

Izražanja genov po genski elektrotransfekciji z električnimi pulzi različnih trajanj – eksperimenti in model

Tjaša Potočnik¹, Damjana Panič², Damijan Miklavčič¹, Alenka Maček Lebar¹

¹Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška 25, 1000 Ljubljana

²Lumentum d.o.o., 1291 Škofljica

E-pošta: alenka.macek.lebar@fe.uni-lj.si

Gene expressions after gene electrotransfection with electric pulses of different durations – experiments and model

Abstract. Transfection is defined as the transfer of foreign genetic material, most often in the form of DNA or RNA, into target cells. When genetic material is inserted into cells by electroporation, we speak of gene electrotransfection (GET). In the present study, we observed the effectiveness of GET with monopolar electrical pulses lasting 100 μ s and short, 2 μ s lasting, bipolar electrical pulses under in vitro conditions for five days. The mathematical model proposed by Wang et al. [7] was fitted to the experimental results. The parameters of the model obtained for the applied electric pulse protocols were compared. The model results suggest that the transfer of pDNA molecules inside the cell using short, 2 μ s lasting bipolar electrical pulses is more efficient than the transfer of pDNA molecules inside the cell using monopolar electrical pulses lasting 100 μ s.

1 Uvod

Transfekcija je definirana kot prenos tujega genskega materiala, najpogostejše v obliki DNK ali RNK, v tarčne celice. Za uspešno transfekcijo morajo molekule RNK priti v citoplazmo celice, molekule DNK pa v celično jedro, da lahko pride do njihove ekspresije. Na ta način je mogoče utišati delovanje okvarjenega gena, ga zamenjati ali pa utišati izražanje preveč izraženega gena. Metodo lahko uporabimo za tvorbo terapevtskega proteina, ki kodira vnesena nukleinska kislina, ali pridobitev celic z novimi funkcijami [1, 2].

V tarčne celice lahko gene vnašamo z naravnimi vektorji – virusi in z nevirusnimi metodami, tako v pogojih *in vitro*, *ex vivo* kot *in vivo*. Pri virusnih metodah je najprej potrebno virusni genom z odstranitvijo nekaterih delov spremeniti, da postane nenevaren. V uporabi so številni virusni vektorji, kot so: retrovirusi, adenovirusi in njim podobni vektorji, lentivirusi, proxvirusi idr. Uporabo virusnih metod omejuje pogost nastanek mutacij in visoka stopnja imunogenosti, ki lahko povzroči vnetni odziv [2].

Med nevirusne metode vnosa genov sodijo fizikalne in biokemične metode ter vbrizganje plazmidne DNK. S fizikalnimi metodami povečamo prepustnost celične membrane, kar olajša vstop DNK v tarčne celice. Uporabimo lahko mehansko, električno, ultrazvočno,

hidrodinamsko ali lasersko energijo. Biokemične metode za vnos DNK uporabljajo komplekse, ki v celico vstopijo z endocitozo. Kompleksi so sestavljeni iz negativno nabitih nukleinskih kislin in polikationskih nanomernih delčkov, bodisi kationskih liposomov ali kationskih polimerov. Biokemične metode so manj toksične in zagotavljajo dolgotrajno izražanje vnesenih proteinov, a imajo slabo učinkovitost [3]. Plazmidi so prisotni v bakterijah kot gola DNK. Plazmidi sami ne morejo vstopati v tarčne celice, zato je za vnos potrebna pomoč tarčne celice ali pa dodatna energija, ki jo lahko zagotovijo fizikalne metode. Ena izmed njih je elektroporacija, pri kateri za povečanje prepustnosti celične membrane uporabljamo električne pulze.

Kadar z elektroporacijo vstavljamo v celice DNK ali RNK, govorimo o genski elektrotransfekciji (GET). V medicini so najbolj obetavne aplikacije GET cepljenje z DNK ali RNK in genska terapija. GET je že bila uspešno opravljena na različnih tkivih, npr. na skeletni in srčni mišici, koži, tumorjih, jetrih, pljučih, ledvicah, možganih, mrežnici, roženici [1]. Rezultati študij potrjujejo, da so DNK cepiva z uporabo elektroporacije varna in omogočajo dober odziv imunskega sistema, elektrogenska terapija pa je učinkovita in brez resnih stranskih učinkov.

GET je uspešna, le kadar je plazmidna DNK (pDNK) prisotna v okolici celice pred dovajanjem električnih pulzov. Le-ti imajo dvojno vlogo; povzročijo nastanek prepustnih mest na celični membrani in zagotovijo elektroforezo negativno nabitih molekul pDNK v električnem polju, ki olajša stik med celično membrano in pDNK. Stik med celično membrano in molekulami pDNK je namreč pogoj za uspešno GET. Če so prepustna mesta na celični membrani dovolj velika, lahko majhne molekule pDNK (≤ 15 bp [4]) vstopijo v celico z elektroforezo. Velike molekule pDNK tvorijo med dovajanjem električnih pulzov na celični membrani skupke, ki po aplikaciji električnih pulzov vstopijo v celico z endocitozo [1].

Uspešnost GET je odvisna od uporabljenih električnih parametrov, kot so amplituda pulzov, njihovo trajanje, število ter frekvenca ponavljanja. Ker je elektroforeza vključena pri nastajanju skupkov pDNK na celični membrani, so za GET priporočeni dlje trajajoči električni pulzi, od nekaj do več 10 ms.

Najpomembnejši neželeni stranski učinek GET v kliničnih aplikacijah je stimulacija motoričnih in senzoričnih nevronov, ki privede do mišičnega krčenja in bolečine. Uporaba kratkih monopolarnih ali bipolarnih električnih pulzov (od nekaj 100 ns do nekaj μ s), ki si

sledijo z visoko frekvenco (več kot 100 kHz), znatno zmanjša mišične kontrakcije in bolečino [5, 6], zato so raziskave uspešnosti GET s tovrstnimi električnimi pulzi postale zanimive.

GET je zapleten večstopenski proces. Vključuje interakcijo pDNK s celično membrano, prenos skozi celično membrano, migracijo skozi citoplazmo, prehod skozi jedrski ovoj in na koncu še gensko ekspresijo. Podrobno dogajanje med posameznimi stopnjami GET ni v celoti poznano, zato si pri razlagi pomagamo tudi z matematičnimi modeli [7].

V pričujoči študiji smo pet dni opazovali učinkovitost GET s klasičnimi monopolarnimi električnimi pulzi, ki trajajo 100 μ s, ter kratkimi, 2 μ s trajajočimi, bipolarnimi električnimi pulzi v pogojih *in vitro*. Eksperimentalnim rezultatom smo prilagodili matematični model, ki ga je predlagal Wang s sodelavci [7], in primerjali parametre modela pri uporabljenih protokolih električnih pulzov.

2 Metode

2.1 Celice

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili celično linijo mišjih mioblastov, C2C12. Celice smo 2-4 dni gojili v posodah s površino 25-150 mm² (TPP, Switzerland) v inkubatorju (Kambič, Slovenia) pri 37°C, in atmosferi z 10% CO₂. Rastni medij, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Aldrich, Germany), smo obogatili z 10% govejim serumom (Sigma Aldrich, Germany), L-glutaminom (StemCell, Canada) in antibiotikoma penicilinom/streptomycinom (PAA, Austria) in gentamicinom (Sigma Aldrich, Germany). Za poskuse smo celice tripsinizirali v eksponentni fazi rasti (5 g tripsina/2 g EDTA v 0.9% NaCl (Sigma Aldrich, Germany), 10 x razredčen v Hankovi solni raztopini (Sigma Aldrich, Germany). Tripsin in rastni medij smo iz celične suspenzije odstranili s centrifugiranjem (180 g, 5 min pri sobni temperaturi (Sigma 3-15 K, UK)). Celično usedlino smo resuspendirali v rastnem mediju, da smo dobili koncentracijo 2×10^6 celic/ml.

2.2 Genska elektrotransfekcija

200 μ l celične suspenzije smo odmerili v elektroporacijsko kiveto z razdaljo med elektrodama 2 mm (VWR International, Belgium) in dodali plazmid pEGFP-N1 (4.7 kb, Clontech Laboratories Inc., USA) s končno koncentracijo 500 μ g/ml. Monopolarne pravokotne pulze trajanja 100 μ s smo generirali z laboratorijskim prototipnim pulznim generatorjem (LBK, Univerza v Ljubljani) [8]. Generirali smo 8 pulzov z amplitudo 250 V, ki so si sledili s frekvenco 1 Hz. Kratke bipolarne električne pulze (HFBP) smo generirali s prototipnim pulznim generatorjem L-POR (mPOR, Slovenija). Bipolarni pulzi in pavza med pozitivnim in negativnim pulzom so trajali 2 μ s. Generirali smo 100 pulznih vlakov, v vsakem vlakcu pa 32 pulzov. Pulzni vlaki so si sledili s frekvenco 1 Hz [8]. Amplituda pozitivnih in negativnih pulzov je bila 250 V. V obeh

primerih smo aplikacijo električnih pulzov spremljali z ustreznim osciloskopom.

Po aplikaciji električnih pulzov smo v kiveto dodali 50 μ l govejega seruma in vzorec inkubirali 5 min pri 37°C. Vzorec smo razdeli na 14 delov, ki so vsebovali različno število celic (od 1×10^5 do 5×10^3), in jih nasadili na plošče s 24 posodicami (TPP, Switzerland). Plošče smo pet dni hranili v inkubatorju (37°C, 5% CO₂) in vsakih 8 ur tripsinizirali celice v posodici z nasajenim ustreznim številom celic. Tripsinizirane celice smo resuspendirali v 200 μ l PBS in določili delež celic z izraženim zelenim fluorescentnim proteinom s pretočnim citometrom (Attune NxT, USA) z uporabo laserske svetlobe z valovno dolžino 488 nm in pasovnim filtrom 530/30 nm. Med vsako meritvijo smo zabeležili 10000 dogodkov. Podatke smo analizirali s programskim orodjem Attune NxT software.

2.3 Model genske elektrotransfekcije

Število molekul pDNK, ki vstopijo v celice, ni enako pri vseh celicah. Odvisno je od različnih dejavnikov, kot je lokacija celice in molekul pDNK v transfekcijskem pufru ter proces celičnega privzema skupkov molekul pDNK. Wang in sodelavci [7] so zasnovali model, ki kot osnovni mehanizem privzema molekul pDNK predvideva endocitozo. Model transporta pDNK v celici so povzeli s sedmimi diferencialnimi enačbami:

$$\frac{d(D_{endosom})}{dt} = -k_1 \times D_{endosom} , \quad (1)$$

$$\frac{d(D_{citotosol})}{dt} = k_1 \times D_{endosom} - k_2 \times D_{citotosol} - k_3 \times D_{citotosol} , \quad (2)$$

$$\frac{d(DI_{citotosol})}{dt} = k_2 \times D_{citotosol} - k_4 \times DI_{citotosol} , \quad (3)$$

$$\frac{d(DI_{NPC})}{dt} = k_4 \times DI_{citotosol} - k_5 \times DI_{NPC} , \quad (4)$$

$$\frac{d(DI_{jedro})}{dt} = k_5 \times DI_{NPC} - k_6 \times DI_{jedro} , \quad (5)$$

$$\frac{d(D_{jedro})}{dt} = k_6 \times DI_{jedro} - k_3 \times D_{jedro} , \quad (6)$$

$$\frac{d(P)}{dt} = k_7 \times D_{jedro} - k_8 \times P , \quad (7)$$

kjer je $D_{endosom}$ število pDNK molekul v endosomih, $D_{citotosol}$ število pDNK v citoplazmi, $DI_{citotosol}$ število skupkov pDNK in importnega proteina v citoplazmi, DI_{NPC} število skupkov pDNK in importnega proteina na jedrski ovojnici, DI_{jedro} število skupkov pDNK in importnega proteina v jedru, D_{jedro} število pDNK v jedru, P število proteinov z izraženim pDNK genom in k_i ($i = 1, \dots, 8$) hitrostne konstante. Pomen hitrostnih konstant je podan v tabeli 1.

Eksperimentalno izmerjeno mediano fluorescence, ki je sorazmerna z mediano števila kopij pDNK v celicah, smo normalizirali glede na največjo vrednost, ki je bila

dosežena 24 h po aplikaciji električnih pulzov s protokolom $8 \times 100 \mu\text{s}$. V programskem okolju Matlab smo pripravili program za reševanje opisanega sistema diferencialnih enačb. Začetne vrednosti vseh spremenljivk smo postavili na vrednost 0, razen spremenljivke *Dendosom*, ki predstavlja normalizirano začetno število molekul pDNK, ki ob GET vstopi v celico. Ker smo v eni od predhodnih študij pokazali [9], da je fluorescenca skupkov pDNK na celični membrani ob uporabi protokola električnih pulzov $8 \times 100 \mu\text{s}$ znatno večja, kot ob uporabi protokola električnih pulzov HFBP, smo predpostavili, da je začetna vrednost spremenljivke *Dendosom* v primeru protokola električnih pulzov HFBP manjša od začetne vrednosti *Dendosom* v primeru protokola električnih pulzov $8 \times 100 \mu\text{s}$. Hitrostne konstante k_i smo določili za oba protokola električnih pulzov s prilagajanjem rešitve sistema diferencialnih enačb za spremenljivko *Djedro* normaliziranim vrednostim mediane fluorescence v posameznih časovnih trenutkih.

Tabela 1. Opis pomena hitrostnih konstant in njihove vrednosti pri uporabljenih protokolih električnih pulzov

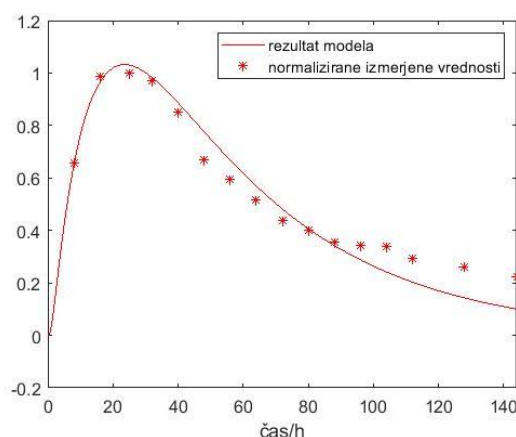
	Opis (enota)	$8 \times 100 \mu\text{s}$	HFBP
k_1	Zapuščanje endosoma (h^{-1})	2,602	0,533
k_2	Formiranje skupkov pDNK in importnega proteina (h^{-1})	1,228	0,851
k_3	pDNK razpad (h^{-1})	0,022	0,013
k_4	Vezava skupkov pDNK in proteina na jedrsko ovojnico (h^{-1})	1000	1000
k_5	Vstop skupkov pDNK in proteina v jedro (h^{-1})	0,080	0,138
k_6	Razpad skupkov in ločitev pDNK od proteina (h^{-1})	1000	1000
k_7	Sinteza proteina z izraženim genom (h^{-1})	0,010	0,010
k_8	Razgradnja proteina (h^{-1})	$7,7 \times 10^{-4}$	$7,7 \times 10^{-4}$

3 Rezultati

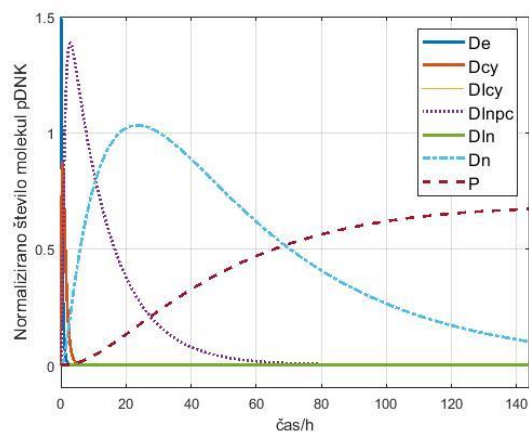
Hitrostne konstante k_i , določene za oba protokola električnih pulzov, so podane v tabeli 1.

Na sliki 1 so prikazane normalizirane vrednosti mediane fluorescence celic C2C12 z izraženim zelenim fluorescentnim proteinom v odvisnosti od časa, ki je potekel od aplikacije protokola električnih pulzov $8 \times 100 \mu\text{s}$. Največja vrednost je dosežena po 24 h. Na sliki 1 je prikazan tudi časovni potek normalizirane vrednosti spremenljivke *Djedro*. Časovni poteki normaliziranih vrednosti preostalih spremenljivk modela so prikazani na sliki 2.

Na sliki 3 so prikazane normalizirane vrednosti mediane fluorescence celic C2C12 z izraženim zelenim fluorescentnim proteinom v odvisnosti od časa, ki je potekel od aplikacije protokola električnih pulzov HFBP. Tudi pri tem protokolu električnih pulzov smo največjo vrednost fluorescence dosegli po 24 h. Na sliki 3 je prikazan tudi časovni potek normalizirane vrednosti spremenljivke *Djedro*. Časovni poteki normaliziranih vrednosti preostalih spremenljivk modela v odvisnosti od časa, ki je potekel od aplikacije protokola električnih pulzov HFBP, so prikazani na sliki 4.



Slika 1. Normalizirane vrednosti mediane fluorescence celic C2C12 z izraženim zelenim fluorescentnim proteinom v odvisnosti od časa, ki je potekel od aplikacije protokola električnih pulzov $8 \times 100 \mu\text{s}$, 1 Hz, 1,25 kV/cm (*) in krivulja (-), ki podaja vrednosti spremenljivke *Djedro* v odvisnosti od časa.

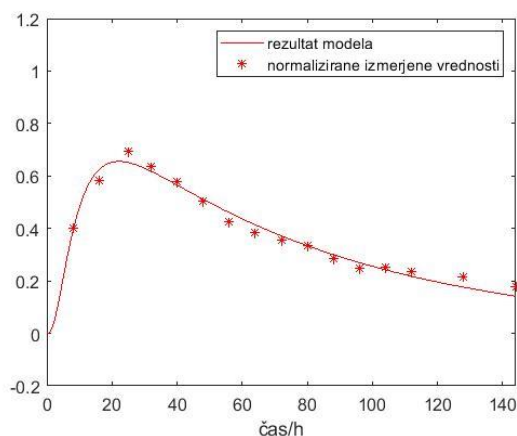


Slika 2. Normalizirano število molekul pDNK v celičnih strukturah v odvisnosti od časa, ki je potekel od aplikacije protokola električnih pulzov $8 \times 100 \mu\text{s}$, 1 Hz, 1,25 kV/cm. De je normalizirano število pDNK molekul v endosomih, Dcy normalizirano število pDNK v citoplazmi, Dlcy normalizirano število skupkov pDNK in importnega proteina v citoplazmi, Dlnpc normalizirano število skupkov pDNK in importnega proteina na jedrski ovojnici, Dln normalizirano število skupkov pDNK in importnega proteina v jedru, Dn normalizirano število pDNK v jedru in P normalizirano število proteinov z izraženim pDNK genom.

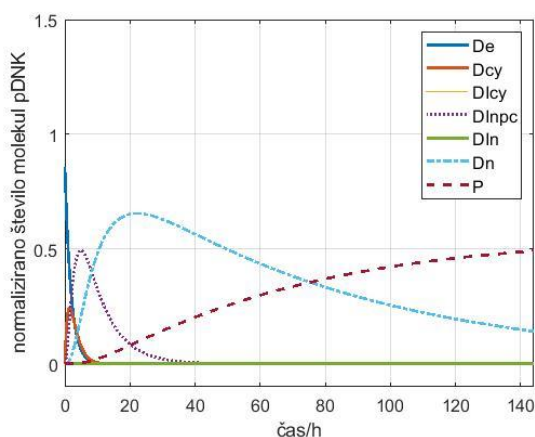
4 Razprava

V študiji smo primerjali učinkovitost GET v pogojih *in vitro* z dvema protokoloma električnih pulzov; $8 \times 100 \mu\text{s}$, 1 Hz in HFBP. Eksperimentalnim rezultatom

– mediani fluorescence celic v odvisnosti od časa, ki je potekel od aplikacije električnih pulzov – smo prilagodili matematični model, ki ga je predlagal Wang s sodelavci [7] in primerjali parametre modela med uporabljenima protokoloma električnih pulzov.



Slika 3. Normalizirane vrednosti mediane fluorescence celic C2C12 z izraženim zelenim fluorescentnim proteinom v odvisnosti od časa, ki je potekel od aplikacije protokola električnih pulzov HFBP, 1,25 kV/cm (*) in krivulja (-), ki podaja vrednosti spremenljivke *Djedro* v odvisnosti od časa.



Slika 4. Normalizirano število molekul pDNK v celičnih strukturah v odvisnosti od časa, ki je potekel od aplikacije protokola električnih pulzov HFBP, 1,25 kV/cm. De je normalizirano število pDNK molekul v endosomih, Dcy normalizirano število pDNK v citoplazmi, DIcy normalizirano število skupkov pDNK in importnega proteina v citoplazmi, DInpc normalizirano število skupkov pDNK in importnega proteina na jedrski ovojnici, DIn normalizirano število skupkov pDNK in importnega proteina v jedru, Dn normalizirano število pDNK v jedru in P normalizirano število proteinov z izraženim pDNK genom.

Pri obeh protokolih električnih pulzov so bile celice izpostavljene enaki jakosti električnega polja (1,25 kV/cm) ob prisotnosti enake koncentracije pDNK (500 µg/ml). Eksperimentalni rezultati so pokazali, da z uporabo obeh protokolov električnih pulzov največjo vrednost fluorescence dosežemo po 24 h, vendar je največja vrednost fluorescenca pri protokolu električnih pulzov HFBP le 70 % največje vrednosti fluorescence dosežene s protokolom električnih pulzov 8 x 100 µs.

Rezultat nakazuje, da število kopij pDNK v celicah, ki so bile transfecirane s protokolom električnih pulzov HFBP, znaša le 70 % števila kopij pDNK v celicah, ki so bile transfecirane s protokolom 8 x 100 µs.

Prilagoditev modela eksperimentalnim rezultatom je pokazala, da najboljše ujemanje dobimo v primeru, ko je začetna vrednost *Dendosom* za protokol električnih pulzov HFBP le polovica začetne vrednosti *Dendosom* uporabljene pri protokolu električnih pulzov 8 x 100 µs. Rezultati modela torej nakazujejo, da kljub temu, da pri protokolu električnih pulzov HFBP vstopi v celico le polovica molekul pDNK v primerjavi s protokolom električnih pulzov 8 x 100 µs, je število kopij pDNK v celicah kar 70 % števila kopij pDNK v celicah, ki so bile transfecirane s protokolom 8 x 100 µs. Rezultati modela nakazujejo, da je prenos molekul pDNK znotraj celice ob uporabi protokola električnih pulzov HFBP bolj učinkovit, kot ob uporabi protokola električnih pulzov 8 x 100 µs. Iz primerjave hitrostnih konstant modela lahko zaključimo, da pri protokolu električnih pulzov 8 x 100 µs molekule pDNK hitreje zapuščajo endosome (k_1) in se hitreje spajajo v skupke z importnim proteinom (k_2), vendar pa je vstop skupkov v jedro (k_5) počasnejši. Ostali procesi v celicah potekajo približno enako hitro pri obeh uporabljenih protokolih električnih pulzov.

Literatura

- [1] C. Rosazza idr. Gene Electrotransfer: A Mechanistic Perspective, *Curr Gene Ther* 2016, 98-129.
- [2] K. Sedej in P. Rožman. Novosti pri zdravljenju z gensko terapijo, *Zdrav Vestn* 2014, 802-813.
- [3] Z.X. Chong idr. Transfection types, methods and strategies: A technical review, *PeerJ* 2021, 9.
- [4] S. Sachdev idr. DNA-membrane complex formation during electroporation is DNA size-dependent, *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2020, 1862.
- [5] C. Yao idr. Bipolar Microsecond Pulses and Insulated Needle Electrodes for Reducing Muscle Contractions during Irreversible Electroporation, *IEEE Trans. Biomed Eng* 2017(64), 2924-2937.
- [6] B. Mercadal idr. Avoiding nerve stimulation in irreversible electroporation: A numerical modeling study, *Phys Med Biol* 2017 (62), 8060-8079.
- [7] L. Wang idr. A Statistical Framework for Determination of Minimal Plasmid Copy Number Required for Transgene Expression in Mammalian Cells, *Bioelectrochemistry* 2021, 107731.
- [8] D.C. Sweeney idr. Quantification of cell membrane permeability induced by monopolar and high-frequency bipolar bursts of electrical pulses, *Biochim. Biophys Acta - Biomembr*, 2016, 2689-2698.
- [9] T. Potočník idr. Gene transfer by electroporation with high frequency bipolar pulses in vitro, *Bioelectrochemistry* 2021, 107803.