

Valsts pētījumu programmas "BIOMEDICINE" 7. projekta "DNS, RNS, proteīnu, peptīdu un mazmolekulāro medicīnisko preparātu piegādes sistēmas izstrādāšana" pārskata seminārs

Nevirālās gēnu transfekcijas optimizācija *in vitro* – progress un perspektīva

Gunita Apsīte

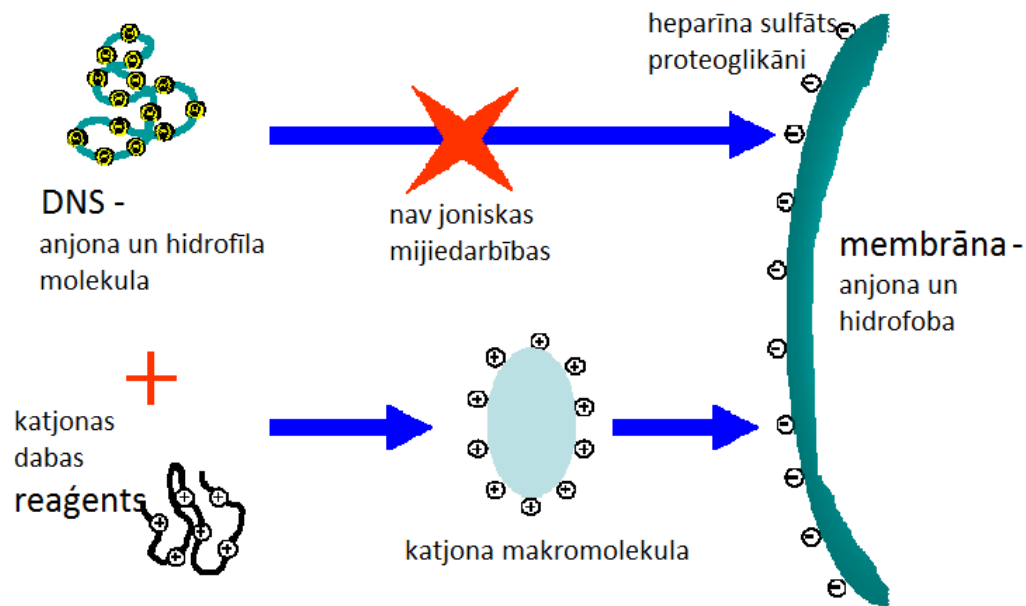


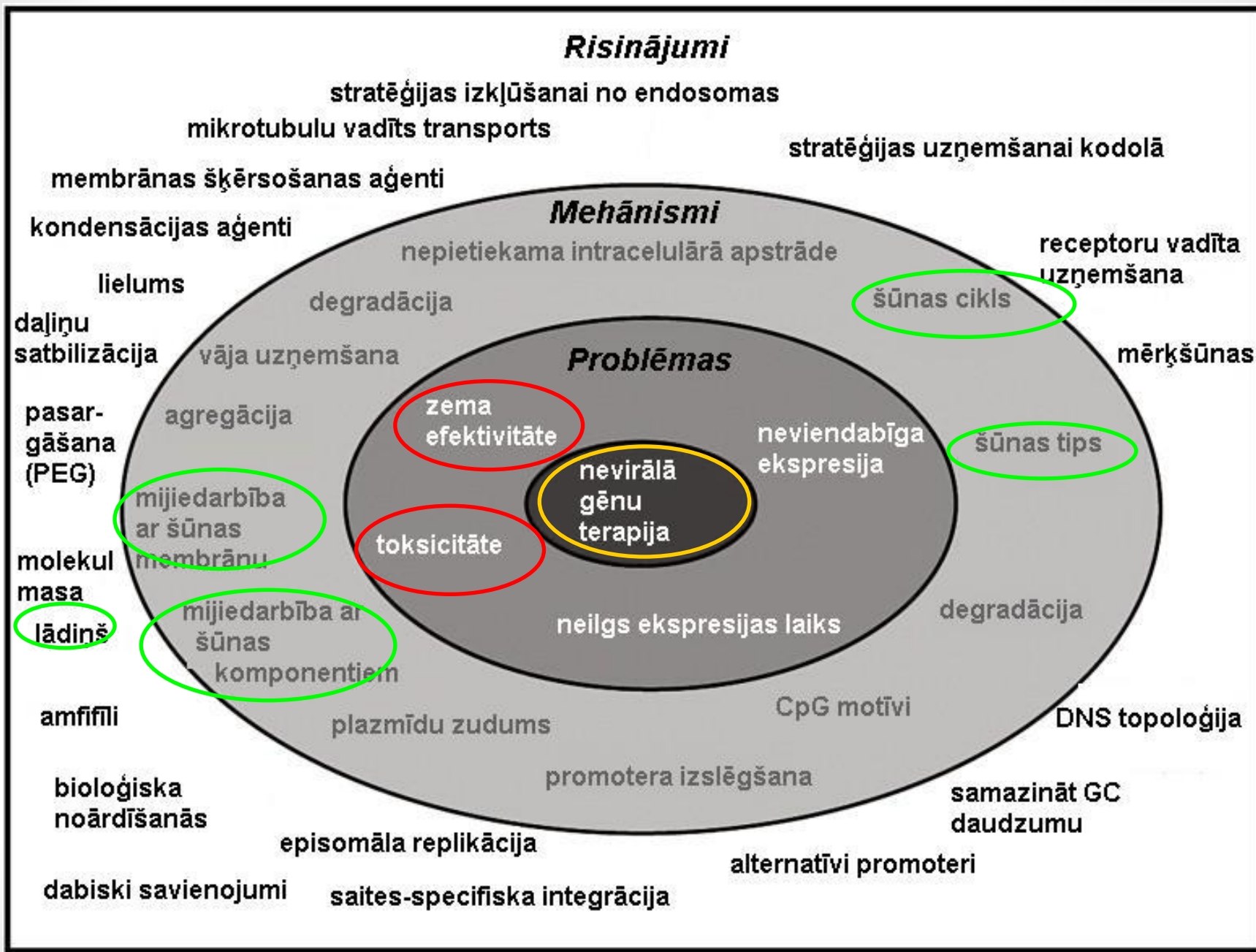
Latvijas Biomedicīnas
pētījumu un studiju centrs
biomedicīnas pētījumi un izglītība no gēniem līdz cilvēkam

11.12.2012.

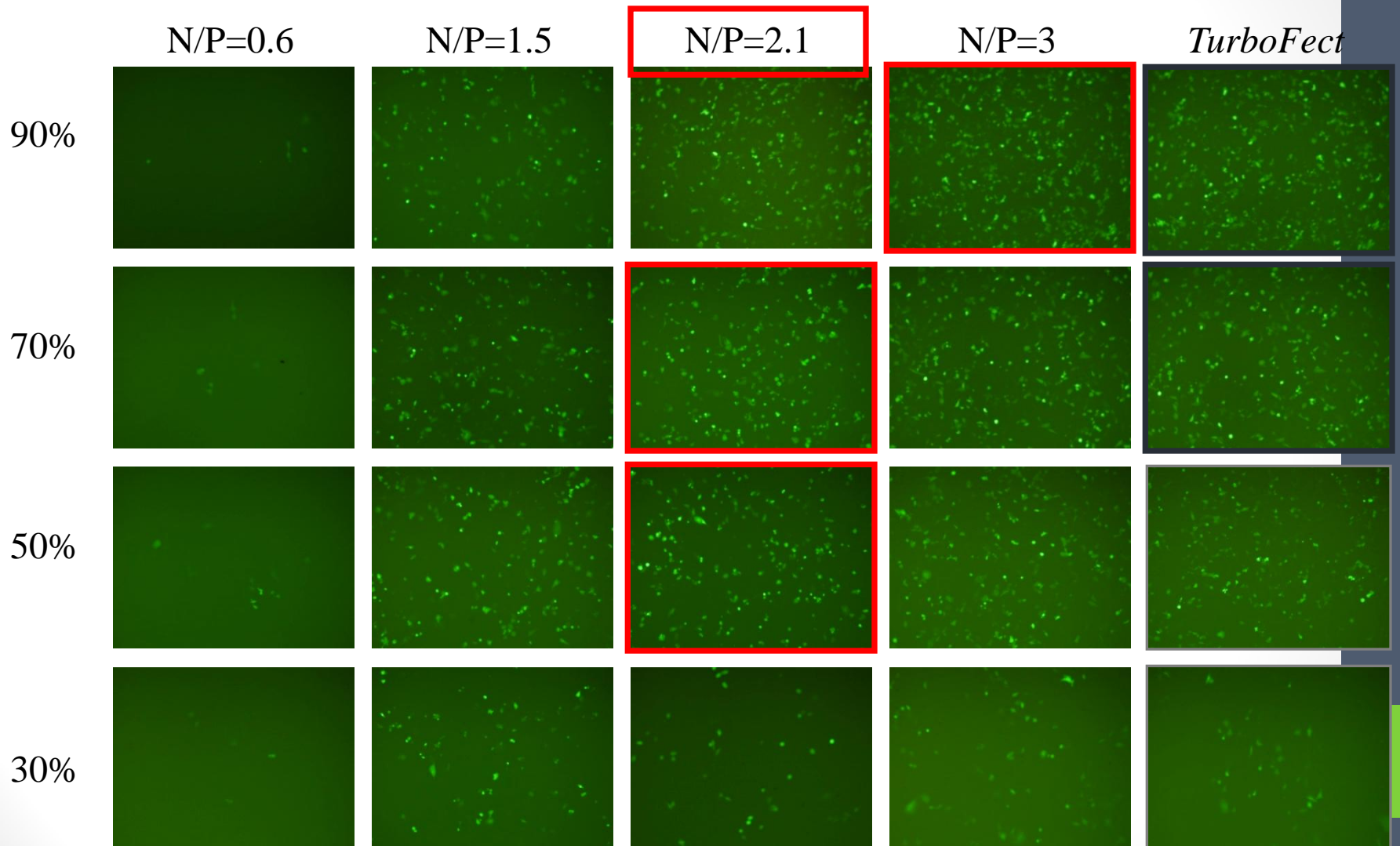
Nevirālā transfekcija, izmantojot katjonu lipīdus

- Katjonie lipīdi ir visvairāk izmantotie transfekcijas reaģenti nukleīnskābju transportēšanā (Even-Chen et al. 2012).
- Nepatogēni, salīdzinoši lēti un viegli producējami (Wang et al. 2012).





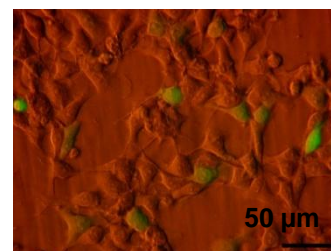
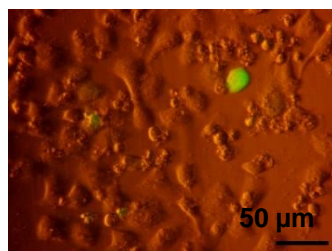
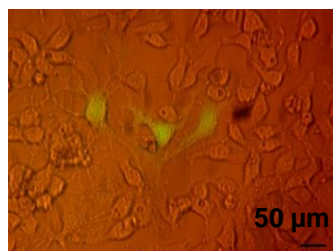
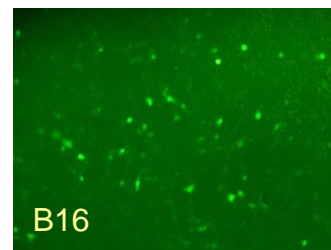
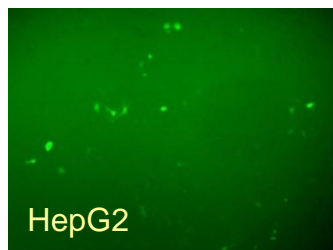
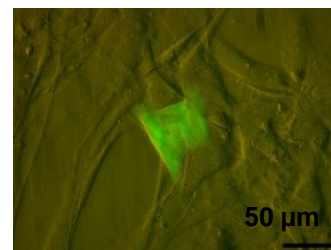
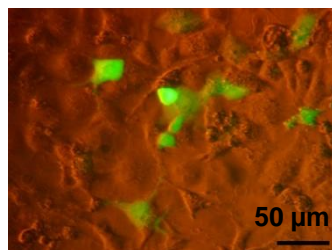
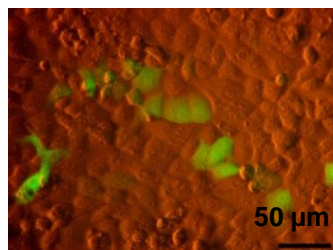
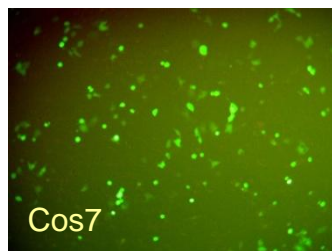
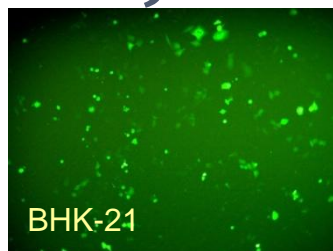
GTR D19 efektivitātes izvērtējums



Fluorescējošais mikroskops, 200x palielinājums

BMC, 2011

C12-Man-Q aktivitāte dažādās šūnu līnijās



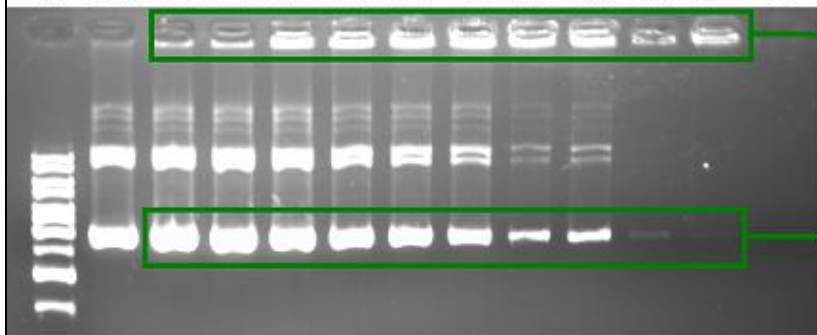
Kompleksa sagatavošanas vides

+NaCl

-NaCl

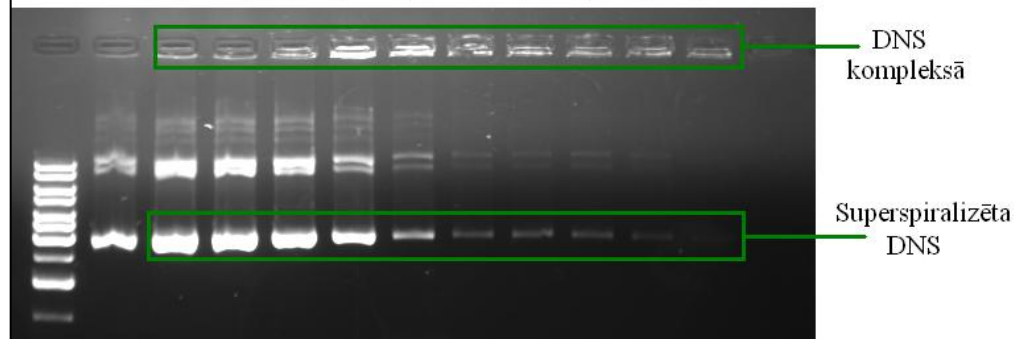
1,4-DHP atvasinājuma katjona attiecība pret vienu DNS

M DNS 0,15 0,3 0,6 0,9 1,2 1,5 1,8 2,1 2,4 2,7 R

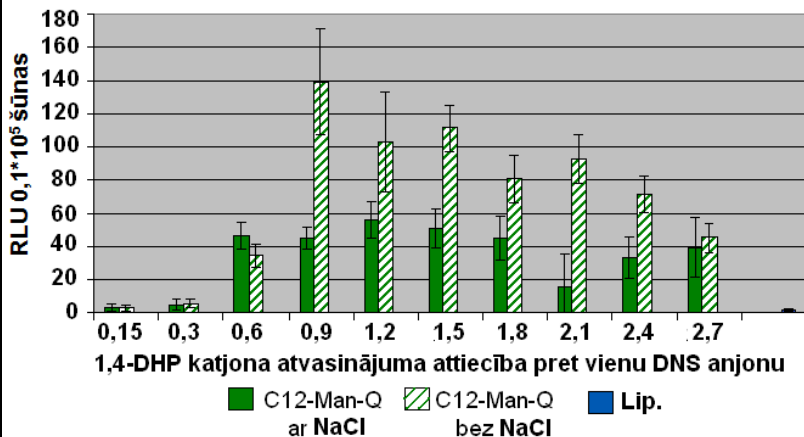


1,4-DHP atvasinājuma katjona attiecība pret vienu DNS anjonu

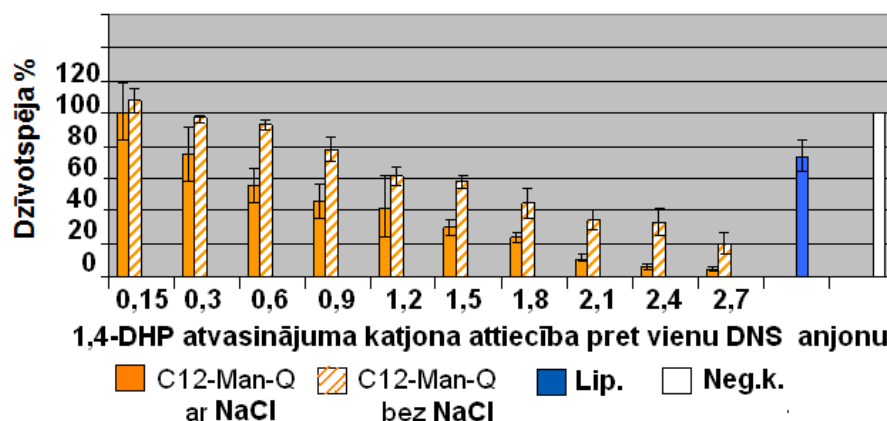
M DNS 0,15 0,3 0,6 0,9 1,2 1,5 1,8 2,1 2,4 2,7 R



Luciferāzes enzīma aktivitāte BHK-21 šūnu lizātos 24 h pēc transfekcijas ar reaģentu C12-Man-Q



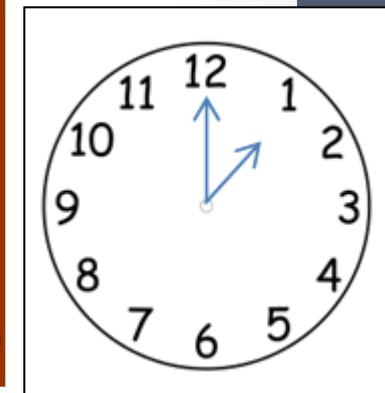
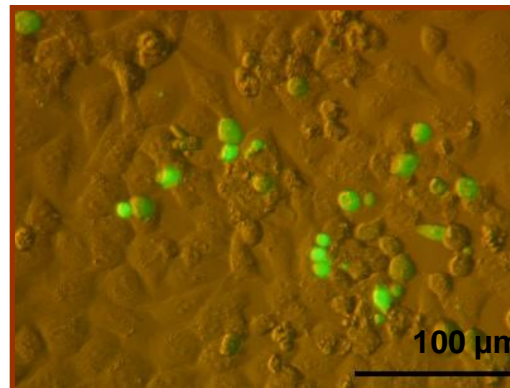
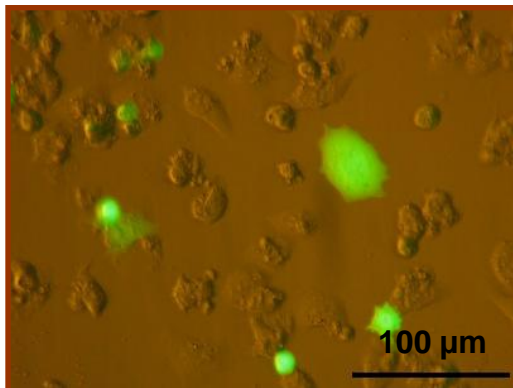
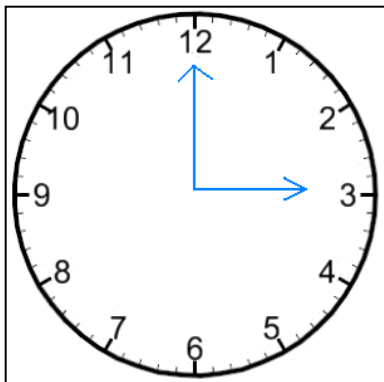
BHK-21 šūnu dzīvotspēja 24 h pēc transfekcijas ar reaģentu C12-Man-Q



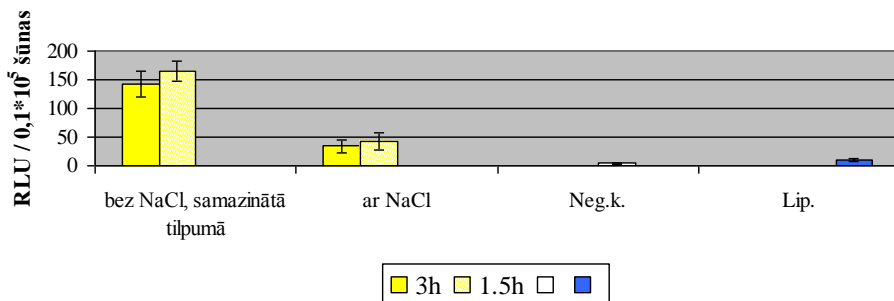
NaCl ietekme

- Izmaiņas sāļu koncentrācijā kompleksu veidošanās laikā var ietekmēt to lādiņu, izmēru, kā arī DNS atbrīvošanu (Leng et al. 2007)
- Šūnas tolerē plašu NaCl koncentrāciju rangu, tomēr virs un zem šī ranga tās pielāgo metabolismu kā atbildi uz konkrētu NaCl koncentrāciju (E.Stubblefield, G.C. Mueller, 1960).
- Fizioloģiska pH bufera ar nelielu jonu spēku, kas papildināts ar glikozi (izo-osmotiskā koncentrācijā) izmantošana veicina elektrostatisko kompleksu veidošanos (E.V.B. Van Gaal et al. 2011).

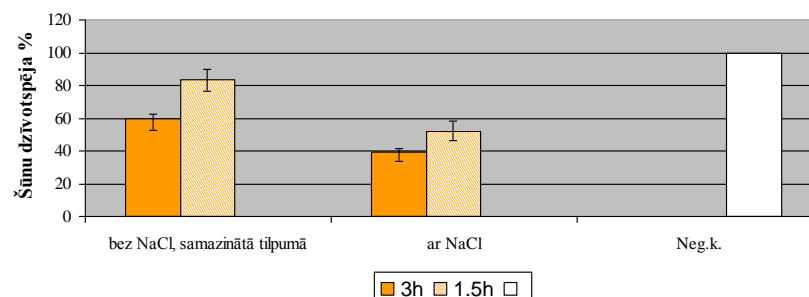
C₁₂-Man-Q/DNS kompleksu iedarbības laiks



C12-Man-Q/DNS kompleksu iedarbības laika ietekme uz transfekcijas efektivitāti BHK-21 šūnās



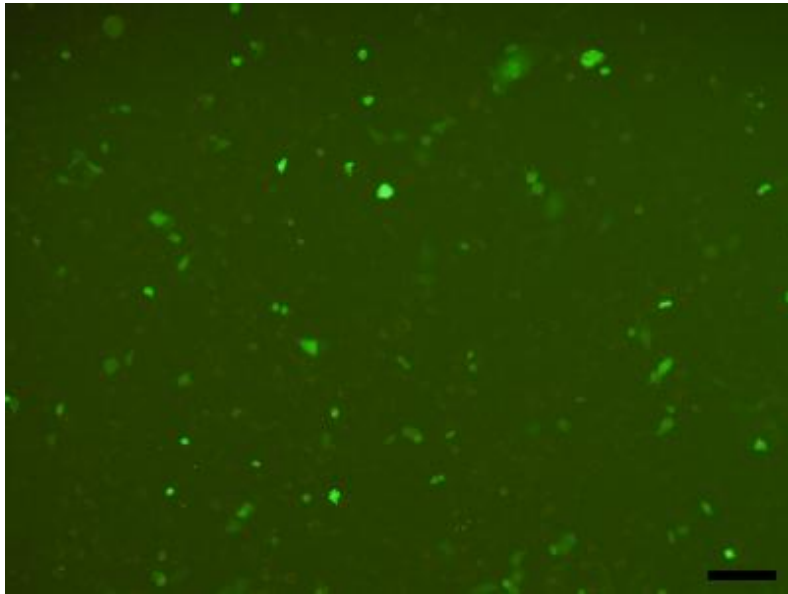
Transfekcijas kompleksu iedarbības laika ietekme uz BHK-21 šūnu dzīvotspēju 24h pēc transfekcijas



Secinājumi:

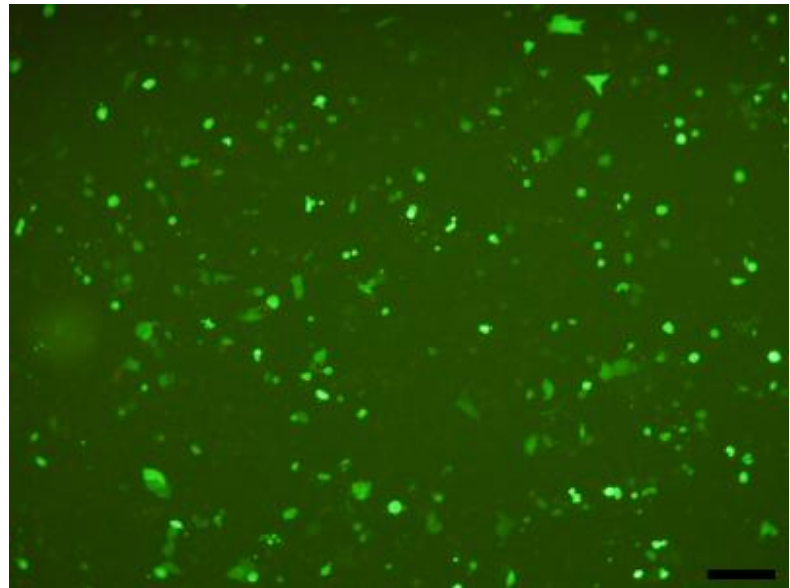
1. Katram monoslāņa blīvuma ir sava optimālā N/P attiecība (izmantojamais reaģenta daudzums), ar ko transfekcija noris visefektīvāk.
2. Transfekcijas efektivāte nepieaug lineāri, palielinot N/P attiecību; kādā punktā tā sasniedz savu maksimumu un tad krītas.
3. Augstāka transfekcijas aktivitāte BHK-21 šūnās tiek sasniegta, kad transfekcijas kompleksi tiek sagatavoti vidē bez papildus NaCl un samazinātā barotnes tilpumā.
4. Transfekcijas kompleksu iedarbības laiku uz šūnām var samazināt no 3 h uz 1,5 h.

Uzlabota transfekcijas efektivitāte



Barotne ar papildus NaCl

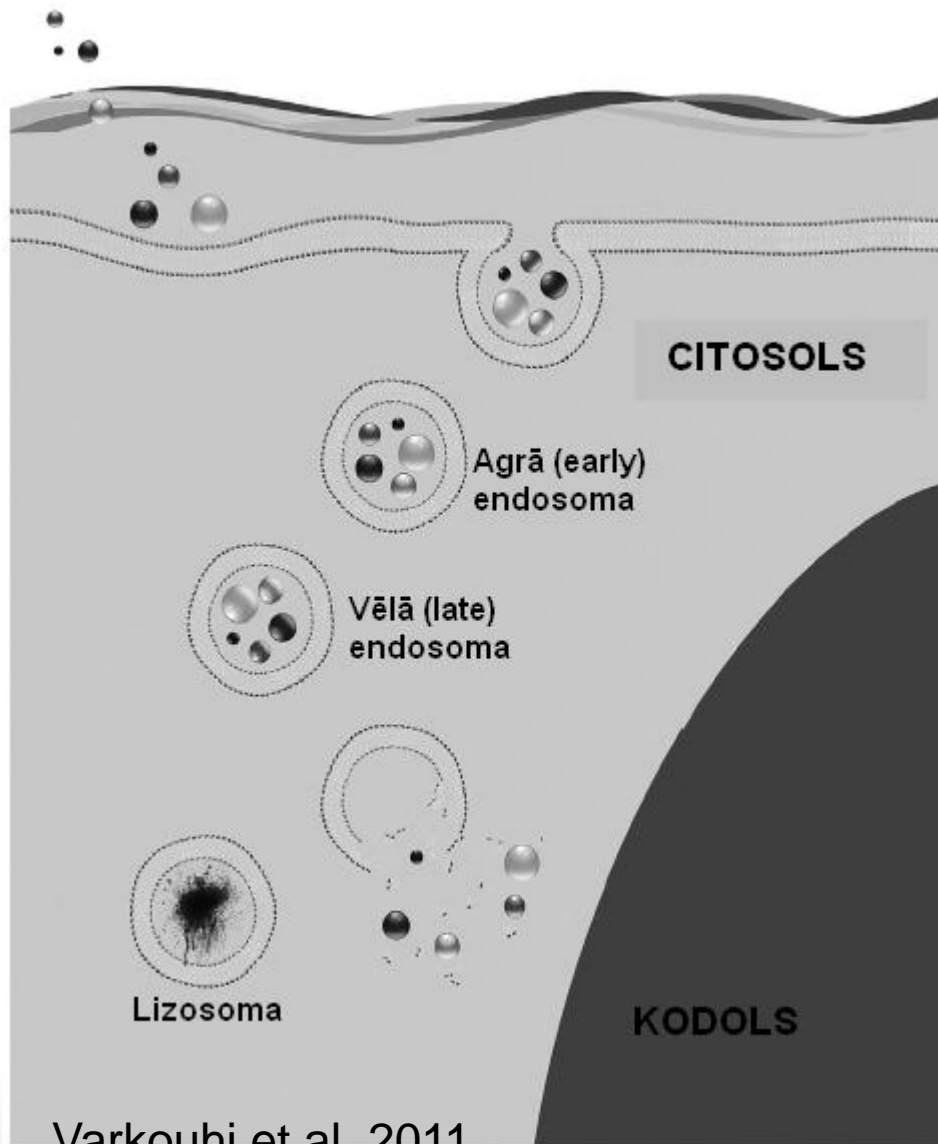
Kompleksa inkubācijas laiks
– 3h



Barotne bez papildus NaCl

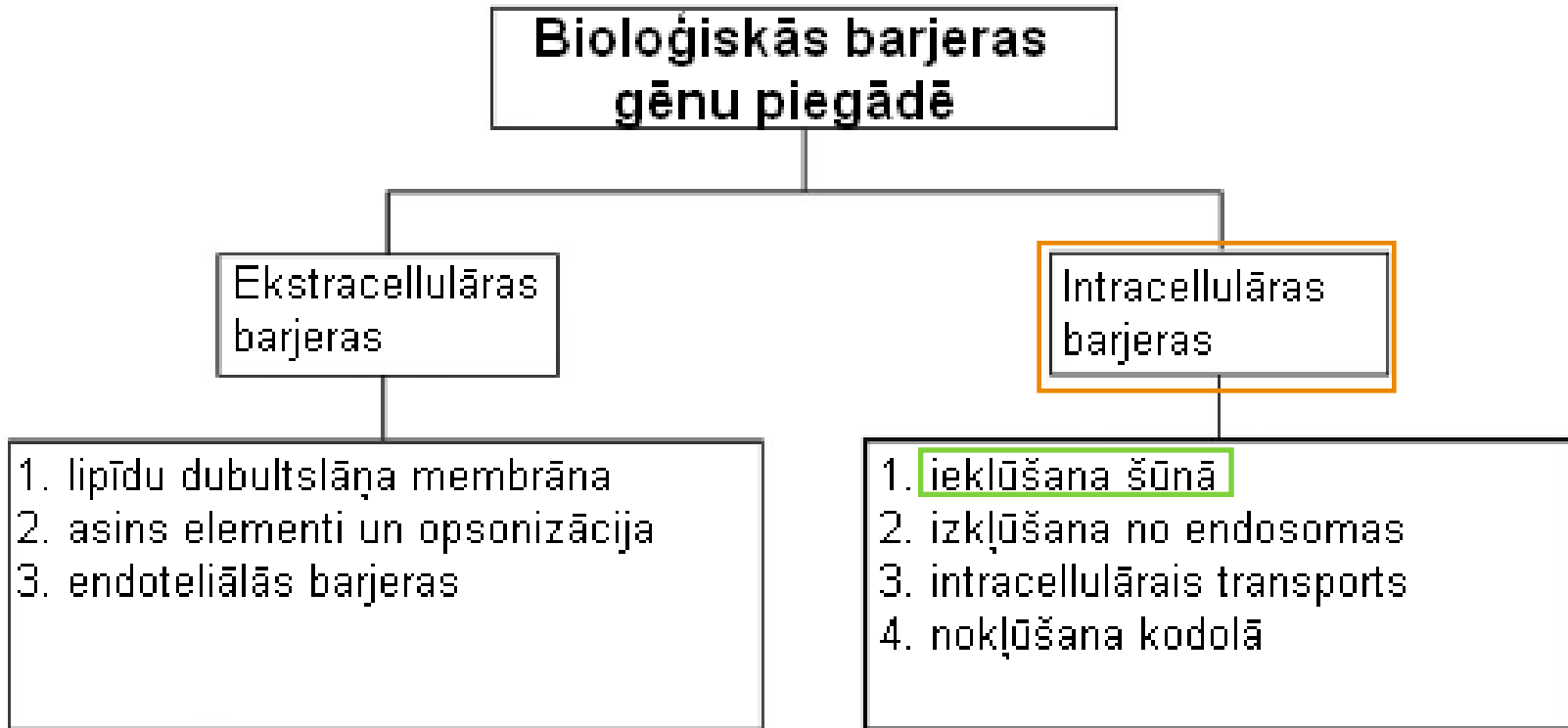
Kompleksa inkubācijas laiks –
1.5h

Pētījumu perspektīva

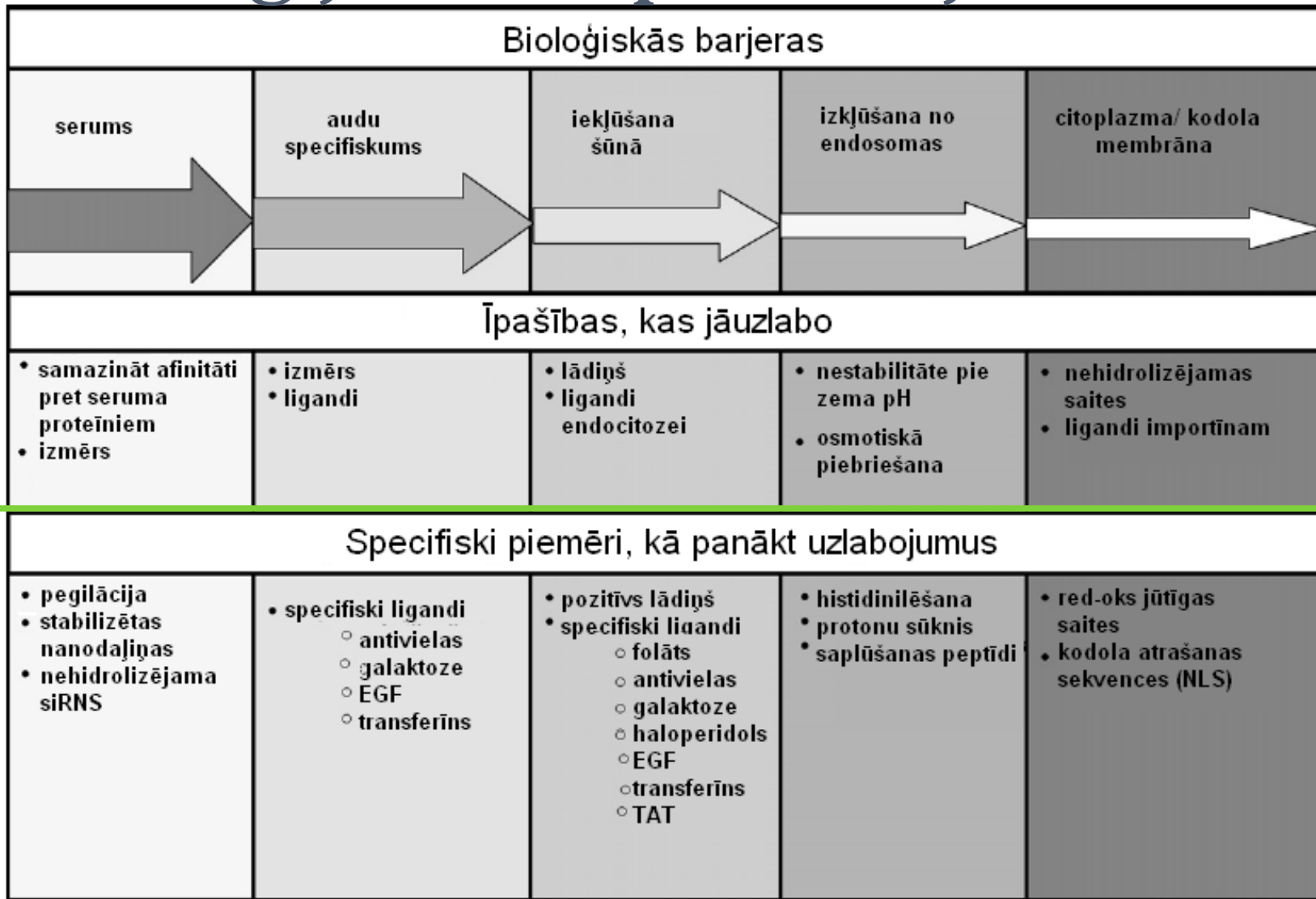


Neviralās gēnu piegādes sistēmas veiksmīgai izstrādei nepieciešama gan dziļa izpratne par gēna/nesēja mijiedarbību, gan par mehānismiem, kas iesaistīti kompleksa un mērķšūnas mijiedarbībā (Khalil et al. 2006).

Kāpēc viens reaģents ir aktīvs daudzās šūnu līnijās, bet cits tikai vienā?



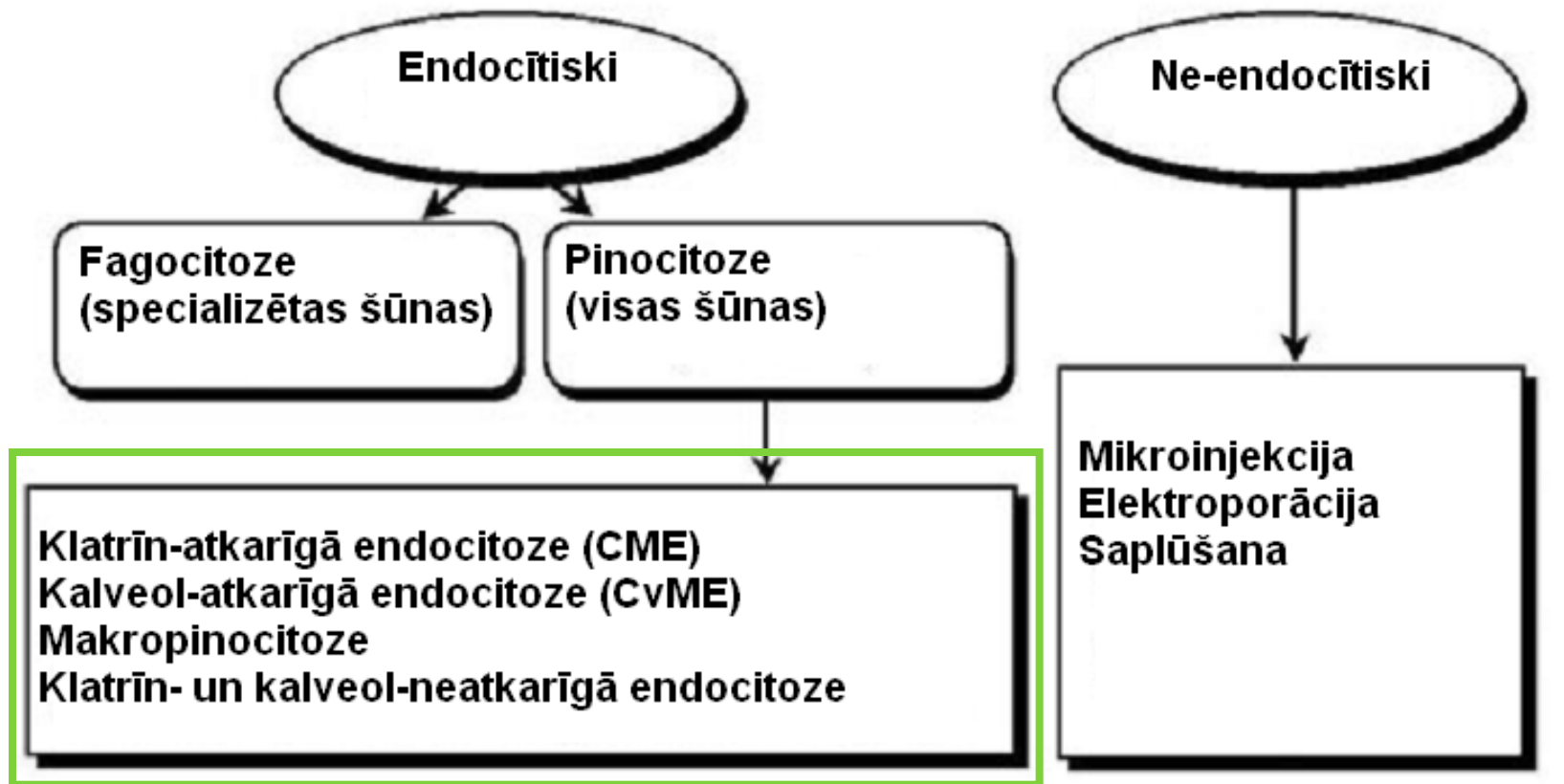
Stratēģijas, kā apiet barjeras



Iekļūšana šūnā

- Plazmatiskā membrāna – viskritiskākais šķērslis (Al-Dosari, Gao, 2009).
- Daļiņu lielums <200 nm (20-40nm – lielāka iespēja iekļūt šūnā) (Pathak et al. 2009).
- Kompleksa lādiņš (pozitīvs!).
- Šūnu tipa atkarīga (Xiang et al. 2012).

Nevirālās gēnu piegādes mehānismi iekļūšanai šūnā



Endocitisko ceļu inhibitori

Table 1

The markers, inhibitors, receptors and profile of the endocytosis pathways for non-viral gene delivery.

	Specific coating protein	GTPases	Receptors	Relationship with lysosome	Endocytic organelle	Probes and markers	Chemical inhibitors
Phagocytosis	Actin	Rho-family GTPases	FcR, CR, mannose/fructose and scavenger receptors, dectin-1	Phago-lysosome	Phagosome	Large microspheres (2 μm)	Amiloride, cytochalasin D, latrunculins, wortmannin, LY290042, sodium azide
CME	Clathrin	Dynamin	TFR, EGFR	Endo-lysosome	Endosome	Transferrin, lactosylceramide, TFR	<u>Chlorpromazine</u> , monodansylcadaverine, phenylarsine oxide, sodium azide
CvME	Caveolin	Dynamin	Insulin receptor, TGFbeta receptor	In dispute (involved with/without lysosome)	Caveosome	CTBs, caveolin-1	<u>Filipin</u> , nystatin, cholesterol oxidase, statins, genestein, MβCD, sodium azide
Macropinocytosis	Actin	Rab proteins	Non-special receptor	In dispute (involved with/without lysosome)	Macropinosome	Dextran	Rottlerin, amiloride, cytochalasin D, latrunculins, wortmannin, LY290042, sodium azide

TABLE 1
Perturbation of endocytosis and intracellular trafficking

Treatment	Effect	Mechanism	Reference
Low temperature	General inhibitor of endocytosis	Energy depletion	Lamaze and Schmid (1995)
Metabolic inhibitors	General inhibitor of endocytosis	Energy depletion	Saraste et al. (1986)
Potassium depletion	Specific inhibitor of CME	Dissociation of clathrin lattice	Larkin et al. (1983)
Cytosol acidification	Specific inhibitor of CME	Dissociation of clathrin lattice	Sandvig et al. (1987)
Hypertonic medium	Specific inhibitor of CME	Dissociation of clathrin lattice	Heuser and Anderson (1989)
<u>Chlorpromazine</u>	Specific inhibitor of CME	Dissociation of clathrin lattice	Wang et al. (1993)
<u>Filipin</u>	Specific inhibitor of caveolae	Cholesterol binding	Lamaze and Schmid (1995)
Nystatin	Inhibitor of caveolae	Sequester cholesterol	Lamaze and Schmid (1995)
Methyl-β-cyclodextrin	Inhibitor of caveolae	Deplete cholesterol	Lamaze and Schmid (1995); Zuhorn et al., (2002)
Genestein	Inhibitor of caveolae	Tyrosine kinase inhibitor	Orlandi and Fishman (1998)
Cytochalasins	Inhibitors of caveolae and macropinocytosis	Actin depolymerization	Parton et al. (1994)
<u>Amiloride</u>	Specific inhibitor of macropinocytosis	Inhibits the Na ⁺ /H ⁺ exchange protein	Hewlett et al. (1994)
Phorbol esters	Specific stimulators of macropinocytosis	Protein kinase C activators	Lamaze and Schmid (1995)
Wortmannin	Inhibitor of macropinocytosis	Phosphatidylinositol-3-phosphate inhibitor	Arcaro and Wymann (1993)
Monensin	Inhibitor of endosome maturation	Prevents endosome acidification	Mollenhauer et al. (1990)
Chloroquine	Disrupting endosomes and lysosomes	Prevents endosome acidification and causes swelling to endosomes and lysosomes	de Duve et al. (1974); Wattiaux et al. (2000)

Paldies par uzmanību!