



## Produkcja wektorów adenowirusowych pierwszej generacji – optymalizacja metody

Magdalena Stopa, Agnieszka Jaźwa, Katarzyna Mleczko,  
Józef Dulak, Alicja Józkowicz

Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

### Production of adenoviral vectors of the first generation – optimization of the method

#### Summary

The paper presents the production of adenoviral vectors (AdV) containing  $\beta$ -galactosidase (Ad $\beta$ -gal), from the transfer of recombinant viral DNA into packing cell line (HEK293) to the titration of viral particles. Optimisation of the methods (preparation of DNA for transfection, adsorption time during the infection of cells, amount of serum in the medium, time-point of vector isolation) enables obtaining a titer of up to  $10^{10}$  IU/mL.

Ad $\beta$ -gal were titrated with several methods, with  $\beta$ -gal *in situ* staining used as a reference. We found that the most suitable titration method of the vectors containing other than reporter genes was the Rapid Titer ELISA kit™.

#### Key words:

adenoviruses, adenoviral vectors, gene therapy.

#### Adres do korespondencji

Alicja Józkowicz,  
Zakład Biotechnologii  
Medycznej,  
Wydział Biochemii,  
Biofizyki i Biotechnologii,  
Uniwersytet Jagielloński,  
ul. Gronostajowa 7,  
31-271 Kraków;  
e-mail:  
alicia@mol.uj.edu.pl

### 1. Wstęp

Wektory adenowirusowe (AdV) to bardzo użyteczne i wydajne narzędzie transferu genów do komórek, często wykorzystywane w eksperymentalnej terapii genowej (1-3). Choć ogólny schemat produkcji i wykorzystania AdV jest bardzo prosty (rys. 1) istnieje wiele sposobów jego realizacji.

Pierwszym etapem konstrukcji wektorów AdV jest przygotowanie zrekombinowanego wirusowego DNA, zawierającego ka-

setę ekspresyjną z transgenem. Można posłużyć się tu klasycznymi metodami biologii molekularnej obejmującymi użycie enzymów restrykcyjnych i ligaz, zastosowanie topoizomeraz czy wykorzystanie rekombinacji przeprowadzanej w bakteriach lub komórkach eukariotycznych (4-6).

Kolejny etap to wprowadzenie przygotowanego DNA do komórek pakujących. Stosuje się przy tym standardowe metody transfekcji z wykorzystaniem fosforanu wapnia, liposomów lub oligodendrymerów (3,4). W komórkach tych dochodzi do wytworzenia kapsydów adenowirusowych zawierających wprowadzony DNA, czyli do wytworzenia pierwszych wektorów adenowirusowych. Następne etapy produkcji polegają już nie na transfekcji kolejnych komórek zrekombinowanym DNA, ale na ich infekowaniu otrzymanymi wcześniej wektorami. Powtarzanie infekcji na coraz większą skalę pozwala namnażać AdV do coraz wyższych mian sięgających nawet  $10^{13}$  wirionów/mL (2,7).

Oprócz wysokiej wydajności, metoda produkcji AdV powinna zapewniać odpowiednią jakość otrzymywanych nośników, czyli przede wszystkim brak adenowirusów kompetentnych replikacyjnie (RCA, ang. *replication competent adenovirus*). RCA mogą powstać poprzez rekombinację homologiczną między DNA wektora, a regionem E1 komórek linii pakującej i mogą się namnażać w każdego typu komórkach, również tych nie posiadających regionu E1 (4,8,9). Możliwość powstania RCA w pewnym stopniu ogranicza wysokość miana AdV jakie można otrzymać, ponieważ im wyższy pasaż, tym większe ryzyko rekombinacji (8). Dlatego też infekowanie kolejnych kultur komórek linii pakującej nie może się odbywać w nieskończoność. W celu ograniczenia powstawania RCA rozwinięto linie komórkowe takie jak PER.C6, zmniejszające ryzyko rekombinacji, oraz wprowadzono różnego typu rearanżacje do genomu wektora (4,5,8).

Jednym z niezwykle ważnych, choć często niedocenianych aspektów namnażania AdV jest ilościowe określenie ich produkcji i bioaktywności (5,7,10). W tym celu konieczne jest zdefiniowanie dwóch parametrów: liczby cząstek wirusowych (VP, ang. *viral particles*) oraz jednostek infekcyjnych (IU, ang. *infection units*). Pierwszy parametr może zostać określony za pomocą bezpośrednich pomiarów fizykochemicznych, natomiast do ustalenia drugiego konieczna jest infekcja komórek permissywnych i sprawdzenie biologicznej aktywności wektora (5,7). Bardzo istotny jest wybór wiarygodnych, miarodajnych i szybkich metod oznaczania obu parametrów (10).

Wśród technik stosowanych do określenia liczby cząstek wirusowych wyróżnia się metodę spektrofotometryczną (7,10,11), znakowanie fluorescencyjne DNA wirusowego (5,7,12), real-time PCR (13,14), mikroskopię elektronową (10,14) oraz metody chromatograficzne (15,16).

Jedną z najstarszych i najpowszechniej stosowanych technik określenia VP jest metoda spektrofotometryczna, polegająca na obliczeniu całkowitej liczby cząstek wirusowych na podstawie bezpośredniego pomiaru absorbancji przy 260 nm, jaką ma oczyszczona i potraktowana SDS zawiesina wirusowa (7,11). Znaczący wpływ na wynik tego oznaczenia ma jednak sposób oczyszczania zawiesiny, obecność niewi-

rusowych kwasów nukleinowych, precypitacja białek, czy rozpraszanie światła, które mogą zawyżyć lub zaniżyć oznaczoną ilość VP (10,15). Inną metodą jest mikroskopia elektronowa, bazująca na zliczaniu wirionów widocznych bezpośrednio na obrazie mikroskopowym (10,14). Wartości otrzymane na jej podstawie często są niższe od tych otrzymanych w metodzie spektrofotometrycznej (10). Liczbę VP można także obliczać na podstawie pomiaru ilości wirusowego DNA znakowanego fluorescencyjnie za pomocą barwnika PicoGreen. Metoda ta jest nawet 20-krotnie czulsza niż metoda spektrofotometryczna, a do pomiaru wystarczy mniejsza objętość zawiesiny wirusowej (5,7,12).

Można również dokonać oznaczenia liczby VP poprzez identyfikację białek kapsydu za pomocą metod chromatograficznych (5,7). Jedną z nich jest chromatografia oparta na adsorbentach anionowymiennych, umożliwiająca oznaczenie VP przy jednoczesnym oczyszczeniu próbki (16). Można też stosować chromatografię odwróconych faz (RP-HPLC). Obie metody charakteryzują się wyższą nawet do 20 razy czułością w oznaczaniu VP w porównaniu z metodą spektrofotometryczną (15).

Jedną z najczęściej stosowanych metod jest jednak reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qPCR), pozwalająca na fluorescencyjną detekcję namnożonych sekwencji DNA. Umożliwia ona szybkie, dokładne i powtarzalne oznaczenie VP w minimalnej ilości materiału, z wykorzystaniem krzywej standardowej dla roztworów o znanej liczbie kopii DNA (13,14).

Wszystkie te metody mają swoje wady i zalety, zwłaszcza jeśli chodzi o czułość i łatwość wykonania. W każdej z nich można też otrzymać fałszywie pozytywne wyniki, wynikające z obecności wolnego wirusowego DNA, czy nie złożonych w kapsydy białek (13,15). Przede wszystkim jednak pomiary często są prowadzone w różnych warunkach (np. po zastosowaniu odmiennych sposobów oczyszczenia zawiesiny wektorów), co utrudnia porównanie wartości VP z różnych źródeł literaturowych (10).

Trzeba również pamiętać, że określenie VP obejmuje zarówno cząstki funkcjonalne jak i niefunkcjonalne (10). Dlatego należy ocenić biologiczną aktywność zawiesiny wirusowej, czyli określić liczbę jednostek infekcyjnych (5,7,10). W przypadku wektorów zawierających geny reporterowe możliwe jest określenie GTU (ang. *gene transfer units*) poprzez zliczenie pozytywnie wybarwionych komórek za pomocą mikroskopu lub cytometru, a następnie przeliczenie ich na liczbę IU przypadających na jednostkę objętości zawiesiny wirusowej, czyli na miano AdV (7,10,17). Dla większości transgenów konieczne jest jednak wykorzystanie innych metod opierających się na przykład na wizualnej ocenie efektu cytopatycznego (CPE, ang. *cytopathic effect*), wyrażanego w jednostkach PFU (ang. *plaque formation unit*). Wśród nich wyróżnia się metodę łysinkową (PFA, ang. *plaque formation assay*) oraz metodę końcowych rozcieńczeń (EPDA, ang. *end point dilution assay*) (5,7). Test PFA polega na obserwacji łysinek na pojedynczej warstwie komórek linii pakującej, ich zliczaniu, a następnie przeliczaniu na wartość IU/mL (10). EPDA różni się od PFA sposobem detekcji – nie są tu zliczane pojedyncze łysinki, a określana jest proporcja hodowli komórkowych wykazujących CPE (18).

Miano oznaczane na podstawie metod biologicznych może być odmienne w zależności od różnic proceduralnych, występujących bardzo często między laboratoriami, przy czym rozbieżności dochodzą nawet do 30% (10,19). Ponadto, wartości te zależą od typu konstruktów i rodzaju pakującej linii komórkowej, a dla tego samego testu mogą się różnić w zależności od próbki komórek permissywnych używanych do oznaczeń (5,7,10). Co więcej, tzw. „efekt transgenu” powoduje, że oznaczenie w ten sam sposób miana dwóch wektorów, przygotowanych tak samo, ale posiadających inny transgen, może się różnić nawet dwu- lub trzykrotnie, co jest dodatkowym utrudnieniem przy porównywaniu mian różnych wektorów (7). Celem prezentowanej pracy była optymalizacja metod namnażania wektorów adenowirusowych oraz wybór najlepszej metody ich mianowania.

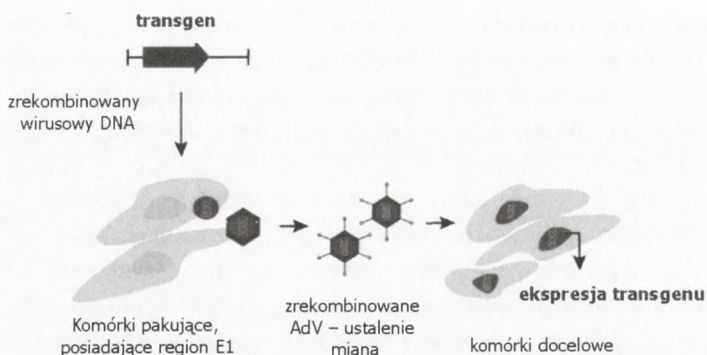
## 2. Materiały i metody

### 2.1. Hodowle komórkowe

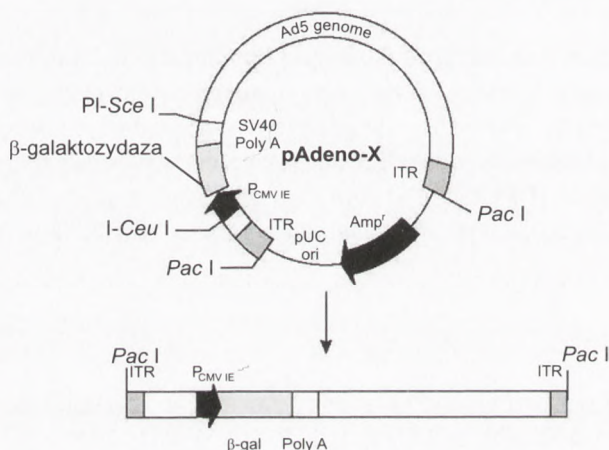
Wektory adenowirusowe produkowano i namnażano w komórkach linii HEK293 (ludzkie embrionalne komórki nerki), otrzymanych dzięki uprzejmości Stefana Kochanka (Ulm, Niemcy). Hodowlę prowadzono w standardowych warunkach (5% CO<sub>2</sub>, 37°C, wilgotność 90%) w butelkach 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt) w medium MEM $\alpha$  (PAA Laboratories) zawierającym 10% FBS (PAA Laboratories), streptomycynę (10  $\mu$ g/mL) i penicylinę (100 U/mL) (Sigma), a trypsynizowano przy użyciu 1 mL 0,05% trypsyny (Gibco).

### 2.2. DNA

Do produkcji wektorów użyto plazmidy zawierające zrekombinowany wirusowy DNA, otrzymane od Kazuhiro Oki (Houston, USA). W skład plazmidu pAd $\beta$ -gal wchodzi kasetta ekspresyjna zawierająca gen reporterowy  $\beta$ -galaktozydazy ( $\beta$ -gal) pod kontrolą promotora cytomegalowirusa (CMV) (rys. 1), a w analogicznej konstrukcji AdRFP genem reporterowym jest gen białka czerwonej fluorescencji (RFP, ang. *red fluorescent protein*). Plazmidy zostały namnożone w bakterii DH5 $\alpha$  (Stratagene), a izolację ich z bakterii przeprowadzono przy użyciu zestawu Endo-Free Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Przygotowanie DNA do transfekcji obejmuje linearyzację enzymem PacI (New England Biolabs) w celu odsłonięcia sekwencji ITR oraz oczyszczenie DNA (rys. 2). Do jednego doświadczenia linearyzowano 5  $\mu$ g DNA przy użyciu 0,2  $\mu$ L enzymu PacI. Mieszaninę inkubowano w 37°C przez 2 h. Oczyszczenie DNA po trawieniu w celu wybrania najlepszej strategii przeprowadzano niezależnie dwoma metodami: mieszaniną fenol : chloroform : alkohol izoamylowy oraz z wykorzystaniem kolumn oczyszczających ze złożem krzemionkowym Clean-Up (A&A Biotechnology). Transfekcji komórek HEK293 dokonywano przy wykorzystaniu odczyn-



Rys. 1. Ogólny schemat produkcji AdV – transfekcja komórek linii pakującej zrekombinowanym wirusowym DNA zawierającym transgen, namnożenie AdV w komórkach oraz ustalenie miana AdV umożliwiają wyprodukowanie wektorów i użycie ich do transdukcji komórek linii docelowych. (<http://www.clontech.com/clontech/expression/adeno/images/12.gif>, zmodyfikowane)



Rys. 2. Schemat przygotowania zrekombinowanego adenowirusowego DNA do transfekcji komórek HEK293 (<http://www.clontech.com/clontech/techinfo/manuals/PDF/PT3414-1.pdf>, zmodyfikowane).

nika SuperFect™ (Qiagen) wprowadzając 5 µg DNA do komórek rosnących na szalce 6 cm, przy proporcji DNA : oligodendrymery wynoszącej 1 : 5.

### 2.3. Produkcja wektorów

Po transfekcji komórki inkubowano przez 7-10 dni do momentu pojawienia się 100% CPE. Wtedy przeprowadzano izolację AdV. W tym celu komórki odrywano od podłoża poprzez potrząsanie i uderzanie w butelkę (bez użycia trypsyny). Zawiesinę

komórkową przenoszono do probówki i wirowano (10 min, 400 g). Nadsącz usuwano, a komórki zawieszano w 0,5 mL PBS (gdy zbierano komórki z szalki 6 cm) lub 1 mL PBS (gdy zbierano komórki z butelki 75 cm<sup>2</sup>). Zawiesinę komórkową poddawano trzem cyklom zamrażania w temperaturze -20°C (mieszanka etanolu 96% i suchego lodu) i rozmrażania w 37°C (łaźnia wodna). Natychmiast po rozmrożeniu (tak, by próbki nie ogrzały się do 37°C) komórki wytrząsano na mieszadle typu wortex. Mechaniczne rozbicie komórek powodowało uwolnienie wirusów do PBS. Zawiesinę wirowano (5 min, 400 g) w celu oddzielenia resztek komórkowych. Rozporcjowaną nadsącz (zawiesinę wirusową) przechowywano w -80°C. W celu namnożenia Ad $\beta$ -gal infekowano komórki HEK293 hodowane w butelkach 75 cm<sup>2</sup>, gdy osiągnęły konfluencję 100%. Mieszaninę infekcyjną (0,25 mL zawiesiny wirusowej + 5 mL medium hodowlanego) podawano na komórki, a następnie inkubowano przez 1,5 h w 37°C. Po inkubacji dodawano 7 mL medium i ponownie inkubowano komórki do momentu uzyskania CPE. Czas inkubacji zależał od miana zawiesiny wirusowej używanej do infekcji i wynosił od 1 do 7 dni. Przeprowadzano 6 etapów namnożenia wirusów, używając każdorazowo do infekcji zawiesinę wirusową z poprzedniego etapu.

W celu ustalenia warunków infekcji komórek HEK293, wysiewano komórki na płytkę 96-dołkową i infekowano stosując 30  $\mu$ L zawiesiny wirusowej (10<sup>4</sup> IU/dołek). Po inkubacji dodawano 70  $\mu$ L pełnego medium hodowlanego (10% FBS), a po 48 h badano wydajność transdukcji barwieniem na obecność  $\beta$ -galaktozydazy *in situ*. W tym celu komórki utrwalano 0,25% aldehydem glutarowym (AppliChem), a następnie podawano syntetyczny substrat  $\beta$ -galaktozydazy – X-gal (AppliChem) na 1-3 h. Stransdukowane komórki wykazujące ekspresję  $\beta$ -galaktozydazy wybarwiały się na niebiesko (tzw. komórki pozytywne).

#### **2.4. Oznaczenie miana za pomocą barwienia wykrywającego aktywność $\beta$ -galaktozydazy *in situ***

24 h przed planowaną infekcją wysiewano komórki HEK293 na płytkę 96-dołkową, tak by w dniu infekcji komórki miały 90% konfluencji. Przygotowywano rozcieńczenia oznaczanej zawiesiny wirusowej w medium hodowlanym, podawano je na komórki w objętości 30  $\mu$ L, a po 1,5-godzinnej inkubacji dodawano kolejne 70  $\mu$ L medium. Zakres rozcieńczeń w przeliczeniu na końcową objętość medium infekcyjnego (100  $\mu$ L) wynosił 10<sup>-1</sup>-10<sup>-8</sup>. 48 h po infekcji dokonywano barwienia wykrywającego aktywność  $\beta$ -galaktozydazy. Wyznakowane komórki liczone w dołkach z jak najbardziej rozcieńczonym inokulatem. Liczbę pozytywnych komórek przeliczano na wartość miana (liczbę infekcyjnych cząstek wirusa (IU) przypadających na 1 mL oznaczanej zawiesiny wirusowej) korzystając z wzoru (A):

$$\frac{\#_{\text{komórek}}}{d_{\text{rozc}} \times V} = M \quad (\text{A})$$

gdzie:

$\#_{\text{komórek}}$  – liczba pozytywnych komórek znajdujących się w dołku,

$d_{\text{rozc}}$  – współczynnik rozcieńczenia (np.  $10^{-5}$ ),

$V$  – objętość rozcieńczonego roztworu podana na komórki (mL),

$M$  – miano zawiesiny wirusowej (IU/mL).

## 2.5. Oznaczenie miana za pomocą Adeno-X™ Rapid Titrer ELISA Kit

Wysiewanie komórek, przygotowywanie i zakres rozcieńczeń zawiesiny wirusowej oraz warunki infekcji były takie same jak w przypadku oznaczania miana na podstawie barwienia  $\beta$ -gal *in situ*. Detekcji dokonywano 48 h po infekcji poprzez reakcję immunohistochemiczną przeprowadzaną zgodnie ze wskazówkami producenta testu Adeno-X™ Rapid Titer ELISA Kit (Clontech). Obliczenie miana na podstawie wybarwionych na brązowo, pozytywnych komórek przeprowadzano tak samo jak w metodzie barwienia  $\beta$ -gal *in situ*.

## 2.6. Oznaczenie miana testem końcowych rozcieńczeń

Wysiewanie komórek, przygotowywanie i zakres rozcieńczeń zawiesiny wirusowej oraz warunki infekcji były takie same jak w przypadku oznaczania miana na podstawie barwienia  $\beta$ -gal *in situ*. Test przeprowadzano zgodnie z procedurą firmy Clontech. Doświadczenia przeprowadzano w ośmiu powtórzeniach. Począwszy od drugiego dnia po infekcji, do momentu zakończenia eksperymentu (7 lub 8 dzień), codziennie dokonywano wizualnej oceny kondycji zainfekowanych komórek. Za dołek, w którym komórki wykazywały efekt cytopatyczny (tzw. dołek CPE pozytywny) uznawano taki, gdzie w warstwie komórek widoczna była jakakolwiek łysinka (doświadczenie 1) lub gdy łysinka była znacznych rozmiarów, otoczona przez skupiska martwych komórek (doświadczenie 2). Dla każdego rozcieńczenia obliczano proporcję dołków CPE pozytywnych (liczba pozytywnych dołków/8; 8 to liczba wszystkich dołków zainfekowanych tym samym rozcieńczeniem zawiesiny wirusowej). Codziennie obliczano miano, korzystając z wzoru (B):

$$10^{(x+0,8)} = M \quad (\text{B})$$

gdzie:

$M$  – miano zawiesiny wirusowej (IU/mL),

$x$  – suma ułamek pozytywnych dołków obliczona dla wszystkich rozcieńczeń zawiesiny wirusowej.

## 2.7. Oznaczenie miana za pomocą testu łysinkowego

24 h przed planowaną infekcją komórki HEK293 wysiewano na płytki 6-dołkowe, tak by w dniu infekcji miały 90% konfluencji. Przygotowywano dziesiętne rozcieńczenia oznaczanej zawiesiny wirusowej w medium hodowlanym, i podawano je na komórki w objętości 1 mL. Po 1,5-godzinnej inkubacji usuwano znad komórek medium infekcyjne i zgodnie ze standardową procedurą, zalewano je warstwą 2% agarozы (Invitrogen), rozcieńczonej 1:1 pożywką hodowlaną DMEM HG, 2x stężoną (Gibco). Po kilkuminutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, komórki poddawano dalszej inkubacji w temperaturze 37°C przez kilka dni, badając każdorazowo liczbę łysinek. Miano obliczano ze wzoru (C):

$$\frac{\#_{\text{plaques}}}{d_{\text{rozc}} \times V} = M \quad (C)$$

gdzie:

$\#_{\text{plaques}}$  – liczba łysinek znajdujących się w dołku,

$d_{\text{rozc}}$  – współczynnik rozcieńczenia (np.  $10^{-10}$ ),

$V$  – objętość rozcieńczonego roztworu podana na komórki (mL),

$M$  – miano zawiesiny wirusowej (IU/mL).

## 2.8. Oznaczenie miana za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzano wykorzystując mix DyNA-mo™ HS Sybr®Green qPCR kit (Finnzymes), w następujących warunkach: 15 min w 95°C, a następnie 40 cykli: 15 sek – 95°C, 15 sek – 58°C, 20 sek – 72°C. Ilościowe określenie liczby kopii DNA w badanej próbce możliwe jest po porównaniu wyniku z krzywą standardową, przygotowaną poprzez dziesiętne rozcieńczenia DNA o znanym stężeniu. Do sporządzenia krzywej standardowej używano plazmid długości 7270 par zasad (bp, ang. *base pairs*) zawierający cDNA β-galaktozydazy (pAAV-LacZ, Stratagene) o znanym stężeniu, przy założeniu, iż 1 bp dsDNA (dwuniciowego DNA, *double-stranded DNA*) ma masę 660 Da. Korzystając z wzoru (D), obliczano liczbę kopii dsDNA w roztworze, a następnie sporządzano dziesiętne rozcieńczenia ( $10^8$  kopii/mL –  $10^3$  kopii/mL).

$$\frac{N_A \times C}{M_{CZ}} = \#_{\text{kopii}} \quad (D)$$

gdzie:

$N_A$  – liczba Avogadro (cząsteczki/mol),

$C$  – stężenie dsDNA (g/μL),

$M_{CZ}$  – masa cząsteczkowa (g/mol),

$\#_{\text{kopii}}$  – liczba kopii (kopie/μL).



Badaną próbką w reakcji PCR była zawiesina wirusowa wyizolowana z komórek i rozcieńczona 1000x i 10 000x. Liczbę kopii DNA dla badanych próbek Ad $\beta$ -gal wyznaczano na podstawie krzywej standardowej zależności Ct (cykl, przy którym fluorescencja osiągnęła wartość progową) od log<sub>10</sub> (liczby kopii), uwzględniając współczynnik rozcieńczenia próbki.

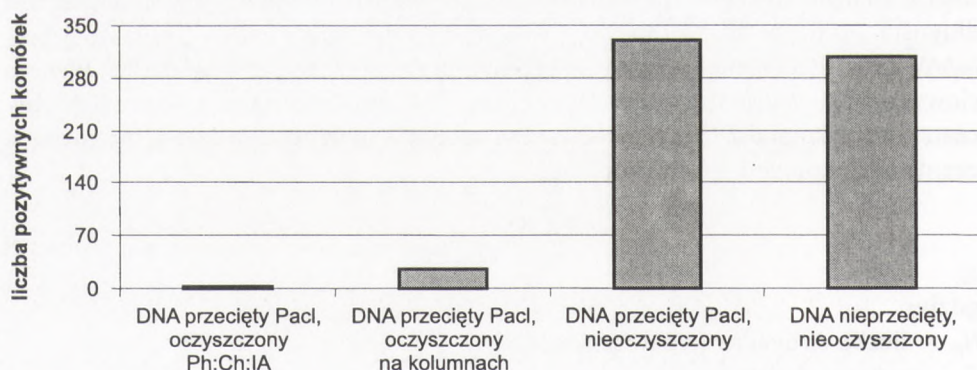
## 2.9. Analiza statystyczna

Wszystkie doświadczenia wykonywane były w duplikatach. Wyniki przedstawione są jako średnia  $\pm$  SD. Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta (dla dwóch próbek) lub analizą wariancji ANOVA z testem Tukeya dla wielu próbek. Jako istotne statystycznie uznawano wyniki dla  $p < 0,05$ .

## 3. Wyniki

### 3.1. Przygotowanie DNA oraz transfekcja komórek HEK293

Plazmid zawierający zrekombinowany wirusowy DNA z genem  $\beta$ -galaktozydazy, przed wprowadzeniem do komórek HEK293 i rozpoczęciem produkcji Ad $\beta$ -gal należy zlinearyzować enzymem Pacl, a następnie oczyścić. Aby wybrać najlepszą metodę oczyszczania plazmidu komórki HEK293 stransfekowano tą samą ilością DNA (5  $\mu$ g) używając DNA zlinearyzowany i oczyszczony za pomocą mieszaniny fenol : chloroform : alkohol izoamylowy lub DNA zlinearyzowany i oczyszczony na kolumnach krzemionkowych. Część komórek transfekowano DNA zlinearyzowanym i nieoczyszczonym, a niektóre DNA nie trawionym i nie oczyszczonym. Po 48 godzinach na każ-

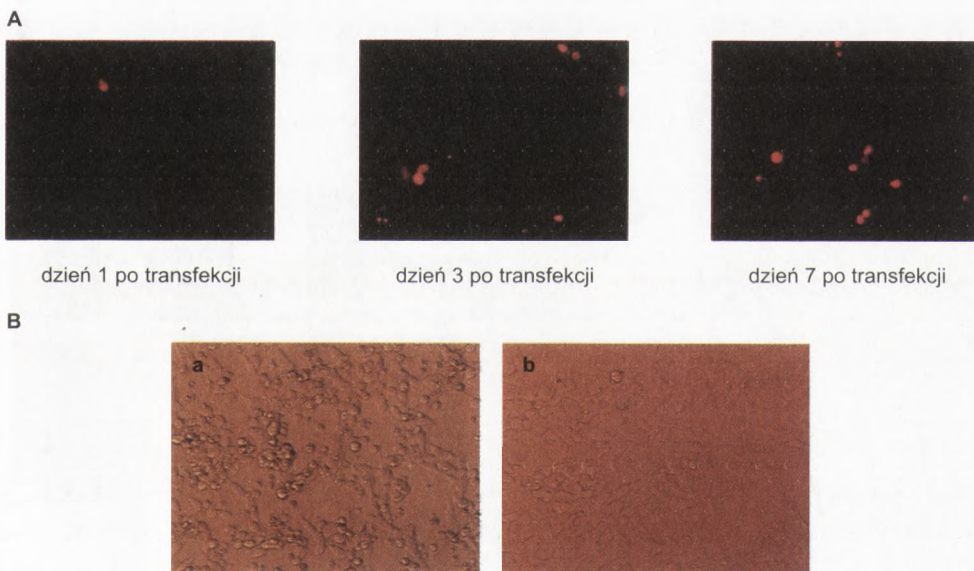


Rys. 3. Wpływ różnych metod przygotowania DNA (pAd $\beta$ -gal) na wydajność transfekcji komórek HEK293. Przykładowe doświadczenie. Ph : Ch : IA – mieszanina fenol : chloroform : alkohol izoamylowy, Pacl – enzym restrykcyjny.

dej z transfekowanych szalek przeprowadzono barwienie wykrywające aktywność  $\beta$ -galaktozydazy *in situ* i policzono wybarwione na niebiesko komórki (rys. 3).

Zaobserwowano, że ominięcie etapu oczyszczania w znaczący sposób poprawia wydajność transfekcji, bez względu na to czy plazmid wprowadzany do komórek był wcześniej linearyzowany czy też nie. Brak oczyszczania DNA podnosił około 20-krotnie wydajność transfekcji. Najmniej efektywną metodą było transfekowanie komórek DNA oczyszczanym mieszaniną fenol : chloroform : alkohol izoamylowy (rys. 3).

Wprowadzenie zrekombinowanego DNA pAdV do komórek HEK293 za pomocą transfekcji to pierwszy krok w procesie produkcji AdV. W ciągu kilku dni stransfekowane komórki produkują i uwalniają do pożywki wektory, które wnikają do kolejnych komórek, tak że liczba komórek stransdukowanych zwiększa się. Najłatwiej zaobserwować to w przypadku wektorów kodujących fluorescencyjny produkt – np. AdRFP (rys. 4A). W przypadku innych typów AdV (np. Ad $\beta$ -gal), wydajność produkcji wektorów ocenia się na podstawie postępującego CPE hodowli, w porównaniu do komórek kontrolnych (rys. 4B).

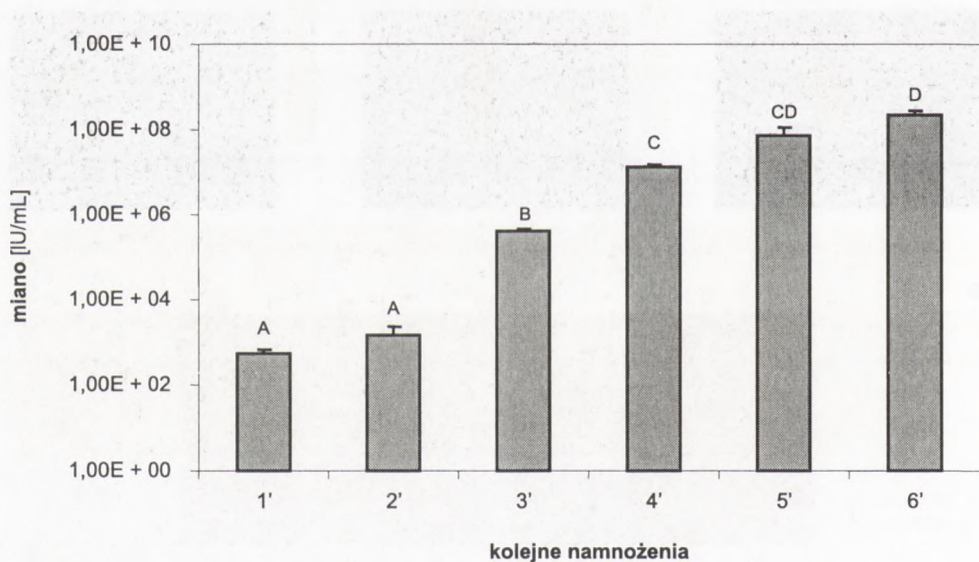


Rys. 4. (A) Produkcja AdV w komórkach stransfekowanych pAdRFP; (B) produkcja AdV w komórkach stransfekowanych pAd $\beta$ -gal oceniona na podstawie CPE (a) porównywanego do komórek kontrolnych (b).

### 3.2. Produkcja Ad $\beta$ -gal – infekcje komórek HEK293

Produkcja wektorów AdV opiera się na powtarzanych transdukcjach kolejnych hodowli komórek pakujących HEK293. W tym celu, połowę (250  $\mu$ L) uzyskanej zawiesiny wektorów Ad $\beta$ -gal wyizolowanych ze stransfekowanych optymalną metodą komórek (Ad $\beta$ -gal 1'), wykorzystywano do transdukcji kolejnej porcji komórek, wysianych na szalce 6 cm. Wyizolowane wektory z drugiego namnożenia (Ad $\beta$ -gal 2') były ponownie namnażane, poprzez kolejną transdukcję komórek. Tym razem jednak zwiększano skalę produkcji, infekując tą samą objętością zawiesiny Ad $\beta$ -gal (250  $\mu$ L) większą porcją komórek HEK293 (butelkę 75 cm<sup>2</sup>). Izolowano dzięki temu dwa razy więcej zawiesiny wektorowej (1 mL Ad $\beta$ -gal 3'), która służyła do transdukcji trzech kolejnych butelek hodowlanych (75 cm<sup>2</sup>). Zwiększając w ten sposób liczbę naczyń do produkcji wektorów z kolejnych namnożeń (Ad $\beta$ -gal 4', 5', 6') uzyskiwano coraz więcej zawiesiny z Ad $\beta$ -gal. Oprócz wzrostu ilości Ad $\beta$ -gal (objętość zawiesiny wektorowej uzyskana z 6' namnożenia to około 20 mL), przeprowadzona w ten sposób produkcja prowadzi do uzyskiwania również coraz wyższego miana wektorów (rys. 5).

Przyrost miana Ad $\beta$ -gal dla kolejnych namnożeń jest znaczny (nawet stukrotnie), największy jednak przy produkcji Ad $\beta$ -gal 3' (300 razy), które jest pierwszym namnożeniem wyprodukowanym po zwiększeniu skali hodowli (rys. 5). 2,5-krotny wzrost miana między Ad $\beta$ -gal 1' a Ad $\beta$ -gal 2' nie jest istotny statystycznie. Różnice między końcowymi namnożeniami (Ad $\beta$ -gal 4', 5' i 6') również są coraz mniejsze



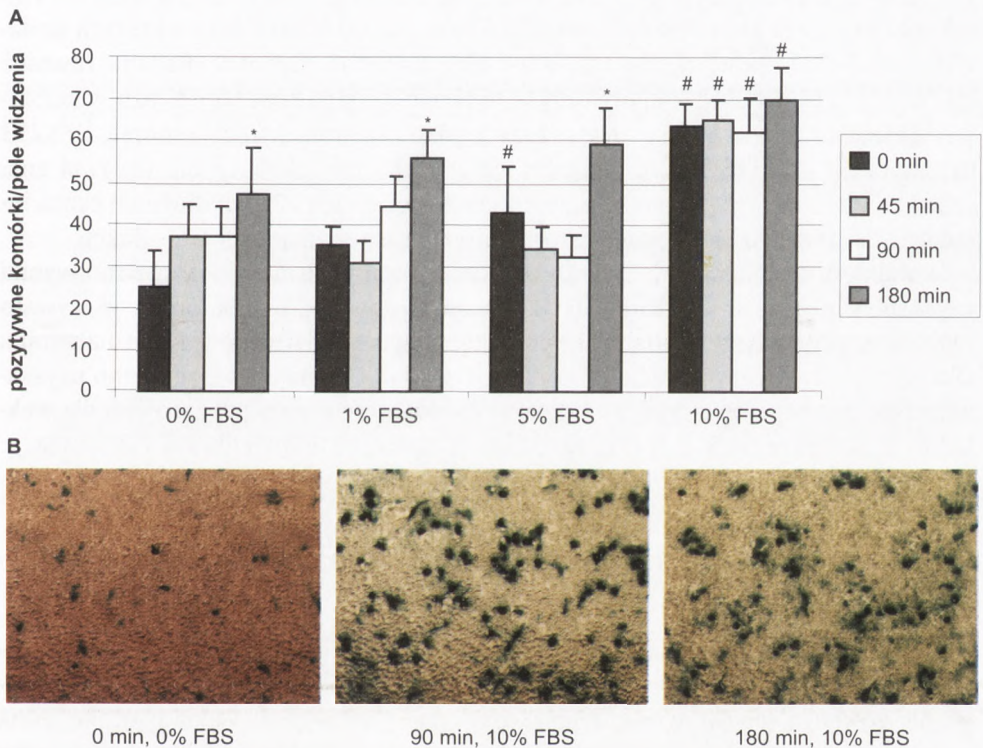
Rys. 5. Wzrost wartości miana Ad $\beta$ -gal dla kolejnych namnożeń wektorów; średnia  $\pm$  SD; A, B, C, D – analiza istotności statystycznej, ta sama litera oznacza brak różnic.

i nie znaczące statystycznie (5 razy dla Ad $\beta$ -gal 4' → Ad $\beta$ -gal 5' oraz 3 dla Ad $\beta$ -gal 5' → Ad $\beta$ -gal 6'), co sugeruje zbliżanie się do maksymalnej zdolności produkcyjnej.

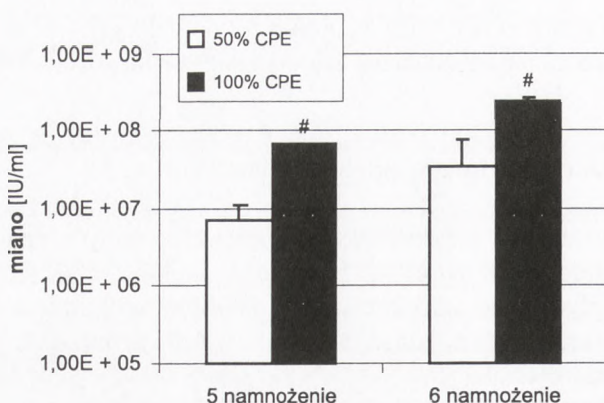
### 3.3. Optymalizacja warunków infekcji komórek HEK293

W osiągnięciu dużych przyrostów miana między kolejnymi namnożeniami podstawowe znaczenie miało zoptymalizowanie warunków infekcji HEK293. W tym celu zbadano wpływ zawartości surowicy w medium infekcyjnym, czasu inkubacji Ad $\beta$ -gal z komórkami i czasu izolacji Ad $\beta$ -gal z komórek na wydajność transdukcji oraz miano wektorów.

Komórki HEK293 poddawano inkubacji z lizatem wirusowym zawieszonym w minimalnej objętości pożywki (30  $\mu$ L/dolek w płytkach 96-dolekowych), zawierającej różne stężenie FBS (0, 1, 5 i 10%). Mała objętość zawiesiny wirusowej zwią-



Rys. 6. Wpływ czasu inkubacji oraz ilości FBS w medium na wydajność transdukcji komórek HEK293 (A) średnia liczba pozytywnych komórek na pole widzenia  $\pm$  SD, \*  $p < 0,05$  w porównaniu do 0 min, #  $p < 0,05$  w porównaniu do 0% FBS, (B) przykładowe zdjęcia komórek po transdukcji Ad $\beta$ -gal w skrajnie różnych warunkach infekcji (0 min, 0% FBS oraz 180 min, 10% FBS), w warunkach uznanych za optymalne (90 min, 10% FBS).



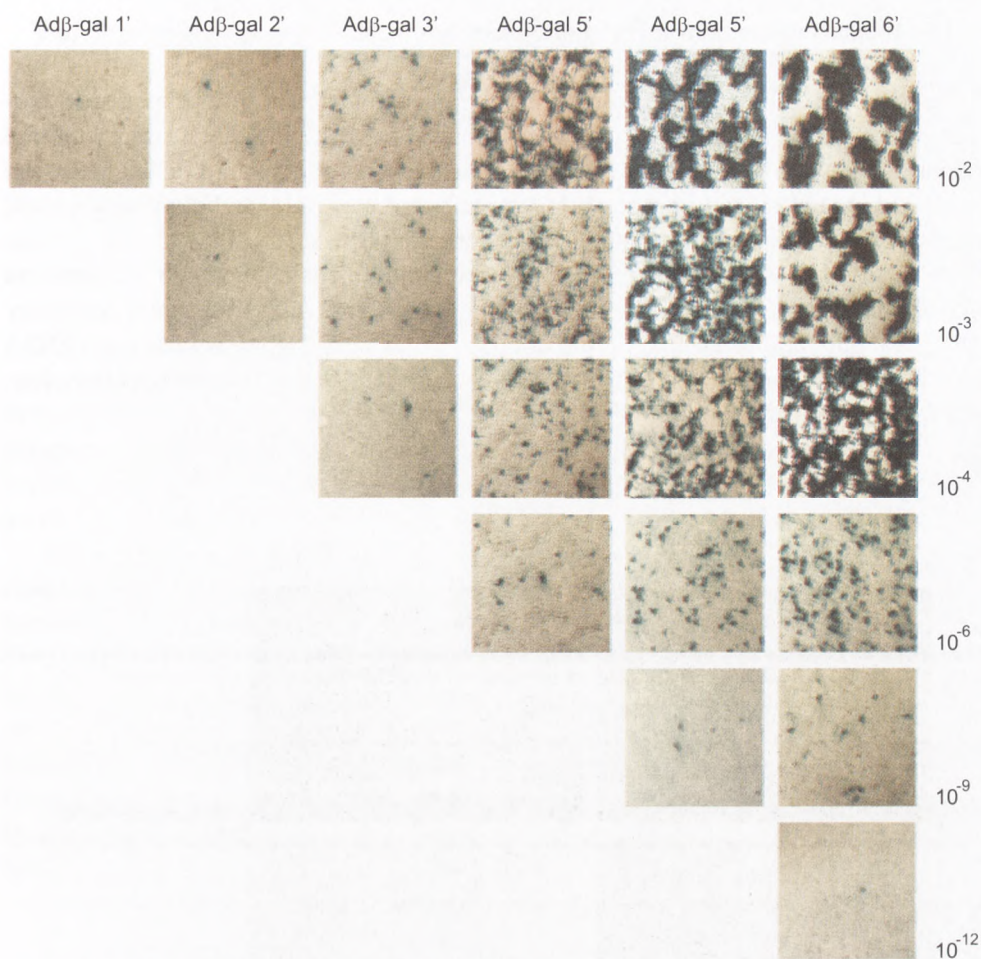
Rys. 7. Porównanie miana jakie posiadają wektory z tego samego namnożenia, ale izolowane w dwóch różnych momentach; średnia wartość miana  $\pm$  SD, # -  $p < 0,05$ .

sza prawdopodobieństwo kontaktu wektora z komórką. Dla każdego stężenia FBS testowano także różne czasy adsorpcji Ad $\beta$ -gal (45, 90 i 180 min) po których dodawano medium hodowlane do końcowej objętości 100  $\mu$ l/dołek. Badano również efektywność transdukcji komórek do których wektory podawano od razu w końcowej objętości (grupa 0 min). Najwyższą wydajność transdukcji komórek HEK293 uzyskano dla 10% FBS (rys. 6). W tych warunkach czas inkubacji nie wpływał znacząco na efektywność. Jednakże przy niższych stężeniach FBS, wydłużenie czasu inkubacji do 180 min skutkowało istotnym wzrostem wydajności transdukcji.

Kolejny optymalizowany czynnik to czas izolacji wektorów. Porównano wyniki uzyskane dla zawiesin wektorowych izolowanych gdy ok. 50% komórek wykazywało CPE, oraz gdy wszystkie komórki były cytotatyczne (oderwane od dna naczynia). Okazuje się, że przeprowadzanie izolacji przy 100% CPE daje wyższe miano uzyskanej zawiesiny wirusowej (rys. 7). Wzrost miana obserwowany był zarówno dla wektorów z namnożenia 5' jak i 6', dla których wynosił odpowiednio 5 i 3,5 raza.

### 3.4. Oznaczenie miana metodą barwienia wykrywającego aktywność $\beta$ -galaktozydazy *in situ*

W celu oznaczenia miana (IU/mL) lizatu wirusowego AdV $\beta$ -gal, infekowano komórki HEK293 kolejnymi rozcieńczeniami badanej zawiesiny i przeprowadzano barwienie wykrywające aktywność  $\beta$ -galaktozydazy *in situ* (rys. 8). Zakładając, że jedna pozytywna komórka przekłada się na jedną jednostkę infekcyjną Ad $\beta$ -gal, obliczono miano korzystając z wzoru (A). Oznaczone miana badanych zawiesin Ad $\beta$ -gal znajdują się w zakresie od  $(5,5 \pm 1,4) \times 10^2$  IU/mL – Ad $\beta$ -gal 1', do  $(2,3 \pm 0,3) \times 10^8$  IU/mL dla Ad $\beta$ -gal 6'. Pozwoliło to w przypadku zawiesiny Ad $\beta$ -gal 6', po rozcieńczeniu 1000 razy, na osiągnięcie 100% efektywności transdukcji (rys. 8). W kolejnych



Rys. 8. Efektywność transdukcji komórek HEK293 przez kolejne dziesiętne rozcieńczenia wektorów Adβ-gal z różnych namnożeń – reprezentatywne zdjęcia dla kilku wybranych rozcieńczeń.

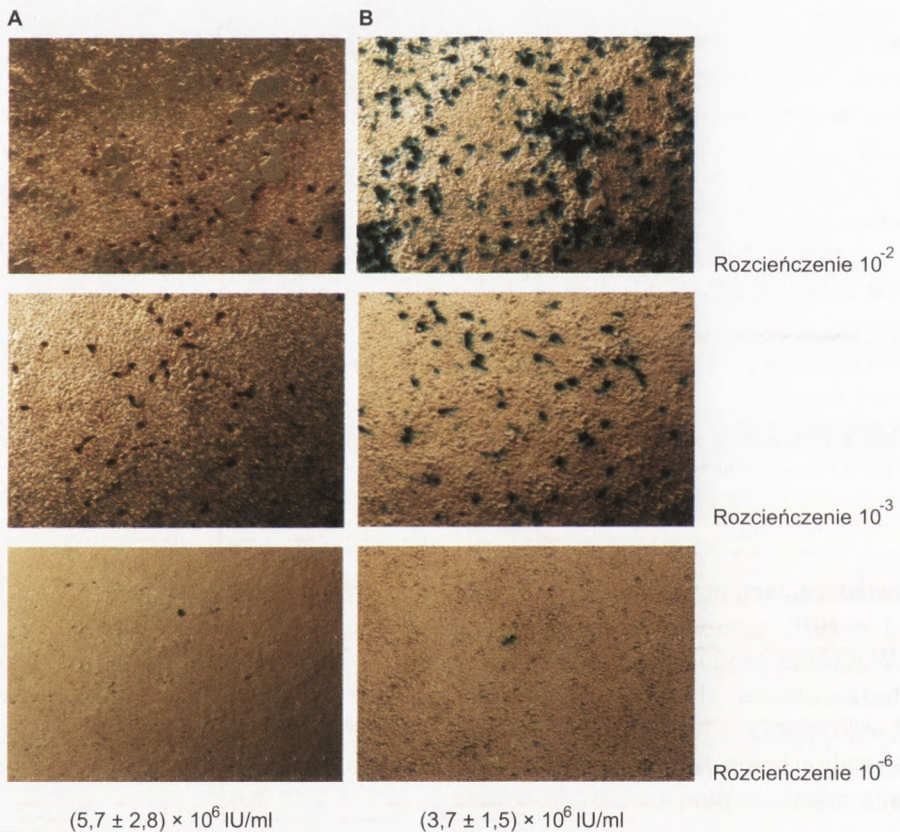
doświadczeniach maksymalne miana uzyskiwanych wirusów wahały się od  $1 \times 10^8$  do  $1 \times 10^{10}$ .

W wyniku produkcji Adβ-gal udało się uzyskać wysokie miano wektora, a sama metoda oznaczeń okazała się łatwa do przeprowadzenia oraz miarodajna. Jej zaletą jest wykrywanie jedynie efektów działania w pełni funkcjonalnych wirionów. Wyniki te zostały uznane za pomiar referencyjny, do którego porównywano wyniki oznaczenia miana za pomocą innych metod.

### 3.5. Oznaczenie miana metodą immunochemiczną

Jedną z testowanych metod była immunohistochemiczna detekcja stransdukowanych komórek. Wykorzystano do niej komercyjnie dostępny zestaw odczynników Adeno-X™ Rapid Titer ELISA Kit. Metoda oparta jest na wykrywaniu białek heksonowych kapsydów AdV za pomocą odpowiednich przeciwciał. Liczbę wybarwionych, pozytywnych komórek przeliczano na miano według wzoru (A).

W celu porównania wyników barwienia immunohistochemicznego z testem na aktywność  $\beta$ -galaktozydazy przeprowadzono oznaczenie miana tej samej zawiesiny Ad $\beta$ -gal jednocześnie dwoma metodami (rys. 9). Okazało się, że wyniki testu ELISA (rys. 9 A) nie odbiegają znacząco od miana oznaczonego metodą barwienia wykrywającego obecność  $\beta$ -galaktozydazy *in situ* (rys. 9 B).



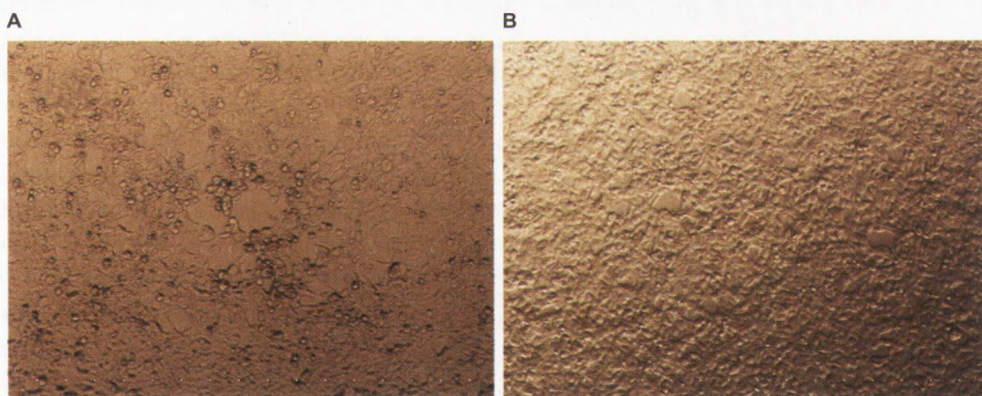
Rys. 9. Porównanie wyników oznaczenia miana za pomocą (A) testu na aktywność  $\beta$ -galaktozydazy oraz (B) za pomocą Adeno-X™ Rapid Titer Elisa Kit. Wartość miana – średnia  $\pm$  SD.

### 3.6. Oznaczenie miana metodą końcowych rozcieńczeń (EDPA)

EPDA jest jedną z tradycyjnych metod mianowania AdV, opartych na oznaczeniu liczby IU poprzez wizualną detekcję CPE występującego w zainfekowanych komórkach. Nie ma jednak jasnych kryteriów pozwalających na jednoznaczne uznawanie hodowli komórkowych za CPE pozytywne. Dlatego w prezentowanych doświadczeniach porównano wyniki oznaczeń miana przy założeniach dwóch odmiennych kryteriów.

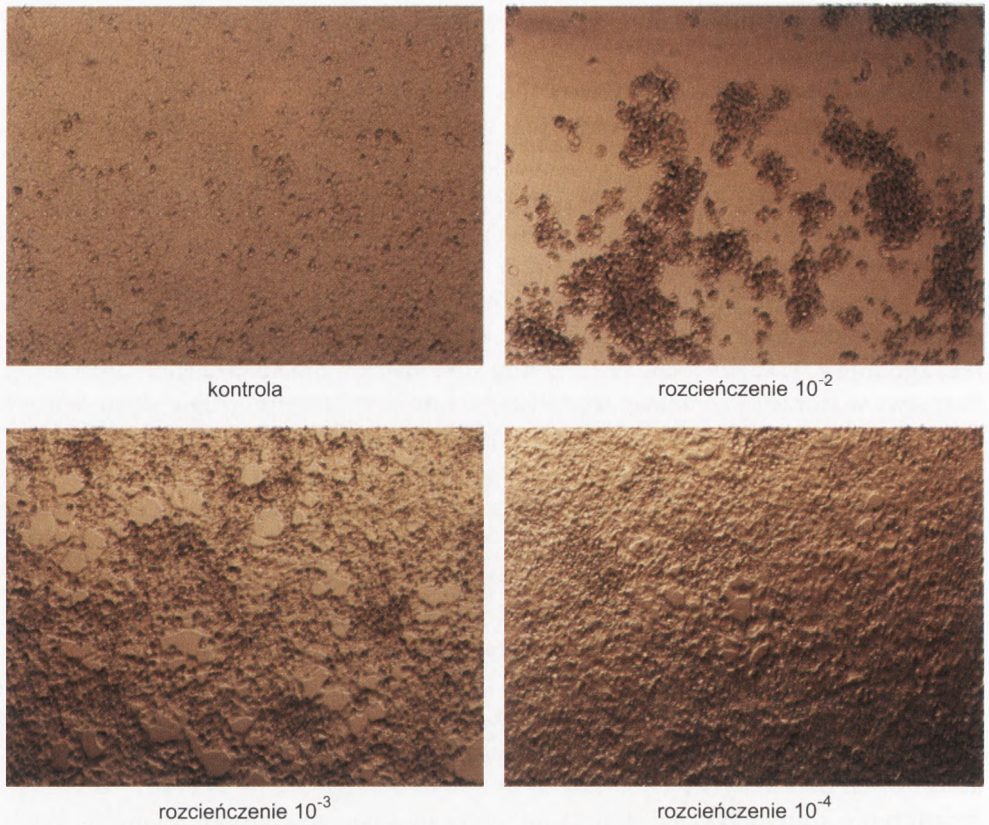
W pierwszej grupie doświadczeń (eksperyment 1), za dołek CPE pozytywny uznawano taki, który wykazał jakiegokolwiek naruszenie pojedynczej warstwy komórek, zgodnie z wskazówkami zawartymi w oryginalnym opisie procedury (rys. 10 A) (<http://www.clontech.com/images/pt/PT3414-1.pdf>). W drugiej grupie doświadczeń (eksperyment 2) – za dołek CPE pozytywny uznawano taki w którym obserwowano łysinki większe niż kilka komórek, otoczone okrągłymi, martwymi komórkami, nie pozostawiające żadnych wątpliwości do co wirusowego pochodzenia (rys. 10 B).

Im większe rozcieńczenie zawiesiny Ad $\beta$ -gal, tym mniejsze prawdopodobieństwo pojawienia się łysinki. Reprezentatywne zdjęcia dołków z danego rozcieńczenia w piątym dniu trwania eksperymentu prezentuje rysunek 11. Zgodnie z procedurą, EPDA powinien trwać 10-14 dni (czas wystarczający na wystąpienie CPE w dołkach zainfekowanych nawet dużym rozcieńczeniem zawiesiny AdV), ale jednocześnie pojawienie się łysinek w choć jednym dołku kontrolnym powinno oznaczać natychmiastowe przerwanie testu. W prezentowanych badaniach łysinki w komórkach kontrolnych pojawiały się około czwartego dnia trwania eksperymentu, jednak doświadczenie kontynuowano, dopóki nie pojawiły się w większości dołków kontrolnych, zwykle w 7 lub 8 dniu eksperymentu.



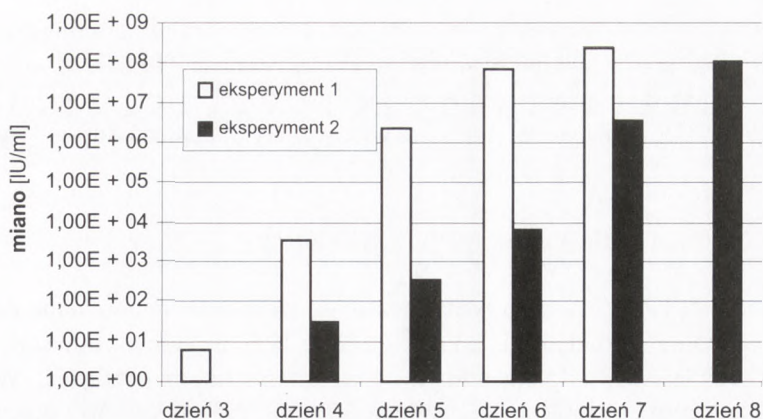
Rys. 10. Wygląd komórek w CPE pozytywnym dołku w warunkach (A) pierwszego i (B) drugiego eksperymentu EPDA.





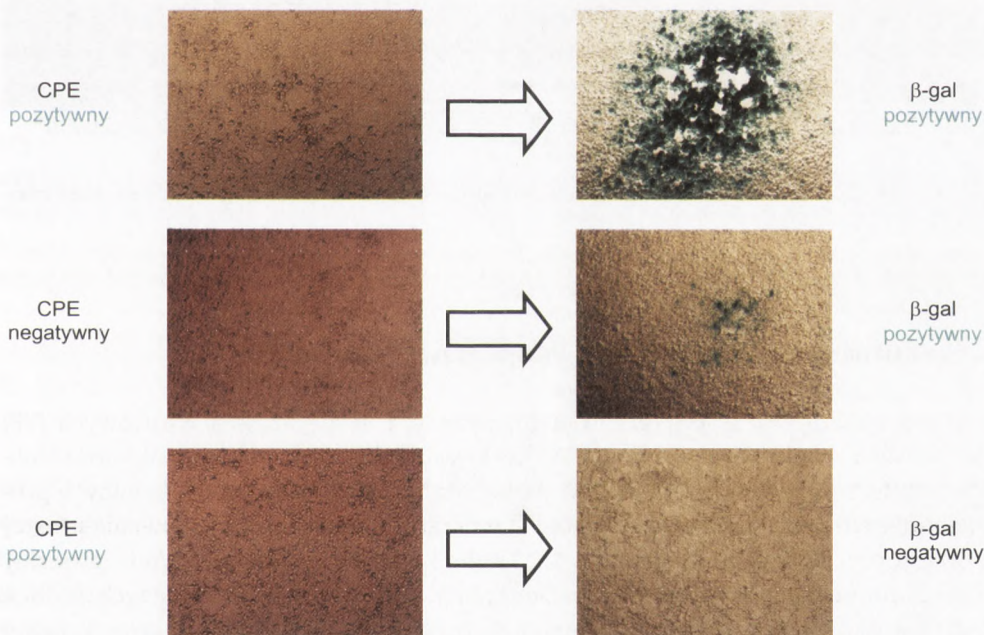
Rys. 11. Efekt CPE po infekcji komórek HEK293, test EPDA, piąty dzień trwania eksperymentu.

W każdym dniu doświadczenia obliczano miano Ad $\beta$ -gal, korzystając ze wzoru (B). Okazuje się, że drobne różnice w sposobie detekcji dołków CPE pozytywnych dają w rezultacie ogromne rozbieżności w oznaczanym mianie, sięgające nawet czterech rzędów wielkości (rys. 12). Pomimo że ostatecznie wyliczone miano nie wykazuje aż takich różnic (eksperyment 1 =  $2,4 \times 10^8$  IU/mL, eksperyment 2 =  $1,1 \times 10^8$  IU/mL), należy pamiętać, iż zgodnie z oryginalną procedurą, doświadczenie powinno zostać zakończone już czwartego dnia, kiedy miano wynosiło  $3,3 \times 10^3$  IU/mL (w eksperymencie 1) lub 30 IU/mL (w eksperymencie 2). Tu różnice w mianie w zależności od sposobu detekcji są już 100-krotne, a ponadto wyniki bardzo różnią się od rzeczywistego miana zawiesiny Ad $\beta$ -gal użytej do infekcji, wyznaczonego na podstawie barwienia wykrywającego aktywność  $\beta$ -galaktozydazy *in situ* ( $2,3 \times 10^8$  IU/mL). Wskazuje to też na drugi czynnik o zasadniczym wpływie na wartość ustalonego miana, a mianowicie moment, w którym dokonano odczytu – jak widać, w kolejnych dniach eksperymentu obliczone miano zwiększało się 10-100 razy.



Rys. 12. Miano Adβ-gal obliczane w różnych dniach EPDA. Przykładowe doświadczenie.

W celu sprawdzenia w jakim stopniu widoczny efekt CPE odzwierciedla faktyczną obecność Adβ-gal, po zakończeniu eksperymentów wykonywano na zainfekowanych płytkach dodatkowe barwienie wykrywające aktywność β-galaktozydazy *in situ*. Okazało się, że większość dołków CPE pozytywnych zgodnie z założeniem wykazała dużą ilość pozytywnych komórek, szczególnie w najbliższym otoczeniu



Rys. 13. Porównanie efektu CPE i barwienia β-gal jako sposobów detekcji infekcji Adβ-gal.

łysinki. Jednakże były również takie dołki, które mimo braku najmniejszych oznak obecności CPE, po barwieniu wykrywającym aktywność  $\beta$ -galaktozydazy *in situ* w istocie były, jak się okazało, zainfekowane Ad $\beta$ -gal, i *vice versa* – można było znaleźć studzienki CPE pozytywne, które nie wykazywały obecności Ad $\beta$ -gal (rys. 13).

### 3.7. Próba oznaczenia miana metodą łysinkową

Podobnie jak EPDA, metoda łysinkowa (PFA) to sposób mianowania AdV, polegający na wizualnej detekcji CPE, a konkretnie na liczeniu łysinek powstałych po infekcji komórek HEK293 i na ich podstawie wyliczaniu miana (wzór (C)). W celu zapewnienia zależności 1 łysinka – 1 wektor AdV, po infekcji komórki pokrywane są roztworem agarozą, utrudniającym dyfuzję wirionów.

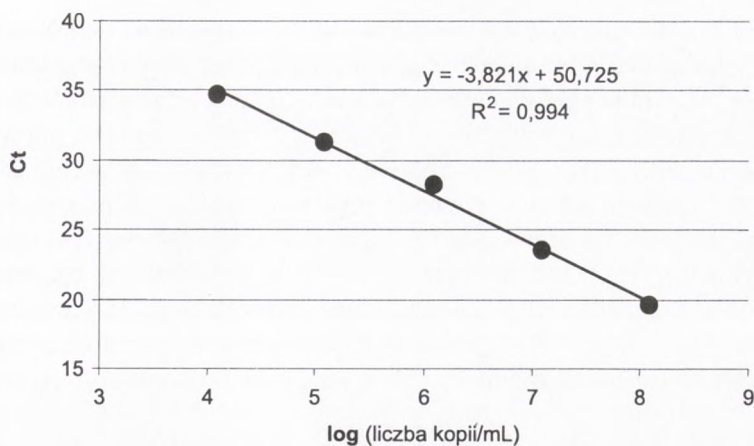
Etap pokrywania komórek agarozą, okazał się na tyle niepowtarzalny i szkodliwy dla komórek, że większość wykonywanych doświadczeń nie pozwalała na oznaczenie miana. Nawet jeśli jakość hodowli umożliwiała liczenie łysinek, nie obserwowano zależności ich liczby od stopnia rozcieńczenia zawiesiny wirusowej (rys. 14). Dlatego test ten uznano za niewiarygodny i niepraktyczny, rezygnując z jego wykorzystywania.



Rys. 14. Efekt CPE komórek zainfekowanych różnymi rozcieńczeniami Ad $\beta$ -gal – trzeci dzień trwania testu PFA.

### 3.8. Oznaczenie miana metodą PCR w czasie rzeczywistym

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym, wyznacza liczbę cząstek wirusowych (VP) wykrywając kopie wirusowego DNA. Reakcja przeprowadzana była równocześnie dla roztworów dsDNA (pAAVLacZ) o znanej liczbie kopii/mL, oraz dla badanych próbek Ad $\beta$ -gal. Reprezentatywna krzywa standardowa oraz wzór dopasowania prostej regresji przedstawiono na rysunku 15. Liczbę kopii wirusowego DNA/mL zawiesiny obliczono znając współczynnik rozcieńczenia oraz wartości Ct badanych próbek Ad $\beta$ -gal i korzystając ze wzoru prostej regresji dopasowanej do punktów krzywej standardowej (rys. 15, tab.).



Rys. 15. Krzywa standardowa reakcji *real-time* PCR – zależność wartości Ct od liczby kopii dsDNA/mL standardu.

Tabela

Miano wektorów Ad $\beta$ -gal obliczone za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Próbka	Średnia wartość Ct $\pm$ SD	Liczba kopii próbki rozcieńczonej (kopie/mL)	Liczba kopii próbki nierozcieńczonej (kopie/mL)	Średnia liczba VP/mL $\pm$ SD
AdV $\beta$ -gal $10^{-3}$	26,52 $\pm$ 0,22	$2,17 \times 10^6$	$2,17 \times 10^9$	(1,82 $\pm$ 0,49) $\times 10^9$
AdV $\beta$ -gal $10^{-4}$	30,98 $\pm$ 0,33	$1,48 \times 10^5$	$1,48 \times 10^9$	

Miano zawiesiny Ad $\beta$ -gal mierzone na podstawie reakcji PCR w czasie rzeczywistym wynosiło  $1,82 \times 10^9$ . Miano tej samej zawiesiny oznaczone za pomocą barwienia  $\beta$ -gal *in situ*, określono jako  $1 \times 10^8$  IU/mL. Różnica w mianie oznaczonym testem biologicznym i przy wykorzystaniu reakcji PCR jest więc dziesięciokrotna. Mimo to test oparty na reakcji PCR w czasie rzeczywistym okazał się dobrym sposobem szybkiego i powtarzalnego szacowania miana wektorów adenowirusowych.

#### 4. Dyskusja

Z prezentowanej pracy wynika, że optymalizacja warunków produkcji AdV może w istotny sposób podnieść wydajność całego procesu, co poświadczają uzyskane wyniki. Ulepszeń można dokonać już na pierwszym etapie, podczas przygotowywania zrekombinowanego wirusowego DNA do transfekcji (rys. 3). Na podstawie przedstawionych wyników widzimy, że linearyzacja pAdV nie wpływa znacząco na wydajność transfekcji. Linearyzacja może natomiast, jak się wydaje, zwiększać poziom produkcji wektorów, dzięki ułatwieniu replikacji DNA poprzez odsłonięcie se-

kwencji ITR (6,20). Dlatego w naszym protokole posługiwaliśmy się DNA zlinearyzowanym. Co zaskakujące, pominięcie sugerowanego przez producenta kroku oczyszczania DNA plazmidowego w mieszaninie fenol : chloroform : alkohol izoamyłowy, dawało 80-krotny wzrost wydajności transfekcji. Jest to zapewne spowodowane stratami w ilości DNA, jakie pojawiają się podczas oczyszczania i/lub zanieczyszczeniem DNA fenolem, które może mieć negatywny wpływ na transfekcję (21). Zastosowanie kolumn krzemionkowych, pozwoliło na uzyskanie 6-krotnie lepszej wydajności niż oczyszczanie mieszaniną fenolową, jednak wciąż była ona 14 razy gorsza niż w przypadku DNA ciętego, nie oczyszczonego. Sugerujemy zatem opuszczenie tego etapu. Dzięki temu nie tylko wzrasta skuteczność procedury, ale także zmniejsza się pracochłonność i skraca się czas niezbędny do jej przeprowadzenia.

Dalszy etap produkcji AdV polega już nie na transfekcji, ale na kolejnych transdukcjach komórek linii pakującej, wektorami wyizolowanymi z poprzedniego namnożenia (2,7). Istnieją co najmniej dwa sposoby uzyskiwania AdV z hodowli komórek pakujących – albo poprzez zbieranie wektorów z medium po lizie komórek, albo poprzez zbieranie zainfekowanych komórek i przeprowadzanie chemicznej lub mechanicznej lizy w celu uwolnienia AdV (8). W prezentowanej pracy nie porównywaliśmy wyników stosowania obu tych metod, lecz wykorzystywaliśmy jedynie procedurę opartą na lizie mechanicznej, polegającą na trzykrotnym zamrażaniu i rozmrażaniu komórek. Wykazaliśmy natomiast, że ustalenie odpowiedniego momentu izolacji wektorów, może znacznie poprawić miano otrzymywanej zawiesiny (rys. 7). Izolacja przy 100% CPE dała wzrost wartości miana w porównaniu z izolacją przeprowadzaną przy zalecanym 50% CPE. Wejście wszystkich komórek w stan cytopatyczności i oderwanie ich od dna naczynia, zachodziło zwykle około 48 h po infekcji, co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami pokazującymi, że w tym czasie ma miejsce najwyższa produkcja AdV (5,22). Czas ten powinien być na bieżąco monitorowany, gdyż łatwo ulega zmianie w zależności od wieku (liczby pasaży) i kondycji komórek oraz miana wektorów wykorzystywanych do transdukcji. Moment izolacji zależy ponadto od takich czynników jak cytotoksyczność transgeny oraz rodzaj pakującej linii komórkowej, co potwierdza konieczność optymalizacji tego czynnika (5,22).

Znaczny przyrost miana wektorów z kolejnych namnożeń (Ad $\beta$ -gal 1' – Ad $\beta$ -gal 6', rys. 5,8) potwierdza, że podczas produkcji łatwo jest uzyskać wysokie stężenia AdV. Przyrosty spowodowane są przede wszystkim coraz większą liczbą wektorów używaną do kolejnych infekcji oraz zwiększeniem skali hodowli (5,22). Ponieważ efektywność infekcji zależy od dyfuzji wirusów w pożywce hodowlanej (5,10), zasadne jest używanie do produkcji komórek znajdujących się w 100% konfluencji, co zwiększa prawdopodobieństwo kontaktu AdV z komórką. Temu samemu celowi służy zminimalizowanie objętości medium w pierwszej fazie infekcji wirusowej (fazie adsorpcji) (10). Prezentowane dane pokazują jednak (rys. 6), że wydłużenie czasu adsorpcji, w przypadku produkcji zachodzącej w komórkach HEK293, nie ma aż tak

dużego znaczenia, o ile infekcja przebiega w medium bogatym w składniki odżywcze (10% FBS). W dotychczasowych badaniach potwierdza się podstawową rolę bogatego w składniki odżywcze medium stosowanego do produkcji AdV (5), oraz pokazuje się, że wydłużenie czasu adsorpcji (do 6 h) może znacząco wpływać na zwiększenie miana AdV (10). Z naszych doświadczeń wynika, że te dwa czynniki współdziałają ze sobą – niską wydajność transdukcji w ubogim w składniki odżywcze medium można podwyższyć, stosując dłuższe czasy adsorpcji, a z kolei stosowanie krótszych czasów adsorpcji może być zrekompensowane poprzez wysoko odżywcze medium.

Okazuje się jednak, że w ustalonych warunkach hodowli, miano wektora w kolejnych namnożeniach może się zwiększyć jedynie do pewnego poziomu (rys. 5). W przypadku następnych namnożeń, przyrosty miana nie są już tak znaczące jak wcześniej, co sugeruje osiągnięcie *plateau* w produkcji AdV. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, pokazującymi, że zwiększona wartość MOI używanego do infekcji komórek HEK293 jedynie do pewnego stopnia poprawia wielkość miana (22). Jednocześnie należy pamiętać, że im więcej etapów namnożeń wektora, tym większe prawdopodobieństwo pojawienia się RCA (8), wirusów kompetentnych replikacyjnie, łatwo przerastających formy replikacyjnie defektywne (4,7). Wszystko to sprawia, że optymalna liczba pasażów do jakiej powinno się namnażać produkowane wektory otrzymując wysoką wartość miana, to 6 (rys. 5,8).

Niezwykle ważnym, a często niedocenianym aspektem namnażania AdV, jest określenie ilości i bioaktywności wyprodukowanych wektorów, czyli zmierzenie ich miana. Istnieje wiele różnych metod pozwalających na mianowanie wektorów, a każda z nich występuje w wielu wariantach (5,7,19). Dodatkowym utrudnieniem jest brak standaryzacji stosowanych testów (10). Jednocześnie należy pamiętać, że wiele z niepożądanych efektów infekcji AdV (cytotoksyczność, immunogenność) w dużym stopniu zależy od dawki wektora, toteż poprawne określenie miana jest zatem niezwykle ważne (1,23,24). Dlatego zdecydowaliśmy się na porównanie kilku ze znanych sposobów mianowania.

Jedną z najłatwiejszych metod jest detekcja produkcji transgenicznego białka. Jest to bezpośredni dowód na funkcjonalność cząstki wektora, a dzięki wysokiemu poziomowi ekspresji, jaki zapewniają AdV jest to również efekt łatwy do obserwowania. Określanie liczby komórek produkujących białko kodowane przez transgen można zatem z powodzeniem wykorzystać do oznaczenia miana zawiesiny AdV (7,10,17). Stosowana przez nas metoda polega na infekcji komórek HEK293 zawiesziną wirusową, a następnie na badaniu ekspresji transgeny poprzez barwienie wykrywające aktywność  $\beta$ -galaktozydazy *in situ*. Zakładając, że jeden wirion przypada na jedną zainfekowaną komórkę, możemy obliczyć liczbę IU/mL zawiesiny (10). Niestety, strategię taką można stosować jedynie w przypadku genów reporterowych, do których należy  $\beta$ -galaktozydaza czy RFP. W celu określenia miana wektorów zawierających inne transgeny, konieczne jest użycie bardziej uniwersalnej metody.

Podstawowe znaczenie podczas oznaczania miana metodami biologicznymi mają warunki infekcji. W zależności od czasu adsorpcji wektora, objętości medium, kondycji komórek oraz sposobu przygotowania i podania rozcieńczeń zawiesiny wirusowej na komórki, wyniki oznaczania miana mogą się diametralnie zmienić (10). Dlatego w prezentowanych badaniach, starano się (o ile specyfika metody na to pozwalała) utrzymać takie same warunki infekcji, jak podczas testów barwienia wykrywającego aktywność  $\beta$ -galaktozydazy. Stosowano zatem ten sam czas adsorpcji wektora w minimalnej objętości medium (1,5 h) taką samą 48 h inkubację w większej objętości medium.

Spośród porównywanych technik, najbardziej podobną do oznaczania miana za pomocą barwienia wykrywającego aktywność  $\beta$ -galaktozydazy *in situ* jest metoda polegająca na immunohistochemicznej detekcji kapsydów wirusowych, a konkretnie jednego z białek kapsydu – heksonu. Można ją przeprowadzać stosując zestaw odczynników dostępny pod komercyjną nazwą Adeno-X™ Rapid Titer ELISA Kit. Opiera się ona na założeniu, że zainfekowana komórka (wykazująca obecność kapsydu wirusowego), jest dowodem na funkcjonalność wirionu. Należy jednak brać pod uwagę możliwość wejścia do komórki również wirionów defektywnych, składających się z pustych kapsydów, a tym samym – zawyżenia miana zawiesiny AdV. Jednakże na podstawie uzyskanych przez nas danych wynika (rys. 9), że istnieje bardzo dobra korelacja między metodą immunohistochemiczną a barwieniem wykrywającym aktywność  $\beta$ -galaktozydazy *in situ*. Nie zaobserwowaliśmy zawyżenia wartości miana z powodu pustych wirionów, a równoczesne oznaczanie miana tej samej zawiesiny wirusowej dwoma omówionymi metodami dało prawie identyczne wyniki (np. barwienia  $\beta$ -gal *in situ*:  $5,7 \times 10^6$ ; ELISA:  $3,7 \times 10^6$ ).

Próby oznaczenia miana za pomocą tradycyjnych testów, bazujących na obserwacji efektu cytopatycznego (5,7,10) nie przynosiły już tak zgodnych wartości. W przypadku PFA, etap pokrywania komórek roztworem agarozy, niezbędny do ograniczenia dyfuzji namnożonych wirionów, jest na tyle kłopotliwy, a wyniki tak trudne do interpretacji, że praktycznie uniemożliwiło to stosowanie tej metody (rys. 14). Druga z tradycyjnych metod, EPDA, okazała się przede wszystkim testem niezwykle subiektywnym. Replikacja AdV w komórkach HEK293 podczas oznaczania miana powoduje ich śmierć i uwolnienie wirionów, a powtarzalne rundy tych wydarzeń dają w efekcie widoczną łysinkę, będącą dowodem na pojawienie się efektu CPE (10). W zależności od tego, czym dla osoby oznaczającej miano jest stwierdzenie „komórki mające efekt CPE” (por. rys. 10), wyniki oznaczania tej samej zawiesiny wektorowej mogą być odmienne (rys. 12). Jednocześnie trudno jest określić, które z kryteriów rozpoznania CPE w dołkach jest lepsze – czy to zgodne z procedurą i nakazujące zliczanie każdej łysinki, czy to, które bazuje jedynie na tych dołkach, gdzie wygląd łysinki nie pozostawia wątpliwości co do jej wirusowego pochodzenia.

Trudno jest ponadto spełnić kolejne kryterium wymagane do prawidłowego przeprowadzenia testu EPDA, a mianowicie 10-dniowy czas trwania eksperymentu,

konieczny do właściwego oznaczenia miana. Wcześniej bowiem pojawia się efekt cytopatyczny w dołkach kontrolnych, spowodowany przegęszczeniem komórek. Dlatego nasze wyniki są zaniżone w porównaniu z oznaczeniem miana za pomocą barwienia wykrywającego aktywność  $\beta$ -galaktozydazy *in situ*. Jednocześnie pokazują jednak, jak bardzo zwiększają się oznaczane wartości w trakcie trwania eksperymentu, na skutek drugorzędowych infekcji AdV wyprodukowanymi podczas samego oznaczania miana, co potwierdza dotychczasowe doniesienia na ten temat (10).

Największą wadą testu EDPA jest jednak pojawianie się licznych fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych wyników (rys. 13). W dotychczasowych doniesieniach na ten temat sugeruje się, że możliwa jest ekspresja transgenu w zainfekowanej komórce, przy jednoczesnym braku efektu cytopatycznego w postaci łysinki (25). W prezentowanych badaniach w pełni potwierdza się taką możliwość. Dodatkowe barwienie na  $\beta$ -galaktozydazę po zakończeniu testu ujawniło liczne przypadki CPE negatywnych studzienek, wykazujących ekspresję  $\beta$ -galaktozydazy oraz nawet liczniejsze przypadki, gdzie obserwowane naruszenie warstwy komórek, określane jako CPE, miało niewirusowe pochodzenie (brak ekspresji  $\beta$ -gal). Wszystko to potwierdza, że metoda EPDA jest nie tylko niezwykle subiektywna, ale również niemiarodajna, dlatego trudno ją używać jako metodę z wyboru do mianowania AdV. Podobne wnioski były formułowane także we wcześniejszych pracach (18).

Oprócz metod mierzących biologiczną aktywność AdV istnieje wiele sposobów oznaczania liczby cząstek wirusowych bez określania jaki jej procent to wektory w pełni funkcjonalne (10-12,14). Jednym z najpopularniejszych i najdokładniejszych testów tego typu jest oznaczenie liczby kopii DNA wektora za pomocą reakcji qPCR (13,14). W prezentowanych przez nas doświadczeniach potwierdzono wcześniejsze doniesienia na temat czułości, precyzji i szybkości tej metody. Niestety, pokazują one także, że wyniki otrzymane na podstawie reakcji PCR (tu:  $1,8 \times 10^9$  VP/mL) mogą nie być w pełni zgodne z mianem zawiesiny wirusowej oznaczonym za pomocą testów biologicznych (tu:  $1 \times 10^8$  IU/mL). Podobne rozbieżności między wartościami IU a VP były obserwowane także przez innych badaczy (14). Przyczyną niezgodności są zapewne kopie wirusowego DNA niezapakowane w funkcjonalne kapsydy. Mimo to metoda PCR w czasie rzeczywistym posiada kilka niezaprzeczalnych zalet – krótki czas trwania (ok. 3 h, podczas gdy inne metody wymagają od 2 do 14 dni), brak konieczności specjalnego przygotowywania próbki oraz brak etapu infekcji komórek. Oznaczając miano tą metodą należy jednak zwracać uwagę na sposób w jaki została przygotowana próbka zawiesiny AdV, a zwłaszcza czy została ona wcześniej oczyszczona i w jaki sposób inaktywowano białka komórkowe i wirusowe. Może to bowiem mieć duży wpływ na wynik reakcji (14).

Podsumowując, w przedstawionych doświadczeniach nad optymalizacją produkcji wektorów AdV pokazano, że nawet poprzez proste modyfikacje poszczególnych etapów można znacząco zwiększyć wydajność metody i uzyskać wysokie miano wektorów. W przeprowadzonych badaniach porównawczych mogliśmy także wybrać wiarygodne i szybkie testy do oznaczania miana wektorów w otrzymanej za-



wiesinie. Wektory takie mogą być następnie z powodzeniem używane do uzyskiwania wysokiej ekspresji transgenów w hodowlach komórkowych, a po dodatkowym oczyszczeniu mogą być również wykorzystywane w doświadczeniach *in vivo*.

Praca finansowana z projektów 2 P04 016 26, PBZ-KBN 107 P04 2004 i PBZ-KBN 105 P05 2004 (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Magdalena Stopa otrzymuje stypendium Sapere Auso z Małopolskiej Fundacji Stypendialnej, a Agnieszka Jaźwa jest stypendystką Funduszu im. Stanisława Estreichera. Alicja Józkowicz jest beneficjentem Wellcome Trust (International Senior Research Fellowship).

## Literatura

1. Amalfitano A., Parks R. J., (2002), *Curr. Gene Ther.*, 2, 111-133.
2. Amalfitano A., (2004), *Methods*, 33, 173-178.
3. Wang Y., Huang S., (2000), *Drug Discov. Today*, 5, 10-16.
4. Danthinne X., Imepriale M. J., (2000), *Gene Ther.*, 7, 1707-1714.
5. Nadeau I., Kamen A., (2003), *Biotechnol. Adv.*, 20, 475-489.
6. Mizuguchi H., Kay M.A., Hayakawa T., (2001), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 52, 165-176.
7. Kamen A., Henry O., (2004), *J. Gene Med.*, 6, S184-S192.
8. Hehir K. M., Armentano D., Cardoza L. M., Choquette T. L., Berthelette P. B., White G. A., Couture L. A., Everton M. B., Keegan J., Martin J. M., Pratt D. A., Smith M. P., Smith A. E., Wadsworth S. C., (1996), *J. Virol.*, 70, 8459-8467.
9. Murakami P., Havenga M., Fawaz F., Vogels R., Marzio G., Pungor E., Files J., Do L., Goudsmit J., McCaman M., (2004), *J. Virol.*, 78, 6200-6208.
10. Mittereder N., March K. L., Trapnell B. C., (1996), *J. Virol.*, 70, 7498-7509.
11. Maizel J. V., White D. O., Scharff M. D., (1968), *Virology*, 36, 115-125.
12. Murakami P., McCaman M. T., (1999), *Anal. Biochem.*, 274, 283-288.
13. Ma L., Bluysen H. A. R., de Raeymaecker M., Laurysens V., van der Beek N., Pavliska H., van Zonneveld A.-J., Tomme P., van Es H. H. G., (2001), *J. Virol. Methods*, 93, 181-188.
14. Wang F., Puddy A. C., Mathis B. C., Montalvo A. G., Louis A. A., McMackin J. L., Xu J., Zhang Y., Tan C. Y., Schofield T. L., Wolf J. J., Lewis J. A., (2005), *Vaccine*, 23, 4500-4508.
15. Lehmborg E., Traina J. A., Chakel J. A., Chang R.-J., Parkman M., McCaman M. T., Murakami P. K., Lahidji V., Nelson J. W., Hancock W. S., Nestaas E., Pungor Jr. E., (1999), *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 732, 411-423.
16. Blanche F., Cameron B., Barbot A., Ferrero L., Guillemin T., Guyot S., Somarriba S., Bisch D., (2000), *Gene Ther.*, 7, 1055-1062.
17. Park M. T., Lee G. M., (2000), *Bioprocess Eng.*, 22, 403-406.
18. Nyberg-Hoffman C., Shabram P., Li W., Giroux D., Aguilar-Cordova E., (1997), *Nat. Med.*, 3, 808-811.
19. Hutchins B., Sajjadi N., Seaver S., Shepherd A., Bauer S. R., Simek S., Carson K., Aguilar-Cordova E., (2000), *Mol. Ther.*, 2, 532-534.
20. Tamanoi F., Stillman B. W., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 79, 2221-2225.
21. Józkowicz A., Dulak J., Guevera I., Wybrańska I., Dembińska-Kieć A., (1999), *Clin. Chim. Acta*, 288, 1-19.
22. Park M. T., Lee M. S., Kim S. H., Jo E.-C., Lee G. M., (2004), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, 553-558.
23. Yang Y., Li Q., Ertl H. C., Wilson J. M., (1995), *J. Virol.*, 69, 2004-2015.
24. Muruve D. A., Barnes M. J., Stillmann I. E., Libermann T. A., (1997), *Hum. Gene Ther.*, 10, 965-976.
25. Kremer E. J., (2004), *J. Gene Med.*, 6, S139-S151.