

Genska elektrotransfekcija na komercialno dostopnih poroznih insertih

Tina Vindiš, Anja Blažič, Tjaša Potočnik, Shaurya Sachdev, Lea Rems

¹Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška cesta 25, Ljubljana, Slovenija
E-pošta: tina.vindis3@gmail.com

Gene electrotransfer on the commercial porous inserts

Abstract. Electroporation is a technique where the permeability of the cell membrane is increased by exposing biological cells to pulsed electric field, allowing therapeutic molecules to be introduced into the cell. Delivery of genetic material into cells using electroporation, known as Gene Electrotransfer (GET), is crucial for gene therapy and gene editing. The disadvantage of conventional GET is the highly permeabilized cell membrane, which can cause severe cell damage often leading to cell death. By localizing electric field over a small membrane area using nanochannels, nanostraws and nanopores, it is possible to improve GET efficiency while providing greater cell survival and better control over gene expression. The disadvantages of such nanofabricated devices are that they are not widely available and require expertise in nanofabrication and access to cleanroom. It has recently been shown that highly efficient electrotransfer of plasmids can be achieved using commercial polycarbonate membranes with 0.1 μm diameter nanopores. In this study, we tested whether similar transfection efficiency can be achieved using membranes with larger pores (0.4 μm pore diameter) which are commercially available in the form of cell culture inserts. We first determined the parameters that would lead to successful gene transfection with numerical models and then performed experiments on mammalian cells.

1 Uvod

Eden prvih konceptov, ki temelji na nanostrukturni geometriji v namen zmanjšanja poškodbe celic in povečanja nadzora nad procesom dostave genskega materiala v celico predstavlja nanokanal, ki povezuje dva mikrokanala [1]. Celico namestimo v en mikrokanal, v drugega pa raztopino s plazmidno DNK, oziroma drugimi molekulami, ki jih želimo prenesti preko nanokanala v celico. Ob dovedenem napetostnem pulzu se znotraj nanokanala, ki predstavlja najvišjo upornost sistema, električno polje močno poveča, kar omogoči elektroforetični prenos nabitih molekul iz enega mikrokanala v celico v nasprotnem mikrokanalu. Spreminjanje trajanja dovedenih pulzov omogoča nadzor nad količino vnosa molekul v celico. Kasnejši sorodni koncepti vključujejo nanofabricirane strukture, kot so nanoslamice [2] in porozne membrane, na katerih raste celična kultura [3]. Omejitev vseh teh konceptov je, da zahtevajo strokovno znanje o nanofabrikaciji in dostop do čistih prostorov (*angl. cleanroom*).

Nedavno so raziskovalci [4], [5] predlagali sistem, ki temelji na držalu iz polidimetilsiloksana (PDMS) s komercialno dostopno polikarbonatno membrano, ki vsebuje pore s premerom 0,1-0,2 μm in se navadno uporablja za filtracijo vode. Z električnimi pulzi so omogočili dostavo učinkovin v obliki nukleinskih kislin, proteinov in ribonukleoproteinov v celice pritrjene na membrano. S svojim sistemom so dosegli visoko učinkovito transfekcijo (do 80 %) brez znatnega vpliva na preživetje celic (<5 % mrtvih celic) [4]. Njihova študija nas je navdihnila, da smo preizkusili, ali je mogoče podoben uspeh doseči s poroznimi membranami vgrajenimi v komercialne inserte, ki se uporabljajo predvsem za raziskave transporta zdravil prek celičnega monosloja, invazije in migracije celic ter kemotaksijo [6]. Predvidene prednosti insertov za GET so, da so njihove membrane že predhodno pripravljene za optimalno pritrditev celic in ne potrebujejo posebne opreme za sestavljanje. Izbrali smo cenovno dostopne inserte s poroznimi membranami iz politetilena tereftalata (PET), ki omogočajo tudi opazovanje celic in vnosa molekul z invertiranim mikroskopom.

Najprej smo z numeričnimi modeli določili parametre, ki omogočajo učinkovito gensko elektrotransfekcijo in nato poskuse naredili na celicah sesalcev.

2 Materiali in metode

2.1 Numerično modeliranje

V programskem okolju Comsol Multiphysics 6.0, ki temelji na metodi končnih elementov, smo naredili dva modela, kjer smo najprej modelirali elektroporacijo celice na majhnem delu porozne membrane in nato model celotnega sistema z insertom s porozno membrano, prevodnim medijem in parom elektrod (Slika 1). Porazdelitev električnega potenciala je bila določena z rešitvijo enačbe

$$-\nabla \cdot \left[(\sigma_{i,e} + \varepsilon_{i,e} \frac{\partial}{\partial t}) \nabla V_{i,e} \right] = 0 \quad (1)$$

kjer $\sigma_{i,e}$ in $\varepsilon_{i,e}$ predstavljata prevodnost in dielektričnost znotrajceličnega (indeks i) in zunajceličnega (indeks e) medija. Celična membrana je bila modelirana kot tanka plast z dano prevodnostjo in dielektričnostjo. Povečanje prepustnosti celične membrane zaradi elektroporacije je določeno z enačbo [7]

$$\frac{dN}{dt} = \alpha (v_m/v_{ep})^2 \left(1 - \frac{N}{N_0} e^{-q(\frac{v_m}{v_{ep}})^2} \right) \quad (2)$$

kjer N predstavlja gostoto por v celični membrani, ki nastane zaradi električnega polja, N_0 predstavlja gostoto

por pred dovedenim pulzom, α , q in V_{ep} pa opisujejo karakteristiko elektroporacije. Porozna membrana je bila prav tako modelirana kot tanka plast z dano efektivno prevodnostjo, ki je funkcija poroznosti in velikosti por v membrani.

$$G_{PET,eff} = \rho_{PET} \frac{2\sigma_e \pi (r_p)^2}{\pi r_p + 2d_{PET}} \quad (3)$$

Parametre modelov predstavlja Tabela 1.

Tabela 1. Parametri modela

Parameter	Simbol	Vrednost
Prevodnost zunajceličnega medija [izmerjeno ¹]	σ_e	1,5 S/m
Prevodnost znotrajceličnega medija [6]	σ_i	0,5 S/m
Prevodnost celične mem. [6]	G_{cm}	2 S/m ²
Kapacitivnost celične membrane [6]	C_{cm}	0,01 F/m ²
Debelina celične membrane [5]	d_{cm}	5 nm
Radij elektropore [5]	r_p	1 nm
Prevodnost elektropore [5]	σ_p	$(\sigma_e - \sigma_i) / \ln(\frac{\sigma_e}{\sigma_i})$
Elektroporacijska konstanta [6]	q	2,46
Parameter elektroporacije [6]	α	10 ⁹ m ² s ⁻¹
Karakteristična napetost elektroporacije [6]	V_{ep}	0,25 V
Ravnotežna gostota por [6]	N_0	1,5 · 10 ⁹ m ⁻²
Debelina porozne mem. [8]	d_{PET}	10 mm
Poroznost porozne mem. [8]	ρ_{PET}	2,0 · 10 ⁶ cm ⁻²
Efektivna prevodnost porozne mem. [enačba (3)]	$G_{PET,eff}$	366 S/m ²

¹ Prevodnost LCIS izmerjena s konduktometrom

Geometrijo modela celice na porozni membrani obdani z prevodnima medijema predstavlja Slika 1a. Zgornji in spodnji ploskvi je bil pripisan električni potencial v časovni obliki 10 ms pulza. PET material je bil definiran kot idealni izolator. Z modelom smo raziskali, kako velikost por v porozni membrani in napetost, ki se vzpostavi na porozni membrani, vplivata na celično elektroporacijo.

Celotni eksperimentalni sistem je sestavljen iz jamice mikrotitrne plošče z medijem, v katero je potopljen insert s porozno membrano na kateri raste celična kultura. Uporabili smo žične elektrode iz zlitine Pt/Ir s premerom 0.5 mm in spodnjo elektrodo oblikovali v spiralo, zgornjo elektrodo pa v obliko črke *L*. Numerični model prikazuje Slika 1b.

2.2 Eksperimentalno delo

V vsak insert (Falcon #353095) smo nasadili 8000 ovarijskih celic kitajskega hrčka (CHO) in jih gojili v 25 mm² posodicah v gojišču HAM's F12 (HAM's Nutritieon Mix, Gibco) dva dni v vlažnem ozračju pri 37°C in 5% CO₂. Na dan poskusov je bil posamezni insert nameščen v jamico pripadajoče mikrotitrne plošče na dvignjene zavihke, ki omogočajo dobro definirano razdaljo med dnom mikrotitrne plošče in insertom. V jamici se je nahajala raztopina plazmidne DNK (pEGFP-N1, volumna 1 ml s koncentracijo 100 µg/ml ali volumna 0.4 ml s koncentracijo 500 µg/ml), ki kodira zeleni fluorescentni protein (eGFP). Zgornja elektroda je bila pozitivna za prenos negativno nabitega plazmida iz spodnjega medija skozi pore porozne membrane v celice in zgornji medij. Za elektroporacijo smo uporabili elektroporator ELECTRO cell B10 (Lecroy Biotech). Dovedli smo od 1 do 12 pulzov dolžine 10 ms pri napetostih med 10 V in 40 V in ponavljalni frekvenci 1 Hz. Pri vsakem nizu poskusov smo imeli kontrolni insert, ki je bil le potopljen v plazmid za 1 min. Ostali inserti so bili potopljani v raztopino s plazmidom in po dovedenem pulzu ostali v njej še 1 min. Insert smo nato prenesli v 800 µl svežega gojišča v mikrotitrsko ploščo (Falcon #353504) in postavili v inkubator za 24 ur. Nato smo določili delež transfeciranih celic in preživetje celic.

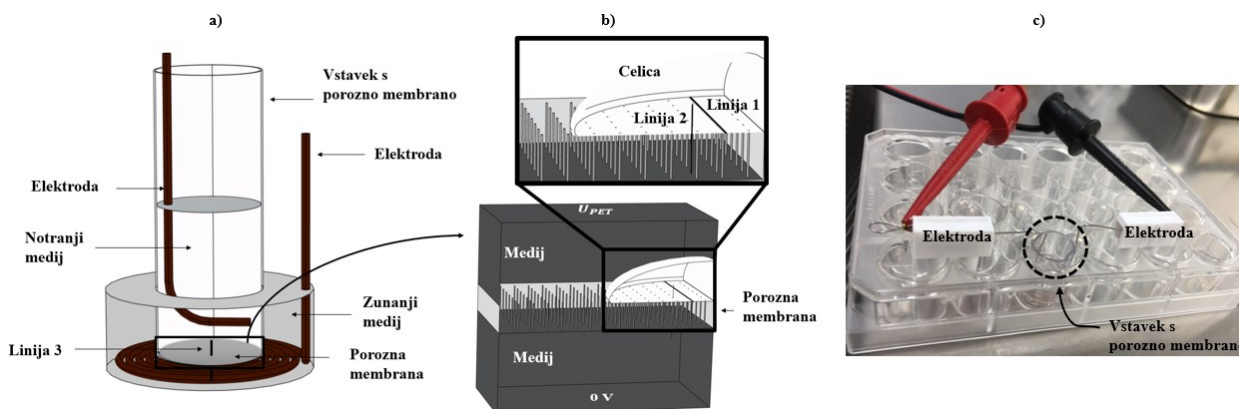
Delež transfeciranih celic smo določili s pretočnim citometrom Attune NxT. Celice v insertih so bile najprej odstranjene s podlage s tripsinizacijo, celična suspenzija pa je bila nato centrifugirana s centrifugo Sigma 3-16 PK (5 minut na 4°C in 200g) in resuspendirana v fosfatnem pufru (PBS). Za vzbujanje fluorescence eGFP je bila izbrana valovna dolžina 488 nm, oddana fluorescenca pa je bila spuščena skozi 530/30 nm filter. Za vsako meritev smo zabeležili nad 8000 dogodkov.

Delež preživelih celic je bil določen z metabolnim testom CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS, Promega). 24 ur po transfekciji je bil celicam v insertih dodanih 40 µl MTS reagenta na 200 µl gojišča. Po 4 urah inkubacije na 37°C je bilo 120 µl gojišča z MTS prenešenega v ploščo s 96 jamicami, absorbanca vzorcev pa prebrana pri 490 nm s spektrofotometrom Infinite M200 (Tecan).

3 Rezultati in razprava

3.1 Rezultati numeričnega modela celice na porozni membrani

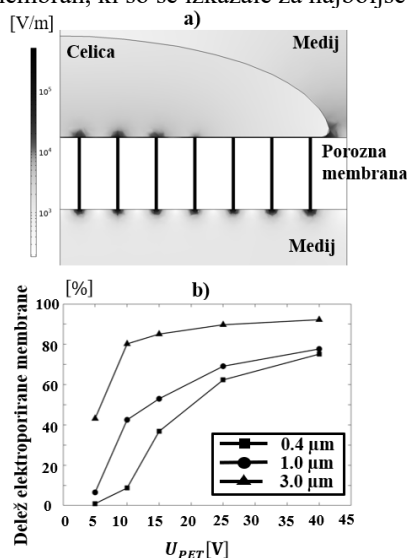
Z numeričnim modelom smo potrdili, da se znotraj por poroznih membran električno polje ojači (Slika 2a). Preučili smo porozne membrane z velikostjo por 0.4 µm, 1.0 µm in 3.0 µm. Ko dovedemo električni pulz, lokalizirano električno polje doseže dele celične membrane, ki so nad porami porozne membrane, in povzroči elektroporacijo, ki v celični membrani ustvari "elektropore".



Slika 1 a) Numerični model sestavlja cilindar, ki predstavlja insert, porozna membrana na dnu pa je definirana z robnim pogojem. Znotraj in zunaj cilindra se nahaja prevodni medij. Razdalja med dnom in insertom znaša 0,8 mm, določena pa je na podlagi podatkov pripadajoče 24-jamične plošče. Spiralna elektroda se nahaja v zunanjem mediju, znotraj cilindra pa je notranja L elektroda. b) Model je sestavljen iz porozne membrane, medijema na obeh straneh in celice. Pore porozne membrane so razporejene v nizu, ki posnema povprečno poroznost poroznih membran, uporabljenih pri poskusih. c) Realni sestav z elektrodama insertom znotraj mikrotitrne plošče in elektrodama povezanimi z elektroporatorjem.

Pri uporabi 0,4 μm por se elektroporacija pojavi pri napetosti porozne membrane $\sim 5\text{ V}$ in ostane lokalizirana na bližino por porozne membrane do $\sim 15\text{ V}$. Pri uporabi membran z 1,0 μm in 3,0 μm porami pride do elektroporacije pri $\sim 3\text{ V}$, vendar je že pri 7,5 V (3,0 μm) poriran 80 % in pri 15 V (1,0 μm) 50 % delež celične membrane (Slika 2b).

Če je elektroporiran prevelik del celične membrane, lahko privede do znatnih poškodb celice, zato smo za eksperimente in doseganje lokalizirane elektroporacije membrane s premerom por 3,0 μm izključili iz nadaljnje študije, v članku pa predstavimo le rezultate 0,4 μm poroznih membran, ki so se izkazale za najboljše.



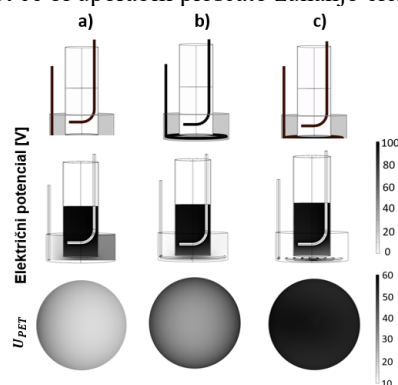
Slika 2. a) 2-D prerez porazdelitve električnega polja v ustaljenem stanju in b) delež elektroporirane celične membrane pri različnih napetostih na porozni membrani.

3.2 Rezultati numeričnega modela sistema inserta s porozno membrano

Preverili smo porazdelitev električnega potenciala po celotnem sistemu in določili, kakšna naj bo dovedena

napetost prek elektrod, da bomo zagotovili želeno napetost na porozni membrani na podlagi numeričnih izračunov modela celice na porozni membrani. Dovedli smo pulz dolžine 10 ms pri napetosti 100 V in opazovali porazdelitev električnega polja pri spreminjanju konfiguracije in položaja elektrod. Ker je sistem linearen smo lahko preračunali, kakšno dovedeno napetost potrebujemo.

Če smo zunanjo elektrodo le potopili v zunanji medij in dovedli napetost, smo dobili najslabše rezultate, pri katerih je napetost na porozni membrani nehomogena in variira med 20 % in 40 % dovedene napetosti. Z zunanjo krožno elektrodo smo dosegli boljše rezultate, vendar je napetost na porozni membrani variirala med 30 % in 50 % dovedene napetosti. S spiralno zunanjo elektrodo pa dosežemo homogenost čez celotno porozno membrano, kjer se potencial giblje nad 50 % dovedene napetosti (Slika 3). Število zavojev spiralne elektrode ne vpliva bistveno na porazdelitev potenciala, rezultati pa so podobni, kot če bi uporabili ploščato zunanjo elektrodo.



Slika 3. Konfiguracija notranje L elektrode in zunanje (I) ravne, (II) krožne in (III) spiralne elektrode z električnim potencialom celotnega sistema in napetosti na porozni membrani U_{PET} .

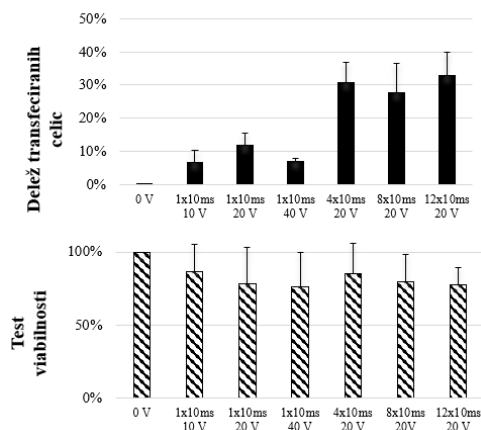
3.3 Eksperimenti s končnim sestavom

Pri končnem eksperimentalnem sestavu so bile žične elektrode z inštalacijsko sponko pritrjene na 24-jamično ploščo (Slika 1c). Spodnja elektroda je bila spiralna in se

pritskala ob dno, zgornja pa se je nahajala približno 2 mm do 3 mm nad porozno membrano. Insert je bil postavljen na dvignjene zavihke pripadajoče plošče in s tem 0,8 mm oddaljen od dna.

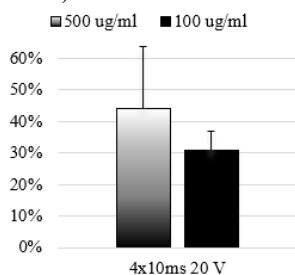
3.3.1 Genska elektrotransfekcija

Celice priraščene na porozno membrano inserta smo postavili bodisi enemu 10 ms pulzu napetosti 10 V, 20 V ali 40 V bodisi več pulzom (4, 8 ali 12) napetosti 20 V.



Slika 4. Delež transficiranih celic in test viabilnosti

Pri enem dovedenem pulzu je bil delež transficiranih celic najvišji pri 20 V in je dosegel 12 %. Z večanjem števila pulzov pa se je povečal tudi delež transficiranih celic in je segel čez 30 %. Preživetje celic po elektroporaciji in genski transfekciji se je gibalo okoli 80 % pri vseh poskusih (Slika 4). S povečanjem koncentracije plazmida smo pri 4 dovedenih pulzih 20 V dosegli 44 % transfekcijo (Slika 5).



Slika 5. Primerjava deleža transficiranih celic pri 100 ug/ml in 500 ug/ml koncentraciji plazmida

Dobljeni rezultati so sicer slabši od študije Cao et al (~80 % transfekcija)[4], ki nas je navdihnili na izvedbo poskusov s komercialno dostopnimi poroznimi membranami. Slabši rezultati so lahko posledica večjih por pri naši študiji (0,4 μ m), zaradi katerih lahko med elektroporacijo skozi pore porozne membrane prehaja več škodljivih snovi, ki so produkti elektrokemične reakcije na stiku kovinske elektrode z elektrolitom. Vendar pa neposredna primerjava naših rezultatov z rezultati Cao et al. [4] ni možna, saj so slednji opravili poskuse na drugih celičnih

linijah s poroznimi membranami, ki imajo poleg manjših por tudi večjo poroznost ter so narejene iz polikarbonata.

Rezultati naše študije so primerljivi z rezultati GET pri klasični elektroporaciji (~40 % transfekcija)[9]. Ena od prednosti uporabe poroznega inserta je uporaba nižje napetostnih pulzov, zaradi česar lahko namesto dragih elektroporatorjev uporabimo preprosto vezje. Porozne membrane so prav tako komercialno in stroškovno dostopne vsakemu laboratoriju, za sestavo eksperimentalnega sistema pa ne potrebujemo nikakršne posebne opreme in prostorov. Rezultati naše študije lahko tudi nakazujejo na možnost izdelave manjših por v že obstoječe inserte in s tem stroškovno ugodno gensko elektrotransfekcijo.

4 Zahvala

Delo je podprto s strani Evropske komisije (projekt št. 893077 in 101038051) in ARRS (projekt št. J2-2503 in I0-0022 ter financiranje MR P2-0249).

5 Reference

- [1] P. E. Boukany *et al.*, "Nanochannel electroporation delivers precise amounts of biomolecules into living cells," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 11, pp. 747–754, Nov. 2011, doi: 10.1038/nnano.2011.164.
- [2] Y. Cao *et al.*, "Universal intracellular biomolecule delivery with precise dosage control," *Sci. Adv.*, vol. 4, no. 10, p. eaat8131, Oct. 2018, doi: 10.1126/sciadv.aat8131.
- [3] L. Chang *et al.*, "3D nanochannel electroporation for high-throughput cell transfection with high uniformity and dosage control," *Nanoscale*, vol. 8, no. 1, pp. 243–252, 2016, doi: 10.1039/C5NR03187G.
- [4] Y. Cao *et al.*, "Nontoxic nanopore electroporation for effective intracellular delivery of biological macromolecules," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 116, no. 16, pp. 7899–7904, Apr. 2019, doi: 10.1073/pnas.1818553116.
- [5] P. Mukherjee, S. S. P. Nathangari, J. A. Kessler, and H. D. Espinosa, "Combined Numerical and Experimental Investigation of Localized Electroporation-Based Cell Transfection and Sampling," *ACS Nano*, vol. 12, no. 12, pp. 12118–12128, Dec. 2018, doi: 10.1021/acsnano.8b05473.
- [6] T. Vindiš, A. Blažič, D. Khayyat, T. Potočnik, S. Sachdev, and L. Rems, "Gene Electrotransfer into Mammalian Cells Using Commercial Cell Culture Inserts with Porous Substrate," *ENGINEERING*, preprint, Jul. 2022. doi: 10.20944/preprints202207.0272.v1.
- [7] K. A. DeBruin and W. Krassowska, "Modeling Electroporation in a Single Cell. I. Effects of Field Strength and Rest Potential," *Biophys. J.*, vol. 77, no. 3, pp. 1213–1224, Sep. 1999, doi: 10.1016/S0006-3495(99)76973-0.
- [8] Corning Incorporated, "Permeable Supports Selection Guide." Accessed: Jul. 17, 2022. [Online]. Available: https://www.dutscher.com/data/pdf_guides/en/Guide_selection_inserts_culture_transwell_falcon.pdf
- [9] T. Potočnik, D. Miklavčič, and A. Maček Lebar, "Gene transfer by electroporation with high frequency bipolar pulses in vitro," *Bioelectrochemistry*, vol. 140, p. 107803, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.bioelechem.2021.107803.