

## POTENTIAL OF CATIONIC LIPOSOMES AND CHITOSAN NANOPARTICLES FOR DELIVERY DNA VACCINE MODEL NTC8685-EGFP

Lalu Unsunidhal<sup>1</sup>, Raudatul Jannah<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Tenggara Barat, Indonesia

<sup>2</sup>Program Studi Kebidanan, STIKES YARSI Mataram, Indonesia  
unsun.nidhal@gmail.com

### Abstract

The development of livestock vaccines has important significance in preventing livestock industry losses due to infectious diseases. DNA vaccines that have the potential as a preventive effort against viral diseases have a weakness in the form of low efficacy due to limitation in the delivery system. This study aims to explore the delivery system in the form of liposomes-DNA and chitosan-DNA nanoparticles for DNA vaccine delivery. The making of chitosan-DNA nanoparticles using complex coarservation method with the ratio of DNA and chitosan mass is 1: 0.5; 1: 1,0; 1: 2,0; and 1: 4,0. Observation of complex formation with gel retardation assay. Liposome-DNA complex was made using Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000. In vitro tests were carried out on HeLa cells with a confluent rate of 70% -90%. Chitosan-DNA nanoparticles and liposome-DNA complex with a total of 8 µg DNA components were transfected for 4 hours then replaced with new growth media and further incubated for 24 hours and analyzed by eGFP protein glow with confocal microscopy. Chitosan-DNA complex was successfully made and visualized as a band of DNA held in agarose wells. Visualization shows that nanoparticles with a mass ratio of 1: 2 are a minimum ratio of chitosan that can trap the whole plasmid DNA to form polyplex. The delivery is able to show the presence of luminescence under a confocal microscope. Fluorescence on chitosan DNA nanoparticles sample qualitatively tends to be less when compared to luminescence in samples with liposome-DNA treatment. The vaccine vector NTC8685-eGFP through the cationic liposome delivery system and chitosan nanoparticles can enter the HeLa cell (model) so that it can be expressed as eGFP protein. Cationic liposomes qualitatively have a higher effectiveness than chitosan nanoparticles in delivering NTC8685-eGFP plasmids into HeLa cells.

**Keywords:** NTC8685-eGFP, Liposomes, Chitosan Nanoparticles, eGF

### Pendahuluan

Hingga kini terdapat empat lisensi produk vaksin DNA pada hewan telah ada di pasaran, yaitu DNA vaksin untuk mencegah West Nile Virus pada kuda, vaksin DNA untuk mencegah Hematopoetic Necrosis Virus pada ikan salmon, vaksin DNA (Oncept) untuk terapi melanoma pada anjing, dan DNA vaksin untuk terapi gen pada babi (Williams, 2013). Jika dibandingkan dengan jenis vaksin lainnya yang hanya mampu memicu respon imunitas humoral, vaksin DNA mampu memicu respon imunitas seluler pula (Xu *et al.*, 2011), yaitu respon yang sangat penting/esensial untuk keberhasilan kontrol infeksi virus dalam tubuh organisme. Walaupun vaksin DNA dinilai menjanjikan, vaksin ini memiliki kelemahan berupa efikasinya yang rendah dalam menginduksi sistem imunitas organisme yang diimunisasi akibat limitasi dalam sistem penghantarannya (Wang, Pan and Zhang, 2011). Pada injeksi vaksin DNA via

intramuskular, molekul DNA mengalami kegagalan dalam mencapai antigen-presenting cell (APC) untuk menginduksi respon imunitas karena asam nukleat sulit menembus barier sel yang berupa membran sel (Pachuk *etal.*, 2000). Sistem penghantaran DNA untuk mencapai sel dan penggunaan adjuvan imunogenik yang tepat mampu meningkatkan efikasi vaksin.

Marker resistensi antibiotik pada vaksin DNA untuk proseskloningmemiliki potensi risiko keamanan. Risiko dapat berupa kontaminasi lingkungan dengan gen resistensi antibiotik dalam proses fermentasi vaksin DNA skala besar ataupun transfer gen resistensi terhadap mikroorganisme normal pada sel host (Luke, Carnes and Williams, 2014). Hal tersebut yang mendasari penggunaan vektor dengan marker seleksi berbasis non protein, seperti vektor dengan RNA-based antibiotic-free selection. Salah satu vektor vaksin DNA dengan seleksi tanpa antibiotik adalah produk Nature Technology

Corporation, yaitu NTC8685. Marker seleksi antibiotik dalam vektor tersebut telah diganti dengan sistem RNA OUT yang mampu menyeleksi bakteri transforman dengan penggunaan sukrosa saja (Luke, Carnes and Williams, 2014). Selain itu, penggantian penggunaan marker seleksi antibiotik ini dengan sistem seleksi tanpa antibiotik juga berdampak positif pada peningkatan ekspresi antigen pada organisme target (Marie *et al.*, 2010).

Limitasi penghantaran melintasi membran sel membuat eksplorasi sistem penghantaran menjadi salah satu komponen yang dieksplorasi. Penghantaran nonviral didominasi oleh jenis lipid kationik dan polimer kationik. Kompleks liposom-DNA disebut lipoplex, sedangkan kompleks polimer-DNA disebut juga dengan poliplex. Dalam penelitian ini, penghantaran nonviral yang digunakan dalam menghantarkan DNA plasmid, yaitu lipid kationik yang berupa lipofectamin dan polimer kationik yang berupa kitosan. Gugus bermuatan positif mengatur interaksi molekul antara lipid dengan gugus fosfat pada asam nukleat serta memfasilitasi kondensasi DNA. Muatan permukaan positif dari liposom akan memediasi interaksi dengan asam nukleat dan membran sel yang bermuatan negatif, memungkinkan fusi kompleks transfeksi asam nukleat dengan membran sel (Son *et al.*, 2000). Penghantaran dengan lipoplex telah dilakukan pada tahap *in vitro* dan *in vivo* untuk vaksin DNA virus influenza A dan terbukti mampu menghasilkan respon imunitas humoral dan seluler (Liu *et al.*, 2014). Poliplex memiliki beberapa kelebihan jika dibandingkan dengan penghantaran menggunakan lipoplex. Poliplex akan memiliki ukuran yang lebih kecil, distribusi ukuran yang lebih sempit, daya proteksi terhadap nuklease yang lebih tinggi dan stabilitas yang lebih tinggi (Dizaj, Jafari and Khosroushahi, 2014). Tidak hanya itu, polimer alam yang bersifat biocompatible dan biodegradable memberikan nilai aman yang lebih.

### Metode

Bahan Penelitian: Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah plasmid NTC8685-eGFP (Nature Technology Corporation/NTC) yang telah dikloning dalam *E. coli* NTC4682 dan dikonfirmasi menggunakan koloni-PCR dan analisis restriksi (Kusumawati *et al.*, 2018); kitosan dengan berat molekul medium

(Sigma no. Catalog: 448877) dalam pelarut asam asetat 1%; Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 (Invitrogen) sebagai agen transfektan komersial liposom kationik; kultur sel HeLa dari koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (FK UGM).

Preparasi Nanopartikel Kitosan-DNA: Larutan stok kerja kitosan berat molekul medium untuk preparasi nanopartikel dibuat sesuai dengan Martien *et al.* (2008). Sebanyak 20 mg kitosan dilarutkan dalam 100 ml larutan asam asetat 1%, kemudian pH larutan diatur menggunakan larutan NaOH 1 M untuk mencapai pH 5,0. Larutan kitosan kemudian difilter steril dengan menggunakan filter 0,2 µm dan disimpan dalam tabung konikal steril. Sebanyak 1000 ng DNA plasmid dan beberapa larutan dengan jumlah kitosan berbeda dipanaskan secara terpisah pada suhu 50°C selama 10 menit. Kemudian, larutan DNA plasmid dan larutan kitosan dicampur dengan *di-vortex* dengan kecepatan 2500 rpm selama 30 detik. Nanopartikel kitosan-DNA disimpan pada suhu kamar. Rasio perbandingan massa DNA dan Kitosan yang digunakan adalah 1:0,5; 1:1,0; 1:2,0; 1:3,0 dan 1:4,0. Satu bagian kitosan setara dengan 1000 ng kitosan rantai medium.

Gel Retardation Assay: Uji pergerakan kompleks kitosan-DNA diamati pada gel agarosa 1%. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan 100 V selama 45 menit kemudian hasil diamati di bawah lampu UV. Sampel nanopartikel kitosan/DNA dibandingkan dengan sampel plasmid bebas dan kitosan saja. Molekul DNA plasmid yang tidak membentuk kompleks bergerak bebas, sedangkan molekul DNA plasmid yang membentuk kompleks nanopartikel-DNA yang tertahan sebagai molekul besar pada bagian atas di daerah awal sumuran gel.

Preparasi Kompleks Lipofectamin-DNA: Kompleks liposom-DNA dibuat dengan menggunakan reagen Lipofectamin<sup>TM</sup> 3000 (Invitrogen). Sebanyak 16 µl Reagen Lipofectamin<sup>TM</sup> 3000 diencerkan dalam 750 µl media RPMI tanpa serum dan divortex selama 2-3 detik. Sebanyak 8 µg DNA plasmid diencerkan dalam 750 µl media RPMI tanpa serum juga di tabung Eppendorf steril terpisah dan ditambahkan reagen P3000<sup>TM</sup>, kemudian diresuspensi perlahan. Campuran DNA dimasukkan ke dalam campuran reagen Lipofectamin<sup>TM</sup> 3000 secara perlahan dengan perbandingan volume 1:1. Campuran akhir diinkubasi selama 15 menit pada

suhu ruang. Kompleks Lipofectamin-DNA siap digunakan dan dimasukkan dalam 1,5 ml media sel kultur yang telah ditumbuhkan sel HeLa.

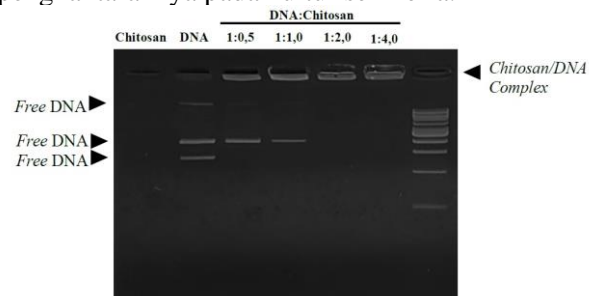
Transfeksi Sel HeLa sebagai Uji Penghantaran *In Vitro*: Sel HeLa dipersiapkan sesuai dengan manual reagen Lipofectamine<sup>™</sup> 3000. Kultur sel HeLa ditanam pada petri dish 60 mm dengan coverslip pada inkubator dengan 5% CO<sub>2</sub> suhu 37<sup>o</sup>C hingga tingkat konfluen sebesar 70%-90%. Sebelum transfeksi, media sel diganti dengan media tumbuh baru. Nanopartikel kitosan-DNA dan kompleks liposom-DNA dengan jumlah komponen DNA masing-masing sebesar 8 µg ditambahkan pada media sel. Sebagai kontrol, sel tanpa perlakuan dan dengan perlakuan sel kitosan saja digunakan. Sel HeLa diinkubasi dengan agen transfeksi, yaitu liposom kationik dan nanopartikel kitosan selama 4 jam. Media kultur transfeksi kemudian diganti dengan media tumbuh baru dan diinkubasi lebih lanjut selama 24 jam untuk dianalisis pendaran protein eGFP.

Pengamatan Pendaran eGFP dengan Mikroskop Konfokal: Coverslip pada petri dish diangkat menggunakan pinset dan diletakkan pada kaca benda dengan posisi lapisan sel menyentuh kaca benda. Pengamatan floresensi dari protein fusi EGFP-Env-TM dilakukan dengan mikroskop konfokal ZEISS LSM 800 di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran lensa objektif sebesar 20X.

## Hasil

Pembentukan kompleks kitosan-DNA (poliplex) diamati dengan *gel retardation assay*/uji migrasi kompleks pada gel agarosa. Variabel bebas yang digunakan adalah rasio massa DNA plasmid NTC8685-eGFP dengan massa kitosan berat molekul medium. Satu bagian DNA plasmid setara dengan 1000 ng DNA, sedangkan satu bagian kitosan setara dengan 1000 ng kitosan. Kontrol yang digunakan adalah kitosan dan DNA plasmid. Kitosan berperan sebagai kontrol negatif tidak bisa berikatan agen DNA *staining* sehingga tidak dapat menghasilkan pendaran. DNA plasmid bebas bermigrasi membentuk tiga pita DNA yang menunjukkan tiga konformasi plasmid yang berbeda. Seiring peningkatan massa kitosan dalam formulasi nanopartikel, DNA plasmid bebas yang mampu bermigrasi dalam gel agarosa juga semakin berkurang. Pendaran DNA plasmid bebas masih teramati pada formulasi dengan rasio massa 1:0,5

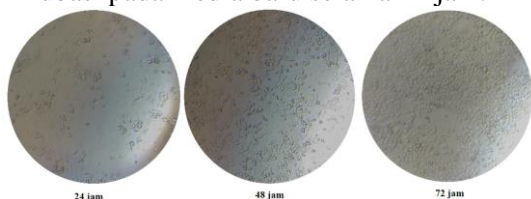
dan 1:1,0, namun pendaran DNA tidak teramati pada formulasi dengan rasio massa kitosan yang lebih tinggi. Semakin banyak kitosan yang ditambahkan dalam formulasi, semakin banyak DNA plasmid yang diperangkap membentuk kompleks kitosan-DNA. Visualisasi pada gel agarosa menunjukkan bahwa perbandingan massa 1:2 merupakan perbandingan minimum kitosan yang memperangkap keseluruhan DNA plasmid. Untuk itu, nanopartikel dengan perbandingan ini dianalisis lebih lanjut dengan diuji penghantarannya pada kultur sel HeLa.



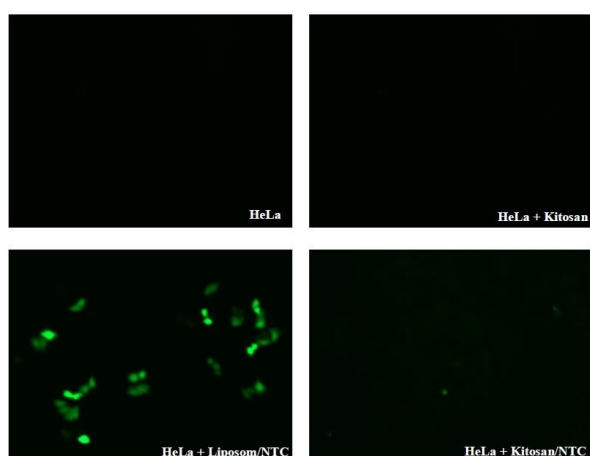
**Gambar 1.** *Gel Retardation Assay* untuk Kompleks Kitosan-DNA plasmid NTC8685-eGFP. Larutan kitosan (chitosan) digunakan sebagai kontrol negatif, sedangkan larutan stok DNA plasmid (DNA) digunakan sebagai pembanding untuk memperlihatkan DNA yang bebas bermigrasi. Rasio angka menunjukkan rasio massa DNA plasmid NTC8685-eGFP dengan massa kitosan. Satu bagian DNA setara dengan 1000 ng DNA plasmid, sedangkan satu bagian kitosan setara dengan 1000 ng kitosan.

Pada tahap ketiga penelitian ini, agen penghantaran ditransfeksikan ke sel HeLa sebagai uji *in vitro* penghantaran vaksin DNA ke dalam sel. Agen yang diuji adalah kompleks kitosan-DNA yang telah diformulasikan pada tahap sebelumnya dan kompleks liposom-DNA yang telah dibuat dengan menggunakan agen liposom komersial, yaitu Lipofectamin<sup>™</sup> 3000. Keberhasilan penghantaran ditandai dengan keberhasilan ekspresi antigen pada tingkat translasi. Penghantaran vaksin DNA yang berhasil ditandai dengan adanya ekspresi protein eGFP yang mampu berpendar di bawah mikroskop konfokal. Sel tanpa perlakuan dan sel yang ditransfeksi dengan kitosan saja digunakan sebagai kontrol negatif yang tidak menghasilkan pendaran. Plasmid NTC8685-eGFP merupakan plasmid kontrol bagi *delivery* vaksin DNA yang sudah teruji mampu mengekspresikan eGFP di sel HeLa. Semua jenis perlakuan dilakukan pada kultur sel HeLa konfluen berkisar 70-90% setelah 72 jam *seeding* pada petri dish 60 mm (Gambar

2). Lama pemaparan dengan agen transfeksi dilakukan selama 4 jam dan diikuti dengan inkubasi pada media baru selama 24 jam.



**Gambar 2.** Pertumbuhan sel HeLa pada Medium RPMI sebelum Perlakuan Transfeksi. Sel HeLa di-*seeding* di petri dish 60 mm dengan medium RPMI dan diamati pertumbuhannya pada 24, 48 dan 72 jam menggunakan mikroskop *inverted* hingga mencapai konfluensi sebesar 70- 90% dan siap ditransfeksi.



**Gambar 3.** Pengamatan pendaran GFP pada Sel HeLa yang Tertransfeksi dengan Mikroskop Konfokal. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran lensa objektif sebesar 20X. Sel HeLa yang tidak diberi perlakuan (HeLa) dan Sel HeLa yang ditransfeksi dengan kitosan saja (HeLa+Kitosan) digunakan sebagai kontrol negatif. Sel HeLa ditransfeksi menggunakan sistem penghantaran liposom kationik Lipofectamine (HeLa+Liposom/NTC). Sel HeLa juga ditransfeksi menggunakan sistem penghantaran nanopartikel kitosan (HeLa+Kitosan/NTC).

Pendaran protein eGFP pada HeLa dapat diamati pada Gambar 3. Penghantaran dengan liposom-DNA dan nanopartikel kitosan-DNA mampu menunjukkan adanya pendaran di bawah mikroskop konfokal. Pengamatan adanya pendaran ini membuktikan bahwa penghantaran DNA dengan kedua sistem penghantaran berhasil. DNA plasmid berhasil dihantarkan ke dalam sel dan diekspresikan hingga tingkat protein sehingga pendaran dari EGFP dapat teramati di bawah mikroskop konfokal. Pendaran pada sampel nanopartikel kitosan DNA secara kualitatif cenderung lebih sedikit jika dibandingkan

pendaran pada sampel dengan perlakuan liposom-DNA. Karakterisasi kompleks kitosan-DNA dengan rasio massa kitosan lebih tinggi diduga mampu menghasilkan nanopartikel yang lebih baik. Rasio massa kitosan yang lebih tinggi mampu menghasilkan partikel dengan diameter yang lebih kecil. Peningkatan rasio massa kitosan/DNA dari 2:1 menjadi 200:1 mampu menurunkan diameter partikel dari  $181,9 \pm 6,2$  nm hingga menjadi  $94,1 \pm 18,2$  nm (Ye *et al.*, 2013). Penurunan diameter partikel ini diharapkan mampu mempermudah *uptake* partikel oleh sel (Winarti, Martien and Siswindari, 2011).

### Simpulan

Vektor vaksin NTC8685-eGFP melalui sistem penghantaran liposom kationik dan nanopartikel kitosan dapat masuk ke dalam sel HeLa (model) sehingga dapat diekspresikan menjadi protein eGFP. Liposom kationik secara kualitatif memiliki efektivitas penghantaran yang lebih tinggi jika dibandingkan nanopartikel kitosan dalam menghantarkan plasmid NTC8685-eGFP ke dalam sel HeLa.

### Daftar pustaka

- Dizaj, S. M., Jafari, S. and Khosroushahi, A. Y. (2014) 'A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors.', *Nanoscale research letters*. Springer, 9(1), p. 252. doi: 10.1186/1556-276X-9-252.
- Kusumawati, A. *et al.* (2018) 'The Chitosan/NTC8685-eGFP Nanoparticles as an Antibiotic- Free DNA Vaccine', in *International Symposium in Veterinary Science: Strengthening the Regional Veterinary Education and Research for the Future Excellent Veterinary Graduates*. Yogyakarta: Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Gadjah Mada, pp. 97–101.
- Liu, J. *et al.* (2014) 'Oral vaccination with a liposome-encapsulated influenza DNA vaccine protects mice against respiratory challenge infection', *Journal of Medical Virology*, 86(5), pp. 886–894. doi: 10.1002/jmv.23768.
- Luke, J. M., Carnes, A. E. and Williams, J. A. (2014) 'Development of Antibiotic-Free Selection System for Safer DNA Vaccination', in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 91–111. doi: 10.1007/978-1-4939-0410-5\_6.

- Marie, C. *et al.* (2010) 'pFARs, Plasmids free of antibiotic resistance markers, display high-level transgene expression in muscle, skin and tumour cells', *The Journal of Gene Medicine*, 12(4), pp. 323–332. doi: 10.1002/jgm.1441.
- Martien, R. *et al.* (2008) 'Thiolated chitosan nanoparticles: Transfection study in the Caco-2 differentiated cell culture', *Nanotechnology*, 19(4). doi: 10.1088/0957-4484/19/04/045101.
- Pachuk, C. J. *et al.* (2000) 'DNA vaccines--challenges in delivery.', *Current opinion in molecular therapeutics*, 2(2), pp. 188–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11249641> (Accessed: 19 July 2018).
- Son, K. K. *et al.* (2000) 'Cationic liposome and plasmid DNA complexes formed in serum-free medium under optimum transfection condition are negatively charged', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1466(1–2), pp. 11–15. doi: 10.1016/S0005-2736(00)00176-0.
- Wang, G., Pan, L. and Zhang, Y. (2011) 'Approaches to improved targeting of DNA vaccines', *Human Vaccines*. Taylor & Francis, 7(12), pp. 1271–1281. doi: 10.4161/hv.7.12.17983.
- Williams, J. A. (2013) 'Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production.', *Vaccines*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1(3), pp. 225–49. doi: 10.3390/vaccines1030225.
- Winarti, L., Martien, R. and Sismindari (2011) 'Formulation of nanoparticles from short chain chitosan as gene delivery system and transfection against T47D cell line Formulasi nanopartikel menggunakan kitosan rantai', *Majalah Farmasi Indonesia*, 22(3), pp. 204–211.
- Xu, K. *et al.* (2011) 'Broad Humoral and Cellular Immunity Elicited by a Bivalent DNA Vaccine Encoding HA and NP Genes from an H5N1 Virus', *Viral Immunology*, 24(1), pp. 45–56. doi: 10.1089/vim.2010.0056.
- Ye, Y. *et al.* (2013) 'permeability across Calu-3 cells', *Journal of Drug Targeting*, 2330, pp. 1–13. doi: 10.3109/1061186X.2013.766885.