UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katja TRONTELJ (ŠKUFCA)

OPTIMIZACIJA ELEKTROFUZIJE CELIC SESALCEV V POGOJIH *IN VITRO*

MAGISTRSKO DELO

OPTIMIZATION OF ELECTROFUSION OF MAMMALIAN CELLS *IN VITRO*

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2005

Otrokom.

Brez njih nas že ni več.

Magistrsko delo je zaključek Interdisciplinarnega podiplomskega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biokibernetiko Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, kjer so bili v celičnem laboratoriju opravljeni poskusi zlivanja celic. Gojenje hibridomov je bilo opravljeno v Centru za razvoj in za proizvodnjo diagnostičnih reagentov na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

Senat Biotehniške fakultete je 29. 6. 2005 odobril temo magistrskega dela iz področja Biotehnologije z naslovom Optimizacija elektrofuzije celic sesalcev v pogojih *in vitro* in za mentorja magistrskega dela imenoval prof. dr. Damijana Miklavčiča in za somentorico prof. dr. Vladko Čurin Šerbec.

Mentor: prof. dr. Damijan MIKLAVČIČ
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko

Somentorica: prof. dr. Vladka ČURIN ŠERBEC
Ljubljana, Zavod za transfuzijsko medicino Republike Slovenije

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Damijan MIKLAVČIČ
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko

Članica: prof. dr. Vladka ČURIN ŠERBEC
Ljubljana, Zavod za transfuzijsko medicino Republike Slovenije

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

Datum zagovora: 21. 11. 2005

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katja Trontelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Md
DK UDK 577.35.086:576.33(043)=863
KG elektrofuzija/celična elektrotehnika/električni parametri/smer električnega polja/zlivanje celic/permeabilizacija/monoklonska protitelesa
AV TRONTELJ (ŠKUFCA), Katja, univerzitetni diplomirani inženir kemije
SA MIKLAVČIČ Damijan (mentor)/ČURIN ŠERBEC, Vladka (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
LI 2005
IN OPTIMIZACIJA ELEKTROFUZIJE CELIC SESALCEV V POGOJIH *IN VITRO*
TD Magistrsko delo
OP VII, 73 str., 6 pregl., 16 sl., 74 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Elektrofuzija oziroma zlivanje celic z električnimi pulzi je pojav, pri katerem se celice, ki so med seboj v tesnem stiku, zaradi prisotnosti kratkotrajnih visokonapetostnih električnih pulzov zlijejo med seboj. Če celice niso v tesnem stiku, električni pulzi povzročijo samo permeabilizacijo celic, to je začasno neselektivno povečanje prepustnosti membrane. Na oba pojava vplivajo različne lastnosti električnega polja. V pričujočem delu smo proučevali vpliv amplitude in števila pulzov ter smeri električnega polja na zlivanje in na permeabilizacijo celic. Preizkusili smo metodo zlivanja celic z električnimi pulzi na dveh celičnih linijah v pogojih *in vitro*. Primerjali smo celice mišjega melanoma B16F1 in ovarijske celice kitajske hrčice CHOK1. Stopnjo permeabilizacije celic smo določali s fluorescenco vnesenega propidijevega jodida, zlivanje celic pa smo določali mikroskopsko, pri čemer smo si pomagali z barvanjem Giemsa. Zlivanje celic je metoda, ki jo lahko koristno uporabimo v biotehnologiji in biomedicini. V našem delu smo uporabili proučevano metodo zlivanja celic z električnimi pulzi za pridobivanje hibridomov iz mišjih mielomskih celic in človeških limfocitov z modificirano Koehler Milsteinovo hibridomno tehnologijo. Rezultati naše metode so primerljivi s tistimi, ki so jih pred nami pridobili z zlivanjem enakih celic s polietilenglikolom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDC 577.35.086:576.33(043)=863
CX electrofusion/cell electrotechnics/electrical parameters/electric field direction/fusion of cells/permeabilisation/monoclonal antibodies
AU TRONTELJ (ŠKUFCA), Katja
AA MIKLAVČIČ Damijan (supervisor)/ČURIN ŠERBEC, Vladka (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty
PY 2005
TI OPTIMIZATION OF ELECTROFUSION OF MAMMALIAN CELLS *IN VITRO*
DT M.Sc. Thesis
NO XI, 73 str., 6 pregl., 16 sl., 74 vir.
LA sl
AL sl/en
AB Cell electrofusion is a phenomenon that occurs, when cells that are in close contact are fused by means of short, high-voltage electric pulses. When cells are not in close contact, the consequence of the pulses is transient and nonselective increase of permeabilization of cell membranes without fusion. Both phenomena are dependent on the choice of electric field parameters. In this work we studied the influence of amplitude and number of electric pulses and direction of electric field on the degree of permeabilization and fusion yield. We tested the method of electrofusion on two cell lines *in vitro*. We compared mouse melanoma cells B16F1 and chinese hamster ovary cells CHOK1. Degree of cell permeabilization was determined microscopicly by fluorescence of propidium iodide. Fusion was detected microscopicly with Giemsa staining. Fusion of cells can be useful in biotehnology and biomedicine. In present work electrofusion was used to produce hibridomas from mouse mieloma cells NS1 and human lymfocytes with modified Koehler Milstein hibridoma technology. We obtained viabile human – mouse heterohybridoma in amounts that are comparable to those previously obtained by fusing the same cells with the use of polyethylene glycol.

KAZALO VSEBINE

		str.
	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
1	**UVOD**	**1**
1.1	ZLIVANJE CELIC	1
1.2	UPORABA ZLIVANJA CELIC	1
1.3	NAČINI IZVEDBE ZLIVANJA CELIC	5
1.3.1	**Virus**	**5**
1.3.2	**Polietilenglikol**	**6**
1.3.3	**Električni pulzi**	**6**
2	**PREGLED OBJAV**	**8**
2.1	ZLIVANJE CELIC Z ELEKTRIČNIMI PULZI	8
2.1.1	**Vpliv električnega polja na membrane celic**	**8**
2.1.2	**Delovanje električnega polja - elektroporacija**	**9**
2.1.2.1	Kritična transmembranska napetost	11
2.1.2.2	Vpliv električnih parametrov na permeabilizacijo	12
2.1.2.3	Vpliv električnih parametrov na zlivanje celic	16
2.1.2.4	Vpliv drugih dejavnikov na permeabilizacijo in zlivanje celic	18
2.1.3	**Mehanizmi zlivanja**	**19**
2.2	NAPRAVE IN METODE ZA IZVEDBO	20
2.2.1	**Stik med celicami**	**20**
2.2.2	**Generiranje električnih pulzov**	**21**
2.2.3	**Detekcija in ovrednotenje produktov zlivanja**	**22**
2.3	OPREDELITEV PROBLEMA	24
2.3.1	**Cilji raziskovanja**	**24**
2.3.2	**Delovna hipoteza**	**25**
3	**MATERIALI IN METODE**	**26**
3.1	VPLIV ELEKTRIČNIH PARAMETROV NA ZLIVANJE CELIC	26

3.1.1 Mediji in gojenje celic 26
3.1.2 Elektroporacija 27
3.1.3 Permeabilizacija 28
3.1.4 Zlivanje celic 29
3.1.5 Detekcija zlitih celic 30
3.1.6 Določitev izplena zlivanja 30
3.1.7 Statistična obdelava rezultatov 32
3.2 PRIPRAVA HIBRIDOMSKIH CELIČNIH LINIJ 32
3.2.1 Mediji in gojenje celic 32
3.2.1.1 Gojenje mielomskih celic 32
3.2.1.2 Priprava suspenzije limfoblastov 33
3.2.1.3 Gojenje heterohibridomov 33
3.2.2 Elektroporacija 34
3.2.3 Zlivanje celic 35
3.2.4 Rast hibridnih celic ter selekcija stabilnih celičnih linij 35
3.2.5 Presejalni testi 36
3.2.6 Kloniranje in shranjevanje hibridomov 37
4 REZULTATI 38
4.1 VPLIV ELEKTRIČNIH PARAMETROV 38
4.1.1 Permeabilizacija 39
4.1.1.1. Intenziteta in število pulzov 39
4.1.1.2. Smer električnih pulzov 41
4.1.2 Zlivanje celic 44
4.1.2.1. Preživetje in povprečno število jeder v celici 44
4.1.2.2. Amplituda in število električnih pulzov 47
4.1.2.3. Smer električnih pulzov 48
4.2 PRIPRAVA HIBRIDOMSKIH CELIČNIH LINIJ 51
4.2.1 Priprava stabilnih celičnih linij 51
4.2.2 Izražanje monoklonskih protiteles 52
5 RAZPRAVA IN SKLEPI 53

5.1 METODA ZLIVANJA CELIC 53
5.2 PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH ELEKTRIČNIH PARAMETROV PRI RAZLIČNIH CELIČNIH LINIJAH 54
5.2.1 Preživetje celic in indeks polinukleacije 54
5.2.2 Amplituda in število pulzov 54
5.2.3 Smer električnega polja 55
5.3 PRIPRAVA HIBRIDOMSKIH CELIČNIH LINIJ 58
5.3.1 Priprava stabilnih celičnih linij 58
5.3.2 Proizvodnja monoklonskih protiteles 59
5.4 SKLEPI 60
6 POVZETEK 62
6.1 POVZETEK 62
6.2 SUMMARY 63
7 VIRI 65
8 ZAHVALA

1 UVOD

1.1 ZLIVANJE CELIC

Življenje se začne s fuzijo oziroma z zlitjem dveh gamet v zigoto. Že dolgo je znano, da z zlivanjem celic tudi kasneje v organizmu nastajajo žive celice in da ima ta pojav veliko vlogo v razvoju in pri diferenciaciji celic in tkiv sesalcev [Witze in Rothman, 2002]. Že leta 1961 so ugotovili, da se pod določenimi pogoji *in vitro* zlivajo tudi somatske celice. Zlivanje somatskih celic so prvič dokazali, ko so identificirali celice z mešanimi kariotipi po skupnem gojenju različnih celičnih linij v kulturi [Barski in sod., 1961].

Pri zlitju celic nastanejo hčerinske celice, ki nosijo oba nabora starševskih kromosomov v enem jedru. Za večino celic je to pogubno, iz nekaterih hibridnih celic pa lahko po naslednjih celičnih delitvah nastane stabilna celična linija z naborom kromosomov, ki ji omogoča preživetje in je sestavljen iz kromosomov obeh staršev [Vassilopoulos in Russell, 2003].

Za nas je zlivanje celic pomembno kot potencialno zelo uporabna biotehnološka oziroma biomedicinska metoda, ki jo izvajamo predvsem v pogojih *in vitro*, lahko pa tudi *in vivo*. Z njo pridobimo žive hibridne celice, ki z dvojnim genskim zapisom opravljajo še dodatne funkcije. Možne uporabe hibridnih celic določajo lastnosti starševskih celic, dejansko uporabnost pa v veliki meri tudi izplen metode, ki jo uporabimo za njihovo pripravo.

1.2 UPORABA ZLIVANJA CELIC

Med hibridi, ki jih lahko pridobimo z zlivanjem celic, so najbolj poznani hibridomi, ki proizvajajo monoklonska protitelesa. Postopek za pridobivanje

monoklonskih protiteles s t.i. **hibridomno tehnologijo**, sta prvič opisala Koehler in Milstein [Koehler in Milstein, 1975]. Hibridomi, ki proizvajajo monoklonska protitelesa, nastanejo z zlivanjem mielomskih celic in limfocitov B. S hibridomno tehnologijo uspešno pripravljajo hibridome med mišjimi limfociti B in mišjimi mielomi. Poleg mišjih se da uporabiti tudi celice nekaterih drugih živali, npr. podgan in kokoši, in tudi humane celice. Monoklonska protitelesa, ki jih pridobijo na ta način, so uporabna v različne namene.

Izjemna lastnost reagentov, ki jih sestavljajo monoklonska protitelesa, je njihova sposobnost specifične vezave na določen antigen [Ritter in Ladyman, 1995]. Le-ta jim omogoča, da se vežejo samo na svojo tarčo tudi v pogojih *in vivo*. S tem na ustreznih mestih delujejo kot agonisti oziroma antagonisti receptorjev ali kot nevtralizatorji ligandov. Predvsem pa so uporabni v imunoloških tehnikah za detekcijo specifičnega proteina.

Mišja monoklonska protitelesa so neprimerna za terapevtsko uporabo, ker povzročijo v človeku imunski odgovor, t.i. odgovora HAMA (human anti-mouse antibody response). Za terapijo lahko uporabljamo le humanizirana ali humana monoklonska protitelesa. Proizvodnja slednjih s hibridomno tehnologijo je še vedno zelo zahtevna, protitelesa pa mnogokrat ne preveč učinkovita. Poglavitna vzroka sta omejen vir človeških limfocitov, primernih za zlivanje ter nepoznavanje učinkovitih metod za zlivanje celic.

Za uporabo v terapevtske namene zato v glavnem uporabljajo himerna in humanizirana mišja protitelesa, ki imajo zmanjšano imunogenost, čeprav je prihodnost v humanih protitelesih [Glennie in Johnson, 2000]. Različne raziskovalne skupine zato še vedno poskušajo optimizirati različne metode za pripravo humanih protiteles. Te metode so: hibridomna tehnologija s človeškimi celicami ali s kombinacijo človeških imunskih celic z mišjimi mielomskimi

celicami; imunizacija gensko spremenjenih živali, ki nosijo gene za človeške imunoglobuline (Ig) in fagna tehnologija.

Dodatne funkcije monoklonskih protiteles lahko dosežemo z vezavo snovi, ki delujejo citotoksično (radioizotopi, bakterijski toksini, kemoterapevtiki ali prekurzorji zdravilnih učinkovin).

Ena od možnosti razširitve uporabe monoklonskih protiteles, od katere se nadejajo uspeha predvsem pri zdravljenju raka, je priprava bispecifičnih monoklonskih protiteles. Ta se v naravi ne pojavljajo, pripravimo pa jih lahko med drugim tudi z zlivanjem dveh različnih hibridomov. Pri pravilni kombinaciji genov ima protitelo dve različni specifičnosti [Kufer in sod., 2004; Cao in sod., 1998; Cao in sod., 1995].

Druga zelo aktualna uporaba zlivanja celic je priprava hibridnih celičnih cepiv za **imunoterapijo raka**. Ugotovitev, da so na tumorskih celicah specifični antigeni, usmerja raziskave v novo generacijo zdravil za zdravljenje raka, ki bi vzpodbujala imunski odziv na tumorje.

Tumorske celice imajo raznovrstne in nepredvidljive napake v imunskih funkcijah. Pogosto opažen t.i. »imunski pobeg« tumorskih celic je zmanjšano izražanje antigenov. To lahko nadomesti uporaba dendritskih celic, ki imajo največjo moč predstavljanja antigenov v imunskem sistemu. Zaradi sposobnosti zelo mobilnih dendritskih celic, da prenesejo antigen do limfnih vozlov in aktivirajo efektorske celice T, pa so idealne za indukcijo specifične antitumorske imunosti [Schirrmacher in sod., 2003].

Antigene lahko v dendritske celice vnesemo na različne načine. Eden je elektropermeabilizacija celic v prisotnosti antigenov, pridobljenih iz tumorja. Druga možnost je, da v celico vnesemo gene, ki kodirajo tumorske antigene. Tretja

možnost pa je zlivanje dendritskih celic s celotnimi tumorskimi celicami. Hibridne celice, ki jih dobimo na ta način, povzročajo imunost tudi proti tumorskim antigenom, ki jih ne poznamo in to daje metodi zlivanja pomembno prednost pred ostalima navedenima metodama.

Za uporabo hibridnega celičnega cepiva pri ljudeh je potrebno zagotoviti hiter in učinkovit postopek za terapijo, preden bolezen začne napredovati. V ta namen je potrebno v kratkem času pripraviti dovolj velike količine hibridnih celic, zato potrebujemo hitro in učinkovito izolacijo dendritskih celic [Lopez in sod., 2003] in učinkovit protokol za zlivanje celic.

Zlivanje celic so uporabili tudi za **vnos receptorjev** v celično membrano. To omogoča študij njihove strukture in funkcije. To metodo so uporabili na kuncu v pogojih *in vivo* za preučevanje okužbe z gonorejo [Heller in Grasso, 1990].

Metode zlivanja celic bi bilo možno uporabiti tudi za **regeneracijo tkiv** s celično terapijo. Pri transplantaciji izvornih celic enega tipa tkiva te celice pod ustreznimi pogoji ustvarijo tkivo drugega tipa, prisotnega na mestu transplantacije.

V nekaterih primerih so raziskovalci to sposobnost celic poimenovali plastičnost izvornih celic in jo uspešno razložili kot dediferenciacijo in ponovno, vendar drugačno, diferenciacijo celic [Rodić in sod., 2004]. V nekaj dobro opisanih primerih zlivanja transplantiranih celic, ki izvirajo iz kostnega mozga, s hepatociti v jetrih, nevroni v možganih in s celicami srčne mišice, pa so dokazali, da je vzrok spremembe razvojne usode transplantiranih celic izključno celično zlivanje [Alvarez-Dolado in sod., 2003, Vassilopoulos in sod., 2003; Wang in sod., 2003].

To spoznanje predstavlja možnost za ciljano celično terapijo z namenom regeneracije organov. Od metod, ki se uporabljajo za zlivanje celic (virus, PEG,

električni pulzi) je le uporaba električnih pulzov možna v pogojih *in vivo*. Obstaja pa tudi možnost zlivanja v pogojih *ex vivo*.

1.3 NAČINI IZVEDBE ZLIVANJA CELIC

Celične membrane se med seboj ne zlivajo spontano, ampak imajo nasprotno mehanizme, ki jih držijo na »varni razdalji«. Zato je potrebno celice spraviti v stanje, v katerem je zlivanje med njimi možno. Pri tem si lahko pomagamo z virusi, s polietilenglikolom ali pa z električnimi pulzi.

1.3.1 Virus

Na začetku so celice zlivali s pomočjo virusov [White in sod., 1981], tudi Koehler in Milstein sta uporabila Sendai virus pri svoji originalni izvedbi hibridomske tehnike [Koehler in Milstein, 1975]. Uporaba virusov pri pripravi hibridnih celic ali njihovih produktov v terapevtske namene zaradi njihove potencialne nevarnosti ni sprejemljiva [Paris, 2004]. Zlivanje celic s pomočjo virusov so zato kmalu opustili in začeli uporabljati preprosto kemično spojino polietilenglikol (PEG) [Galfre in sod., 1977].

Zlivanje celic s pomočjo virusov je kljub temu še vedno predmet intenzivnega raziskovanja. Pomemben cilj teh raziskav je pridobiti znanje o mehanizmu virusne okužbe (zlitja virusa z membrano ciljne celice), ki bi nam omogočalo, da jo preprečimo. Pri tem je pomemben del razumevanje delovanja fuzijskih proteinov, ki je zelo kompleksno in se razlikuje od virusa do virusa [Peisajovich in Shai, 2003].

Študije virusnega zlivanja so zanimive z vidika razumevanja mehanizmov zlivanja [Zimmerberg in Chernomordik, 1999; Melikyan in Chernomordik, 1997; Lindau in

Almers, 1995]. Pri virusnem zlivanju stik med membranami povzročijo proteini in t.i. fuzijski peptidi [Nieva in Agirre, 2003; Epand, 2003]. Le-ti naj bi se vgradili v ciljno membrano, destabilizirali lipidni dvosloj, povzročili njegovo ustrezno ukrivljenost in končno omogočili nastanek »fuzijske pore«, ki tako kot pri zlivanju z električnimi pulzi nastane v lipidnem dvosloju membrane [Epand, 1998; Bailey in sod., 2005].

1.3.2 Polietilenglikol

Metoda zlivanja s polietilenglikolom [Galfre in sod., 1977] je bila do pred kratkim najbolj splošno uporabljana. Polietilenglikol povzroči higroskopno agregacijo in skrčenje celic. Predpostavljajo, da je za zlivanje celic ključen korak odstranitev polietilenglikola, ker se takrat celice napihnejo [Scott – Taylor, 2000].

Ta metoda je dovolj učinkovita za zlivanje mišjih imunskih in mielomskih celic in se uspešno uporablja za pridobivanje mišjih monoklonskih protiteles [Čurin Šerbec, 2001]. Človeški hibridomi proizvajajo protitelesa, ki so uporabna predvsem v terapevtske namene, vendar v tem primeru metoda s polietilenglikolom žal ni dovolj uspešna [Jessup in sod., 2000].

Tudi za zlivanje dendritskih in tumorskih celic za imunoterapijo raka se uporablja metoda zlivanja s polietilenglikolom. Pomanjkljivost pri tej metodi je, da je potrebno celice pridobljenih celičnih linij nato gojiti v kulturi, da pridobimo dovolj velike količine celic za uporabo.

1.3.3 Električni pulzi

Pri uporabi zlivanja z električnimi pulzi so poročali o stokrat večjem izplenu kot pri uporabi polietilenglikola v primeru pridobivanja monoklonskih protiteles proti

progesteronu [Elder in sod., 1997]. Zdaj se uporabljata obe metodi, vendar rezultate težko primerjamo, saj so odvisni od mnogih parametrov in so različni pri različnih celicah.

Pri zlivanju dendritskih in tumorskih celic so začeli uvajati zlivanje z električnimi pulzi v želji, da bi pridobili količino hibridnih celic, ki bi bila dovolj velika za terapijo s samim zlivanjem in bi se izognili potrebi po razmnoževanju hibridnih celic v kulturi [Scott-Taylor in sod., 2000].

Tudi tu ni primerjalnih študij, ki bi nam povedale, katera metoda je učinkovitejša. Obstaja pa raziskava, v kateri so ugotovili, da so si produkti zlivanja pri obeh metodah med seboj podobni glede na učinkovitost cepiva v antitumorskih imunizacijah v pogojih *in vivo* [Lindner in Schirrmacher, 2002].

Poleg enostavnosti zlivanja z električnimi pulzi bi lahko bila ena od prednosti te metode tudi možnost, da kontroliramo električne parametre, ki jih uporabljamo, in da jih optimalno prilagodimo posameznemu eksperimentalnemu sistemu (različne celice, *in vitro*, *in vivo*). Uporaba te metode pa je omejena z možnostjo dostopa do ustreznega generatorja pulzov, ki ne spada v standardno opremo celičnih laboratorijev, medtem ko za metodo s polietilenglikolom takih omejitev ni.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZLIVANJE CELIC Z ELEKTRIČNIMI PULZI

2.1.1 Vpliv električnega polja na membrane celic

Ko celice izpostavimo visokonapetostnim električnim pulzom, jih lahko uničimo, ali pa s kontroliranimi pogoji povzročimo le začasne spremembe v njihovi membrani. Za proučevanje delovanja električnega polja na celice ne moremo uporabljati neposrednih mikroskopskih metod opazovanja pojavov na membrani.

Vplive različnih električnih parametrov zato proučujemo s pomočjo proučevanja pojavov, ki jih električno polje povzroči. Nas zanimata predvsem dva pojava. Prvi je permeabilizacija celic, to je povečana neselektivna prepustnost membrane za različne snovi (ione, barvila, plazmide,...).

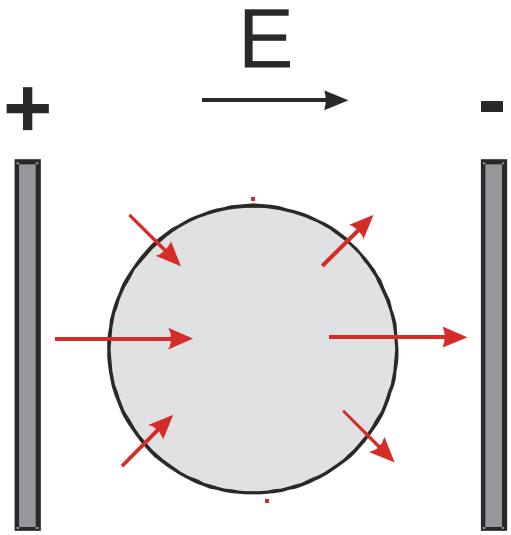
Druga sprememba pa je t.i. fuzogenost celic. To je stanje celičnih membran, v katerem se membrane in posledično tudi celična notranjost pod ustreznimi pogoji lahko zlijejo med seboj. Hkrati s tema dvema spremembama nas zanima tudi stopnja preživetja celic, saj so uporabne le tiste celice, ki so obdelavo preživele.

Spremembe v membrani so posledica vsiljene transmembranske napetosti, ko le-ta preseže določeno kritično vrednost. Molekularni mehanizmi pojavov, ki jih ta napetost povzroči, še niso natančno poznani. Večina raziskovalcev na tem področju pa se strinja, da v lipidnem dvosloju celične membrane nastanejo t.i. pore.

Ob obstoju nekaterih drugih teorij [Kotnik, 2000], je najširše sprejeta teorija elektroporacije, ki razlaga nastanek in obnašanje por in je podana v nadaljevanju.

2.1.2 Delovanje električnega polja - elektroporacija

Avtorji so opisali stacionarno stanje za okroglo celico, ki se nahaja v homogenem električnem polju med elektrodama, na kateri pritisnemo napetost v obliki kratkega pulza (slika 1).



Slika 1: Skica celice v električnem polju.

Figure 1: Schematic of a cell within electric field.

Za okroglo celico v homogenem električnem polju velja naslednja modelna - Schwanova enačba:

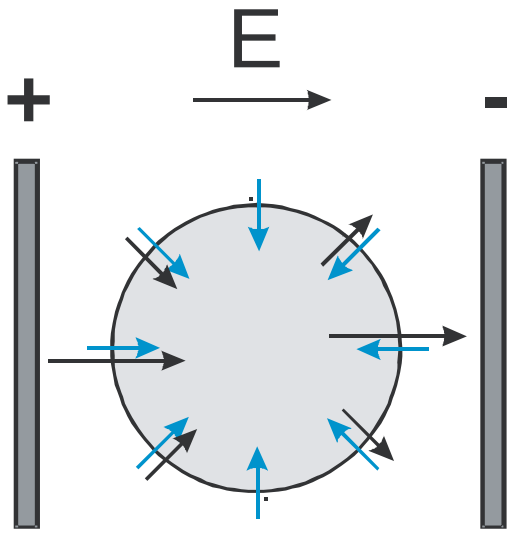
$$\Delta\Phi_i = \frac{3}{2} ER\cos\vartheta, \qquad (1)$$

kjer je E uporabljeno električno polje, R polmer celice, ϑ pa odraža položaj dela membrane na celici glede na smer električnega polja. Pri tem veljajo predpostavke, da je membrana čisti dielektrik, torej neprevodna, da je celica okrogla in da je čas trajanja pulza daljši od časa nabijanja membrane, kar za 10 µs in več trajajoče pulze lahko predpostavimo.

Ta enačba je koristna za razumevanje učinkov posameznih parametrov električnega polja na membrane. Električna poljska jakost in radij celice sta linearna faktorja, torej povečanje električnega polja povzroči linearno sorazmerno povečanje napetosti vsiljene čez membrano. Večje celice pa bodo pri enakem električnem polju deležne večje vsiljene napetosti.

Naslednji pomemben parameter je cos ϑ. Le ta pove, da vsiljena transmembranska napetost ni enaka na vseh točkah na membrani, ampak je odvisna od položaja. Največje transmembranske napetosti nastanejo na položaju, kjer je ϑ enak 0 ali π, na teh dveh točkah pa je nasprotno usmerjen. Najmanjša transmembranska napetost nastane na položaju, kjer je ϑ enak $\pi/2$ oziroma -$\pi/2$.

Žive celice imajo mirovalno transmembransko napetost, ki je enaka po celem obodu celice. Tipične vrednosti so določali okrog 60 mV. Vsiljena transmembranska napetost se prišteje že prisotni mirovalni napetosti na membrani.



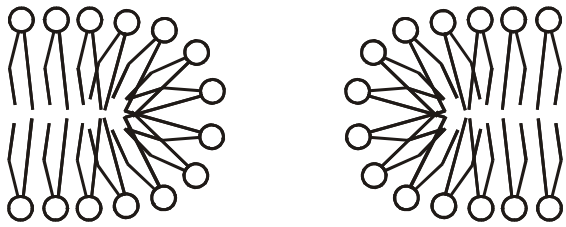
Slika 2: Mirovalna napetost žive celice (svetla) in vsiljena napetost (temna), ki je posledica prisotnosti električnega polja.

Figure 2: Superposition of induced membrane potential (dark) onto the resting potential (light) of a living cell.

Slika 2 prikazuje asimetrično porazdelitev napetosti čez membrano. Največja vrednost napetosti je na strani pozitivne elektrode in manjša na nasprotni strani, medtem ko je napetost vsiljena pri $\vartheta \ \pi/2$ oziroma $-\pi/2$ enaka nič. Asimetrični potencial je pokazal že Kinosita s sodelavci. Fluorescentno barvilo, občutljivo na spremembo napetosti, so vgradili v membrano in nato merili fluorescenco med izpostavitvijo celic električnemu polju [Kinosita in sod., 1988].

2.1.2.1 Kritična transmembranska napetost

Za vsako membrano obstaja kritična transmembranska napetost, pri kateri pride do »porušitve« membrane. Vrednosti te pragovne napetosti se razlikujejo med posameznimi vrstami celic. Ko transmembranska napetost doseže kritično (pragovno) vrednost, Schwanova enačba ne velja več. Pride do hitre depolarizacije membrane in do pojava, ki ga ponavadi opišemo kot elektroporacijo oziroma permeabilizacijo. Membrano v takem stanju si predstavljamo preluknjano s hidrofilnimi porami [Weaver in Powell, 1989] (slika 3).

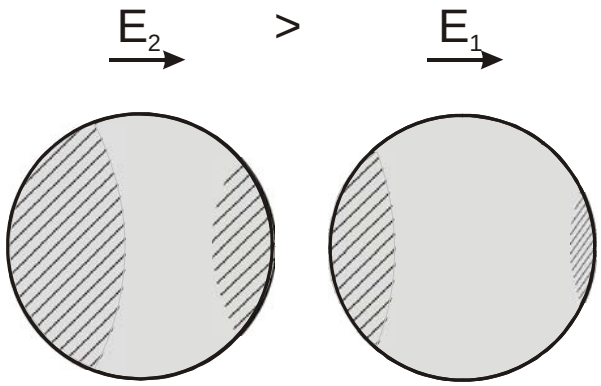


Slika 3: Ilustracija hipotetične pore, kakršne nastanejo zaradi delovanja električnega polja

Figure 3: Illustrations of hypothetical pore that may be involved in electroporation

Pri kritični transmembranski napetosti pride do permeabilizacije na tistem polu membrane, ki je na strani pozitivne elektrode. Z naraščanjem vrednosti

transmembranske napetosti se povečuje površina membrane okrog obeh polov v obliki kapic, na kateri le-ta preseže kritično vrednost in pride do permeabilizacije (slika 4). Površina celične membrane, ki je permeabilizirana, je torej funkcija amplitude električne poljske jakosti [Gabriel in Teissie, 1998].



Slika 4: Površina membrane, na kateri membranski potencial presega kritični membranski potencial je označena črtkano; na levi je električna poljska jakost večja kot na desni ($E_2 > E_1$).

Figure 4: Dashed lines illustrates the area of permeabilised membrane (membrane potential exceedes the treshold value); electric field E_1 is smaller than electric field E_2.

Permeabilizacija membrane je začasna, dokler jakost električnega polja ne preseže določene vrednosti, ko povzroči celici nepopravljive poškodbe. Pri tem ostaja odprto vprašanje, ali pride do nepopravljive poškodbe membrane ali do prevelikega iztoka snovi iz celice.

2.1.2.2 Vpliv električnih parametrov na permeabilizacijo

Uporabljali so zelo različne vrednosti posameznih parametrov, saj so za permeabilizacijo različnih tipov in različnih velikosti celic potrebne različne količine dovedene energije. Sčasoma se je izkazalo, da je pomemben tudi način dovajanja te energije.

Poleg celic so permeabilizirali tudi sintetične lipidne membranske vezikle, za katere so pogoji, pri katerih se permeabilizirajo, prav tako precej drugačni od tistih za celice. Lipidni membranski vezikli namreč nimajo svoje lastne mirovalne napetosti, lahko so zelo različno veliki, njihovo membrano pa večinoma sestavljajo samo lipidi iste vrste, večinoma tudi brez proteinov.

Mnogi raziskovalci so opazovali vpliv dolžine in amplitude enega električnega pulza na učinkovitost elektroporacije celic v pogojih *in vitro*. Ugotovili so [Neumann, 1992], da je pri uporabi enega pulza, učinkovitost permeabilizacije sorazmerna njegovi **energiji**. Povečanje vrednosti amplitude in dolžine pulza poveča energijo, ki jo dovedemo celični suspenziji in jo izračunamo kot:

$$E = \int_0^{\tau} U(t) I(t) dt = \int_0^{\tau} U(t) \frac{U(t)}{Z(\omega,t)} dt = \frac{1}{Z} \int_0^{\tau} U(t)^2 dt \qquad (2)$$

Napetost med elektrodama smo označili z U(t), električni tok I(t) in trajanje celotnega poskusa s τ. Privzeli smo, da je impedanca bremena Z(ω,t) omska in med obdelavo konstantna. Zapisali smo jo s konstanto Z. Tudi napetost U(t) je bila med pravokotnim pulzom konstantna in enaka U. Naštete ugotovitve upoštevamo v enačbi (2) in dobimo:

$$E = \frac{U^2}{Z} \sum_{i=1}^{N} T_i = \frac{1}{Z} U^2 \tau \qquad (3)$$

Kasneje so pokazali, da način dovajanja te energije vpliva na permeabilizacijo in preživetje celic [Maček Lebar, 1999]. Uporabili so enako energijo, le da so jo namesto v enem daljšem pulzu dovedli v večjem številu krajših pulzov. Pri poskusih, kjer so uporabili protokole z enako dovedeno energijo in različnimi

ostalimi parametri, so ugotovili, da dovedena energija ni ključni parameter uspešne permeabilizacije celic [Vernhes in sod., 1999].

Od **amplitude** pulzov (električne poljske jakosti) je odvisno, kolikšen del membrane je izpostavljen nadpragovni vrednosti električne poljske jakosti, pri kateri lahko pride do permeabilizacije. Z večanjem amplitude pulzov se povečuje površina membrane, kjer dosežemo nadpragovno vrednost [Rols in Teissie, 1990a]. Intenziteto permeabilizacije na območju, ki ga določa amplituda, pa nato določata število in trajanje pulzov.

Povečanje **števila** pulzov poveča delež permeabiliziranih celic za majhne molekule, ne pa tudi za večje molekule. Iz tega so sklepali, da število pulzov poveča število por na permeabilizirani membrani [Rols in Teissie, 1998]. S tem vpliva na velikost toka molekul skozi membrano.

Dolžina pulzov naj bi vplivala na povečanje površine por. S tem dolžina pulzov vpliva na prepustnost membrane celic za manjše molekule [Maček Lebar in Miklavčič, 2001], predvsem pa za makromolekule. Ugotovili so, da je vpliv dolžine pulzov na prepustnost celic precej bolj izrazit za makromolekule kot za manjše molekule. Za manjše molekule so uspešne tudi obdelave z več krajšimi pulzi, medtem ko za večje molekule to ne velja [Rols in Teissie, 1998].

Poleg električne poljske jakosti, števila in dolžine pulzov, je za permeabilizacijo pomembna tudi hitrost dovajanja energije, saj se energija z mesta, kamor jo dovedemo, širi oziroma izgublja v okolico. Hitrost dovajanja energije spreminjamo s **ponavljalno frekvenco pulzov**.

Pucihar in sod. so merili vnos molekule Lucifer Yellow v celice DC3F pri različnih ponavljalnih frekvencah pulzov [Pucihar in sod., 2002]. Pokazali so, da povečanje

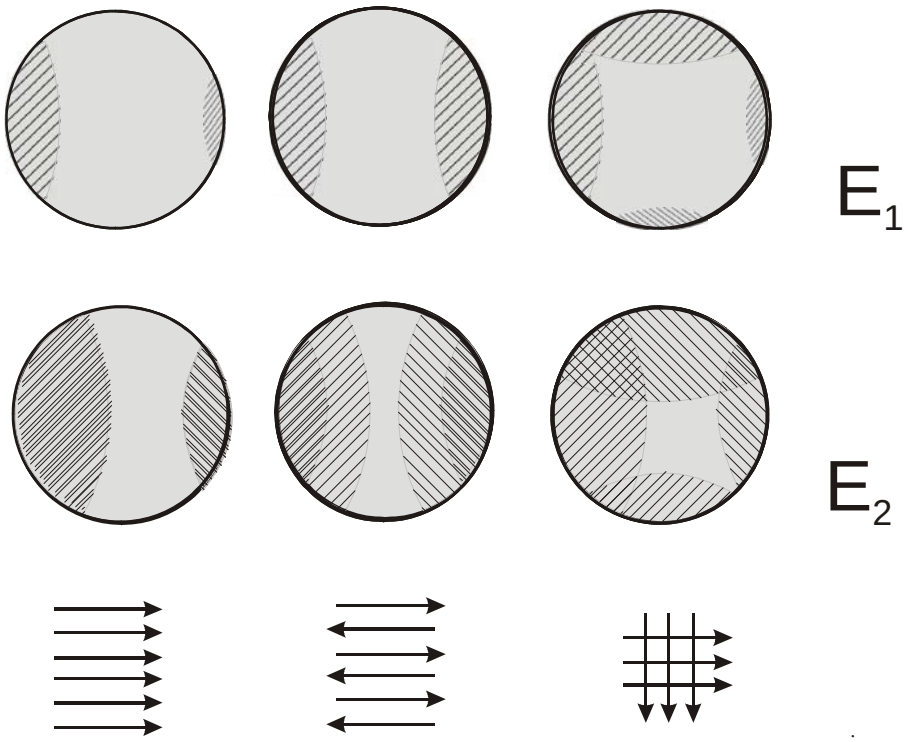
ponavljalne frekvence ne zmanjša pomembno maksimalne vrednosti vnosa vse do zelo visokih frekvenc (8.3 kHz). Pri tem ima vsaka frekvenca maksimalno vrednost vnosa pri drugačni napetosti; pri večjih frekvencah je potrebna višja napetost za dosego maksimalnega vnosa.

Vernhes in sodelavci pa so pri merjenju vnosa propidijevega jodida in preživetja CHO celic pri vrednostih ponavljalne frekvence pulzov v območju od 0,5 Hz do 100 Hz opazili najvišje preživetje pri 10 Hz, medtem ko se je delež permeabiliziranih celic povečeval proti 100 Hz [Vernhes in sod., 1999].

Smer dovajanja električnih pulzov je parameter, ki so ga začeli raziskovati šele v zadnjem času. To so omogočili dovolj zmogljivi generatorji električnih pulzov, ki so sposobni izvesti take kombinacije pulzov in so jih izdelali šele pred kratkim [Reberšek, 2001]. Iz teorije elektroporacije sledi, da pulzi, pritisnjeni v različnih smereh, povzročijo permeabilizacijo na različnih področjih celične membrane, kot je razvidno iz slike 5.

Pokazali so, da uporaba pulzov, ki jih pritisnemo v različnih smereh, poveča permeabilizacijo, [Miklavčič, 2001, Valič in sod., 2003; Faurie in sod., 2004]. Pri tem pa se lahko zmanjša delež preživelih celic [Vernhes in sod., 1999].

Večjo permeabilizacijo pri uporabi bipolarnih pulzov so pokazali tudi Kotnik in sodelavci [Kotnik in sod., 2001a], pri čemer so ugotovili tudi, da taki pulzi povzročijo manjšo elektrolizo elektrod in s tem manj sproščanja citotoksičnih kovinskih ionov v celično suspenzijo [Kotnik in sod., 2001b].



Slika 5: Površina membrane, na kateri membranski potencial presega kritični membranski potencial je označena črtkano; v zgornji vrsti je električna poljska jakost manjša kot v spodnji vrsti, $E_1 < E_2$. Smer električnega polja je prikazana s puščicami.

Figure 5: Dashed lines illustrates the area of permeabilised membrane (membrane potential exceedes the treshold value); E_1 is smaller than E_2. Arrows depict the direction of the electric field.

2.1.2.3 Vpliv električnih parametrov na zlivanje celic

Permeabilizacijo celic razlagamo s pomočjo teorije elektroporacije. Zlivanje celic, tako kot permeabilizacijo, povzročimo z električnimi pulzi. Ker ne vemo natančno, kakšni so molekularni mehanizmi obeh membranskih procesov, tudi ne vemo, kakšna je povezava med permeabilizirano membrano in t.i. fuzogeno membrano, ki je sposobna zlivanja.

Vemo, da se zlivanje celic od permeabilizacije bistveno loči v času trajanja posledic delovanja električnih pulzov. Vnos molekul skozi permeabilizirano membrano je

možen bistveno daljši čas (membrane CHO celic so spet neprepustne šele po dvajsetih minutah) kot zlivanje med membranami, za katero se sposobnost membran drastično zmanjša že v prvi minuti po pulzih in popolnoma izgine po petih minutah [Sowers, 1986; Teissie in Ramos, 1998].

Tako kot za permeabilizacijo tudi za zlivanje celic velja, da obstaja kritična transmembranska napetost, pri kateri pojav opazimo. Z naraščanjem **amplitude** električnih pulzov nato delež zlitih celic narašča do neke vrednosti, pri kateri pride do nasičenja. Pokazali so, da je kritična transmembranska napetost za zlivanje celic večja kot za permeabilizacijo pri celicah, ki imajo mirovalno transmembransko napetost. Enaki pa sta pri lipidnih dvoslojih in veziklih [Teissie in Rols, 1993].

To razliko, ki jo povzroči mirovalna membranska napetost, izniči uporaba pulzov v različnih **smereh**. Pri amplitudah, pri katerih se kapice membran, na katerih je transmembranska napetost večja od kritične, ne prekrivajo, je celotna površina membrane, na kateri je transmembranska napetost večja od kritične, vsota vseh kapic.

Ker se stiki med celicami tvorijo naključno, pri centrifugiranju, so iz tega sklepali, da pride do zlivanja membran le, če prideta v stik dve membrani, na katerih je transmembranska napetost večja od kritične. Smer pulzov torej poveča površino membrane, na kateri je transmembranska napetost večja od kritične in ima enak učinek kot povečevanje amplitude električnih pulzov, le da manj poškoduje membrano [Teissie in Rols, 1986].

Povečevanje **dolžine** pulzov poveča izplen zlivanja do neke vrednosti, kjer pride do nasičenja. Odvisnost je podobna kot pri permeabilizaciji, kjer vrednost nasičenja dosežejo pri enakih pogojih. To pa ne velja za vpliv **števila** pulzov, kjer

indeks zlivanja ne sledi permeabilizaciji. Tu pri neki vrednosti pride do nasičenja, izplen zlivanja pa se pri tej vrednosti začne spet zmanjševati. Zlivanje celic in permeabilizacija torej nista na enak način odvisni od električnih parametrov [Teissie in Ramos, 1998].

2.1.2.4 Vpliv drugih dejavnikov na permeabilizacijo in zlivanje celic

Na hitrost celjenja membran vpliva **temperatura** [Kinosita in Tsong, 1977, Deuticke in Schwister, 1989]. Pri nizki temperaturi je čas obstoja struktur v membrani, ki ji omogočajo zlivanje, daljši kot pri višji temperaturi. Ker želimo, da ima membrana čim dlje sposobnost zlivanja, centrifugiranje opravimo pri temperaturi +4°C.

Vpliv **prevodnosti medija** na zlivanje celic še ni raziskan, verjetno pa je povezan z vplivom, ki ga ima prevodnost na permeabilizacijo celic. Vpliv električnega polja na površino membran posredujejo ioni v okoliški tekočini z medploskovno polarizacijo. Za uspešno permeabilizacijo zato potrebujemo končno koncentracijo ionov v okoliškem mediju [Neumann, 1992].

V bolj prevodnem mediju steče višji električni tok, zato se suspenzija bolj segreje in to poškoduje celice. Z zmanjšanjem prevodnosti povečamo odstotek preživetja celic [Pucihar in sod., 2001]. Vendar v nizkoprevodnem mediju z istimi parametri vsilimo manjši potencial čez membrano, zato so za permeabilizacijo potrebni električni pulzi večje amplitude oziroma dolžine.

Prav tako na celice vpliva **osmotski tlak suspenzije**. Tvorba por je neodvisna od ozmolarnosti, hipoozmolarni medij vzpodbuja povečevanje por, hiperozmolarni medij pa celjenje celic [Rols in Teissie, 1990b]. Pri spreminjanju pogojev pa je

potrebno upoštevati tudi preživetje celic, ki je v močno hipoozmolarnih medijih zelo slabo.

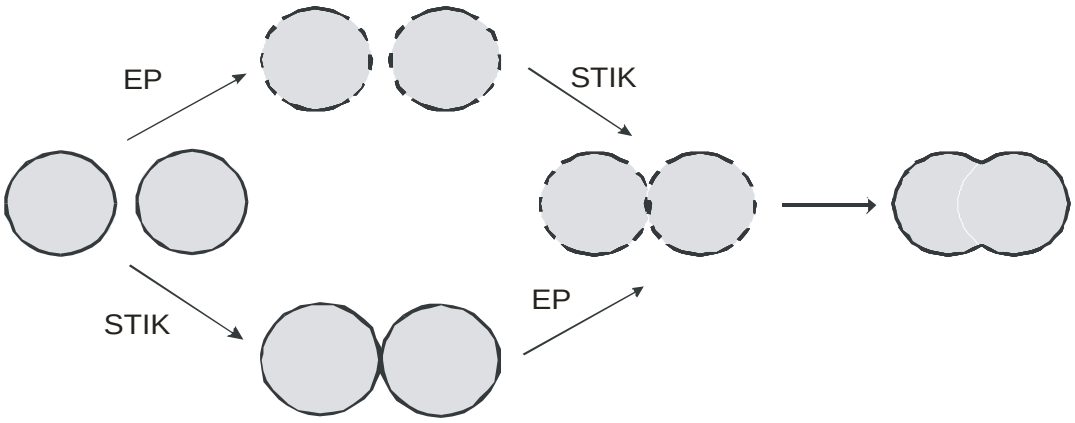
Začetek zlivanja je odvisen od razdalje in odbojnih sil med negativno nabitimi membranami. Te naboje lahko kompenziramo s pozitivno nabitimi ioni. Velik je pomen **dvovalentnih ionov**, predvsem Ca^{2+} in Mg^{2+}, brez katerih se močno zmanjša delež zlitih celic in tudi preživetje celic [Ohno-Shosaku in Okada, 1985].

Na permeabilizacijo in zlivanje vplivajo tudi **proteolizni encimi in druge kompleksne molekule**. Te molekule na zlivanje in permeabilizacijo celic vplivajo preko učinka, ki ga imajo na strukturo membrane, na citoskelet in na elektrostatske sile [Velizarov in Berg, 1998; Velizarov in sod., 1998].

2.1.3 Mehanizmi zlivanja

Celice se normalno ne približujejo druga drugi na razdaljo, ki bi bila dovolj majhna za zlitje. Zaradi negativnega naboja, ki ga ima večina živih celic na svoji površini, se namreč med seboj odbijajo. To odbojno silo je potrebno premagati, če želimo, da se celice približajo na toliko majhno razdaljo, da lahko pride do mešanja lipidnih molekul iz različnih membran.

Vzpostavitev t.i. fuzogenega stanja membrane z električnimi pulzi in zagotovitev stika med celicami sta dva nujna koraka pri procesu zlivanja celic z električnimi pulzi. Proces so uspešno izvedli v obeh možnih zaporedjih teh dveh korakov [Ramos in Teissie, 2000] (slika 6).



Slika 6: Prikazani sta dve zaporedji izvedbe zlivanja celic z električno metodo; najprej elektroporacija (EP) in nato stik ter obratno.

Figure 6: Electrofusion can be observed as resulting of a contact first or a pulse first approach.

2.2 NAPRAVE IN METODE ZA IZVEDBO

2.2.1 Stik med celicami

Uporabimo lahko več različnih metod, s katerimi lahko zagotovimo stik med celicami. Dielektroforeza je najpogosteje uporabljena metoda. To je metoda, pri kateri uporabljamo izmenično električno polje nizke jakosti, da celice uredimo v nekakšne verižice, v katerih sta v stiku po dve sosednji celici [Zimmermann, 1982]. Slabost te metode je, da se suspenzija pri njej segreva, kar ni najbolje za preživetje celic. Kljub temu to metodo pogosto uporabljajo, potreben pa je ustrezen generator, ki proizvaja izmenično električno polje in pulze za elektroporacijo.

Če želimo zlivati med seboj celice, ki so priraščene na podlago, imamo možnost celice gojiti do takšne gostote, pri kateri se celice med seboj dotikajo [Teissie in sod., 1982]. S to metodo smo omejeni samo na zlivanje pritrjenih celic, zelo specifična pa je tudi metoda, pri kateri tvorimo avidin–biotinski most, s katerim povežemo dve monoklonski protitelesi [Lo in sod., 1984]. Vsako od teh dveh protiteles je vezano na eno vrsto celic, ki jih želimo zlivati. Obstoj ustreznih

protiteles in njihova cena sta omejujoča dejavnika pri tej metodi. Celice so uspešno spravljali v stik tudi z mehansko silo, za katero so uporabljali posebej v ta namen izdelano komoro [Jaroszeski in sod., 1994] ali filter papir [Ramos in sod., 2002].

Pri vseh zgoraj naštetih metodah so celice že v stiku, ko jih izpostavimo visokonapetostnim električnim pulzom. Način, s katerim lahko zagotovimo stik med celicami po njihovi izpostavitvi visokonapetostnim pulzom, pa je centrifugiranje celic. Ta metoda je enostavna in ne zahteva nobenih posebnih aparatur [Teissie in Rols, 1986].

Celice moramo centrifugirati v čim krajšem času po elektroporaciji pri nizki temperaturi, ko so celice še v t.i. fuzogenem stanju, ko v membrani še obstajajo začasne permeabilne strukture. Čas obstoja teh struktur je reda velikosti sekund do minut in je močno odvisen od temperature. Uporabiti moramo primerno hitrost centrifugiranja, da zagotovimo stik med celicami, hkrati pa celic, ki so zaradi posledic delovanja električnega polja občutljivejše, ne uničimo.

Pomembna prednost te metode je, da pri njej lahko posebej električno obdelamo vsake od celic, ki jih želimo zliti. To je pomembno v primeru, ko želimo med seboj zlivati celice, ki imajo različne optimalne električne parametre permeabilizacije.

2.2.2 Generiranje električnih pulzov

Za generiranje električnih pulzov uporabljamo dva tipa generatorjev oziroma pulzov. Prvi so generatorji, ki proizvajajo eksponentno padajoče pulze. Drugi pa so generatorji, ki proizvajajo pulze pravokotne oblike. Uporaba pulzov pravokotne oblike nam omogoča, da celice izpostavimo konstantnemu električnemu polju, česar eksponentno padajoči pulzi ne zagotavljajo. V zadnjem času se v glavnem uporabljajo generatorji pravokotnih pulzov [Puc in sod., 2004].

2.2.3 Detekcija in ovrednotenje produktov zlivanja

Za detekcijo lahko uporabljamo različne mikroskopske metode ali pretočni citometer. Celice na mikroskopu lahko opazujemo z vidno svetlobo. Pri tej metodi si lahko pomagamo z barvili, ki različno obarvajo jedro in citoplazmo celice. Celice po zlivanju nasadimo v petrijevke, pustimo približno 24 ur v inkubatorju, da se pritrdijo na podlago in nato štejemo. Če uporabljamo barvila, jih prej še fiksiramo in pobarvamo.

Prednost te metode je, da detektiramo samo žive celice, ki so preživele obdelavo in ne vseh, kot je to pri vseh ostalih metodah. Slabost te metode pa je subjektivnost pri ocenjevanju posameznih celic. Jedra se namreč včasih zlijejo in potem si moramo pomagati z ostalimi podatki, kot sta velikost celice in velikost jeder.

Pri fluorescentnih mikroskopskih metodah uporabljamo dve različni fluorescentni barvili, ki fluorescirata, npr. rdečo in zeleno svetlobo. Kjer pride do zlivanja celic, detektiramo dvojno fluorescenco oziroma rumeno svetlobo. Pri tej metodi ne moremo ločiti živih in mrtvih celic, saj svetijo tako prve kot druge. Pomanjkljivost obeh mikroskopskih metod je zamudnost štetja in majhen del celic, ki jih lahko preštejemo.

Pred kratkim so preizkusili avtomatizirani način ovrednotenja zlitih celic z merjenjem površine z dvojno fluorescenco na slikah, zajetih s konfokalnim fluorescentnim mikroskopom [Gabrijel in sod., 2004]. Dobili so enake rezultate kot pri štetju celic z dvojno fluorescenco in to precej hitreje. Z običajnim fluorescentnim mikroskopom ta metoda še ni preizkušena.

Hitra je tudi metoda detekcije s pretočnim citometrom, pri kateri prav tako uporabljamo fluorescentna barvila [Jaroszeski in sod., 1994]. Tudi pri tej metodi

detektiramo vse celice in ne samo živih. Primerjava z mikroskopskimi metodami je pokazala, da so s pretočnim citometrom določeni deleži zlitih celic nekoliko preveliki. Del napake bi lahko pripisali detekciji celičnih agregatov, ki niso zliti, del pa tudi obarvanim ostankom celic v celični suspenziji.

2.3 OPREDELITEV PROBLEMA

2.3.1 Cilji raziskovanja

1. Preizkusiti metodo za zlivanje celic v pogojih *in vitro*, ki deluje na različnih celičnih linijah.

V ta namen je treba najprej raziskati dejavnike, ki vplivajo na zlivanje celic, nato izbrati med najboljšimi do zdaj znanimi pogoji najustreznejše za naš primer in jih preizkusiti na različnih celičnih linijah, pri čemer je treba zagotoviti tudi primeren način detekcije in ovrednotenja rezultatov.

2. Primerjati vpliv različnih električnih parametrov pri različnih celičnih linijah.

Izbrati želimo nekaj obdelav, to je kombinacij različnih vrednosti električnih parametrov, ki vplivajo na zlivanje celic, in preveriti njihovo učinkovitost. Pri posamezni obdelavi nas zanima tudi permeabilizacija celic.

3. Uporabiti predlagano metodo za pridobivanje hibridomov.

Predlagati želimo praktično metodo za zlivanje celic v pogojih *in vitro,* ki bo uporabna v hibridomni tehnologiji. Metodo želimo uporabiti za pripravo humanih heterohibridomov iz mielomskih celic in humanih limfocitov, ki ni tako enostavna kot priprava mišjih hibridomov in pri kateri metoda s polietilenglikolom ni dovolj uspešna.

4. Predlagati možnosti za nadaljnje izboljšanje izplena zlivanja.

Iz dobljenih rezultatov in ugotovitev pri delu želimo pridobiti ideje za izboljšanje uporabljenih postopkov in uvedbo novih metod, ki bi bile primerne za pripravo monoklonskih protiteles, uporabnih v diagnostiki ali terapiji.

2.3.2 Delovna hipoteza

Naša hipoteza je bila, da zlivanje celic lahko izvedemo na način, ki se ga da uporabiti v hibridomni tehnologiji in da zlivanje z električnimi pulzi lahko v tem primeru pri ustreznih parametrih nadomesti zlivanje s polietilenglikolom z najmanj enakim izplenom.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VPLIV ELEKTRIČNIH PARAMETROV NA ZLIVANJE CELIC

3.1.1 Mediji in gojenje celic

Vpliv električnih parametrov na zlivanje celic smo proučevali na dveh pritrjenih celičnih linijah. Uporabili smo celice mišjega melanoma B16F1 in ovarijske celice kitajske hrčice CHOK1, ki smo jih pridobili iz Evropske zbirke celičnih kultur.

Celice mišjega melanoma B16F1 smo gojili v Eaglovem mediju (EMEM; Sigma, ZDA), ki smo mu dodali zarodni telečji serum (FCS, Sigma, ZDA) v končni koncentraciji 10%, L-glutamin (20 mM; Gibco BRL, Velika Britanija) ter antibiotika crystacillin v obliki K soli benzilpenicilina (200 IE/ml, Pliva, Hrvaška) in gentamicin v obliki gentamicinijevega sulfata (8 µg/ml, Lek, Slovenija).

Ovarijske celice kitajske hrčice CHO smo gojili v hranljivem mediju (F-12 HAM, Sigma, ZDA), ki smo mu dodali zarodni telečji serum (FCS, Sigma, ZDA) v končni koncentraciji 10 %, L-glutamin (10 mM; Gibco BRL, Velika Britanija) ter antibiotika crystacillin v obliki K soli benzilpenicilina (200 IE/ml, Pliva, Hrvaška) in gentamicin v obliki gentamicinijevega sulfata (8 µg/ml, Lek, Slovenija).

Pripravljene medije ter različne dodatke smo sterilizirali s filtracijo preko celulozno-acetatnega filtra z velikostjo por 0,2 µm. Celice smo gojili v inkubatorju pri temperaturi 37 °C v 5 % CO_2 atmosferi in 90 % vlagi. Celice obeh celičnih linij rastejo pritrjene v monosloju. Gojili smo jih v stekleničkah z velikostjo 25 cm^2. Rutinsko smo jih presajali dvakrat na teden z 0,25 % raztopino tripsina z EDTA (Sigma, ZDA). Tripsinizirali smo jih pol minute, nato tripsin odstranili in njegovo delovanje ustavili po eni minuti z gojiščem, ki je vsebovalo telečji serum.

Poskus smo izvedli četrti dan po nasaditvi, en dan pred tem pa smo zamenjali gojišče. Za poskus smo celice odlepili od podlage s tripsinizacijo na enak način kot pri presajanju.

3.1.2 Elektroporacija

Za poskuse smo celice centrifugirali 5 minut pri +4 °C in 1000 obratih na minuto. Nato smo jih resuspendirali v izoozmolarnem poracijskem mediju z nizko ionsko jakostjo. Ta medij je vseboval 10 mM K fosfatni pufer (K_2HPO_4/KH_2PO_4), 250 mM saharozo, ter 1 mM MgCl, njegova pH vrednost pa je bila 7,4. Ta medij smo povzeli po literaturi, saj je najpogosteje uporabljan medij [Teissie in Rols, 1986]. Njegova sestava naj bi bila optimalna za zlivanje celic. V tem gojišču smo pripravili celično suspenzijo ene celične linije s koncentracijo 5 x 10^6 celic/ml tako za določitev stopnje permeabilizacije kot za določitev izplena zlivanja, saj smo opazovali zlivanje celic iste celične linije med seboj.

100 µl celične suspenzije smo z mikropipeto vnesli med štiri valjaste elektrode, ki so bile vpete v ogliščih kvadrata. Razdalja med paroma diagonalno nasprotnih elektrod, med kateri smo dovedli pulze je bila 5 mm. Elektrode iz nerjavečega jekla so bile izdelane v Laboratoriju za biokibernetiko Fakultete za elektrotehniko [Reberšek, 2001].

Kapljico smo namestili tako, da so bile omočene vse štiri elektrode, kar zagotavlja relativno homogeno električno polje [Kandušer in sod., 2003]. Elektrode smo pred vsakim poskusom sprali s fiziološko raztopino in jih osušili s sterilno gazo. Na elektrode smo dovedli pulze z ustreznim časovnim potekom (amplituda, trajanje pulzov, število pulzov, frekvenca pulzov) in smerjo. Pravokotne napetostne pulze smo generirali z elektroporatorjem, prav tako izdelanim v Laboratoriju za biokibernetiko [Reberšek, 2001]. Napetost in tok smo med meritvami opazovali z

dvokanalnim spominskim digitalnim osciloskopom LeCroy 9310C (LeCroy, ZDA). Epruveto s celično suspenzijo smo med meritvami hranili pri temperaturi +4 °C. Po elektroporaciji smo celice obravnavali različno za določitev permeabilizacije in zlivanja.

3.1.3 Permeabilizacija

Permeabilizacijo celic smo spremljali z merjenjem fluorescence propidijevega jodida, kot opisuje Maček Lebar [Maček Lebar, 1999]. Propidijev jodid je fluorescentno barvilo, ki ne more skozi intaktno neporirano membrano. Če mu s permeabilizacijo omogočimo, da pride v celico, se v njej veže na DNK. Vezano na DNK fluorescira svetlobo v območju valovnih dolžin 430 – 570 nm.

Fluorescenca nevezanega propidijevega jodida je 1000-krat manjša. Prav ta lastnost mu daje prednost pred drugimi fluorescentnimi barvili; po elektropermeabilizaciji nevezanega propidijevega jodida namreč ni potrebno odstraniti, saj meritve s fluorescentnim mikroskopom ne moti. Tako se izognemo odvečnemu pipetiranju in centrifugiranju, ki lahko dodatno mehansko poškoduje celice [Rols in Teissie, 1998].

Permeabilizacijo smo določali z invertnim fluorescentnim mikroskopom Axiovert 200 (Zeiss, Nemčija). Za meritev fluorescence propidijevega jodida smo pred elektroporacijo 100 µl celične suspenzije zmešali z 10 µl propidijevega jodida (0,1 mM, Sigma, ZDA). Takoj po elektroporaciji smo kapljico s suspenzijo celic iz prostora med elektrodami z mikropipeto prenesli v vdolbinico mikrotiterske plošče s 24 vdolbinicami in po petih minutah zajeli slike v parih, fazni kontrast in fluorescenco za isto vidno polje.

Za vzbujanje smo uporabili Xenonovo obločnico z monokromatorjem, ki prepušča le ozek (20 nm) pas svetlobe. Valovno dolžino smo nastavili na 510 nm (zelena svetloba). Dikroično zrcalo je prepuščalo svetlobo z valovnimi dolžinami nad 560 nm. Uporabili smo filter za izsevano svetlobo za Rhodamin in Phycoerythrin, BP 580/30, ki je prepuščal svetlobo v območju med 565 nm in 595 nm.

Uporabili smo objektiv z dvajsetkratno povečavo. Slike smo zajeli z digitalno IMAGO CCD kamero VISICAM 1280 (Visitron, Nemčija) z ločljivostjo 1280 x 1024 točk, analizirali pa smo jih s programom Meta Morph 5.0 (Visitron, Nemčija).

Delež permeabiliziranih celic smo določili iz razmerja med fluorescirajočimi celicami in vsemi celicami, ki smo jih prešteli na slikah, posnetih s faznim kontrastom. Kontrolno meritev, s katero smo določili delež mrtvih celic, smo izvedli enako kot ostale meritve, le da na elektrode nismo privedli električnih pulzov.

Propidijev jodid sčasoma prehaja tudi v zdrave nepermeabilizirane celice, zato je potrebno meritve opraviti v manj kot 30 minutah po elektroporaciji. S časom narašča tudi intenziteta fluorescence v permeabiliziranih celicah, zato smo slike pri vseh vzorcih zajeli v enakem časovnem obdobju, to je od 5 do 9 minut po elektroporaciji. V tem času nismo zaznali spreminjanja intenzitete.

3.1.4 Zlivanje celic

Uporabili smo protokol, ki smo ga priredili po Teissie in Rols [Teissie in Rols, 1986]. V največ dvajsetih sekundah po elektroporaciji smo suspenzijo celic prenesli v centrifugirko in v centrifugo. Celice so v fuzogenem stanju samo kratek čas po elektroporaciji, potem pa vzpostavijo intaktno stanje na membrani in do fuzije ne

more več priti. Elektroporirane celice smo centrifugirali (Sigma, ZDA) pet minut pri 50xg (525 vrtljajev na minuto) in temperaturi +4 °C.

S to hitrostjo smo zagotovili stik med celicami, celice pa ohranili nepoškodovane. Celice so po poraciji namreč bolj občutljive in ne prenesejo večje hitrosti centrifugiranja. Po centrifugiranju smo vzorce v centrifugirkah za 10 minut prenesli v inkubator (37 °C, 5 % CO_2), nato pa jih razredčili v 1,9 ml medija in jih nanesli v petrijevke (35 mm^2, TTP, Švica). Celično suspenzijo v petrijevkah smo nato približno 24 ur gojili pri 37 °C in 5 % atmosferi CO_2.

3.1.5 Detekcija zlitih celic

Celice smo pustili približno 24 ur, da so se pritrdile na podlago, hkrati pa se še niso pričele deliti. Če niso pritrjene, so okrogle in ne vidimo jeder, kar nam onemogoča ovrednotenje oziroma štetje celic. Če se celice začnejo deliti, lahko izgubimo pravilno razmerje med številom večjedrnih in enojedrnih celic zaradi morebitno različnih delitvenih časov, poleg tega so hitro pregoste za rast, zato začnejo odmirati.

Z invertnim mikroskopom CK40 (Olympus, Japonska) smo zajeli po pet slik na vzorec in prešteli celice na njih (najmanj 400 celic na vzorec). V začetnih poskusih smo zajemali slike neobdelanih celic v gojišču. Zaradi lažje detekcije smo v kasnejših poskusih celice v petrijevkah fiksirali 5 minut s 96 % metanolom (Merck, Nemčija) in jih nato pred štetjem pobarvali z barvilom Giemsa (Sigma, ZDA).

3.1.6 Določitev izplena zlivanja

Izplen zlivanja celic smo definirali kot število jeder v večjedernih celicah, deljeno s številom vseh jeder. Pri vsakem poskusu smo izvedli tudi kontrolo. Pri kontroli

smo s celicami ravnali enako kot pri vseh električnih obdelavah, le da na elektrode nismo dovedli električnih pulzov. Delež jeder v večjedrnih celicah v kontroli smo prikazali pri vsakem rezultatu na enak način kot delež jeder v večjedrnih celicah pri obdelavi z električnimi pulzi. Vse transformirane celične linije imajo namreč v svoji normalni populaciji večjedrne celice, ki niso posledica postopka zlivanja. Take celice lahko nastanejo zaradi nepravilne delitve transformiranih celic.

$$izplen = \frac{število\ jeder\ v\ večjedrnih\ celicah}{število\ vseh\ jeder} \tag{4}$$

Pri prikazu rezultatov smo upoštevali tudi preživetje celic. Število jeder v kontroli smo določili za 100% in glede na to število izračunali odstotek preživetja celic pri posameznih obdelavah. Število jeder v kontroli je lahko manjše od števila jeder pri posamezni obdelavi. S to metodo zato lahko dobimo vrednosti preživetja celic pri posameznih obdelavah, ki so večje od 100 %. Izplen, pri katerem upoštevamo preživetje celic, smo označili izplen*. Izračunali smo ga po naslednji enačbi:

$$izplen^* = izplen \cdot P[\%], \tag{5}$$

kjer je P preživetje celic v odstotkih. Pri vsaki obdelavi smo izračunali tudi povprečno število jeder na večjedrno celico. To vrednost smo poimenovali indeks polinukleacije I_P. Da bi dobili dejanski izplen zlitih celic, ki smo ga označili izplen**, smo rezultate korigirali s to vrednostjo po naslednji enačbi:

$$izplen^{**} = izplen^* \cdot 2 / I_P \tag{6}$$

Po tej enačbi namesto deleža jeder, ki so v večjedrnih celicah dobimo delež večjedrnih celic. Le-ta je manjši ali kvečjemu enak deležu jeder v večjedrnih celicah

v primeru, ko sta v vseh večjedrnih celicah po dve jedri. Delež celic računamo, ker nas pri uporabi zlitih celic ponavadi ne zanima, koliko jeder imajo.

3.1.7 Statistična obdelava rezultatov

Statistično značilno razliko med vrednostmi permeabilizacije in izplena zlitih celic pri različnih obdelavah smo ugotavljali z dvoparametersko ANOVA metodo. Razlike med obdelavami s pulzi v različnih smereh smo ugotavljali z Bonferronijevim t-testom, ki je najbolj restriktiven od obstoječih testov za primerjanje povprečij. Statistično obdelavo smo izvedli v programu Sigma Stat (SPSS Inc., ZDA).

3.2 PRIPRAVA HIBRIDOMSKIH CELIČNIH LINIJ

3.2.1 Mediji in gojenje celic

Za pripravo hibridomskih celičnih linij smo uporabili humane limfocite B iz vranice, ter mišje mielomske celice NS1 za fuzijske partnerje. Oboje smo dobili v Centru za razvoj in za proizvodnjo diagnostičnih reagentov na Zavodu RS za transfuzijsko medicino.

3.2.1.1 Gojenje mielomskih celic

Za gojenje mišjih mielomov smo uporabili Eaglov medij, modificiran po Dulbeccu, DMEM (ICN, ZDA), ki vsebuje visoko koncentracijo glukoze (4,5 g/l) ter vse potrebne soli in aminokisline. DMEM mediju smo dodali 3,7 g/l $NaHCO_3$ (Sigma, ZDA) ter 2,38 g/l HEPES-a (Sigma, ZDA). Tako pripravljen medij imenujemo nekompletni DMEM. Hranimo ga lahko dlje časa pri +4 °C.

Tik pred uporabo smo dodali mediju zarodni telečji serum (Fetal Clone I, Hyclone, ZDA) v končni koncentraciji 13%, ter L-glutamin (10 mM, Sigma, ZDA), crystacillin v obliki K soli benzilpenicilina (400 IE/ml, Pliva, Hrvaška) in streptomicin (120 IE/ml, Sigma, ZDA), da smo dobili hranljivi DMEM medij, ki ga imenujemo kompletni DMEM.

Celične linije, ki so bile shranjene v tekočem dušiku, smo odmrznili en teden pred fuzijo. Ker se te celice delijo vsakih 10 ur, smo jih na dva do tri dni dohranjevali s svežim kompletnim DMEM.

Dan pred poskusom smo celicam popolnoma odstranili porabljeni medij ter jih resuspendirali v svež medij v končni koncentraciji 2-3 x 10^5 celic/ml. S tem smo dosegli, da so bile celice v času fuzije v zgodnji logaritemski fazi rasti. Celice smo pobarvali z 0,2 % barvilom Nigrozin, nato pa prešteli na hemocitometru. Viabilnost celic pred zlivanjem je bila višja kot 95 %.

3.2.1.2 Priprava suspenzije limfoblastov

Uporabili smo humane limfocite iz vranice, ki so bili izolirani na Ficolu Histopaque – 1077 (Sigma, ZDA) in zamrznjeni v tekočem dušiku. Teden dni pred poskusom smo celice odmrznili in jih do poskusa vzdrževali v kompletnem DMEM mediju v inkubatorju pri temperaturi 37 °C v 5 % CO_2 atmosferi in 90 % vlagi. Celice smo prešteli na hemocitometru.

3.2.1.3 Gojenje heterohibridomov

Za gojenje heterohibridomov smo uporabili enako gojišče, saj serum Fetal Clone I vsebuje vse komponente, ki so potrebne za rast mišjih in človeških

heterohibridomov. Gojišču smo dodali še mešanico oksalata, piruvata in inzulina (OPI, Sigma, ZDA), ki izboljša rast hibridomov.

Za selekcijo hibridomov po fuziji potrebujemo t.i. selektivni medij. Pripravili smo ga tako, da smo 98 ml kompletnega DMEM dodali 2 ml 50 x koncentrirane raztopine hipoksantina, aminopterina in timidina (HAT, Sigma, ZDA), ki vsebuje 6,8 mg hipoksantina, 0,95 mg aminopterina ter 19,5 mg timidina v 99 ml destilirane vode.

Po približno dveh tednih gojenja hibridomskih celičnih linij v HAT kompletnem DMEM mediju smo ta medij zamenjali s HT kompletnim DMEM medijem, ki ne vsebuje aminopterina. Pripravljene medije ter različne dodatke smo sterilizirali s filtracijo preko celulozno-acetatnega filtra z velikostjo por 0,2 µm. Celice smo gojili v inkubatorju pri temperaturi 37 °C v 5 % CO_2 atmosferi in 90 % vlagi.

3.2.2 Elektroporacija

Za poskuse smo celice pripravili na enak način kot je opisano v poglavju 3.1.2 za celice B16F1 in CHOK1. V tem primeru smo pripravili suspenzijo iz dveh vrst celic. Pripravili smo suspenzijo iz mielomskih celic in limfocitov v razmerju celic 1:1 in s koncentracijo 5 x 10^6 celic/ml.

Elektroporacijo smo izvedli na enak način kot je opisano v poglavju 3.1.2. Pri prvem poskusu smo uporabili enake obdelave (kombinacije električnih parametrov), kot pri celicah B16F1 in CHOK1. Pri drugem poskusu smo uporabili eno od teh obdelav in še dve nekoliko spremenjeni obdelavi. Parametri so podani v preglednici 1.

Preglednica 1: Električni parametri, ki smo jih uporabili za pripravo hibridomov:

Table 1: Electrical parameters used for creating hibridomas:

Prvi poskus:	Drugi poskus:
800 V/cm, 6 pulzov, 100 µm	1000 V/cm, 10 pulzov, 100 µm
800 V/cm, 10 pulzov, 100 µm	1000 V/cm, 10 pulzov, 200 µm
1000 V/cm, 10 pulzov, 100 µm	1000 V/cm, 10 pulzov, 500 µm

3.2.3 Zlivanje celic

Uporabili smo enak protokol kot za celice B16F1 in CHOK1. V največ dvajsetih sekundah po elektroporaciji smo celice prenesli v centrifugo. Centrifugirali smo jih pet minut pri 50xg (525 vrtljajev na minuto) in temperaturi +4 °C. Po centrifugiranju smo vzorce v centrifugirkah za 10 minut prenesli v inkubator (37 °C, 5 % CO_2), nato pa jih razredčili v 0,9 ml medija.

Celice smo nasadili v mikrotiterske plošče s 96 luknjicami. V luknjice smo nalili po 100 µl celične suspenzije. S tem smo v vsako luknjico nasadili 5 x 10^4 celic. V luknjice, ki se nahajajo na enem robu ploščice, smo nalili samo suspenzijo mielomskih celic za kontrolo učinkovitosti selektivnih medijev. Ostalih robnih luknjic nismo uporabili zaradi večje možnosti okužbe in izhlapevanja.

3.2.4 Rast hibridnih celic ter selekcija stabilnih celičnih linij

Po zlivanju smo celice gojili v HAT selektivnem mediju, v katerem preživijo le hibridomi. Medij smo menjali po dveh do treh dneh. Po štirinajstih dnevih smo HAT medij zamenjali s HT medijem, v katerem smo celice gojili približno en teden. Kasneje smo celice gojili v kompletnem DMEM mediju.

Prve klone hibridomov smo z mikroskopiranjem našli v sedmih dneh po fuziji, približno po enem mesecu pa smo testirali prisotnost protiteles.

Po testiranjih smo celične linije prenesli v mikrotiterske plošče s 24 luknjicami. Z gojenjem hibridomov v mikrotiterskih ploščah s 24 luknjicami smo dobili dovolj celic, da smo jih prenesli v majhne stekleničke. Hibridome smo v stekleničkah namnožili do količine, ki je dovolj velika za zmrzovanje.

3.2.5 Presejalni testi

Namen vseh presejalnih testov je, da izmed nastalih hibridomov s hitro, enostavno in poceni metodo izberemo tiste, ki proizvajajo željena protitelesa. Prva testiranja izvedemo v dveh tednih po zlivanju, ko imamo na razpolago približno 100 µl supernatanta iz vsake od luknjic, ponovna testiranja (rescreening) pa z vzorci supernatantov iz večjih luknjic, v katerih imamo za testiranje na razpolago tudi do 1,5 ml supernatanta.

Testiranje na tej stopnji je še posebej pomembno, ker mnogi hibridomi izgubijo kromosome za proizvodnjo protiteles ali pa jih prerastejo celične linije hibridomov, ki izražajo kakšna druga protitelesa ali pa nobenih. Ker zadnji ne proizvajajo protiteles, lahko zelo hitro prerastejo hibridome, ki proizvajajo protitelesa.

V našem primeru smo prisotnost specifičnih protiteles določali s testi aglutinacije. Izvedli smo jih s Coombs Liss gelsko kartico (Diamed, Švica). Uporabili smo eritrocite dajalcev z ustreznimi antigeni več krvnoskupinskih sistemov (Duffy, Kell in Rh). Jakost aglutinacije v posameznih luknjicah smo po mednarodnih pravilih izražali z oznakami od enega do štirih križev.

3.2.6 Kloniranje in shranjevanje hibridomov

Pri kloniranju želimo iz luknjice, v kateri smo s presejalnimi testi odkrili željena protitelesa, izolirati celico, ki proizvaja ta specifična protitelesa. Na ta način želimo pridobiti stabilno monoklonsko celično linijo, ki jo gojimo en do dva meseca, da se prepričamo, ali je stabilna. Heterohibridomi med mišjimi mielomi in človeškimi limfociti namreč mnogokrat izgubljajo človeške kromosome za rast. V tem primeru lahko nekaj časa odlično rastejo in proizvajajo protitelesa, približno po dveh tednih pa propadejo.

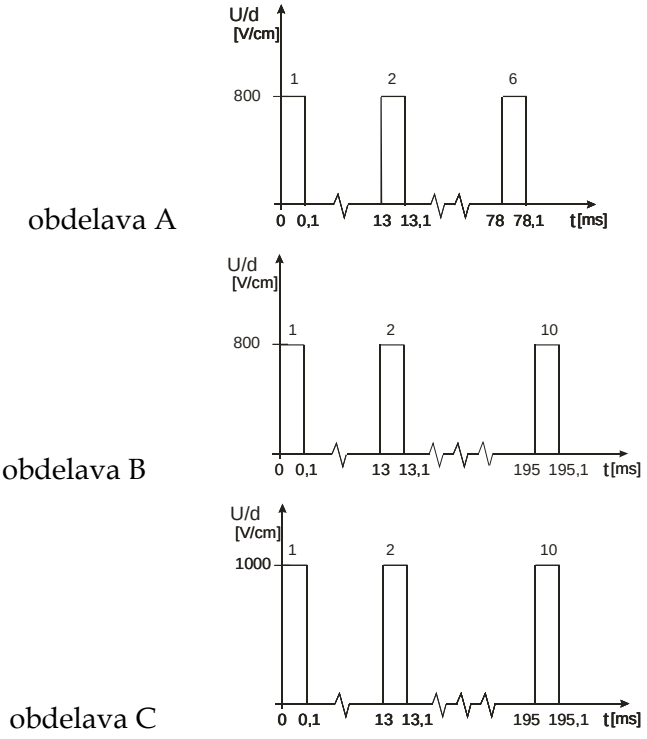
Za zamrzovanje smo celice prešteli, nato pa za pol ure postavili na led. Celice smo 5 minut centrifugirali v hlajeni centrifugi (+4 °C) pri 1200 obratih na minuto. Med tem smo pripravili medij za zamrzovanje, ki vsebuje 10 % dimetilsulfoksida (DMSO, Sigma, ZDA) in 45 % zarodnega telečjega seruma Fetal Clone I v nekompletnem DMEM. K peletu, ki je nastal pri centrifugiranju, smo dodali primeren volumen ohlajenega medija za zamrzovanje, tako da je bila končna koncentracija celic v ampulah za zamrzovanje 1 x 10^7 celic/ml. Ampule smo shranili za nekaj ur na -70 °C, v 24 – ih urah pa v tekoči dušik.

Pri odmrzovanju smo v centrifugirke odpipetirali 10 ml ohlajenega kompletnega DMEM. Celice smo na hitro odtopili v vodni kopeli na 37 °C, jih resuspendirali v manjšem volumnu pripravljenega medija iz centrifugirke in suspenzijo prenesli vanje. Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih na minuto, nato pa smo pelet resuspendirali v običajnem mediju ter celice prešteli.

4 REZULTATI

4.1 VPLIV ELEKTRIČNIH PARAMETROV

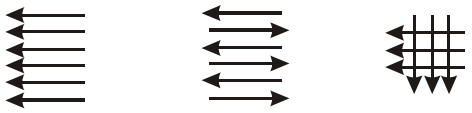
Izbrali smo tri različne obdelave (pulze z različnimi kombinacijami vrednosti električnih parametrov): število pulzov 6 ali 10 ter amplituda pulzov (oziroma razmerje med napetostjo in razdaljo med elektrodama) 800 V/cm in 1000 V/cm. Vsi pulzi so bili dolgi 100 μs, ponavljali pa so se na 13 ms (njihova ponavljalna frekvenca je bila 77 Hz). Omenjene obdelave so prikazane na sliki 7.



Slika 7: Tri različne električne obdelave: **A** - obdelava s šestimi pulzi z amplitudo 800 V/cm, **B** - obdelava z desetimi pulzi z amplitudo 800 V/cm in **C** - obdelava z desetimi pulzi z amplitudo 1000 V/cm.

Figure 7: Three different electrical treatments: **A** – treatment with six pulses with an amplitude of 800 V/cm, **B** treatment with ten pulses with an amplitude of 800 V/cm in **C** - treatment with ten pulses with an amplitude of 1000 V/cm.

Vsako kombinacijo parametrov smo izvedli s tremi različnimi kombinacijami smeri pulzov, ki so prikazane na sliki 8. Tako smo dobili devet različnih obdelav celic. Pri vseh obdelavah smo določili delež permeabiliziranih celic in izplen zlitih celic.

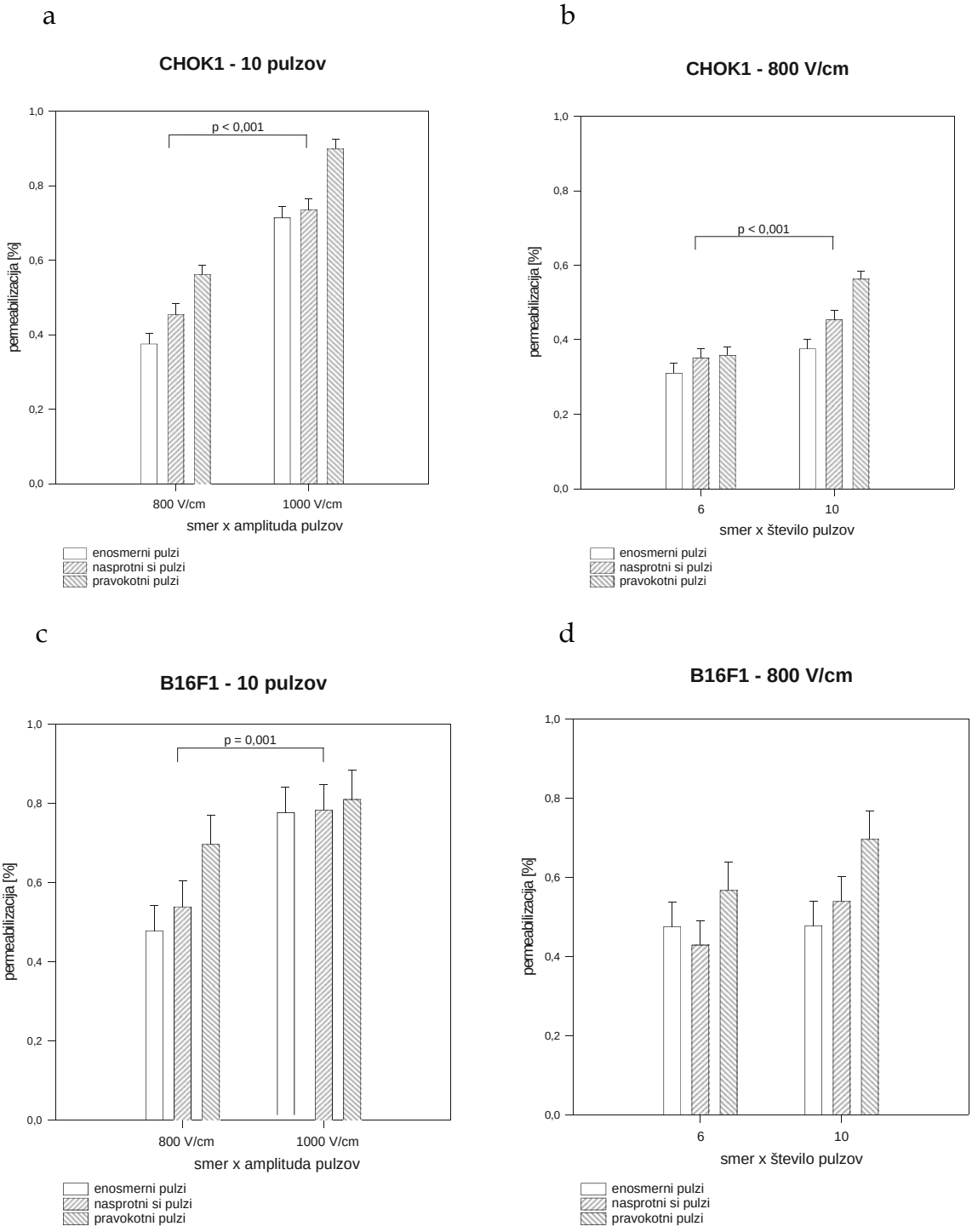


Slika 8: Tri različne kombinacije smeri pulzov (za šest pulzov).
Figure 8: Three different combinations of pulse directions (for six pulses).

4.1.1 Permeabilizacija

4.1.1.1. Intenziteta in število pulzov

Pri celicah CHOK1 je bila pri obdelavah z 800 V/cm permeabilizacija manjša kot pri obdelavah s 1000 V/cm ($p<0,001$, slika 9 a), pri obdelavah s šestimi pa manjša kot pri obdelavah z desetimi pulzi ($p<0,001$, slika 9 b). Pri celicah B16F1 je bila permeabilizacija pri obdelavah z 800 V/cm manjša kot pri obdelavah s 1000 V/cm ($p=0,001$, slika 9 c), razlike med obdelavami z različnim številom pulzov (6 ali 10) pa niso bile statistično značilne (slika 9 d).



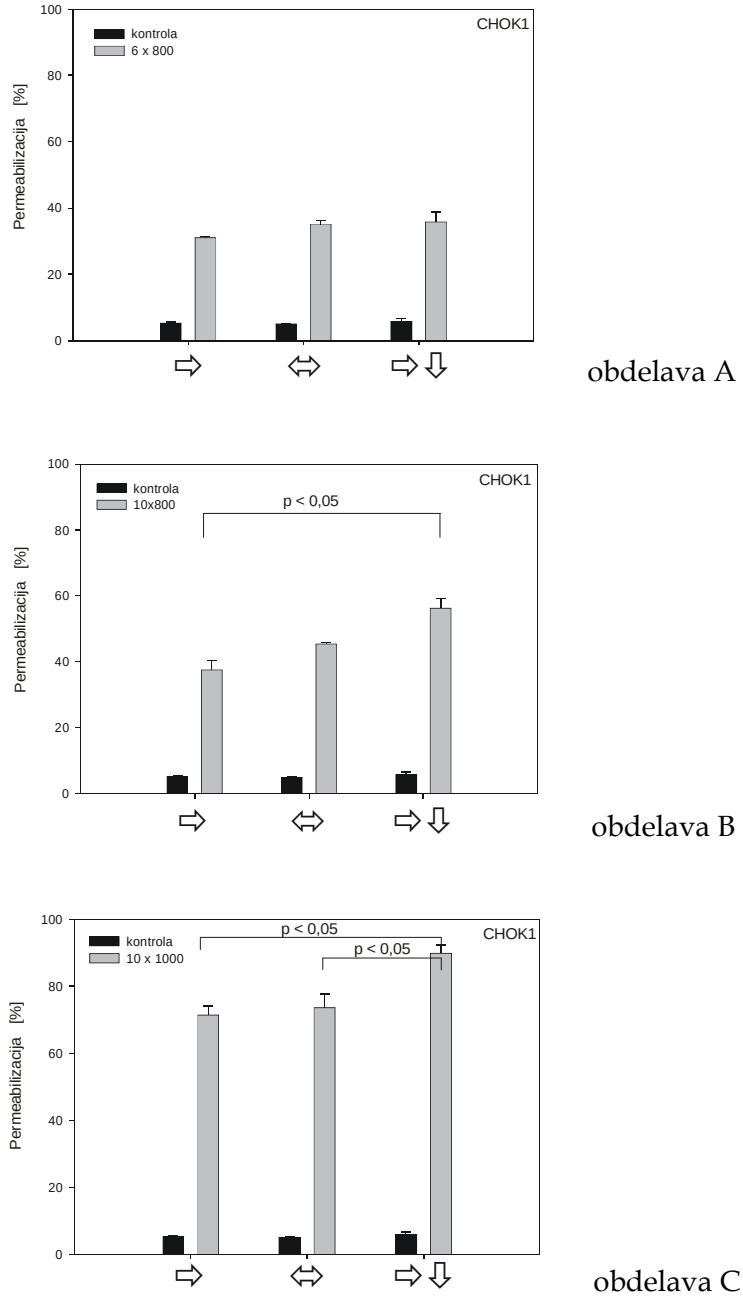
Slika 9: Permeabilizacija celic: primerjava različnih amplitud in števila električnih pulzov

Figure 9: Permeabilisation of cells: comparisson of the effect of different amplitudes and number of electric pulses.

4.1.1.2. Smer električnih pulzov

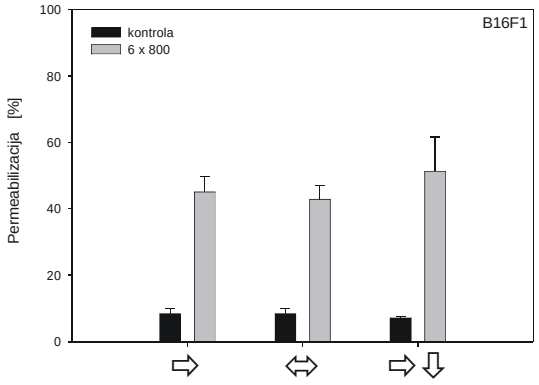
Pri celicah CHOK1 smo med obdelavami z različno usmerjenimi pulzi ugotovili razlike v vnosu propidijevega jodida. Pri obdelavah s pulzi v pravokotnih smereh (⇨⇩) smo dobili višjo permeabilizacijo kot pri obdelavah s pulzi v isti smeri (⇨), $p<0,001$, v nekaterih primerih pa tudi višjo od obdelav s pulzi, ki so si sledili v nasprotnih si smereh (⇦). Obdelave s pulzi v nasprotnih si smereh se niso statistično razlikovale od obdelav s pulzi v eni smeri (slika 10).

Pri celicah B16F1 nismo ugotovili statistično pomembnih razlik v vnosu propidijevega jodida med obdelavami z različno usmerjenimi električnimi pulzi. Rezultati so prikazani na sliki 11.

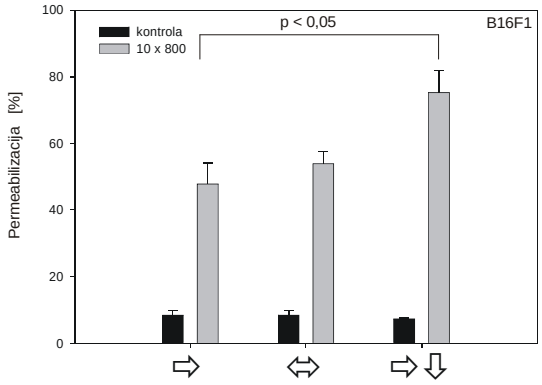


Slika 10: Permeabilizacija CHOK1 celic: **A** - obdelava s šestimi pulzi z amplitudo 800 V/cm, **B** - obdelava z desetimi pulzi z amplitudo 800 V/cm in **C** - obdelava z desetimi pulzi z amplitudo 1000 V/cm; (⇨**)** – pulzi v isti smeri, (⇔**)**– pulzi v nasprotnih si smereh in (⇨⇩**)** – pulzi v pravokotnih smereh.

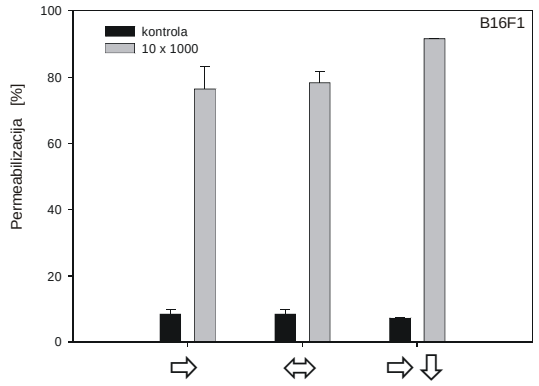
Figure 10: Permeabilization of CHOK1 cells: **A** – treatment with six pulses with an amplitude of 800 V/cm, **B** treatment with ten pulses with an amplitude of 800 V/cm in **C** - treatment with ten pulses with an amplitude of 1000 V/cm; (⇨**)** – pulses in the same direction, (⇔**)**– pulses with opposite directions and (⇨⇩**)** – pulses in two perpendicular directions.



obdelava A



obdelava B



obdelava C

Slika 11: Permeabilizacija B16F1 celic: **A** - obdelava s šestimi pulzi z amplitudo 800 V/cm, **B** - obdelava z desetimi pulzi z amplitudo 800 V/cm in **C** - obdelava z desetimi pulzi z amplitudo 1000 V/cm; (⇨**)** – pulzi v isti smeri, (⇔**)**– pulzi v nasprotnih si smereh in (⇨⇩**)** – pulzi v pravokotnih si smereh.

Figure 11: Permeabilization of B16F1 cells: **A** – treatment with six pulses with an amplitude of 800 V/cm, **B** treatment with ten pulses with an amplitude of 800 V/cm in **C** - treatment with ten pulses with an amplitude of 1000 V/cm; (⇨**)** – pulses in the same direction, (⇔**)**– pulses with opposite directions and (⇨⇩**)** – pulses in two perpendicular directions.

4.1.2 Zlivanje celic

4.1.2.1. Preživetje in povprečno število jeder v celici

Pri različnih obdelavah smo dobili različno preživetje celic, kar vpliva na dejanski izplen živih zlitih celic. Preživetje celic v posamezni obdelavi smo izračunali tako, da smo število jeder v vseh celicah v posamezni obdelavi delili s številom jeder v vseh celicah v kontroli. Preživetje se je razlikovalo pri posameznih obdelavah, vendar ni bilo nikoli manjše od 75%. Vrednosti so navedene v preglednicah 2 in 3. Preživetje celic B16F1 je bilo pri vseh pogojih boljše kot preživetje celic CHOK1.

Preglednica 2: Preživetje celic B16F1 pri poskusih zlivanja celic.
Table 2: Survival of B16F1 cells in the experiments of cell fusion.

	preživetje celic [%]		
B16F1	6 pulzov, 800 V/cm	10 pulzov, 800 V/cm	10 pulzov, 1000 V/cm
⇨	101,8	103,6	104,1
⇔	95,0	103,5	96,7
⇨⇩	91,9	92,1	86,9

Preglednica 3: Preživetje celic CHOK1 pri poskusih zlivanja celic
Table 3: Survival of CHOK1 cells in the experiments of cell fusion.

	preživetje celic [%]		
CHOK1	6 pulzov, 800 V/cm	10 pulzov, 800 V/cm	10 pulzov, 1000 V/cm
⇨	90,2	98,8	87,9
⇔	85,1	86,5	84,1
⇨⇩	82,6	80,3	77,2

Določili smo tudi povprečno število jeder na večjedrno celico pri vsaki obdelavi. To vrednost smo poimenovali indeks polinukleacije I_P. Vrednosti za I_P so navedene v preglednicah 4 in 5.

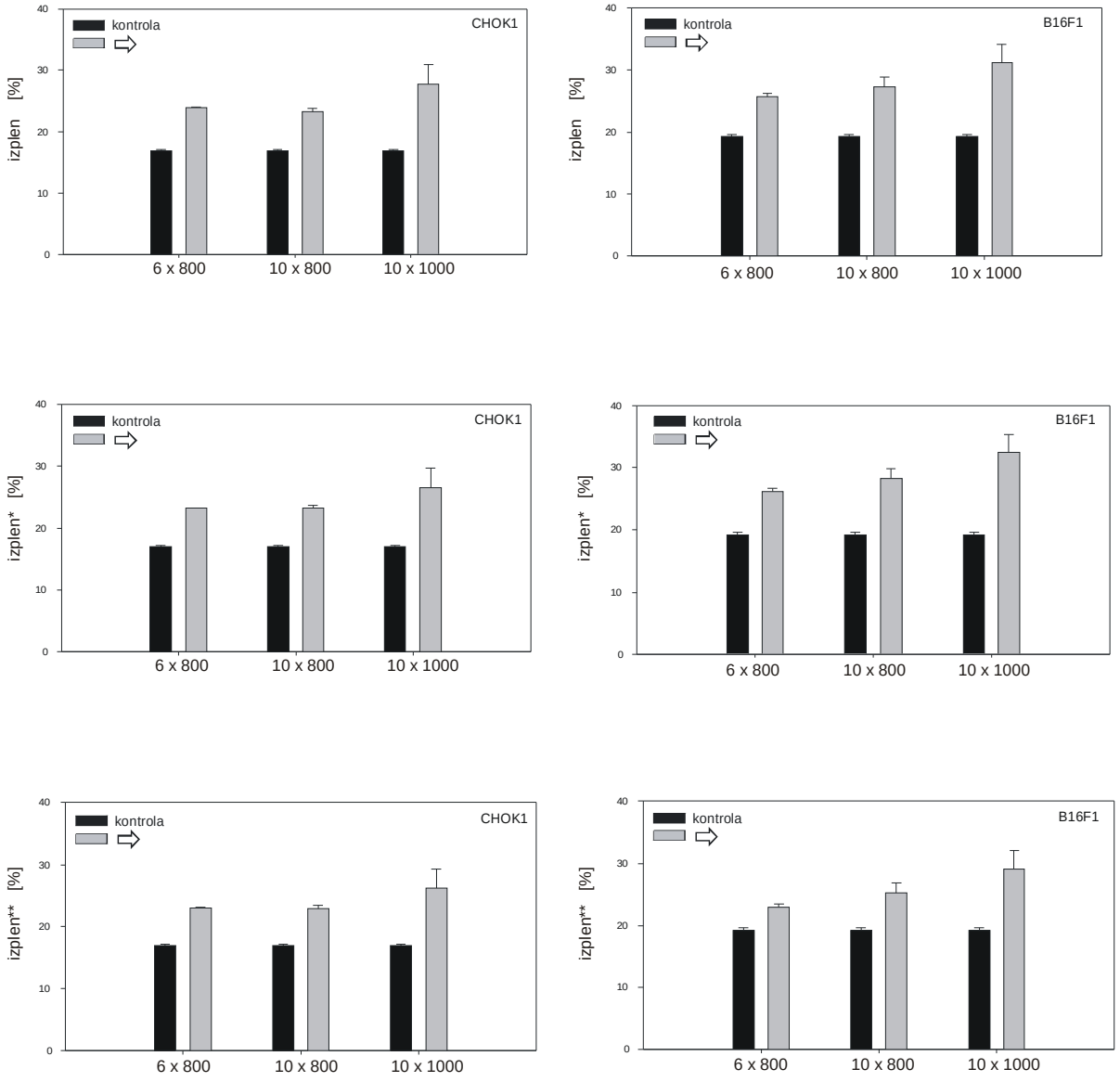
Preglednica 4: Indeks polinukleacije pri zlivanju celic B16F1.
Table 4: Polynucleation indeks for fusion of B16F1 cells.

	indeks polinukleacije [I_P]		
B16F1	6 pulzov, 800 V/cm	10 pulzov, 800 V/cm	10 pulzov, 1000 V/cm
⇨	2,28	2,23	2,23
⇔	2,28	2,24	2,20
⇨⇩	2,19	2,29	2,25

Preglednica 5: Indeks polinukleacije pri zlivanju celic CHOK1.
Table 5: Polynucleation indeks for fusion of CHOK1 cells.

	indeks polinukleacije [I_P]		
CHOK1	6 pulzov, 800 V/cm	10 pulzov, 800 V/cm	10 pulzov, 1000 V/cm
⇨	2,09	2,11	2,08
⇔	2,08	2,04	2,07
⇨⇩	2,40	2,25	2,34

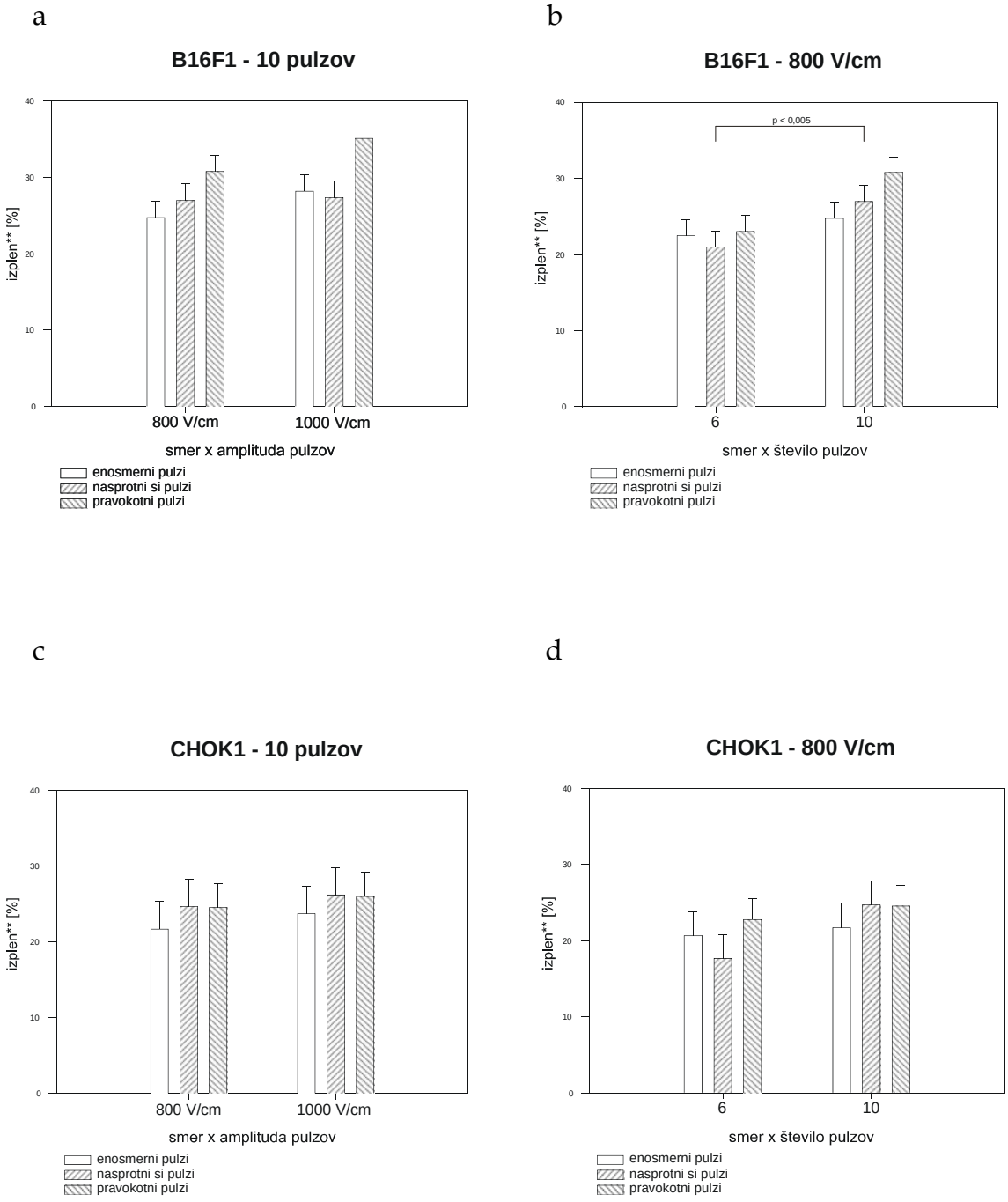
Rezultati zlivanja celic z enosmernimi pulzi so prikazani na tri načine: najprej izplen fuzije brez upoštevanja preživetja celic (izplen), nato z upoštevanjem preživetja (izplen*), nato pa še z upoštevanjem indeksa polinukleacije (izplen**). V tej zadnji možnosti primerjamo med seboj kar število večjedrnih celic. Rezultati za enosmerne električne pulze so zbrani na sliki 12.



Slika 12: Zlivanje celic CHOK1 in B16F1 s pulzi v isti smeri – od leve proti desni: obdelava A: šest pulzov z amplitudo 800 V/cm, obdelava B: deset pulzov z amplitudo 800 V/cm in obdelava C: deset pulzov z amplitudo 1000 V/cm.

Figure 12: Fusion of CHOK1 and B16F1 cells with pulses in the same direction – from the left to the right: treatment A: six pulses with an amplitude of 800 V/cm, treatment B: ten pulses with an amplitude of 800 V/cm and treatment C: ten pulses with an amplitude of 1000 V/cm

4.1.2.2. Amplituda in število električnih pulzov



Slika 13: Zlivanje celic: primerjava različnih amplitud in števil pulzov.

Figure 13: Fusion of cells: comparisson of the effect of different amplitudes and numbers of pulses.

Pri določanju izplena zlivanja B16F1 celic je bil pri obdelavah z 800 V/cm izplen manjši kot pri 1000 V/cm ($p<0,005$) in pri obdelavah s šestimi pulzi manjši od obdelav z desetimi pulzi ($p<0,005$). Ko smo upoštevali preživetje in indeks polinukleacije, je skupno ostala statistično značilna samo razlika med obdelavami z različnima številoma pulzov ($p<0,005$) (slika 13 a,b).

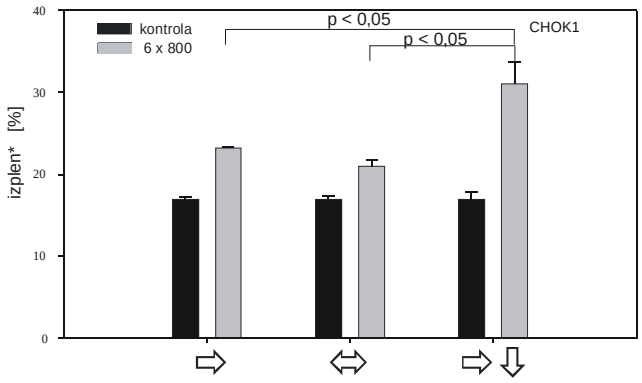
Pri določanju izplena zlivanja CHOK1 celic je bil pri obdelavah z 800 V/cm izplen manjši kot pri 1000 V/cm ($p<0,005$), razlike med obdelavami z različnima številoma pulzov pa niso bile statistično značilne. Če upoštevamo še preživetje celic ali preživetje in indeks polinukleacije, med obdelavami ne dobimo več statistično značilnih razlik (slika 13 c,d).

4.1.2.3. Smer električnih pulzov

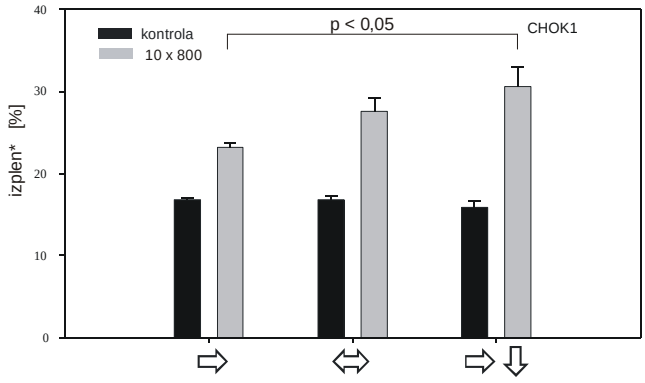
Pri določanju izplena zlivanja CHOK1 celic so se obdelave s pulzi v pravokotnih smereh razlikovale od obdelav s pulzi v eni smeri in od obdelav s pulzi v nasprotnih si smereh. Obdelave s pulzi v nasprotnih si smereh se niso statistično razlikovale od obdelav s pulzi v eni smeri.

Ko smo upoštevali preživetje (izplen* - slika 14) so ostale razlike med posameznimi obdelavami, ko smo upoštevali še indeks polinukleacije (izplen**), pa so izginile vse razlike med obdelavami z različno usmerjenimi pulzi.

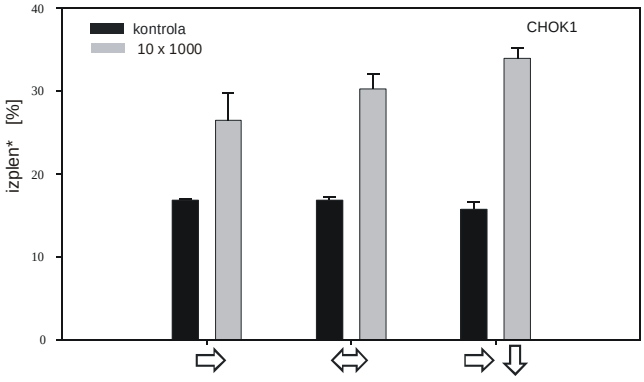
Pri celicah B16F1 so se obdelave s pulzi v pravokotnih smereh razlikovale od obdelav s pulzi v eni smeri in od obdelav s pulzi v nasprotnih si smereh. Obdelave s pulzi v nasprotnih si smereh pa se niso statistično razlikovale od obdelav s pulzi v eni smeri. Razlike med nekaterimi obdelavami z različno usmerjenimi pulzi so ostale, tudi ko smo upoštevali preživetje in indeks polinukleacije (slika 15).



obdelava A



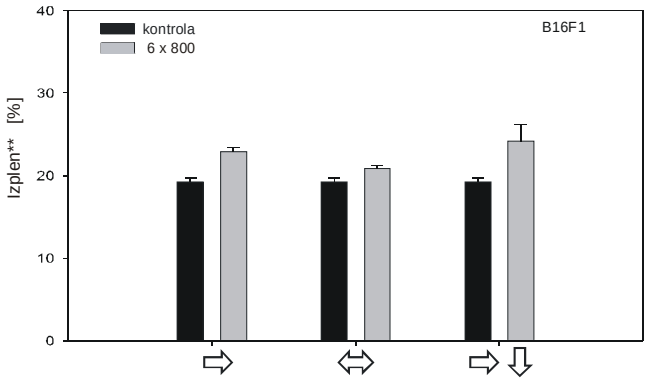
obdelava B



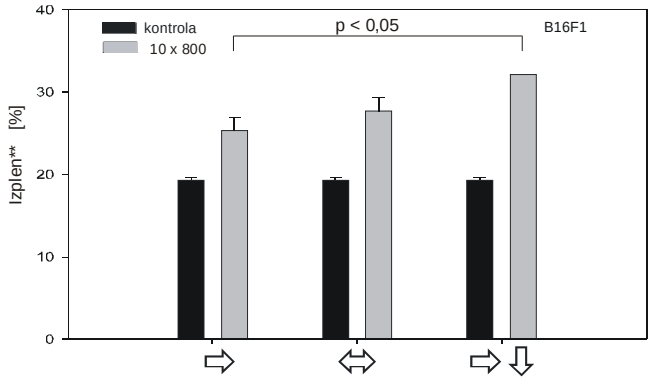
obdelava C

Slika 14: Zlivanje celic CHOK1 s pulzi v različnih smereh: **A** - obdelava s šestimi pulzi z amplitudo 800 V/cm, **B** - obdelava z desetimi pulzi z amplitudo 800 V/cm in **C** - obdelava z desetimi pulzi z amplitudo 1000 V/cm; ; (⇨**)** – pulzi v isti smeri, (⇔**)**– pulzi v nasprotnih si smereh in (⇨⇩**)** – pulzi v pravokotnih si smereh.

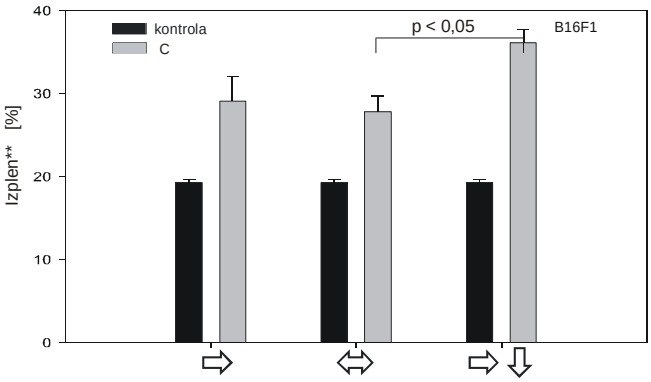
Figure 14: Fusion of CHOK1 cells with pulses in different directions: **A** – treatment with six pulses with an amplitude of 800 V/cm, **B** treatment with ten pulses with an amplitude of 800 V/cm in **C** - treatment with ten pulses with an amplitude of 1000 V/cm; (⇨**)** – pulses in the same direction, (⇔**)**– pulses with opposite directions and (⇨⇩**)** – pulses in two perpendicular directions.



obdelava A



obdelava B



obdelava C

Slika 15: Zlivanje B16F1 celic s pulzi v različnih smereh: **A** - obdelava s šestimi pulzi z intenziteto 800 V/cm, **B** - obdelava z desetimi pulzi z intenziteto 800 V/cm in **C** - obdelava z desetimi pulzi z intenziteto 1000 V/cm; (⇨**)** – pulzi v isti smeri, (⇔**)**– pulzi v nasprotnih si smereh in (⇨⇩**)** – pulzi v pravokotnih si smereh.

Figure 15: Fusion of B16F1 cells with pulses in different directions: **A** – treatment with six pulses with an amplitude of 800 V/cm, **B** treatment with ten pulses with an amplitude of 800 V/cm in **C** - treatment with ten pulses with an amplitude of 1000 V/cm; (⇨**)** – pulses in the same direction, (⇔**)**– pulses with opposite directions and (⇨⇩**)** – pulses in two perpendicular directions.

4.2 PRIPRAVA HIBRIDOMSKIH CELIČNIH LINIJ

4.2.1 Priprava stabilnih celičnih linij

Za pripravo hibridomov smo najprej uporabili enake obdelave kot pri prvem delu naloge. To so bili 100 µs trajajoči pulzi v vlaku po 6 oziroma 10 pulzov z amplitudama 800 V/cm in 1000 V/cm. Poleg tega smo uporabili še obdelavi z desetimi 200 µs in 500 µs trajajočimi pulzi in amplitudo 1000 V/cm. Za take pogoje smo se odločili, ker so limfociti manjši od mielomskih celic in zato po naših pričakovanjih za permeabilizacijo potrebujejo višjo amplitudo ali daljše pulze. Pulze smo dovedli v pravokotni smeri. V vsako luknjico smo nasadili po $5x10^4$ celic.

Preglednica 6: Rezultati poskusov zlivanja limfoblastov in mielomskih celic:
Table 6: Results of fusion of limfoblasts and myeloma cells:

	Število nasajenih luknjic	Število luknjic, v katerih so se pojavili kloni	Število viabilnih hibridomov
Obdelava - prvi poskus:			
800 V/cm, 6 pulzov, 100 µs	27	/	/
800 V/cm, 10 pulzov, 100 µs	27	/	/
1000 V/cm, 10 pulzov, 100 µs	27	7	2
Obdelava - drugi poskus:			
1000 V/cm, 10 pulzov, 100 µs	43	14	3
1000 V/cm, 10 pulzov, 200 µs	18	6	1
1000 V/cm, 10 pulzov, 500 µs	27	2	/

Izvedli smo dva poskusa. Pri prvem poskusu smo pridobili dva viabilna klona hibridomov pri obdelavi s 100 µs dolgimi pulzi (tabela 6). Tudi pri drugem poskusu je bila najuspešnejša ista obdelava, pri njej smo dobili tri viabilne klone hibridomov in enega pri 200 µs dolgih pulzih.

4.2.2 Izražanje monoklonskih protiteles

Hibridomi, ki smo jih pridobili, imajo enake lastnosti kot hibridomi, ki so bili iz istega izhodnega materiala pridobljeni z zlivanjem s polietilenglikolom (viabilnost, stabilnost, zamrzovanje).

S testi aglutinacije smo ugotavljali, če hibridomi proizvajajo protitelesa. Rezultat je primerljiv z rezultatom pri hibridomih, ki so bili iz enakih celic pridobljeni z zlivanjem s polietilenglikolom. V obeh primerih hibridomi slabo proizvajajo protitelesa.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 METODA ZLIVANJA CELIC

V našem delu smo preizkusili metodo za zlivanje celic sesalcev v pogojih *in vitro*. Metodo smo uspešno izvedli na dveh celičnih linijah. Uporabili smo pogoje, za katere menimo, da so najustreznejši za zlivanje celic sesalcev. Celice smo izpostavljali električnim pulzom v izoozmolarnem mediju, ki je vseboval dvovalentne katione in je imel relativno nizko prevodnost.

V eksperimentih smo uporabili takšno koncentracijo celic, ki je dovolj majhna, da na vse celice v suspenziji vsilimo enako transmembransko napetost, ker še ne pride do učinka senčenja [Pavlin in sod., 2003]. Uporabili smo metodo detekcije z barvanjem Giemsa, ki omogoča natančnejše ocenjevanje celic in jeder.

Vrednosti izplena zlivanja, ki smo ga dobili z našimi poskusi, so primerljive z vrednostmi, ki so jih z uporabo električnih pulzov dobili drugi raziskovalci [Ramos in sod., 2002; Teissie in Ramos, 1998; Rols in Teissie, 1989; Rols in Teissie, 1990b]. Vrednosti izplena zlivanja se pri optimalnih pogojih približujejo 50 %.

Čeprav neposredna primerjava zlivanja celic z električno metodo in zlivanja s polietilen glikolom ni bila izvedena, posamezne študije kažejo, da samo s polietilen glikolom ne moremo doseči tako visokih izplenov [Scott-Taylor in sod., 2000].

5.2 PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH ELEKTRIČNIH PARAMETROV PRI RAZLIČNIH CELIČNIH LINIJAH

Vpliv amplitude, trajanja in števila električnih pulzov na permeabilizacijo celic je že dobro poznan. Izbrali smo tiste znane parametre, pri katerih so celice že dobro permeabilizirane, visoka pa je tudi stopnja njihovega preživetja. Pri teh pogojih smo torej pričakovali in tudi dobili relativno velik delež živih permeabiliziranih in zato tudi zlitih celic.

5.2.1 Preživetje celic in indeks polinukleacije

V naših poskusih so se CHOK1 celice izkazale za občutljivejše, saj je stopnja njihovega preživetja pri vseh uporabljenih pogojih približno 10% nižja kot pri celicah B16F1. Stopnja preživetja celic CHOK1 pri zlivanju se ujema z vrednostmi, ki jih navajajo drugi raziskovalci [Teissie in Ramos, 1998, Ramos in sod., 2002], medtem ko za celice B16F1 podatkov v literaturi nismo našli.

Celični liniji sta se razlikovali tudi v povprečnem številu jeder na večjedrno celico. Ta vrednost (indeks polinukleacije, prikazan kot povprečna vrednost ± standardna napaka) je bila pri celicah B16F1 približno enaka za vse obdelave (2,24 ± 0,04), medtem ko je pri celicah CHOK1 ta vrednost za obdelave s pravokotnimi pulzi ⇧⇨ (2,33 ± 0,08) večja kot pri ostalih dveh smereh (2,08 ± 0,02).

5.2.2 Amplituda in število pulzov

- Pri določanju permeabilizacije za celice CHOK1 smo dobili večjo permeabilizacijo pri obdelavah z višjo amplitudo in z večjim številom pulzov (slika 9).

- Pri določanju izplena zlivanja celic CHOK1 smo dobili večji izplen pri obdelavah z večjo amplitudo, ne pa tudi z večjim številom pulzov. Če upoštevamo še preživetje celic ali preživetje in indeks polinukleacije, med obdelavami razlike niso več statistično značilne. Še vedno pa se vidi trend naraščanja izplena z večanjem amplitude in števila pulzov (slika 13).
- Pri določanju permeabilizacije za celice B16F1 smo dobili večjo permeabilizacijo pri obdelavah z višjo amplitudo, ne pa tudi z večjim številom pulzov (slika 9).
- Pri določanju izplena zlivanja celic B16F1 smo dobili večji izplen tako pri obdelavah z večjo amplitudo kot tudi z večjim številom pulzov. Ko smo upoštevali preživetje in indeks polinukleacije, je še vedno ostala razlika med obdelavami z različnima številoma pulzov (slika 13).

Teissie in Ramos [Teissie in Ramos, 1998] sta v svoji študiji korelacije med permeabilizacijo in zlivanjem WTT klona celic CHO (ki raste v suspenziji) ugotovila naraščanje permeabilizacije z intenziteto do 1400 V/cm (10 pulzov, 100 μs) in s številom do 10 pulzov, kjer sta dosegla nasičenje. Pri zlivanju sta pri enakih pogojih dosegla nasičenje že pri 1000 V/cm oziroma petih pulzih ob upoštevanju preživetja celic. Ti rezultati se ujemajo z našimi rezultati za celice CHOK1, medtem ko se celice B16F1 obnašajo drugače.

5.2.3 Smer električnega polja

- Pri celicah CHOK1 smo med obdelavami z različno usmerjenimi pulzi ugotovili razlike v permeabilizaciji. Obdelave s pulzi v pravokotnih smereh (⇨⇩) so dale večji izplen od obdelav s pulzi v eni smeri (⇨) in od obdelav s pulzi v nasprotnih si smereh (⇦). Le-te pa se niso statistično razlikovale od obdelav s pulzi v eni smeri (slika 10).

- Pri določanju izplena zlivanja celic CHOK1 so obdelave s pulzi v pravokotnih smereh (⇨⇩) dale večji izplen od obdelav s pulzi v eni smeri (⇨) in od obdelav s pulzi v nasprotnih si smereh (⇦). Razlike pa so izginile, ko smo upoštevali preživetje in indeks polinukleacije. Obdelave s pulzi v nasprotnih si smereh (⇦) se niso statistično razlikovale od obdelav s pulzi v eni smeri (⇨) (slika 14).
- Pri določanju permeabilizacije za celice B16F1 nismo dobili statistično značilnih razlik med obdelavami s pulzi v različnih smereh (slika 11).
- Pri določanju izplena zlivanja celic B16F1 so obdelave s pulzi v pravokotnih smereh (⇨⇩) dale večji izplen od obdelav s pulzi v eni smeri (⇨) in od obdelav s pulzi v nasprotnih si smereh (⇦). Razlike so ostale, tudi ko smo upoštevali preživetje in indeks polinukleacije. Obdelave s pulzi v nasprotnih si smereh (⇦) se niso statistično razlikovale od obdelav s pulzi v eni smeri (⇨) (slika 15).

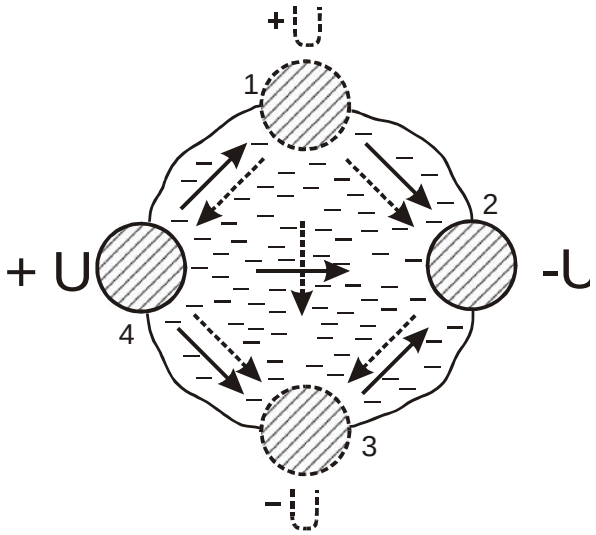
Kotnik in sodelavci [Kotnik in sod., 2001b] so pokazali, da je razlika v površini permeabilizirane membrane med obdelavami z enosmernimi pulzi (⇨) in tistimi s pulzi v nasprotnih si smereh (⇦) največja pri intenzitetah, ki so tik nad kritično vrednostjo. Ko povečujemo amplitudo pulzov, pa se ta učinek zmanjša za več kot polovico.

V naših poskusih smo uporabili pogoje, ki so blizu optimalnim za permeabilizacijo oziroma zlivanje membran. Pri teh pogojih je bil učinek spremembe smeri pulzov v nasprotno smer (za 180°) praktično zanemarljiv. Sklepamo lahko, da sta površini permeabiliziranih »kapic« membrane na obeh polih celice (pri kotu $\theta = 0°$ in 180°) veliki že pri uporabi pulzov v isti smeri.

Večjo razliko smo pričakovali med rezultati pri teh dveh orientacijah in rezultati, ki jih dobimo pri uporabi pulzov, ki so pravokotni drug na drugega, saj s pulzi v

pravokotni smeri permeabiliziramo tudi membrano na nasprotni kapici pri kotu $\theta = 90°$ in delno pri kotu $\theta = 270°$, ki jih pri prvih dveh orientacijah nikakor ne moremo permeabilizirati (oziroma jih lahko permeabiliziramo samo pri pogojih, kjer je preživetje celic že zelo slabo).

Razlog za majhne razlike med obdelavami s pravokotnimi pulzi in ostalimi pa je lahko tudi v porazdelitvi električnega polja v območju med elektrodami, kjer se je nahajala celična suspenzija (slika 16).



Slika 16: Prikazan je tloris elektrod in kapljice celične suspenzije med njimi. Dva zaporedna pulza pri obdelavi s pravokotnimi pulzi dovedemo med elektrodi 1 in 3 ter 2 in 4, torej v pravokotni smeri drug na drugega. Električno polje, ki ga povzročita v prostoru med elektrodami, sta prikazani s polnimi in črtkanimi puščicami.

Figure 16: Schematic of electrodes and the drop of cell suspension between them. At treatmnet with pulses in perpendicular directions two paralel pulses are applied between electrodes 1 and 3 and 2 and 4. Resulting electric fields ared depicted with full and dashed arrows.

Samo tiste celice, ki so se nahajale v osrednjem delu prostora, so bile pri obdelavi s pravokotnimi pulzi deležne polja v pravokotnih smereh. Ostale, ki so se nahajale v zunanji lupini kapljice celične suspenzije, pa so bile pri tem deležne polja v isti smeri ali v nasprotnih si smereh.

5.3 PRIPRAVA HIBRIDOMSKIH CELIČNIH LINIJ

5.3.1 Priprava stabilnih celičnih linij

Z uporabo električne metode zlivanja nam je uspelo pripraviti stabilne heterohibridome, ki smo jih uspešno zamrznili. Izplen naše metode je primerljiv z izplenom metode s polietilenglikolom, s katero so v Centru za razvoj in za proizvodnjo diagnostičnih reagentov pridobivali hibridome med enakimi celicami pred našimi poskusi.

Za zlivanje celic, iz katerih smo želeli pripraviti hibridome, smo v glavnem uporabili enake vrednosti električnih parametrov kot v prvem delu pričujoče naloge. To je sicer koristno za morebitno primerjavo obeh poskusov, vendar pa ni nujno optimalno za nastanek hibridomov. Limfoblasti (po naših meritvah je njihov premer v našem mediju približno 7 μm) so približno za polovico manjši od mielomskih celic NS1. Iz teorije elektroporacije vemo, da so večje celice bolj občutljive na električno polje kot manjše celice (enačba 1). Za permeabilizacijo limfoblastov bi torej potrebovali večjo amplitudo ali večje število pulzov kot za permeabilizacijo mielomskih NS1 celic. To potrjujejo tudi nekatere meritve [Sixou in Teissie, 1990].

Kwee in sodelavci so primerjali vpliv električnih pulzov na transformirane humane amnionske (AMA) celice in primarne amnionske celice [Kwee in sod., 1992]. Ugotovili so, da so primarne celice bolj občutljive kot transformirane. Pri nižjih amplitudah električnega polja so dosegli opazno večjo permeabilizacijo (višje vnose Tripan modrega barvila). Pri pogojih, ki pri transformiranih celicah še niso povzročili nobenih trajnih sprememb, so opazili močne ireverzibilne celične poškodbe in lizo celic.

V naših poskusih smo opazili da so bile mielomske celice po obdelavi z električnimi pulzi v zelo slabem stanju. Celice so bile nazobčane in so se zelo počasi vračale v okroglo obliko. Poleg tega smo uspeli pridobiti hibridome le pri obdelavah z daljšimi pulzi in večjim številom pulzov.

Slabo stanje mielomskih celic (večje celice) po našem mnenju kaže na to, da so te celice električni pulzi že močno poškodovali. Iz dejstva, da viabilne hibridome kljub temu dobimo samo pri nekaterih obdelavah z daljšimi pulzi oz. več pulzi in z višjo intenziteto pa sklepamo, da šele pri teh pogojih tudi limfoblaste (manjše celice) spravimo v stanje, v katerem so dovzetni za zlivanje. V našem nadaljnjem delu bo zato potrebno določiti optimalne pogoje za permeabilizacijo vsake od obeh vrst celic posebej.

Predvidevamo, da se optimalni pogoji za permeabilizacijo obeh vrst celic razlikujejo med seboj. V tem primeru bo potrebno razviti metodo, ki bo omogočala istočasno ločeno obdelavo obeh vrst celic z električnimi pulzi. Ta izvedba je tehnično zahtevnejša zaradi časovne omejitve, ki jo predstavlja čas po izpostavitvi električnim pulzom, v katerem so celice še dovzetne za zlivanje.

5.3.2 Proizvodnja monoklonskih protiteles

Hibridomi, ki smo jih pridobili z električno metodo, imajo enake lastnosti kot hibridomi, ki so bili iz istega izhodnega materiala pridobljeni z zlivanjem s polietilenglikolom (viabilnost, stabilnost, zamrzovanje).

Izražanje protiteles je bilo v obeh primerih bolj slabo. To je posledica lastnosti limfocitov, s katerimi smo izvajali eksperimente, saj le-ti očitno niso bili dovolj močno stimulirani, da bi proizvajali protitelesa v velikih količinah. Te limfocite

smo uporabili zato, ker so bile tedaj edine, s katerimi so že prej izvajali zlivanje s polietilenglikolom in smo le tako lahko primerjali rezultate.

Primerne humane imunokompetentne celice (limfociti B, ki proizvajajo protitelesa pri ljudeh) je težko dobiti, saj je ljudi neetično imunizirati za pridobivanje imunskih celic v terapevtske ali raziskovalne namene. Tako nam ostanejo le imunske celice ljudi, ki so se imunizirali naključno (npr. ob boleznih ali mati pred in pri porodu), ali ljudi, ki so bili pred kratkim cepljeni. Poleg tega moramo poznati dober testni (screening) sistem, s katerimi protitelesa lahko detektiramo. Za izboljšanje lastnosti protiteles lahko uporabimo tudi t.i. imunizacijo *in vitro*.

V prihodnosti želimo za raziskovanje vpliva različnih električnih parametrov na zlivanje ter optimiranje pogojev za čim boljši izplen uporabiti sistem, v katerem bomo imeli dostopne limfocite v zadostnih količinah ter dober, enostaven, hiter in poceni testni sistem za določanje protiteles pri presejalnem testiranju.

5.4 SKLEPI

Na dveh celičnih linijah smo preizkusili preprosto in učinkovito metodo zlivanja celic sesalcev z električnimi pulzi v pogojih *in vitro*.

Preverili smo izplen zlivanja celic pri obdelavah z različnimi vrednostmi električnih parametrov in ugotovili razlike med posameznimi obdelavami. Spreminjanje smeri električnega polja poveča izplen zlivanja in stopnjo permeabilizacije. Uporaba pulzov dovedenih v pravokotnih smereh je boljša kot uporaba pulzov dovedenih v isti smeri.

Metodo zlivanja celic z električnimi pulzi smo uspešno uporabili v postopku zlivanja mišjih mielomskih celic in humanih limfocitov namesto zlivanja s

polietilenglikolom. Pridobili smo žive mišje in humane heterohibridome. Število pridobljenih hibridomov je primerljivo s številom hibridomov, ki so jih pred nami pridobili z zlivanjem enakih celic s polietilenglikolom.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Elektrofuzija oziroma zlivanje celic z električnimi pulzi je pojav, pri katerem se celice, ki so med seboj v tesnem stiku, zaradi prisotnosti kratkotrajnih visokonapetostnih električnih pulzov zlijejo med seboj. Če celice niso v tesnem stiku, električni pulzi povzročijo samo permeabilizacijo celic, to je začasno neselektivno povečanje prepustnosti membrane. Preizkusili smo metodo zlivanja celic z električnimi pulzi na dveh pritrjenih celičnih linijah v pogojih *in vitro*. Primerjali smo celice mišjega melanoma B16F1 in ovarijske celice kitajske hrčice CHOK1.

Za zlivanje celic smo uporabili protokol, kjer smo celice spravili v stik po elektroporaciji s centrifugiranjem. Stopnjo permeabilizacije celic smo določali mikroskopsko s fluorescenco vnesenega propidijevega jodida, zlivanje celic smo določali mikroskopsko, pri čemer smo si pomagali z barvanjem Giemsa.

Na permeabilizacijo in zlivanje celic vplivajo različne lastnosti električnega polja. V pričujočem delu smo proučevali vpliv amplitude in števila pulzov ter smeri električnega polja na zlivanje in na permeabilizacijo celic. Najboljši rezultat smo dosegli pri obdelavi z vlakom desetih 100 μs dolgih pulzov z amplitudo 1000 V/cm, ki smo jih dovedli v pravokotnih smereh. Obdelave s pulzi v pravokotnih smereh so bile v vseh primerih uspešnejše kot obdelave s pulzi v isti smeri.

Zlivanje celic je metoda, ki jo lahko koristno uporabimo v biotehnologiji in biomedicini. V našem delu smo uporabili proučevano metodo zlivanja celic z električnimi pulzi za pridobivanje heterohibridomov iz mišjih mielomskih celic NS1 in človeških limfocitov z modificirano Koehler Milsteinovo hibridomno

tehnologijo. Rezultate naše metode smo primerjali s tistimi, ki so jih pred nami pridobili z zlivanjem enakih celic s polietilenglikolom. Število pridobljenih živih hibridomov je primerljivo.

6.2 SUMMARY

Cell electrofusion is a phenomenon that occurs, when cells that are in close contact are fused by means of short, high-voltage electric pulses. When cells are not in close contact, the consequence of the pulses is transient and nonselective increase of permeabilization of cell membranes without fusion. The purpose of this thesis was to use the method of electrofusion on two adherent cell lines. We compared mouse melanoma cells B16F1 and chinese hamster ovary cells CHOK1.

For cell fusion we used pulse first protocol. That means that we made contact between cells after electroporation by centrifugation. Permeabilization of cells was determined microscopicly by fluorescence of propidium iodide. Cell fusion was detected microscopicly with coloration by Giemsa.

Electropermeabilization and electrofusion are dependent on the choice of electric field parameters. In this work we studied the influence of amplitude and number of electric pulses and direction of electric field on the degree of permeabilization and fusion yield. The best result was achieved at treatment with the train of 10 pulses, with the length of 100 μs and an amplitude of 1000 V/cm applied in perpendicular directions. Treatments with pulses applied in perpendicular directions were allways more succesful than treatments with pulses applied in one direction.

Fusion of cells can be useful in biotehnology and biomedicine. In present work electrofusion was used to produce hibridomas from mouse mieloma cells NS1 and

human limfocytes with modified Koehler Milstein hibridoma technology. We obtained viabile human – mouse heterohybridoma in amounts that are comparable to those previously obtained by fusing the same cells with the use of polyethylene glycol.

7 VIRI

Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., Fike J.R., Lee H.O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S.J., Alvarez-Buylla A. 2003. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. Nature, 425:968-973.

Bailey A., Zhukovsky M., Gliozzi A., Chernomordik L.V. 2005. Liposome composition effects on lipid mixing between cells expressing influenza virus hemagglutinin and bound liposomes. Biochemistry and Biophysics, .

Barski G., Sorieul S. in Cornefert F. 1961. Hybrid type cells in combined cultures of two different mammalian cell strains. Journal of National Cancer Institute 26:1269-1291.

Cao Y., Christian S., Suresh M.R. 1998. Development of a bispecific monoclonal antibody as a universal immunoprobe for detecting biotinylated macromolecules. Journal of Immunological Methods, 220:85-91.

Cao Y., Vinayagamoorthy T., Noujaim A.A. in Suresh M.R. 1995. A rapid non-selective method to generate quadromas by microelectrofusion. Journal of Immunological Methods, 187:1-7.

Čurin Šerbec V. 2001. Antibodies capable to selectively detect prion Prp Sc isoforms : patent. 28.11.2001. München: European patent office, 2001.

Deuticke B., Schwister K. 1989. Theory of electroporation. V: Electroporation and electrofusion in cell biology. Neumann E., Sowers A.E., Jordan C.A. (ur.). New York, Plenum Press: 127-148.

Elder P.A., Gaynor P.T., Lewis J.G., Bodger P.S., Bason L.M. 1997. Generation of monoclonal progesterone antibodies by electrofusion techniques. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 43:35-40.

Epand R.M. 1998. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. Biochimica et Biophysica Acta, 1376:353-368.

Epand R.M. 2003. Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. Biochimica et Biophysica Acta, 1614:116-121.

Faurie C., Phez E., Golzio M., Vossen C., Lesbordes J.-C., Delteil C., Teissie J., Rols M.P. 2004. Effect of electric field vectoriality on electrically mediated gene delivery in mammalian cells. Biochimica et Biophysica Acta, 1665:92-100.

Gabriel B., Teissie J. 1998. Mammalian cell electropermeabilization as revealed by millisecond imaging of fluorescence changes of ethidium bromide in interaction with the membrane. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 47:113-118.

Gabrijel M., Repnik U., Kreft M., Grilc S., Jeras M., Zorec R. 2004. Quantification of cell hybridoma yields with confocal microscopy and flow cytometry. Biochemical and Biophysical Research Communications, 314:717-723.

Galfre G., Milstein S.C., Butcher G.W, Howard J.C. 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cells. Nature, 266:550-552.

Glennie M.J., Johnson P.W.M. 2000. Clinical trials of antibody therapy. Immunology Today, 21:403-410.

Heller R., Grasso R.J. 1990. Transfer of human membrane surface components by incorporating human cells into intact animal tissue by cell-tissue electrofusion in vivo. Biochimica et Biophysica Acta, 1024:185-188.

Jaroszeski M.J., Gilbert R., Heller R. 1994. Detection and quantitation of cell-cell electrofusion products by flow cytometry. Analytical Biochemistry, 216:271-275.

Jessup C.-F., Baxendale H., Goldblatt D., Zola H. 2000. Preparation of human-mouse heterohybridomas against an immunising antigen. Journal of Immunological Methods, 246:187-202.

Kandušer M., Faurie C., Reberšek M., Čorović S., Teissie J., Rols M.-P., Miklavčič D. 2005. Changing the electric field orientation during the pulse application in gene electrotransfer improves GFP expression in CHO cells. V: XVIIIth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society, and 3rd Spring Meeting Bioelectrochemistry of the International Society ofElectrochemistry, Coimbra, Portugal, June 19-24, 2005. Bioelectrochemistry-2005: scientific programme and book of abstracts. Coimbra: Redhorse - Industria Grafica: P-203

Kinosita K., Ashikawa I., Saita N., Yoshimura H., Itoh H., Hagayma K., Ikegam A. 1988. Electroporation of cell membrane visualised under a pulsed-laser fluorescence microscop. Biophysical Journal, 53:1015-1019.

Kinosita K., Tsong T.Y. 1977. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. Nature, 268:438-441.

Koehler G., Milstein C. 1975. Continues culture of fused cells secreting antibody of predefined spscifity. Nature, 256:495-497.

Kotnik T. 2000. Influence de la dynamique du champ électrique sur l'efficacité de l'électroperméabilisation de la membrane cellulaire. These. Paris: Université Paris XI, Faculté de Médecine Paris-Sud: 161 str.

Kotnik T., Miklavčič D., Mir L.M. 2001a. Cell membrane electropermeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses Part II, Reduced electrolytic contamination. Bioelectrochemistry, 54:91-95.

Kotnik T., Mir L.M., Flisar K., Puc M., Miklavčič D. 2001b. Cell membrane electropermeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses Part I, Increased efficiency of permeabilization. Bioelectrochemistry, 54:83-90.

Kufer P., Lutterbuese R., Baeuerle P.A. 2004. A revival of bispecific antibodies. Trends in Biotechnology, 22:238-244.

Kwee S., Gesser B., Celis J.E. 1992. Electroporation of human cultured cells grown in monolayers Part 3. Transformed cells and primary cells. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 28:269-278.

Lindau M., Almers W. 1995. Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. Curent Opinion in Cell Biology, 7:509-517.

Lindner M., Schirrmacher V. 2002. Tumour cell-dendritic cell fusion for cancer immunotherapy: comparison of therapeutic efficiency of polyethylen-glycol versus electro-fusion protocols. European Journal of Clinical Investigation, 32:207-217.

Lo M.M.S., Tsong T.Y., Conrad M.K., Strittmatter S.M., Hester L.D., Snyder S.H. 1984. Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion. Nature, 310: 792-794.

Lopez J.A., Bioley G., Turtle C.J., Pinzon-Charry A., Ho C.S.K., Vuckovic S., Crosbie G., Jackson D.C., Gilleece M., Munster D., Hart D.N.J. 2003. Single step enrichment of blood dendritic cells by positive immunoselection. Journal of Immunological Methods, 274:47-61.

Maček Lebar A. 1999. Vpliv električnih parametrov na elektroporacijo plazmaleme v in vitro pogojih. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko: 95 str.

Maček Lebar A., Miklavčič D. 2001. Cell electropermeabilization to small molecules in vitro: control by pulse parameters. Radiology and Oncology, 35:193-202.

Melikyan G.B., Chernomordik L.V. 1997. Membrane rearrangements in fusion mediated by viral proteins. Trends in Microbiology, 5:349-355.

Miklavčič D. 2001. Electrodes and corresponding electric field distribution for effective in vivo electroporation. Proceedings of the Workshop on Electroporative Assisted Drug Delivery: Electrochemotherapy and

Genetherapy/MEDICON 2001 - Mediterranean conference on medical and biological engineering and computing, Pula, Croatia, June 11, 2001. Kotnik T. in Miklavčič D. (eds.). Ljubljana, Fakulteta za elektrotehniko: 5-9.

Neumann E. 1992. Membrane electroporation and direct gene transfer. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 28:247-267.

Nieva J.L., Agirre A. 2003. Are fusion peptides a good model to study viral cell fusion? Biochimica et Biophysica Acta, 1614:104-115.

Ohno-Shosaku T., Okada Y. 1985. Electric pulse-induced fusion of mouse lymphoma cells: roles of divalent cations and membrane lipid domains. Journal of Membrane Biology, 85:269-280.

Parris G.E. 2004. The role of viruses in cell fusion and its importance to evolution, invasion and metastasis of cancer clones. Medical Hypotheses, 64:1011-1014.

Pavlin M., Miklavčič D. 2003. Effective conductivity of a suspension of permeabilized cells: a theoretical analysis. Biophysical Journal, 85: 719-729.

Pavlin M., Pavšelj N., Miklavčič D. 2002. Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 49:605-612.

Peisajovich S.P., Shai Y. 2003. Viral fusion proteins: multiple regions contribute to membrane fusion. Biochimica et Biophysica Acta, 1614:122-129.

Puc M., Čorović S., Flisar K., Petkovšek M., Nastran J., Miklavčič D. 2004. Techniques of signal generation required for electropermeabilization. Survey of electropermeabilization devices. Electrobiochemistry, 64:113-124.

Pucihar G., Kotnik T., Kandušer M., Miklavčič D. 2001. The influence of medium conductivity on electropermeabilization and survival of cells in vitro. Bioelectrochemistry, 54:107-115.

Pucihar G., Mir L.M., Miklavčič D. 2002. The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electropermeabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy. Bioelectrochemistry, 57:167-172.

Ramos C., Bonenfant D., Teissie J. 2002. Cell hybridization by electrofusion on filters. Analytical Biochemistry, 302:213-219.

Ramos C., Teissie J. 2000. Electrofusion: A biophysical modification of cell membrane and a mechanism in exocytosis. Biochimie, 82: 511-518.

Reberšek M. 2001. Elektroporacija z moduliranimi visokonapetostnimi električnimi pulzi : delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom Damijana Miklavčiča. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko: 96 str.

Ritter M.A., Ladyman H.M. 1995. Monoclonal antibodies. Production, engineering and clinical application. Cambridge, University Press: 480 str.

Rodić N., Rutenberg M.S., Terada N. 2004. Cell fusion and reprogramming: resolving our transdifferences. Trends in Molecular Medicine, 10:93-96.

Rols M.-P., Teissie J. 1990a. Electropermeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. Biophysical Journal, 58:1089-1098.

Rols M.-P., Teissie J. 1990b. Modulation of electrically induced permeabilization and fusion of chinese hamster ovary cells by osmotic pressure. Biochemistry, 29:4561-4567.

Rols M.-P., Teissie J. 1998. Electropermeabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. Biophysical Journal, 75:1415-1423.

Rols M.-R., Teissie J. 1989. Ionic-strength modulation of electrically induced permeabilization and associated fusion of mammalian cells. Europian Journal of Biochemistry, 179:109-115.

Schirrmacher V., Feuerer M., Fournier P., Ahlert T., Umansky V., Beckhove P. 2003. T-cell priming in bone marrow: the potential for long-lasting protective anti-tumor immunity. Trends in Molecular Medicine, 9:526-534.

Scott-Taylor T.H., Pettengell R., Clarke I., Stuhler G., La Barthe M.C., Walden P., Dalgleish A.G. 2000. Human tumor and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines. Biochimica et Biophysica Acta, 1500:265-279.

Sixou S., Teissie J. 1990. Specific electropermeabilization of leucocytes in a blood sample and application to large volumes of cells. Biochimica et Biophysica Acta, 1028:154-160.

Sowers A.E. 1986. A long-lived fusogenic state is induced in erythrocyte ghosts by electric pulses. The Journal of Cell Biology, 102:1358-1362.

Teissie J., Ramos C. 1998. Correlation between electric field pulse induced long-lived permeabilization and fusogenicity in cell membranes. Biophysical Journal, 74:1889-1898.

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

Teissie J., Knutson V.P., Tsong T.Y., Lane M.D. 1982. Electric pulse-induced fusion of 3T3 cells in monolayer culture. Science, 216:537-538.

Teissie J., Rols M.-P. 1986. Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electropermeabilization. Biochemical and Biophysical Research Communications, 140:258-266.

Valič B., Golzio M., Pavlin M., Schatz A., Faurie C., Gabriel B., Teissie J., Rols M.-P., Miklavčič D. 2003. Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. Europian Biophysical Journal, 32:519-528.

Vassilopoulos G., Russell D.W. 2003. Cell fusion: an alternative to stem cell plasticity and its therapeutic implications. Current Opinion in Genetics & Development, 13:480-485.

Vassilopoulos G., Wang P.-R., Russell D.W. 2003. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. Nature, 422:901-904.

Velizarov S., Berg H. 1998. Electropermeabilzation and electrofusion of human lymphoma cells modified by proteolitic enzymes. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 46:263-265.

Velizarov S., Reitz M., Glück B., Berg H. 1998. Electropermeabilization and electrofusion of human cells modified by anaesthetic agents. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 47:89-96.

Vernhes M.C., Cabanes P.A., Teissie J. 1999. Chinese hamster ovary cells sensitivity to localized electrical stresses. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 48:17-25.

Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al-Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Olson S., Grompe M. 2003. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. Nature, 422:897-901.

Weaver J.C., Powell K.T. 1989. Theory of electroporation. V: Electroporation and electrofusion in cell biology. Neumann E., Sowers A.E., Jordan C.A. (ur.). New York, Plenum Press: 111-126.

White J., Matlin K., Helenius A. 1981. Cell fusion by Semliki Forest, influenza, and vesikular stomatitis viruses. Journal of Cell Biology, 89:674-679.

Witze E., Rothman J.H. 2002. Cell fusion: an EFFicient sculptor. Current Biology, 12:R467-R469.

Zimmerberg J., Chernomordik L.V. 1999. Membrane fusion. Advanced Drug Delivery Reviews, 38:197-205.

Zimmermann U. 1982. Electrical field-mediated fusion and related electrical phenomena. Biochimica et Biophysica Acta, 696:227-277.