifične površinske vzorce vdirajočih mikrobov, ki so pri osebkih iz določene skupine enaki in se imenujejo patogenom pridruženi molekularni vzorci ali PAMPs (angl. *Pathogen-associated molecular patterns*). PAMPs direktno z vezavo na PRR-je ali indirektno z vezavo na druge molekule stimulirajo prirojeni IS (MacPherson in Austyn, 2012).

Preglednica 2: Celice prirojenega imunskega sistema in njihove glavne značilnosti ter funkcije (povzeto po Lydyard in sod., 2011; MacPherson in Austyn, 2012; Ng in Gommerman, 2013)

Celice prirojenega IS	Glavne značilnosti in funkcije
Nevtrofilci (fagociti)	mobilni fagociti, ki po okužbi aktivno fagocitirajo in požirajo tujke imajo granule s peroksidazami, kislimi in bazičnimi fosfati ter defenzini
Makrofagi (fagociti)	v različnih tkivih (npr. Kupferjeve celice v jetrih) receptorji Toll za prepoznavanje tujka in določitev vrste imunskega odziva stimulirajo vnetje ter proizvajajo citokine (za celjenje tkiv po vnetju)
NK-celice	krožijo v krvi – obramba pred virusi in tumorskimi celicami receptorji za preverjanje površine drugih celic sposobnost ubijanja drugih celic (citotoksičnost) – sprostitjo granule s perforini (naredijo pore v cel. membrani) in grancimi (sprožijo apoptozo)
Celice MAST in bazofilci	številne granule v citoplazmi MAST sproščajo citokine in mediatorje vnetja (alergije in anafilaktični šok) bazofilci sproščajo citokine, hidrolitične encime, heparin in histamin

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 2. Celice prirojenega imunskega sistema in njihove glavne značilnosti ter funkcije

Eozinofilci	granulociti, ki so udeleženi pri vnetnih procesih, še posebej pri vnetjih parazitskih okužb in alergijskih odgovorov v citoplazmi imajo granule s peroksidi in toksini
Dendritične celice (DC)	ključna vloga povezovanja prirojenega in pridobljenega IS prepoznajo mikrobnе Ag in nadalje prezentirajo in procesirajo njihove proteine limfocitom T – so najpomembnejše APC dva tipa: konvencionalne (cDC) in plazmacitoidne (pDC)

* Ag (antigen), APC (antigen predstavitvena celica)

Molekule, ki so udeležene pri poteku prirojene obrambe, so: proteini komplemента in akutne faze ter citokini (interferoni in antimikrobni peptidi) (Lydyard in sod., 2011).

2.3.2 Celice in molekule pridobljenega imunskega sistema

Ključna komponenta pridobljenega IS so limfociti, nosilci specifične imunosti in imunskega spomina. Delimo jih na limfocite B in T. Ločimo tudi dva tipa pridobljene imunosti: humoralno in celično. Humoralna je posredovana s protitelesi (Ab) limfocitov B, ki jih le-ti izločajo v cirkulirajoče in mukozne tekočine, kjer nevtralizirajo in eliminirajo mikrobo ter njihove toksine. Vendar Ab nimajo dostopa do mikrobov znotraj celic. Pri obrambi proti znotrajceličnim mikrobo je pomembna celična imunost, posredovana z limfociti T (Abbas in sod., 2012).

Preglednica 3: Celice specifičnega imunskega sistema in njihove glavne značilnosti ter funkcije (povzeto po (Abbas in sod., 2012; Lydyard in sod., 2011; MacPherson in Austyn, 2012)

Celice specifičnega IS	Glavne značilnosti in funkcije
Celice B/Limfociti B	iz hematopoetskih matičnih celic (plod), kasneje iz kostnega mozga na površini B-celični receptorji (BCR) in Ab za določen Ag
Spominske celice B	dozoritev po aktivaciji limfocitov B izražanje Ab za točno določen Ag – ob ponovnem srečanju z istim Ag sposobne hitrega in močnejšega imunskega odziva
Celice B plazmatke	nimajo antigenskih receptorejv na površini masovna proizvodnja Ab enake specifičnosti kot je antigeni receptor stimulirane spominske celice B

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 3. Celice specifičnega imunskega sistema in njihove glavne značilnosti ter funkcije

Celice T/Limfociti T	diferenciacija iz T-celičnih prekurzorskih celic v timusu na površini T-celični receptorji (TCR) za določene Ag, ki jim jih preko MHC predstavljajo APC naloga: ojačanje imunskega odziva in ubijanje okuženih celic
Citotoksični limfociti T/Tc	na površini TCR in CD8 ⁺ (za prepoznavanje celic) preverjanje celičnih površin – ob okuženi celici sprostijo granule s perforini in grancimi (nastanek transmembranskih kanalov v okuženi celici, porušeno ionsko ravnovesje – liza in apoptoza okužene celice) proizvodnja toksičnih citokinov
Celice pomagalke T/Th	na površini izražene CD4 ⁺ , več tipov (Th1, Th2, Th17 in Treg) pomoč pri proizvodnji Ab in fagocitom pri uničevanju mikrobov
Th1	aktivacija makrofagov, NK in Tc, stimulacija plazmatk in Ab Th1 odgovori pomembni pri bakterijskih in virusnih okužbah
Th2	vpliv na eozinofilce (parazitske okužbe), aktivacija makrofagov, indukcija diferenciacije limfocitov B in stimuliranje humornega IS
Th17	stimulacija migracije nevtrofilcev na mesto okužbe in obramba proti glivičnim in bakterijskim okužbam
Treg	supresija drugih celic (tudi DC in/ali drugih limfocitov) – pomembno pri izklopu IS po uspešni odstitvi mikroba
Spominski limfociti T	zapomnijo si odziv na določene Ag tako kot spominske celice B

* MHC (molekula poglobitve tkivne skladnosti), APC (antigen predstavitevna celica)

2.3.3 Tumorska imunologija

IS je sposoben prepoznati tumorske celice. Na tem področju je bila identifikacija Ag značilnih za tumorske celice ključnega pomena (Tannock in sod., 2013).

Poznamo tumor specifične Ag - TSA (angl. *Tumor-specific antigens*) in tumor povezane Ag - TAA (angl. *Tumor-associated antigens*). TSA so značilni samo za tumorske celice in so unikatni, TAA pa se lahko nahajajo tudi na normalnih celicah (Lydyard in sod., 2011). TAA so procesirani ter prezentirani na molekule MHC I/II, da jih limfociti T prepoznajo s TCR (Tannock in sod., 2013). Druga delitev tumorskih Ag upošteva njihov izvor. Po tej klasifikaciji poznamo virusne, kemične, onkofetalne in diferenciacijske tumorske Ag (Lydyard in sod., 2011).

Pri prepoznavanju tumorjev so najprej pomembne komponentne prirojenega IS, ki uporabljajo PRR-je in druge molekule na celični površini (direkten imunski odziv). Tumorske celice pogosto izražajo s stresom povezane gene (npr. MICA in MICB), ki delujejo kot ligandi za receptorje na površini NK-celic, Tc in fagocitov. NK-celice nenehno preverjajo prisotnost molekul MHC I na površini celic, saj pri tumorskih pride do izgube le-teh. Pridobljeni IS pa prepoznava tumorske celice indirektno s pomočjo DC, ki skupaj s Th celicami aktivirajo limfocite B in proizvodnjo Ab, ki reagirajo na tumorske proteine (Dranoff, 2004).

Potencialni imunoefektorski mehanizmi proti tumorskim celicam so: ubijanje s Tc celicami, ki prepoznajo TAA ali TSA peptide povezane z MHC I; indukcija apoptoze s pomočjo Ab; ubijanje posredovano z Ab in komplementom; od Ab odvisna celična citotoksičnost posredovana z makrofagi, receptorji granulocitov ali limfocitov s Fc receptorji; fagocitoza aktivirana z makrofagi ter ubijanje z NK-celicami (Lydyard in sod., 2011). Vendar tumorske celice razvijejo številne načine, s katerimi se izognejo delovanju IS, npr. zmanjšajo prepoznavnost tumorskih Ag, postanejo neobčutljive za apoptotične in/ali nekrotične signale efektorskih celic (npr. Tc) ter aktivno posegajo v delovanje IS s pomočjo tvorbe imuno-zaviralnih dejavnikov v tumorskih celicah ali v celicah okoliškega tkiva (Novaković in sod., 2009).

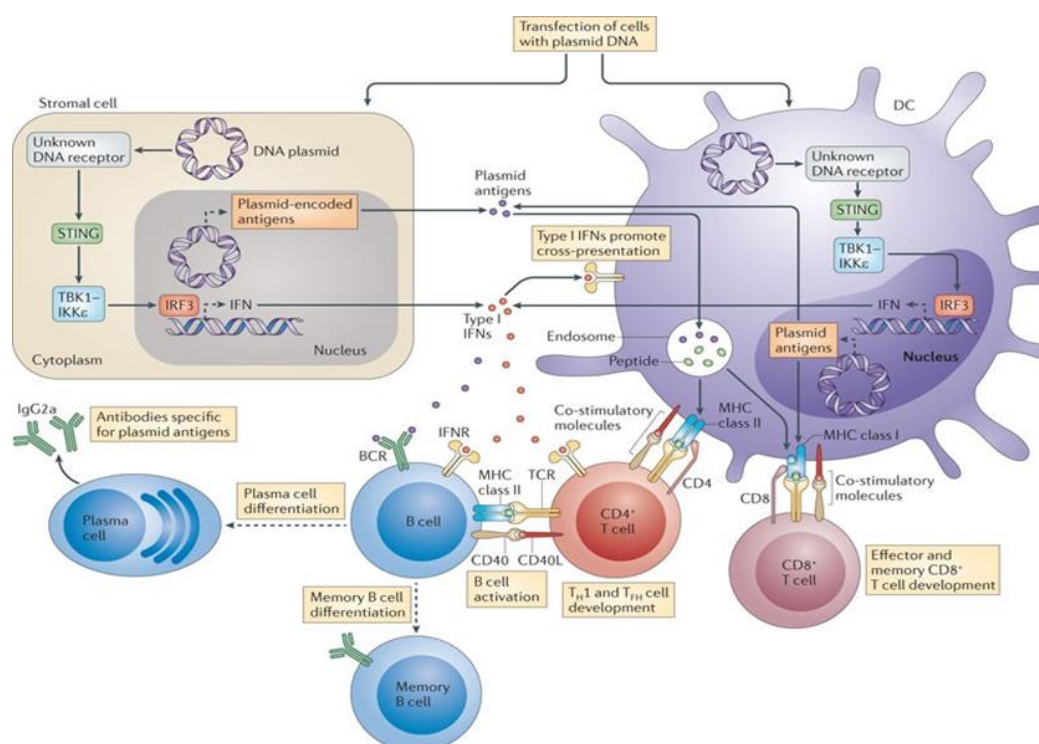
2.4 IMUNSKO ZAZNAVANJE NUKLEINSKIH KISLIN

Odkritje specifičnih receptorjev je v zadnjem desetletju izkazalo ključno vlogo pri prepoznavanju nukleinskih kislin v celici in z njimi povezane aktivacije IS na znotrajcelične patogene. Gre za že omenjene PRR-je, ki jih aktivirajo specifični vzorci na celični površini, imenovani PAMPs in DAMPs (angl. *Damage-associated molecular patterns*).

Mikrobne nukleinske kisline so pomemben razred PAMPs. Od lastnih nukleinskih kislin celice se razlikujejo v sekvenci, strukturi, molekularni modifikaciji in lokaciji. Neobičajno lokalizirane lastne nukleinske kisline, kot sta zunajcelična DNA ali RNA-molekula pa sta prepoznani kot DAMPs (Desmet in Ishii, 2012). DAMPs so druga kategorija signalov, ki

jih poleg PAMPs zaznava in nanje reagira (prirojeni) IS. Gre za nepatogene lastne produkte celice, ki se največkrat pojavijo kot rezultat celičnega stresa ali poškodbe. To so znotrajcelični proteini, kot so histoni in toplotni stresni proteini, ki se sprostijo tekom nekroze ali apoptoze, ter zunajcelični produkti, sproščeni po mehanski poškodbi tkiv, kot sta heparin sulfat in hialuron (Ishii in Tang, 2014).

DNA-molekula je običajno prisotna v celičnem jedru evkariotskih celic, zato njena prisotnost na neobičajnih mestih v celici, kot sta npr. citoplazma ali endosomi, sproži aktivacijo IS. Celično jedro je imunsko privilegirana organel. Prisotnost DNA v drugih kompartmentih celice pa aktivira sistem prepoznavanja DNA, ki zazna tako DNA vdirajočega patogena (DNA PAMPs) kot tudi lastno DNA (DNA DAMPs) (Paludan in Bowie, 2013).



Slika 5: Mehanizem DNA cepljenja oziroma transfekcija celic s plazmidno DNA, kjer gre za zaznavanje nukleinskih kislin v celici in posledično aktivacijo imunskega odziva (povzeto po Desmet in Ishii, 2012)

Aktivacija IS s PAMPs poteka z direktno vezavo PRR-jev nanje in ne vključuje nobene dodatne degradacije ali prezentacije na specifične celice. Poznanih je pet družin PRR-jev, ki se med seboj razlikujejo v celični lokaciji, tipom PAMPs, ki jih zaznavajo in v indukciji

imunoefektorskih odgovorov. To so: receptorji Toll (TLRs), citosolni RIG-1 receptorji (RLRs), receptorji-Nod, C-tip lektinski receptorji in v melanomu odsotni 2 (AIM-2) receptorji. Čeprav so DAMPs kategorno povsem drugačni od PAMPs, so vzorci vnetnih odgovorov, ki jih inducirajo povsem enaki: infiltracija makrofagov in nevtrofilcev ter sproščanje citokinov. DAMPs so zaznani z istim naborom PRR-jev kot PAMPs (Ishii in Tang, 2014).

2.5 BIOLOŠKI DNA SENZORJI

Prvi identificiran PRR za zaznavanje DNA, je endosolni senzor TLR9, ki spada med receptorje Toll in po zaznavi DNA v endosomih, stimulira izražanje interferonov tipa I. (Paludan in Bowie, 2013). Na področju IS so ti ključnega pomena pri vnetnih odzivih, aktivaciji jedrnih faktorjev kapa B (NF- κ B), ki uravnavajo transkripcijo DNA, ter pri izražanju kostimulatornih molekul B7 in vnetnih citokinov (Ishii in Tang, 2014).

Poleg endosomov se lahko DNA po številnih poteh znajde tudi v citosolu celice, kjer so ključnega pomena citosolni senzorce DNA. To so proteini, ki delujejo kot PRR za prepoznavanje DNA. DNA v citosolu je lahko posledica okužbe z znotrajceličnimi patogeni, oslabiljenega eliminiranja eksogene DNA in neuravnoveženega nadzora nad endogenimi DNA produkti. Vsaka celica vsebuje encime DNA-ze, ki preprečujejo neželjeno kopičenje DNA v notranjosti celice. V primeru nepravilnega delovanja ali odsotnosti teh encimov, DNA pronica v citoplazmo oziroma se tam kopiči in tako stimulira citosolne senzorce DNA (Paludan in Bowie, 2013).

Preglednica 4: Biološki senzorce (povzeto po Desmet in Ishii, 2012; Paludan in Bowie, 2013)

PRR receptor	Lokacija v celici	Zaznani patogeni	Naravni agonisti	Stimuliran odgovor
TLR3	Endolizosomi	dsRNA, ssRNA in dsDNA virusi	dsRNA	Vnetni citokini
TLR7 in TLR8	Endolizosomi	ssRNA virusi, bakterije, glive, protozojski paraziti	GU-bogata ssRNA	IFN-I
TLR9	Endolizosomi	dsDNA virusi, bakterije, protozojski paraziti	DNA	IFN-I

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 4. Biološki senzorji

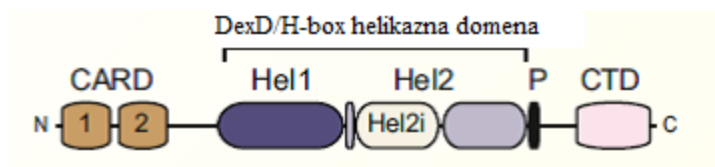
RIG-1	Citoplazma	ssRNA virusi, DNA virusi, bakterije	Kratke RNA s 5' ppp	IL-1β, IFN-I, vnetni citokini
MDA5	Citoplazma	Vacinia virus, reovirusi, bakterije	Dolge dsRNA	IFN-I
NOD2	Citoplazma	RNA virusi	ssRNA	IFN-I
DDX3	Citoplazma	RNA virusi	RNA	IFN-I
DDX1/21/36	Citoplazma	RNA virusi	dsRNA	IFN- α
DDX60	Citoplazma	RNA in DNA virusi	ssRNA, dsRNA, dsDNA	IFN-β, CXCL-10
DDX41	Citoplazma	DNA virusi, bakterije	DNA	IFN- α , IFN- β
AIM2	Citoplazma	DNA virusi, bakterije	DNA	IL-1 β , IL-18
IFI16	Citoplazma in jedro	DNA virusi	dsDNA	IFN- β , IL-6, IL-1 β
STING	Citoplazma	Bakterije	Ciklični di-GMP	

* dsRNA/DNA (dvovijačna RNA/DNA), ssRNA/DNA (enovijačna RNA/DNA), 5' ppp (5' fosfatni konci verige DNA), RIG-1 (receptor RIG-1; angl. *Retinoic acid inducible gene 1*), MDA5 (receptor MDA5; angl. *Melanoma Differentiation-Associated protein 5*), NOD2 (nukleotid vezoča oligomerizacijska domena proteina 2), CXCL-10 (kemokin: interferon gama inducirajoč protein 10 / IP10), AIM2 (odsoten v melanomu 2), IFI16 (interferon gama inducirajoč protein 16), IFN-I (interferoni tipa 1), STING (stimulator IFN genov)

Citosolna senzorja RIG-1 in DDX-60, ki smo ju preučevali v naši nalogi, spadata med proteine DexD/H-box (DDX), ki vključujejo RNA in DNA antivirusne helikaze z domenami DexD/H-box ali DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box. Ti proteini so vpleteni v procesih uravnavanja izražanja genov na številnih mestih: pri prenosu signalov po signalizacijskih poteh, pri interakcijah z genskimi promotorji, spajanju mRNA-molekule in translacijski regulaciji. Številni proteini DDX so vključeni tudi pri imunskem odgovoru in sicer kot signalne molekule in senzorji RNA/DNA (Paludan in Bowie, 2013).

2.5.1 Citosolni senzor RIG-1

RIG-1 (angl. *Retinoic acid-inducible gene 1*) je eden izmed treh članov RLR-receptorjev podružine DDX helikaz. Poleg RIG-1 sem spadata še MDA5 in LGP2. Čeprav so RNA helikaze dobile ime po svoji sposobnosti za odvijanje dsRNA, opravljajo bolj splošne funkcije: izpodrivanje proteinov vezanih na RNA, prileganje verigam RNA in promocija konformacijskih sprememb RNA. Vse od naštetega je značilno za RIG-1, ki je sposoben odvijanja RNA duplesov in translokacije vzdolž baznih parov RNA (Gobau in sod., 2013).



Slika 6: Zgradba RIG-1. Citosolni senzor RIG-1 je sestavljen iz C-terminalne domene (CTD), DexD/H-box helikazne domene, sposobne vezave na RNA molekulo ter N-terminalne CARD domene, ki posreduje signalizacijo (povzeto po Gobau in sod., 2013)

RIG-1 je poznan tudi kot DDX-58 in je sposoben vezave na različne ligande eno- ali dvo-vijačne RNA molekule (ss/dsRNA). Je pomemben induktor prirojenega IS proti virusom ter pri zaznavanju bakterij. Indirektno ga aktivirajo citosolne virusne ali bakterijske dsDNA, lahko pa se aktivira tudi kot odgovor na lastne RNA. Sposoben je interakcij s STING-om (Desmet in Ishii, 2012).

RIG-1 je pomemben pri produkciji IFN-I. Od njega je odvisen interferonski odgovor na nekatere DNA viruse. Sposoben je ločiti lastno od tuje RNA, po značilnostih na 5' koncu vijačnice. Aktiviran RIG-1 inducira signalizacijo z vezavo na mitohondrijski adaptor MAVS, poznan tudi kot IPS1 (IFN- β promotor stimulator 1). Neodvisno od IPS1, RIG-1 aktivira znotrajcelični signalizacijski kompleks, inflamatom, katerega aktivacija vodi v proteolizno obdelavo prointerlevkina 1 β v zrel interlevkin 1 β (IL-1 β), ki je predstavnik vnetnih citokinov. Aktivacija RIG-1 v melanomskih celicah lahko privede do indukcije kaspazno odvisnih apoptotskih odgovorov, ki potekajo preko proteina Noxa (Gobau in sod., 2013).

Prepoznavanje dsDNA z RIG-1 je odvisno od tipa celic. Študije na "knock-out" miših z izbitim genom za RIG-1 so pokazale, da imajo konvencionalne DC, makrofagi in fibroblasti izolirani iz omenjenih miših, oslABLJENO indukcijo IFN po RNA virusni okužbi, medtem ko je produkcija IFN nemotena v plazmacitoidnih DC (InvivoGen, 2012).

2.5.2 Citosolni senzor DDX-60

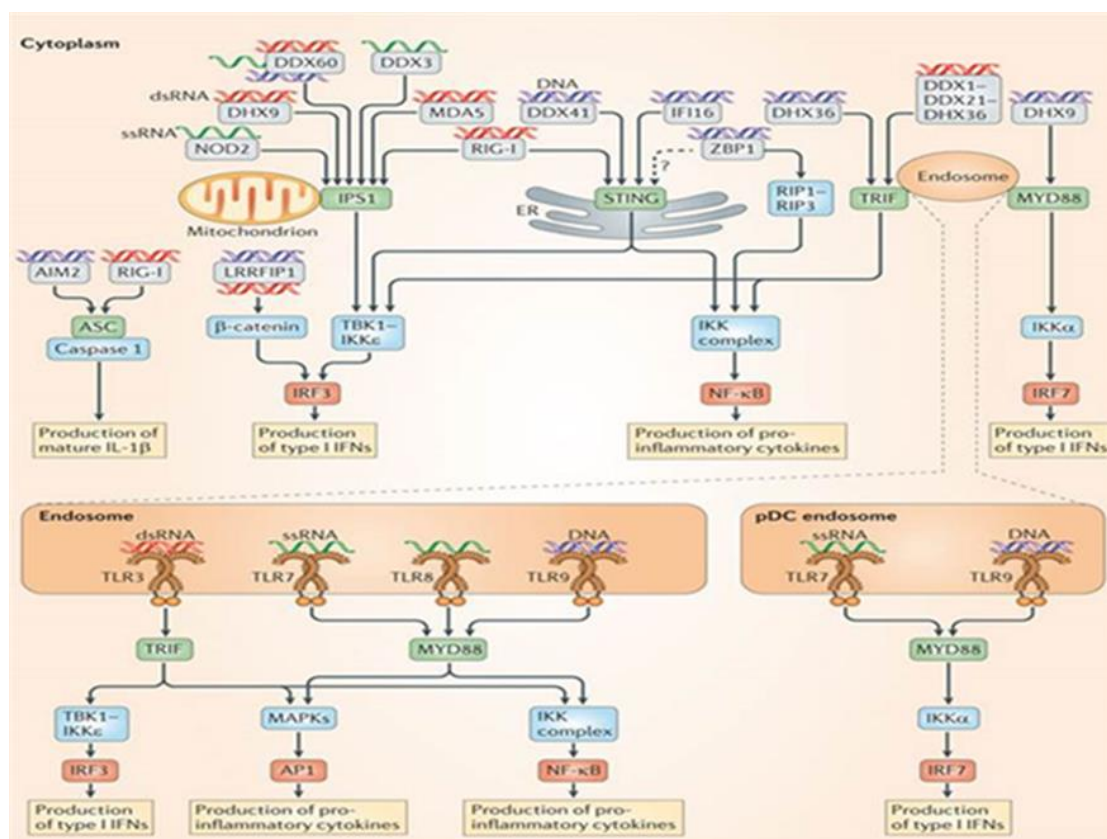
DDX-60 spada med helikaze, ki imajo podobno delovanje kot RLR-receptorji. Poleg DDX-60 so ti proteini še: DDX3, DHX9 in kompleks DDX1-DDX21-DDX36. Te helikaze posredujejo izražanje IFN- α/β bodisi z direktnim zaznavanjem nukleinskih kislin po virusni okužbi in/ali z interakcijami komponent IFN indukcijskih poti (Gobau in sod., 2013).

DDX-60 je prav tako kot RIG-1 sestavljen iz DexD/H-box helikazne domene ter dolgih N- in C-terminalnih regij. Filogenetski razvoj kaže podobnost med DDX-60 in kofaktorjem RNA eksosomov gliv kvasovk, Ski2. Ski2 je proteinski kompleks, potreben za integriteto citoplazemske RNA, RNA eksosom pa je makromolekulski proteinski kompleks, ki vključuje ribonukelaze in helikaze ter nadzoruje kvaliteto celičnih RNA v jedru in v citoplazmi. Pri glivah kvasovkah RNA eksosomi skupaj s Ski2 delujejo antivirusno. Študije so dokazale, da se tudi DDX-60 povezuje s komponentami RNA eksosomov (Miyashita in sod., 2011).

DDX-60 zavira virusno replikacijo, zato je njegovo izražanje povečano po virusnih okužbah. Veže se lahko na virusno ss/dsRNA ter tudi na dsDNA-molekulo DNA-virusov. DDX-60 oblikuje kompleks z RLR-ji in je udeležen pri njihovih signalnih poteh. Po virusni okužbi se veže na endogeni protein RIG-1 in je nadalje pomemben pri izražanju IFN-I (Miyashita in sod., 2011). Utišanje DDX-60 vodi v zmanjšano sekrecijo IFN-I (Desmet in Ishii, 2012).

Izražanje DDX-60 promovira vezavo RIG-1 na virusno RNA/DNA. Sposoben je promocije RIG-1 ali MDA5 odvisne ekspresije IFN- β . Med virusno okužbo inducira gene IFN, njegova antivirusna aktivnost pa naj bi bila odvisna od prisotnosti RLR-jev (Miyashita in sod., 2011). Zadnje raziskave so pokazale, da je DDX-60 udeležen pri RIG-1 odvisni produkciji IFN-I ter pri RIG-1 neodvisnih RNA virusnih degradacijskih poteh. DDX-60 s svojim delovanjem nadzoruje citoplazemski protivirusni prirojeni imunski odziv in deluje kot ligandno specifičen aktivator RIG-1 (Oshiumi in sod., 2015).

Vlogo DDX-60 kot pozitivnega regulatorja RLR-jev so na drugi strani pod velik vprašaj postavili rezultati raziskave Gobau in sod., 2015. V omenjeni študiji so raziskali vlogo DDX-60 pri produkciji IFN- α/β in pri odpornosti na določene virusne okužbe. Analize fibroblastov in mieloidnih celic "knock-out" miši z izbitim genom za DDX-60 niso pokazale oslabitev v produkciji IFN- α/β kot odgovor na RLR agoniste ali RNA viruse. Dokazali so še, da povečana ekspresija DDX-60 ni okrepila indukcije IFN in da DDX-60 ni interagiral z RLR-ji. Pri omenjeni študiji niso ugotovili nobene oslabiljene odpornosti na virusne okužbe pri miših brez gena za DDX-60. Profili mRNA DDX-60 in RIG-1 so bili v različnih tkivih zelo podobni – primerljiva ekspresija je bila zabeležena tudi na celičnem nivoju: mRNA DDX-60 in RIG-1 so bile prisotne v večini imunskih celic. V splošnem rezultati te študije predvidevajo, da DDX-60 bolj kot pozitivni regulator RLR-jev deluje kot restriksijski faktor, visoko specifičen za določen virus, razred virusov ali ostalih patogenov (Gobau in sod., 2015).



Slika 7: Pregled mehanizmov zaznavanja nukleinskih kislin (povzeto po Desmet in Ishii, 2012)

2.6 CITOKINI

Citokini so majhne signalizacijske molekule, ki jih celice izločajo kot odgovor na določen dražljaj. So posredniki interakcij med elementi IS, pospešijo rast, diferenciacijo, kemotakso, okrepijo citotoksičnost ter regulirajo imunost. Delimo jih glede na populacijo celic, ki jih izločajo:

- monokine izločajo mieloidne celice (monociti in makrofagi);
- limfokine primarno izločajo limfociti, lahko pa jih izločajo tudi v mieloidne celice;
- kemokini so citokini, ki usmerjajo celične migracije in aktivirajo celice kot odgovor na infekcijske agense ali tkivne poškodbe;
- interlevkine so najpogostejši produkti levkocitov;
- interferoni, ki jih proizvajajo številne različne celice kot odgovor na virusne okužbe (Lydyard in sod., 2011).

2.6.1 Interferoni tipa I in IFN- β

Interferoni (IFN) so vnetne molekule, ki posredujejo obrambo proti virusnim okužbam in so pomembni pri omejevanju okužb, medtem ko se vzpostavljata specifični humoralni in celični IS. Delijo se na dve skupini: interferone tipa I (IFN-I), ki vključujejo IFN- α in IFN- β ter interferone tipa II (IFN-II), med katere spadajo IFN- γ (Lydyard in sod., 2011).

IFN-I so polipeptidi, ki jih izločajo okužene celice in imajo tri glavne funkcije. V prvi vrsti inducirajo znotrajcelično antimikrobno stanje okuženih in sosednjih celic v tkivu, s čimer omejijo širitev okužbe (Ivashkiv in Donlin, 2014). Protivirusno stanje ustvarijo z indukcijo izražanja z IFN-stimuliranih genov (Desmet in Ishii, 2012). Druga funkcija je posredovanje prirojenega IS, kar nadalje promovira prezentacijo Ag in funkcije celic ubijalk. Tretja funkcija je aktivacija specifičnega IS, kar vključuje promocijo B in T celičnih odgovorov in imunski spomin (Ivashkiv in Donlin, 2014). IFN-I z direktnim spodbujanjem diferenciacije celic Th1, inducirajo Th1 tip imunskega odgovora (Desmet in Ishii, 2012).

IFN-I predstavljajo zaščito pri akutnih virusnih in bakterijskih okužbah ter pri avtoimunskih boleznih (Ivashkiv in Donlin, 2014). Mehanizem delovanja pri bakterijskih okužbah je povečevanje dovzetnosti različnih vrst celic na apoptozo inducirajoč dražljaj. Vendar IFN-I sami niso dovolj za indukcijo apoptoze mnogih celic, temveč njihovo delovanje vključuje povišano regulacijo kaspaz in pro-apoptotskih senzorjev, kot so TLR-ji in inflammasomi. IFN-I inducirajo povečano regulacijo RIG-1 in MDA5 (Trinchieri, 2010).

Družina citokinov, IFN-I, vključuje 12 podtipov IFN- α , IFN-1 β , IFN- ϵ (IFN epsilon), IFN- κ (IFN kappa) in IFN- ω (IFN omega) (Desmet in Ishii, 2012). Izločajo jih številni tipi celic od fibroblastov, epitelnih celic, celic prirojenega IS do limfocitov (Ng in Gommerman, 2013). Večina tipov celic proizvaja IFN- β , medtem ko hematopoetske celice (pDCs) prevladujoče proizvajajo IFN- α (Ivashkiv in Donlin, 2014).

IFN- β je potencialni aktivator imunskih celic in IS. S svojim delovanjem lahko aktivira tako celice prirojenega IS (APC) kot tudi celice pridobljenega IS (limfocite B in T). Citosolno zaznavanje DNA, ki aktivira STING in posledično povzroči izražanje IFN- β , lahko ima tolerogene ali imunogene posledice pri fizioloških značilnostih vnetnih procesov, ki so pomembni za klinične bolezni vključno z avtoimunskim sindromom, rakavimi obolenji in kroničnimi okužbami (Lemos in sod., 2014).

2.6.2 Tip I interferonski imunski odgovor

IFN-I nastajajo v skoraj vseh celicah, kot odgovor na aktivacijo različnih vrst transmembranskih in citosolnih receptorjev. RIG-1 in MDA5 sta najpogostejša receptorja, odgovorna za sprožanje izločanja IFN-I (Trinchieri, 2010). Obstajajo tri glavne signalne poti, ki vodijo v proizvodnjo IFN-I: po virusni okužbi steče signalizacija po poti RIG-1, drugo in tretjo pot pa sprožijo receptorji Toll – ena vključuje adaptorni protein TRIF, druga pa aktivacijo transkripcijskega faktorja IRF7 (InvivoGen, 2005).

3 MATERIALI IN METODE

Eksperimentalno delo je večinoma potekalo na Onkološkem Inštitutu, na Oddelku za eksperimentalno onkologijo v Ljubljani, končne analize qPCR pa v laboratoriju na Fakulteti za vede o zdravju v Izoli. Pri eksperimentalnem delu v *in vitro* sistemu smo uporabili celice mišjega melanoma B16F10, za eksperimentalno delo v *in vivo* sistemu pa laboratorijske miši linije C57BI/6. Tako *in vitro* kot *in vivo* smo uporabljali plazmid gWiz Blank, plazmid brez zapisa za protein. Eksperimentalno delo smo večinoma izvajali v zaščitni komori z laminarnim pretokom zraka (LAF komori), da so gojišča in ostali material, ki smo ga uporabljali, ostali sterilni.

3.1 CELICE MIŠJEGA MELANOMA IN MIŠJI TUMORJI

Celice mišjega melanoma B16F10 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) z visokim metastatskim potencialom smo gojili v gojišču AMEM (Life Technologies, Grand Island, NY) z dodatki: 5 % fetalnega govejega seruma (FBS, Life Technologies), 10 Mm/l L-glutamina (Life Technologies), 100 U/ml penicilina (Grutenhal, Aachen, DE) in 50 mg/ml gentamicina (Krka, Novo Mesto, Slovenija). Celice smo gojili v inkubatorju na 37 °C in 5 % CO₂.

Mišji tumorji so bili nasajeni v podkožje na bok laboratorijskih miši linije C57BI/6 (Envigo, Udine, Italija). Nasadili smo 1x10⁶ celic v podkožje vsake miši. Poskuse smo začeli izvajati, ko je premer tumorja dosegel 4 mm. Miši so bile nastanjene v posebnih kletkah in prostorih z nadzorovano temperaturo in vlago ter 12/12 urnim dnevno-nočnim ciklom. Hrano in vodo smo dodajali po potrebi.

3.2 PLAZMID gWIZ BLANK

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili plazmid gWiz™ Blank, proizvajalca Aldevron (Fargo, North Dakota, USA). Plazmid gWiz Blank nima zapisa za protein in je velik 5100 baznih parov. Sestavljen je iz modificiranega promotorja, introna A in umetnega visoko

učinkovitega transkripcijskega terminatorja. Je brez endotoksinov in je odporen na antibiotik kanamicin.

Različnim ekperimentalnim skupinam smo dodali različne koncentracije omenjenega plazmida. Osnovna koncentracija plazmida je bila 2 mg/ml, potrebovali pa smo še koncentraciji 1 mg/ml in 3,5 mg/ml. Najnižjo koncentracijo smo pripravili z redčenjem osnovne koncentracije s fiziološko raztopino (100 µl plazmida + 100 µl fiziološke raztopine), najvišjo pa z zgostitvijo osnovne koncentracije. Koncentracijo in čistost plazmida smo preverili spektrofotometrično (Epoch Microplate Spectrophotometer, Take3™ Micro-Volume Plate, BioTek, Bad Friedrichshall, Nemčija).

3.3 GENSKI ELEKTROPRENOS

3.3.1 Genski elektroprenos *in vitro*

Najprej smo si pripravili celice mišjega melanoma B16F10. Celicam na plošči smo odpipetirali gojišče, sprali z 10 ml PBS-ja in dodali 7 ml tripsina. Ploščo s tripsinom smo rahlo premešali s premikanjem petrijevke po ravni površini v smeri gor-dol in levo-desno, da so se celice hitreje odlepile. Nato smo dodali enako ali večjo količino svežega gojišča s FBS-jem in celice zbrali v falkonko. Ploščo smo na koncu sprali še z 10 ml gojišča in tudi to odpipetirali v isto falkonko.

Celično suspenzijo v falkonki smo 5 minut centrifugirali (THERMO, Heareus MULTIFUGE 1S-R centrifuge) pri sobni temperaturi in pri 1500 vrt/min. Odlili smo supernatant in previdno odpipetirali še preostanek gojišča, da so na dnu falkonke ostale samo celice. Celice smo resuspendirali v 5 ml hladnega (4 °C) elektroporacijskega pufra (125 mmol/l saharoze, 10 nmol/l KHPO₄, 2.5 nmol/l KH₂PO₄, 2 mmol/l MgCl₂ x 6H₂O) in celično suspenzijo ponovno centrifugirali (1500 vrt/min, 5 min, sobna temperatura). Ponovno smo odlili supernatant in previdno odpipetirali preostanek elektroporacijskega pufra. Celice smo resuspendirali v 150-200 µl (za cca. 5–10x10⁶ celic) elektroporacijskega pufra in jih od tega koraka naprej hranili na ledu. Celice smo najprej prešteli s pomočjo hemocitometra in nato natančno izmerili volumen celične suspenzije.

Končna enačba za izračun koncentracije celic je bila naslednja:

$$C = (n/4) \times 10^4 \text{ celic/ml} \quad \dots (1)$$

Pri čemer predstavlja:

C ... koncentracija v suspenziji

n ... število prešteti celic

Ko smo s pipeto natančno izmerili še volumen celične suspenzije, smo iz števila prešteti celic po naslednji formuli izračunali, koliko EP lahko naredimo:

$$X = (n \times V) / 1000 \mu\text{l} \quad \dots (2)$$

Pri čemer predstavlja:

X ... število EP

V ... volumen celične suspenzije

Za eno EP smo potrebovali 1×10^6 celic v 40 μl . Zato smo število EP pomnožili s 40 μl in od dobljenega volumna odšteli izmerjen volumen celične suspenzije. Rezultat je bil volumen elektroporacijskega pufra, ki smo ga dodali v celično suspenzijo za pripravo suspenzije s koncentracijo 1×10^6 celic v 40 μl .

Pripravili smo si toliko mikrocentrifugirk, kolikor EP smo naredili in v vsako odpipetirali 44 μl pripravljene celične suspenzije. Mikrocentrifugirke smo hranili na ledu. Pred EP smo si pripravili in ustrezno označili še 6 cm^2 petrijevke (Corning, NY, USA) oziroma Ultra Low attachment 24-well testne plošče (Corning). Tik pred EP smo celicam v mikrocentrifugirkah dodali 11 μl ustrezne koncentracije plazmidne DNA ali fiziološko raztopino (Preglednica 5). S pipetiranjem smo dobro premešali vsebino mikrocentrifugirk in odpipetirali 50 μl med nerjaveče elektrode elektroporatorja GT-01 (Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Slovenija) z 2 mm razmakom. Parametri za izvedbo posamezne EP so bili naslednji: število pulzov ($N_i = 8$), število pulziranja ($N_s = 8$), trajanje

pulza ($T_i = 5000 \mu\text{s}$), pavza ($D_i = 199$) in napetost ($U = 120 \text{ V}$; razmerje med amplitudo in razdaljo električnega toka je bilo 600 V/cm , razmak med elektrodama 0.2 cm).

Po EP smo elektroporirano suspenzijo stresli v 6 cm^2 petrijevko in ji takoj dodali enako volumsko količino 100 % FBS ($50 \mu\text{l}$). FBS namreč poveča delež preživetja občutljivih celic po izpostavitvi električnim pulzom. Elektrodi smo pred naslednjo EP sprali v 70 % alkoholu, ju dobro obrisali s sterilno gazo in počakali, da se posušita. Po 5 minutah smo v petrijevko z elektroporirano suspenzijo in FBS-jem, dodali 5 ml gojišča. Petrijevke smo dali v inkubator na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 , za 24 ali 48 h.

Preglednica 5: Eksperimentalne skupine pri *in vitro* sistemu

Ekperimentalna skupina	Celična suspenzija in dodana snov	Elektroporacija (EP)
CTRL	44 μl celične suspenzije + 11 μl fiziološke raztopine	NE
gWiz 10	44 μl celične suspenzije + 11 μl plazmidne DNA (1 mg/mL)	NE
gWiz 20	44 μl celične suspenzije + 11 μl plazmidne DNA (2 mg/mL)	NE
gWiz 35	44 μl celične suspenzije + 11 μl plazmidne DNA (3,5 mg/mL)	NE
EP	44 μl celične suspenzije + 11 μl fiziološke raztopine	DA
EP gWiz 10	44 μl celične suspenzije + 11 μl plazmidne DNA (1 mg/mL)	DA
EP gWiz 20	44 μl celične suspenzije + 11 μl plazmidne DNA (2 mg/mL)	DA
EP gWiz 35	44 μl celične suspenzije + 11 μl plazmidne DNA (3,5 mg/mL)	DA

3.3.2 Genski elektroprenos *in vivo*

Pri *in vivo* sistemu je eksperimentalni del potekal na laboratorijskih miših linije C57BI/6 in z melanomskimi tumorji B16F10. Vsi *in vivo* poskusi so bili izvedeni na Onkološkem Inštitutu ter v skladu z dovoljenjem št. 34401-4/2012/2, ki ga je izdalo Ministrstvo za kmetijstvo in okolje Republike Slovenije. To pomeni, da sama nisem bila udeležena pri nasajanju tumorjev v podkožje in žrtvovanju omenjenih miši po genskem elektroprenosu, temveč sem pri svojem eksperimentalnem delu samo uporabila, predhodno pridobjene vzorce tumorjev za izolacijo RNA, prepis v cDNA in qPCR.

Štiri različne terapevtske skupine je sestavljalo po 5 miši (Preglednica 6). Parametri EP so bili enaki kot pri GET *in vitro*, razen napetosti ($U = 160 \text{ V}$). Poskuse so izvajalci začeli izvajati ko je premer tumorja dosegel 4 mm. V skupinah z gWiz Blank plazmidom so v tumor injicirali 50 μl plazmidne DNA s koncentracijo 2 mg/ml, tako da je vsaka miš dobila dozo 100 μg plazmidne DNA. Naredili so enkratno GET in 4 h po GET miši žrtvovali, jim izrezali tumorje ter shranili na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, do njihove nadaljne uporabe.

Preglednica 6: Ekperimentalne skupine pri *in vivo* sistemu

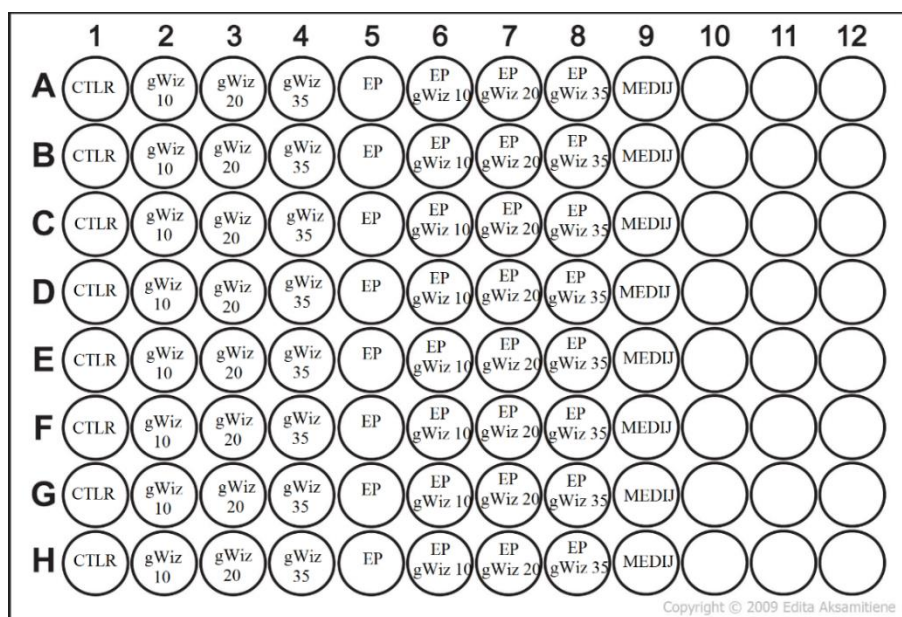
Ekperimentalna skupina	Snov injicirana v mišji tumor	Elektroporacija (EP)
CTLR	50 μl fiziološke raztopine	NE
gWiz	50 μl plazmidne DNA, gWiz Blank (2 mg/mL)	NE
EP	50 μl fiziološke raztopine	DA
EP gWiz	50 μl plazmidne DNA, gWiz Blank (2 mg/mL)	DA

3.4 TEST PROLIFERACIJE

Po GET in 24 h inkubacije celic v inkubatorju ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2) oziroma čez noč, smo si pripravili in prešteli celice pri posamezni ekperimentalni skupini (enako kot na začetku pri GET: tripsinizacija posamezne petrijevke in štetje celic s pomočjo hemocitometra). Naslednji korak je bil izračun ustreznega volumna celične suspenzije, v katerem se nahaja zahtevano število celic, ki smo jih za test proliferacije nasadili na mikrotitrsko testno ploščo s 96 vdolbinicami (96-well testno ploščo) z ravnim dnom (za test proliferacije je število celic za 6 dni: 800 celic/vdolbinico).

Pripravili smo si 8 falkonk s 3 ml gojišča (za vsako ekperimentalno skupino ena). Celično suspenzijo smo dobro premešali in ustrezen volumen suspenzije, ki je vseboval določeno število celic, prenesli v falkonko z gojiščem. S pipeto smo dobro premešali vsebino falkonke in jo nato prenesli v plastično kadičko. Vsebino kadičke smo ponovno rahlo premešali, tokrat z multikanalno pipeto (8-kanalno pipeto). Z multikanalno pipeto smo nato nanegli 100 μl celične suspenzije v posamezno vdolbinico na testni plošči. Za vsako skupino smo naredili 3 paralelke za vsak dan spremljanja proliferacije: za 2., 4. in 6. dan

(Slika 9). Torej smo nasadili po 800 celic na posamezno vdolbinico na tri mikrotitrsko plošče: za dan 0, 2 in 4, na vsako ploščo pa smo odpipetirali tudi samo medij (Slika 8). Fluorescenco medija smo namreč na koncu, pri meritvah posamezne eksperimentalne skupine odšteli, da smo dobili fluorescenco celic, ki nas zanima.



Slika 8: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami za test proliferacije (800 celic/vdolbinico) in test citotoksičnosti (1500 celic/vdolbinico)

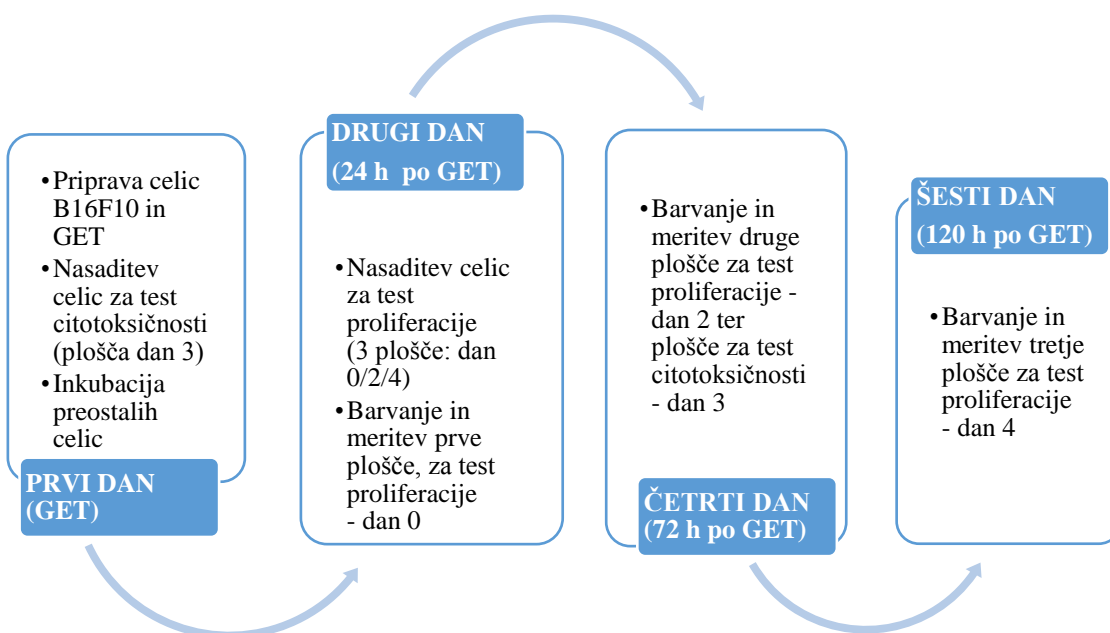
Sledila je inkubacija 2 h v inkubatorju pod že navedenimi pogoji, da so se celice pritrdile na podlago. Po 2 h smo vzeli prvo mikrotitrsko ploščo za dan 0 iz inkubatorja in v vdolbinice z multikanalno pipeto dodali 10 μ l barvila Presto Blue (Life Technologies, Carlsbad, CA). Med dodajanjem barvila smo v laminariju ugasnili luč, saj je barvilo občutljivo na svetlobo. Po barvanju smo inkubirali testno ploščo še 1,5 h v inkubatorju, nato pa smo s programom Magelan 6 – ALAMAR fluorescence bottom shaking, izmerili fluorescenco pri ekscitaciji 560 nm in emisiji 590 nm (čitalec mikroplošč Infinite 200, Tecan, Männedorf, Switzerland). Ta meritev nam je služila kot meritev v času 0. Postopek barvanja in merjenja fluorescence smo ponovili še četrty in šesti dan, za testni plošči dan 2 in dan 4.

Meritve fluorescence smo najprej obdelali s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excel. Od vsake posamezne meritve smo odšteli fluorescenco, ki jo je oddajal sam medij in

dobili fluorescenco, ki so jo oddajale posamezne ekperimentalne skupine. Vrednost te fluorescence je sorazmerna deležu viabilnih celic. Vse tretirane ekperimentalne skupine smo normalizirali na kontrolno netretirano skupino in izračunali povprečje normaliziranih vrednosti ter standardno napako posamezne skupine

3.5 TEST CITOTOKSIČNOSTI PLAZMIDA

Enako kot pri testu proliferacije smo za test citotoksičnosti plazmida na transparentno mikrotitrsko ploščo z ravnim dnom in 96 vdolbinicami (96-well ploščo), isti dan po GET nasadili predhodno elektroporirane celice. Za test citotoksičnosti plazmida smo na testno ploščo nasadili 1500 celic/vdolbinico. To testno ploščo smo inkubirali 3 dni v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂) in tretji dan (72 h po GET), enako kot pri testu proliferacije najprej dodali barvilo Presto Blue (10 µl/vdolbinico), nato pa po 1 h inkubacije, z Magellanom 6 izmerili fluorescenco ter rezultate meritev enako kot pri testu proliferacije najprej uredili v programu Microsoft Excell.



Slika 9: Shema poteka ekperimentalnega dela v *in vitro* sistemu za test proliferacije celic in test citotoksičnosti plazmida

3.6 POVEČANO IZRAŽANJE CITOSOLNIH SENZORJEV DNA IN IFN-1 β

Povečano izražanje citosolnih senzorjev DNA smo določili na nivoju mRNA tako v *in vitro* kot tudi v *in vivo* sistemu iz predhodno transfeciranih celic ter s pomočjo ustreznega izolacijskega protokola, s katerim smo najprej izolirali enovijačno celično mRNA-molekulo, ki smo jo nadalje prepisali v cDNA-molekulo. Nato smo izbrali ustrezne oligonukleotidne začetnike in prisotnost znotrajceličnih oziroma citosolnih senzorjev DNA in IFN-1 β preverili s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR).

3.6.1 Povečano izražanje citosolnih senzorjev DNA in IFN-1 β v *in vitro* sistemu

Celice mišjega melanoma B16F10 smo najprej elektroporirali (skupine celic in protokol sta bila enaka kot pri GET *in vitro* za test proliferacije in test citotoksičnosti – Preglednica 5) in jih nato inkubirali 4 h na Ultra low attachment, 24-well testni plošči (testni plošči s 24 vdolbinami) v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂). Sledila je izolacija celične RNA, ki je potekala po ustaljenem protokolu proizvajalca izolacijskega kompleta, PureLinkTM RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific).

3.6.1.1 Izolacija RNA

Preden smo začeli postopek izolacije, smo si malo centrifugo nastavili na 4 °C in si pripravili ter označili 8 falkonk, 16 "Rnase Free" mikrocentrifugirk, 8 "Spin Cartridge" mikrocentrifugirk, 16 "Collection" tubic in 8 "Recovery" tubic iz izolacijskega kompleta. Nato smo vzeli Ultra Low attachment testne plošče (testne plošče s 24 vdolbinami) s celicami iz inkubatorja, jih zbrali v falkonke in jih centrifugirali.

Medtem smo si z "Rnase away" (Life Technologies, Carlsbad, CA) temeljito očistili laminarij in celotno delovno površino, vključno s pipetami, stojali za mikrocentrifugirke, škatlami z nastavki za avtomatske pipete itd. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in usedlini celic na dnu falkonk dodali 500 μ l TRIzol® RNA Isolation Reagents (Thermo Fischer Scientific). S pipetiranjem smo dobro premešali in prenesli v prve pripravljene "Rnase Free" mikrocentrifugirke. Mikrocentrifugirke smo pustili 5 minut na sobni

temperaturi, nato pa celicam s trizolom dodali 100 µl kloroforma in jih zmešali v roki tako, da smo jih nekajkrat obrnili. Sledila je inkubacija na sobni temperaturi 2–3 minute, nato pa smo mikrocentrifugirke centrifugirali pri 12.000 x g za 15 minut pri 4 °C. Tekočina v mikrocentrifugirkah se je razplastila na 3 sloje in za nas je bil pomemben samo zgornji brezbarven sloj, saj je le ta vseboval RNA.

Zgornje sloje (približno 350-400 µl na posamezno mikrocentrifugirko) smo prenesli v sveže "Rnase Free" mikrocentrifugirke in jim dodali enak volumen 70 % etanola ter dobro premešali z vorteksiranjem. Nato smo prenesli 700 µl vsakega vzorca v "Spin Cartridge" mikrocentrifugirke, skupaj z "Collection" tubicami. Sledilo je centrifugiranje, tokrat na 12.000 x g za 15 sekund in pri sobni temperaturi (21 °C). Po centrifugi smo zavrgli kar je ostalo v "Collection" tubicah in "Spin Cartridge" mikrocentrifugirke dali nazaj v iste "Collection" tubice.

Mikrocentrifugirkam smo nato dodali 700 µl Wash Bufferja I (Thermo Fischer Scientific) in centrifugirali na 12.000 x g za 15 sekund pri sobni temperaturi. Po centrifugi smo dali "Spin Cartridge" mikrocentrifugirke na nove "Collection" tubice. Dodali smo jim 500 µl Wash Bufferja II (Thermo Fischer Scientific) z etanolom in spet centrifugirali na 12.000 x g za 15 sekund pri sobni temperaturi. Zavrgli smo kar je ostalo spodaj v "Collection" tubicah in ponovili centrifugiranje pod enakimi pogoji

Nato je sledilo še eno dodatno centrifugiranje, na 12.000 x g za 1 minuto pri sobni temperaturi, s katerim smo odstranili vso tekočino. Po končanem centrifugiranju smo premestili "Spin Cartridge" mikrocentrifugirke v "Recovery" tubice. Eluirali smo tako, da smo v center "Spin Cartridge" mikrocentrifugirk dodali 30 µl "Rnase-Free" vode in inkubirali 1 minuto na sobni temperaturi ter centrifugirali 2 minuti na 12.000 x g. Postopek smo nato ponovili še enkrat z istimi "Collection" tubicami. Izmerili smo koncentracijo (Epoch Microplate Spectrophotometer, Gene – Take 3 Session) izolirane mRNA in jo do prepisa shranili v zamrzovalnik na –80 °C.

3.6.1.2 Prepis v cDNA

Za nadaljne analize qPCR smo morali najprej izolirano enovijačno mRNA-molekulo prepisati v dvovijačno cDNA, ki je komplementarna mRNA (komplementarna DNA ali cDNA). Prepis je potekal po ustaljenem protokolu proizvajalca kompleta SuperScript[®] VILO[™] cDNA Synthesis Kit (Life Technologies), s katerim smo prepis izvedli. Z izmerjeno koncentracijo mRNA smo izračunali volumen izolirane RNA, ki je potreben pri posamezni ekperimentalni skupini za uspešen prepis (potrebujemo od 0,5 do 1,0 µg RNA).

Na ledu smo si pripravili 8 posebnih majhnih mikrocentrifugirk in jih na repkih ustrezno označili. V posamezno mikrocentrifugirko smo po protokolu najprej odpipetirali 4 µl 5x VILO Reaction Mix-a, izračunan volumen mRNA ter DEPC-vodo (do skupnega volumna 18 µl), čisto na koncu pa še 2 µl 10x SuperScript Enzyme Mix-a. Skupen volumen v posamezni mikrocentrifugirki je moral znašati 20 µl. Mikrocentrifugirke smo premešali na Spin Down centrifugi jih zložili v PCR-aparat, na program prepisovanja cDNA. Reakcija prepisovanja, mikrocentrifugirke najprej inkubira 10 minut na 25 °C, sledi 60 minut na 42 °C ter konča reakcijo 5 minut na 85 °C. Prepisano celično cDNA smo po končanem prepisu do nadaljnih analiz shranili v zmrzovalniku na -20°C.

3.6.1.3 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR)

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) je nadgradnja klasične PCR metode pomnoževanja genov, ki omogoča natančno kvantifikacijo specifičnih nukleinskih kislin v kompleksni mešanici tudi v primeru zelo nizkih koncentracij izhodiščnega materiala (Fraga in sod., 2008). Ta visoko občutljiva tehnika je postala pomembna metoda na številni področjih raziskav: pri študijah genske regulacije in izražanja tumorskih markerjev v tumorskih celicah, pri spremljanju odgovorov rakavih celic na zdravljenje s kemoterapijo ter tudi pri ocenitvi molekularne stopnje določenega tumorja (Demes in sod., 2012).

Princip qPCR temelji na sprotnem določanju in vizualizaciji pomnoženega dela nukleinske kisline na podlagi fluorescence in zanj ne potrebujemo detekcije produkta na agaroznem gelu kot pri klasičnem PCR-ju. Za detekcijo produkta pri qPCR se uporabljata dve metodi,

ki omogočata meritev količine produkta. Prva temelji na fluorescenčnem barvilu (nespecifična detekcija), druga pa na fluorescenčni sondi (specifična detekcija) (Arya in sod., 2005).

Metoda z uporabo barvila (najpogosteje SYBR Green-a), ki smo jo uporabili tudi v naši raziskovalni nalogi, temelji na vezavi barvila v DNA-molekule, ki nastanejo med samo PCR reakcijo. Barvila so nespecifična in se vežejo na vse dvovijačne molekule ter s tem povzročijo emitiranje fluorescence. To nam omogoča določitev začetne koncentracije DNA v vzorcu. Pomankljivost barvila SYBR Green je nespecifična vezava v dvojno vijačnico, zaradi česar lahko poleg specifičnih produktov zaznamo tudi nespecifične produkte in dimere začetnih oligonukleotidov (Arya in sod, 2005). qPCR torej temelji na spremljanju fluorescentnega signala, kjer je jakost signala sorazmerna s količino produkta. Signal meri PCR-aparat (termocikler), ki detektira fluorescenco in je povezan z računalnikom in s programsko opremo (Applied Biosystems 7300 System Software) s pomočjo katere lahko detektiramo rezultate in jih tudi analiziramo.

Poznamo absolutno in relativno kvantifikacijo rezultatov qPCR. Z absolutno kvantifikacijo izmerimo količino izražene tarčne sekvence bodisi kot število kopij bodisi kot koncentracijo nukleinske kisline v vzorcu, za kar potrebujemo standardno umeritveno krivuljo. Pri relativni kvantifikaciji pa dobimo relativne vrednosti izražene kot razmerja začetnih količin tarčnih sekvenc med kontrolnimi in tretiranimi skupinami, normalizirane na nek notranji standard kot je na primer izražanje referenčnega gena. Referenčni gen služi kot notranja referenca med različnimi vzorci in pomaga normalizirati eksperimentalno napako (Fraga in sod., 2008).

Preglednica 7: Primerji/začetni nukleotidi uporabljeni pri qPCR

PRIMER	IZPISANO IME PRIMERJA	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE ZAČETNEGA OLIGONUKLEOTIDA (5' → 3')
Tarčni:		
RIG-1	Retinojska kislina inducirajoč gen 1	F: GCT GCC ATG CAG AGT GAT TGG AAA R: ACT CTT GGC CAC ACA GCT GTA GAA
DDX-60	DexD/H-box polipeptid 60	F: ACT GGA ACA CTC GCT TTG G R: GAA GTA GAC ATC ACC CAA CAG G
IFN-1 β	Interferon 1 beta	F: / R: AGA AAC ACT GTC TGC TGG TGA AGT
Referenčni:		
BA	Beta aktin	F: GAA GTG TGA CGT TGA CAT CC R: ACT CAT CGT ACT CCT GCT TG
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza	F: TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC R: GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA

* F (vodilni začetni nukleotidi oziroma nukleotidno zaporedje *forward*), R (povratni začetni nukleotidi oziroma nukleotidno zaporedje *reverse*)

V naši raziskovalni nalogi smo količino DNA določili z relativno kvantifikacijo in s pomočjo Power SYBR Master Mix-a (Applied Biosystems). Za analize qPCR smo si najprej pripravili testno ploščo s 96 vdolbinicami. Vzorce (cDNA) smo predhodno 10-krat redčili (54 μ l DEPC-vode + 6 μ l vzorca) ter vse skupaj postavili v hladne kadičke. Sledila je priprava mešanice barvila in oligonukleotidnih začetnikov (primerjev).

Primerje smo si pripravili tako, da smo v posamezno mikrocentrifugirko najprej odpipetirali 4,6 μ l H₂O, dodali 10 μ l Sybr green-a in 0,4 μ l primer mix-a (v katerem je bil že par primerjev, forward in reverse primer). Označeno testno ploščo s 96 vdolbinicami smo postavili v hladno kadičko in v posamezno vdolbinico odpipetirali 5 μ l redčenega vzorčka in 15 μ l prej pripravljene mešanice. Posamezni vzorec ekperimentalne skupine smo na ploščo nanesti v dveh paralelkah (I. In II.). V posebej označene vdolbinice smo odpipetirali tudi samo 15 μ l mešanice barvila in oligonukleotidnih začetnikov, to so bile tako imenovane NTC vdolbinice na testni plošči (angl. *Non template control*), da smo preverili, da primerji ne dimerizirajo in s tem vežejo barvilo (Slika 10). Pripravljeno ploščo smo na koncu prelepili s folijo ter jo odnesli v PCR-aparaturu. PCR smo izvedli s 7300-System (Applied Biosystems). Protokol reakcije je bil sledeč: 10 minut na 95 °C (začetna

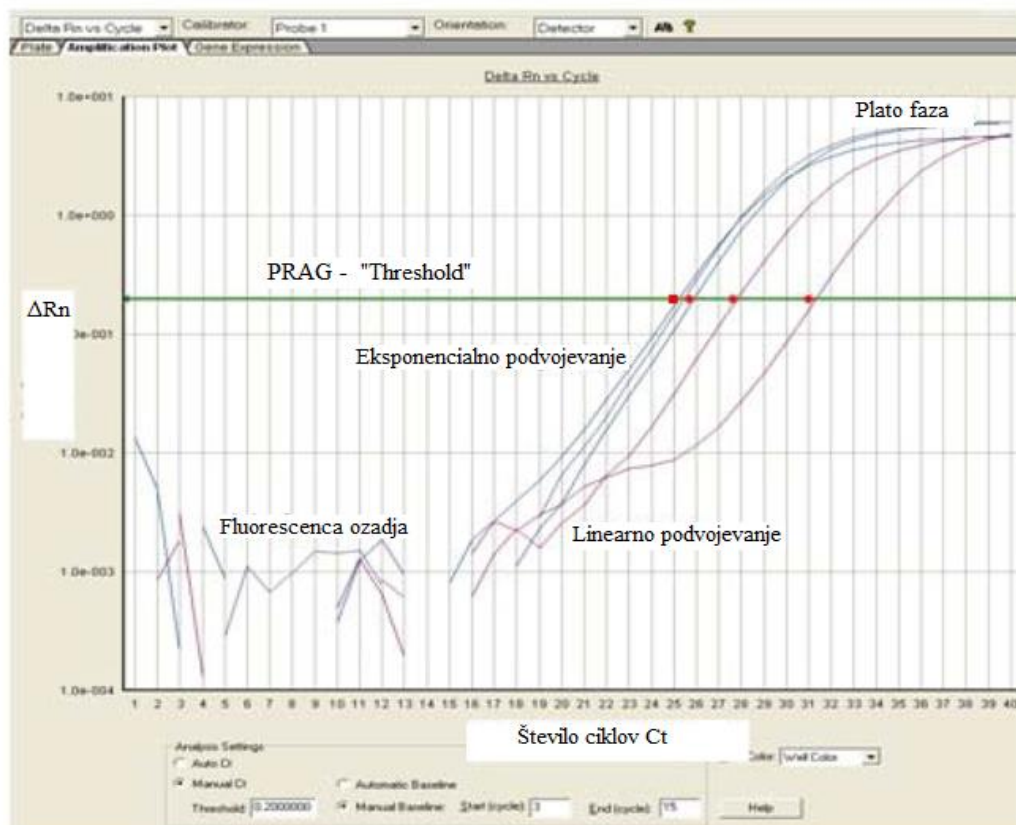
denaturacija) ter 40 ciklov: 15 sekund na 95 °C (denaturacija) in 1 minuta na 60 °C (prileganje in raztezanje ter branje fluorescence).

DDX-60	RIG-1	IFN-1 β	BA	GADPH	DDX-60	RIG-1	IFN-1 β	BA	GADPH	NTC	
CTLR (I)	CTLR (I)	CTLR (I)	CTLR (I)	CTLR (I)	EP (I)	EP (I)	EP (I)	EP (I)	EP (I)		DDX-60
CTLR (II)	CTLR (II)	CTLR (II)	CTLR (II)	CTLR (II)	EP (II)	EP (II)	EP (II)	EP (II)	EP (II)		RIG-1
gWiz 10 (I)	gWiz 10 (I)	gWiz 10 (I)	gWiz 10 (I)	gWiz 10 (I)	EP gWiz 10 (I)	EP gWiz 10 (I)	EP gWiz 10 (I)	EP gWiz 10 (I)	EP gWiz 10 (I)		IFN-1 β
gWiz 10 (II)	gWiz 10 (II)	gWiz 10 (II)	gWiz 10 (II)	gWiz 10 (II)	EP gWiz 10 (II)	EP gWiz 10 (II)	EP gWiz 10 (II)	EP gWiz 10 (II)	EP gWiz 10 (II)		BA
gWiz 20 (I)	gWiz 20 (I)	gWiz 20 (I)	gWiz 20 (I)	gWiz 20 (I)	EP gWiz 20 (I)	EP gWiz 20 (I)	EP gWiz 20 (I)	EP gWiz 20 (I)	EP gWiz 20 (I)		GADPH
gWiz 20 (II)	gWiz 20 (II)	gWiz 20 (II)	gWiz 20 (II)	gWiz 20 (II)	EP gWiz 20 (II)	EP gWiz 20 (II)	EP gWiz 20 (II)	EP gWiz 20 (II)	EP gWiz 20 (II)		
gWiz 35 (I)	gWiz 35 (I)	gWiz 35 (I)	gWiz 35 (I)	gWiz 35 (I)	EP gWiz 35 (I)	EP gWiz 35 (I)	EP gWiz 35 (I)	EP gWiz 35 (I)	EP gWiz 35 (I)		
gWiz 35 (II)	gWiz 35 (II)	gWiz 35 (II)	gWiz 35 (II)	gWiz 35 (II)	EP gWiz 35 (II)	EP gWiz 35 (II)	EP gWiz 35 (II)	EP gWiz 35 (II)	EP gWiz 35 (II)		

Copyright © 2009 Edita Aksamitiene

Slika 10: Shema testne plošče s 96 vdolbincami za qPCR

Na začetku reakcije qPCR, količina produkta raste eksponentialno. V čisto prvih ciklih gre za zelo majhne količine produkta, zato povečanja fluorescence ne moremo detektirati kljub eksponentialni rasti produkta, saj prevlada fluorescence ozadja. Cikel, v katerem količina produkta naraste dovolj, da signal lahko detektiramo, imenujemo "threshold" cikel in ga označimo s C_T . To je tako imenovani prazni cikel. Vrednost C_T za posamezno reakcijo je odvisna od količine DNA, ki je prisotna na začetku reakcije. Gen, ki je manj izražen, bo imel višjo C_T vrednost v primerjavi z bolj izraženim genom in obratno. Vsak posamezni cikel reakcije je sestavljen iz treh faz: denaturacije, pripenjanja oligonukleotidnih začetnikov in polimerizacije.



Slika 11: Sigmoidno oblikovan diagram produktov qPCR. ΔR_n prikazuje magnitudo intenzivnosti fluorescenčnega signala, negativna vrednost R_n je fluorescenca za PCR brez vzorca (NTC), pozitivna vrednost R_n pa je razmerje med intenziteto FAM fluorescence in intenziteto fluorescence barvila (povzeto po Demes in sod., 2012)

Vrednosti C_T smo gledali med 8 in 35 ciklom. C_T vrednosti merjenega oziroma tarčnega gena (*DDX-60*, *RIG-1*, *IFN-1 β*) smo primerjali s C_T vrednostjo primerjalnega oziroma referenčnega gena (*BA*, *GAPDH*). Za referenčne gene je značilno, da imajo skorajda nespremenjeno raven izražanja v različnih fizioloških ali patofitoloških stanjih. Razlike med izražanjem tarčnega in referenčnega gena smo označili kot ΔC_T . $\Delta \Delta C_T$ pa pove, ali je tarčni gen bolj (ali manj) izražen v tumorskih celicah ali v tkivu v primerjavi z normalnimi.

Podatke pridobljene z meritvami qPCR oziroma ko smo določili vse C_T vrednosti tarčnih in referenčnih genov, smo najprej uredili v programu Microsoft Excell, in sicer po tako imenovani Livak-ovi metodi ali metodi $2^{-\Delta \Delta C_T}$. Dobljene vrednosti smo najprej preračunali za vsak vzorec (ΔC_T vzorca):

$$\Delta C_{t\text{vzorec}} = C_{t\text{tarčni}} - C_{t\text{referenčni}} \quad \dots (3)$$

Dobljene ΔC_t vrednosti za vzorec smo normalizirali na kontrolno skupino:

$$\Delta \Delta C_{t\text{vzorec}} = \Delta C_{t\text{vzorec}} - \Delta C_{t\text{kontrola}} \quad \dots (4)$$

Nato pa smo izračunali nivo ekspresije:

$$2^{-\Delta \Delta C_t} = \text{normaliziran nivo ekspresije} \quad \dots (5)$$

Ta rezultat nam pove zvišanje ali znižanje genske ekspresije tarčnega gena glede na kontrolno skupino in normalizirano na referenčni gen. Rezultat je povsem neodvisen od količine vzorca oz. celic v vzorcu.

3.6.2 Povečano izražanje citosolnih senzorjev DNA in IFN-1 β v *in vivo* sistemu

Zamrznjene in predhodno pridobljene melanomske tumorje smo najprej odmrznili in strli v tekočem dušiku, da so bili primerni za nadaljno izolacijo. Izolacijo RNA smo izvedli po ustaljenem protokolu proizvajalca izolacijskega kompleta PureLinkTM RNA Mini Kit.

3.6.2.1 Izolacija mRNA

Postopek smo izvedli enako kot v točki 3.6.1.1. Edina razlika je bila, da smo namesto 500 μ l Trizola odpipetirali 1000 μ l Trizola in posledično čez 5 minut dodali 200 μ l kloroforma.

3.6.2.2 Prepis v cDNA in qPCR

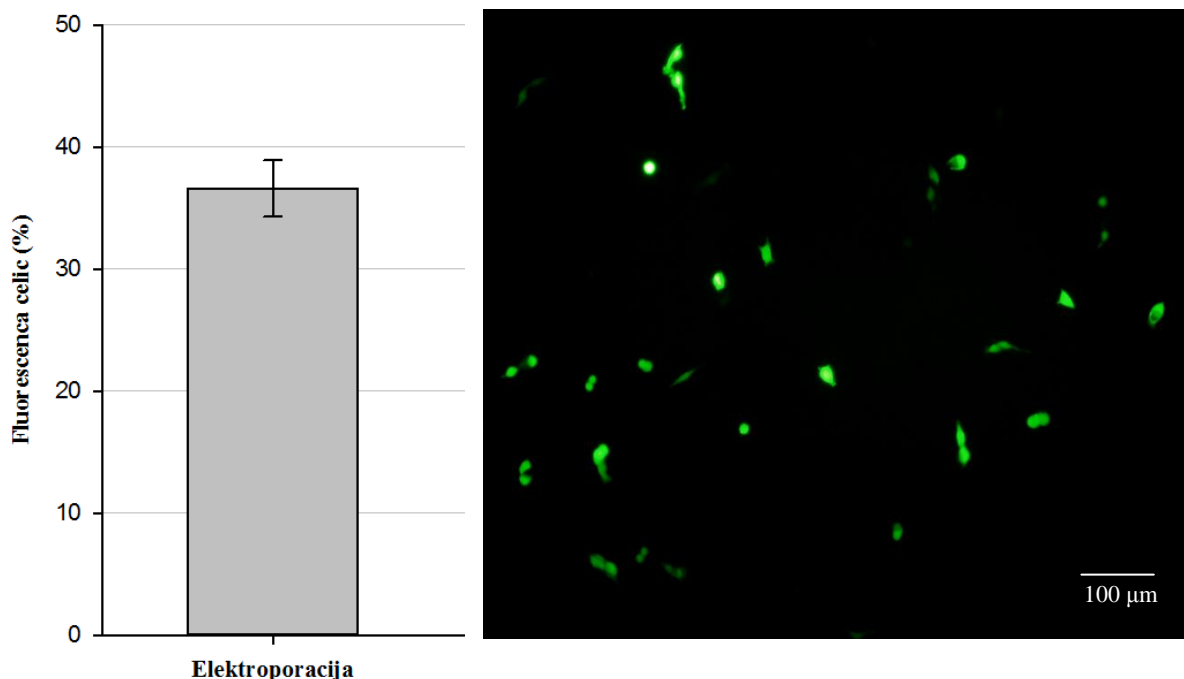
Izolirano mRNA smo prepisali v cDNA po ustaljenem protokolu proizvajalca kompleta SuperScript[®] VILOTM cDNA Synthesis Kit, ki je bil poponoma enak že opisanemu postopku prepisa *in vitro* v točki 3.6.1.2.

3.7 STATISTIČNE ANALIZE

Razlike med ekperimentalnimi skupinami smo statistično ocenili z enosmerno analizo variance (One Way ANOVA) ter Holm – Sidakovim testom za množično primerjavo. Za statistične analize smo uporabili Sigma Plot Software (Systat Software, Chicago, USA), s katerim smo vse rezultate tudi grafično predstavili.

4 REZULTATI

4.1 DELEŽ TRANSFEKCIJE CELIC V *IN VITRO* SISTEMU

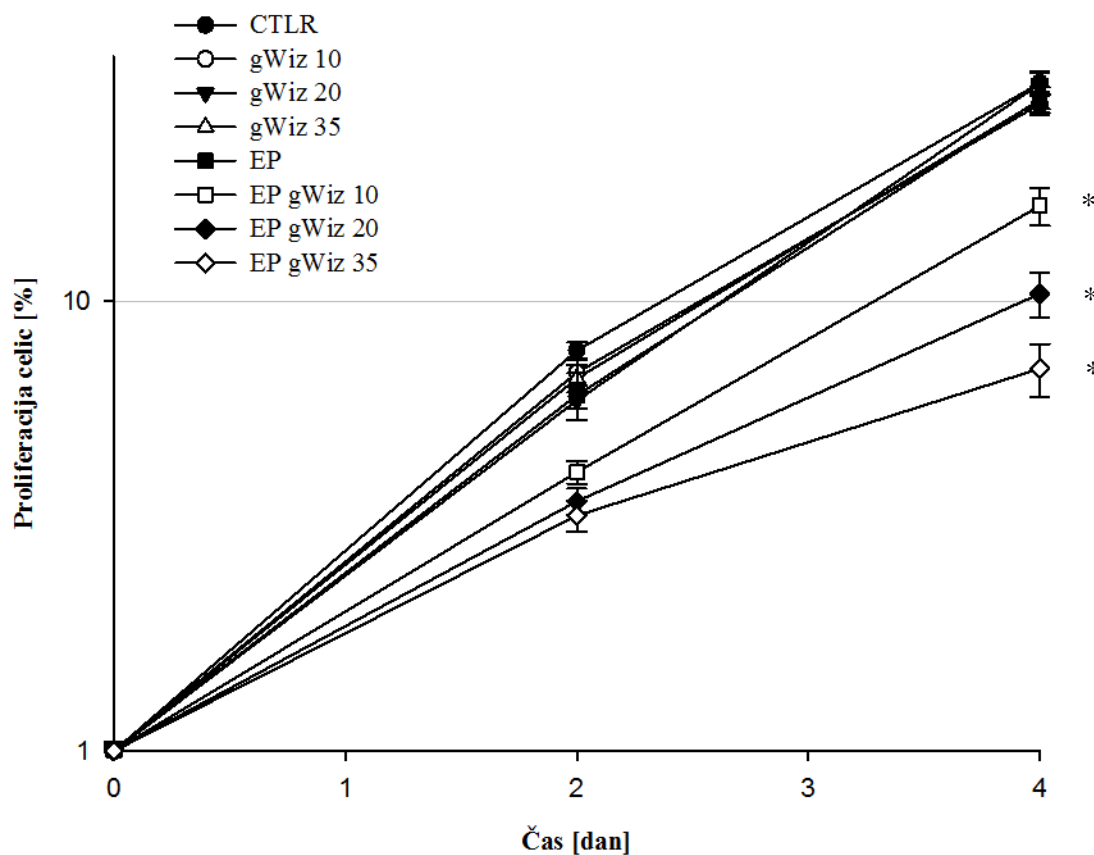


Slika 12: Stolpični diagram deleža transfeciranih celic mišjega melanoma B16F10 po genskem elektroprenosu plazmida GFP (angl. *Green fluorescence protein*) v *in vitro* sistemu (levo) in fluorescirajoče celice mišjega melanoma B16F10 pod mikroskopom (desno). Delež transfekcije celic: $36,6 \pm 2,3$ %

Rezultati eksperimentalnega dela na Onkološkem Inštitutu, na Oddelku za eksperimentalno onkologijo v *in vitro* sistemu kažejo, da je po genskem elektroprenosu plazmidne DNA (zelenega fluorescirajočega plazmida, GFP-ja), v melanomske celice B16F10, uspešno transfeciranih približno 40 % vseh celic. Za primerjavo, Čemažar in sod., 2002 navajajo, da je delež transfekcije tumorskih celic, z genskim elektroprenosom plazmidne DNA v *in vivo* sistemu, približno 4 %.

4.2 TEST PROLIFERACIJE

S testom proliferacije smo spremljali viabilnost celic v časovnem okviru 4-ih dni. Delež viabilnih celic posamezne eksperimentalne skupine, smo v vsaki časovni točki normalizirali na čas 0 vsake izmed eksperimentalnih skupin. Rezultati testa proliferacije so predstavljeni v obliki proliferacijskih krivulj s standardnimi napakami in predstavljajo delež preživetja celic v odvisnosti od časa.

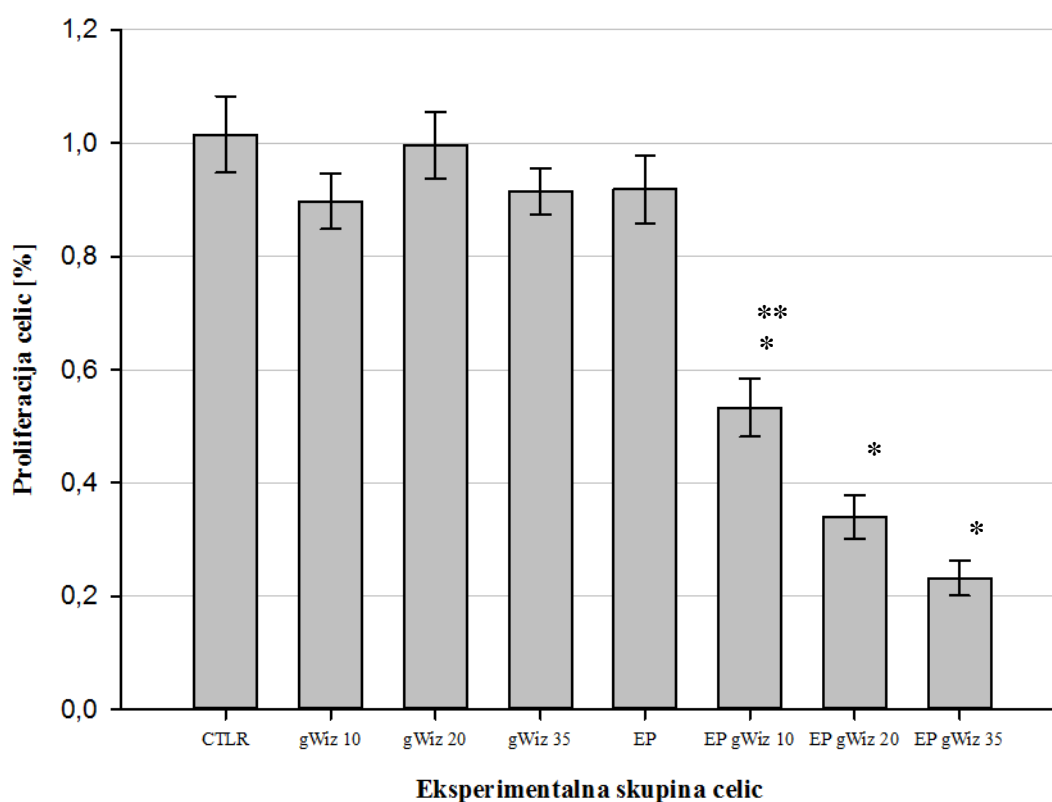


Slika 13: Proliferacijske krivulje B16F10 celic s standardnimi napakami. Med kontrolnimi skupinami brez elektroporacije, EP, ni statistično signifikantnih razlik, medtem ko se vse proliferacijske krivulje, kjer smo kombinirali plazmid s pulzi, signifikantno razlikujejo od same elektroporacije. * prikazuje statistično signifikantno razliko elektroporiranih skupin z vneseni plazmidom od elektroporirane skupine (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$)

S testom proliferacije celic smo ugotovili zmanjšano proliferacijo melanomskih celic B16F10 v odvisnosti od koncentracije vnesenega plazmida gWiz Blank po GET (Slika 13). Drugi dan ni bilo razlik med kontrolnimi in elektroporiranimi skupinami. Četrty dan se

proliferacijske krivulje kontrolne skupine in plazmidnih skupin statistično ne razlikujejo, medtem ko je proliferacija skupin, kjer smo kombinirali plazmid s pulzi, zmanjšana ter pada v odvisnosti od koncentracije vnesenega plazmida.

Rezultate testa proliferacije izmerjene na četrti dan, smo v nadaljevanju še posebej normalizirali na povprečje kontrolne skupine istega dne. Dobljeni rezultati so prikazani v obliki stolpičnega diagrama s standardnimi napakami (Slika 14).



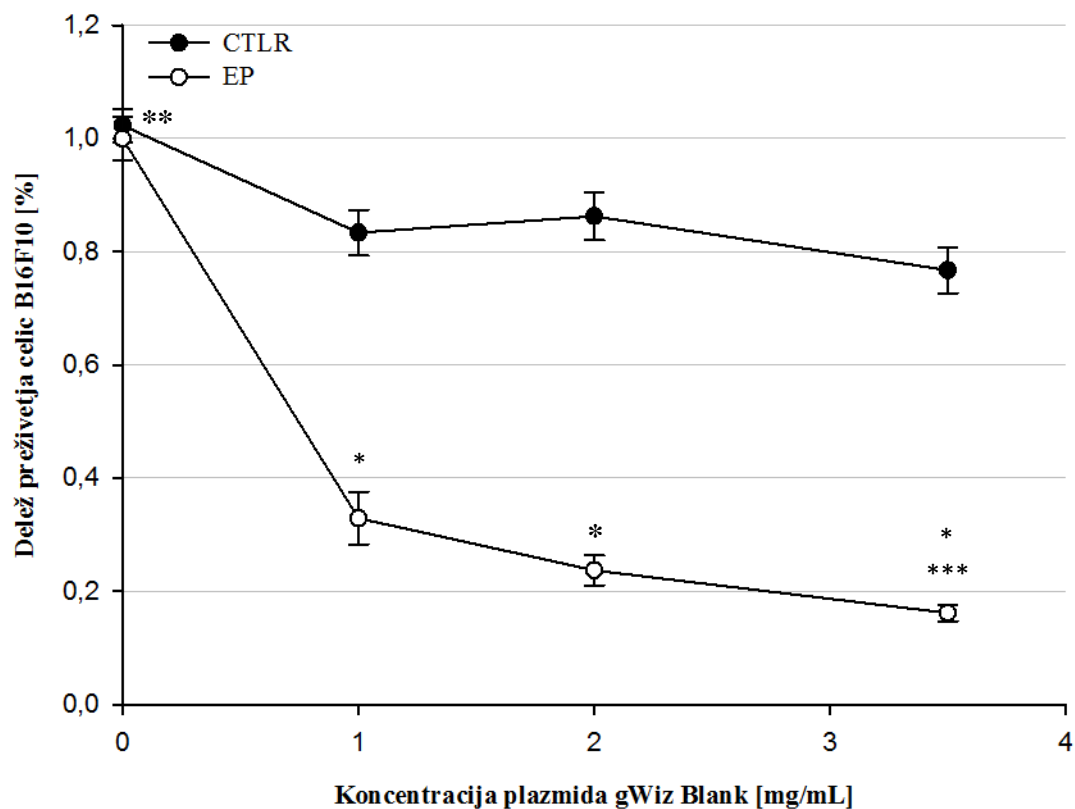
Slika 14: Stolpični diagram proliferacije celic B16F10 s standardnimi napakami za dan 4. * prikazuje statistično signifikantno razliko skupin EP gWiz 10, EP gWiz 20 in EP gWiz 35 od vseh ostalih skupin (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$). ** prikazuje statistično signifikantno razliko med skupinama EP gWiz 10 in EP gWiz 35 (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$)

Stolpični diagram proliferacije celic na četrti dan prikaže padajoče vrednosti deleža preživetja celic pri eksperimentalnih skupinah, kjer smo vnašali različne koncentracije plazmida v kombinaciji z metodo elektroporacije. Deleži preživetja celic kontrolne skupine, plazmidnih skupin in elektroporirane skupine, se med seboj bistveno ne razlikujejo.

Kombinacija plazmidne DNA in pulzov močno zmanjša preživetje celic, kar za 50–75 %, odvisno od koncentracije vnesenega plazmida. Najmanjši delež preživetja celic je zabeležen pri skupini z največjo vneseno koncentracijo plazmida gWiz Blank, v kombinaciji z elektroporacijo, EP gWiz 35, ki je statistično signifikantno različna. Statistično različna sta tudi deleža preživetja celic pri ostalih dveh elektroporiranih skupinah z vnesenima nižjima koncentracijama plazmida, EP gWiz 20 in EP gWiz 10. Medtem ko med skupinama EP gWiz 10 in EP gWiz 20 ter EP gWiz 20 in EP gWiz 35 ne opazimo statistično signifikantne razlike, je le-ta prisotna med skupinama EP gWiz 10 in EP gWiz 35.

4.3 TEST CITOTOKSIČNOSTI PLAZMIDA

S testom citosoksičnosti plazmida gWiz Blank smo spremljali viabilnost celic v časovnem okviru treh dni. Delež viabilnih celic posamezne eksperimentalne skupine smo normalizirali na kontrolno eksperimentalno skupino. Torej plazmidne skupine smo normalizirali na kontrolno skupino, CTRLR, elektroporirane skupine z vnesenim plazmidom pa na elektroporirano skupino brez plazmida, EP. Rezultati testa citotoksičnosti so predstavljeni v obliki krivulje preživetja celic v odvisnosti od koncentracije plazmida (Slika 15).



Slika 15: Krivulji preživetja celic ob dodatku plazmida gWiz Blank s standardnimi napakami, brez ali v kombinaciji s pulzi. * prikazuje statistično signifikantno razliko elektroporiranih eksperimentalnih skupin z vnesenim plazmidom od vseh ostalih skupin (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$). ** prikazuje statistično signifikantno razliko kontrolne skupine od plazmidnih skupin ter elektroporirane skupine od elektroporiranih skupin z vnesenim plazmidom ((Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$). *** prikazuje statistično signifikantno razliko skupine EP gWiz 35 od EP gWiz 10 (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$)

Plazmid gWiz Blank se je s testom citotoksičnosti izkazal za bolj toksičnega v kombinaciji z metodo elektroporacije. Razlika med citotoksičnostjo plazmida pri plazmidnih in elektroporiranih eksperimentalnih skupinah, je 3–4 kratna. S krivulje citotoksičnosti plazmida, je razvidna 3-krat večja toksičnost plazmida v kombinaciji z elektroporacijo od plazmidnih skupin, saj je delež preživetja celic pri plazmidnih skupinah 3-krat večji kot pri elektroporiranih skupinah z vnesenim plazmidom. Pri elektroporirani eksperimentalni skupini z najvišjo koncentracijo vnesenega plazmida, EP gWiz 35, je delež preživetja celic kar 4-krat nižji od plazmidne skupine z vneseno enako koncentracijo plazmida, gWiz 35.

Opazen je močno zmanjšan delež preživetja celic v odvisnosti od koncentracije plazmida pri kombinaciji z metodo elektroporacije, medtem ko deleži preživetja celic plazmidnih skupin ne padajo oziroma upadejo le za malenkost. Elektroporirane skupine z različnimi vnesenimi koncentracijami plazmidov so statistično signifikantno različne od kontrolne skupine, plazmidnih skupin in tudi od elektroporirane skupine brez vnesenega plazmida. Statistični program je izračunal tudi statistično signifikantne razlike med elektroporiranimi in plazmidnimi skupinami. Kontrolna skupina je signifikantno različna od vseh plazmidnih, elektroporirana pa od vseh preostalih elektroporiranih skupin z vnesenim plazmidom. Prav tako je elektroporirana skupina z najvišjo koncentracijo plazmida, EP gWiz 35, signifikantno različna od elektroporirane skupine z najnižjo koncentracijo vnesenega plazmida, EP gWiz 10.

4.4 CITOSOLNI SENZORJI DNA IN IFN-1 β V *IN VITRO* SISTEMU

V *in vitro* sistemu nas je zanimalo povečanje izražanja dveh citosolnih senzorja DNA (RIG-1 in DDX-60) in interferonski imunski odgovor oziroma povečanje izražanja citokina, IFN-1 β . Z meritvami qPCR in statistično obdelavo podatkov smo določili faktorje povišanega izražanja (FPI) za vsak posamezni citosolni senzor ter IFN-1 β pri kontrolnih ter ostalih eksperimentalnih skupinah.

Preglednica 8: Faktorji povišanega izražanja citosolnih senzorjev DNA in IFN-1 β pri eksperimentalnih skupinah, v *in vitro* sistemu

	DDX-60		RIG-1		IFN-1 β	
	FPI \pm SE	N	FPI \pm SE	N	FPI \pm SE	N
CTRL	1.0 \pm 0.1	9	NZ	2	1.2 \pm 0.2	9
gWiz 10	1.3 \pm 0.8	5	NZ	2	3.8 \pm 2.6	5
gWiz 20	1.4 \pm 0.6	7	NZ	2	1.4 \pm 0.9	6
gWiz 35	2.6 \pm 1.1	7	NZ	2	5.4 \pm 2.8	6
EP	1.0 \pm 0.5	8	NZ	2	6.4 \pm 4.1	6
EP gWiz 10	11.2 \pm 6.3	4	NZ	2	109.3 \pm 17.0 ***	4
EP gWiz 20	6.9 \pm 1.9 *	8	NZ	2	71.8 \pm 24.3 +	7
EP gWiz 35	37.6 \pm 17.7 **	5	NZ	2	123.3 \pm 57.0 ***	5

Vrednosti predstavljajo faktorje povišanega izražanja (FPI) s standardno napako (SE). N pomeni velikost vzorca. NZ pomeni, da izražanje senzorja ni bilo zaznano. * predstavlja statistično signifikantno razliko skupine EP gWiz 20 od CTRL, gWiz 20 in EP pri citosolnem senzorju DDX-60 (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$). ** predstavlja statistično signifikantno razliko skupin EP gWiz 35 od vseh ostalih skupin pri citosolnem senzorju DDX-60 (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$). *** predstavlja statistično signifikantno razliko skupin EP gWiz 10 in EP gWiz 35 od CTRL, gWiz 10, gWiz 20, gWiz 35 in EP pri citokinu IFN-1 β (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$). + predstavlja statistično sigfnifikantno razliko skupine EP gWiz 20 od EP gWiz 35 pri IFN-1 β (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$)

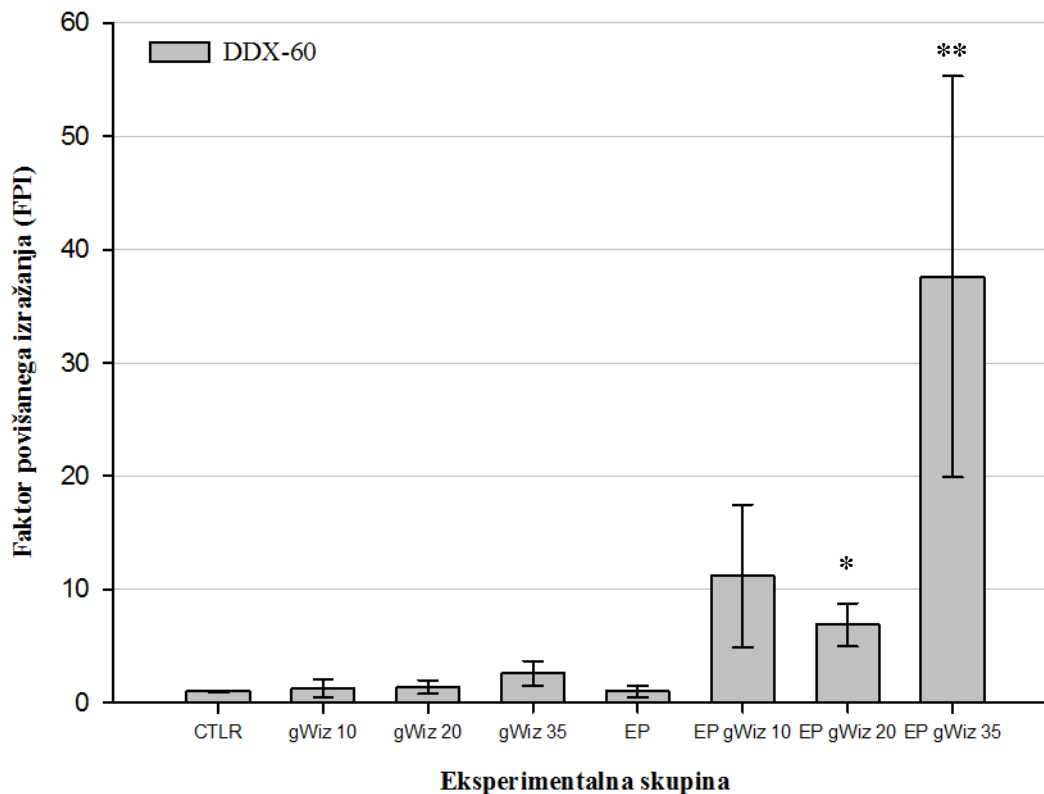
Pri spremljanju izražanj citosolnih senzorjev DNA in IFN-1 β v melanomskih celicah *in vitro* so rezultati pokazali, da se citosolni senzor RIG-1 v samih celicah ne izraža, zato tudi njegovega povečanega izražanja nismo zaznali. Citosolni senzor DDX-60 in citokin IFN-

1 β pa se oba izražata že v samih tumorskih celicah, po GET s plazmidno DNA pa se njuno izražanje močno poveča.

Faktorji povišanega izražanja senzorja DDX-60 in citokina IFN-1 β so pri elektroporiranih skupinah višji kot pri kontrolnih in plazmidnih skupinah. Pri senzorju DDX-60 je povečanje izražanja opazno pri vseh elektroporiranih skupinah z vnesenim plazmidom, elektroporirana skupina z vneseno najvišjo koncentracijo plazmida, EP gWiz 35, pa je tudi statistično signifikantno različna od vseh ostalih eksperimentalnih skupin. Prav tako je pri DDX-60 statistično signifikantna skupina EP gWiz 20, ki se razlikuje od kontrolne, CTRLR, elektroporirane, EP in plazmidne skupine z vneseno enako koncentracijo plazmida, gWiz 20.

Pri IFN-1 β so povečanja izražanj mnogo intenzivnejša kot pri citosolnem senzorju DDX-60. Vrednosti FPI so že pri plazmidnih skupinah za malenkost večje kot pri senzorju DDX-60, pri elektroporiranih skupinah pa je povečanje izražanja IFN-1 β še višje. V primerjavi z DDX-60 je povečanje pri citokinu vsaj 3-kratno pri skupini EP gWiz 35 oziroma celo 10-kratno, pri skupini EP gWiz 20. Elektroporirani skupini z najnižjo in najvišjo koncentracijo plazmida, EP gWiz 10 ter EP gWiz 35, sta pri IFN-1 β statistično signifikantno različni od kontrolne, elektroporirane skupine in plazmidnih skupin. Prav tako sta skupini EP gWiz 20 in EP gWiz 35 med seboj statistično različni. Največje povečanje izražanja je tako pri senzorju kot pri citokinu, zabeleženo pri elektroporirani skupini z vneseno najvišjo koncentracijo plazmida.

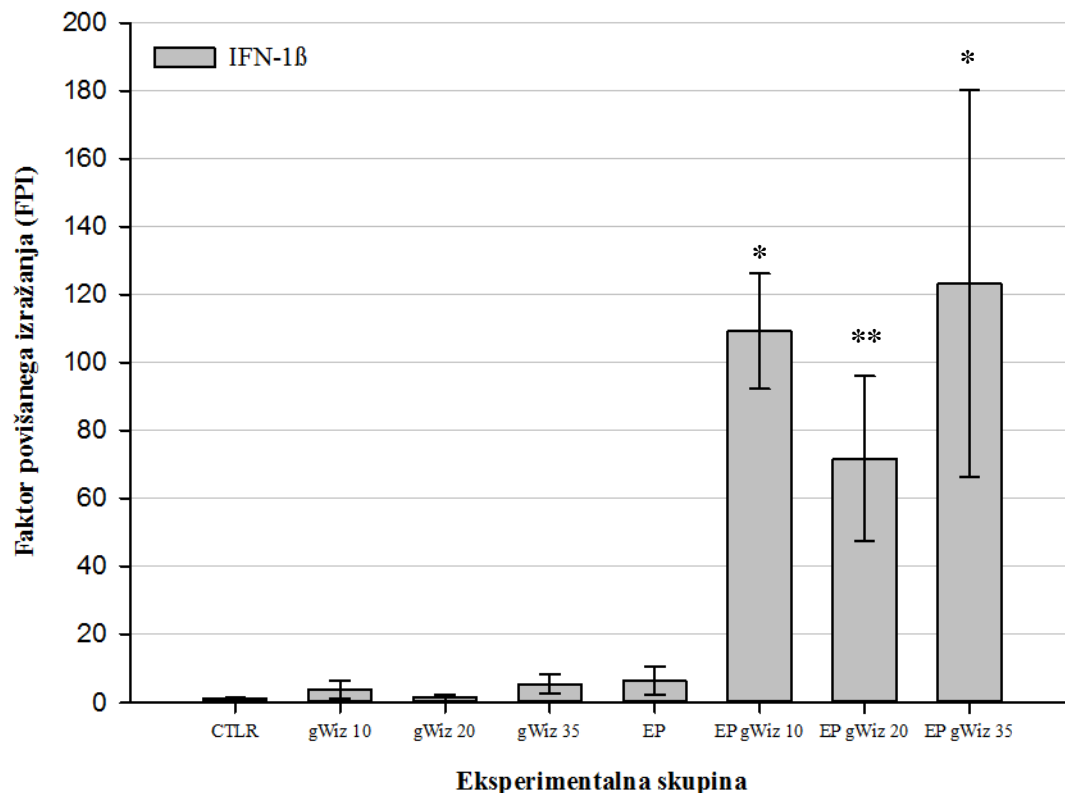
4.4.1 Faktor povišanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60 (*in vitro*)



Slika 16: Stolpčni diagram povečanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60 (*in vitro*), pri posameznih ekperimentalnih skupinah s standardnimi napakami. * predstavlja statistično signifikantno razliko skupine EP gWiz 20 od CTRL, gWiz 20 in EP (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$). ** predstavlja statistično signifikantno razliko skupin EP gWiz 35 od vseh ostalih skupin (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$)

Citosolni senzor DDX-60 je dosegel največji faktor povišanega izražanja pri elektroporirani skupini z najvišjo koncentracijo plazmida, EP gWiz 35, ki je statistično signifikantna glede na vse ostale ekperimentalne skupine. Najmanjše povečanje izražanja je bilo zabeleženo pri kontrolni in plazmidnih skupinah ter pri elektroporirani skupini brez dodanega plazmida, EP. Vrednosti FPI omenjenih skupin so si med seboj zelo podobne in med njimi ni večjega odstopanja. Zanimivo je, da je povečanje izražanja DDX-60 pri elektroporirani skupini brez vnesenega plazmida, EP povsem primerljivo s povečanjem izražanja pri kontrolni ter plazmidnih skupinah.

4.4.2 Faktor povišanega izražanja citokina IFN-1 β (*in vitro*)

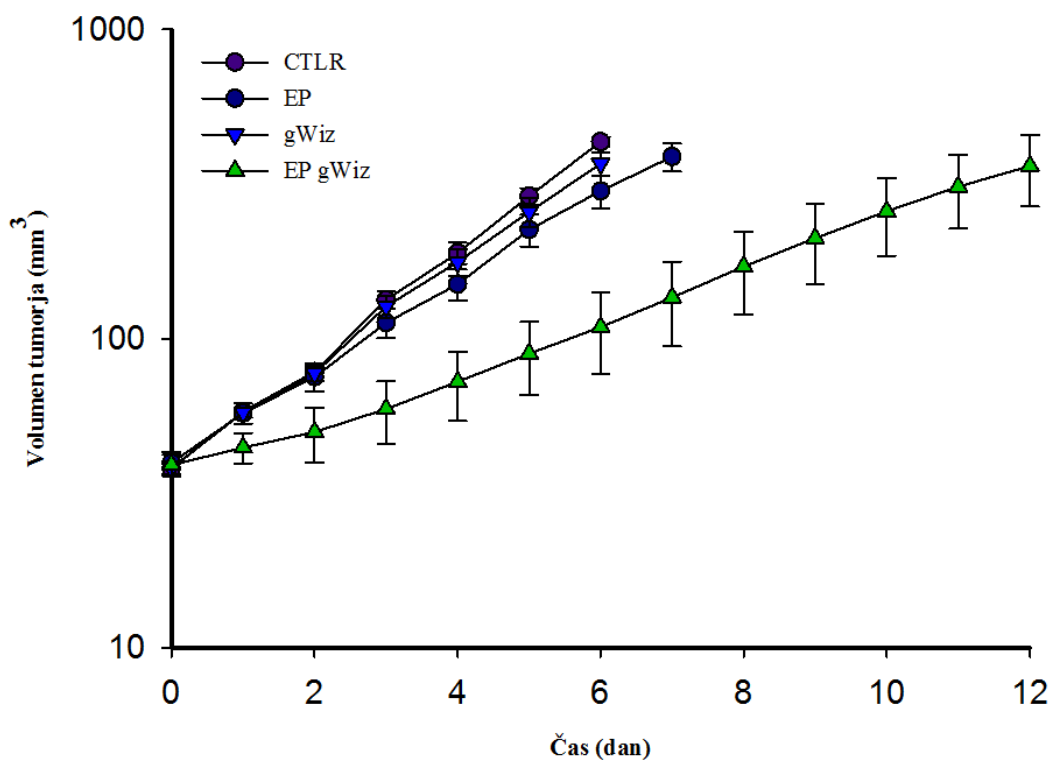


Slika 17: Stolpični diagram povečanega izražanja citokina IFN-1 β (*in vitro*), pri posameznih ekperimentalnih skupinah s standardnimi napakami. * predstavlja statistično signifikantno razliko skupin EP gWiz 10 in EP gWiz 35 od CTRL, gWiz 10, gWiz 20, gWiz 35 in EP (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$). ** predstavlja statistično sifnifikantno razliko skupine EP gWiz 20 od EP gWiz 35 (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$)

Citokin IFN-1 β je v *in vitro* sistemu pri kontrolni, elektroporirani in pri plazmidnih skupinah povečal svoje izražanje v zelo majhni meri oziroma skoraj nič. Povečanje izražanja je pri elektroporiranih skupinah z vnesenim plazmidom, mnogo večje kot pri ostalih skupinah. Največje povečanje izražanja IFN-1 β je zabeleženo pri elektroporirani skupini z najvišjo koncentracijo vnesenega plazmida, EP gWiz 35, vendar pa le-to ni statistično signifikantno različno od povečanja izražanja IFN-1 β pri skupinah EP gWiz 10 in EP gWiz 20.

4.5 CITOSOLNI SENZORJI DNA IN IFN-1 β V *IN VIVO* SISTEMU

Rezultati eksperimentalnega dela na Oddelku za eksperimentalno onkologijo kažejo v *in vivo* sistemu upočasnitev rasti tumorja v kombinaciji z uporabo metode elektroporacije in vnosa plazmidne DNA (Slika 18). Zato nas je poleg povečanega izražanja citosolnih senzorjev DNA in IFN-1 β v *in vitro* sistemu to zanimalo tudi v *in vivo* sistemu, kjer smo prav tako kot v *in vitro* sistemu za vse eksperimentalne skupine določili faktor povišanega izražanja (FPI) za vsak posamezni citosolni senzor ter citokin IFN-1 β .



Slika 18: Diagram rasti tumorja v *in vivo* sistemu

Diagram rasti tumorja v *in vivo* sistemu prikazuje napredovanje rasti tumorja v odvisnosti od časa. Med krivuljami tumorske rasti pri posamezni eksperimentalni skupini izstopa elektroporirana skupina z vnesenim plazmidom, EP gWiz, kjer opazimo, da je tumorska rast upočasnjena. Rast tumorja pri ostalih eksperimentalnih skupinah je hitrejša in se med seboj bistveno ne razlikuje. Na začetku časovnega okvirja (do dneva 2) so razlike med vsemi štirimi eksperimentalnimi skupinami majhne, vendar se tekom nadaljnjega časovnega

intervala razlike med elektroporirano skupino s plazmidom in ostalimi skupinami povečujejo. Vnos plazmidne DNA v tumorske celice, igra ključno vlogo pri upočasnitvi rasti tumorja.

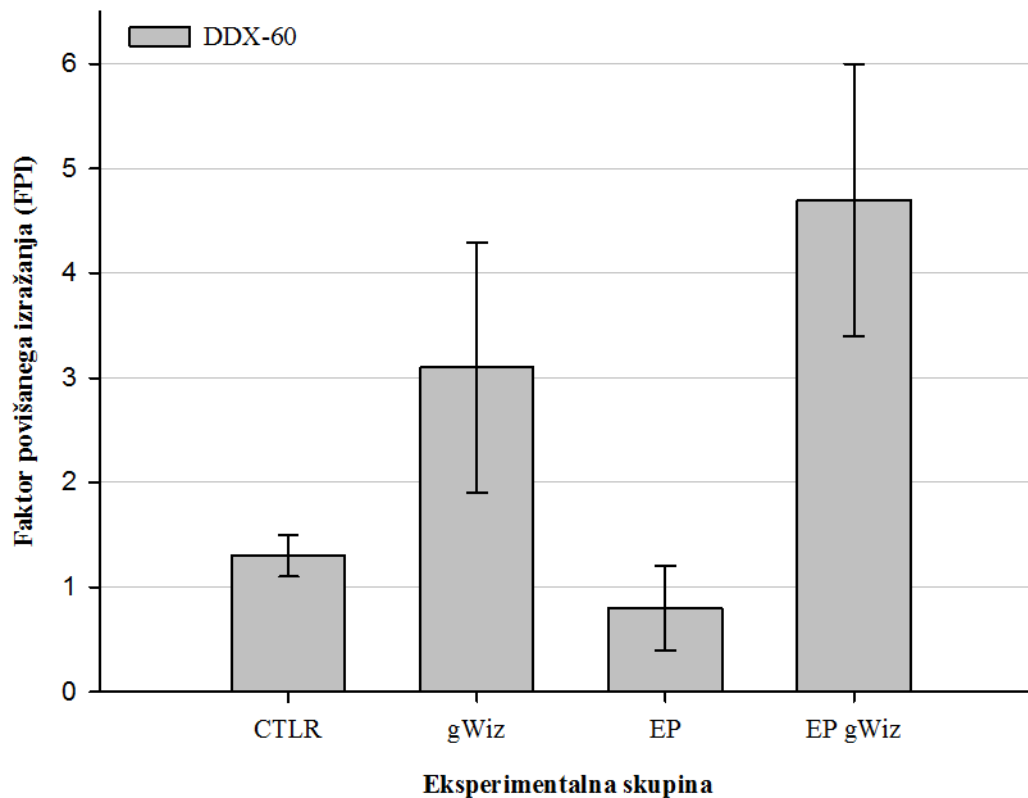
Preglednica 9: Faktorji povišanega izražanja citosolnih senzorjev DNA in IFN-1 β pri eksperimentalnih skupinah, v *in vivo* sistemu

	DDX-60		RIG-1		IFN-1β	
	FPI \pm SE	N	FPI \pm SE	N	FPI \pm SE	N
CTLR	1.3 \pm 0.2	11	NZ	3	2.0 \pm 0.7	11
gWiz	3.1 \pm 1.2	12	NZ	3	4.4 \pm 2.3	12
EP	0.8 \pm 0.4	10	NZ	3	0.4 \pm 0.1	10
EP gWiz	4.7 \pm 1.3	13	NZ	3	26.7 \pm 8.0 *	13

Vrednosti predstavljajo faktorje povišanega izražanja (FPI) s standardno napako (SE). N pomeni velikost vzorca. NZ pomeni, da izražanje senzorja ni bilo zaznano. * predstavlja statistično signifikantno razliko skupine EP gWiz 35 od vseh ostalih skupin pri citokinu IFN-1 β in od skupine EP gWiz pri senzorju DDX-60 (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$)

Tudi v *in vitro* sistemu nismo zaznali izražanje citosolnega senzorja DNA, RIG-1. Citosolni senzor DDX60 in citokin IFN-1 β pa sta dosegla največje povečanje izražanja pri eksperimentalni skupini EP gWiz, torej pri vnosu plazmida v kombinaciji z metodo elektroporacije, vendar citosolni senzor DNA DDX60 ni dosegel statistično signifikantnega povečanja izražanja glede na kontrolno skupino. Povečal pa je svoje izražanje citokin, IFN-1 β , čigar najvišja zabeležena vrednost FPI pri skupini EP gWiz je statistično signifikantno različna od vseh ostalih ekperimentalnih skupin. Povečanje izražanja med senzorjem in citokinom je pri omenjeni skupini spet mnogo višje pri citokinu: v *in vivo* sistemu je povečanje izražanja citokina IFN-1 β pri skupini EP gWiz kar 5-krat večje kot pri senzorju DDX-60 (vrednosti FPI DDX-60: 4.7 \pm 1.3, FPI IFN-1 β : 26.7 \pm 8.0), med obema skupinama pa je tudi statistično signifikantna razlika.

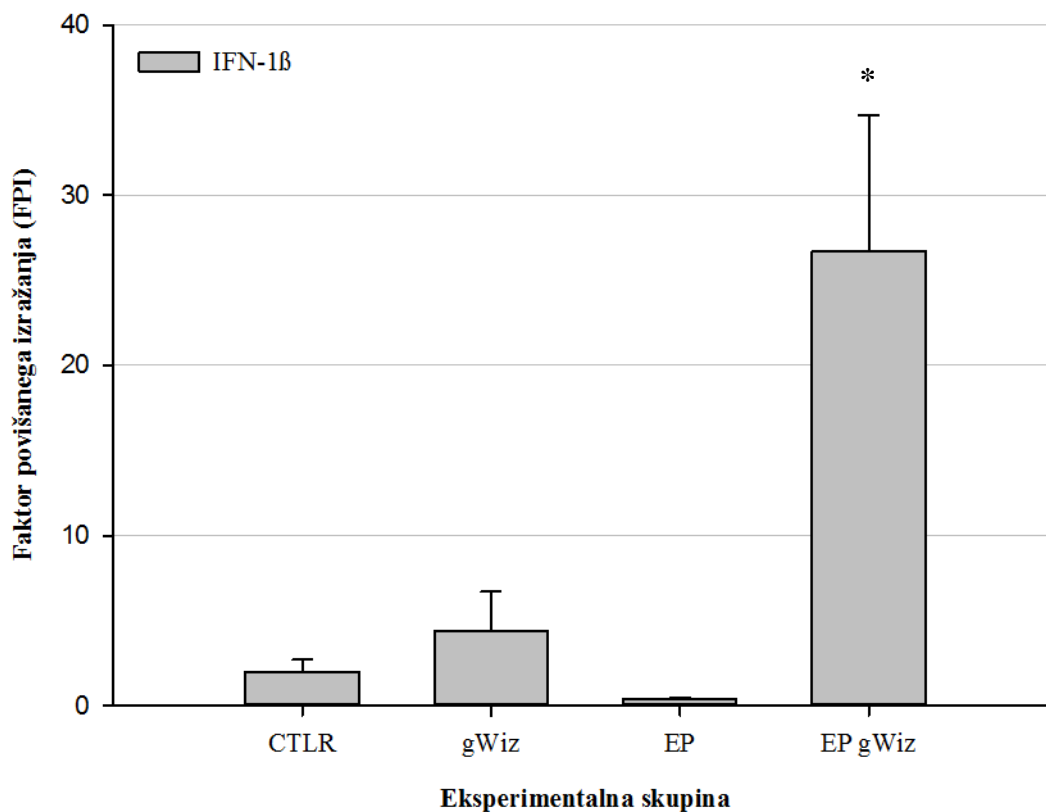
4.5.1 Faktor povišanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60 (*in vivo*)



Slika 19: Stolpični diagram povečanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60 (*in vivo*), pri posameznih eksperimentalnih skupinah s standardnimi napakami. Statistično signifikantnih razlik med eksperimentalnimi skupinami ni.

Citosolni senzor DDX-60 je v *in vivo* sistemu najbolj povečal svoje izražanje pri skupini EP gWiz. Vendar pa faktor povišanega izražanja pri omenjeni skupini ni statistično signifikanten od vrednosti FPI pri skupini EP. Zanimivo je povečanje izražanja DDX-60 pri plazmidni skupini, gWiz, ki je celo večje od povečanja izražanja pri elektroporirani skupini (citotoksičnost plazmida), vendar vrednost FPI plazmidne skupine ni statistično signifikantna.

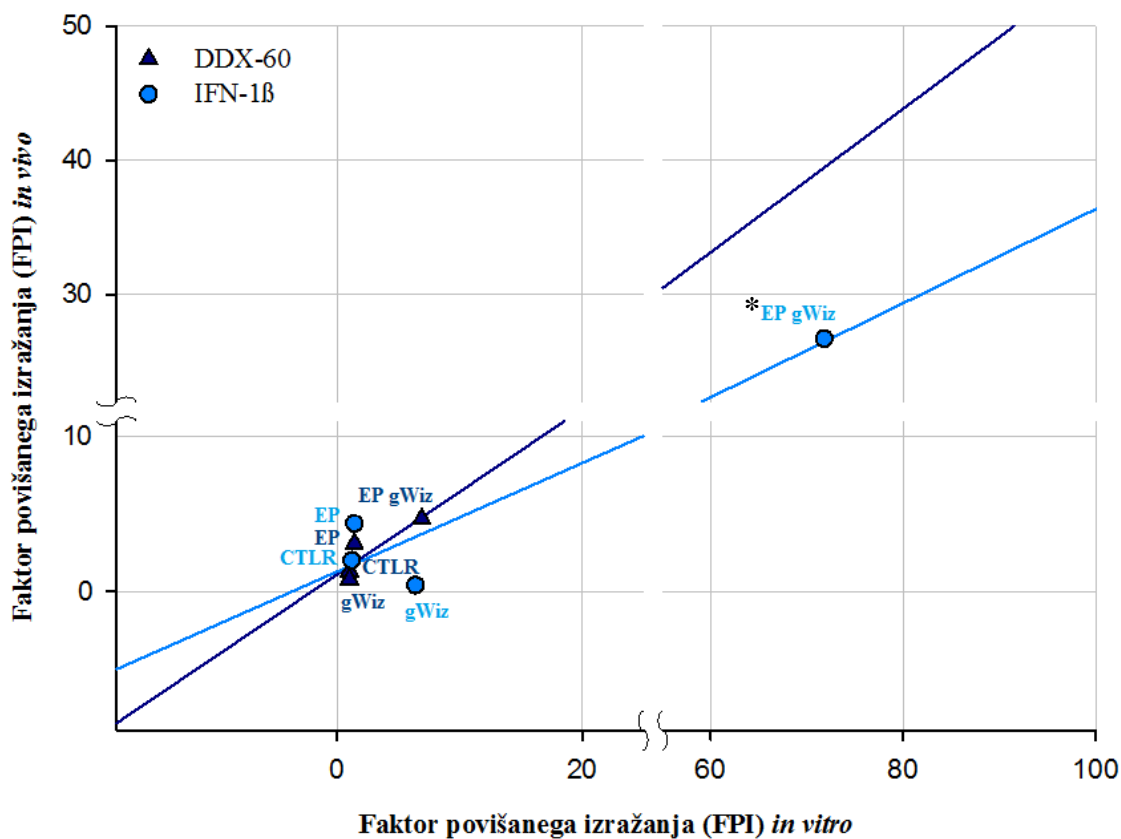
4.5.2 Faktor povišanega izražanja citokina IFN-1 β (*in vivo*)



Slika 20: Stolpični diagram povečanega izražanja citokina, IFN-1 β (*in vivo*), pri posameznih eksperimentalnih skupinah s standardnimi napakami. * prikazuje statistično signifikantno različnost skupine EP gWiz od vseh ostalih eksperimentalnih skupin (Holm Sidakov t-test, $p < 0,050$)

V primerjavi s citosolnim senzorjem DDX-60 je povečanje izražanja citokina IFN-1 β v *in vivo* sistemu mnogo večje, vendar le pri elektroporirani skupini z dodanim plazmidom. Največji FPI INF-1 β je zabeležen pri eksperimentalni skupini EP gWiz, ki se statistično signifikantno razlikuje od vseh ostalih skupin. V primerjavi s povečanjem izražanja pri kontrolni skupini, je povečanje izražanja citokina pri EP gWiz, povečano za kar 13-krat (vrednost FPI kontrolne skupine: 2.0 ± 0.7 , FPI skupine EP gWiz: 26.7 ± 8.0).

4.6 KORELACIJA POVEČANEGA IZRAŽANJA CITOSOLNEGA SENZORJA DDX-60 IN IFN-1 β MED *IN VITRO* IN *IN VIVO* SISTEMOMA



Slika 21: Diagram korelacije povečanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60 in IFN-1 β med *in vitro* in *in vivo* sistemoma. Statistično izračunani Pearsonovi korelacijski koeficienti in vrednosti P: DDX-60 = 0.866, P > 0.050; * IFN-1 β = 0.981, P < 0.050. * prikazuje statistično signifikantno korelacijo med skupinami *in vitro* in *in vivo*

Ob primerjavi vrednosti FPI citosolnega senzorja DDX-60 in citokina IFN-1 β v *in vitro* ter *in vivo* sistemu opazimo, da pride do povečanega izražanja IFN-1 β kot posledica povečanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60, v obeh sistemih ter v *in vivo* sistemu rezultira v interferonski imunski odgovor. Do interferonskega imunskega odgovora oziroma do povečanega izražanja IFN-1 β , pride predvsem pri elektroporiranih eksperimentalnih skupinah, tako v *in vitro* kot v *in vivo* sistemu.

Z grafa korelacije je razvidno, da je prišlo do močnejšega oziroma večjega povečanja izražanja citosolnih sensorjev in INF-1 β v *in vitro* sistemu. Vrednosti FPI pri *in vitro* sistemu se na x osi nahajajo znotraj intervala od 0 pa vse do skoraj 80, medtem ko je zgornja meja za vrednosti FPI pri *in vivo* sistemu na osi y, 5. To je najverjetneje posledica različnega deleža transfeciranih celic mišjega melanoma B16F10 v *in vitro* (40 %; 4.1 Delež transfekcije celic v *in vitro* sistemu, slika 12) ter tumorskih celic v *in vivo* sistemu (4 %; Čemažar in sod., 2002). Poleg tega ne smemo zanemariti dejstva, da *in vitro* sistem ponuja mnogo bolj enakomerne, stabilne in predvsem nadzorljive pogoje kot *in vivo* okolje, kjer parametre in dejavnike ne moremo nadzorovati in nanje vplivati v enaki meri.

Diagram korelacije prikaže izstopanje skupine EP gWiz pri IFN-1 β , kjer je bilo zabeleženo največje povečanje izražanja. Vse ostale vrednosti FPI (tako citosolnega sensorja kot tudi IFN-1 β) pri preostalih eksperimentalnih skupinah so na diagramu zgoščene skupaj in se nahajajo znotraj enakega intervala. Vnos plazmida s kombinacijo metode elektroporacije se je tako izkazal za najuspešnejši način izzvanja interferonskega imunskega odgovora v *in vivo* sistemu.

Statistične analize korelacije (Pearsonov koeficient korelacije) med vrednostmi FPI eksperimentalnih skupin citosolnega sensorja oziroma citokina med *in vitro* in *in vivo* sistemoma so pokazale, da med skupinami obstaja pozitivna linearna povezanost. Oba izračunana korelacijska koeficienta sta namreč blizu vrednosti 1. Vendar pa statistična analiza pri sensorju DDX-60 ni pokazala signifikantnih povezav med *in vitro* in *in vivo* izmerjenimi vrednostmi FPI. Drugače se je izkazalo pri citokinu, IFN-1 β , kjer se je vrednost korelacijskega koeficienta najbolj približala vrednosti 1, hkrati pa je statistična analiza pokazala signifikantno korelacijo med vrednostmi v *in vitro* ter *in vivo* sistemoma. Statistična analiza je pri IFN-1 β izračunala, da se vrednosti tako v *in vitro* kot v *in vivo* sistemu, pri posameznih skupinah celic povečujejo enako oziroma je med njimi prisotna signifikantna korelacija.

5 RAZPRAVA

Tekom raziskovalne naloge in eksperimentalnega dela lahko potrdimo dve od treh, na začetku postavljenih hipotez. Z dobljenimi rezultati smo namreč prišli do ugotovitev, da vnos plazmida, ki ne nosi zapisa za protein v melanomske celice, aktivira oziroma poveča izražanje citosolnih senzorjev DNA in s tem posledično tudi sproži interferonski imunski odgovor oziroma poveča izražanje citokina IFN-1 β , pri čemer je povečanje izražanja odvisno od koncentracije vnesene plazmidne DNA, vendar odvisnost ni linearna.

Prav tako lahko potrdimo drugo hipotezo, ki pravi, da vnos plazmida, ki ne nosi zapisa za protein z elektroporacijo v melanomske celice, zmanjša proliferacijo celic. Tretjo hipotezo, ki pa pravi, da vnos plazmida, ki ne nosi zapisa za protein, z elektroporacijo v melanomske tumorje *in vivo* poveča izražanje citosolnih senzorjev DNA, kar se posledično kaže v interferonskem imunskem odzivu, pa lahko le delno potrdimo. Vnos plazmida brez zapisa za protein v *in vivo* sistemu je namreč statistično povečal izražanje samo pri citokinu IFN-1 β , ne pa tudi pri citosolnih senzorjih. Povečanje izražanja citosolnega senzorja DDX-60 v *in vivo* sistemu je sicer bilo prisotno, vendar pa se njegove vrednosti faktorja povišanega izražanja niso izkazale za statistično signifikantne.

Proliferacija celic mišjega melanoma B16F10 v *in vitro* sistemu je v kombinaciji vnosa plazmida z metodo elektroporacije zmanjšana. To velja za vse eksperimentalne skupine, ki so bile izpostavljene električnim pulzom, s pomočjo katerih smo uspešno vnesli plazmidno DNA. Vnos plazmidne DNA v celice torej zmanjša celično proliferacijo. Delež preživetja celic četrty dan po genskem elektroprenosu je pri skupinah z vnesenim plazmidom zmanjšano za 50–75 %, odvisno od koncentracije vnesenega plazmida.

Bošnjak in sod., 2013 so v svojih raziskavah z uporabo vnosa plazmida v melanomske celice z metodo elektroporacije potrdili večjo citotoksičnost vnesenega plazmida ob uporabi v kombinaciji z elektroporacijo. Ta je tudi v našem primeru povečala citotoksičnost uporabljenega plazmida gWiz Blank in sicer za 3-krat do 4-krat. Proliferacija celic je bila pri najvišji koncentraciji vnesenega plazmida in v kombinaciji z

elektroporacijo najnižja. Deleži preživetja celic pri elektroporiranih skupinah z vnesenim plazmidom padajo glede na naraščajočo koncentracijo vnesenega plazmida, vendar odvisnost ni linearna.

V *in vivo* sistemu so Heller in sod., 2013, med drugim prav tako uporabili plazmid brez zapisa za protein, gWiz Blank, in dokazali, da elektroprenos plazmida v mišji melanom privede do inhibicije tumorske rasti, podaljšanja preživetja miši ter v končni fazi regresije tumorja. Do enakih zaključkov so prišli raziskovalci tekom svojih raziskovanj tudi na Onkološkem Inštitutu, na Oddelku za eksperimentalno onkologijo (slika 21: Diagram rasti tumorja v *in vivo* sistemu).

Nekatere druge študije so prav tako pokazale, da lahko kontrolni plazmid brez vključenega terapevtskega gena, kot je gWiz Blank v našem primeru, povzroči popolni odgovor tumorja oziroma tumorskih celic, še posebej pri celicah mišjega melanoma B16. Vzročni mehanizem za slednje vključuje več faktorjev: direktno toksičnost DNA, izbor parametrov električnih pulzov in indukcijo imunosti (Čemažar in sod., 2015).

Faktorji povišanega izražanja citosolnih senzorjev in IFN-1 β so bili v *in vitro* sistemu pri elektroporiranih skupinah višji kot pri skupinah brez elektroporacije. Od citosolnih senzorjev smo tako v *in vitro* kot tudi v *in vivo* sistemu zabeležili večje povečanje izražanja citosolnega senzorja DDX-60 po genskem elektroprenosu, medtem ko se drugi uporabljeni citosolni senzor, RIG-1 ni izražal oziroma nismo zaznali povečanja njegovega genskega izražanja. Citosolni senzor RIG-1, v našem primeru v melanomskih celicah (*in vitro*) in v tumorskih celicah (*in vivo*) ni prisoten. Faktor povišanega izražanja citokina IFN-1 β , ki je povečal svoje izražanje kot odgovor na prisotnost citosolnih senzorjev oziroma na povečano izražanje citosolnega senzorja DDX-60, je bil v obeh sistemih signifikantno najvišji.

V *in vitro* sistemu se je izražanje citosolnega senzorja DDX-60 najbolj povečalo pri elektroporirani eksperimentalni skupini z najvišjo koncentracijo vnesenega plazmida, EP gWiz 35. Največje povečanje izražanja pa je kot odgovor v *in vitro* sistemu dosegel IFN-1 β , čigar izražanje je bilo prav tako najvišje pri eksperimentalni skupini EP gWiz 35.

Vrednosti faktorjev povišanega izražanja so bile pri IFN-1 β mnogo višje (najvišji FPI IFN-1 β : 123.3 \pm 57.0) kot pri citosolnem senzorcju (najvišji FPI DDX-60: 37.6 \pm 17.7). Izražanje citokina v *in vitro* sistemu je v primerjavi z izražanjem citosolnega senzorca vsaj 3-krat večje.

V *in vivo* sistemu je bil največji faktor povišanega izražanja, tako citosolnega senzorca DDX-60 kot tudi IFN-1 β , zabeležen pri eksperimentalni skupini EP gWiz, kjer je bil plazmid uporabljen v kombinaciji z elektroporacijo. Vendar je bilo izražanje citokina tako kot v *in vitro* kot tudi v *in vivo* sistemu večje kot izražanje citosolnega senzorca. Statistično signifikantno je izražanje citokina pri omenjeni skupini, saj je 5-krat večje od izražanja citosolnega senzorca.

Povečano izražanje citosolnih senzorcev DNA je posledica vnosa tuje DNA oziroma nahajanje DNA na neobičajnem mestu – v citosolu celice. Do slednjega pride tako v *in vitro* kot tudi v *in vivo* sistemu. V *in vitro* sistemu so bili citosolni senzorcji do danes večinoma opisani v imunskih celicah, kjer je na povečanje njihovega izražanja vplivala predvsem transfekcija z različnimi virusi: senzor DDX-60 v celicah HeLa po okužbi s poliovirusom (Myashita in sod., 2011), senzorca DHX9 in DHX36 v humanih plazmacitoidnih dendritičnih celicah po transfekciji z virusom herpesa simpleksa (Kim in sod., 2010), senzor DAI v mišjih fibroblastih po okužbi s citomegalovirusom (Upton in sod., 2012), itd. V naši raziskovalni nalogi pa smo dokazali obstoj citosolnih senzorcev (predvsem DDX-60) tudi v celicah mišjega melanoma, B16, njihovo povečanje izražanja pa smo dosegli s povsem drugačnim dostavnim sistemom – z gensko elektrotransfekcijo oziroma s pomočjo uporabe fizikalne metode elektroporacije.

Sun in sod., 2013, so tekom svojih raziskav predpostavili, da v različnih celicah obstajajo različni senzorcji DNA. Choi in sod., 2009, pa so že pred njimi ugotovili, da določene signalizacijske poti zaznavanja nukleinskih kislin delujejo samo v določenih celicah, kar je povezano s senzorcji, ki se v njih nahajajo. Tekom našega eksperimenta smo tako ugotovili, da senzor RIG-1 ni pristoten v celicah mišjega melanoma, se je pa pri drugih raziskavah (Jensen in Tomsen, 2012) izkazalo, da je prisoten v večini drugih mišjih celic, kot so fibroblasti, konvencionalne dendritične celice in makrofagi, kjer je po virusni okužbi

močno povečal svoje izražanje in kjer ima pomembno obrambno vlogo pred številnimi virusi.

Analize korelacije med izmerjenimi vrednostmi faktorjev povišanega izražanja v *in vitro* in *in vivo* sistemu še enkrat dokazujejo prevlado IFN-1 β pri povečanju izražanja v primerjavi s citosolnim senzorjem DDX-60. Izražanje IFN-1 β v *in vitro* sistemu je povsem primerljivo in statistično linearno pozitivno povezano z izražanjem v *in vivo* sistemu, saj se vrednosti FPI posameznih eksperimentalnih skupin enako povečujejo v obeh sistemih. V obeh sistemih zaradi povečanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60 torej posledično pride do povečanega izražanja IFN-1 β , ki v *in vivo* sistemu vodi v interferonski imunski odgovor. Interferonski imunski odgovor lahko poteče po različnih ali deloma podobnih signalizacijskih poteh (Sklepi, slika 22).

Ob vseh zbranih rezultatih in zaključkih je treba upoštevati tudi delež transfeciranih melanomskih oziroma tumorskih celic. Pri *in vitro* sistemu je bilo tekom eksperimentalnega dela transfeciranih približno 40 % vseh melanomskih celic (slika 12), medtem ko je bilo v *in vivo* sistemu transfeciranih le 2–5 % vseh tumorskih celic. To je vzrok za to, da je povečanje izražanja citosolnih senzorjev in IFN-1 β pri *in vitro* sistemu mnogo večje v primerjavi z *in vivo* rezultati, kjer je treba upoštevati še številne druge *in vivo* pogoje, prisotne v tumorskem tkivu in tumorskem mikrookolju, na katere ne moremo vplivati in jih nadzorovati kot pri *in vitro* pogojih.

Po transfekciji plazmidne DNA v celico, torej po GET plazmida gWiz Blank, se ta nahaja v citosolu celice, kjer ga kot DAMP zaznajo citosolni senzorji DNA. Signalizacijska pot, preko katere najverjetneje poteka signaliziranje v našem eksperimentalnem modelu, najbrž poteka preko citosolnega senzorja DDX-60. Če dsDNA zazna citosolni senzor DDX-60, nadaljna signalizacijska pot poteče preko IPS1. Interakcije med DDX-60 in IPS1 vodijo preko TBK1 do aktivacije transkripcijskega faktorja IRF3, katerega končni rezultat je izražanje IFN-I (Desmet in Ishii, 2012; InvivoGen, 2005; Lemos in sod., 2014; Ng in Gomerman, 2013; Trinchieri, 2010).

IFN-I so imunski aktivatorji. Tekom svojega povečanega izražanja se vežejo bodisi na BCR na površini limfocitov B ali na TCR, ki se nahajajo na površini limfocitov T. Vezava IFN-I na BCR privede do diferenciacije B celic plazmatk in spominskih celic B. Vezava IFN-I na TCR limfocitov T, natančneje limfocitov Th, pa privede do sproščanja citokinov in ojačanja imunskega odziva (Desmet in Ishii, 2012). Razvije se specifičen imunski odziv Th1 celic, katerega rezultat je aktivacija makrofagov in citotoksičnih limfocitov T (Tc) ter proizvodnja interferonov tipa II (IFN- γ) in tumor nekroznega faktorja, TNF- α (Lydyard in sod., 2011).

Nastali IFN- β je kot predstavnik IFN-I potencialni aktivator tako prirojenega kot tudi pridobljenega imunskega odziva oziroma njegovih imunskih celic. IFN- β stimulirajo (avtoimunost) ali zavirajo imunske odgovore (toleranca). Imunost stimulirajo z indukcijo proizvodnje Tc in Th, zavirajo pa jo s pomočjo proizvodnje specifičnega encima, indoleamin 2,3 dioksigenazo (IDO), ki regulira T-celične odgovore in aktivira regulacijske celice T (Treg). Treg celice namreč zavirajo efektorske odgovore Tc in Th celic, kar je ključnega pomena pri imunski toleranci (Lemos in sod., 2014).

Proizvodnja IFN-I poteka preko aktivacije IFNAR receptorjev. Po dimerizaciji podenot IFNAR1 in IFNAR2 steče fosforilacija TYK2 in JAK1. Aktivirani kinazi nadalje fosforilirata STAT1 in STAT2, ki skupaj vežeta IRF9, s katerim tvorijo trimerni transkripcijski faktor ISGF3. Ta se translocira v celično jedro, kjer po interakciji z ISRE elementi, aktivira gensko transkripcijo IFN (Ng in Gommerman, 2013). Proizvodnja IFN-I je lahko pomnožena preko pozitivne povratne zanke, v kateri zgodaj nastali IFN sprožijo transkripcijo IRF 7 in IRF 8. Fosforilacija transkripcijskih faktorjev pa nadalje stimulira ekspresijo vseh tipov interferonov I (Trinchieri, 2010).

Elektroporacija se je tekom naše raziskovalne naloge izkazala za učinkovito metodo, ki ne samo, da omogoča transport sicer neprepustnim molekulam preko celične membrane, temveč s tem tudi pripomore k zmanjšani rasti tumorskega tkiva. Na tak način omogoča prehod, ne samo nukleinskim kislinam, temveč tudi pomembnim terapevtikom, zdravilom, ki lažje in hitreje vstopijo v celico ter tako hitreje dosežejo svoje tarče in začnejo z antitumorskim delovanjem. Rezultat upočasnjene tumorske rasti je podaljšanje časa

razvoja ali popolna zaustavitev bolezni same ter v končni fazi tudi podaljšanje življenjske dobe bolnikov, obolelih za rakavimi obolenji.

6 SKLEPI

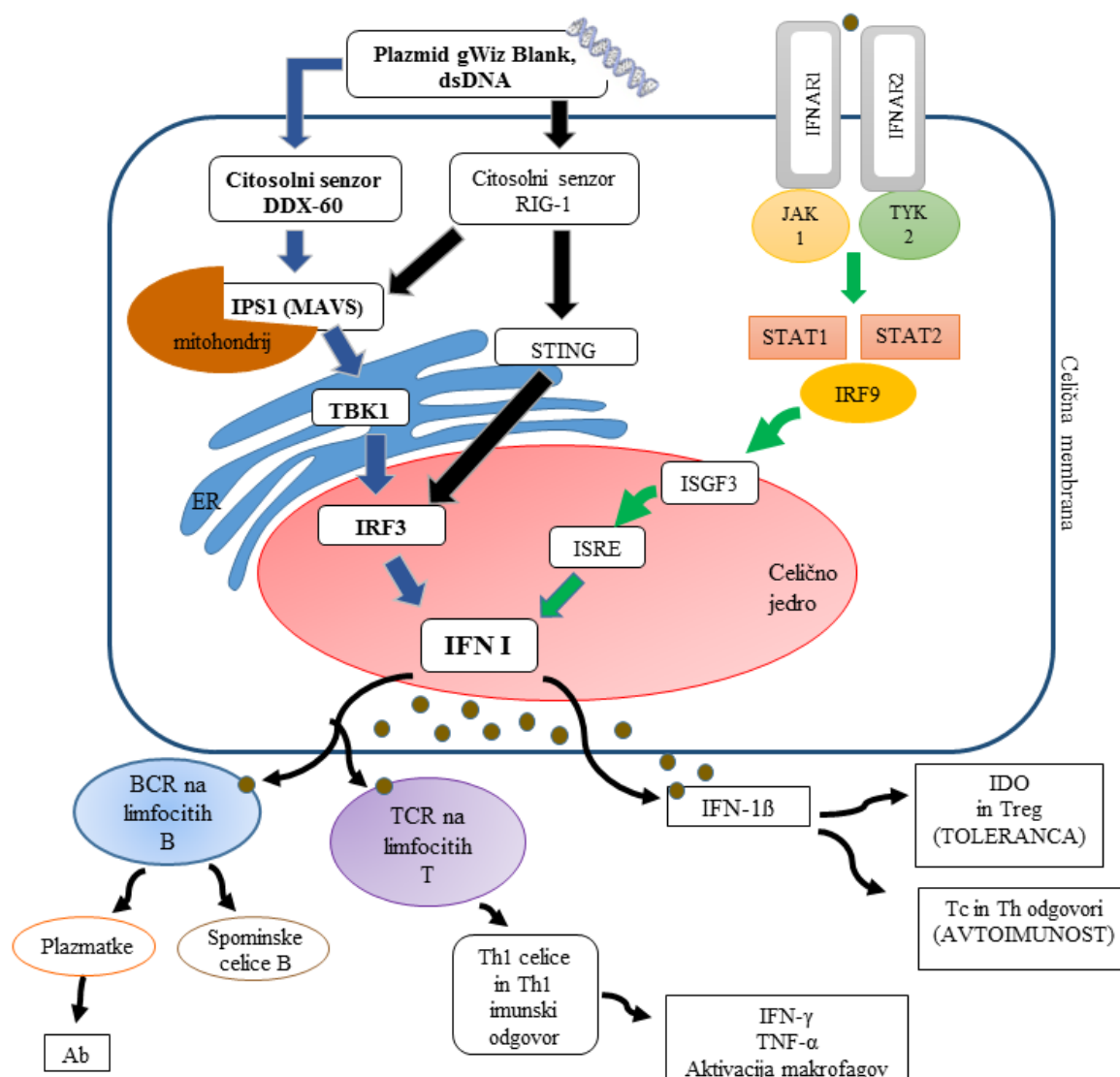
Vnos plazmida gWiz Blank, ki nima zapisa za protein, v melanomskih celicah zmanjša proliferacijo celic v kombinaciji z metodo elektroporacije. Delež preživetja celic je četrti dan po genskem elektroprenosu zmanjšašan za 50–75 %, odvisno od koncentracije vnesenega plazmida. Plazmid se izkaže za od 3-krat do 4-krat bolj toksičnega v kombinaciji z elektroporacijo. Pri tem citotoksičnost vseh treh preizkušenih koncentracij narašča linearno z večanjem koncentracije plazmida. Elektroporacija se je izkazala za zelo uspešno in obetavno metodo na področju genskega elektroprenosa.

Vnos plazmida tako pri *in vitro* kot pri *in vivo* sistemu privede do povečanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60, ki v *in vivo* sistemu ni dosegel statistične značilnosti, ter posledično do razvoja interferonskega imunskega odziva (v *in vivo* sistemu). Citosolni senzor RIG-1 v našem primeru ni prisoten niti v *in vitro* niti v *in vivo* sistemu. Pri obeh sistemih so faktorji povišanih izražanj tako citosolnega senzorja DDX-60 kot citokina IFN-1 β v kombinaciji elektroporacije z vnosom plazmida največji. Največje povečanje izražanja je v obeh sistemih zabeleženo pri IFN-1 β .

Korelacija med koncentracijo vnesenega plazmida in povečanjem izražanja citosolnih senzorjev DNA, se tekom našega eksperimentalnega dela, ni izkazala za linearno odvisno. Korelacija med povečanjem izražanj citosolnega senzorja DDX-60 in citokina IFN-1 β v *in vitro* ter *in vivo* sistemu pa se je izkazala za linearno pozitivno povezano. Povečanje izražanja IFN-1 β je statistično signifikantno enako med obema sistemoma.

Pot aktivacije INF-1 β oziroma interferonska pot imunskega odgovora na zaznavanje nukleinskih kislin oziroma citosolnih senzorjev DNA v našem primeru najverjetneje poteka preko citosolnega senzorja DDX-60 po narisani shemi (slika 22). Po transfekciji plazmida gWiz Blank v celice mišjega melanoma B16F10 je plazmidna DNA zaznana v citosolu celic kot DAMP. Zazna jo citosolni senzor DDX-60 in nadaljna signalizacija najverjetneje poteče po naslednji poti:

DDX-60 – IPS1/MAVS – TBK1 – IRF3 – IFN-I



Slika 22: Shema signalizacijskih poti in interferonski imunski odgovor. Modre puščice nakazujejo najbolj verjetno pot aktivacije IFN-I preko citosolnega senzorcja DDX-60 (v našem primeru), zelene puščice pa potek produkcije IFN-I. IFN se tvorijo v citoplazmi celice

* Ab (protitelesa), BCR (B-celični receptor), ER (endoplazmatski retikel), IDO (indoleamin 2,3 dioksidogenaza), IFNAR1/2 (interferon- α/β receptor 1/2), IPS1 (IFN- β promotor stimulator 1), IRF3/9 (interferon regulacijski faktorji 3/9), ISG (IFN stimulirani geni), ISGF3 (faktor stimulacije interferona 3), JAK1 (janus kinaza 1), STAT1/2 (pretvornik signala in aktivator transkripcije 1/2), IFN- γ (interferon gama), ISRE (elementi stimulacije interferonskega odgovora), STING (stimulator IFN genov), TCR (T-celični receptor), TBK1 (TANK vezavna kinaza 1), TNF- α (tumor nekrozni faktor alfa), Tc (citotoksične celice T), Th (celice pomagalke T), Treg (regulatorne celice T), TYK2 (tirozin kinaza 2)

IFN-I se nato vežejo na limfocite B in T. Celice B plazmatke proizvajajo specifična protitelesa proti tujim antigenom, spominske celice B pa si zapomnijo določen imunski odziv. IFN-I, ki se vežejo na limfocite T, aktivirajo celice pomagalke (Th1). Rezultat je razvoj specifičnega Th1 imunskega odgovora.

Interferonski imunski odgovor (povečano izražanje IFN-1 β) je v končni fazi Th1 imunskega odgovora, ki je pomemben pri obrambi proti različnim okužbam, indukciji apoptoze in inhibiciji tumorogeneze. IFN-1 β konkretno pa stimulirajo ali zavirajo imunske odgovore. Stimulacija imunskih odgovorov je pomembna pri avtoimunosti, zaviranje pa pri razvoju imunske tolerance.

7 POVZETEK

Na nenehno razvijajočem se področju zdravljenja rakavih bolezni predstavlja genski pristop enega od sodobnejših in učinkovitejših načinov. Z gensko terapijo se v obolela tkiva oziroma celice vstavi nukleinske kisline (gene) z namenom pridobitve terapevtskega učinka. S tem pristopom lahko popolnoma zamenjamo okvarjeni gen, pridobimo nove celice, ki izločajo željene terapevtske proteine ter številne druge možnosti. Obstajajo številne poti vnosa genov v celice in tkiva. Ena izmed možnosti je genski elektroprenos ali genska elektrotransfekcija (GET), ki temelji na fizikalni metodi elektroporacije.

Elektroporacija je metoda, ki začasno povzroči destabilizacijo celične membrane, kar se zgodi kot posledica izpostavljenosti fosfolipidnega dvosloja celične membrane določenemu električnemu polju, zaradi katerega pride v celičnem dvosloju do nastanka vodnih por. Vodne pore omogočijo začasno prehajanje molekulam, ki sicer ne morejo prehajati preko celične membrane, v notranjost celice. Elektroporacija začasno poveča permeabilnost ali prepustnost celične membrane. S pomočjo elektroporacije lahko v celice ali tkiva vnesemo tudi nukleinske kisline. Vendar pa vnos nukleinskih kislin znotraj celic aktivira oziroma poveča izražanje tako imenovanih citosolnih senzorjev DNA.

Citosolni senzorji DNA se nahajajo v citosolu celice, kjer zaznavajo prisotnost nukleinskih kislin oziroma DNA molekul. Ker se DNA molekule običajno nahajajo v celičnem jedru in ne v citosolu, ob prisotnosti DNA molekule, citosolni senzorji DNA povečajo svoje izražanje ter tako posredno vplivajo na potek imunskega odziva, ki v našem eksperimentalnem modelu temelji na povečanem izražanju intereferonov tipa I, zato govorimo o intereferonskem imunskem odzivu.

Namen naše raziskovalne naloge je bil, da s pomočjo elektroporacije in z vnosom plazmida, brez zapisa za protein, gWiz Blank, v melanomske celice B16F10, ugotovimo, ali pride do povečanega izražanja citosolnih senzorjev DNA, DDX-60 in RIG-1 ter intereferona 1 β (IFN-1 β), že v *in vitro* sistemu. Uporabljenima citosolnima senzorjema DNA in IFN-1 β smo določili faktorje povišanega izražanja (FPI) glede na kontrolo v obeh,

in vitro ter *in vivo* sistemoma, pri čemer smo se osredotočili na interferonski imunski odziv.

Pri raziskovalni nalogi smo uporabili različne metode in materiale. Genski elektroprenos je v *in vitro* sistemu potekal na celicah mišjega melanoma, B16F10, v *in vivo* sistemu pa na laboratorijskih miših linije C57BI/6. Za genski elektroprenos smo uporabili elektroporator z elektrodama, kot vključek pa smo v melanomske in tumorske celice vnašali plazmid gWiz Blank, ki nima zapisa za noben protein. Po genskem elektroprenosu smo celice nasadili na mikrotitrne plošče za nadaljne analize testa proliferacije celic in testa citotoksičnosti plazmida. Vrednosti FPI za posamezni citosolni senzor in IFN- β pri različnih eksperimentalnih skupinah in v obeh sistemih smo določili s pomočjo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR). Za nukleotidne analize s qPCR smo iz predhodno transfeciranih celic mišjega melanoma in tumorskega tkiva izolirali enovijačne mRNA-molekule ter jih nato zapisali v cDNA molekule. S qPCR smo kvantitativno izmerili prisotnost citosolnih senzorjev DNA in IFN-1 β oziroma njihovo gensko izražanje pri posameznih skupinah ter iz izmerjenih vrednosti določili vrednosti FPI. Razlike med eksperimentalnimi skupinami smo ocenili s pomočjo statističnega programa SigmaPlot Software 12.0, s katerim smo rezultate tudi grafično predstavili.

Tekom naše raziskovalne naloge smo ugotovili, da je GET v *in vitro* sistemu zmanjšala proliferacijo celic B16F10 in povečala citotoksičnost vnesenega plazmida, gWiz Blank. Ugotovili smo tudi, da pride do povečanega izražanja citosolnega senzorja DNA DDX-60 in IFN-1 β v obeh sistemih. Pri določanju vrednosti FPI smo opazili, da se višje vrednosti FPI pojavijo pri eksperimentalnih skupinah, kjer smo s pomočjo elektroporacije vnesli različne koncentracije plazmidne DNA. Najvišji FPI je bil zabeležen pri IFN-1 β , sledil je citosolni senzor DDX-60. Citosolni senzor RIG-1 v našem primeru ni bil zaznan niti v *in vitro* niti v *in vivo* sistemu. Interferonski imunski odgovor oziroma povečano izražanje IFN-1 β v celicah in tumorjih mišjega melanoma, je posledica povečanega izražanja citosolnega senzorja DDX-60 in ne RIG-1.

Signalizacijska pot, ki v celicah zaradi prisotnosti nukleinskih kislin v citosolu privede do povečanega izražanja DDX-60, ki nadalje stimulira povečano izražanje IFN-1 β in potek

interefronskega imunskega odziva, predvidoma poteka po naslednji signalni poti: DDX-60 – IPS1 / MAVS – TBK1 – IRF3 – IFN-I. Predlagana signalizacijska pot je najverjetnejša za naš eksperimentalni primer oziroma v našem eksperimentalnem modelu.

Elektroporacija je tekom raziskovalne naloge potrdila svoje lastnosti in značilnosti uspešne in varne metode vnosa nukleinskih kislin v celice oziroma tkiva. S pomočjo te fizikalne metode smo uspešno vnesli plazmidno DNA v celice mišjega melanoma in tumorsko tkivo, kar je v *in vivo* sistemu povzročilo tudi zaviralni učinek na rast tumorskega tkiva. V praksi pomeni to najmanj podaljšanje življenjske dobe bolnika, obolelega z rakastim obolenjem, če ne celo popolna zaustavitev in supresija tumorske rasti in uspešna ozdravitev ter odstanitev tumorskega tkiva. V klinični praksi ima elektroporacija kot metoda trenutno še vedno nekaj šibkih točk – predvsem pri uspešnem vstavljanju elektrod v globlje globlje ležeča tkiva. Znanje pridobljeno na področju onkologije bo v prihodnje zelo dragoceno orodje pri nadgradnji že uveljavljenih metod in principov, kar vključuje tudi metodo elektroporacije in izboljšanje njenega potenciala za uspešna zdravljenja rakavih obolenj tudi v prihodnje.

8 VIRI

- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. 2012. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 4th ed., Chapter 1: Introduction to the Immune System. Philadelphia, Elsevier: 1-22
- Aldevron Products, DNAs, gWiz™ High Expression Reporter Plasmids. 2015. <http://www.aldevron.com/products/dnas/gwiz/> (10. december 2015)
- Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersal L., Arya N., Patel H.R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Review of Molecular Diagnostics, 5, 2: 209-219
- Barnes F.S., Greenebaum. B. (eds.). 2006. Biological and Medical Aspects of Electromagnetic Fields. Handbook of Biological effects of electromagnetic fields, 3rd ed., Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC: 310-311
- Bošnjak M., Prosen L., Dolinšek T., Blagus T., Markelc B., Čemažar M., Buquet C., Serša G. 2013. Biological Properties of Melanoma and Endothelial Cells after Plasmid AMEP Gene Electrotransfer Depend on Integrin Quantity on Cells. The Journal of Membrane Biology, 246, 11: 803-819
- Choi M. K., Wang Z., Ban T., Yanai H., Lu Y., Koshiba R., Nakaima Y., Hangai S., Savitsky D., Nakasato M., Negishi H., Takeuchi O., Honda K., Akira S., Tamura T., Taniguchi T. 2009. A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106, 42: 17870-17875
- Čemazar M., Kotnik T., Serša G., Miklavčič D. 2015. Electroporation for Electrochemotherapy and Gene Therapy. V: Electromagnetic Fields in Biology and Medicine. Markov M.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 395-413
- Čemažar M., Serša G., Wilson J., Tozer G.M., Hart S.L., Grosel 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 Therapy, 9, 4: 399-406
- Demes M., Bartsch H., Scheil-Bertram S., Mücke R., Fisseler-Eckhoff A. 2012. Real-Time PCR Data Processing Shown by the Analysis of Colorectal Specific Candidate Genes, ERCC1, RRM1 and TS in Relation to β 2M as Endogenous Control. Applied Sciences, 2: 139-159
- Desmet C.J., Ishii K.J. 2012. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. Nature Reviews, Immunology, 12: 479-491

- Ding Z.Y., Zou X.I., Wei Y.Q. 2012. Cancer Microenvironment and Cancer Vaccine. *Cancer Microenvironment*, 5, 3: 333–344
- Dranoff G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews, Cancer*, 4: 11-21
- Edhemovic I., Breclj E., Gasljevic G., Marolt Music M., Gorjup V., Mali B., Jarm T., Kos B., Pavliha D., Grcar Kuzmanov B., Cemazar M., Snoj M., Miklavcic D., Gadzijevec E. M., Sersa G. 2014. Intraoperative Electrochemotherapy of Colorectal Liver Metastases. *Journal of Surgical Oncology*, 110, 3: 320-327
- Fraga D., Meulia T., Fenster S. 2008. Unit 10.3, Real-Time PCR. *Current Protocols, Essential Laboratory Techniques*: 10.3.1-10.3.33
- Farmaceutski terminološki slovar. 2011. Založba Znanstvenoraziskovalni center Slovenske akademije znanosti in umetnosti (ZRC SAZU)
<http://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/farmaceutski#v> (20. oktober 2015)
- Goubau D., Deddouche S., Reis e Sousa C. 2013. Cytosolic sensing of Viruses. *Immunity*, 38: 855-869
- Gobau D., Van der Veen A.G., Chakravarty P., Lin R., Rogers N., Rehwinkel J., Deddouche S., Rosewell I., Hiscott J., Reis e Sousa C. 2015. Mouse superkiller-2-like helicase DDX-60 is dispensable for type I IFN induction and immunity to multiple viruses. *European Journal of Immunology*, 45, 12: 3386-3403
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 4: 646-669
- Haberl S., Miklavčič D., Serša G., Frey W., Rubinsky B. 2013. Cell Membrane Electroporation – Part 2: The Applications. *Electrical Insulation Magazine*, 29, 1: 29-37
- Heller L., Todorovič V., Čemažar M. 2013. Electrotransfer of single-stranded or double-stranded DNA induces complete regression of palpable B16.F10 mouse melanomas. *Cancer Gene Therapy*, 20, 12: 1-6
- Ihoba. Instituto de Hematologia e Oncologia da Bahia.
<http://www.ihoba.com.br/orientacoes-ao-cliente/o-cancer/> (25. oktober 2015)
- InvivoGen. 2012. RIG-I-Like Receptors & Cytosolic DNA Sensors Review.
<http://www.invivogen.com/review.php> (20. oktober 2015)
- InvivoGen. 2005. Type I IFN Production and Signaling - Review.
<http://www.invivogen.com/review-type1-ifn-production> (25. oktober 2015)

- Ishii K.J., Tang C.K. (eds.). 2014. Biological DNA Sensor: The Impact of Nucleic Acids on Diseases and Vaccinology. Oxford, Elsevier: 368 str.
- Ivaskhiv L.B., Donlin L.T. 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews, Immunology*, 14: 36-49
- Jensen S., Thomsen A.R. 2012. Sensing of RNA Viruses: a Review of Innate IMMUNE Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion. *Journal of Virology*, 86, 6: 2900-2910
- Kim T., Pazhor S., Bao M., Zhang Z., Hanabuchi S., Facchinetti V., Bover L., Plumas J., Chaperot L., Qin J., Liu Y.-J. 2010. Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 34: 15181-15186
- Kočevár N., Čemazar M., Serša G. 2010. Gensko zdravljenje raka. *Farmakološki vestnik*, 61: 14-21
- Lakshmanan S., Gupta G.K., Avci P., Chandran R., Sadasivam M., Jorge A.E.S., Hamblin M.R. 2014. Physical energy for drug delivery; poration, concentration and activation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 71: 98-114
- Lemos H., Huang L., McGaha T.L., Mellor A.L. 2014. Cytosolic DNA sensing via the stimulator of interferon genes adaptor: Ying and Yang of immune responses to DNA. *European Journal of Immunology*, 44: 2847-2853
- Lydyard P., Whelan A., Fanger M. 2011. *Immunology*. 3rd ed. New York, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC: 358 str.
- Medical dictionary.
<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/> (23. oktober 2015)
- MacPherson G., Austyn J., 2012. *Exploring Immunology: Concepts and Evidence*, 1st ed. Chapter 1: The Immune System. Weinheim, Wiley-Blackwell: 5-47
- Miklavčič D., Kotnik T. 2004. Electroporation for Electrochemotherapy and Gene Therapy. V: *Bioelectromagnetic Medicine*. Rosch P.J., Markov M.S. (eds.). New York, Marcel Dekker: 637-656
- Miklavčič D., Mali B., Kos B., Heller R., Serša G. 2014. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *BioMedical Engineering OnLine*, 13, 19: 1-20
- Mikrobiološki slovar. 2013. Slovensko mikrobiološko društvo.
<http://www.termania.net/slovarji/96/mikrobioloski-slovar> (21. oktober 2015)

- Miyashita M., Oshiumi H., Matsumoto M., Seya T. 2011. DDX60, a DEXD/H Box Helicase, Is a Novel Antiviral Factor Promoting RIG-I-like Receptor-Mediated Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 31, 18: 3802-3819
- Nayerossadat N., Maedeh T., Ali P.A. 2012. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*, 1, 2: 1-11
- Ng D., Gommerman J.L. 2013. The regulation of immune responses by DC derived Type I IFN. *Frontiers in Immunology, Antigen Presenting Cell Biology*, 4, 94: 1-6
- Novaković S., Hočevar M., Jezeršek Novaković B., Strojan P., Žgajnar J. 2009. *Onkologija – raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. Ljubljana, Založba Mladinska knjiga: 425 str.
- Oshiumi H., Miyashita M., Masaaki O., Morioka Y., Okabe M., Matsumoto M., Seya T. 2015. DDX60 Is Involved in RIG-I-Dependent and Independent Antiviral Responses, and Its Function Is Attenuated by Virus-Induced EGFR Activation. *Cell Reports*, 11: 1193-1207
- Paludan S.R., Bowie A.G. 2013. Immune Sensing of DNA. *Immunity*, 38: 870-880
- Rems L., Miklavčič D. 2014. Različni modeli elektroporacije in transporta molekul prek celične membrane. *Elektrotehniški vestnik*, 81: 64-72
- Rožman P., Jež M. 2008. Matična celica in napredno zdravljenje (napredno zdravljenje s celicami, genska terapija in tkivno inženirstvo) - Slovar.
http://www.ztm.si/uploads/pdf_datoteke/gradiva/Slovarcek_MC-3227.pdf
(21. oktober 2015)
- Schiavoni G., Gabriele L., Mattei F. 2013. The tumor microenvironment: a pitch for multiple players. *Frontiers in Oncology, Tumor Immunity*, 3, 90: 1-10
- Serša G. 2009. Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove tarče pri zdravljenju raka. *Farmakološki vestnik*, 60: 43-47
- Serša G., Čemažar M., Snoj M. 2009. Electrochemotherapy of tumours. *Current Oncology*, 16, 2: 34-35
- Slovenski medicinski slovar. 2015. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta.
<http://www.termania.net/slovarji/95/slovenski-medicinski-slovar> (22. oktober 2015)
- Sun L., Wu J., Du F., Chen X., Chen Z.J. 2013. Cyclic GMP-AMP Synthase is a Cytosolic DNA Sensor that Activates the Type-I Interferon Pathway. *Science*, 339, 6121: 786-791
- Tannock I., Hill R., Bristow R., Harrington L. 2013. *Basic Science of Oncology*. 5th ed. New York, McGraw-Hill Education: 592 str.

Tarin D. 2012. Clinical and Biological Implications of the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*, 5, 2: 95-112

Trinchieri G. 2010. Type I interferon: friend or foe? *The Journal of Experimental Medicine*, 207, 10: 2053-2063

Upton J.W., Kaiser W.J., Mocarski E.S. 2012. DAI complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe*, 11, 3: 290-297

Vabret N., Blander J.M. 2013. Sensing microbial RNA in the cytosol. *Frontiers in Immunology. Molecular Innate Immunity*, 4, 468: 1-7

Weinberg R.A. 2007. *The biology of cancer*. New York, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC: 864 str.

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem prof. dr. Maji Čemažar za prevzem mentorstva, vse popravke, koristne nasvete in usmerjanje na zaključni poti študija.

Zahvaljujem se prof. dr. Gregorju Serši za prevzem mesta recenzenta ter predsednici komisije, doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin.

Zahvaljujem se nepogrešljivi asistentki in nadebudni mladi raziskovalki, Maši Bošnjak, mag. farm., za super pomoč, ažurnost, koristne napotke in razumljive razlage tako pri eksperimentalnem delu v laboratoriju kot pri samem pisanju zaključne naloge.

Zahvala tudi celotni preostali ekipi Oddelka za ekperimentalno onkologijo za vso pomoč (gospe Miri za vedno ob pravem času pripravljene celice ter vsem ostalim pridnim puncam, ki so z veseljem priskočile na pomoč kadar je bilo potrebno).

Zahvala tudi moji najdražji družini; mami, očetu in bratu za trdno in nesporno podporo tekom naporih, a hkrati neizmerno lepih let študija ter vsem sošolcem in prijateljem.

Posebna zahvala sošolki in prijateljici Danijeli, za marsikatero koristno biološko debato ob popoldanski kavici glede rezultatov, metod in eksperimentalnega dela.

Zahvaljujem se tudi dolgoletni prijateljici Tamari Kovačič, mag. prof. slov. in ang., za hitro in natančno lektoriranje celotnega besedila.

Na koncu se najlepše zahvaljujem še Boštjanu, za stoo odstotno podporo, mnogokrat potrebno motivacijo in spodbudo ter razumevanje, posebej ob dnevih, ko se ni vedno izšlo vse po načrtih.