

Aktivacija vzorčno prepoznavnih senzorjev po genskem elektroprenosu plazmida z zapisom za Interlevkin-12

A. Medved^{1,2}, T. Jesenko^{1,2}, M. Bosnjak¹, G. Sersa^{1,3} and M. Cemazar^{1,4}

¹ Onkološki Inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija
² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Medicino, Vrazov trg 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija
³ Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Zdravstvena pot 5, SI-1000 Ljubljana, Slovenija
⁴ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, SI-6310 Izola, Slovenija
 mail: amedved@onko-i.si

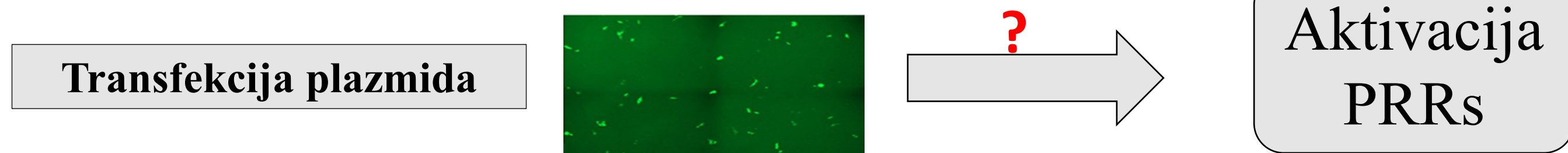
ONKOLOŠKI INŠTITUT
 INSTITUTE OF ONCOLOGY
 LJUBLJANA

Univerza v Ljubljani
 Medicinska fakulteta



Cilji:

Transfekcija plazmidne DNA bi lahko aktivirala vzorčno prepoznavne receptorje (PRR), zato je cilj naše študije oceniti učinek električnega prenosa plazmida z zapisom za IL-12 na nekatere PRR ter na učinkovitost transfekcije in viabilnost celic v celičnih linijah B16F10 in CT26.



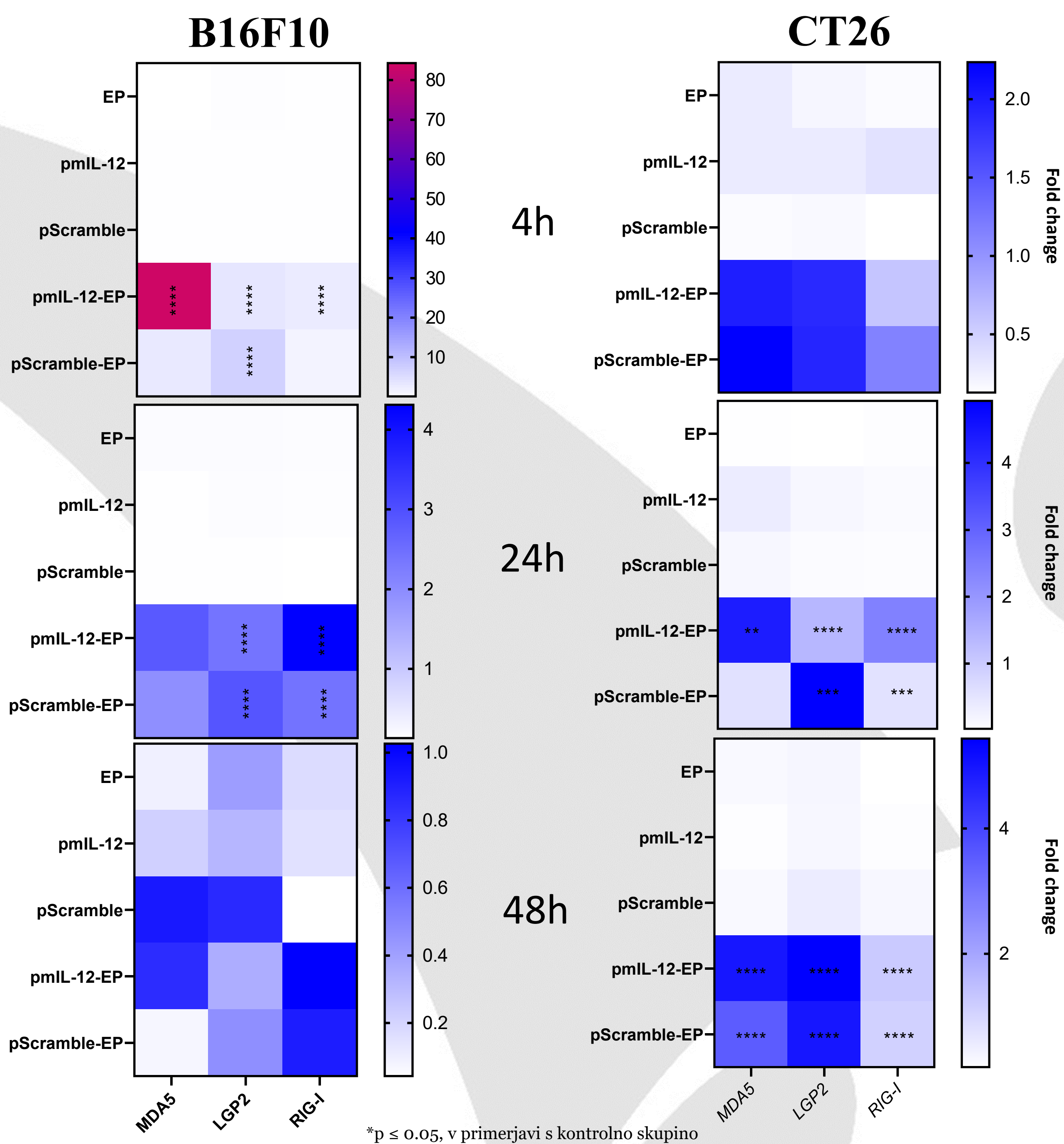
Zaključki:

B16F10 in CT26 celični liniji smo uspešno transfecirali s plazmidno DNA;

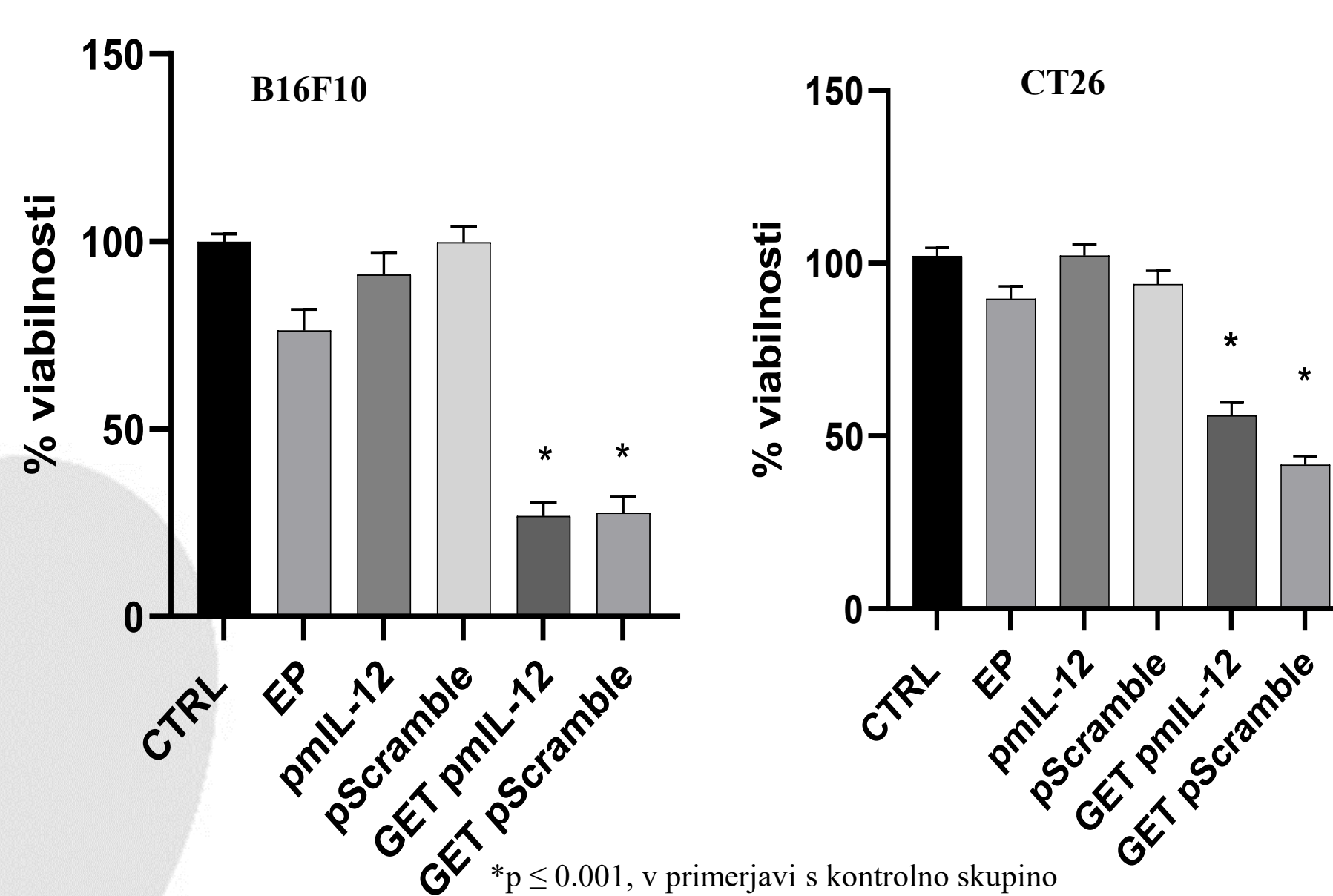
- Delež transfekcija plazmidne DNA je bil višji pri transfekciji B16F10 celične linije.
- Genski elektroprenos plazmidne DNA je znižal viabilnost celic pri obeh celičnih linijah.
- Genski elektroprenos plazmidne DNA je povzročil povišano izražanje RNA senzorjev pri obeh celičnih linijah, izrazitejše pri melanomski celični liniji. Stopnja izražanja se je spreminjala s časom in kaže na takojšen odziv senzorjev (v prvih 48 urah).
- Mehanizem aktivacije RNA vezavnih senzorjev še ni znan, zato bodo za razumevanje le tega potrebne nadaljnje študije.

Rezultati:

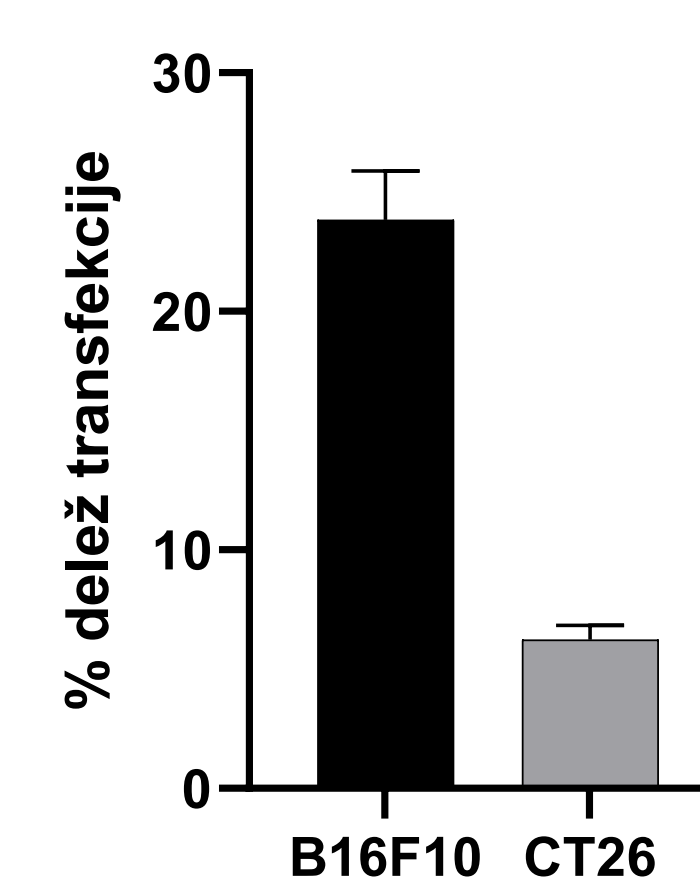
Izražanje RNA senzorjev:



Celična viabilnost:



Transfekcijska učinkovitost:

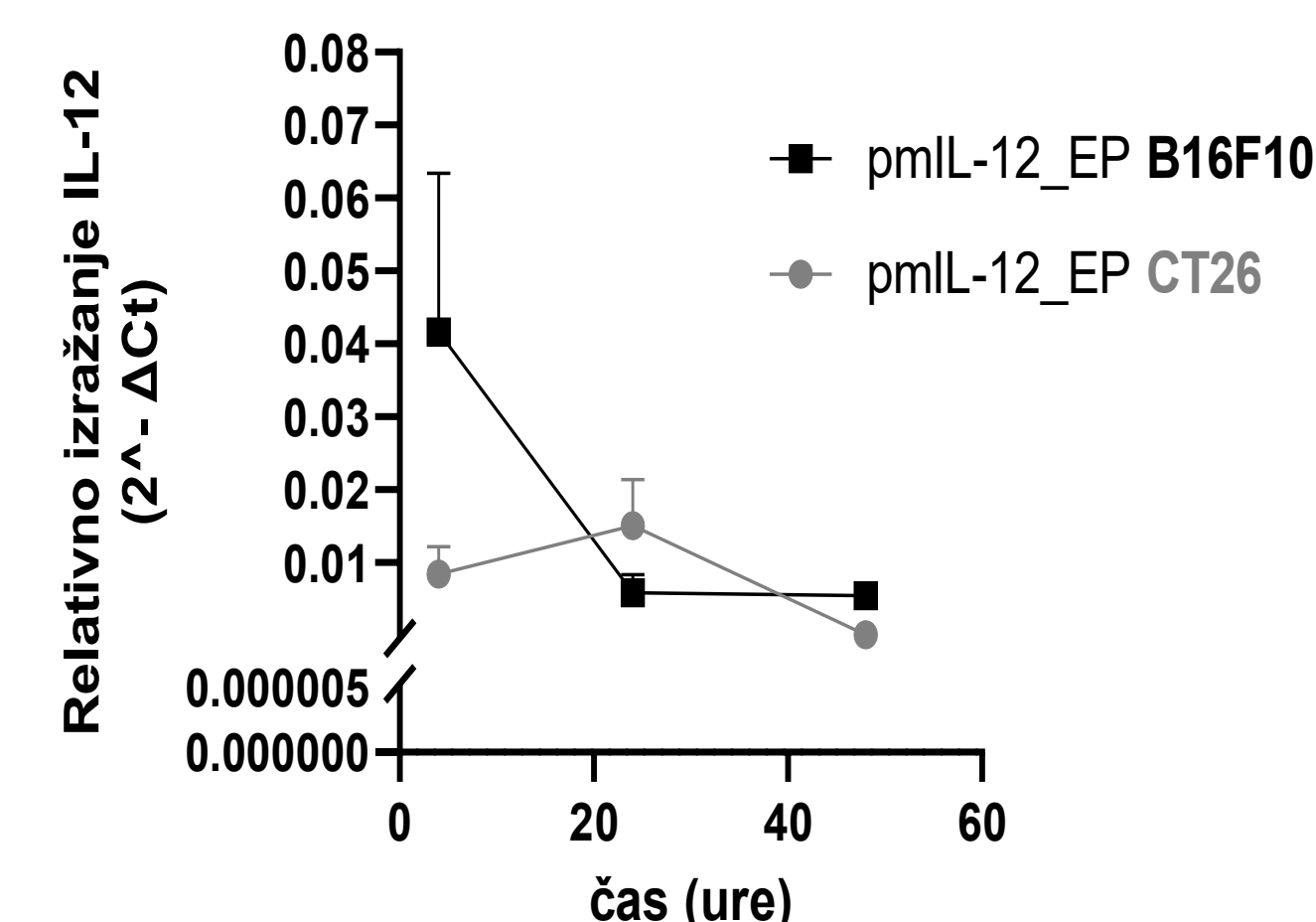


Transfekcija plazmidne DNA znižuje delež viabilnih celic.

Učinkovitost transfekcije genskega elektroprenosa plazmida z zapisom za GFP je bila pri celični liniji B16F10 okoli 24 %, pri celični liniji CT26 pa le okoli 6 %.

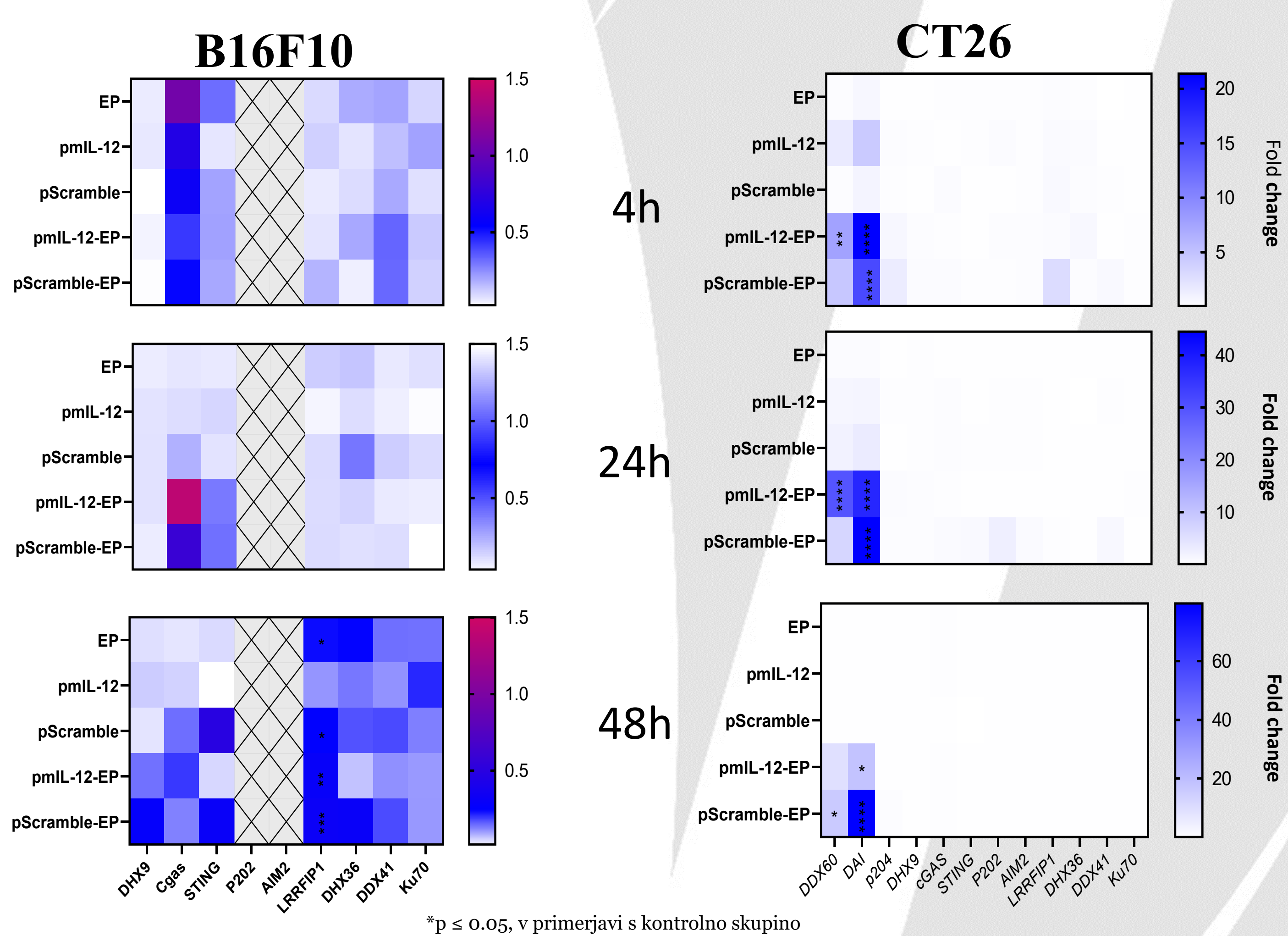
Po genskem elektroprenosu plazmidov (GET; pmIL-12-EP, pScramble-EP) se je povišano izražala mRNA za nekatere DNA pa tudi RNA senzorje. V B16F10 tumorskih celicah se je znatno povišalo izražanje RNA senzorjev *Mda5*, *Rig-1* in *Lgp2* 4 ure po GET, pri celični liniji CT26 pa smo opazili le rahlo povišano izražanje vseh treh senzorjev 24 in 48 ur po GET. Povišano izražanje DNA senzorjev smo opazili samo pri CT26 celični liniji, kjer se je z najvišjim izražanjem pri časovni točki 24 ur, povišano izražala mRNA senzorjev *Ddx60* in *Dai*. Ostali senzorji, ki smo jih testirali; *Cgas*, *Sting*, *Ddx41*, *Dhx9*, *Dhx36*, *Lrrfip1*, *Ku70*, *p202*, *p204* in tudi *Aim2*, ki ga v melanomskih celicah ni, so sicer bili izraženi v tumorskih celicah, vendar se njihovo izražanje po GET ni znatno povečalo.

Izražanje transgena:



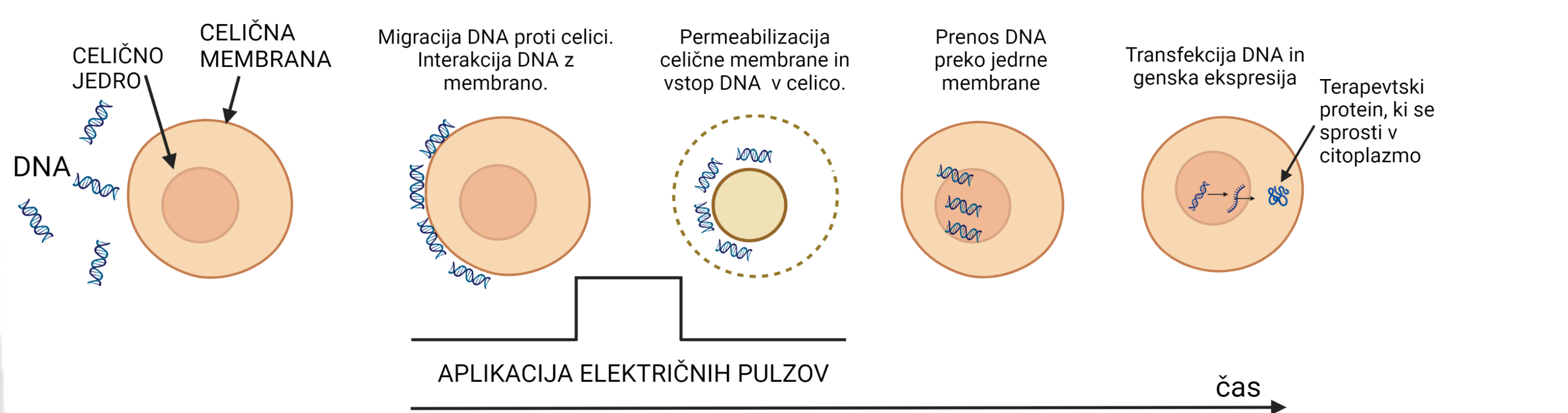
Izražanje transgena ni bilo opazno pri kontrolnih skupinah. Relativno izražanje IL-12 je doseglo najvišjo vrednost 4h po terapiji pri celični liniji B16F10, po 24 h pa pri celični liniji CT26 in 48h po terapiji doseglo kontrolne vrednosti.

Izražanje DNA senzorjev:



Metode:

GENSKI ELEKTROPENOS



Elektroporacijski protokol:

- 1 x 10⁶ celic + 10 μg plazmida
- Električni pulzi (1300 V/cm, 100μs, 8 pulzov, 5 kHz)
- ploščate elektrode (2 mm)

B16F10
 mišji melanom

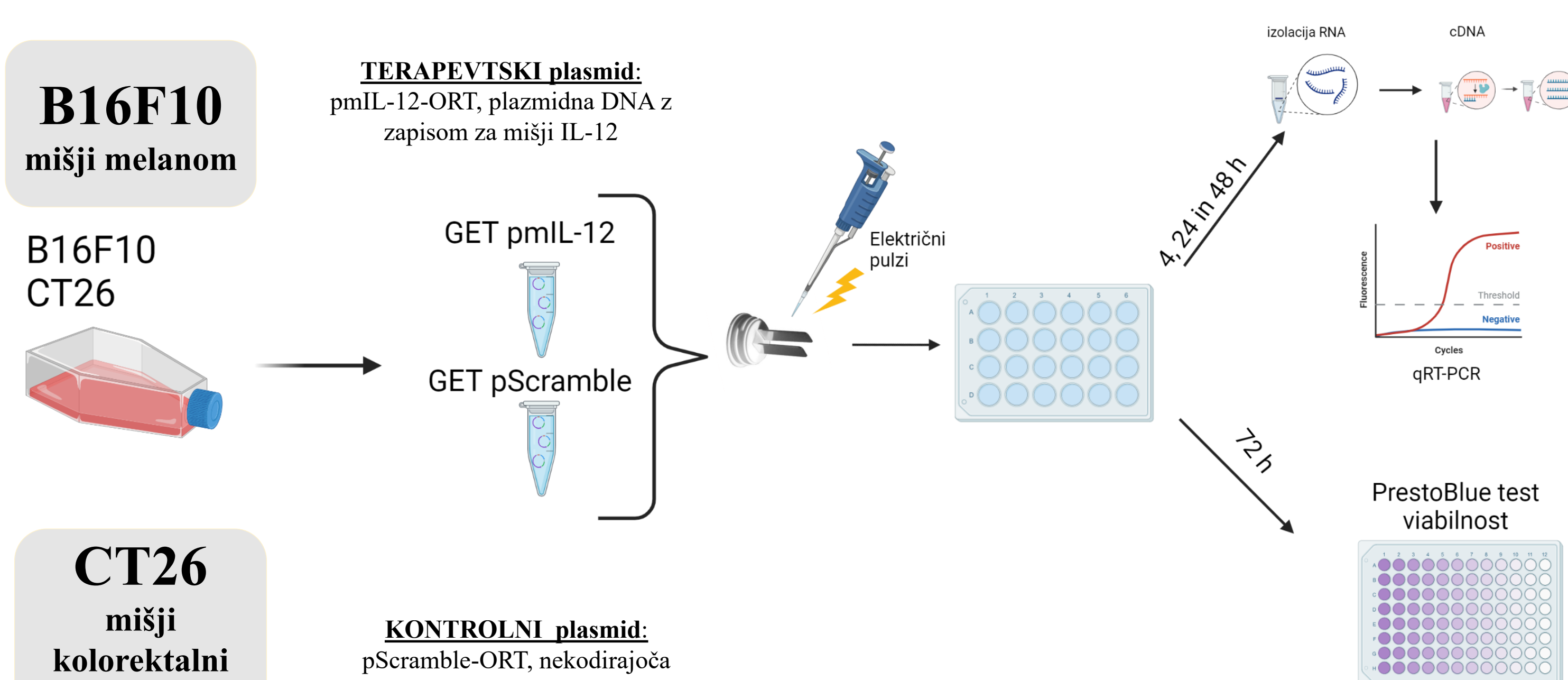
B16F10
 CT26

CT26
 mišji kolorektalni karcinom

TERAPEVTSKI plazmid:
 pmIL-12-ORT, plazmidna DNA z zapisom za mišji IL-12

KONTROLNI plazmid:
 pScramble-ORT, nekodirajoča plazmidna DNA

Profil izražanja vzorčno prepoznavnih receptorjev:



Uvod:

Gensko zdravljenje je terapevtska strategija, ki uporablja gene kot terapevtske dejavnike. Med gensko terapijo se terapevtski gen vstavi v ciljne celice z namenom zamenjave mutiranega gena, ki povzroča bolezen z zdravo kopijo tega gena. Ta pristop pa ni edini in predstavlja le eno izmed strategij za zdravljenje različnih bolezni z gensko terapijo. Največkrat uporabljeni vektorji za dostavo nukleinskih kislin so virusni, veliko pozornosti na področju genske terapije pa je usmerjene v razvoj plazmidne DNA. Eksogene nukleinske kisline, kot sta DNA in RNA, ki jih s terapijo vstavimo v celice, jih le te prepoznajo kot vdor patogenov oz. kot s patogeni povezane molekulske vzorce (PAMPs). PAMPs s svojo prisotnostjo v celicah aktivirajo vzorčno prepoznavne receptorje (PRRs). Signalna transdukcija, ki sledi aktivaciji PRRs inducira proizvodnjo prvotnih citokinov in interferonov tipa I (IFN1). IFN tipa I imajo osrednjo vlogo pri protivirusnih odzivih, saj povzročajo prepisovanje genov, stimuliranih z IFN1. Aktivacija teh genov vodi v vnetje ali celično smrt; obe posledici lahko pomembno vplivata na terapevtsko učinkovitost. Ena izmed genskih terapij za zdravljenje raka je genski elektroprenos (GET) plazmidne DNA z zapisom za citokin interlevkin-12 (IL-12). Plazmidna DNA, ki jo vnesemo v celice z GET, bi lahko aktivirala različne PRRs, zato je bil cilj naše študije ovrednotiti učinek GET plazmidne DNA z zapisom za IL-12 na nekatere PRRs pri mišji CT26 celični liniji.