

AKTIVACIJA VZORČNO PREPOZNAVNIH SENZORJEV PO GENSKEM ELEKTROPRENOSU PLAZMIDA Z ZAPISOM ZA INTERLEVKIN-12

Ajda Medved^{1,2}, Tanja Jesenko¹, Gregor Serša^{1,3}, Maša Bošnjak¹, Maja Čemažar^{1,4}

¹ *Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki Inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

² *Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Medicino, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

³ *Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija*

⁴ *Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija*

Elektronski naslov: amedved@onko-i.si

Medtem ko se za zdravljenje bolnikov z rakom že desetletja kombinirajo standardni načini zdravljenja raka, kot so kirurgija, radioterapija in sistemsko zdravljenje, se je zaradi pojava novih področij raziskovanja raka ponovno povečalo zanimanje za kombiniranje standardnih načinov zdravljenja z novejšimi pristopi, kot je genska terapija. 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. Za take vektorje velja, da so varnejši od virusnih in jih je mogoče dostaviti več kot enkrat. Poleg tega lahko vsebujejo dolg genetski zapis in jih je relativno enostavno in poceni izdelati.

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 protivnetnih citokinov in interferonov tipa I (IFN). IFN tipa I imajo osrednjo vlogo pri protivirusnih odzivih, saj povzročajo prepisovanje genov, stimuliranih z IFN. Aktivacija teh genov vodi v vnetje ali celično smrt; obe posledici pa 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.

Za GET v celice CT26 smo uporabili plazmidno DNA z zapisom za mišji IL-12 (1 mg/ml), nekodirajočo plazmidno DNA (1 mg/ml, pScramble) in plazmid z zapisom za zeleno flourescirajoč protein (pEGFP). Za prenos plazmidov smo uporabili elektrode z 2-mm razdaljo in 8 električnih pulzov, s trajanjem 100 μ s in frekvenco 5 Hz in napetosti

240 V. Viabilnost celic smo določili 3 dni po terapiji, učinkovitost transfekcije 2 dni po GET pEGFP, izražanje različnih PRRS, ter izražanje IL-12 pa je bilo določeno s qRT-PCR 4, 24, 48 ur po terapiji. Transfecirali smo približno 6 % celic. Viabilnost celic se je znatno zmanjšala po GET. Nivo izražanja IL-12 je začel padati po 24 urah in pri 48 urah padel pod nivo zaznave. GET IL-12 in GET pSCRLsta povzročila povišano izražanje dveh DNA vezavnih receptorjev DDX60, DAI pri vseh časovnih točkah, med tem ko se je nivo izražanja LGP2, RNA vezavnega receptorja, povišal samo po 24 urah, po GET IL-12.

Če povzamemo, je GET plazmidne DNA z zapisom za IL-12, povzročil aktivacijo tako DNA kot RNA PRRs, kar je najverjetneje posledica uspešno transfecirane DNA in prepisane mRNA za IL-12. Za pridobitev globljega vpogleda na povezavo med aktivacijo PRRs in protitumorskega učinka na CT26 celično linijo bomo izvedli dodatne poskuse.

P12