

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Eva SKVARČA

**VPLIV INHIBITORJEV ENDOCITOZE NA
UČINKOVITOST ELEKTRIČNO POSREDOVANEGA
VNOSA PLAZMIDNE DNA V CELICE MELANOMA
B16F1**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Eva SKVARČA

**VPLIV INHIBITORJEV ENDOCITOZE NA UČINKOVITOST
ELEKTRIČNO POSREDOVANEGA VNOSA PLAZMIDNE DNA V
CELICE MELANOMA B16F1**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECTS OF INHIBITORS OF ENDOCYTOSIS ON PLASMID
DNA GENE ELECTROTRANSFER EFFICIENCY IN B16F1 MOUSE
MELANOMA CELLS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Mami v spomin.

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta Ljubljana v sodelovanju z Oddelkom za citopatologijo Onkološkega inštituta Ljubljana.

Po sklepu Komisije za študij 1. in 2. stopnje Biotehniške fakultete je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Mojca Narat in za somentorja prof. dr. Gregor Serša.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

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

Datum zagovora: 29. avgust 2016

Podpisana izjavljam, da je diplomsko 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.

Eva Skvarča

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 602.621:602.64:606:616-056.7(043.2)
KG	elektrotransfekcija/elektroporacija/plazmid/endocitoza/inhibitor endocitoze/metil- β -ciklodekstrin/konkanavalin A/dynasore
AV	SKVARČA, Eva
SA	NARAT, Mojca (mentorica)/SERŠA, Gregor (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2016
IN	VPLIV INHIBITORJEV ENDOCITOZE NA UČINKOVITOST ELEKTRIČNO POSREDOVANEGA VNOSA PLAZMIDNE DNA V CELICE MELANOMA B16F1
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 71 [2] str., 15 sl., 1 pril., 75 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Tehnologija električno posredovanega vnosa genov v celice in tkiva veliko obeta na področju genskega zdravljenja. Temelji na uporabi gole DNA, ki s pomočjo električnih pulzov prehaja preko celične membrane v celice. V raziskavi smo želeli dokazati sodelovanje procesov endocitoze pri električno posredovanem vnisu plazmidne DNA v celice melanoma B16F1. Preverjali smo vpliv treh farmakoloških inhibitorjev endocitoze, metil- β -ciklodekstrina ($M\beta$ CD), konkanavalina A (Con A) in dynasorja. $M\beta$ CD, ki inhibira poti endocitoze, pri katerih sodeluje holesterol, je pri najvišji uporabljeni koncentraciji elektrotransfekcijo skoraj popolnoma inhibiral. Z uporabo Con A smo testirali sodelovanje procesa receptorsko posredovane endocitoze in dosegli približno 60 % inhibicijo elektrotransfekcije. Poleg zmanjšanja deleža transfeciranih celic smo pri poskusih z $M\beta$ CD opazili tudi zmanjšanje intenzitete fluorescence zeleno fluorescirajočega proteina (GFP) znotraj transfeciranih celic. V transfecirane celice je torej vstopalo manj plazmidne DNA kot pri kontrolnih celicah. Con A takega vpliva na transfecirane celice ni imel. Dynasore, inhibitor delovanja dinamina, na uspešnost elektrotransfekcije ni vplival. Njegovo delovanje je časovno omejeno na prvih 5 minut po aplikaciji električnih pulzov, kar potrejuje, da vstop plazmidne DNA v celico ne poteka med dovajanjem električnih pulzov temveč kasneje. Rezultati naše raziskave dokazujejo sodelovanje procesov endocitoze pri električno posredovanem vnisu plazmidne DNA v celice. Kljub temu, da smo uporabili tri različne inhibitorje endocitoze, ni mogoče sklepati, katera endocitotska pot omogoča molekulam DNA vstop v notranjost celice in potovanje do jedra. Zmanjšanje učinkovitosti elektrotransfekcije pri celicah tretiranih z $M\beta$ CD in Con A nakazuje na sodelovanje poti endocitoze, za katero je značilna interakcija DNA s specifičnimi molekulami na membrani, ki pa še niso identificirane.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 602.621:602.64:606:616-056.7(043.2)
CX electrotransfection/electroporation/plasmid/endocytosis/inhibitors of endocytosis/methyl- β -cyclodextrin/concanavalin A/dynasore/ gene electrotransfer
AU SKVARČA, Eva
AA NARAT, Mojca (supervisor)/SERŠA, Gregor (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2016
TI THE EFFECTS OF INHIBITORS OF ENDOCYTOSIS ON PLASMID DNA GENE ELECTROTRANSFER EFFICIENCY IN B16F1 MOUSE MELANOMA CELLS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 71 [2] p., 15 fig., 1 ann., 75 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Gene electrotransfer (GET) is a promising new technology with great potential for gene therapy. The basic principle of GET is the application of electric pulses that enable the transfer of naked DNA through the cell membrane. The aim of our research was to show the involvement of endocytic pathways in GET. We tested three pharmacological inhibitors of endocytosis, namely methyl- β -cyclodextrin (M β CD), concanavalin A (Con A), and dynasore. The highest tested concentrations of M β CD, an inhibitor of cholesterol-dependent endocytic pathways, resulted in almost complete inhibition of GET. Con A was used to test the involvement of receptor-mediated endocytic pathways in GET. With Con A, up to 60 % inhibition of electrotransfection was achieved. Both M β CD and Con A reduced the fraction of electrotransfected cells, but only M β CD also reduced the fluorescence intensity of green fluorescent protein (GFP) in the electrotransfected cells, thus implying that treatment of cells with M β CD reduces the amount of plasmid DNA entering cells in comparison to control groups. On the other hand, dynasore, inhibitor of dynamin, did not affect the efficiency of GET in our experiments, confirming that the entry of plasmid DNA into the cells does not happen during the application of electric pulses, but at least 5 minutes later. Our results support the hypothesis that endocytosis is the key mechanism involved in plasmid DNA transfer during GET. Although three different inhibitors of endocytosis were tested we could not conclude which particular endocytic pathway is responsible for plasmid DNA intake and intracellular transport towards cell nucleus. Reduction of GET efficiency achieved with M β CD and Con A indicates involvement of endocytic pathway that requires interaction of plasmid DNA with specific yet unidentified molecules on cell membrane.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	13
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA	13
2 PREGLED OBJAV	14
2.1 GENSKO ZDRAVLJENJE	14
2.2 PRIPRAVA DNA KONSTRUKTOV ZA GENSKO ZDRAVLJENJE	16
2.3 METODE VNOSA GENOV (VEKTORJI)	16
2.3.1 Virusni vektorji za vnos genov	17
2.3.1.1 Retrovirusni vektorji	17
2.3.1.2 Adenovirusni vektorji	18
2.3.1.3 Adeno-asociacijski virusni vektorji	19
2.3.2 Fizikalne metode vnosa genov	19
2.3.2.1 Biolistika (genska pištola)	20
2.3.2.2 Visokotlačno injiciranje (angl. jet injection)	20
2.3.2.3 Ultrazvočno posredovan vnos genov (sonoporacija)	20
2.3.2.4 Magnetno posredovan vnos genov (magnetofekcija)	21
2.3.2.5 Električno posredovan vnos genov (elektropermeabilizacija, elektroporacija)	21
2.4 ENDOCITOZA	25
2.4.1 Fagocitoza	26
2.4.2 Makropinocitoza	26
2.4.3 Endocitoza, posredovana s klatrinom	27
2.4.4 Endocitoza, posredovana s kaveolinom	29
2.4.5 Endocitoza, neodvisna od klatrina in kaveol ozziroma kaveolina	31
2.4.5.1 Endocitoza, posredovana s flotilinom	31
2.4.5.2 Endocitotska pot CLIC/GEEC	31
2.4.5.3 Endocitotske poti vstopa IL-2R β , IL-2R γ , Fc ϵ R1, CD59 in proteinov MHC I	31
2.4.6 Vloga dinamina pri tvorbi endocitotskih veziklov	32
2.4.7 Farmakološka inhibicija endocitoze	33
2.4.7.1 Metil- β -ciklodekstrin	34
2.4.7.2 Konkanavalin A	35
2.4.7.3 Dynasore	36
3 MATERIAL IN METODE	37
3.1 PLAZMIDNA DNA	37
3.1.1 Namnožitev in izolacija plazmidne DNA (GFP)	37

3.1.2	Določanje koncentracije in čistosti plazmidne DNA	38
3.2	GOJENJE CELIČNIH LINIJ	38
3.3	TRETIRANJE CELIC Z INHIBITORJI ENDOCITOZE	38
3.4	ELEKTRIČNO POSREDOVAN VNOS PLAZMIDNE DNA V CELICE (ELEKTROTRANSFEKCIJA)	39
3.5	DOLOČANJE USPEŠNOSTI VNOSA PLAZMIDNE DNA	40
3.5.1	Fluorescenčna mikroskopija	40
3.5.2	Pretočna citometrija	40
3.6	MERJENJE VIABILNOSTI CELIC	41
3.7	DOLOČANJE KLONOGENOSTI (PREŽIVETJA) CELIC	42
3.8	INHIBICIJA ENDOCITOZE TRANSFERINA	43
3.9	STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV	44
4	REZULTATI	45
4.1	VPLIV INHIBITORJEV ENDOCITOZE NA VIABILNOST IN KLONOGENOST CELIC	45
4.1.1	Vpliv metil-β-ciklodekstrina na viabilnost celic B16F1	45
4.1.2	Vpliv konkanavalina A na viabilnost in klonogenost celic B16F1	46
4.1.3	Vpliv dynasorja na viabilnost in klonogenost celic B16F1	47
4.2	VPLIV INHIBITORJEV ENDOCITOZE NA ELEKTRIČNO POSREDOVAN VNOS PLAZMIDNE DNA V CELICE	48
4.2.1	Vpliv metil-β-ciklodekstrina na uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1	48
4.2.2	Vpliv konkanavalina A na uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1	49
4.2.3	Vpliv dynasorja na uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1	52
4.3	VPLIV INHIBITORJEV ENDOCITOZE NA VSTOP TRANSFERINA V CELICE	52
4.3.1	Vpliv metil-β-ciklodekstrina na vstop FITC-Tf v celice B16F1	53
4.3.2	Vpliv konkanavalina A na vstop FITC-Tf v celice B16F1	54
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	56
5.1	RAZPRAVA	56
5.1.1	Vpliv inhibitorjev endocitoze na viabilnost in klonogenost celic	56
5.1.1.1	Vpliv metil-β-ciklodekstrina na viabilnost celic B16F1	56
5.1.1.2	Vpliv konkanavalina A na viabilnost in klonogenost celic B16F1	56
5.1.1.3	Vpliv dynasorja na viabilnost in klonogenost celic B16F1	57
5.1.2	Vpliv inhibitorjev endocitoze na električno posredovan vnos plazmidne DNA v celice	57
5.1.3	Vpliv inhibitorjev endocitoze na vstop transferina v celice	60
5.2	SKLEPI	62
6	POVZETEK (SUMMARY)	63

6.1	POVZETEK	63
6.2	SUMMARY	64
7	VIRI	65
ZAHVALA		
PRILOGA		

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Endocitotske poti se med seboj razlikujejo po velikosti endocitotskih veziklov, naravi tovora in mehanizmih tvorbe veziklov (Conner in Schmid, 2003: 37).	25
Sl. 2: Klatrinski triskelion (Conner in Schmid, 2003: 40).	28
Sl. 3: Struktura metil- β -ciklodekstrina (Kline in sod., 2010: 203).	34
Sl. 4: Tridimenzionalna struktura monomera konkanavalina A (Bouckaert in sod., 2000: 19779).	35
Sl. 5: Kemijska struktura dynasorja (Macia in sod., 2006: 840).	36
Sl. 6: Strukturi resazurina in resorufina (O'Brien in sod., 2000: 5425).	42
Sl. 7: Viabilnost celic B16F1 tretji in sedmi dan po izpostavitvi M β CD.	46
Sl. 8: Viabilnost celic B16F1 tretji in sedmi dan po izpostavitvi Con A ter njihova klonogenost.	47
Sl. 9: Viabilnost celic B16F1 tretji in sedmi dan po izpostavitvi dynasorju ter njihova klonogenost.	48
Sl. 10: Vpliv M β CD na uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1.	49
Sl. 11: Vpliv Con A na uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1.	50
Sl. 12: Slike celic B16F1 pri 40-kratni povečavi pod fluorescenčno svetlobo in pod vidno svetlobo pri različnih koncentracijah Con A.	51
Sl. 13: Vpliv dynasorja na uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1.	52
Sl. 14: Vpliv M β CD na vstop FITC-Tf v celice B16F1.	54
Sl. 15: Vpliv Con A na vstop FITC-Tf v celice B16F1.	55

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

B16F1	celična linija mišjega melanoma
GET	genska elektrotransfekcija (angl. gene electrotransfer)
GFP	zeleno fluorescirajoči protein (angl. green fluorescent protein)
ori	mesto začetka podvajanja
AAV	adeno-asociacijski virus
DNA	deoksiribonukleinska kislina
RNA	ribonukleinska kislina
gag	genski material, ki kodira proteine retrovirusnega jedra
pol	gen, ki pri retrovirusih kodira reverzno transkriptazo
env	gen, ki pri retrovirusih kodira proteine ovojnice
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti
SCID	huda kombinirana imunska pomanjkljivost (angl. severe combined immuno-deficiency)
SPION	super-paramagnetni nanodelci iz železovega oksida (angl. superparamagnetic iron oxide nanoparticles)
ΔV_M	sprememba transmembranskega potenciala
f	faktor oblike celice
g(λ)	funkcije prevodnosti (λ) membrane in medijev
λ	prevodnost
r	polmer celice
E	jakost električnega polja
cosθ	kosinus kota (θ) med normalo na celično membrano v obravnavani točki in smerjo električnega polja
GTP	gvanozin-5'-trifosfat
GTPaza	encim, ki veže in hidrolizira GTP
Rho GTPaza	majhen signalni G-protein, ki spada v družino Ras GTPaz in sodeluje pri znotrajcelični dinamiki aktina
Rac GTPaza	majhen signalni G-protin, ki spada v poddružino Rho GTPaz
Rac 1	majhen signalni G-protein, ki spada v Rho družino GTPaz (angl. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)
Cdc42	protein (Rho GTPaza), ki sodeluje pri regulaciji celičnega cikla (angl. cell division control protein 42 homolog)
Ras	proteinska naddružina majhnih GTPaz
GEF	gvanin nukleotid izmenjevalni faktor
PI	fosfatidil inozitol
PI-kinaza	fosfatidil inozitol kinaza
PI3-kinaza	fosfatidil inozitol 4,5-bisfosfat 3-kinaza
PI(4,5)P₂	fosfatidil inozitol 4,5-bisfosfat
PI(3,4,5)P₃	fosfatidil inozitol 3,4,5-trisfosfat
GFR	receptor za rastni faktor (angl. growth factor receptor)

EGF	epidermalni rastni faktor (angl. epidermal growth factor)
EGFR	receptor za epidermalni rastni faktor (angl. epidermal growth factor receptor)
PDGFR	receptor za rastni faktor, ki izvira iz trombocitov (angl. platelet-derived growth factor receptor)
TKV	težka klatrinska veriga
LKV	lahka klatrinska veriga
AP	adapterski protein (angl. adaptor protein)
AP1-4	štirje strukturno sorodni si adapterski proteini
hsc 70	molekulski spremjevalec (šaperon), ki sodeluje pri regulaciji različnih celičnih funkcij (angl. heat shock cognate protein 70)
GPCRs	receptorji, vezani z G-proteini (angl. G protein-coupled receptors)
BAR domena	dobro ohranjena dimerizacijska domena, pogosto prisotna pri proteinih, ki sodelujejo pri dinamiki (ukriviljanju) celičnih membran
N-BAR domena	domena pri proteinih, ki ima na N-koncu pred BAR domeno še amfifatsko vijačnico
SNX9	protein, ki sodeluje pri znotrajceličnem transportu (angl. sorting nexin 9)
GPI	glizozilfosfatidilinozitol
pH	merilo za koncentracijo hidroksidnih ionov v raztopini in posledično za kislost ali bazičnost raztopine
SV-40	polioma virus, ki ga je mogoče najti pri opicah in ljudeh (angl. Simian vacuolating virus 40 ali Simian virus 40)
CTxB	podenota B kolera toksina (angl. cholera toxin subunit B)
GM1	monosialotetraheksosilgangliozid - "prototip" gangliozid, ki deluje kot vezavno mesto kolera toksina
IL2	Interlevkin 2
CD59	glikoprotein na celični površini, ki regulira lizo celic, posredovan s komplementom
GPI-AP	glizozilfosfatidilinozitolno sidro (angl. glycosylphosphatidylinositol anchored protein)
GEEC	zgodnji endosomski razdelek, bogat z GPI-AP (angl. GPI-AP enriched early endosomal compartment)
CLIC	prenašalec, neodvisen od klatrina (angl. chlatrin-independent carrier)
ADP	adenozin difosfat
PH	domena, homologna plekstrinu
SH3	SRC homologna domena (angl. SRC homology 3 domain)
Src	ne-receptorska tirozin kinaza
IL-2R	receptor za interlevkin-2
IL-2Rβ	β veriga receptorja za interlevkin-2 (angl. β chain of interleukin-2 receptor)

IL-2Rγ	γ podenota receptorja za interleukin-2 (angl. interleukin-2 receptor subunit gamma)
FcϵR1	receptor za imunoglobulin E
MHC I	poglavitni histokompatibilnostni kompleks tipa I
IgE	imunoglobulin E
arf6	ADP-ribozilacijski faktor 6
Dyn1, Dyn2, Dyn3	izooblike dinamina
Drp1	mitohondrijski dinamin
GED	GTPazna efektorska domena
PRD	domena, bogata s prolini/arginini
MβCD	metil- β -ciklodekstrin
A431	model humanega epidermoidnega karcinoma
Cos7	modelna celična linija, pridobljena iz opičih ledvic
Con A	konkanavalin A
CRD	domena za prepoznavanje ogljikovih hidratov (angl. carbohydrate recognition domain)
pCMV-EGFP-N1	vektorski sistem, ki vsebuje gen, ki pod kontrolo citomegalovirusnega (CMV) promotorja kodira sintezo GFP
pCMV	citomegalovirusni promotor
EGFP	gen z zapisom za zeleno fluorescirajoči protein (angl. enhanced green fluorescence protein)
pUC ori	mesto začetka podvajanja v bakterijski kulturi
A_{260/280}	razmerje absorbanc pri 260 nm in 280 nm (omogoča ovrednotenje prisotnosti proteinov v vzorcih plazmidne DNA)
A_{260/230}	razmerje absorbanc pri 260 nm in 230 nm (omogoča ovrednotenje prisotnosti fenolov v vzorcih plazmidne DNA)
LB	gojišče Luria- Bertani
MEM	minimalno osnovno Eaglovo gojišče
AMEM	izboljšano gojišče MEM (angl. advanced MEM)
FBS	fetalni telečji serum
CO₂	ogljikov dioksid
EDTA	etilendiaminetetraacetna kislina
PBS	fosfatni pufer
EP	elektroporacijski pufer
PE	uspešnost nasaditve celic (angl. plating efficiency)
n_{zraslih kolonij}	število zraslih kolonij
n_{nasajenih celic}	število nasajenih celic
SF	delež preživelih celic (ang. surviving fraction)
PE_{tretirana skupina}	uspešnost nasaditve celic, tretiranih z inhibitorjem
PE_{kontrolna skupina}	uspešnost nasaditve celic kontrolne skupine
FITC	fluorescein izotiocianat (angl. fluorescein isothiocyanate)

FITC-transferin	transferin iz človeškega seruma, konjugiran s fluoresceinom
FITC-Tf	transferin iz človeškega seruma, konjugiran s fluoresceinom
VIS	elektromagnetni spekter v obsegu valovnih dolžin, ki jih človeško oko zazna (vidna svetloba)
UV	ultravijolično elektromagnetno valovanje
HUVEC	modelna celična linija humanega žilnega endotelija popkovine
HeLa	modelna celična linija humanega raka materničnega vratu
MTT	tetrazolijeva sol 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
BSC1	modelna celična linija opičjega ledvičnega epitelija
B16F10	modelna celična linija mišjega melanoma
CHO	modelna celična linija jajčnikov kitajskega hrčka (angl. Chinese hamster ovary)
¹²⁵I	radionuklid joda
MDCK II	modelna celična linija pasjega ledvičnega tkiva

1 UVOD

Električno posredovan vnos genov v celice in tkiva je ena izmed tehnologij vnašanja genskih informacij, ki veliko obeta predvsem na področju genskega zdravljenja. Tehnologija temelji na uporabi gole DNA in relativno enostavni aplikaciji električnih pulzov. Odsotnost nosilnih delcev (zlati, volframovi, nanodelci itd.) pomeni zmanjšanje možnosti neželenih strankih učinkov pri zdravljenju. Enostavna aplikacija pulzov pa predstavlja cenovno učinkovito metodo z minimalnimi stranskimi učinki (možnost opekljin). Ključnega pomena za izkoriščanje metode v terapevtske namene je poznavanje delovanja na molekularnem nivoju. Znano je, da aplikacija električnih pulzov molekulam DNA omogoči vstop v celice (Neumann in sod., 1982; Teissie in sod., 2005; Rosazza in sod., 2012). Kaj točno se pri tem procesu dogaja na molekularnem nivoju pa še ni popolnoma znano. Predvsem za razvoj tehnologije v terapevtske namene je izredno pomembno, da je znan način vstopa molekule DNA v notranjost celice, njena pot do jedra celice ter interakcija molekul DNA z dednim materialom celice.

Predhodne raziskave so pokazale, da izpostavitev celic električnemu polju sproži intenzivno uvihavanje plazemske membrane, značilno za procese endocitoze (Antov in sod., 2004), ter da izpostavitev celic metil- β -ciklodekstrinu tik pred izpostavitvijo polju zmanjša učinkovitost vnosa plazmidne DNA v celice (Rosazza in sod., 2012).

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA

Namen diplomskega dela je bil preveriti vpliv treh farmakoloških inhibitorjev endocitoze na učinkovitost električno posredovanega vnosa plazmidne DNA v celice.

Naša hipoteza je bila, da metil- β -ciklodekstrin, konkanavalin A in dynasore zmanjšajo učinkovitost električno posredovanega vnosa plazmidne DNA v celice mišjega melanoma B16F1. Za model smo vzeli plazmidno DNA, ki kodira gen za zeleno fluorescirajoči protein (GFP). Predpostavili smo, da bomo iz pridobljenih podatkov o učinkovitosti izražanja gena za GFP lahko sklepali o vlogi specifičnih poti endocitoze pri električno posredovanem vnosu genov v celice.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GENSKO ZDRAVLJENJE

Razvoj tehnologije rekombinantne DNA je omogočil izolacijo genov in določitev nukleotidnih zaporedij. Poznavanje zaporedja omogoča genetske manipulacije, s katerimi je mogoče spremeniti genotip organizma. Vnašanje spremenjenih genov v organizme je osrednja tema bazičnih genetskih raziskav, razvitih pa je tudi nekaj komercialno uporabnih aplikacij. Spreminjanje genotipov in fenotipov organizmov s tehnologijami rekombinantne DNA se imenuje genski inženiring (Griffiths in sod., 2008). Razvoj tehnologij genskega inženiringa je potekal predvsem na bakterijah in se kasneje razširil na evkariontske modelne organizme. Danes kloniranje in določanje nukleotidnega zaporedja evkariontskih genov še vedno v veliki meri poteka v bakterijskih gostiteljih, kljub temu da se jih kasneje vnese v evkariontski organizem, ki izvira iz iste ali druge vrste kot donor gena. Preneseni gen imenujemo transgen, spremenjeni organizem pa transgenski organizem (Griffiths in sod., 2008). Za vnos transgena v evkariontsko celico obstajajo številne metode kot so transformacija, injiciranje, bakterijska ali virusna infekcija in obstreljevanje z volframovimi ali zlatimi delci, prevlečenimi z DNA. Ko transgen vstopi v celico, potuje do jedra, kjer se mora vključiti v kromosom, da postane stabilen del genoma, ali pa se (le v nekaterih vrstah) podvaja kot del plazmida. Pri vključitvi lahko transgen nadomesti originalen gen ali se vključi ektopično na drugih lokacijah v genomu. Transgeni iz drugih vrst se običajno vključijo ektopično (Griffiths in sod., 2008).

Tehnologije genskega inženiringa je mogoče uporabiti za zdravljenje genskih bolezni, torej bolezni, katerih vzrok je okvara gena. Gensko zdravljenje je zdravljenje ali preprečevanje bolezni z uporabo tehnologije prenosa nukleinskih kislin (RNA ali DNA) v telesne celice posameznikov (ali živali). Terapevtski učinek se doseže s popravljanjem genske motnje ali pa s čezmernim izražanjem terapevtsko učinkovitih proteinov (Kreft in sod., 2007; Somiari, 2005). Zdravi se lahko prirojene genske bolezni (dedne bolezni), kot je na primer cistična fibroza in pridobljene genske bolezni, kot je na primer rak (Kreft in sod., 2007). Prvotno je bilo gensko zdravljenje usmerjeno v zdravljenje monogenskih nepravilnosti, danes pa večina kliničnih študij poteka na področjih zdravljenja raka in okužb z virusom HIV. Tudi te je namreč mogoče vsaj deloma obrazložiti s spremembami genov in njihovega izražanja (Dobbelstein, 2003). Strategije genskega zdravljenja teh bolezni se razlikujejo od klasičnega pristopa, pri katerem se z vnesenim genskim materialom doda funkcionalen gen ali zamenja okvarjeni gen. Bolj kot vzpostavljanje normalnega genotipa z genskim zdravljenjem, se pri raku uporablja indukcijo apoptoze, imunoterapijo, inhibicijo angiogeneze, onkolitsko viroterapijo in samomorilske gene (Kreft in sod., 2007; Dobbelstein, 2003; Patil in sod., 2005). Pristopi genskega zdravljenja okužbe z virusom HIV med drugimi obsegajo dominantne negativne mutirane proteine, znotrajcelična

protitelesa, protismiselno RNA, ribocime, RNA vabe, interferenčno RNA in s HIV aktivirane T-celične receptorje (Kreft in sod., 2007).

Cilj vsake metode genskega zdravljenja je enostaven netoksičen vnos eksogene dednine v tarčna tkiva. V tkivu mora dednina učinkovito vstopati v celice in potovati proti jedru. Pomembno je, da se z interakcijami tuje dednine z gostiteljevimi regulatornimi faktorji doseže dolgotrajno izražanje (Somiari, 2005). Gensko zdravljenje je kompleksen proces, ki vključuje dostavo terapevtskih genov do organov, tkivno ciljanje, celični promet, uravnavanje ravni in trajanja genskega izražanja, biološko aktivnost terapevtskih proteinov ter varnost vektorskih sistemov in genskih produktov (Kreft in sod., 2007). Tehnične ovire, ki so se pojavile pri razvoju genskega zdravljenja niso neznatne, a bodo z nadaljnjjim razvojem verjetno premagane. Eden izmed problemov je učinkovita dostava transgena do tarčnega tkiva. Drug problem predstavlja sestava transgena, ki mora dosledno omogočati visok nivo izražanja. Ravno tako pa je pomembna tudi problematika morebitnih škodljivih stranskih učinkov, ki jih lahko povzroči napačno izražanje transgena (Griffiths in sod., 2008).

Gensko zdravljenje ima posamezne prednosti pred obstoječimi terapevtskimi zdravili (nizkomolekularnimi učinkovinami ter ostalimi biološkimi zdravili):

- popravljanje genskih vzrokov bolezni,
- selektivno zdravljenje obolelih celic in tkiv (celice in tkiva sama proizvajajo svoje zdravilo),
- dolgotrajno zdravljenje po enkratnem vnosu zdravila (Kreft in sod., 2007).

Glede na to, kaj se dogaja z vneseno molekulo DNA v celici, lahko gensko zdravljenje razdelimo na sledeče načine:

- Nespecifična vstavitev funkcionalnega gena. Pri tem celoten gen, skupaj z ustreznim promotorjem, vključimo v katerikoli del genoma.
- Vstavitev funkcionalnega gena na mesto okvarjenega gena. Pri tem novi gen s homologno rekombinacijo nadomesti (zamenja) okvarjenega in ga s tem odstrani.
- Popravilo z reverzno mutacijo, pri kateri v mutiranem genu spremenimo samo okvarjeno mesto, da ponovno nastane funkcionalna oblika gena (Kreft in sod., 2007).

Najpomembnejši korak pri genskem zdravljenju je vnos DNA v celice, za kar lahko uporabimo različne metode oz. vektorje:

- virusni vektorji (njapogosteje uporabljeni),
- nevirusni sistemi kot so na primer elektroporacija, biolistika, visokotlačno injiciranje, sonoporacija in magnetofekcija (Kreft in sod., 2007; Somiari, 2005).

Glede na lokacijo celic, v katere gen vnašamo, poznamo dva poglavitna tipa genskega zdravljenja:

- *Ex vivo* gensko zdravljenje, pri katerem bolniku odvzamemo celice organa, v katerem se genska motnja izraža. Odvzete celice gojimo v celični kulturi in jih gensko modificiramo (vnesemo DNA). Nato preverimo, v katerih celicah je bil vnos uspešen in ali se je DNA vključila na primerno mesto v genomu. Tako ozdravljene celice vrnemo v bolnikovo telo.
- *In vivo* gensko zdravljenje, pri katerem tujo dednino v primernem dostavnem sistemu vnesemo neposredno v bolnikovo telo (Kreft in sod., 2007; Somiari, 2005).

2.2 PRIPRAVA DNA KONSTRUKTOV ZA GENSKO ZDRAVLJENJE

Pri izdelavi rekombinantne DNA se donorsko DNA razreže na fragmente, ki se jih nato veže s posameznimi vektorskimi DNA. Pogosto se za vektorsko DNA uporablja bakterijske plazmide ali virusno DNA. Za rezanje donorske in vektorske DNA se uporabi isto restriktionsko endonukleazo za specifična zaporedja. Vektorsko in donorsko DNA se nato združi, kar omogoči tvorbo kovalentnih fosfodiestrskih vezi in s tem intaktno fosfatno-sladkorno ogrodje za vsako od verig DNA (Griffiths in sod., 2008). Vektor-donor DNA konstrukt se pomnoži v gostiteljskih celicah s preusmeritvijo osnovnega replikacijskega mehanizma celice v pomnoževanje rekombinantnih molekul. V ta namen mora vektor vsebovati vse potrebne signale za primerno replikacijo in segregacijo v gostiteljski celici. Za plazmidne sisteme mora vektor vsebovati mesto pričetka podvajanja (ori) in selekcijske označevalce, kot je rezistenca na antibiotik, ki zagotovi, da gostiteljska celica obdrži plazmid. Rezultat pomnoževanja je mnogo kopij (klonov) vsakega rekombinantnega DNA konstrukta. Za določitev specifičnega klonu je potreben pregled celotne genomske knjižnice (Griffiths in sod., 2008). Na ta način pripravljeni plazmidi so konstrukt visoke molekulske teže, zgrajeni iz dvoverižne DNA, ki vsebujejo transgene z zapisi za specifične proteine (Patil in sod., 2005).

2.3 METODE VNOSA GENOV (VEKTORJI)

Metode vnosa terapevtskih genov za gensko zdravljenje morajo biti varne in učinkovite. Gene je potrebno dostaviti v tarčne celice, v katerih bo potekala genska ekspresija. Vsaka metoda vnosa genov mora zato izpolnjevati sledeče zahteve:

1. transgen mora zaščititi pred razgradnjo z nukleazami v zunajceličnem matriksu in olajšati difuzijo transgena v matriksu;
2. omogočiti mora prehod transgena preko plazemske membrane tarčne celice;
3. olajšati mora znotrajcelično migracijo transgena proti jedru in zmanjšati razgradnjo transgena z znotrajceličnimi nukleazami;
4. omogočiti mora prehod transgena preko jedrne ovojnice (Escoffre in sod., 2010; Gao in sod., 2007).

Pri kliničnih študijah se v splošnem uporablja predvsem rekombinantne virusne vektorje zaradi njihove učinkovitosti pri vnosu genov in sposobnosti indukcije visoke in dolgotrajne genske ekspresije v različnih tkivih. Razlog za tako dobro učinkovitost so infekcijske sposobnosti, ki jih regulirajo virusni proteini. Prav ti proteini lahko povzročijo imunske odzive, ki onemogočijo ponovno aplikacijo (vnašanje) virusnega vektorja in zmanjšajo učinkovitost vnosa genov. Poleg tega lahko retrovirusni in lentivirusni vektorji z integracijo v gostiteljski genom povzročijo insercijske mutacije. Zaradi rekombinacij lahko nastanejo tudi virusi sposobni replikacije. V nasprotju z virusnimi vektorji so DNA plazmidi zgolj kovalentno zaprte krožne dvostranske molekule DNA brez vezanih proteinov. Plazmidne DNA molekule so bolj enostavne, lažje jih je masovno proizvajati in so bolj varne kot virusni vektorji. Zaradi manjše imunogenosti in nezmožnosti integracije so plazmidne DNA molekule primerne za gensko zdravljenje, če je možen varen in tarčen vnos (Escoffre in sod., 2010).

2.3.1 Virusni vektorji za vnos genov

Nekateri virusi so učinkoviti dostavnici sistemov (vektorjev) za vnos genov, vendar lahko njihova uporaba povzroči neželene stranske učinke. Poleg tega je lahko pacient zaradi predhodne izpostavljenosti na virus odporen, zato virusnega sistema ni mogoče uporabiti za gensko zdravljenje na dolgi rok. Običajno se virusne vektorje pripravi tako, da se odstrani patogene dejavnike (elemente), ohrani pa se virusne elemente, ki omogočajo učinkovit vnos in izražanje genov. Pri izdelavi virusnih vektorjev je predvsem potrebno doseči varnost in primerno biološko aktivnost. Potrebno je odstraniti virulenčne gene in parentalne (izhodne) viruse, ki so sposobni replikacije (Somiari, 2005). Čeprav je uporabnost virusnih vektorjev mogoče oceniti z *in vitro* poskusom, je lahko njihovo obnašanje v pogojih *in vivo* drugačno. Mnoge celice, ki se jih uporablja v *in vitro* poskusih, so namreč transformirane, pa tudi primarne celice nimajo vedno enakih fenotipov v pogojih *in vitro* kot *in vivo*. Zaradi tega so nujno potrebne *in vivo* raziskave na živalih, ki omogočajo oceno sposobnosti vektorja za ciljanje celic in organov, učinkovitosti, specifičnosti in trajanja genskega izražanja ter verjetnost toksičnosti in povzročitve imunskega vnetnega odgovora gostitelja (Somiari, 2005; Patil in sod., 2005).

Virusni vektorski sistemi, ki se najpogosteje uporabljajo za gensko zdravljenje pri človeku so retrovirusni, adenovirusni in adeno-asociacijski vektorji (Griffiths in sod., 2008, Patil in sod., 2005).

2.3.1.1 Retrovirusni vektorji

Retroviruse delimo na osnovi genomske kompleksnosti v dve skupini: enostavne retroviruse (npr. onkogeni retrovirusi) in kompleksne retroviruse (npr. lentivirusi) (Kreft in

sod., 2007; Escors in Breckpot, 2010). Enostavni retrovirusi vsebujejo le tri gene, gag, pol in env, medtem ko kompleksni vsebujejo številne dodatne proteine, ki so odgovorni za uravnavanje virusnega podvojevanja in vplivajo na imunski odziv gostitelja. Na osnovi skupnih vzorcev patogeneze pa lahko retroviruse razdelimo na tri osnovne poddružine: onkogene retroviruse, lentiviruse in spumaviruse (Kreft in sod., 2007).

Retrovirusi so majhni RNA virusi, ki se replicirajo preko vmesne DNA spojine. Celice inficirajo s specifično interakcijo med proteinom virusne ovojnice in "receptorjem" na površini tarčne celice. Virus nato vstopi v celico kjer se njegova RNA reverzno prepiše v provirusno dvostranski DNA. Tako nastala dvostranski DNA nato potuje v jedro, kjer se stabilno vgradi v genom gostiteljske celice (Somiari, 2005). Pri večini retrovirusov sta za vstop virusnega genoma v jedro potrebna mitoza in razpad jadrne ovojnice, kar pomeni, da lahko inficirajo zgolj proliferajoče celice, kot so krvne celice (Griffiths in sod., 2008; Somiari, 2005). Ta lastnost močno omeji uporabo retrovirusnih vektorjev za zdravljenje mnogih dednih okvar, ki prizadenejo tkiva, v katerih se celice redko ali nikoli ne delijo (Griffiths in sod., 2008).

Retrovirusni vektorji so vstavljeni v virusne delce, odstranjeni so virulenčni geni, a vsebujejo virusna regulatorna zaporedja. Zaradi integracije v gostiteljski genom, je ekspresija transgena stabilna in dolgotrajna. Retrovirusni vektorji so relativno majhni, kar predstavlja pomembno omejitev pri njihovi uporabi za gensko terapijo, pri kateri je potreben vnos genov večjih od 8 kb (Somiari, 2005).

V zadnjih letih so raziskave osredotočene predvsem na uporabo lentivirusnih vektorjev, ki ne vsebujejo virusnih proteinov in virusov zmožnih replikacije in omogočajo transdukcijo nedelečih celic. To omogoča aktiven transport virusnega genoma v jedro gostiteljske celice. Lentivirusni vektorji lahko povzročijo insercijsko mutagenezo, a manj pogosto kot vektorji, pripravljeni iz preprostih retrovirusov. Razlog za to so najverjetnejše drugačni integracijski vzorci. Prednosti uporabe lentivirusnih vektorjev sta dobra transdukcija in stabilna ekspresija tako pri delečih kot tudi nedelečih celicah, tako v *in vitro* kot tudi *in vivo* pogojih. V prvi klinični študiji so lentivirusne vektorje uporabili za gensko zdravljenje HIV. Na živalskih modelnih organizmih pa so lentivirusne vektorje testirali za zdravljenje β-talasemije, SCID, Wiskott-Aldrichevega sindroma, hemofilije, metakromatske levkodistrofije, Fanconijeve anemije in bolezni jeter (Escors in Breckpot, 2010).

2.3.1.2 Adenovirusni vektorji

Adenovirus običajno okuži respiratorni epitelij, pri čemer injicira svoj genom v epitelne celice na površini pljuč. Virusni genom se ne vključi v kromosom, vendar se v celici obdrži. Vektor tako ne povzroči inaktivacije rezidentnega gena. Prednost adenovirusnih

vektorjev predstavlja sposobnost teh virusov, da inficirajo tudi celice, ki se ne delijo, kar pomeni, da so dovezeta praktično vsa tkiva. Adenovirusni vektor je primerna izbira za zdravljenje cistične fibroze, bolezni respiratornega epitelija (Griffiths in sod., 2008).

2.3.1.3 Adeno-asociacijski virusni vektorji

Adeno-asociacijski virusni vektorji (AAV, angl. adeno-associated virus) niso povezani z nobeno poznano človeško boleznijo. Rekombinantni AAV vektorji imajo majhne enoverižne DNA genome. Med replikacijo se lahko vključijo v gostiteljski genom, kar omogoča stabilno transdukcijo tarčne celice. Ti virusi inficirajo tako deleče, kot tudi nedeleče se celice. AAV vektorji niso tako dobro proučeni kot retrovirusni in adenovirusni vektorski sistemi, vendar se zdi, da je njihova uporaba bolj varna. Odstranjena so namreč vsa zaporedja, ki kodirajo virusne proteine in posledično je tveganje imunskega odziva na vektor manjše. Nerešena ostajata problema insercijskih mutacij in razmnoževanja virusov, sposobnih replikacije (Somiari, 2005).

2.3.2 Fizikalne metode vnosa genov

Fizikalne metode vnosa genov omogočajo neposreden vnos majhnih in velikih molekul DNA in drugih nepermeabilnih molekul v citosol. Z uporabo fizikalnih metod se je mogoče izogniti mnogim stranskim učinkom, ki jih povzročajo virusne in biokemijske metode, poleg tega je mogoča večkratna aplikacija zdravil ali DNA. Za razliko od virusnih in kemijskih vektorjev dolžina kodirajočega zaporedja pri vnosu s fizikalnimi vektorji ni omejena. Največji izziv fizikalnih pristopov je doseganje enakega nivoja genskega vnosa kot ga dosegajo z vnosom z virusnimi vektorji (Villemejane in Mir, 2009).

Vse metode vnosa genov (virusne in ne-virusne) morajo zagotavljati uspešnost dveh procesov. Prvi nujen proces je dostava nukleinskih kislin do tarčnih celic. Virusi imajo za to naravne predispozicije. Naprednejši kemični vektorji, ki so neprepoznavni za obrambne mehanizme telesa, so zmožni prepoznavanja specifičnih antigenov na površini celic in s tem prepoznavanja tarčnih celic. Pri fizikalnih metodah se večinoma uporablja gola DNA, zato je potrebno poskrbeti za njen dostavo do tarčnega tkiva. Poleg tega v tkivih spontana difuzija molekul DNA ne poteka in je potrebno vzpostaviti sisteme aktivnega transporta, ki omogočijo potovanje DNA znotraj tkiva do posameznih celic. Drugi proces, potreben za uspešen vnos genov, je prehod nukleinskih kislin skozi plazemske membrane v celico. Medtem ko virusi to dosežejo z naravnimi mehanizmi, morajo kemični in fizikalni vektorji povzročiti spremembe v plazemske membrane (npr. fizikalni vektorji) in/ali notranjih vezikularnih membranah (npr. kationski lipidi po vključitvi v endosome) (Villemejane in Mir, 2009). Uspešen vnos genov (ali zdravil) v celice s fizikalnimi metodami torej zahteva kombinacijo dveh procesov. Metoda mora inducirati reverzibilne spremembe v plazemske

membrani, ki omogočijo neposreden vstop molekul v celični citosol in omogočiti kontakt med DNA in membrano oziroma olajšati njihov vstop v notranjost celice. Odvisno od izbora fizikalne metode je ta dva procesa mogoče doseči istočasno (npr. biolistične metode, visokotlačno injiciranje, hidrodinamično injiciranje) ali v več korakih (npr. sonoporacija, magnetofekcija in elektroporacija) (Villemejane in Mir, 2009).

2.3.2.1 Biolistika (genska pištola)

Pri biolističnih metodah se v celice izstrelji delce iz težke kovine, ki so obdani z golo plazmidno DNA. Tarčna tkiva ali celice tako permeabilizirajo majhne kroglice iz biokompatibilne težke kovine (zlato ali volfram), s premerom od 1 µm do 5 µm, ki so obdane z želenim plazmidom. Delce se pospeši z izpustom plina iz genske pištole (Villemejane in Mir, 2009; Escoffre in sod., 2010). Prednost te tehnologije je v neposrednem transportu DNA v citosol, pri čemer se DNA ne poškoduje med penetracijo v celice, kakor je to običajno pri transportu z endosomi (Villemejane in Mir, 2009). Uspešnost transfekcije z biolistiko omogoča penetracija kovinskih delcev v celično jedro kar omogoča dolgotrajno ekspresijo transgena. Poglavitna omejitev uporabe je plitva penetracija kovinskih delcev, ki ne dosežejo celotnega tkiva (Villemejane in Mir, 2009; Escoffre in sod., 2010). Pogosto je za dostop do tarčnega tkiva potrebna operacija, zato se metodo večinoma uporablja za vnos genov v celice kože (Villemejane in Mir, 2009).

2.3.2.2 Visokotlačno injiciranje (angl. jet injection)

Visokotlačno injiciranje je balistična metoda, pri kateri se lokalno injicira tekočino z aparaturom, ki s pomočjo visokega tlaka pospeši mikroskopsko majhne kapljice tekočine, da le-te penetrirajo kožo ali mukozno membrano. Metoda se uporablja za injiciranje molekul (zdravil, nukleinskih kislin), raztopljenih v tekočini, brez uporabe igle ali delcev. Njena prednost je zmanjšanje nevšečnosti za bolnike. Hitrost tekočine prispeva k penetraciji v kožo, premer curka in injiciranega volumna pa sta omejujoča faktorja za globino penetracije raztopine (Villemejane in Mir, 2009).

2.3.2.3 Ultrazvočno posredovan vnos genov (sonoporacija)

Sonoracija je metoda, pri kateri se za izboljšanje vnosa velikih molekul v celice izkorišča aplikacija ultrazvoka, ki povzroči permeabilizacijo celičnih membran. V terapevtske namene se ultrazvočno aparaturom upravlja pri frekvencah od 1 MHz do 3 MHz (ali nižjih) in intenzitetah od $0,5 \text{ W/cm}^2$ do 3 W/cm^2 . V diagnostične namene se uporablja višje frekvence (3,5-40 MHz) in nižje intenzitete. Pri terapevtskih študijah se injicira plazmidno DNA, nato sledi iradiacija tkiva z ultrazvokom. Ultrazvok je primeren za

klinično uporabo (vnos kemoterapevtikov, trombolitičnih zdravil in genov), saj je metoda neinvazivna, omogoča dobro penetracijo skozi mehko tkivo, ne poškoduje celic ali tkiv (pri primernih intenzitetah) in ne vpliva na integriteto DNA. Slabost te tehnologije je, da lahko povzroči okvaro citoskeleta ter s tem povzroči spremembe pri mehanizmih kot je na primer potovanje DNA znotraj celic (Villemejane in Mir, 2009).

2.3.2.4 Magnetno posredovan vnos genov (magnetofekcija)

Magnetofekcija temelji na vnosu paramagnetičnih nanodelcev, obdanih s plazmidno DNA, v celice ali tkiva pod vplivom močnih magnetnih polj. Pri tem postopku se najprej lokalno injicira s plazmidno DNA prevlečene nanodelce, nato se aplicira magnetno polje. Transfekcija je hitrejša pri večjih paramagnetičnih nanodelcih (npr. 375 nm v premeru) kot pri majhnih (npr. 185 nm ali 240 nm). Večji paramagnetični delci se namreč izognejo vstopu v celice po lizosomski poti in sprostijo DNA v bližini jedra (Escoffre in sod., 2010). Za magnetofekcijo se uporablajo tudi super-paramagnetični nanodelci iz železovega oksida (SPION, angl. super-paramagnetic iron oxide nanoparticles) s premerom 50 nm. Metoda temelji na uporabi kationskih polimerov, ki jih je mogoče z elektrostatskimi interakcijami vezati z delci SPION in DNA ali RNA. Pri tem nastanejo stabilni kompleksi v katerih je DNA zaščitena pred razgradnjo. SPION delce je mogoče uporabljati z virusnimi vektorji, kot so paramiksovirusi. Magnetni delci omogočajo hitro kinetiko učinkovite transfekcije, a njihov vpliv na celične funkcije ni dobro poznan. Trenutno je tehnologija v fazi razvoja za uporabo *in vivo* (Villemejane in Mir, 2009).

2.3.2.5 Električno posredovan vnos genov (elektroporabilizacija, elektroporacija)

Elektroporacija je fizikalna metoda vnosa makromolekul v celice in tkiva, pri kateri se povečanje prepustnosti membrane doseže s kontroliranim delovanjem električnega polja (Čemažar in Serša, 2007; Kotnik in sod., 2005; Markelc in sod., 2012). Pri reverzibilni elektroporaciji se inducira prehodne strukturne spremembe, kar omogoča ciljni vnos majhnih molekul (npr. zdravila, ioni, barvila, sladkorji) in makromolekul (npr. nukleinske kisline) v tarčne celice, vključevanje proteinov v membrano ali fuzijo celic. Pri irreverzibilni elektroporaciji na celice deluje električno polje previsoke jakosti, kar povzroči stabilne spremembe na membrani. Metoda se zato izkorišča za aplikacije, pri katerih je cilj uničenje tarčnih celic (npr. tumorjev) (Neumann in sod., 1982; Maček Lebar in sod., 1998; Teissie in sod., 2005; Kotnik in sod., 2005; Miklavčič in Puc, 2006; Escoffre in sod., 2007; Serša in sod., 2008; Pavlin in sod., 2012).

Medij v celični notranjosti, kjer se odvijajo vse biokemijske reakcije, potrebne za življenje, je bogat z ioni in visoko prevoden. Prav tako je, vsaj pri živalskih celicah, visoko prevoden zunanji medij, naj bo to gojišče v *in vitro* pogojih ali biološke tekočine v pogojih *in vivo*.

Plazemska membrana, ki ločuje celično notranjost od zunanjega okolja, je neprevodna. V električnem polju se vsi naboji znotraj in zunaj celice elektroforetsko premestijo, vendar se njihovo gibanje ustavi ob plazemski membrani. Nasprotni naboji se tako akumulirajo na obeh straneh membrane, kar inducira spremembo transmembranskega potenciala (Mir, 2009). Sprememba transmembranskega potenciala je premosorazmerna jakosti električnega polja in velikosti celice ter je odvisna od položaja na membrani. V obravnavani točki celične membrane se električno inducirana spremembra transmembranskega potenciala, ΔV_M , poveča v skladu z enačbo:

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

pri kateri je f faktor oblike celice, g predstavlja kompleksne funkcije prevodnosti (λ) membrane in medijev, r predstavlja polmer celice, E jakost električnega polja in θ predstavlja kot med normalo na celično membrano v obravnavani točki in smerjo električnega polja (Kotnik in sod., 1997, 2005; Maček Lebar in sod., 1998; Rols in Teissie, 1998; Kotnik in Miklavčič, 2000; Teissie in sod., 2005; Miklavčič in Puc, 2006; Escoffre in sod., 2007, 2009; Mir, 2009; Čemažar in sod., 2015).

Zaradi odvisnosti spremembe transmembranskega potenciala od kota, je vpliv polja na celico odvisen od lokacije na površini. Ena stran celice je tako hipopolarizirana, druga stran depolarizirana (Teissie in sod., 2005; Escoffre in sod., 2009). Makromolekule (protitelesa, encimi, nukleinske kisline, nekatera zdravila) vstopajo v celice le, če so prisotne med aplikacijo električnega polja (Wolf in sod., 1994; Maček Lebar in sod., 1998) in le na območjih celične površine, kjer spremembra transmembranskega potenciala presega kritično vrednost (Rols in Teissie, 1998). Kritična vrednost je odvisna od pogojev in znaša od 200 mV do 1 V (Teissie in Rols, 1993; Maček Lebar in sod., 1998; Teissie in sod., 2005; Miklavčič in Puc, 2006; Escoffre in sod., 2007, 2009).

Plazmidi, ki so prisotni med pulziranjem, v celice vstopajo približno 1 minuto po pulziranju. Pri aplikaciji niza pulzov enake polarnosti plazmidi vstopajo v celico zgolj na strani celice, ki je obrnjena proti katodi. V primeru menjavanja polarnosti elektrod med vsakim pulzom, plazmidi vstopajo v celice tudi na strani anode. Ta pojav nakazuje, da za akumulacijo DNA ob membrani niso odgovorne elektroforetske sile, ampak stabilne interakcije med DNA in permeabilizirano membrano (Golzio in sod., 2002; Susil in sod., 1998). Spreminjanje polarnosti ali orientacije električnih pulzov nima velikega vpliva na permeabilizacijo, vendar zviša nivo transfekcije, zaradi povečanja površine celične membrane, s katero DNA interagira (Escoffre in sod., 2009).

Intenzivnost elektroporacije nadzorujemo s pravokotnimi električnimi pulzi, s tem ko poleg amplitude pulza definiramo tudi trajanje, število in ponovitveno frekvenco pulzov (Neumann in sod., 1982; Maček Lebar in sod., 1998; Teissie in sod., 2005; Kotnik in sod.,

2005; Miklavčič in Puc, 2006; Escoffre in sod., 2007; Pavlin in sod., 2012). Jakost električnega polja določa področje membrane, kjer bo prišlo do permeabilizacije (makrodomene). Gostota permeabilnih struktur (mikrodomen) znotraj makrodomen, kjer dejansko pride do permeabilizacije je odvisna od števila in trajanja pulzov (Wolf in sod., 1994; Rols in Teissie, 1998; Teissie in sod., 2005; Escoffre in sod., 2009). Pri jakosti električnega polja, ki je višja ali enaka pragovni, tako povečanje števila pulzov kot tudi nadaljšanje trajanja pulzov izboljša učinkovitost permeabilizacije, a le do nekega platoja, ki ga dosežemo že pri relativno majhni vrednosti tako trajanja kot števila pulzov. Permeabilizacija je bolj učinkovita, če je čas med posameznimi pulzi krajsi. Pri dovolj veliki frekvenci pulzov (npr. 1 Hz) proces popravila membrane med pulzi ne poteka, zato nadaljnji pulzi prispevajo k večji intenziteti permeabilizacije področja (Wolf in sod., 1994; Maček Lebar in sod., 1998; Miklavčič in Puc, 2006).

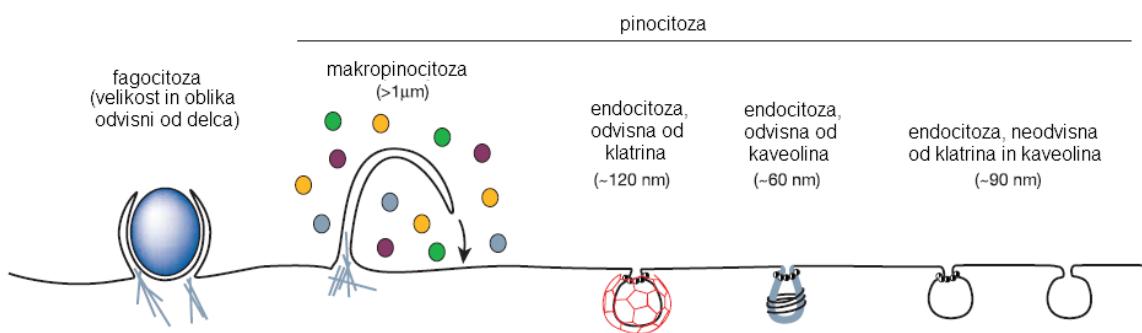
Optimalni pogoji za elektropermeabilizacijo, pri kateri se ohrani primerno viabilnost celic so zmerna intenziteta (jakost) električnega polja in dolgo trajanje pulza. Učinkovitost permeabilizacije je podobna pri majhnem številu kratkotrajnih pulzov visoke jakosti in pri večjem številu dolgotrajnih pulzov zmerne jakosti, vendar slednji pogoji celice manj poškodujejo (Rols in Teissie, 1998).

Za učinkovitost elektropermeabilizacije so najpomembnejši parametri električnega polja, vendar je pri izvajanju eksperimentov potrebno nadzorovati tudi druge eksperimentalne parametre. Možnosti nadzora le-teh se razlikujejo od pogojev, kot so npr. pogoji *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* (ter *in ovo* in *in situ*). Pri pogojih *in vitro* je praktično mogoče dobro nadzorovati vse pogoje, kot so velikost, oblika in orientacija celic, gostota in prevodnost celične suspenzije ter osmotski tlak in temperatura. Drugače je pri pogojih *in vivo*, saj so prisotne histološke in anatomske strukturne raznolikosti tkiv in fiziološko stanje celo pri poskusnih živalih iste vrste (Miklavčič in Puc, 2006; Escoffre in sod., 2009). Iz enačbe 1 je razvidno, da so velike celice na dano vrednost jakosti električnega polja bolj občutljive kot majhne (Miklavčič in Puc, 2006; Escoffre in sod., 2009). Z naraščanjem gostote pri dani vrednosti jakosti električnega polja delež permeabiliziranih celic upada, kar je posledica interakcij med celicami (Susil in sod., 1998; Miklavčič in Puc, 2006; Puciha in sod., 2007). Prevodnost celične suspenzije in osmotski tlak je v *in vitro* pogojih mogoče spremenjati z uporabo različnih medijev, v katerih so celice suspendirane tekom eksperimenta. Z znižanjem prevodnosti celične suspenzije se zviša delež preživelih celic. Vnos snovi v celice je boljši, če so celice pred aplikacijo električnega polja pri temperaturi mešanice vode in ledu (4 °C). Po aplikaciji električnih pulzov je najprimernejša inkubacijska temperatura 37 °C, kar poveča učinkovitost elektroporacije, preživetje pa je pri tej temperaturi največje (Rols in sod., 1994; Maček Lebar in sod., 1998; Antov in sod., 2004; Miklavčič in Puc, 2006). Temperatura močno vpliva predvsem na procese popravil membrane. Pri viabilnih elektroporiranih celicah, vzdrževanih pri 4 °C, je namreč stanje permeabilizacije mogoče zaznati še po več urah (Teissie in sod., 2005).

Mehanizem reverzibilne elektropermeabilizacije membrane, ki se ga izkorišča za vnos plazmidne DNA v celice, razlagajo različni teoretični modeli, molekularna definicija prehodnih permeabilnih struktur pa še ni poznana. Vse več je dokazov, da električno polje povzroči nastanek 1 – 20 nm velikih hidrofilnih por v celični membrani. Le-te omogočajo prehod preko celične membrane hidrofilnim molekulam, ki pri normalnih pogojih ne prehajajo preko membrane. Ta model ne pojasnjuje prehoda makromolekul, ki so večje od velikosti por, a kljub temu ostaja najverjetnejša razlaga začetnih procesov elektropermeabilizacije membrane. Raziskave so pokazale, da električno polje, ki lahko teče skozi nastale pore, povzroči elektroforetsko potovanje molekul DNA proti poram. Prisotnost plazmidne DNA ob membrani omogoči interakcije med DNA in permeabiliziranim delom membrane v prisotnosti električnega polja. Količina akumulirane DNA v agregatih je odvisna od kumulativnega trajanja pulzov in prisotnosti dvovalentnih kationov. Le-ti verjetno delujejo kot nabiti mostički, ki zmanjšujejo elektrostatski odboj med negativno nabitimi molekulami DNA in membrano. Plazmidna DNA je na ta način vključena v strukture na membrani, ki še niso definirane, in je s tem tudi zaščitena pred razgradnjo z DNazami. Te strukture nastanejo v roku ene minute, plazmidna DNA pa ostane vezana na površino celice še nekaj minut po zaključku pulziranja (Rosazza in sod., 2016b; Rols in Teissie, 1998; Golzio in sod., 2002; Tieleman, 2004; Escoffre in sod., 2009, 2010). Področja na plazemski membrani, v katerih se DNA akumulira v aggregate, po lokaciji, velikosti in številu sovpadajo s področji, v katerih se v notranjosti celic skoncentrirajo aktinski filamenti. Področja z aktinskimi filamenti nastanejo približno 5 minut po aplikaciji električnih pulzov in nastanejo samo, kadar je med aplikacijo pulzov prisotna tudi DNA. Aktinski citoskelet ima pomembno vlogo pri začetnih procesih vstopa DNA v celice in je nujno potreben za doseganje optimalnega izražanja DNA, a lahko predstavlja limitirajoč faktor v poznejših fazah vnosa plazmidne DNA (Rosazza in sod., 2011). Nedavne raziskave kažejo, da DNA agregati membrano dokončno prečkajo in v celice vstopajo s procesom endocitoze (Čemažar in sod., 2015; Rosazza in sod. 2016b). Molekule, ki delujejo kot DNA receptorji in omogočijo vključitev plazmidov v permeabilizirano membrano ter tipi endocitoze, ki sodelujejo pri prenosu plazmidne DNA v celice še niso povsem poznani (Rosazza in sod., 2016b). Rosazza in sodelavci (2013) so z opazovanjem posameznih DNA agregatov dokazali da le-ti v notranjost celice potujejo z aktivnim transportom (Rosazza in sod., 2013). Ker z opazovanjem posameznih DNA agregatov ni mogoče sklepati o tem ali agregati potujejo v notranjost celic znotraj veziklov ali kot gola DNA so Rosazza in sodelavci (2016a) zastavili nadaljnje poskuse z inhibitorji endocitoze ter endocitotskimi in endosomskimi markerji. Na podlagi pridobljenih rezultatov sklepajo, da po elektroporaciji približno 50 % DNA vstopa v celice po endocitotski poti odvisni od kaveolina, 25 % po endocitotski poti odvisni od klatrina in 25 % DNA vstopi v celice s procesom makropinocitoze (Rosazza in sod., 2016a).

2.4 ENDOCITOZA

Endocitoza obsega več raznolikih mehanizmov, s katerimi celice preko prenašalnih veziklov, ki se tvorijo na plazemski membrani, vase sprejemajo makromolekule in delce. Vezikli se nato od membrane odcepijo in potujejo proti notranjosti celice. Endocitoza nadzira vnos snovi v celico, ima ključno vlogo pri razvoju, imunskega odziva, nevrotransmisiji, medcelični komunikaciji, prenašanju signalov ter homeostazi celic in organizma (Conner in Schmid, 2003). Endocitotske poti vodijo iz celične površine do lizosomov v notranjosti celice. Celice na ta način vase sprejemajo makromolekule, delce in v posebnih primerih tudi druge celice. Celica postopoma obda snov, ki jo želi sprejeti vase, z majhnim delom plazemske membrane. Membrana se najprej uviha in se nato odcepi, pri čemer nastane endocitotski vezikel, ki vsebuje vključeno snov ali delec (Alberts in sod., 2007). Endocitotske poti se razlikujejo glede na velikost endocitotskih veziklov, narave tovora (snovi, ki vstopajo – ligandi, receptorji in lipidi) in mehanizem tvorbe veziklov (Conner in Schmid, 2003). Dva glavna tipa endocitoze se razlikujeta glede na velikost endocitotskih veziklov, ki pri procesu nastanejo (Alberts in sod., 2007). Pri fagocitozi ("celično hranjenje") veliki delci vstopajo preko velikih veziklov, imenovanih fagosomi (v splošnem >250 nm v premeru). Pri pinocitozi ("celično pitje") preko majhnih pinocitotskih veziklov (približno 100 nm v premeru) vstopajo tekočina in topljenci. Pri večini evkariontskih celic s pinocitozo neprestano vstopajo tekočina in topljenci; velike delce najbolj učinkovito sprejemajo vase specializirane fagocitotske celice (Alberts in sod., 2007; Conner in Schmid 2003). Pinocitoza poteka pri vseh tipih celic preko vsaj štirih osnovnih mehanizmov - makropinocitoze, endocitoze posredovane s klatrinom, endocitoze posredovane s kaveolinom in endocitoze neodvisne od klatrina in kaveolina (Conner in Schmid 2003).



Slika 1: Endocitotske poti se med seboj razlikujejo po velikosti endocitotskih veziklov, naravi tovora (ligandi, receptorji in lipidi) in mehanizmih tvorbe veziklov (Conner in Schmid, 2003: 37).

2.4.1 Fagocitoza

Fagocitoza je posebna oblika endocitoze, pri kateri celica sprejema vase velike delce kot so mikroorganizmi in mrtve celice z velikimi endocitotskimi vezikli imenovanimi fagosomi. Za fagocitozo se morajo delci najprej vezati na površino fagocita, vendar vsi delci, ki se vežejo, ne vstopajo v celico (Alberts in sod., 2007). Proces fagocitoze se prične s prepoznavanjem delca na celični površini in se nadaljuje s postopnim vključevanjem receptorjev in tvorbo membranskih izrastkov v obliki čaše, ki zaobjamejo delec v fagosom. Potek procesa narekuje postopno vključevanje majhnih GTPaz, med procesom pa poteka polimerizacija aktina (Kumari in sod., 2010, Alberts in sod., 2007, Conner in Schmid, 2003). Obstaja več tipov fagocitoze, ki so odvisni od delcev in receptorjev, ki delce prepoznavajo (Conner in Schmid, 2003). Najbolje poznani sprožilci fagocitoze so protitelesa, ki nas ščitijo tako, da se vežejo na površino patogenih mikroorganizmov. Protitelesa tvorijo okrog mikroorganizma plašč z izpostavljenimi Fc regijami (opsonizacija), ki jih prepoznavajo Fc receptorji na površini makrofagov in nevtrofilcev (Alberts in sod., 2007). Vezava Fc receptorjev pri fagocitotski celici sproži podaljševanje pseudopodijev, ki delec obdajo in se na koncih združijo, da nastane fagosom. Obliko pseudopodijev določa lokalizirana polimerizacija aktina, ki jo sproži Rho družina GTPaz (Cdc42 in Rac) in njihova aktivacija gvanin nukleotid izmenjevalnih faktorjev (GEF) (Alberts in sod., 2007; Conner in Schmid, 2003). Aktivna Rho GTPaza omogoči kinazno aktivnost lokalnih fosfatidilinozitol-kinaz (PI-kinaz). Polimerizacija aktina se prične kot odgovor na kopičenje fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$) v membrani. Za dokončno izoblikovanje fagosoma je potrebna depolimerizacija aktina na osnovni ploskvi (membrani), do katere pride, ko je $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ podvržen delovanju PI3-kinaze, ki ga pretvori v fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat ($\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$). $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ je potreben za zaprtje fagosoma in lahko sodeluje pri preoblikovanju aktinskega omrežja, kar pripomore k uvihanju nastajajočega fagosoma (Alberts in sod., 2007).

2.4.2 Makropinocitoza

Makropinocitoza je endocitotski proces, pri katerem glede na volumen celice vanjo vstopa relativno velika količina zunajcelične tekočine. V nekaterih primerih s tekočino vstopajo tudi delci kot so bakterije. Makropinocitoza je definirana kot dobro koordiniran, sprožljiv proces, pri katerem sodelujejo značilni molekulski regulatorji. Raziskave so pokazale, da pri nastajanju makropinosomov poteka razvrščanje komponent membrane (Kumari in sod., 2010). Pri makropinocitozi namreč aktivacija receptorskih tirozin kinaz kot sta receptorja za epidermalni rastni faktor (EGFR, angl. epidermal growth factor receptor) in rastni faktor, ki izvira iz trombocitov (PDGFR, angl. platelet-derived growth factor receptor), vodi do globalnega povečanja polimerizacije aktina na celični površini (Kerr in Teasdale, 2009; Conner in Schmid, 2003). Membrana se prične gubati kot odgovor na usmerjeno

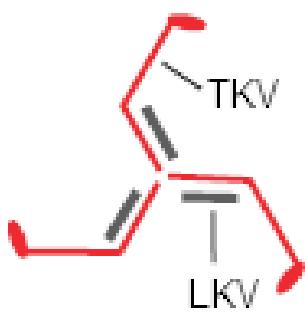
polimerizacijo aktina v bližini plazemske membrane in tvorijo se skoraj ravni podaljški celične površine. Proses se nadaljuje dokler se fleksibilni filamenti lahko upirajo vedno večjemu bremenu. Makropinosomi nastanejo, ko se izrastki ponovno zligejo s plazemsko membrano in s tem zaobjamejo veliko količino zunajcelične tekočine (Kerr in Teasdale, 2009). Mehanizem odcepitve makropinosomov od plazemske membrane še ni poznan. V nekaterih primerih eksperimentalni dokazi nakazujejo na vpletjenost izoblik dinamina. Ni še jasno ali dinamin pri specifičnih primerih makropinocitoze služi kot protein za odcepljanje ali pri endocitozi sodeluje kot regulatorni faktor. Znano je, da dinamin uravnava celično distribucijo Rac1 GTPaze, zato lahko neposredno vpliva na proces makropinocitoze z uravnavanjem razpoložljive Rac1 GTPaze, ki je nujna za preoblikovanje aktina (Kumari in sod., 2010).

2.4.3 Endocitoza, posredovana s klatrinom

Pri endocitozi, posredovani s klatrinom, se visoko afinitetni transmembranski receptorji in nanje vezani ligandi skoncentrirajo v prevlečenih jamicah na plazemski membrani. Le-te nastanejo z združevanjem citosolnih plaščnih proteinov, med katerimi je najpomembnejši klatrin. Prevlečene jamice se uvihajo in odcepijo, pri čemer nastanejo endocitotski vezikli s premerom 100-200 nm (Kumari in sod., 2010), ki so obdani s poligonalnim klatrinskim plaščem in v celico vnašajo koncentrirane komplekse receptor-ligand (Conner in Schmid, 2003). Dolgo je prevladovalo prepričanje, da je endocitoza, odvisna od klatrina, proces, ki ga stimulirajo tovorne molekule. Rezultati raziskave Marcela Ehrlicha in sodelavcev (2004) pa kažejo, da se ob plazemski membrani lahko klatrinski plašč tvori spontano, interakcije s tovornimi molekulami pa ga stabilizirajo (Ehrlich in sod., 2004; Kumari in sod., 2010). Pravzaprav je proizvodnjo veziklov obdanih s klatrinom mogoče smatrati za več sorodnih si endocitotskih poti, ki jim je skupna uporaba plaščnega proteina klatrina. Za tvorbo jamic in veziklov prevlečenih s klatrinom obstaja širok obseg specifičnih adapterjev in pomožnih proteinov, ki so specifični za vstopajoče molekule. Proses ni omejen na enak sestav pomožnih proteinov v vsaki celici ali obseg molekul, ki lahko vstopajo (Doherty in McMahon, 2009). Poznanih je približno 150 proteinov, ki sodelujejo pri tvorbi veziklov obdanih s klatrinom in regulaciji procesa (Kumari in sod., 2010).

Struktura klatrina (slika 2), imenovana triskelion (zaradi treh "krakov"), je zgrajena iz treh težkih klatrinskih verig, vsaka pa je tesno povezana z lahko klatrinsko verigo (Conner in Schmid, 2003; Kumari in sod., 2010). Pri nefizioloških pogojih (nizka koncentracija soli in visoka koncentracija kalcija) se klatrinski triskelioni spontano samozdružujejo v zaprte poligonalne kletke (Conner in Schmid, 2003). Za tvorbo kletk pri fizioloških pogojih pa so potrebne druge komponente plašča – adapterski in pomožni proteini (Conner in Schmid, 2003; Doherty in McMahon, 2009; Kumari in sod., 2010). Adapterski in pomožni proteini usklajujejo nastajanje klatrinskih jeder na področjih plazemske membrane, kjer bo

endocitoza potekala. Tvorba teh jeder pospeši polimerizacijo klatrina v ukrivljeni rešetki, kar posledično stabilizira deformacijo membrane. Polimerizacija klatrina (in delovanje drugih proteinov) pripomore k oblikovanju in zožitvi vratu vezikla. Odcepitev vezikla od plazemske membrane omogoči protein dinamin, velika GTPaza, ki okrog vrata vezikla tvori polimer v obliki vijačnice in odcepitev posreduje s hidrolizo GTP. Klatrinska kletka se od vezikla sprosti z delovanjem auksilina in hsc70. Vezikel brez klatrinskega plastičnega potuje po celici in vsebino dostavi do ciljnega razdelka tako, da se z le-te zlije (Doherty in McMahon, 2009).



Slika 2: Klatrinski triskelion, zgrajen iz treh težkih klatrinskih verig (TKV), ki so povezane s po eno lahko klatrinsko verigo (LKV) (Conner in Schmid, 2003: 40).

Raziskave kažejo, da zgolj polimerizacija klatrina ni dovolj za ukrivljanje membrane. Epsi, družina proteinov, ki na klatrin vežejo molekule, ki predstavljajo tovor (npr. tovor, označen z ubikvitinom), se neposredno vežejo tudi na inozitolne lipide in lahko z vključitvijo amfifatske vijačnice pripomorejo k deformaciji membrane pri nastanku jamice prevlečene s klatrinom. Kadar so ob tvorbi prevlečene jamice prisotni epsini, ta proces zagotavlja začetno deformacijo membrane v sodelovanju s polimerizacijo klatrina. K deformaciji membrane lahko pripomorejo tudi drugi pomožni proteini – na primer receptorji vezani z G-proteini (GPCRs, angl. G protein-coupled receptors). S klatrinom se lahko povežejo preko vezave β -arestinov, ki interagirajo s fosforiliranimi receptorji, fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfatom, klatrinom in adapterskim proteinom 2 (AP2, angl. adaptor protein 2). Možno je da imajo različne afinitete receptorjev (določene npr. s fosforilacijo ali ubikvitinacijo receptorja) za specifične adapterske proteine ključno vlogo pri njihovem združevanju v posamezne jamice ali vezikle prevlečene s klatrinom. Na ta način se lahko vsak vezikel tvori na kinetično različen način in nato potuje do primerne znotrajcelične destinacije na način, odvisen od tovornih molekul in njihovih ligandov (Doherty in McMahon, 2009). Pomožni proteini lahko pripomorejo k deformaciji membrane tako, da k membrani privedejo druge proteine, s sestavo ogrodja ali z vlogo koordinatorjev pri endocitotskem procesu. Proteini, ki vsebujejo domene N-BAR ali BAR, kot so SNX9 in amfifizin, lahko tvorijo in stabilizirajo ukrivljenost membrane (tako pripomorejo k deformaciji membrane znotraj vezikla), vežejo tako klatrin kot AP2 in k

vratu vezikla privedejo dinamin. Vse več je dokazov, da različni adapterji in pomožni proteini nadzirajo vstop različnih molekul, zaradi česar se tvorijo različni podtipi veziklov. Za njihovo tvorbo so potrebni različni specifični proteini. Čeprav se zdi ta pojav zelo verjeten, obstoj jamic in veziklov (vsaj relativno) specifičnih za tovor še ni dokazan (Doherty in McMahon, 2009).

Glede na to, da so pri endocitozi posredovani s klatrinom za vnos tovornih molekul odgovorne morfološko nerazločljive strukture, in da (vsaj včasih) jamice in vezikli, prevlečeni s klatrinom, vsebujejo več tipov tovornih molekul, je zelo verjetno, da vsaka jama oziroma vezikel vsebuje kompeticijsko nastalo populacijo tovornih molekul in adapterjev oziroma pomožnih proteinov. Natančna sestava jamic oziroma veziklov je odvisna od mnogih faktorjev, vključno s koncentracijami posameznih tipov tovornih molekul ob plazemski membrani, specifičnim aktivacijskim stanjem posameznega tovora, odvisnostjo vstopa posameznega tovora v jamicu od aktivacijskega stanja, mobilnostjo tovora v plazemski membrani, celokupno afiniteto adapterskih oz. pomožnih proteinov, ki vežejo tovor, koncentracijo adapterskih oz. pomožnih proteinov, ki lahko tovor prenašajo in sposbnostjo adapterskih oz. pomožnih proteinov za interakcijo z mehanizmom klatrinske polimerizacije (Doherty in McMahon, 2009).

2.4.4 Endocitoza, posredovana s kaveolinom

Kaveole so membranski uvihki s premerom 50-80 nm, prisotni v plazemskih membranah večine celičnih tipov (Pelkmans in Helenius, 2002; Conner in Schmid, 2003; Alberts in sod., 2007; Doherty in McMahon, 2009). Preko kaveol v celice vstopajo membranske komponente (glikosfingolipidi in proteini, vsidrani preko glikozilfosfatidilinozitolov) zunajcelični ligandi (albumin, folna kislina), bakterijski toksini (tetanus toksin, kolera toksin) in mnogo virusov brez ovojnica (poliomavirus, opičji virus 40) (Pelkmans in Helenius, 2002; Kumari in sod., 2010). Smatra se, da kaveole nastanejo iz membranskih mikrodomen ali lipidnih raftov, ki so področja, predvsem bogata s holesterolom, glikosfingolipidi in membranskimi proteini, vsidranimi preko glikozilfosfatidilinozitolov (GPI, angl. glycosylphosphatidylinositol) (Alberts in sod., 2007). Oblika in struktorna organizacija kaveol sta odvisni od kaveolinov, 21 kDa velikih integralnih membranskih proteinov (Pelkmans in Helenius, 2002), ki se vežejo neposredno na membranski holesterol (Doherty in Mcmahon, 2009; Kumari in sod., 2010). Obstajajo trije tipi kaveolinskih proteinov. Kaveolin-3 je odgovoren za tvorbo kaveol v celicah mišic, kaveolina-1 in -2 pa za tvorbo v ostalih celicah (Pelkmans in Helenius, 2002; Kumari in sod., 2010). Aminski in karboksilni konci kaveolinov se nahajajo na citosolni strani membrane in so med seboj povezani s hidrofobnim zaporedjem, ki je vključeno v membrano, a se ne razteza preko dvosloja. Kaveolini imajo na segmentu karboksilnega

konca vezane palmitinske kisline, tirozinski ostanki so lahko fosforilirani, vežejo holesterol in tvorijo dimere ali oligomere (Pelkmans in Helenius, 2002).

Kaveolin v notranji (citosolni) sloj lipidnega dvosloja plazemske membrane vključi zanko in s samozdruževanjem tvori progast kaveolinski plašč na površini membranskega uvihka (Conner in Schmid, 2003). Vključitev transmembranskih amfifatskih heliksov v obliki klina povzroči večji razmik med lipidi notranjega kot zunanjega sloja, kar privede do začetne ukrivitve membrane. Kaveolini (kaveolin-1 in kaveolin-2) so sposobni oligomerizacije na membrani, kar proces ukrivljanja membrane še okrepi. Tvorba kaveol je odvisna od holesterola, zato njegova izguba vodi v razgradnjo kaveolarnih struktur (Kumari in sod., 2010). Kaveolini so ključni za tvorbo in stabilizacijo kaveol saj v njihovi odsotnosti kaveol ni opaziti. Pri izražanju kaveolinov v celicah, ki nimajo kaveol, le-ti inducirajo njihovo tvorbo. Ali ima kaveolin neposredno vlogo pri procesih endocitoze ni znano. Raziskave namreč kažejo, da kaveolin-1 pravzaprav upočasnuje endocitotske procese preko kaveol. Ti rezultati nakazujejo, da je funkcija kaveolina morda stabilizacija kaveol in s tem preprečevanje osnovnih od raftov odvisnih endocitotskih procesov (Pelkmans in Helenius, 2002).

Poleg kaveolinov vsebujejo kaveole tudi dinamin, ki se nahaja na vratovih uvihkov (kaveol). Dinamin ni permanentna komponenta kaveol, ampak najverjetneje pripada skupini faktorjev, ki se na kaveole vežejo kot odziv na določene signale. Dinamin najverjetneje sodeluje pri odcepljanju kaveolarnih veziklov od plazemske membrane. Poleg tega kaveole vsebujejo tudi molekularni mehanizem za vsidranje in fuzijo (Pelkmans in Helenius, 2002). Kaveole, ki se odcepijo od plazemske membrane, vsebino dostavijo kaveosomom, ki so endosomom podobni razdelki, ali plazemski membrani na nasprotni strani polarizirane celice (v procesu imenovanem transcytoza) (Alberts in sod., 2007). Kaveosomi so membranski organeli, ki vsebujejo kaveolin-1 in so razporejeni po celotni citoplazmi, imajo nevtralen pH, njihova membrana pa je bogata s holesterolom in glikosfingolipidi. V kaveosomih se ne akumulirajo ligandi, ki v celice vstopajo v procesih endocitoze odvisne od klatrina, niti markerji tekoče faze. Ultrastruktturna analiza je pokazala, da so kaveosomi tubulovezikularne strukture, homogene glede na velikost in obliko (Pelkmans in Helenius, 2002). Molekule, ki v celico vstopijo preko kaveosomov, se izognejo endosomom in lizosomom in so na ta način zaščitene pred nizkim pH in lizosomskimi hidrolazami; ni pa še znano, kako nadalje potujejo iz kaveosoma do drugih destinacij v celici (Alberts in sod., 2007). Snovi iz kaveosomov potujejo do endoplazemskega retikuluma, Golgijskega aparata in morda tudi do drugih organelov (Pelkmans in Helenius, 2002).

2.4.5 Endocitoza, neodvisna od klatrina in kaveol ozziroma kaveolina

V celicah, v katerih sta onemogočeni poti endocitoze, odvisni od klatrina in kaveolina 1, poteka endocitoza, odvisna od holesterola. S takim procesom endocitoze v celice vstopajo zunajcelična tekočina, SV-40 virioni, CTxB, GM1, drugi sfingolipidi, proteini, vezani na GPI, ter receptorji za IL2, rastne hormone, endotelin in mnoge druge molekule (Conner in Schmid, 2003; Doherty in McMahon, 2009).

2.4.5.1 Endocitoza, posredovana s flotilinom

Flotilin 1 (reggie 2) in flotilin 2 (reggie 1) sta proteini s topologijo, podobno kaveolinu 1, ki tvorita strukture, ki so podobne kaveolam in so le malenkost večje. Flotilin 1 je potreben za vnos proteoglikanov s celične površine na način, odvisen od dinamina (Doherty in McMahon, 2009).

2.4.5.2 Endocitotska pot CLIC/GEEC

Proteini, ki se na membrane vežejo preko glikozilfosfatidilinozitolnega sidra (GPI-APs), se v večjih količinah nahajajo v membranskih frakcijah odpornih na delovanje detergentov in običajno niso skoncentrirani v jamicah prevlečenih s klatrinom ali v kaveolah (Doherty in McMahon, 2009). V celice vstopajo v specializiranih strukturah, ki se imenujejo zgodnji endosomski razdelki, bogati z GPI-APs (GEECs,). GEECs najverjetneje nastanejo s fuzijo tubulovezikularnih struktur imenovanih prenašalci, neodvisni od klatrina (CLICs), ki izvirajo iz plazemske membrane in niso obdani s plaščem (Hansen in Nichols, 2009; Doherty in McMahon, 2009; Kumari in sod., 2010). Pomembna značilnost poti CLIC/GEEC je odvisnost od mehanizma aktinske polimerizacije, saj je za to pot nujno ohranjanje dinamične aktinske arhitekture (Kumari in sod., 2010; Hansen in Nichols, 2009). Pri poti CLIC/GEEC dinamin verjetno sodeluje pri procesih, ki se odvijajo po odcepitvi tubulovezikularnih struktur od plazemske membrane (Hansen in Nichols, 2009; Doherty in McMahon, 2009; Kumari in sod., 2010).

2.4.5.3 Endocitotske poti vstopa IL-2R β , IL-2R γ , Fc ϵ R1, CD59 in proteinov MHC I

Tako kot proteini vezani z GPI se tudi β verige receptorjev za interlevkin-2 (IL2R β) v večjih količinah nahajajo v membranskih frakcijah odpornih na detergente. Kljub temu, da pomanjkanje holesterola prekine endocitozo obeh tipov proteinov, je za vstopanje IL2R β po ligaciji odgovorna endocitotska pot, ki se razlikuje od poti CLIC/GEEC (Doherty in McMahon, 2009).

Podobna endocitotska pot, odvisna od dinamina in neodvisna od klatrina, je odgovorna za vstop IL-2R γ in IgE receptorja Fc ϵ R1 v celice, vendar razširjenost in vloga te poti razen pri levkocitih nista poznani (Doherty in McMahon, 2009).

CD59, protein, vezan z GPI, in proteini MHC kompleksa razreda I so lahko kointernalizirani v od klatrina neodvisnih arf6-pozitivnih endosomih, ki se razlikujejo od endocitotskih struktur CLIC/GEEC. Endocitoza, odvisna od arf6 je najverjetnejše neodvisna od dinamina (Doherty in McMahon, 2009).

2.4.6 Vloga dinamina pri tvorbi endocitotskih veziklov

Dinamini so 100 kDa velike modularne GTPaze (Cao in sod., 1998; Macia in sod., 2006; Kirchhausen in sod., 2008) z domenami, ki omogočajo vezavo fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata (PI(4,5)P₂), samosestavljanje ter interakcije z drugimi endocitotskimi komponentami (Conner in Schmid, 2003). Dinamin na mesto delovanja prispe med sestavljanjem klatrinske jamice, ko na to mesto prispejo tudi proteini, ki vsebujejojo N-BAR domene (npr. amfifizin), in neposredno interagirajo z dinaminom (Kumari in sod., 2010). GTPaza dinamin sodeluje pri fagocitozi, endocitozi odvisni od klatrina, kaveolarni endocitozi, razredu makropinocitoze ter nekaterih poteh endocitoze neodvisne od klatrina in kaveolina, kot je endocitotska pot receptorja za interleukin 2 (endocitotska pot IL-2R). Njegova vloga je najbolje poznana pri endocitozi odvisni od klatrina (Conner in Schmid, 2003), vendar kot kaže dinamin sodeluje pri večini endocitotskih poti, kjer nastajajo in se odcepljajo prevlečeni vezikli (različni plaščni proteini) (Kumari in sod., 2010). V sesalskih celicah so znanstveniki identificirali tri gene za dinamin. Vsak gen izraža vsaj štiri spojitelne oblike (izooblike). Izooblike dinamina so prisotne v vseh celicah, pri čemer je *Dyn1* omejen na izražanje v nevronskih celicah, *Dyn2* se izraža ubikvitarno, *Dyn3* pa je omejen na izražanje v možganih, pljučih in testisih (Cao in sod., 1998; Kumari in sod., 2010).

Dinamin je GTPaza, zgrajena iz več domen. Na aminskem koncu se nahaja GTPazna domena, sledijo ji sredinska domena, domena homologna plekstrinu (PH), GTPazna efektorska domena (GED) in na karboksilnem koncu vsebuje domeno bogato s prolini/arginini (PRD) (Sever, 2002; Takei in sod., 2005, Macia in sod., 2006; Kirchhausen in sod., 2008). Domena PH veže fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PI(4,5)P₂), kar močno stimulira GTPazno aktivnost dinamina. Domena GED interagira z GTPazno domeno sosednje molekule dinamina znotraj polimera, kar prav tako spodbudi GTPazno aktivnost dinamina. Domena PRD veže proteine, ki vsebujejo domeno SH3 (npr. amfifzin) (Takei in sod., 2005; Macia in sod., 2006). Čisti dinamin pri nizki ionski moči spontano tvori obročke in spirale. Vsak pogoj, ki sproži oligomerizacijo, samosestavljanje ali tvorbo obročkov, vodi tudi do stimulacije dinaminske GTPaze, zaradi znotrajmolekularnega stika

med GTPazo in domeno GED (Macia in sod., 2006). Pri visokih koncentracijah lahko dinamin tvori multimere in spirale na membranah (Kumari in sod., 2010). Dinamin verjetno tvori obroč okrog vratu globoko uvhane jamice, vendar njegovo delovanje ni poznano. Znanstveniki zagovarjajo predvsem dve teoriji. Ena teorija trdi, da dinamin za razliko od drugih GTPaz deluje kot mehansko-kemični encim, ki fizično vodi vezikulacijo na podlagi konformacijskih sprememb, ki jih omogoča hidroliza GTP. Druga teorija predlaga, da dinamin, tako kot druge GTPaze deluje kot regulatorna molekula pri tvorbi endocitotskih veziklov prevlečenih s klatrinom, pri čemer dinamin, vezan na GTP, privlači ali aktivira druge molekule, ki sodelujejo v nadalnjih procesih. Ne glede na to ali dinamin deluje kot mehansko-kemični encim ali regulatorna GTPaza ali kombinacija obeh, morajo za njegovo aktivacijo vsekakor poteči konformacijske spremembe, ki jih sproži hidroliza GTP (Conner in Schmid, 2003; Macia in sod., 2006).

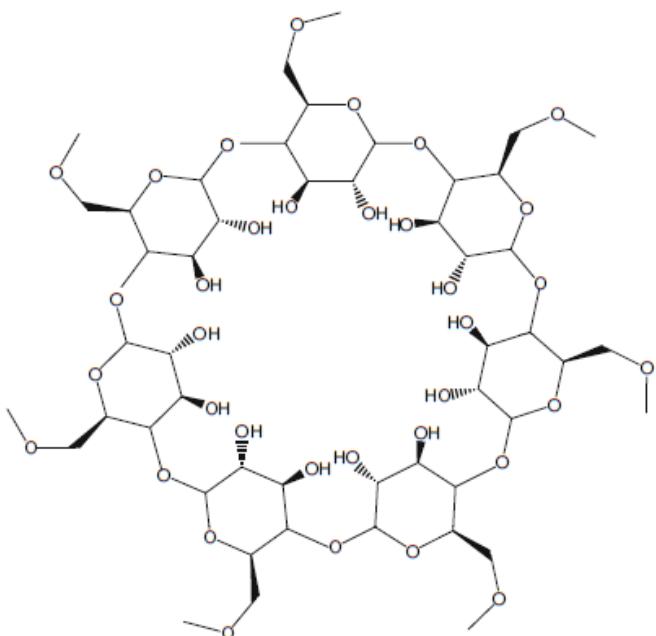
2.4.7 Farmakološka inhibicija endocitoze

Poti vstopa molekul v celice poleg klasičnih celičnih biologov raziskujejo tudi znanstveniki iz različnih področij nevrobiologije, imunologije in patofiziologije. Za tako raznovrstno skupino raziskovalcev je pomembno, da so orodja za raziskovanje endocitoze v pogojih *in vivo* ter *in vitro* enostavna, zanesljiva in cenovno ugodna. Farmakološki (kemični) inhibitorji omogočajo neposredno preizkušanje endocitoze v živih celicah. Ti inhibitorji imajo nekaj prednosti pred visoko razvitimi molekularnimi orodji s tarčnim delovanjem na določene endocitotske proteine. Farmakološki inhibitorji vplivajo enako na vse celice v populaciji, njihove učinke je enostavno titrirati in kvantificirati. Celice so inhibitorjem običajno izpostavljen le kratek čas, kar prepreči pojav zakasnelih stranskih učinkov ali kompenzacijskih mehanizmov. Farmakološki inhibitorji so tudi primerni za uporabo v študijah *in vivo*. Poleg tega ima uporaba farmakoloških inhibitorjev še to prednost, da ne zahteva dolgotrajnih postopkov, prevelike količine dela in je cenovno ugodna (Ivanov, 2008).

Poglavitni problem, ki predstavlja oviro pri uporabi farmakoloških inhibitorjev endocitoze, je njihova slaba specifičnost. Problem specifičnosti je pogosto prezrt, saj ima lahko določen inhibitor pri določenih eksperimentalnih pogojih visoko specifičnost, vendar se pri drugačnih pogojih pojavi stranski učinki. Pri ocenjevanju specifičnosti farmakoloških oziroma kemičnih inhibitorjev sta pomembna predvsem dva kriterija: (i) vpliv agensa na proučevano endocitotsko pot brez motenja alternativnih načinov vstopa molekul, (ii) inhibitor ne sme prizadeti aktinskega citoskeleta (Ivanov, 2008).

2.4.7.1 Metil- β -ciklodekstrin

Metil- β -ciklodekstrin ($M\beta CD$) je cikličen heptasaharid s hidrofobnim jedrom (slika 3), ki ima visoko afiniteto za holesterol. Pogosto se ga uporablja za spremnjanje struktur domen bogatih s holesterolom v celičnih membranah (Ivanov, 2008; Lopez in sod., 2011). Učinkovitost odstranitve celičnega holesterola je odvisna od uporabljenega ciklodestinskega derivata, njegove koncentracije, trajanja inkubacije, temperature in celične linije. Kljub številnim raziskavam molekularni mehanizem odstranitve holesterola še ni poznan (Lopez in sod., 2011).



Slika 3: Struktura metil- β -ciklodekstrina (Kline in sod., 2010: 203).

Če celicam dodamo $M\beta CD$ v koncentraciji 5-10 mM, v roku ene ure tvori topne inkluzijske komplekse s holesterolom in tako izloči lipide iz celičnih membran (Ivanov, 2008; Castagne in sod., 2009). Tak tretma povzroči izravnavanje kaveol in napačno razporeditev kaveolina 1 v mišjih fibroblastih. Poleg tega $M\beta CD$ inhibira vstop v celice več markerskih ligandov za lipidne rafte in kaveole, vključno s kolera toksinom, glukoznim transporterjem in sintazo dušikovega oksida (Ivanov, 2008). Poleg vpliva $M\beta CD$ na lipidne rafte oziroma endocitozo posredovano s kaveolami akutna izločitev holesterola blokira tudi vstop transferina, ki je klasični ligand endocitoze posredovane s klatrinom (Rodal in sod., 1999; Ivanov, 2008). Ta stranski učinek je mogoče pojasniti z blokado uvhavanja jamic prevlečenih s klatrinom. $M\beta CD$ blokira tudi endocitozo tekoče faze pri epitelnih in endotelijskih celicah. Nespecifična inhibicija več endocitotskih poti niti ne preseneča glede na to, da akutna izločitev holesterola z $M\beta CD$ dramatično vpliva na

celični citoskelet in signalizacijo. Tretiranje celic z M β CD namreč povzroča pojave kot so disperzija kortikalnega F-aktina pri adipocitih, inhibicija pretvorbe fosfatidilinozitola pri A431 karcinomskih celicah in aktivacija Ras GTPaze v Cos-7 epitelnih celicah (Ivanov, 2008).

2.4.7.2 Konkanavalin A

Konkanavalin A (Con A) je rastlinski protein, ki spada v skupino lektinov, za katere sta značilni vezava ogljikovih hidratov in aglutinacija različnih živalskih celic (Wang in sod., 1975, Ghazarian in sod., 2011). Pri pH 7 ali višjem Con A zavzame tetramerno strukturo sestavljeno iz štirih identičnih podenot, ki imajo molekulsko maso 26 kDa. Pri pH nižjem od 6 prevladuje dimerna struktura Con A. Ne glede na pH in molekularno strukturo vsak monomer vsebuje dve vezavni mesti za kovinske ione (Ca^{2+} in Mn^{2+}). Vezava kovinskih ionov je nujno potrebna za zmožnost vezave sladkorjev. Vsaka podenota vsebuje en Mn^{2+} in en Ca^{2+} ion ter eno vezavno mesto za sladkorje (Wang in sod., 1975). Strukturne študije, izvedene na živalskih lektinih, kažejo, da je za vezavo sladkorjev odgovorno zaporedje aminokislin, imenovano domena CRD (angl., carbohydrate recognition domain). Domena CRD običajno prepoznavata terminalne nereducirajoče sladkorne ostanke glikoproteinov in glikolipidov na celični membrani. Lektinske domene CRD so zmožne ločevanja med anomerami, kar definira specifičnost vezave sladkornih ostankov (Ghazarian in sod., 2011). Con A se tako specifično veže na α -D-manozne in α -D-glukozne ostanke, ne pa na njihove β -anomere (Wang in sod., 1975; Mody in sod., 1995; Ghazarian in sod., 2011).

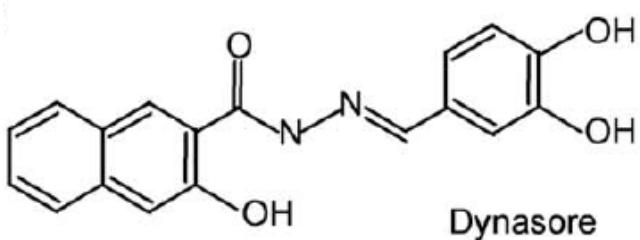
Z uporabo Con A je mogoče preprečiti vstop plazemskih receptorjev v celice in njihovo recikliranje, vendar mehanizem delovanja ni pojasnjen. Najverjetnejše vstop receptorjev v celico preprečuje navzkrižno povezovanje sladkornih ostankov. Con A dobro deluje pri nekaterih receptorjih (npr. β -adrenergičnih receptorjih), pri drugih (npr. muskarinskih acetilholinskih receptorjih) pa je manj učinkovit (Koenig, 2004).



Slika 4: Tridimenzionalna struktura monomera konkanavalina A (Bouckaert in sod., 2000: 19779).

2.4.7.3 Dynasore

Dynasore je inhibitor endocitoze, ki v pogojih *in vitro* moti GTPazno aktivnost dinamina 1, dinamina 2 in mitohondrijskega dinamina, ne vpliva pa na ostale majhne GTPaze. Dynasore je učinkovit inhibitor endocitotskih poti odvisnih od dinamina, saj v nekaj sekundah po dodatku blokira tvorbo prevlečenih veziklov. Dynasore pri pogojih nizke ionske moči ne preprečuje samozdruževanja dinamina ali njegove vezave na lipide. V pogojih *in vitro* deluje kot nekompetitiven inhibitor dinamina 1 in dinamina 2 (Macia in sod., 2006).



Slika 5: Kemijska struktura dynasorja (Macia in sod., 2006: 840).

3 MATERIAL IN METODE

Z namenom določitve endocitotskih poti, ki po izpostavitvi celic električnemu polju sodelujejo pri vstopu plazmidne DNA v notranjost celic, smo celično linijo B16F1 izpostavili trem inhibitorjem endocitoze - metil- β -ciklodekstrinu (M β CD), ki deluje kot splošni inhibitor endocitoze, konkanavalinu A (Con A), ki inhibira endocitozo posredovano s klatrinom, in dynasorju, ki reverzibilno inhibira delovanje dinamina. Po 30-minutni inkubaciji celic smo inhibitorje odstranili in izvedli elektrotransfekcijo, s katero smo v celice vnašali plazmid z zapisom za zeleno fluorescirajoči protein. To nam je omogočilo, da smo z merjenjem fluorescence celic ovrednotili uspešnost elektrotransfekcije. Na podlagi rezultatov smo sklepali na delovanje inhibitorjev endocitoze in na to, katere poti endocitoze se aktivirajo pri elektrotransfekciji.

Z namenom preverjanja (kontrole) inhibitorne aktivnosti M β CD in Con A smo izvedli poskuse, pri katerih smo celični liniji B16F1 po inkubaciji z inhibitorjema, dodali fluorescenčno označeni transferin, za katerega je znano, da v celice vstopa z endocitozo posredovano s klatrinom. Po odstranitvi transferina iz celične suspenzije in s površine celic smo z merjenjem fluorescence celic ovrednotili uspešnost vstopa transferina v celice. Na podlagi teh rezultatov smo sklepali o specifičnosti M β CD in Con A pri inhibiciji endocitoze posredovane s klatrinom.

3.1 PLAZMIDNA DNA

Zaradi potrebe po spremeljanju učinkovitosti električno posredovanega vnosa plazmidne DNA smo v celice vnašali gen z zapisom za zeleno fluorescirajoči protein (angl. green fluorescent protein, GFP). V ta namen smo poskuse izvedli s komercialno dostopnim vektorskim sistemom pCMV-EGFP-N1 (Clontech Laboratories, Mountain View, Kalifornija, ZDA). Vektor vsebuje gen, ki pod kontrolo citomegalovirusnega (CMV) promotorja kodira sintezo GFP. Vključuje tudi nukleotidno zaporedje za začetek podvajanja (pUC ORI), ki omogoča namnoževanje v bakterijskih sevih *E. coli* in selekcijsko zaporedje za rezistenco na kanamicin, ki celicam z vektorjem omogoča rast v bakterijski kulturi s kanamicinom.

3.1.1 Namnožitev in izolacija plazmidne DNA (GFP)

Veliko količino plazmidne DNA (2,5 – 5 mg) smo pridobili tako, da smo z bakterijsko kulturo *E. coli*, ki je vsebovala vektor pCMV-EGFP-N1, inokulirali 1 liter sterilnega gojišča LB, dodali antibiotik kanamicin (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija) v končni koncentraciji 50 µg/ml ter gojili čez noč pri 37 °C. Plazmidno DNA smo izolirali s

kompletom Endofree Plasmid Mega Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) v skladu z navodili proizvajalca.

3.1.2 Določanje koncentracije in čistosti plazmidne DNA

Uspešnost izolacije smo preverili z merjenjem absorbcije svetlobe pri valovni dolžini 260 nm z UV spektrofotometrom (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA). Spektrofotometer izriše krivuljo odvisnosti med absorbancijo in valovno dolžino, poda koncentracijo nukleinskih kislin v ng/ μ l, razmerje A_{260/280} in razmerje A_{260/230}. S primerjanjem absorbanci pri 260 nm in 280 nm (razmerje A_{260/280}) smo ovrednotili prisotnost proteinov v vzorcih plazmidne DNA. Razmerje A_{260/230} pa se uporablja za ovrednotenje prisotnosti fenolov. Vzorci so primerno čisti, kadar je vrednost razmerja A_{260/280}, čim bližje 2,00 in vrednost razmerja A_{260/230} malo čez 2,00.

Vzorcem izolirane plazmidne DNA smo izmerili volumne, jih redčili do končne koncentracije 1 μ g/ μ l, spektrofotometrično preverili koncentracije ter jih shranili v zamrzovalniku za nadaljnjo uporabo.

3.2 GOJENJE CELIČNIH LINIJ

Celice mišjega melanoma B16F1 (ATCC, Manassas, ZDA) so adherentna celična linija. Gojili smo jih v petrijevkah v minimalnem osnovnem Eaglovem gojišču (MEM; GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), ki smo mu dodali L-glutamin (GIBCO) v končni koncentraciji 10 mM, 100 U/ml penicilina (Grünenthal, Aachen, Nemčija), 50 μ g/ml gentamicina (Krka, Novo Mesto, Slovenija) ter ga obogatili s fetalnim telečjim serumom, FBS (GIBCO) v končni koncentraciji 10 %. Celice smo gojili v inkubatorju (Heraeus B-5060-EK-CO₂; Hanau, Nemčija) pri 37 °C in 5 % atmosferi CO₂. Celice smo 2-krat tedensko rutinsko presajali z uporabo 0,25 % raztopine tripsina z dodatkom 0,75 mM EDTA (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija) in za poskuse uporabljali celice v eksponentni fazi rasti.

3.3 TRETIRANJE CELIC Z INHIBITORJI ENDOCITOZE

Tri dni pred izvedbo poskusa smo na štiri petrijevke (premer 15 cm) nasadili po 5x10⁵ celic. Ko so celice prerastle 80 % površine petrijevke, smo odstranili gojišče in celice sprali s fosfatnim pufrom (1 x PBS; sestava v prilogi), da smo odstranili mrtve celice. Nato smo dodali 10 ml raztopine tripsina ter inkubirali dve minuti, da so se celice odlepile od podlage. Delovanje tripsina smo ustavili z dodatkom 10 ml gojišča s FBS in antibiotiki. Celice smo zbrali v koničaste centrifugirke (50 ml), tripsin odstranili s centrifugiranjem (5

minut pri 1500 vrtlajih na minuto; Heraeus MULTIFUGE 1S-R Centrifuge, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, ZDA) in celice resuspendirali z gojiščem. Koncentracijo celic smo določili s štetjem celic na hemocitometru in pod mikroskopom. Celične suspenzije smo porazdelili v skupine v koničaste centrifugirke po 3×10^6 celic ter jim dodali ustrezne količine gojišča, PBS in inhibitorja endocitoze. Vedno smo pripravili 3 skupine brez inhibitorja, ki so služile kot različni kontrolni vzorci. Poskuse smo izvedli s tremi inhibitorji endocitoze v različnih koncentracijah. Z metil-β-ciklodekstrinom (Sigma-Aldrich) smo celice tretirali v koncentracijskem območju od 1,25 mM do 20 mM, s konkanavalinom A (Sigma-Aldrich) v koncentracijskem območju od 2,5 µg/ml do 400 µg/ml ter z dynasorjem (Sigma-Aldrich) v območju od 15 µM do 120 µM. Celične suspenzije smo inkubirali 30 minut pri 37 °C in 5 % atmosferi CO₂ (inkubator).

Po inkubaciji smo 1×10^5 celic prenesli v mikrocentrifugirke (2 ml), inhibitor odstranili s centrifugiranjem (5 minut pri 1500 vrtlajih na minuto; Heraeus FRESCO 21 Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA), celice resuspendirali v gojišču in v nadaljevanju izvedli teste za določanje viabilnosti in klonogenosti (za metil-β-ciklodekstrin testa klonogenosti nismo izvedli).

Preostanek celične suspenzije iz vsakega vzorca (z $2,9 \times 10^6$ celic) smo uporabili za vnos plazmidne DNA (pCMV-EGFP-N1) z elektroporacijo (elektrotransfekcija).

3.4 ELEKTRIČNO POSREDOVAN VNOS PLAZMIDNE DNA V CELICE (ELEKTROTRANSFEKCIJA)

Po 30-minutni inkubaciji z inhibitorjem smo preostalemu delu celičnih suspenzij ($2,9 \times 10^6$ celic) dodali 10 ml hladnega elektroporacijskega pufra (EP, sestava v prilogi) in centrifugirali, da smo inhibitor odstranili. Pelet smo resuspendirali v 88 µl EP in dodali 22 µl plazmidne DNA s koncentracijo 1 µg/µl oziroma 22 µl vode za kontrolne skupine. Za vsako skupino smo izvedli dve elektroporaciji (50 µl vzorca).

Za izvedbo elektroporacije smo uporabljali elektroporator GT-1, izdelan na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, ki generira pravokotne električne pulze. Pulziranje smo nadzorovali z osciloskopom. Celično suspenzijo smo nanesli med elektrodi iz nerjavečega jekla z razmikom 2 mm ter pri jakosti električnega polja 600 V/cm aplicirali 8 pulzov, dolžine 5 ms, s ponovitveno frekvenco 1 Hz. Celično suspenzijo smo prenesli v petrijevko (premera 6 cm) in gojišče dodali po 5 minutah, s čimer smo preprečili, da bi po elektropermeabilizaciji membrane v celice vstopale tudi komponente gojišča.

Pri vsakem poskusu smo izvedli tudi elektroporacije v odsotnosti inhibitorja (pozitivna kontrola elektroporacije) in v odsotnosti plazmidne DNA (negativna kontrola

elektroporacije). Poleg le-teh smo vsakič pripravili še dvojno negativno kontrolno skupino (brez inhibitorja in elektroporacije).

3.5 DOLOČANJE USPEŠNOSTI VNOSA PLAZMIDNE DNA

3.5.1 Fluorescenčna mikroskopija

Uspešnost vnosa plazmidne DNA, ki kodira GFP, smo ob časih 24 in 48 ur po izvedbi elektroporacije preverili z opazovanjem celic s fluorescenčnim invertnim mikroskopom (Olympus IX70, Hamburg, Nemčija). S spremeljanjem izražanja GFP smo določali učinkovitost elektrotransfekcije in pojav inhibicije pri različnih koncentracijah inhibitorjev endocitoze. Pri tem smo primerjali število transfeciranih celic, ki so pod fluorescentno (modro) svetlobo fluorescirale zeleno, s številom vseh celic, opaznih pod vidno svetlobo v istem vidnem polju. Sklepali smo, da manjšanje deleža transfeciranih celic z večanjem koncentracije inhibitorja endocitoze, pomeni manjšanje učinkovitosti elektrotransfekcije. Z opazovanjem celic pod mikroskopom smo pridobili zgolj okvirno informacijo o morebitni inhibiciji vnosa plazmidne DNA v celice. Fluorescenčna mikroskopija omogoča določitev deleža transfeciranih celic, a je tako kvantifikacija precej nenatančna in subjektivna glede na zajeto vidno polje. Natančno kvantifikacijo uspešnosti elektrotransfekcije smo izvedli z uporabo pretočnega citometra.

3.5.2 Pretočna citometrija

Pretočni citometer razredči pripravljeno suspenzijo celic tako, da celice s tokom nosilne tekočine ena za drugo potujejo mimo laserja, ki oddaja svetlobo določene valovne dolžine. Vsaka celica tako za trenutek prekine pot žarka svetlobe ter od svoje površine odbije nekaj svetlobe. Le-to zaznajo senzorji, postavljeni nasproti in pravokotno na laser. To nam omogoča določitev velikosti in oblike posamezne celice, ki potuje mimo laserja. Uporaba fluorescentne svetlobe nam omogoča ločevanje celic, ki oddajajo fluorescentno svetlobo, od tistih, ki je ne.

Fluoresenco GFP v celicah B16F1 smo merili s pretočnim citometrom (BD FACSCanto II; BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA) 48 ur po tretiranju celic z inhibitorji endocitoze in izvedbi elektrotransfekcije s plazmidno DNA, ki kodira GFP. Celice so bile izpostavljene laserju, ki je oddaljal svetlobo valovne dolžine 488 nm. Za merjenje odbite fluorescentne svetlobe smo uporabili 530/30 nm filter.

Z merjenjem povprečne in mediane fluorescence GFP posameznih celic, ki so ena za drugo potovale mimo merilne točke, smo zanesljivo razlikovali celice, ki so GFP izražale (GFP

pozitivne celice), od tistih, ki ga niso (GFP negativne celice). Na ta način smo določili delež elektrotransfeciranih celic in uspešnost elektrotransfekcije.

3.6 MERJENJE VIABILNOSTI CELIC

Z merjenjem viabilnosti celic smo določali vpliv inhibitorjev na celice (citotoksičnost). Na ta način smo določili koncentracije inhibitorjev, ki so primerne za izvedbo elektroporacije.

Po inkubaciji z inhibitorjem smo le-tega odstranili s centrifugiranjem (5 minut pri 1500 vrtljajih na minuto). Nato smo pripravili primerne redčitve in na mikrotitrsko plošče nasadili po 1000 celic (v 8 ponovitvah) za merjenje viabilnosti celic po 3 dneh in po 100 celic (v 8 ponovitvah) za merjenje viabilnosti po 7 dneh gojenja pri 37 °C in 5 % atmosferi CO₂. Po treh oziroma sedmih dneh smo celicam dodali reagent alamarBlue® (Thermo Fisher Scientific) ter inkubirali 75 minut pri 37 °C.

Po inkubaciji z reagentom alamarBlue® smo fluorescenco merili s fluorescenčnim spektrofotometrom (Infinite 200, Tecan, Mannendorf, Avstrija), pri čemer smo uporabili filtre za valovno dolžino ekscitacije 560 nm, valovno dolžino emisije pa 595 nm.

Za določanje citotoksičnosti MβCD smo poskus ponovili trikrat, za Con A petkrat in za dynasore štirikrat. Pri vseh poskusih smo za posamezno koncentracijo inhibitorja pripravili po osem paralelk. Izmerili smo absolutne vrednosti fluorescence za skupine celic tretiranih z inhibitorji in kontrolne skupine celic (celice inkubirane brez dodatka inhibitorja). Nato smo preračunali delež fluorescence posameznega vzorca (paralelke) glede na srednjo vrednost fluorescence kontrole (normalizacija podatkov glede na kontrolo). Normalizirane vrednosti vzorcev (paralelk) iz vseh poskusov smo združili, izračunali relativne srednje vrednosti za posamezne skupine (kontrolne skupine in skupine celic, izpostavljene različnim koncentracijam inhibitorjev) in podatke statistično obdelali kot je opisano v poglavju 3.9.

Relativne srednje vrednosti viabilnosti celic, prikazane na slikah 7, 8 in 9, so torej relativne srednje vrednosti izmerjene fluorescence celic. Metabolno aktivne celice so namreč tekom inkubacije pretvarjale nefluorescentno komponento resazurin (oksidiran alamarBlue®) v fluorescentno molekulo resorufin (reduciran alamarBlue®) (slika 6). Količina nastale fluorescence je sorazmerna številu živih, metabolno aktivnih celic, kar omogoča kvantitativno oceno viabilnosti celic (O'Brien in sod., 2000).



Slika 6: Strukturi resazurina in resorufina (O'Brien in sod., 2000: 5425).

3.7 DOLOČANJE KLONOGENOSTI (PREŽIVETJA) CELIC

Preživetje celic smo določali z izvedbo testa klonogenosti, ki temelji na sposobnosti delitve celic oziroma sposobnosti tvorbe kolonij. Pripravili smo po 3 ponovitve (3 petrijevke) na skupino. Na petrijevke premera 6 cm smo nasadili po 300 celic, predhodno izpostavljenih inhibitorjem (konkanavalin A in dynasore), in kontrolnih celic, ki inhibitorjem niso bile izpostavljene. Celice smo gojili v izboljšanem gojišču MEM (AMEM; GIBCO), ki smo mu dodali L-glutamin (GIBCO) v končni koncentraciji 10 mM, 100 U/ml penicilina (Grünenthal), 50 µg/ml gentamicina (Krka) ter ga obogatili s fetalnim telečjim serumom, FBS (GIBCO) v končni koncentraciji 5 %. Po 7 dneh gojenja pri 37 °C in 5 % atmosferi CO₂ smo kolonije, ki so jih tvorile reproduktivno sposobne celice, fiksirali inobarvali z barvilkom Crystal Violet (Sigma-Aldrich Chemie) raztopljenim v absolutnem alkoholu. Makroskopsko vidne kolonije (več kot 50 celic na kolonijo) smo prešteli ter določili uspešnost nasaditve celic (angl. plating efficiency, PE), ki je enaka razmerju med številom zraslih kolonij in številom nasajenih celic (enačba 2). Vsako skupino v poskusu smo primerjali s kontrolno skupino (normalizacija podatkov glede na kontrolo) in iz razmerja uspešnosti nasaditve določili delež preživelih celic (ang. surviving fraction, SF) (enačba 3).

$$PE [\%] = \frac{n_{zraslih\ kolonij}}{n_{nasajenih\ celic}} \cdot 100 \quad \dots (2)$$

$$SF = \frac{PE_{tretirana\ skupina}}{PE_{kontrolna\ skupina}} \quad \dots (3)$$

Test klonogenosti smo z inhibitorjem endocitoze Con A izvedli dvakrat, z dynasorjem pa štirikrat. Za vsako skupino celic smo test izvedli v treh paralelkah. Na slikah 8 in 9 so predstavljene relativne srednje vrednosti deležev preživelih celic.

3.8 INHIBICIJA ENDOCITOZE TRANSFERINA

Inhibitorno delovanje metil- β -ciklodekstrina in konkanavalina A smo preverili s poskusom inhibicije endocitoze transferina.

Transferin je glikoprotein, ki močno, a reverzibilno veže železo. V celice z lahkoto vstopa v procesu endocitoze. Za vstop v celico je potrebna vezava na transferinski receptor na površini celice. V notranjosti celice kompleks transferin-receptor odda svoj tovor (železo) ter potuje (se reciklira) nazaj na celično površino (Ciechanover in sod., 1983).

Pri poskusih smo uporabili transferin iz človeškega seruma, konjugiran s fluoresceinom (FITC-transferin; Thermo Fisher Scientific). Poskuse smo izvedli z dvema inhibitorjema endocitoze v različnih koncentracijah. Z metil- β -ciklodekstrinom smo celice tretirali v koncentracijskem območju od 1,25 mM do 7,5 mM, s konkanavalinom A pa v koncentracijskem območju od 20 μ g/ml do 250 μ g/ml.

$1,3 \times 10^6$ celic B16F1 na skupino smo izpostavili metil- β -ciklodekstrinu oziroma konkanavalinu A po enakem postopku, kot je opisan v poglavju 3.3. Po inkubaciji smo inhibitor odstranili s centrifugiranjem (1500 x rpm, 5 min, 26 °C), odstranili supernatante in pelete resuspendirali v 500 μ l gojišča brez fenol rdečega. Celicam (razen kontrolnih) smo nato v temi dodali po 2 μ l FITC-transferina s koncentracijo 5 mg/ml ter jih inkubirali 20 minut v inkubatorju (37 °C, 5 % atmosfera CO₂). Po inkubaciji smo skupinam dodali po 1 ml PBS, centrifugirali, odstranili supernatante in pelete resuspendirali v 500 μ l PBS. Celice smo nato fiksirali z dodatkom 500 μ l 8 % raztopine formaldehyda (končna koncentracija 4 %), v kateri smo celice inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi in v temi. Formaldehid smo nato odstranili s centrifugiranjem in pelete resuspendirali v 500 μ l citratnega pufra s pH 4,6. S 4-minutno inkubacijo v vodni kopeli pri 37 °C smo odstranili transferin vezan na površino celic. Po inkubaciji smo dodali po 1 μ l gojišča, centrifugirali ter pelete resuspendirali v 300 μ l PBS, s čimer smo jih pripravili za merjenje intenzitete fluorescence fluoresceina (FITC) s pretočnim citometrom.

Fluoresenco FITC-transferina v celicah B16F1 smo merili s pretočnim citometrom (BD FACSCanto II; BD Biosciences). Celice so bile izpostavljene laserju, ki je oddajal svetlobo valovne dolžine 488 nm. Za merjenje odbite fluorescentne svetlobe smo uporabili 530/30 nm filter. Z merjenjem povprečne in mediane intenzitete fluorescence fluoresceina, vezanega na transferin smo določili delež živih celic, v katere je transferin vstopal, ter sklepali na količino transferina, ki je v celice vstopil.

3.9 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Eksperimentalno pridobljene podatke smo statistično analizirali tako, da smo najprej preverili porazdeljenost podatkov za vsako proučevano skupino. V primeru, da so bili podatki normalno porazdeljeni, smo za vsako proučevano skupino izračunali aritmetično sredino in pripadajočo standardno napako. Primerjavo več skupin smo izvedli z enosmerno analizo varianc, pri čemer smo po Holm-Sidakovi metodi primerjali razlike med posameznimi skupinami, ki so se statistično značilno razlikovale. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabljali program Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., London, Velika Britanija).

4 REZULTATI

Rezultati raziskave so objavljeni v članku:

Markelc B., Skvarča E., Dolinšek T., Prevodnik Kloboves V., Coer A., Serša G., Čemažar M. 2015. Inhibitor of endocytosis impairs gene electrotransfer to mouse muscle *in vivo*. Bioelectrochemistry, 103: 111-119

4.1 VPLIV INHIBITORJEV ENDOCITOZE NA VIABILNOST IN KLONOGENOST CELIC

Koncentracije inhibitorjev, ki so primerne za izvedbo poskusov električno posredovanega vnosa plazmidne DNA v celice smo določili tako, da smo preverili vpliv inhibitorjev na viabilnost in klonogenost celic.

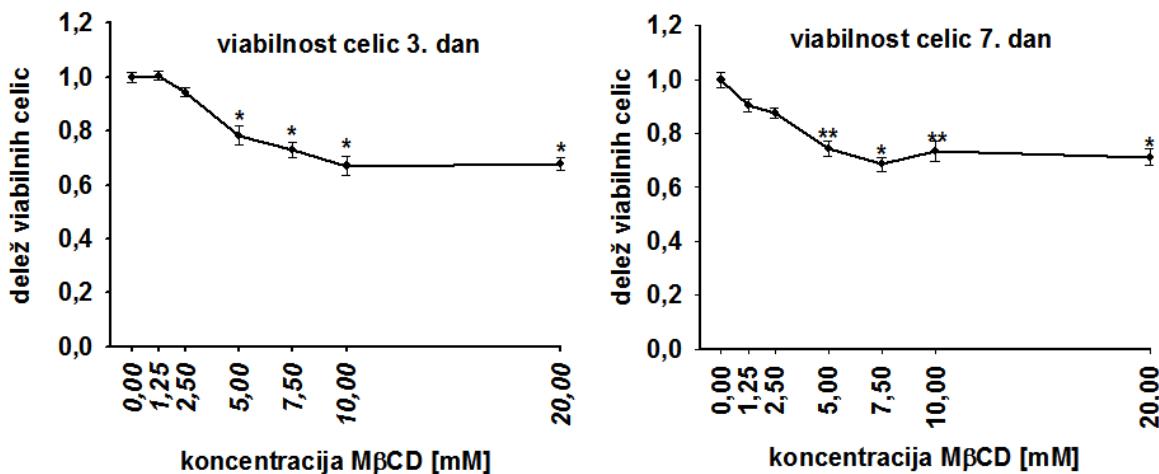
Pri določanju vpliva inhibitorja na viabilnost celic smo merili metabolno aktivnost celic. Tekom inkubacije z reagentom alamarBlue® so metabolno aktivne celice pretvarjale nefluorescentno komponento resazurin (oksidiran alamarBlue®) v fluorescentno molekulo resorufin (reduciran alamarBlue®). Količina nastale fluorescence je sorazmerna številu živih, metabolno aktivnih celic, kar omogoča kvantitativno oceno viabilnosti celic (O'Brien in sod., 2000).

S testom klonogenosti smo določali vpliv Con A in dynasorja (za M β CD testa klonogenosti nismo izvedli) na sposobnost podvojevanja celic oziroma na njihovo sposobnost tvorbe kolonij. Celice, izpostavljene različnim koncentracijam Con A oziroma dynasorja, smo nasadili na petrijevke. Po 7 dneh gojenja smo prešteli makroskopsko vidne kolonije ter določili uspešnost nasaditve celic (enačba 2) in delež prezivelih celic (enačba 3) kot je opisano v poglavju 3.7.

4.1.1 Vpliv metil- β -ciklodekstrina na viabilnost celic B16F1

Metil- β -ciklodekstrin (M β CD) tvori topne inkluzijske komplekse s holesterolom in ga tako izloča iz celičnih membran. Izpostavitev celic M β CD torej prizadene njihovo normalno fiziologijo (Ivanov, 2008). S testom viabilnosti celic smo določili koncentracije M β CD, ki so primerne za uporabo pri poskusih inhibicije električno posredovanega vnosa plazmidne DNA v celice B16F1, pri katerih viabilnost celic precej zmanjša tudi izvedba elektroporacije. Viabilnost celic smo merili tretji in sedmi dan po izpostavitvi celic različnim koncentracijam M β CD in nasaditvi na mikrotitrske plošče.

Viabilnost celic B16F1 se je glede na kontrolno skupino, ki ni bila izpostavljena M β CD, statistično značilno zmanjšala (Slika 7). V koncentracijskem območju od 0 do 10 mM M β CD se je viabilnost manjšala z večanjem koncentracije. Pri 10 mM M β CD je viabilnost celic dosegla 70 % in se z nadaljnjjim večanjem koncentracije M β CD ni več zmanjševala (viabilnost je dosegla plato).



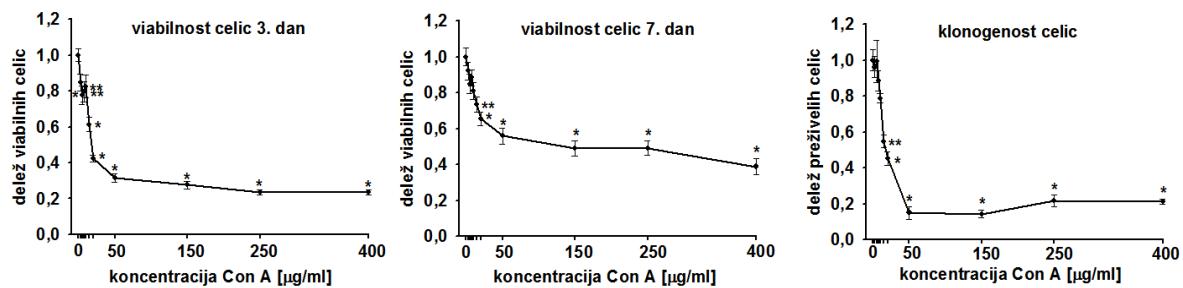
Slika 7: Viabilnost celic B16F1 tretji (levo) in sedmi (desno) dan po izpostavitvi M β CD, določena kot sposobnost celic za pretvarjanje reagenta alamarBlue®. Točke prikazujejo relativne srednje vrednosti viabilnosti celic in pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino. *P<0,001 in **P<0,050 proti kontrolni skupini ter skupinama celic, izpostavljenih 1,25 mM oziroma 2,50 mM M β CD. Izvedli smo tri ponovitve testa viabilnosti po osem paralelk.

4.1.2 Vpliv konkanavalina A na viabilnost in klonogenost celic B16F1

Con A je lektinski protein, ki se ga uporablja za inhibicijo endocitoze posredovane s klatrinom (Luttrell in sod., 1997; Tang in sod., 2000). Za Con A in več drugih lektinov se je izkazalo, da so citotoksični tako za normalne kot maligne celice (Gorelik, 1999; Mody in sod., 1995), zato smo izvedli teste viabilnosti in klonogenosti celic ter s tem določili koncentracije Con A, primerne za izvedbo poskusov inhibicije električno posredovanega vnosa plazmidne DNA v celice B16F1. Viabilnost celic smo merili tretji in sedmi dan po izpostavitvi celic različnim koncentracijam Con A in nasaditvi na mikrotitrsko ploščo.

Pridobljeni podatki kažejo, da je Con A zelo citotoksičen že pri nizkih koncentracijah. Viabilnost celic B16F1 se je glede na kontrolno skupino, ki Con A ni bila izpostavljena, statistično značilno močno zmanjšala (Slika 8). Pri rezultatih testa viabilnosti smo opazili plato v koncentracijskem območju od 50 µg/ml do 400 µg/ml, ki je bil sedmi dan po izpostavitvi celic Con A nekoliko višje (viabilnih približno 50 % celic) kot tretji dan (viabilnih približno 25 % celic). Izboljšanje viabilnosti kaže na to, da je v tem času nekaj več celic uspelo obnoviti fiziologijo do te mere, da so bile sposobne pretvarjati

nefluorescenten resazurin v resorufin, katerega fluorescenco smo merili in asocirali z viabilnostjo celic. Višanje koncentracije Con A v testiranem območju od 100 µg/ml do 400 µg/ml, ni dodatno zmanjšalo viabilnosti celic. Rezultati testa klonogenosti izvedenega 7 dni po izpostavitvi Con A kažejo, da kljub temu, da so nekatere celice ohranile metabolno funkcijo, niso bile sposobne podvojevanja. Le tega je namreč bilo sposobnih zgolj 20 % celic, ki so bile Con A izpostavljene 30 minut v koncentracijskem območju od 50 µg/ml do 400 µg/ml (Slika 8).

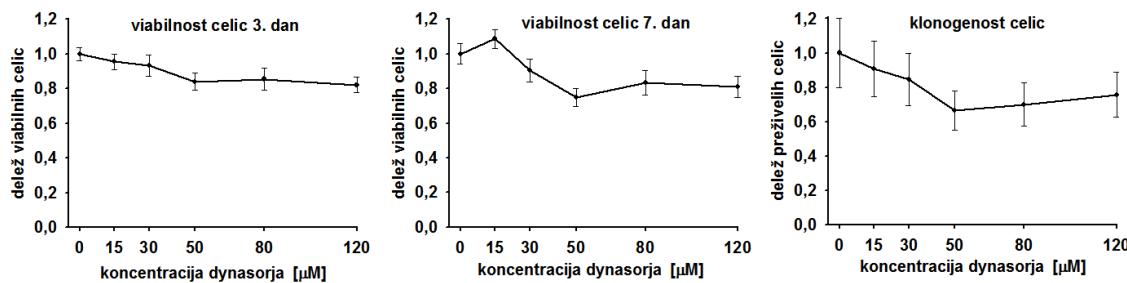


Slika 8: Viabilnost celic B16F1 tretji (levo) in sedmi (sredina) dan po izpostavitvi Con A ter njihova klonogenost (desno). Viabilnost celic smo določali kot sposobnost celic za pretvarjanje reagenta alamarBlue®, klonogenost pa kot sposobnost celic za tvorbo kolonij. Točke prikazujejo relativne srednje vrednosti viabilnosti oz. klonogenosti celic in pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino. *P<0,001 in **P<0,050 proti kontrolni skupini za viabilnost ter proti kontrolni skupini in skupinam celic, izpostavljenim nizkim koncentracijam Con A (do 10 µg/ml) za klonogenost celic. Izvedli smo pet ponovitev testa viabilnosti po osem paralelk ter dve ponovitvi testa klonogenosti po tri paralelke.

4.1.3 Vpliv dynasorja na viabilnost in klonogenost celic B16F1

Dynasore je inhibitor endocitoze, ki v pogojih *in vitro* moti GTPazno aktivnost dinamina 1, dinamina 2 in mitohondrijskega dinamina, ne vpliva pa na ostale majhne GTPaze. Dynasore je učinkovit inhibitor endocitotskih poti, odvisnih od dinamina, saj v nekaj sekundah po dodatku blokira tvorbo prevlečenih veziklov (Macia in sod., 2006).

Pridobljeni rezultati kažejo trend zmanjšanja viabilnosti in zmožnosti reprodukcije celic B16F1, ki smo jih izpostavili dynasorju v koncentracijskem območju od 15 µM do 120 µM, vendar v primerjavi s kontrolno skupino celic, ki dynasorju niso bile izpostavljene, zmanjšanje ni statistično značilno (Slika 9).



Slika 9: Viabilnost celic B16F1 tretji (levo) in sedmi (sredina) dan po izpostavitvi dynasoru ter njihova klonogenost (desno). Viabilnost celic smo določali kot sposobnost celic za pretvarjanje reagenta alamarBlue®, klonogenost pa kot sposobnost celic za tvorbo kolonij. Točke prikazujejo relativne srednje vrednosti viabilnosti oz. klonogenosti celic in pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino. Izvedli smo štiri ponovitve poskusov po osem paralelk za test viabilnosti in tri paralelke za test klonogenosti

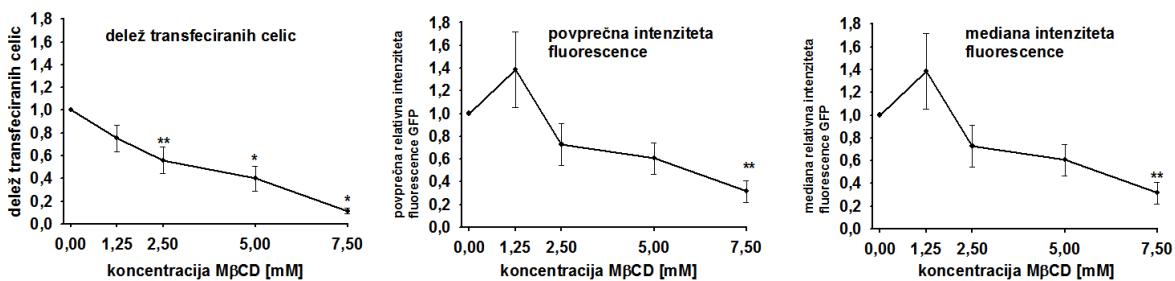
4.2 VPLIV INHIBITORJEV ENDOCITOZE NA ELEKTRIČNO POSREDOVAN VNOS PLAZMIDNE DNA V CELICE

Uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1 pri električnih parametrih 600 V/cm, trajanju pulza 5 ms in frekvenci 1 Hz v prisotnosti inhibitorjev endocitoze (ali brez inhibitorjev, kar je bila kontrola) smo določali s fluorescenčno mikroskopijo in pretočno citometrijo. Z opazovanjem celic pod mikroskopom smo pridobili zgolj okvirno informacijo o morebitni inhibiciji vnosa plazmidne DNA v celice. Fluorescenčna mikroskopija omogoča določitev deleža transfeiranih celic, a je tako kvantifikacija precej nenatančna in subjektivna glede na zajeto vidno polje. Prav iz tega razloga v diplomskem delu predstavljamo zgolj rezultate enega reprezentativnega poskusa, čeprav smo fluorescenčno mikroskopijo uporabili pri vseh poskusih. Za natančno določitev uspešnosti elektrotransfekcije smo s pretočnim citometrom določili delež transfeiranih celic ter intenzitetu fluorescence GFP.

4.2.1 Vpliv metil- β -ciklodekstrina na uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1

Sodelovanje procesa endocitoze pri električno posredovanem vnosu plazmidne DNA v celice smo testirali tako, da smo celice B16F1 pred izvedbo transfekcije s plazmidom pCMV-EGFP-N1 inkubirali z M β CD, ki inhibira poti endocitoze, pri katerih sodeluje holesterol (lipidni rafti). Celice smo izpostavili različnim koncentracijam M β CD v območju od 1,25 mM do 7,50 mM M β CD. Uspešnost elektrotransfekcije smo določili z uporabo pretočnega citometra, s katerim smo izmerili delež živih celic, ki so izražale vneseni gen za GFP, ter mediano in povprečno intenzitetu fluorescence GFP.

Delež transfeciranih celic B16F1 se je glede na kontrolno skupino (elektroporacija netretiranih celic v prisotnosti plazmida) statistično značilno zmanjšal v koncentracijskem območju od 2,50 mM do 7,50 mM M β CD. Pri 7,5 mM koncentraciji M β CD je bila elektrotransfekcija skoraj popolnoma inhibirana (transfeciranih približno 10 % celic) (Slika 10). Z naraščanjem koncentracije M β CD sta upadali tudi mediana in povprečna intenziteta fluorescence GFP. Statistično značilno zmanjšanje intenzitete fluorescence glede na kontrolno skupino celic je bilo doseženo le pri najvišji uporabljeni koncentraciji M β CD (7,5 mM).



Slika 10: Vpliv M β CD na uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1. Celice smo inkubirali 30 minut z različnimi koncentracijami M β CD in izvedli elektroporacijo v dveh paralelkah za vsako skupino celic. Uspešnost elektrotransfekcije smo določili z merjenjem fluorescence GFP živih celic (20.000 celic) s pretočno citometrijo. Poskus smo izvedli sedemkrat. Levo: Učinkovitost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1 predstavljena kot delež transfeciranih celic. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. *P<0,001, **P<0,050 proti kontrolni skupini celic. Sredina: Povprečna relativna intenziteta fluorescence po elektrotransfekciji celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. **P<0,050 proti kontrolni skupini celic. Desno: Mediana relativna intenziteta fluorescence po elektrotransfekciji celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. **P<0,050 proti kontrolni skupini celic.

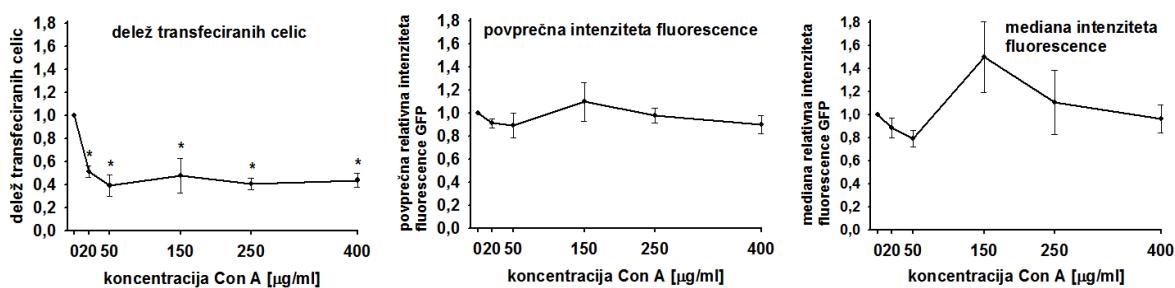
4.2.2 Vpliv konkanavalina A na uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1

Z uporabo Con A smo testirali sodelovanje procesa endocitoze odvisne od klatrina pri vstopu plazmidne DNA v celice po elektroporaciji. V ta namen smo celice B16F1 inkubirali s Con A v koncentracijskem območju od 20 µg/ml do 400 µg/ml. Nato smo izvedli elektroporacijo v prisotnosti plazmida pCMV-EGFP-N1. Uspešnost elektrotransfekcije smo določili s pretočno citometrijo, pri kateri smo izmerili delež živih celic, ki so izražale vneseni gen za GFP, ter intenziteto fluorescence GFP.

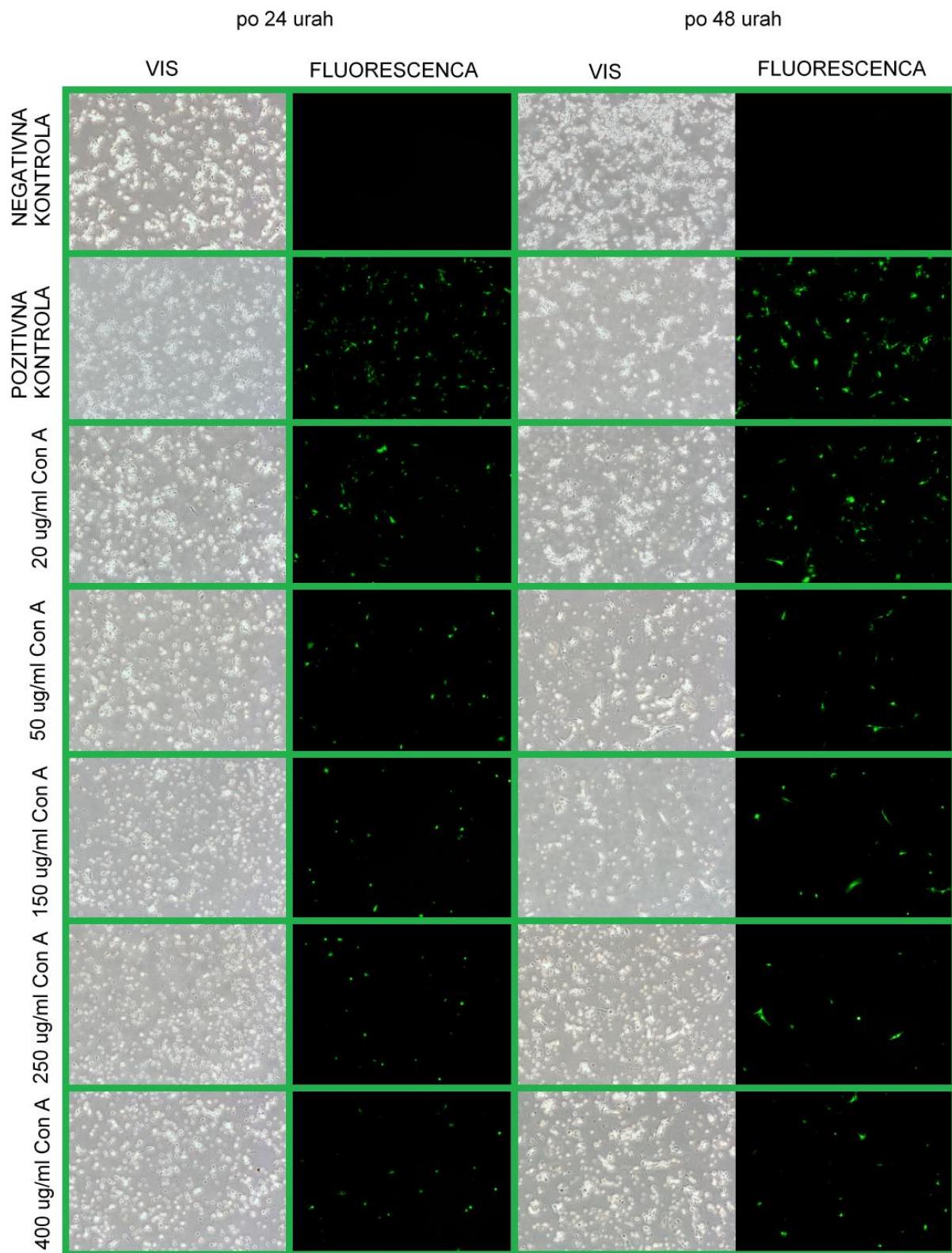
Delež transfeciranih celic se je v primerjavi s kontrolno skupino celic statistično značilno zmanjšal že pri najmanjši uporabljeni koncentraciji Con A - 20 µg/ml (Slika 11). Pri koncentraciji Con A 50 µg/ml je bilo glede na kontrolno skupino transfeciranih približno 40 % celic. Dodatno večanje koncentracije Con A ni povzročilo dodatnega zmanjšanja

deleža transfeciranih celic. Mediana in povprečna intenziteta fluorescence GFP se z višanjem koncentracije Con A nista statistično značilno spremenjali, kar pomeni, da so transfecirane celice privzemale enako količino plazmidne DNA neodvisno od koncentracije Con A.

Rezultati, pridobljeni s pretočno citometrijo, potrjujejo naša opažanja na podlagi mikroskopiranja. Iz slik reprezentativnega poskusa (Slika 12) je namreč razvidno nekolikšno zmanjšanje deleža transfeciranih celic, ki fluorescirajo zeleno. Prav tako je iz slik razvidno citotoksično delovanje Con A, saj se z večanjem koncentracije Con A veča delež mrtvih celic, ki so na slikah posnetih pod vidno svetlobo videti kroglaste oblike, medtem ko so žive celice vretenaste oblike.



Slika 11: Vpliv Con A na uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1. Celice smo inkubirali 30 minut z različnimi koncentracijami Con A in izvedli elektroporacijo v dveh paralelkah za vsako skupino celic. Uspešnost elektrotransfekcije smo določili z merjenjem fluorescence GFP živih celic (20.000 celic) s pretočno citometrijo. Poskus smo izvedli štirikrat. Levo: Učinkovitost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1 prikazana kot delež transfeciranih celic. Prikazane so relativne srednje vrednosti učinkovitosti elektrotransfekcije in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. *P<0,001 proti kontrolni skupini celic. Sredina: Povprečna relativna intenziteta fluorescence po elektrotransfekciji celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. Desno: Mediana relativna intenziteta fluorescence po elektrotransfekciji celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic.



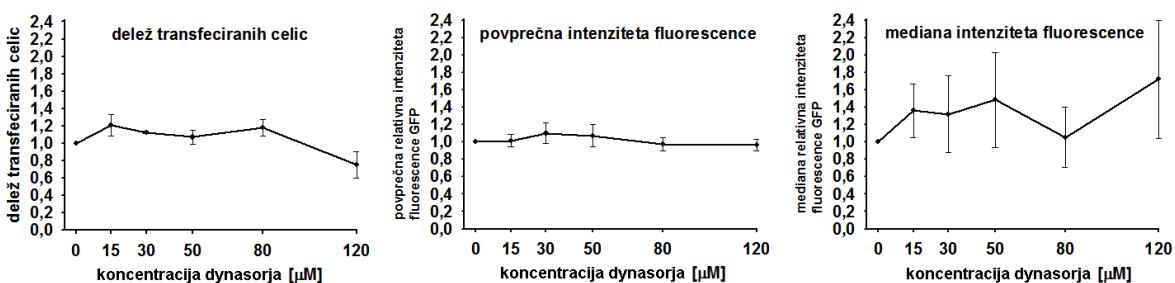
Slika 12: Slike celic B16F1 pri 40-kratni povečavi pod fluorescenčno svetlobo (drugi in četrti stolpec) in pod vidno svetlobo (prvi in tretji stolpec) pri različnih koncentracijah Con A. Celice smo slikali 24 ur (prva dva stolpca) in 48 ur (tretji in četrti stolpec) po izvedbi elektrotransfekcije s plazmidom pCMV-EGFP-N1.

Negativna kontrola predstavlja kontrolno skupino celic, ki je bila elektroporirana v odsotnosti plazmidne DNA in Con A. Pozitivna kontrola predstavlja kontrolno skupino celic, ki so bile elektroporirane v prisotnosti plazmidne DNA in odsotnosti inhibitorja Con A. Slike so rezultat enega reprezentativnega poskusa.

4.2.3 Vpliv dynasorja na uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1

Za testiranje sodelovanja dinamina ozziroma procesov endocitoze, ki so odvisni od dinamina, pri električno posredovanem vnosu plazmidne DNA v celice, smo izvedli poskuse z inhibitorjem endocitoze dynasorjem v koncentracijskem območju od $15 \mu\text{M}$ do $120 \mu\text{M}$. Za določitev uspešnosti elektrotransfekcije smo s pretočnim citometrom določili delež celic, ki so izražale vneseni gen za GFP, ter intenzitetu fluorescence GFP.

Z večanjem koncentracije dynasorja se delež transfeciranih celic ter mediana in povprečna intenziteta fluorescence GFP glede na kontrolno skupino niso statistično značilno spremenjali (Slika 13).



Slika 13: Vpliv dynasorja na uspešnost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1. Celice smo inkubirali 30 minut z različnimi koncentracijami dynasorja in izvedli elektroporacijo v dveh paralelkah za vsako skupino celic. Uspešnost elektrotransfekcije smo določili z merjenjem fluorescence GFP živilih celic (20.000 celic) s pretočno citometrijo. Poskus smo izvedli štirikrat. Levo: Učinkovitost elektrotransfekcije celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1 prikazana kot delež transfeciranih celic. Prikazane so relativne srednje vrednosti učinkovitosti elektrotransfekcije in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. Sredina: Povprečna relativna intenziteta fluorescence po elektrotransfekciji celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. Desno: Mediana relativna intenziteta fluorescence po elektrotransfekciji celic B16F1 s plazmidom pCMV-EGFP-N1. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic.

4.3 VPLIV INHIBITORJEV ENDOCITOZE NA VSTOP TRANSFERINA V CELICE

Serumski transferin je velik enoverižni glikoprotein, zgrajen iz približno 700 aminokislin, z molekulsko maso okrog 80 kDa, brez hema, ki ima sposobnost vezave dveh Fe^{3+} atomov (Qian in sod., 2002; Ciechanover in sod., 1983). Polipeptidna veriga je upognjena v dva strukturno podobna, a funkcionalno različna režnja, ki ju imenujemo N- in C- reženj.

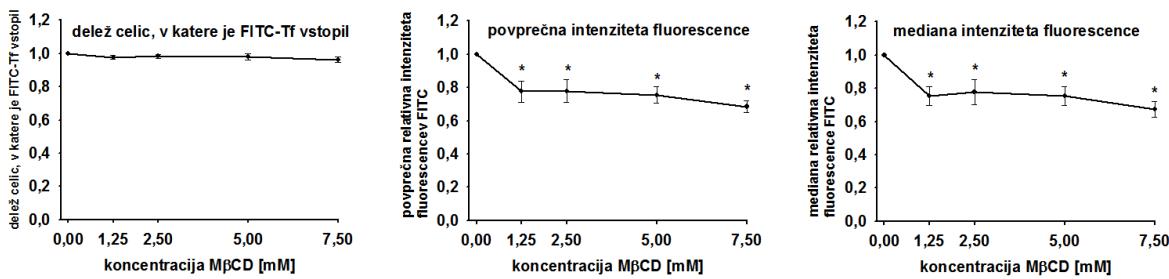
Režnja sta povezana s kratkim peptidom. Vsak reženj se nadalje deli v dve domeni, ki omejujeta globoko hidrofilno režo, v kateri se nahaja vezavno mesto za železo (Qian in sod., 2002). Poglavitna vloga transferina je prenašanje železa od mest absorpcije in skladiščenja preko sistemski cirkulacije do celic in tkiv, pri čemer v celice vstopa z receptorsko posredovano endocitozo (Qian in sod., 2002; Ciechanover in sod., 1983). Pri procesu receptorsko posredovane endocitoze sodelujejo specifični receptorji na celični površini, ki v splošnem v celice vstopajo preko prevlečenih jamic. Po vstopu kompleksov receptor-ligand v celico se ligandi običajno razgradijo v kislem okolju lizosomov, receptorji pa potujejo nazaj na površino celice, kjer so na voljo za ponovno uporabo. Za razliko od mnogih ligandov, ki vstopajo v celice na ta način, se transferin v celicah ne razgradi. V celice vstopa transferin, vezan z enim ali dvema atomoma železa, znotraj celice se železo pri kislem pH odcepi, apotransferin (transferin brez železa) pa se od receptorja odcepi kasneje in se izloči (van Renswoude in sod., 1982; Dautry-Varsat in sod., 1983; Ghosh in sod., 1994).

Humani serumski transferin, konjugiran s fluoresceinom (FITC-transferin), smo uporabili kot marker za endocitozo posredovano s klatrinom. Testirali smo vpliv metil- β -ciklodekstrina in konkanavalina A na vstop transferina v celice B16F1.

4.3.1 Vpliv metil- β -ciklodekstrina na vstop FITC-Tf v celice B16F1

Transferin v celice vstopa v procesu receptorsko posredovane endocitoze odvisne od klatrina (Rodal in sod., 1999). Z namenom testiranja sodelovanja procesa endocitoze odvisne od holesterola pri vstopu transferina smo celice B16F1 pred inkubacijo s FITC-Tf tretirali z različnimi koncentracijami M β CD v območju od 1,25 mM do 7,50 mM. Celice smo s transferinom inkubirali 20 minut, nato smo jih fiksirali ter sprali transferin, vezan na površino celic. S pretočno citometrijo smo določili delež živih celic, v katere je transferin vstopil, ter mediano in povprečno intenziteto fluorescence fluoresceina, vezanega na transferin.

Delež celic B16F1, v katere je FITC-Tf vstopil, se glede na kontrolno skupino celic ni statistično značilno spremenil (Slika 14). FITC-Tf je vstopil v praktično vse celice, vendar v manjši meri, na kar nakazuje statistično značilno zmanjšanje intenzitete fluorescence glede na kontrolno skupino celic. Grafa povprečne in mediane relativne intenzitete fluorescence dosežeta plato pri 1,25 mM koncentraciji M β CD, pri kateri relativna intenziteta fluorescence dosega 77 % relativne intenzitete kontrolne skupine celic.

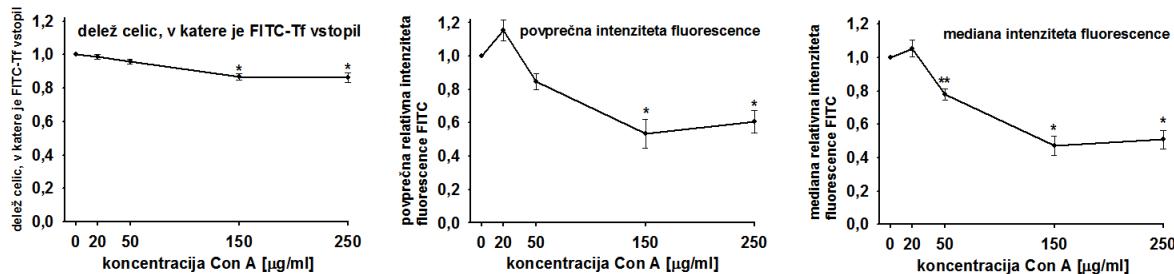


Slika 14: Vpliv M β CD na vstop FITC-Tf v celice B16F1. Celice smo najprej inkubirali 30 minut z različnimi koncentracijami M β CD, nato 20 minut s FITC-Tf v končni koncentraciji 20 μ g/ml, nato smo celice fiksirali s formaldehidom ter površinsko vezan transferin odstranili s citratnim pufrom. Vstop FITC-Tf v celice smo določili z merjenjem fluorescence FITC v živih celicah (20.000 celic) s pretočno citometrijo. Poskus smo izvedli trikrat. Levo: Delež živih celic B16F1, v katere je vstopil FITC-Tf. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. Sredina: Povprečna relativna intenziteta fluorescence FITC znotraj celic B16F1. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. *P<0,050 proti kontrolni skupini celic. Desno: Mediana relativna intenziteta fluorescence FITC znotraj celic B16F1. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. *P<0,050 proti kontrolni skupini celic.

4.3.2 Vpliv konkanavalina A na vstop FITC-Tf v celice B16F1

Inhibitorne lastnosti Con A smo testirali s poskusom inhibicije endocitoze transferina, ki v celice vstopa v procesu receptorsko posredovane endocitoze odvisne od klatrina (Rodal in sod., 1999). Pri poskusu smo celice B16F1 inkubirali 30 min v prisotnosti različnih koncentracij Con A v območju od 20 μ g/ml do 250 μ g/ml Con A. Nato smo celice 20 min inkubirali v prisotnosti FITC-Tf, jih fiksirali in odstranili površinsko vezan transferin. S pretočno citometrijo smo nato določili delež živih celic, v katere je transferin vstopil, ter mediano in povprečno intenzitetu fluoresceina vezanega na transferin.

Glede na kontrolno skupino celic je delež celic, v katere je FITC-Tf vstopil, pri višjih koncentracijah Con A (od 150 μ g/ml dalje) statistično značilno nižji (Slika 15). V primerjavi s kontrolo je Con A pri najvišjih testiranih koncentracijah povzročil približno 10 % zmanjšanje deleža celic, v katere je FITC-Tf vstopal. Statistično značilno je tudi zmanjšanje mediane in povprečne intenzitete fluorescence FITC pri najvišjih uporabljenih koncentracijah Con A. Pri najvišjih testiranih koncentracijah je Con A povzročil približno 45 % zmanjšanje intenzitete fluorescence.



Slika 15: Vpliv Con A na vstop FITC-Tf v celice B16F1. Celice smo najprej inkubirali 30 minut z različnimi koncentracijami Con A, nato 20 minut s FITC-Tf v končni koncentraciji 20 µg/ml, nato smo celice fiksirali s formaldehidom ter površinsko vezan transferin odstranili s citratnim pufrom. Vstop FITC-Tf v celice smo določili z merjenjem fluorescence FITC v živih celicah (20.000 celic) s pretočno citometrijo. Poskus smo izvedli petkrat. Levo: Delež živih celic B16F1, v katere je vstopil FITC-Tf. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. *P<0,001 proti kontrolni skupini. Sredina: Povprečna relativna intenziteta fluorescence FITC znotraj celic B16F1. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. *P<0,001 proti kontrolni skupini celic. Desno: Mediana relativna intenziteta fluorescence FITC znotraj celic B16F1. Prikazane so relativne srednje vrednosti in njim pripadajoče standardne napake, normalizirane glede na kontrolno skupino celic. *P<0,001, **P<0,050 proti kontrolni skupini celic.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vpliv inhibitorjev endocitoze na viabilnost in klonogenost celic

5.1.1.1 Vpliv metil- β -ciklodekstrina na viabilnost celic B16F1

Naši rezultati testa viabilnosti celic B16F1 izpostavljenih različnim koncentracijam M β CD so v skladu z rezultati raziskovalne skupine, ki je primerjala citotoksičnost različnih ciklodekstrinov za endoteljske celice HUVEC. Castagne in sodelavci (2009) so vpliv M β CD na viabilnost celic preverjali z merjenjem vsebnosti celokupnih proteinov. Vsebnost proteinov je namreč v korelaciji s številom celic, kar omogoča oceno viabilnosti celic. Pri celicah HUVEC, ki so jih eno uro inkubirali z 10 mM M β CD, so izmerili 52,2 % vsebnost proteinov glede na kontrolno skupino celic, ki ni bila izpostavljena M β CD. Rezultati naše raziskave (slika 7) kažejo boljše preživetje celic (približno 70 % viabilnost) pri visokih koncentracijah M β CD (10 mM in 20 mM M β CD), vendar smo za razliko od omenjene skupine raziskovalcev, celice inkubirali z M β CD le 30 minut in v prisotnosti 10 % fetalnega telečjega seruma (FBS). Prisotnost FBS lahko vpliva na rezultat raziskave, saj vsebuje enake lipide kot celične membrane, zaseda mesta za vezavo (tvorbo inkluzijskih kompleksov) pri M β CD ter s tem zmanjša citotoksičnost M β CD za celice (Castagne in sod., 2009). O vplivu seruma na zmanjšanje citotoksičnosti M β CD poročajo tudi Subtil in sodelavci (1999). V raziskavi so sicer ugotavljali vpliv M β CD na potek endocitoze transferinskega receptorja, a so ugotovili, da 12-urna inkubacija celic CHO predhodno tretiranih z 10 mM M β CD (30 minut) v gojišču s serumom popolnoma izniči delovanje M β CD. Endocitoza transferinskega receptorja, prvotno inhibirana z M β CD, se pri inkubaciji celic v gojišču s serumom povrne na prvotno raven. Poleg lipidnih komponent seruma reverzibilnost delovanja M β CD omogoča tudi sinteza holesterola, ki poteka v celicah (Subtil in sod., 1999). Rezultati naše raziskave so tudi v skladu z rezultati, ki so jih pridobili Kiss in sodelavci (2007). Celice HeLa so inkubirali 30 minut pri 37° C v 5 % CO₂ atmosferi z različnimi koncentracijami ciklodekstrinov (v odsotnosti serum) njihovo viabilnost pa so merili z izvedbo MTT testa (Kiss in sod., 2007), pri katerem je viabilnost celic sorazmerna s sposobnostjo presnove tetrazolijeve soli MTT v mitohondrijih živih celic (Mosmann, 1983).

5.1.1.2 Vpliv konkanavalina A na viabilnost in klonogenost celic B16F1

Inhibitorni učinek Con A na proces endocitoze posredovane s klatrinom je najverjetneje posledica navzkrižnega povezovanja sladkornih ostankov na receptorjih, ki v celice vstopajo po tej poti (Koenig, 2004). Povezovanje receptorjev na celični površini onemogoča njihovo vstopanje v celice, kar vodi do blokade mnogih procesov, ki so

ključnega pomena za preživetje in sposobnost podvajanja celic. Za Con A in več drugih lektinov se je izkazalo, da so citotoksični tako za normalne kot maligne celice (Gorelik, 1999; Mody in sod., 1995). To potrjujejo rezultati naše raziskave (slika 8), ki kažejo, da so za celice melanoma B16F1 že nizke koncentracije Con A močno citotoksične. Pri rezultatih testa viabilnosti smo opazili plato v koncentracijskem območju od 50 µg/ml do 400 µg/ml, ki je bil sedmi dan po izpostavitvi celic Con A nekoliko višje (viabilnih približno 50 % celic) kot tretji dan (viabilnih približno 25 % celic). Izboljšanje viabilnosti kaže na to, da je v tem času nekaj več celic uspelo obnoviti fiziologijo do te mere, da so bile sposobne pretvarjati nefluorescenten resazurin v resorufin, katerega fluorescenco smo merili in asocirali z viabilnostjo celic. Rezultati testa klonogenosti izvedenega 7 dni po izpostavitvi Con A kažejo, da kljub temu, da so nekatere celice ohranile metabolno funkcijo, niso bile sposobne podvojevanja. Le tega je namreč bilo sposobnih zgolj 20 % celic, ki so bile Con A izpostavljene 30 min v koncentracijskem območju od 50 µg/ml do 400 µg/ml.

5.1.1.3 Vpliv dynasorja na viabilnost in klonogenost celic B16F1

Rezultati naše raziskave, kjer inkubacija celic z inhibitorjem endocitoze dynasore ni imela vpliva na viabilnost celic B16F1 (slika 9) so v skladu z raziskavo, s katero so Macia in sodelavci (2006) dokazali, da dynasore ni citotoksičen. Celice BSC1 so 48 ur inkubirali v prisotnosti 80 µM dynasorja. Rast celic se je sicer ustavila, vendar so celice ostale viabilne in se niso odlepile od podlage, drugih drastičnih sprememb pa niso opazili. Del celic so prenesli v sveže gojišče brez dynasorja ter inkubirali 24 ur. Število celic se je povečalo, kar dokazuje reverzibilnost zaustavitve rasti, povzročene z dynasorjem (Macia in sod., 2006).

5.1.2 Vpliv inhibitorjev endocitoze na električno posredovan vnos plazmidne DNA v celice

V raziskavi smo potrjevali hipotezo, da je endocitoza ključen korak za uspešno elektrotransfekcijo. S tem namenom smo opazovali vpliv treh farmakoloških inhibitorjev endocitoze na uspešnost elektrotransfekcije. Rezultati kažejo, da inhibitorji endocitoze lahko zmanjšajo uspešnost elektrotransfekcije pri celicah mišjega melanoma B16F1. Testirali smo učinke treh različnih inhibitorjev – M β CD, ki je splošni inhibitor endocitoze, Con A, ki inhibira endocitozo posredovano s klatrinom, in dynasorja, inhibitorja dinamina.

Z uporabo M β CD smo dosegli skoraj popolno blokado elektrotransfekcije (slika 10). Pri najvišji uporabljeni koncentraciji (7,5 mM) M β CD je bilo transfeciranih zgolj 10 % živih celic glede na kontrolno skupino. Prav tako je uspešnost elektrotransfekcije močno zmanjšal Con A (sliki 11 in 12). Pri višjih koncentracijah (50 - 400 µg/ml Con A) je bilo transfeciranih približno 40 % živih celic v primerjavi s kontrolo, medtem ko dynasore na

uspešnost elektrotransfekcije ni vplival (slika 13). Poleg zmanjšanja deleža transfeciranih celic smo pri poskusih z M β CD opazili tudi zmanjšanje intenzitete fluorescence GFP znotraj transfeciranih celic (slika 10), kar kaže na to, da je v transfecirane celice vstopalo manj plazmidne DNA, kot pri kontrolnih celicah. Con A (slika 11) ter dynasore (slika 13) takega vpliva na transfecirane celice nista imela. Naši rezultati podpirajo teoretični model, po katerem plazmidna DNA vstopa v citosol preko endocitotskih veziklov. Rosazza in sodelavci (2012) so pri izvedbi podobne raziskave z M β CD pridobili rezultate, ki se ujemajo z našimi. V njihovi raziskavi je tretiranje CHO celic s 5 mM M β CD povzročilo petkratno zmanjšanje deleža transfeciranih celic (20 % celic transfeciranih) ter prepolovilo intenziteto fluorescence GFP v notranjosti transfeciranih celic glede na kontrolno skupino celic (Rosazza in sod., 2012). Pri enaki koncentraciji M β CD je bilo v naši raziskavi transfeciranih 40 % celic B16F1 v primerjavi s kontrolno skupino, povprečna in mediana intenziteta fluorescence pa sta dosegli 60 % vrednosti kontrolne skupine (slika 10). Razlike v rezultatih so najverjetneje posledica uporabe različnih celičnih linij, razlik v trajanju inkubacije celic z M β CD, uporabljeni koncentracije plazmida ter parametrov električnega polja.

Z namenom raziskovanja vloge endocitoze pri električno posredovanem vnosu plazmidov sta Wu in Yuan (2011) testirala vpliv klorpromazina, genisteina, dynasorja in genskega utišanja dinamina z siRNA na učinkovitost elektrotransfekcije. Pred izvedbo elektroporacije so celice B16F10 eno uro inkubirali v prisotnosti 28 μ M klorpromazina, 200 μ M genisteina ali 80 μ M dynasorja. Vsi trije inhibitorji so znatno zmanjšali učinkovitost elektrotransfekcije s plazmidno DNA. Glede na kontrolno skupino celic je klorpromazin povzročil zmanjšanje deleža transfeciranih celic na približno 65 %, genistein in dynasore pa na približno 35 %. Specifično utišanje izražanja dinamina II je povzročilo približno 50 % znižanje učinkovitosti elektrotransfekcije glede na kontrolo (Wu in Yuan, 2011). Genistein inhibira endocitozo, ki poteka preko kaveol (Wu in Yuan, 2011) in je torej podobno kot M β CD precej splošen inhibitor endocitoze. Klorpromazin inhibira tvorbo jamic prevlečenih s klatrinom (Wu in Yuan, 2011), zato lahko njegov vpliv na elektrotransfekcijo do neke mere primerjamo z vplivom Con A. Pri obeh raziskavah je splošni inhibitor endocitoze zmanjšal delež transfeciranih celic v večji meri kot inhibitor endocitoze, posredovane s klatrinom.

Medtem ko v naši raziskavi dynasore ni imel vpliva na učinkovitost elektrotransfekcije (slika 13) pa Wu in Yuan (2011) poročata o 65 % znižanju deleža elektrotransfeciranih celic z uporabo 80 μ M dynasorja in 50 % znižanje deleža elektrotransfeciranih celic v primeru utišanja izražanja gena za dinamin II (Wu in Yuan, 2011). Delovanje dinamina je ključnega pomena pri tvorbi veziklov obdanih s klatrinom, ker sodeluje pri zadnji fazi uvihanja membrane, pri kateri se dokončno oblikovana jamică odcepi od membrane in tvori vezikel (Macia in sod., 2006). Glede na vlogo dinamina pri procesu endocitoze in na doseženo znižanje učinkovitosti elektrotransfekcije z uporabo splošnih inhibitorjev

endocitoze ($M\beta CD$ in genistein) ter inhibitorjev endocitoze, posredovane s klatrinom (Con A in klorpromazin) v obeh raziskavah bi lahko pričakovali, da bi dynasore prav tako moral zmanjšati učinkovitost elektrotransfekcije. Razlika v pridobljenih rezultatih je najverjetneje posledica reverzibilnosti delovanja dynasorja in uporabljenega protokola za izvedbo elektroporacije celic, tretiranih z dynasorjem. Po izpostavitvi celic različnim koncentracijam dynasorja smo celične suspenzije centrifugirali in z odlitjem supernatanta odstranili dynasore. Nato smo pelete resuspendirali v elektroporacijskem pufru in dodali plazmidno DNA ali vodo (za kontrolne skupine). Pri tem postopku je običajno od odstranitve dynasorja do aplikacije pulzov minilo približno 15 minut. Macia in sodelavci (2006) poročajo, da je delovanje dynasorja reverzibilno, kar so dokazali z opazovanjem inhibicije privzema transferina v celice HeLa in obnovitve privzema transferina 20 minut po odstranitvi dynasorja (Macia in sod., 2006). Pri izvedbi naših poskusov je dynasore torej deloval inhibitorno zgolj 5 minut po aplikaciji električnih pulzov.

Wu in Yang (2011) sta izvedla poskuse, pri katerih sta elektroporirane celične suspenzije izpostavila tripsinu, ki cepi membranske proteine vezane s plazmidno DNA, 10 in 40 minut po aplikaciji električnih pulzov. Izpostavitev celic tripsinu ob času 10 minut po pulziranju, je povzročila zmanjšanje deleža elektrotransfeciranih celic na 60 % v primerjavi s kontrolno skupino. Inkubacija s tripsinom dodanim 40 minut po pulziranju pa ni imela vpliva na uspešnost elektrotransfekcije. Ti rezultati kažejo, da se proces vstopa membransko vezane plazmidne DNA dokončno zaključi v času med 10 in 40 minutami po izvedbi elektroporacije (Wu in Yang, 2011). Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da 5-minutna inhibicija dinamina z dynasorjem po aplikaciji električnih pulzov ne zadostuje za učinkovito izvedbo inhibicije procesa endocitoze, ki je ključnega pomena pri transportu plazmidne DNA v celice. Rezultati naše raziskave torej potrjujejo da DNA agregati plazemske membrane ne prečkajo v prvih petih minutah po elektroporaciji, kar je v skladu z rezultati opazovanja domen, kjer poteka agregacija plazmidne DNA na celičnih membranah, na nivoju posameznih celic (Golzio in sod., 2002; Faurie in sod., 2010). Golzio in sodelavci (2002) poročajo, da je po aplikaciji električnih pulzov plazmidna DNA ujeta v elektropermeabilizirani membrani in se ne sprosti niti ob menjavi polarnosti električnega polja. Membranska področja z vsidrano plazmidno DNA je mogoče opaziti tudi še 10 minut po pulziranju, ko elektropermeabilizirana membrana že obnovi nativno stanje (Golzio in sod., 2002).

Prisotnost DNA agregatov na membrani so opazovali tudi Rosazza in sodelavci (2011, 2013), ki so se v svojih raziskavah osredotočili predvsem na določitev procesov, ki sodelujejo pri vstopu DNA v celice in znotrajcelično potovanje. Rosazza in sodelavci (2011) so na nivoju posameznih celic spremljali koncentriranje aktinskih filamentov na membrani. Značilnosti teh področij so podobne značilnostim področij, v katerih poteka agregacija DNA. Aktinski filamenti so se skoncentrirali zgolj na področjih, kjer je plazmidna DNA interagirala z membrano, področja so se pojavila v času 5 minut po

pulziranju in so ostala vidna do 45 minut po pulziranju. Področja z aktinskimi filamenti so bila prisotna tudi v enakem številu in velikosti kot področja z DNA agregati. Prav tako aktinskih struktur ni bilo mogoče opaziti v primeru, ko DNA ni bila prisotna med aplikacijo električnih pulzov. Z uporabo latrunkulina B, ki povzroči depolimerizacijo aktinskih filamentov, so določali vpliv aktinskega citoskeleta na uspešnost elektrotransfekcije celic. S tretiranjem celic CHO z latrunkulinom B pred aplikacijo pulzov ali 1 uro po aplikaciji pulzov so dosegli znižanje uspešnosti elektrotransfekcije. Pri celicah tretiranih z latrunkulinom B 24 ur po aplikaciji pulzov pa so opazili 40 % zvišanje uspešnosti elektrotransfekcije. Ti rezultati kažejo, da ima aktinski citoskelet pomembno vlogo pri začetnih procesih vstopa DNA v celice in je nujno potreben za doseganje optimalnega izražanja DNA, a lahko predstavlja limitirajoč faktor v poznejših fazah vnosa plazmidne DNA. Rosazza in sodelavci (2011) so tako pokazali, da depolimerizacija aktinskega omrežja 24 ur po aplikaciji električnih pulzov olajša potovanje plazmidne DNA proti celičnemu jedru (Rosazza in sod., 2011). V nadaljnji raziskavi so Rosazza in sodelavci (2013) dokazali sodelovanje aktivnega znotrajceličnega transporta plazmidne DNA po vnosu z elektroporacijo. Izvedli so poskuse, pri katerih so spremljali potovanje posameznih DNA agregatov po notranjosti celic CHO tretiranih z različnimi snovmi, ki povzročijo razpad ali stabilizacijo mikrotubularnega (nokodazol in taksol) ali aktinskega (latrunkulin B in jasplakinolid) transporta. Dokazali so, da je za hitro potovanje znotraj celic odgovoren mikrotubularen aktivni transport. Nekoliko počasneje pa DNA potuje tudi vzdolž aktinskih filamentov. Farmakološka stabilizacija mikrotubularnega ali aktinskega omrežja povzroči zmanjšanje nivoja aktivnega transporta. V obeh primerih je za zmanjšanje hitrosti transporta najverjetneje odgovorno povečanje gostote citoskeletnega omrežja ali pa sprememba v dinamiki oziroma interakcijah molekularnih motorjev s filamenti (Rosazza in sod., 2013). Ker z opazovanjem posameznih DNA agregatov ni mogoče sklepati o tem ali agregati potujejo v notranjost celic znotraj veziklov ali kot gola DNA so Rosazza in sodelavci (2016a) zastavili nadaljnje poskuse z inhibitorji endocitoze ter endocitotskimi in endosomskimi markerji. Na podlagi pridobljenih rezultatov sklepajo, da po elektroporaciji približno 50 % DNA vstopa v celice po endocitotski poti odvisni od kaveolina, 25 % po endocitotski poti odvisni od klatrina in 25 % DNA vstopi v celice s procesom makropinocitoze (Rosazza in sod., 2016a).

5.1.3 Vpliv inhibitorjev endocitoze na vstop transferina v celice

Z namenom testiranja inhibitornih lasnosti M β CD in Con A ter njune specifičnosti smo v raziskavi izvedli poskuse, pri katerih smo inhibirali endocitozo transferina. Le-ta v celice vstopa preko receptorsko posredovane endocitotske poti, ki je odvisna od klatrina (Rodal in sod., 1999). Akutna izločitev holesterola z izpostavitvijo celic B16F1 M β CD v koncentracijskem območju od 1,25 mM do 7,50 mM ni vplivala na delež celic, v katere je FITC-Tf vstopal (slika 14). M β CD je pri največji testirani koncentraciji (7,50 mM)

povzročil zmanjšanje količine FITC-Tf v celicah za 30 %. V naši raziskavi je bilo zmanjšanje vstopa FITC-Tf manjše kot v nekaterih drugih raziskavah kar je mogoče obrazložiti z razlikami v izvedbi poskusov. Subtil in sodelavci (1999) so vlogo holesterola pri endocitozi odvisni od klatrina preučevali s sledenjem transporta transferinskega receptorja z elektronsko mikroskopijo. Celice CHO so izpostavili 10 mM M β CD za 30 minut, kar je povzročilo 85 % zmanjšanje vstopa receptorja v celice v primerjavi s kontrolno skupino celic (Subtil in sod., 1999). Rodal in sodelavci (1999) so poskuse izvedli na različnih celičnih linijah ter z izločitvijo holesterola z M β CD dosegli zmanjšanje endocitoze transferina za več kot 50 %. Pri izvedbi poskusov so celice izpostavili 10mM M β CD za 15 minut, nato so jih inkubirali 30 minut s 125 I-transferinom v končni koncentraciji 100 ng/ml (Rodal in sod., 1999). Za razliko od naše raziskave so celice izpostavili višji koncentraciji M β CD za krajši čas ter manjši koncentraciji transferina za daljši čas. Vstop transferina v celice so Rodal in sodelavci merili z gama števcem, pri čemer je izmerjena gamaradiacija radionuklida 125 I sorazmerna količini transferina. Delež transferina, ki je v celice vstopal, so določili kot delež znotrajceličnega transferina in vsote transferina, vezanega na membrano, ter znotrajceličnega transferina (Rodal in sod., 1999). Ta podatek je mogoče primerjati zgolj z intenzitetami fluorescence FITC-Tf izmerjenimi pri naših poskusih in ne z deležem celic, v katere FITC-Tf vstopa. Povprečna in mediana intenziteta fluorescence FITC-Tf v našem poskusu dokazujeta zmanjšanje vstopa FITC-Tf v celice do 30 % pri 7,50 mM M β CD, kar je primerljivo s približno 35 % zmanjšanjem endocitoze 125 I-transferina pri celicah MDCK II, ki so bile izpostavljene 7mM M β CD (Rodal in sod., 1999).

Con A, inhibitor endocitoze odvisne od klatrina, je endocitozo FITC-Tf inhibiral bolj učinkovito kot M β CD, ki povzroči izločenje holesterola iz celičnih membran. Con A je pri najvišjih testiranih koncentracijah 150 μ g/ml in 250 μ g/ml povzročil približno 10 % zmanjšanje deleža celic, v katere je FITC-Tf vstopal, v primerjavi s kontrolnimi skupinami celic (slika 15). Občutno zmanjšanje povprečne in mediane intenzitete fluorescence v primerjavi s kontrolo pomeni, da je Con A povzročil tudi zmanjšanje količine transferina v deležu celic, v katere je le-ta vstopal. V primerjavi s kontrolno skupino je Con A pri najvišjih testiranih koncentracijah 150 μ g/ml in 250 μ g/ml, povzročil približno 45 % zmanjšanje količine transferina v celicah.

Razliko v učinkovitosti inhibicije endocitoze transferina s Con A in M β CD je mogoče pojasniti s specifičnostjo uporabljenih inhibitorjev. V obeh primerih inhibicije je transferin vstopil v podobno število celic, bolj občutno razliko med inhibitorjema pa je opaziti pri količini transferina, ki je v celice vstopil. Subtil in sodelavci (1999) so dokazali, da izločitev holesterola iz celične membrane ne vpliva na oblikovanje jamic prevlečenih s klatrinom, v katerih se skoncentrirajo transferinski receptorji. Prisotnost holesterola v celični membrani je ključnega pomena za odcepljanje jamic in tvorbo endocitotskih veziklov. Izločitev holesterola z M β CD torej povzroči, da so transferinski receptorji dlje

časa "ujeti" na membrani (Subtil in sod., 1999). Mehanizem delovanja Con A še ni pojasnjen, znano pa je, da pri nekaterih receptorjih deluje bolje kot pri drugih. Najverjetneje vstop receptorjev v celico preprečuje navzkrižno povezovanje sladkornih ostankov (Koenig, 2004). Glede na rezultate pridobljene v naši raziskavi lahko sklepamo, da Con A dobro deluje na transferinske receptorje in s tem preprečuje vstop transferina v celice, njegovo delovanje pa je odvisno od uporabljeni koncentracije.

5.2 SKLEPI

Rezultati, pridobljeni v naši raziskavi, dokazujejo sodelovanje procesov endocitoze pri električno posredovanem vnosu plazmidne DNA v celice. Kljub temu, da smo uporabili tri različne inhibitorje endocitoze, ni mogoče sklepati, katera endocitotska pot omogoča vstop molekulam DNA v notranjost celice in potovanje do jedra. Zmanjšanje učinkovitosti elektrotransfekcije pri celicah tretiranih z metil- β -ciklodekstrinom in konkanavalinom A nakazuje na sodelovanje poti endocitoze, za katero je značilna interakcija DNA s specifičnimi molekulami na membrani. Rezultati, pridobljeni z inhibitorjem dinamina, pa kažejo na to, da vstop plazmidne DNA v celico po aplikaciji pulzov poteka več kot 5 minut.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Tehnologija električno posredovanega vnosa genov v celice in tkiva veliko obeta na področju genskega zdravljenja. Temelji na uporabi gole DNA, ki ji prehod celične membrane omogoča aplikacija električnih pulzov. Natančno poznavanje procesov vstopa DNA v celice ter njenega potovanja do celičnega jedra je ključnega pomena pri razvoju tehnologije v terapevtske namene.

Predhodne raziskave so pokazale, da delovanje električnega polja sproži intenzivno uvhavanje plazemske membrane, značilno za procese endocitoze, ter da izpostavitev celic metil- β -ciklodekstrinu tik pred aplikacijo polja zmanjša učinkovitost vnosa plazmidne DNA v celice. Z našo raziskavo smo želeli dokazati sodelovanje procesov endocitoze pri električno posredovanem vnosu plazmidne DNA v celice melanoma B16F1. V ta namen smo preverjali vpliv treh farmakoloških inhibitorjev endocitoze, metil- β -ciklodekstrina, konkanavalina A in dynasorja.

M β CD, ki inhibira poti endocitoze, pri katerih sodeluje holesterol (lipidni rafti), je pri najvišji uporabljeni koncentraciji elektrotransfekcijo skoraj popolnoma inhibiral. Z uporabo Con A smo testirali sodelovanje procesa receptorsko posredovane endocitoze in dosegli približno 60 % inhibicijo elektrotransfekcije. Poleg zmanjšanja deleža transfeciranih celic smo pri poskusih z M β CD opazili tudi zmanjšanje intenzitete fluorescence GFP znotraj transfeciranih celic kar nakazuje, da je v celico vstopalo manj plazmidne DNA kot pri kontrolnih celicah. Con A takega vpliva na transfecirane celice ni imel. Dynasore, inhibitor delovanja dinamina, na uspešnost elektrotransfekcije ni imel vpliva. Pri izvedbi naših poskusov je dynasore inhibitorno deloval zgolj 5 minut po aplikaciji električnih pulzov, kar nakazuje, da se vstop plazmidne DNA v celico po elektroporaciji zgodi več kot 5 minut po sami elektroporaciji.

Rezultati naše raziskave dokazujejo sodelovanje procesov endocitoze pri električno posredovanem vnosu plazmidne DNA v celice. Kljub temu, da smo uporabili tri različne inhibitorje endocitoze, ni mogoče sklepati, katera endocitotska pot omogoča molekulam DNA vstop v notranjost celice in potovanje do jedra. Zmanjšanje učinkovitosti elektrotransfekcije pri celicah tretiranih z metil- β -ciklodekstrinom in konkanavalinom A nakazuje na sodelovanje poti endocitoze, za katero je značilna interakcija DNA s specifičnimi molekulami na membrani, sam proces vstopa plazmidne DNA v celico pa se zgodi več kot 5 minut po elektroporaciji, kar potrjujejo rezultati z inhibitorjem dinamina.

6.2 SUMMARY

Gene electrotransfer (GET) is a promising new technology with great potential for gene therapy. The basic principle of GET is the application of electric pulses that enable the transfer of naked DNA through the cell membrane. In order to utilize this technology for therapeutic use it is crucial to thoroughly understand the molecular mechanisms involved in DNA transfer through cell membrane, and its transport towards the cell nucleus.

Exposure to electric field was observed to cause perturbation of cell membrane, which is a characteristic endocytic feature. Treatment of cells with methyl- β -cyclodextrin (M β CD) prior to application of electric pulses reduces the efficiency of electrotransfection with plasmid DNA. The aim of our research was to prove the involvement of endocytic pathways in electro-mediated plasmid DNA transfer in B16F1 mouse melanoma cells. For this purpose, we tested the effects of three pharmacological inhibitors of endocytosis, namely methyl- β -cyclodextrin (M β CD), concanavalin A (Con A), and dynasore.

The highest tested concentrations of M β CD, an inhibitor of cholesterol-dependent endocytic pathways (lipid rafts), resulted in almost complete inhibition of GET. Con A was used to test the involvement of receptor-mediated endocytic pathways in GET. With Con A, up to 60 % inhibition of electrotransfection was achieved. Both M β CD and Con A reduced the fraction of electrotransfected cells, but only M β CD also reduced the GFP fluorescence intensity in the electrotransfected cells, thus implying that treatment of cells with M β CD reduces the amount of plasmid DNA entering cells in comparison to control groups. On the other hand, dynasore, inhibitor of dynamin, did not affect the efficiency of GET. Dynasore was only active for approximately 5 minutes after the application of electric field in our experiments. This results confirm that plasmid DNA does not enter the cell in first 5 minutes after the electroporation.

Our results support the hypothesis that endocytosis is the key mechanism involved in plasmid DNA transfer during GET. Although three different inhibitors of endocytosis were tested we could not conclude which particular endocytic pathway is responsible for plasmid DNA intake and intracellular transport towards the cell nucleus. Reduction of GET efficiency achieved with M β CD and Con A indicates involvement of endocytic pathway that requires interaction of plasmid DNA with specific yet unidentified molecules on cell membrane. Results obtained with inhibitor of dynamin, show that the process of plasmid DNA transfer through the cell membrane after the electroporation takes longer than 5 minutes.

7 VIRI

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2007. Transport into the cell from the plasma membrane: Endocytosis. V: Molecular Biology of the Cell. 5. izd. New York, Garland Science: 787-799

Antov Y., Barbul A., Korenstein R. 2004. Electroendocytosis: stimulation of adsorptive and fluid-phase uptake by pulsed low electric fields. *Experimental Cell Research*, 297: 348-362

Bouckaert J., Dewallef Y., Poortmans F., Wyns L., Loris R. 2000. The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 26: 19778-19787

Cao H., Garcia F., McNiven M.A. 1998. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9: 2595-2609

Castagne D., Fillet M., Delattre L., Evrard B., Nusgens B., Piel G. 2009. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63: 225-231

Ciechanover A., Schwartz A.L., Dautry-Varsat A., Lodish H.F. 1983. Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents. *The Journal of Biological Chemistry*, 258: 9681-9689

Conner S.D., Schmid S.L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422: 37-44

Čemažar M., Serša G. 2007. Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 9, 6: 554-562

Čemažar M., Kotnik T., Serša G., Miklavčič D. 2015. Electroporation for electrochemotherapy and gene therapy. V: *Electromagnetic Fields in Biology and Medicine*. Markov M.S. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 395-413

Dautry-Varsat A., Ciechanover A., Lodish H.F. 1983. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 2258-2262

Dobbelstein M. 2003. Viruses in therapy – royal road or dead end? *Virus Research*, 92: 219-221

Doherty G.J., McMahon H.T. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78: 857-902

Ehrlich M., Boll W., van Oijen A., Hariharan R., Chandran K., Nibert M.L., Kirchhausen T. 2004. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell*, 118: 591-605

Escoffre J.-M., Dean D.S., Hubert M., Rols M.-P., Favard C. 2007. Membrane perturbation by an external electric field: a mechanism to permit molecular uptake. *European Biophysics Journal*, 36: 973-983

Escoffre J.-M., Portet T., Wasungu L., Teissie J., Dean D., Rols M.-P. 2009. What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Molecular Biotechnology*, 41:286-295

Escoffre J.-M., Teissié J., Rols M.-P. 2010. Gene transfer: How can the biological barriers be overcome? *The Journal of Membrane Biology*, 236: 61-74

Escors D., Breckpot K. 2010. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Archivum Immunologiae et Therapie Experimentalis*, 85, 2: 107-119

Faurie C., Reberšek M., Golzio M., Kandušer M., Escoffre J.-M., Pavlin M., Teissie J., Miklavčič D., Rols M.-P. 2010. Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation. *The Journal of Gene Medicine*, 12: 117-125

Gao X., Kim K.-S., Liu D. 2007. Nonviral gene delivery: What we know and what is next. *The AAPS Journal*, 9,1: E92-E104

Ghazarian H., Idoni B., Oppenheimer S.B. 2011. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*, 113: 236-247

Ghosh R.N., Gelman D.L., Maxfield F.R. 1994. Quantification of low density lipoprotein and transferrin endocytic sorting in HEp2 cells using confocal microscopy. *Journal of Cell Science* 107: 2177-2189

Golzio M., Teissie J., Rols M.-P. 2002. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 1292-1297

Gorelik E. 1999. Cytotoxic effects of lectins. V: *Methods in Molecular Medicine*. Vol. 9. Lectin Methods and Protocols. Rhodes J.M., Milton J.D. (ur.). Totowa, Humana Press Inc.; 453-459

Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C., Carroll S.B. 2008. Introduction to genetic analysis. 9. izd. New York, W. H. Freeman and Company: 838 str.

Hansen C.G., Nichols B.J. 2009. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *Journal of Cell Science*, 122: 1713-1721

Ivanov A.I. 2008. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: Is it specific enough to be useful? V: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 440, Exocytosis and Endocytosis. Ivanov A.I. (ur.). Totowa, New Jersey, Humana Press: 15-33

Kerr M.C., Teasdale R.D. 2009. Defining macropinocytosis. *Traffic*, 10: 364-371

Kirchhausen T., Macia E., Pelish H.E. 2008. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods in Enzymology*, 438: 77-93

Kiss T., Fenyvesi F., Pasztor N., Feher P., Varadi J., Kocsan R., Szente L., Fenyvesi E., Szabo G., Vecsernyes M., Bacskay I. 2007. Cytotoxicity of different types of methylated β -cyclodextrins and ionic derivatives. *Pharmazie*, 62: 557-558

Kline M.A., O'Connor Butler E.S., Hinze A., Sliman S., Kotha S.R., Marsh C.B., Uppu R.M., Parinandi N.L. 2010. A simple method for effective and safe removal of membrane cholesterol from lipid rafts in vascular endothelial cells: Implications in oxidant-mediated lipid signaling. V: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 610 2. izd., Free Radicals and Antioxidant Protocols. Uppu R.M., Pryor W.A., Murthy S.N., Parinandi N.L. (ur.). New York, New York, Humana Press: 201-211

Koenig J.A. 2004. Assessment of receptor internalization and recycling. V: *Methods in Molecular Biology*. Receptor Signal Transduction protocols. Vol. 259. 2. izd. Willars G.B., Challis R.A.J. (ur.). Totowa, Humana Press: 249-273

Kotnik T., Bobanović F., Miklavčič D. 1997. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields – a theoretical analysis. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43: 285-291

Kotnik T., Maček Lebar A., Kandušer M., Pucihar G., Pavlin M., Valič B., Miklavčič D. 2005. Elektroporacija celične membrane: teorija ter poizkusi *in vitro*. Medicinski razgledi, 44: 81-90

Kotnik T., Miklavčič D. 2000. Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. Biophysical Journal, 79: 670-679

Kreft S., Doljak B., Obermajer N. 2007. Osnove genskega zdravljenja. V: Biološka zdravila. Od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). 1. izd. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 591-625

Kumari S., MG S., Mayor S. 2010. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. Cell Research, 20: 256-275

Lopez C.A., de Vries A.H., Marrink S.J. 2011. Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction. PloS Computational Biology, 7, 3: e1002020, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002020: 11 str.

Luttrell L.M., Daaka Y., Della Rocca G.J., Lefkowitz R.J. 1997. G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. The Journal of Biological Chemistry, 272: 31648-31656

Macia E., Ehrlich M., Massol R., Boucrot E., Brunner C., Kirchhausen T. 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. Developmental Cell, 10: 839-850

Maček Lebar A., Serša G., Čemažar M., Miklavčič D. 1998. Elektroporacija. Electroporation. Medicinski razgledi, 37: 339-354

Markelc B., Bellard E., Serša G., Pelofy S., Teissie J., Coer A., Golzio M., Čemažar M. 2012. *In vivo* molecular imaging and histological analysis of changes induced by electric pulses used for plasmid DNA electrotransfer to the skin: a study in a dorsal window chamber in mice. The Journal of Membrane Biology, 245: 545-554

Miklavčič D., Puc M. 2006. Electroporation. V: Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering. Akay M. (ur.). John Wiley & Sons, Inc, doi: 10.1002/9780471740360.ebs1390: 11 str.

Mir L.M. 2009. Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenetherapy): past, current, and future. Molecular Biotechnology, 43: 167-176

- Mody R., Joshi S., Chaney W. 1995. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 33: 1-10
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63
- Neumann E, Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofsneider P.H. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal*, 1: 841-845
- O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267: 5421-5426
- Patil S.D., Rhodes D.G., Burgess D.J. 2005. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *The AAPS Journal*, 7, 1: E61-E77
- Pavlin M., Pucihař G., Kandušer M. 2012. The role of electrically stimulated endocytosis in gene electrotransfer. *Bioelectrochemistry*, 83: 38-45
- Pelkmans L., Helenius A. 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic*, 3: 311-320
- Pucihař G., Kotnik T., Teissie J., Miklavčič D. 2007. Electroporabilization of dense cell suspensions. *European Biophysics Journal*, 36: 173-185
- Qian Z.M., Li H., Sun H., Ho K. 2002. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacological Reviews*, 54: 561-587
- Rodal S.K., Skretting G., Garred Ø., Vilhardt F., van Deurs B., Sandvig K. 1999. Extraction of cholesterol with methyl- β -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, 10: 961-974
- Rols M.-P., Delteil C., Serin G., Teissie J. 1994. Temperature effects on electrotransfection of mammalian cells. *Nucleic Acid Research*, 22, 3: 540
- Rols M.-P., Teissie J. 1998. Electroporabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophysical Journal*, 75: 1415-1423
- Rosazza C., Escoffre J.-M., Zumbusch A., Rols M.-P. 2011. The actin cytoskeleton has an active role in the electrotransfer of plasmid DNA in mammalian cells. *Molecular Therapy*, 19, 5: 913-921

Rosazza C., Phez E., Escoffre J.-M., Cézanne L., Zumbusch A., Rols M.-P. 2012. Cholesterol implications in plasmid DNA electrotransfer: Evidence for the involvement of endocytotic pathways. International Journal of Pharmaceutics, 423, 1: 134-143

Rosazza C., Buntz A., Reiβ T., Wöll D., Zumbusch A., Rols M.-P. 2013. Intracellular tracking of single-plasmid DNA particles after delivery by electroporation. Molecular Therapy, 21, 12: 2217-2226

Rosazza C., Deschout H., Buntz A., Braeckmans K., Rols M.-P., Zumbusch A. 2016a Endocytosis and endosomal trafficking of DNA after gene electrotransfer *in vitro*. Molecular Therapy – Nucleic Acids, 5, e286, doi: 10.1038/mtna.2015.59: 11 str.

Rosazza C., Haberl Meglič S., Zumbusch A., Rols M.-P., Miklavčič D. 2016b. Gene electrotransfer: a mechanistic perspective. Current Gene Therapy, 16: 98-129

Serša G., Miklavčič D., Čemažar M., Rudolf Z., Pucihař G., Snoj M. 2008. Electrochemotherapy in treatment of tumours. European Journal of Surgical Oncology. The Journal of Cancer Surgery. 34: 232-240

Sever S. 2002. Dynamin and endocytosis. Current Opinion in Cell Biology, 14: 463-467

Somiari S.B. 2005. Gene therapy. Methods and application. V: Medical Biomethods Handbook. Walker J.M., Rapley R.(ur.). Totowa, Humana Press Inc.: 625-638

Subtil A., Gaidarov I., Kobylarz K., Lampson M.A., Keen J.H., McGraw T.E. 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96: 6775-6780

Susil R., Šemrov D., Miklavčič D. 1998. Electric field-induced transmembrane potential depends on cell density and organization. Electro- and Magnetobiology, 17: 391-399

Takei K., Yoshida Y., Yamada H. 2005. Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis. The Journal of Biochemistry, 137: 243-247

Tang H., Nishishita T., Fitzgerald T., Landon E.J., Inagami T. 2000. Inhibition of AT₁ receptor internalization by concanavalin A blocks angiotensin II-induced ERK activation in vascular smooth muscle cells. Involvement of epidermal growth factor receptor proteolysis but not AT₁ receptor internalization. The Journal of Biological Chemistry, 275, 18: 13420-13426

Teissie J., Golzio M., Rols M.-P. 2005. Mechanisms of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1724: 270-280

Teissie J., Rols M.-P. 1993. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation. *Biophysical Journal*, 65: 409-413

Tieleman D.P. 2004. The molecular basis of electroporation. *BMC Biochemistry*, 5, 10: doi: 10.1186/1471-2091-5-10: 12 str.

van Renswoude J., Bridges K.R., Harford J.B., Klausner R.D. 1982. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells: Identification of a nonlysosomal acidic compartment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79: 6186-6190

Villemejane J., Mir L.M. 2009. Physical methods of nucleic acid transfer: General concepts and applications. *British Journal of Pharmacology*, 157: 207-219

Wang J.L., Cunningham B.A., Waxdal M.J., Edelman G.M. 1975. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. I. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragments F₁ and F₂. *The Journal of Biological Chemistry*, 250: 1490-1502

Wolf H., Rols M.-P., Boldt E., Neumann E., Teissie J. 1994. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophysical Journal*, 66: 524-531

Wu M., Yuan F. 2011. Membrane binding of plasmid DNA and endocytic pathways are involved in electrotransfection of mammalian cells. *PloS ONE*, 6, 6; e20923, doi: 10.1371/journal.pone.0020923: 9 str.

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Mojci Narat in somentorju prof. dr. Gregorju Serši se lepo zahvaljujem za izjemno učinkovito sodelovanje, podporo pri zasnovi in izvedbi laboratorijskega dela ter skrben pregled diplomske naloge.

Delovnima mentorjema dr. Boštjanu Markelcu in dr. Tanji Dolinšek se zahvaljujem za obilico potrpljenja in podpore pri izvedbi laboratorijskega dela, obdelavi podatkov, in pregledu diplomske naloge.

Dr. Jaki Lavrenčaku se lepo zahvaljujem za izvedbo analiz s pretočnim citometrom.

Dr. Alešu Sedlarju se zahvaljujem za pomoč pri izolaciji plazmidne DNA, dr. Lari Prosen za pomoč pri določanju koncentracije in čistosti plazmidne DNA, Miri Lavrič za uvajanje v laboratorijsko delo in oskrbo s ploščami polnimi celic. Ostalim zaposlenim na Oddelku za eksperimentalno Onkologijo pa najlepša hvala za kolegialnost in vedno prijetno vzdušje.

Svoji družini se iz srca zahvaljujem za neomajno podporo tekom študija.

PRILOGA

Sestava fosfatnega pufra (10x PBS):

Sestavina	Količina	Proizvajalec
Na ₂ HPO ₄	11,5 g	Kemika, Zagreb, Hrvaška
KH ₂ PO ₄	2 g	Kemika, Zagreb, Hrvaška
KCl	2 g	Merck, Darmstadt, Nemčija
NaCl	80 g	Merck, Darmstadt, Nemčija
destilirana voda	do 1 l	

Sestava elektroporacijskega pufra (EP):

Sestavina	Količina	Proizvajalec
saharoza	42,78 g	Kemika, Zagreb, Hrvaška
KH ₂ PO ₄	0,34 g	Kemika, Zagreb, Hrvaška
K ₂ HPO ₂	1,74 g	Kemika, Zagreb, Hrvaška
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,4g3	Merck, Darmstadt; Nemčija
destilirana voda	do 1 l	

Sestava citratnega pufra s pH 4,6:

Sestavina	Količina	Proizvajalec
citronska kislina monohidrat	0,16 g	Pharmachem, Sušnik Jožef, s.p., Ljubljana, Slovenija
natrijev citrat dihidrat	0,22 g	Laphoma, Skopje, Makedonija
saharoza	2,88 g	Kemika, Zagreb, Hrvaška
destilirana voda	do 30 ml	