

Skupki pDNA na celični membrani ob genski elektrotransfekciji z mikrosekundnimi bipolarnimi električnimi pulzi

Potočnik Tjaša, Miklavčič Damijan, Maček Lebar Alenka

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

E-pošta: tjasa.potocnik@fe.uni-lj.si

pDNA aggregates on cell membrane after gene electrotransfer with microsecond bipolar pulses

Abstract. *High-frequency microsecond bipolar pulses (HF-BP) have been demonstrated to be efficient for membrane permeabilization and irreversible electroporation. Because of potential of these pulses to be used also in gene therapies, we tested if successful gene electrotransfer (GET) can be achieved. We examined the extent and position of pDNA aggregates formation on the cell membrane using various pDNA concentrations and HF-BP pulses. Results were compared to the results obtained by "classical" monopolar millisecond pulses. We observed that increasing pDNA concentration increases the fluorescence intensity of pDNA aggregates formed on cell membrane. Our results show that both, pDNA concentration and pulse parameters affect pDNA aggregates formation on cell membrane. However, we did not observe any direct correlation between fluorescence intensity of pDNA aggregates formed on cell membrane and GET efficiency. With the highest pDNA concentration overall GET obtained by HF-BP pulse protocol was comparable to overall GET obtained by millisecond monopolar pulse protocol. The interaction of pDNA with cell membrane is only one of several steps and barriers that pDNA has to overcome in order to be expressed. So, for the successful use of HF-BP pulses in GET, it is necessary to investigate the role of the remaining steps and factors.*

1 Uvod

Kratkotrajna izpostavitve celic zunanjemu električnemu polju dovolj visoke električne poljske jakosti povzroči destabilizacijo celične membrane [1]. Najbolj splošno uveljavljena teorija predpostavlja, da je destabilizacija celične membrane posledica nastanka por, ki ionom in drugim molekulam omogočajo vstop in/ali izstop iz celice [2]. Pojav so zato poimenovali elektroporacija (tudi elektropermeabilizacija) in je ena od univerzalnih metod za vnos različnih molekul v celice *in vitro* in *in vivo* pogojih. Elektroporacija se uporablja v medicini, biotehnologiji, pri predelavi hrane in biomase [3, 4, 5].

Uporaba elektroporacije v medicini obsega predvsem elektrokemoterapijo (ECT), ablacijo tkiva z ireverzibilno elektroporacijo (IRE), transdermalno apliciranje zdravil ter gensko elektrotransfekcijo (GET) v obliki genske terapije in DNA cepljenja. GET izboljša izražanje terapevtskih ali imunogenih proteinov, za katere zapis nosita DNA ali RNA, zato se lahko uporablja za preprečevanje ali zdravljenje številnih vrst raka, bolezni srca in ožilja, avtoimunskih bolezni, specifičnih motenj v delovanju organov ter preprečevanju nalezljivih bolezni [6].

Za uspešno GET običajno dodamo plazmidno DNA (pDNA) v celično okolico pred aplikacijo električnih pulzov. Le-ti imajo dvojno vlogo; omogočijo permeabilizacijo celične membrane in povzročijo elektroforezo pDNA. Negativno nabite molekule pDNA se namreč v električnem polju gibljejo zaradi elektroforetske sile in lahko, v primerjavi s prosto difuzijo, v večjem številu vzpostavijo stik s celično membrano [7]. Majhne molekule DNA (enake ali manjše od 15 baznih parov) lahko vstopijo v celico z elektroforezo. Velike molekule pDNA pa med aplikacijo električnih pulzov tvorijo skupke na celični membrani in po elektropermeabilizaciji vstopijo v celico z endocitozo [8]. Prav zaradi pomembne vloge elektroforeze so se za uspešno GET uveljavili dolgi milisekundni monopolarni pulzi. Zdravljenje tkiv z dolgimi monopolarnimi pulzi povzroča mišične kontrakcije in je boleče, zato je nujna uporaba mišičnih relaksantov in anestezije ter sinhronizacija dovajanja pulzov z elektrokardiogramom [9].

Nedavne študije so pokazale, da je mogoče s kratkimi bipolarnimi električnimi pulzi (0,25 - 5 μ s), ki so dovedeni s ponavljalno frekvenco 100 kHz in več ter nastopajo v ponavljajočih se kratkotrajnih vlakih (HF-BP), doseči podobno permeabilizacijo celične membrane *in vitro* [10] kot z dolgimi monopolarnimi električnimi pulzi, pri čemer ne povzročajo mišičnih kontrakcij in bolečin [11]. Rezultati poskusov *in vivo* so dokazali, da so pulzi HF-BP učinkoviti pri ECT, IRE in GET [11, 12, 13]. V pričujoči študiji smo preverili v kolikšni meri in kje nastajajo skupki pDNA na celični membrani ob uporabi pulzov HF-BP in rezultate primerjali z rezultati uporabe »klasičnih« monopolarnih milisekundnih pulzov. GET smo v okviru HF-BP izvedli s petdesetimi zaporednimi vlakmi petdesetih bipolarnih pulzov z 2 μ s trajajočo pozitivno in negativno fazo in 2 μ s trajajočo pavzo med obema

fazama kot tudi pavzo med pulzi. Vlaki so si sledili s frekvenco 1 Hz. Za primerjavo smo izbrali GET z osmimi 5 ms trajajočimi pulzi, ki so si sledili s frekvenco 1 Hz.

2 Materiali in metode

2.1 Celice

V študiji smo uporabili celično linijo ovarijskih celic kitajskega hrčka (CHO). Celice smo gojili po že opisanem protokolu [13]. V eksperimentih smo uporabili celice v eksponentni fazi rasti. 1×10^5 celic v rastnem mediju smo nanесли v posodico (Lab-Tek, Nunc, TermoFisher Scientific, ZDA) in jih 8 ur pustili v inkubatorju pri 37°C v vlažni atmosferi s 5% CO₂. Pred izpostavitvijo električnim pulzom smo rastni medij zamenjali s svežim medijem z ustrezno koncentracijo plazmida.

2.2 Plazmid

GET smo izvedli s plazmidom pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., ZDA), ki nosi zapis za zeleni fluorescentni protein (GFP). Uporabili smo dve koncentraciji plazmida; 20 µg/ml in 500 µg/ml. Da bi lahko opazovali skupke pDNA na celični membrani smo molekule pDNA obarvali s fluorescentnim barvilom TOTO-1 [14].

2.3 Električni pulzi

V študiji smo uporabili dva protokola električnih pulzov. Kot »klasične« monopolarne milisekundne pulze smo izbrali 8 pulzov s trajanjem 5 ms, ki so si sledili s frekvenco 1 Hz. Protokol HF-BP pa je sestavljalo petdeset zaporednih vlakov petdesetih bipolarnih pulzov z 2 µs trajajočo pozitivno in negativno fazo in 2 µs trajajočo pavzo med obema fazama kot tudi pavzo med pulzi. Vlaki so si sledili s frekvenco 1 Hz. Za generiranje pulzov smo uporabili laboratorijski prototip, razvit v Laboratoriju za biokibernetiko Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani [10]. Delovanje naprave smo med eksperimenti spremljali z osciloskopom (Wavesurfer 422, 200 MHz, LeCroy, ZDA). Pulze smo dovedli z uporabo dveh vzporednih žičnih elektrod iz zlitine platine in iridija, ki sta na razdalji 4 mm nalegali na dno posodice s celicami. Velikost jakosti električnega polja je v primeru milisekundnih pulzov znašala 0,5 kV/cm, v primeru pulzov HF-BP pa 1,25 kV/cm.

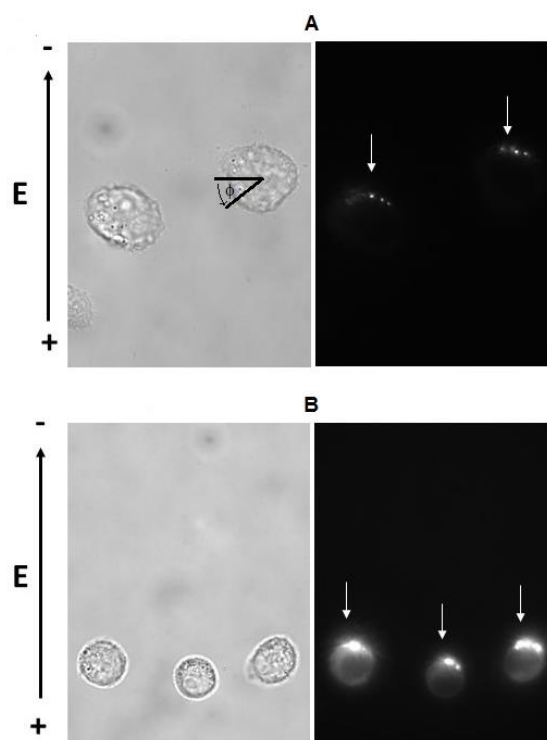
2.4 Analiza rezultatov

Stik pDNA s celično membrano smo opazovali s fluorescenčnim mikroskopom (Zeiss 200, Axiovert, Nemčija) ob uporabi oljnega objektiva s 100x povečavo. Slike smo posneli s programom MetaMorph (Visitron, Nemčija) in analizirali intenzivnost fluorescence vzdolž

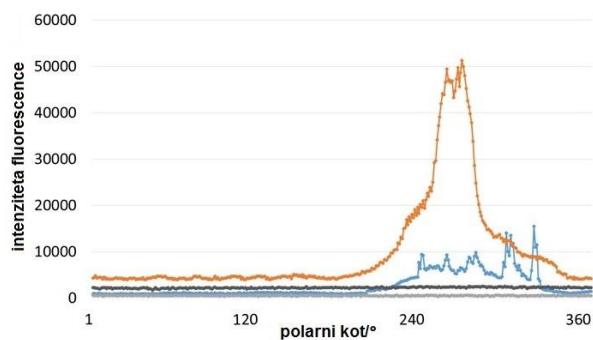
celične membrane. Za vsak protokol električnih pulzov smo analizirali vsaj tri slike.

3 Rezultati in razprava

Analiza fluorescence vzdolž membrane celic, ki so bile izpostavljene monopolarnim milisekundnim pulzom, je pokazala povečano intenziteto fluorescence le na eni strani celice (slika 1). Skupki pDNA so torej nastali zgolj na tisti strani celice, ki je bila med dovajanjem električnih pulzov obrnjena proti katodi. Intenziteta fluorescence je znatno odvisna od koncentracije plazmida v eksperimentalnem vzorcu. V primeru, ko je znašala uporabljena koncentracija plazmida 500 µg/ml, je vrh intenzitete fluorescence skoraj trikrat višji kot v primeru, ko je uporabljena koncentracija plazmida znašala 20 µg/ml (slika 2).



Slika 1. Stik pDNA z membrano celic, ki so bile izpostavljene monopolarnim milisekundnim pulzom. Slika celic v svetlobnem polju (levo) in slika celic pod fluorescenco (desno). Koncentracija plazmida v vzorcu je bila 20 µg/ml (A) oziroma 500 µg/ml (B). Oznaka ϕ označuje polarni kot, s puščico pa je označena smer meritve intenzitete fluorescence.



Slika 2. Intenziteta fluorescence vzdolž membrane ene od celic izpostavljene monopolarnim milisekundnim pulzom v primeru, ko je znašala koncentracija plazmida v vzorcu 20 µg/ml (modra barva) oziroma 500 µg/ml (oranžna barva). S sivima barvama je označena intenziteta fluorescence ozadja; 20 µg/ml (svetlo siva barva), 500 µg/ml (temno siva barva).

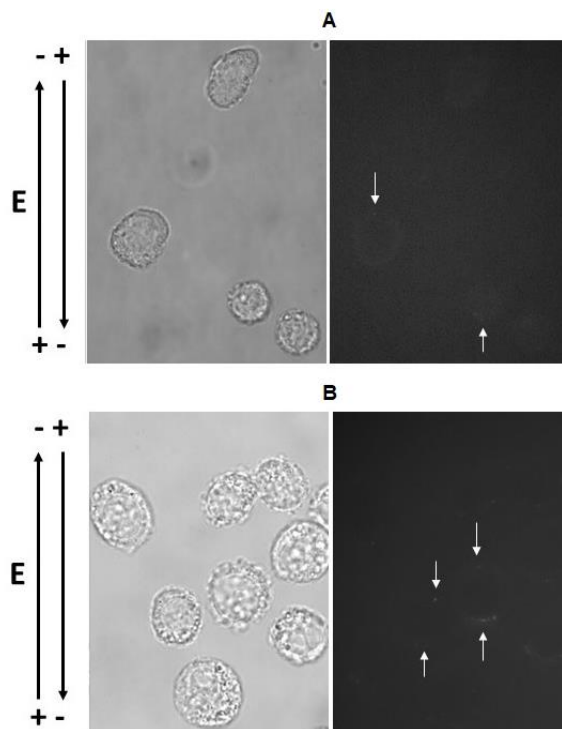
Celice, ki so bile izpostavljene pulzom HF-BP, so izkazovale povečano intenziteto fluorescence membrane na dveh straneh celice. To pomeni, da so skupki pDNA nastali na obeh – proti elektrodam obrnjenih straneh celice (slika 3). V primeru, ko je bila uporabljena koncentracija plazmida 20 µg/ml, so skupki komaj opazni, a oba vrha intenzitete fluorescence se razlikujeta od intenzitete fluorescence ozadja (slika 4). V primeru, ko je bila uporabljena koncentracija plazmida 500 µg/ml, je fluorescenca skupkov intenzivnejša. Vrha v intenziteti fluorescence sta približno sedemkrat višja kot v primeru, ko je uporabljena koncentracija plazmida znašala 20 µg/ml (slika 4).

Opazovanje skupkov pDNA na celični membrani je pokazalo, da višja koncentracija pDNA povzroči bolj intenzivno fluorescenca skupkov pDNA, ki smo jo obarvali s fluorescentnim barvilom TOTO-1. Intenzivnost fluorescence skupkov pDNA pa je odvisna tudi od protokola električnih pulzov. Ko smo uporabili nizko koncentracijo pDNA (20 µg/ml) in celice izpostavili monopolarnim milisekundnim pulzom, je bila intenziteta fluorescence skupkov pDNA skoraj 4-krat večja kot v primeru, ko smo celice izpostavili pulzom HF-BP ob visoki koncentraciji pDNA (500 µg/ml). Če primerjamo intenzivnost fluorescence skupkov pDNA ob visoki koncentraciji pDNA (500 µg/ml) je le-ta po pulznem protokolu HF-BP skoraj 10-krat manjša v primerjavi z intenzivnostjo fluorescence skupkov pDNA nastalih po protokolu monopolarnih milisekundnih pulzov.

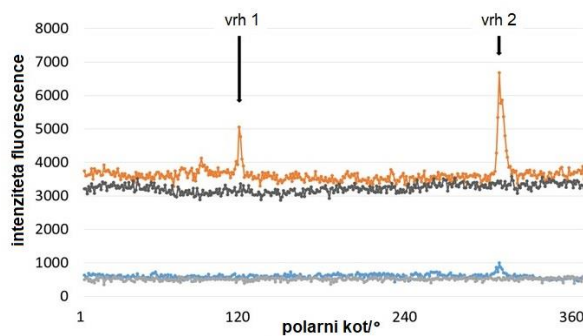
Pri nizki koncentraciji pDNA (20 µg/ml) je bila celokupna GET statistično značilno višja, ko smo celice izpostavili monopolarnim milisekundnim pulzom ($19 \pm 5\%$) v primerjavi s HF-BP pulzi ($4 \pm 2\%$). Pri visoki koncentraciji pDNA (500 µg/ml) pa smo z monopolarnimi milisekundnimi pulzi ($40 \pm 10\%$) in HF-BP pulzi ($34 \pm 7\%$) dosegli primerljivo celokupno GET. Naši rezultati tako kažejo, da ni direktne povezave med intenzivnostjo fluorescence skupkov pDNA na celični membrani in uspešnostjo GET.

Glede na obstoječe znanje je za uspešno GET potrebnih več korakov. Prvi je vsekakor uspešna elektropermeabilizacija celične membrane, naslednji

stik med celično membrano in pDNA, sledi prehod pDNA skozi celično membrano in transport pDNA po citoplazmi do jedra. Da pride do njene ekspresije, mora pDNA vstopiti v jedro. Stik pDNA s celično membrano, ki smo ga opazovali v pričujoči študiji, je le eden od potrebnih korakov, zato intenzivnejša fluorescenca skupkov pDNA še ne pomeni učinkovitejše GET. K razlikam v učinkovitosti, poleg zapisanih korakov, zagotovo prispevajo tudi drugi dejavniki, kot so stabilnost pDNA v citoplazmi, njen transport v perinuklearno regijo in uspešno prehajanje jedrne ovojnice [8].



Slika 3. Stik pDNA z membrano celic, ki so bile izpostavljene pulzom HF-BP. Slika celic v svetlobnem polju (levo) in slika celic pod fluorescenco (desno). Koncentracija plazmida v vzorcu je bila 20 µg/ml (A) oziroma 500 µg/ml (B).



Slika 4. Intenziteta fluorescence vzdolž membrane ene od celic izpostavljene pulzom HF-BP v primeru, ko je znašala koncentracija plazmida v vzorcu 20 µg/ml (modra barva) oziroma 500 µg/ml (oranžna barva). S sivima barvama je

označena intenziteta fluorescence ozadja; 20 µg/ml (svetlo siva barva), 500 µg/ml (temno siva barva).

4 Zaključek

V pričujoči študiji smo pokazali, da so skupki pDNA na celični membrani prisotni tudi ob GET s pulzi HF-BP. Pri GET s HF-BP pulzi nastanejo skupki pDNA na obeh proti elektrodam obrnjenih straneh celice. Višja koncentracija pDNA povzroči bolj intenzivno fluorescenco skupkov pDNA. Na intenzivnost fluorescence skupkov pDNA vplivajo tudi parametri električnih pulzov. Intenzivnost fluorescence skupkov pDNA po GET z izbrano koncentracijo pDNA s protokolom HF-BP je mnogo manjša od intenzivnost fluorescence po GET s protokolom monopolarnih milisekundnih pulzov. Toda stik pDNA s celično membrano je le eden od korakov GET, zato je za uspešno uporabo pulzov HF-BP potrebno raziskati tudi potek preostalih korakov.

Zahvala

Raziskavo je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS (ARRS) [temeljno raziskovalno financiranje št. P2-0249 in financiranje za mladega raziskovalca TP]. Poskusi so bili izvedeni v okviru Infrastrukturnega centra: Mreža raziskovalnih infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani (MRIC UL IP-0510).

Literatura

- [1] T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek, D. Miklavcic, Membrane Electroporation and Electroporabilization: Mechanisms and Models, *Annu. Rev. Biophys.* 48 (2019) 63–91.
- [2] J.C. Weaver, Y.A. Chizmadzhev, Theory of electroporation: A review, *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 41 (1996) 135–160.
- [3] M.L. Yarmush, A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik, D. Miklavčič, Electroporation-based technologies for medicine: Principles, applications, and challenges, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 16 (2014) 295–320.
- [4] T. Kotnik, W. Frey, M. Sack, S. Haberl Meglič, M. Peterka, D. Miklavčič, Electroporation-based applications in biotechnology, *Trends Biotechnol.* 33 (2015) 480–488.
- [5] S. Mahnič-Kalamiza, E. Vorobiev, D. Miklavčič, Electroporation in Food Processing and Biorefinery, *J. Membr. Biol.* 247 (2014) 1279–1304.
- [6] L. Lambricht, A. Lopes, S. Kos, G. Sersa, V. Prémat, G. Vandermeulen, Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 13 (2016) 295–310.
- [7] C. Faurie, M. Rebersek, M. Golzio, M. Kanduser, J.M. Escoffre, M. Pavlin, J. Teissie, D. Miklavcic, M.P. Rols, Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation, *J. Gene Med.* 12 (2010) 117–125.
- [8] C. Rosazza, S. Haberl Meglic, A. Zumbusch, M.-P. Rols, D. Miklavcic, Gene Electrottransfer: A Mechanistic Perspective, *Curr. Gene Ther.* 16 (2016) 98–129.
- [9] B. Mali, V. Gorjup, I. Edhemovic, E. Breclj, M. Cemazar, G. Sersa, B. Strazisar, D. Miklavcic, T. Jarm, Electrochemotherapy of colorectal liver metastases - An observational study of its effects on the electrocardiogram, *Biomed. Eng. Online*, 14 (2015).
- [10] Sweeney, M. Reberšek, J. Dermol, L. Rems, D. Miklavčič, R. V. Davalos, Quantification of cell membrane permeability induced by monopolar and high-frequency bipolar bursts of electrical pulses, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858 (2016) 2689–2698.
- [11] A. Sugrue, V. Vaidya, C. Witt, C. V. DeSimone, O. Yasin, E. Maor, A.M. Killu, S. Kapa, C.J. McLeod, D. Miklavčič, S.J. Asirvatham, Irreversible electroporation for catheter-based cardiac ablation: a systematic review of the preclinical experience, *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 55 (2019) 251–265.D.C.
- [12] M. Scuderi, M. Rebersek, D. Miklavcic, J. Dermol-Cerne, The use of high-frequency short bipolar pulses in cisplatin electrochemotherapy in vitro, *Radiol. Oncol.*, 53 (2019), 194-205.
- [13] T. Potočnik, D. Miklavčič, A. Maček Lebar, Gene transfer by electroporation with high frequency bipolar pulses in vitro, *Bioelectrochemistry* 140 (2021) 1567-5394.
- [14] M. Golzio, J. Teissie, M.P. Rols, Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 1292–1297.