



Optymalizacja otrzymywania wektorów AAV

Agnieszka Jaźwa, Andrzej Rutkowski, Sławomir Gołda,
Anna Rehhahn, Alicja Józkowicz, Józef Dulak

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

Optimization of methods for the production of AAV vectors

Summary

One of the conditions of effective gene therapy is the choice of a proper gene carrier that will efficiently deliver the genetic material to the damaged tissue without causing deleterious side-effects. Adeno-associated viral vectors (AAV) have emerged as attractive tools for gene therapy, because of their broad tissue tropism, long-term transgene expression, and lack of human pathology. Nevertheless, difficulty in preparing and purifying this viral vector in large quantities remains a major obstacle for evaluating AAV vectors in clinical trials. In this article, we compare different methods for AAV production in order to optimize the conditions of AAV preparation to the scale and purity required for clinical and potential commercial applications.

Key words:

AAV vectors, reporter genes, gene therapy.

Adres do korespondencji

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

biotechnologia

3 (78) 141–156 2007

1. Wstęp

Wirusy towarzyszące adenowirusom (AAV, ang. *adeno-associated viruses*) należą do grupy bezotoczkowych parwowirusów, które w swojej strukturze zawierają jednoniciowy DNA długości około 5 kb (1). AAV mają możliwość dobudowania drugiej nici DNA i efektywnej replikacji tylko w obecności wirusów pomocniczych, takich jak adenowirusy lub wirus opryszczki (2).

W genomie AAV kodowane są dwie rodziny białek wirusowych *rep* (białka biorące udział w replikacji) i *cap* (białka kapsydu).

Trzy białka kapsydu (VP1, VP2 i VP3) powstają w wyniku alternatywnego składania transkryptów znajdujących się pod kontrolą promotora p40. Na końcach 5' genomu wirusów AAV zlokalizowane są sekwencje *rep* kodujące cztery rodzaje białek biorących udział w replikacji (Rep78/68 i Rep52/40), które podobnie jak białka kapsydu powstają poprzez alternatywne składanie transkryptów będących pod kontrolą dwóch promotorów, odpowiednio p5 i p19. Białka Rep mają duże znaczenie w cyklu życiowym wirusów AAV. Rep78 i Rep68 są niezbędne w procesie replikacji wirusowego DNA, kontroli transkrypcji i miejscowospecyficznego integracji z chromosomem 19 genomu gospodarza (3). Mniejsze białka Rep52 i Rep40 są pomocne w upakowaniu materiału genetycznego do kapsydów wirusowych. Sekwencje *rep* i *cap* mogą być dostarczane także w formie *trans*, tzn. na innej niż genom wirusa nici DNA. Na obu końcach (5' i 3') sekwencji kodującej białka wirusowe znajdują się bogate w pary GC 145-nukleotydowe sekwencje palindromowe ITR (ang. *inverted terminal repeats*) (3). Fragmenty te, stanowiące jedynie około 4% genomu wirusa, charakteryzują się co najmniej trzema istotnymi elementami. Po pierwsze, ITR przy końcu 3' służy jako starter i umożliwia syntezę drugiej nici DNA. Po drugie, fragment ten posiada w swojej strukturze sekwencję wiążącą białka Rep (RBS, ang. *Rep-binding site*), a konkretnie Rep78 i Rep68, które wykazują aktywność helikazy i endonukleazy, co umożliwia miejscowospecyficzne wycięcie sekwencji kodującej genomu wirusa. Po trzecie, każdy fragment ITR zawiera miejsce TRS (ang. *terminal resolution site*), którego sekwencja jest identyczna z sekwencją w chromosomie 19. Wszystkie te cechy umożliwiają miejscowospecyficzną integrację materiału genetycznego wirusa z genomem gospodarza w przypadku nieobecności wirusów pomocniczych (4). W formie latentnej wirus może przebywać w genomie gospodarza przez lata.

Wektory AAV powstają poprzez wstawienie transgenu, czyli sekwencji kodującej np. białko terapeutyczne, w miejsce sekwencji *rep* i *cap* (5,6). Fragmenty ITR na końcach 5' i 3' wirusowej sekwencji kodującej muszą być obecne w wektorze AAV w formie *cis*, czyli na tej samej co transgen nici DNA, aby powstały w pełni funkcjonalne cząstki AAV.

Wczesne metody produkcji AAV prowadzone były w obecności wirusów pomocniczych (7). Zasadność użycia tych wektorów do badań *in vivo* budziła wiele wątpliwości głównie ze względu na ich dużą immunogenność. W związku z tym podjęto badania nad otrzymywaniem wektorów AAV w sposób bardziej bezpieczny, bez udziału wirusów pomocniczych.

Klasyczna metoda takiej produkcji opiera się na trójplazmidowej kotransfekcji komórek linii HEK293 (8). Są to komórki embrionalne z ludzkiej nerki z wbudowanym w genom adenowirusowym (Ad5) regionem E1 (9). Region ten koduje *in trans* białka E1 adenowirusa. Pozostałe geny niezbędne do powstania cząstek AAV dostarczane są w plazmidzie zawierającym transgen (wektor 1) oraz dwóch plazmidach pomocniczych. Jeden zawiera genom wirusowy AAV – geny *rep* i *cap* (*AAV-helper plasmid*, wektor 2), a w kolejnym zakodowane są białka adenowirusowe E2A, E4ORF6, VA (*Ad-helper plasmid*, wektor 3). System transfekcji trójplazmidowej jest dostępny komercyjnie od kilku lat.

Możliwe jest również otrzymywanie wektorów AAV oparte na prostszym, dwuplazmidowym systemie transfekcji (10). W tym przypadku jeden plazmid koduje transgen (wektor 1), natomiast geny *rep*, *cap* oraz geny adenowirusowe dostarczane są do komórek w układzie *trans* na jednym wspólnym plazmidzie pomocniczym (pDG). Sekwencje ITR znajdują się na obu końcach transgeny, są zatem wprowadzane w formie *cis*, natomiast wszystkie geny pomocnicze dostarczane są w układzie *trans*, co pozwala na uzyskanie replikacyjnie defektywnych wektorów AAV.

Pierwszą opisaną i ciągle jeszcze stosowaną metodą oczyszczania wektorów AAV było ich ultrawierowanie w gradiencie chlorku cezu (CsCl) (11). Niestety, izolaty AAV uzyskiwane tą metodą są w znacznym stopniu zanieczyszczone białkami komórkowymi linii pakującej, a wysoki stosunek kopii genomów AAV (vp, ang. *viral particles*) do cząstek transdukujących (TU, ang. *transducing units*) świadczy o znacznej zawartości niefunkcjonalnych wektorów (12,13).

Alternatywną metodą oczyszczania jest połączenie ultrawierowania w gradiencie jodksanolu (zamiast CsCl) z wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC, ang. *high performance liquid chromatography*) na kolumnach wypełnionych złożem heparynowym (13). Procedura ta pozwala na uzyskiwanie wysokiej czystości izolatów o niskim stosunku vp/TU. Znacznie prostszą, bo nie wymagającą tak skomplikowanej aparatury jest jednoetapowa metoda oczyszczania na kolumnach wypełnionych heparynowaną agarozą o przepływie grawitacyjnym (SSCP, ang. *single-step gravity-flow column purification*) (12). Obie procedury, HPLC i SSCP, działają w oparciu na chromatografii powinowactwa wykorzystując zdolność wiązania cząstek AAV serotypu 2 z siarczanem heparanu (14).

Celem badań było porównanie dwóch metod transfekcji (dwu- i trójplazmidowej) pod względem wydajności tworzenia wektorów AAV w komórkach linii pakującej HEK293. Dokonano również analizy porównawczej dwóch metod oczyszczania cząstek AAV – ultrawierowania w gradiencie jodksanolu w połączeniu z HPLC oraz rozdziału na kolumnach o przepływie grawitacyjnym. Izolaty oceniano pod kątem zawartości cząstek infekcyjnych (TU) stosując metodę seryjnych rozcieńczeń wektora z genem reporterowym. Liczbę kopii genomów wektorów AAV (vp) określało techniką PCR w czasie rzeczywistym, (*real-time* PCR, *quantitative* PCR, qPCR).

2. Materiały i metody

2.1. Hodowla komórek

Embrionalne komórki ludzkiej nerki 293 (HEK293, ang. *human embryonic kidney cells 293*) (Stratagene) hodowano w pożywce MEM α Modification (PAA Laboratories), której 10% stanowiła płodowa surowica bydlęca (FBS, ang. *fetal bovine serum*) (PAA Laboratories). Dodatkowo pożywka wzbogacona była o L-glutaminę (2 mM), penicylinę (100 U/mL) i streptomycynę (10 μ g/mL). Ludzkie komórki nabłonkowe

z raka szyjki macicy (Hela, ang. *human epithelial cells from a fetal cervical carcinoma*) (ATCC) i ludzkie keratynocyty (HaCaT, ang. *human keratinocytes*,) (otrzymane dzięki uprzejmości Roberta Fuseniga, Heidelberg University, Niemcy) hodowano w pożywce DMEM (PAA Laboratories) uzupełnionej 10% FBS, L-glutaminą (2 mM), penicyliną (100 U/mL) i streptomycyną (100 µg/mL).

2.2. Izolacja plazmidowego DNA

Plazmidowy DNA wektora zawierającego transgen (LacZ lub GFP, wektor 1) (Stratagene), AAV-helper (wektor 2) (Stratagene), Ad-helper (wektor 3) (Stratagene) oraz pDG (otrzymany dzięki uprzejmości Selvarangana Ponnazhagana, University of Alabama, Birmingham, USA) wprowadzono do komórek kompetentnych *Escherichia coli* JM109 metodą transformacji z zastosowaniem szoku termicznego, namnażano poprzez całonocną hodowlę zawiesiny bakterii w pożywce LB w temperaturze 37°C w wytrząsarce i izolowano za pomocą zestawu Qiagen Midi lub Maxi Kit (Qiagen) zgodnie z procedurą producenta.

2.3. Transfekcja komórek pakujących HEK293

Komórki rosnące na szalkach o powierzchni 176 cm² transfekowane były przy konfluencji 80-90%. Na 2-3 godziny przed transfekcją pożywka hodowlana na każdej szalce była wymieniana na świeżą. Wszystkie porcje podane zostały na jedną transfekcję prowadzoną na pojedynczej szalce. Bezpośrednio przed transfekcją mieszano wektory 1, 2 oraz 3 w stosunku molarnym 1:1:1 – w przypadku transfekcji trójplazmidowej lub wektory 1 i pDG w stosunku molarnym 1:3 – w przypadku transfekcji dwuplazmidowej. W obu mieszaninach transfekcyjnych końcowa ilość DNA nie przekraczała 62,5 µg. Po dodaniu 150 µL 2,5 M CaCl₂ całość dopełniano sterylną wodą do objętości 1 mL. Podczas wytrząsania tej mieszaniny kroplami dodawano 1 mL 2x stężonego roztworu HBS (ang. *HEPES buffered saline*) (BD Biosciences). Całość inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5-10 minut, do momentu pojawienia się białej zawiesiny w roztworze, co świadczyło o wytworzeniu się kompleksów transfekcyjnych Ca₃(PO₄)₂ z DNA. Mieszaninę nakrapiano na komórki HEK293. Po 18 godzinach pożywkę wymieniano na świeżą. W ciągu następnych 48-72 godzin obserwowano efekt cytopatyczny (okrągłe komórki przyczepione do szalki), świadczący o wydajnym tworzeniu cząstek AAV wewnątrz komórek pakujących. Po tym czasie komórki zdrapywano z szalki i wirowano przez 5 min przy 160 × g w 4°C. Po odrzuceniu supernatantu osady komórek natychmiast poddawano lizie lub przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych etapów izolacji.

2.4. Liza komórek pakujących

Osad komórek zawieszano w 15 mL buforu lizującego (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH 8,5), wówczas gdy kolejnym etapem było ultrawierowanie i rozdział HPLC lub w 5 mL bezsurowiczej pożywki MEM α Modification, gdy do izolacji stosowano metodę SSCP. Następnie, tak przygotowaną zawiesinę komórek poddawano trzykrotnemu szybkiemu zamrażaniu (w oparach ciekłego azotu) i rozmrażaniu w 37°C (w łaźni wodnej). Po każdym cyklu lizat intensywnie mieszano, po czym do lizatu dodawano DNazę I (Sigma) w stężeniu końcowym 0,1 mg/mL i inkubowano przez 30 min w 37°C w celu strawienia nadmiaru plazmidowego DNA. Fragmenty komórkowe usuwano poprzez wirowanie przy $3700 \times g$ przez 10 min w temperaturze pokojowej, a klarowny supernatant poddawano procedurze dalszego oczyszczania lub nieoczyszczony nakładano na komórki w celu określenia ilości TU.

2.5. Oczyszczanie lizatu komórkowego metodą SSCP

Stosowano metodę szczegółowo opisaną przez Auricchio i wsp. (12), według której klarowny, poddany działaniu DNazy I lizat komórkowy inkubowano w kwasie deoksycholowym (Sigma) o stężeniu końcowym 0,5% przez 30 min w 37°C w łaźni wodnej, po czym filtrowano przez filtry o średnicy porów 5 oraz 0,8 μm (Millipore). Tak przygotowany lizat наносono na kolumnę wypełnioną heparynowaną agarozą (Sigma). Po związaniu się cząstek AAV, złożę dwukrotnie płukano 25 mL 0,1 M roztworem soli NaCl w buforze PBS (ang. *phosphate buffered saline*), po czym eluowano wektory 0,4 M NaCl w objętości 15 mL. W celu pozbycia się nadmiaru soli z próbki oraz jej zagęszczenia do objętości około 200 μl , wektory kilkakrotnie płukano i wirowano w buforze PBS w probówkach typu Amikon Ultra 100K (Millipore) z umieszczonym wewnątrz nieprzepuszczalnym dla wektorów AAV filtrem.

2.6. Oczyszczanie lizatu komórkowego poprzez ultrawierowanie w gradiencie gęstości jodiksanolu

Zastosowano, w niewielkim stopniu zmodyfikowaną, metodę opisaną przez Zolotukhina i wsp. (13). Bezpośrednio przed wirowaniem do probówek wirówkowych typu Quick-Seal (Beckman) dodawano klarowny lizat komórkowy, po czym formowano gradient poprzez wprowadzenie stopniowo od dna próbki wirówkowej roztworów o wzrastającym stężeniu jodiksanolu (OptiPrep density gradient medium) (Sigma). Nakładano kolejno: 15, 25, 40 i 57% roztwór jodiksanolu w buforze PBS-MK (1 \times PBS uzupełniony jonami magnezu – 1 mM MgCl₂ i potasu – 2,5 mM KCl). Roztwory 25 i 57% jodiksanolu przed wprowadzeniem do próbki wirówkowej były barwione poprzez dodanie do nich czerwieni fenolowej (2,5 μl 0,5% roz-

tworu na mL jodiksanolu) w celu odróżniania po ultrawiirowaniu niezabarwionej warstwy 40% roztworu jodiksanolu zawierającej wektory AAV. Ultrawiirowanie prowadzono w rotorze 50,2 Ti (Beckman) stosując przyspieszenie $200\ 000 \times g$ przez 2 godziny 40 minut w temperaturze 18°C. Bezpośrednio po wirowaniu ostrożnie zbierano strzykawką około 3 mL frakcji bezbarwnego 40% jodiksanolu poprzez nakłucie próbówki igłą o średnicy 18 G na odpowiedniej wysokości. Próbkę przechowywano w temperaturze 4°C przez około 18 godzin do czasu dalszej analizy.

2.7. Oczyszczanie frakcji 40% jodiksanolu na kolumnach powinowactwa w systemie HPLC

Wektory AAV izolowano techniką chromatografii powinowactwa z kolumnami wypełnionymi złożem heparynowym o objętości 1 mL (HiTrap Heparin HP Columns, Amersham Biosciences). Frakcję zebraną po ultrawiirowaniu dopełniono w strzykawce do 5 mL buforem wiążącym PBS-MK, bezpośrednio przed naniesieniem na kolumnę. Tak przygotowaną próbkę наносzono na kolumnę z prędkością 0,5 mL/min. Elucję wektorów z kolumny prowadzono w gradiencie 0,1 M Na₂SO₄ w buforze PBS-MK z prędkością przepływu 1 mL/min, a pomiaru absorbancji dokonywano przy 231 nm. Frakcja HPLC zawierająca pojedynczy pik chromatograficzny poddawana była dializie w kasetach Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 10K MWCO o pojemności 0,5-3 mL (Pierce) w roztworze PBS przez noc w temperaturze 4°C, a następnie w roztworze 20% glicerolu w PBS w celu wytworzenia odpowiednich warunków do zamrożenia wektorów w temperaturze -80°C.

2.8. Elektroforeza białek wirusowych w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) i barwienie srebrem

Czystość wyizolowanych wektorów AAV sprawdzano poprzez rozdział elektroforetyczny izolatów uzyskanych w wyniku zastosowania dwóch różnych metod oczyszczania wektorów AAV (HPLC i SSCP). Do 15 µl roztworu zawierającego cząstki AAV dodawano 5 µl 4× stężonego buforu obciążającego, po czym próbki denaturowano przez 5 minut w temperaturze 98°C. Tak przygotowane próbki nakładano na 12% żel poliakrylamidowy z SDS i prowadzono elektroforezę przy 180 V przez 2 godziny. Wizualizacji białek tworzących kapsyd wektorów (VP1, VP2 i VP3) dokonywano poprzez barwienie żelu srebrem z użyciem zestawu odczynników GelCode SilverSNAP Stain Kit (Pierce) według procedury producenta.

2.9. Pomiar miana cząstek AAV techniką qPCR

Reakcja qPCR prowadzona była bezpośrednio w roztworze zawierającym oczyszczone wektory AAV na podstawie metody opisanej przez Rohr i wsp. (15). W wysokiej temperaturze (95°C) na początku reakcji PCR białka kapsydu ulegają degradacji, uwalniając matrycę do reakcji. Produkt amplifikacji wykazywał fluorescencję wynikającą z interkalacji barwnika SYBR Green pomiędzy dwie nici DNA. Reakcja PCR poprzedzona była 15 minutami aktywacji polimerazy w 95°C, po czym następowało 40 cykli denaturacji (15 sekund, 95°C), hybrydyzacji (20 sekund, 58°C) oraz polimeryzacji (15 sekund, 72°C). Oceny specyficzności amplifikacji dokonywano poprzez analizę krzywych topnienia produktów PCR. Do reakcji użyto primerów specyficznie rozpoznających gen białka GFP (wprzód: 5' ATG ACG GGA ACT ACA AGA CCC GC 3'; wstecz: 5' AGG TAA TGG TTG TCT GGG AGG AGC 3'). Długość produktu PCR wynosiła 298 nukleotydów. Liczbę kopii genu określano na podstawie krzywej standardowej sporządzonej z plazmidu z wklonowanym analizowanym genem.

2.10. Barwienie komórek po transdukcji AAV-LacZ

Powstałe w wyniku dwuplazmidowej transfekcji, oczyszczone poprzez wirowanie w gradiencie jodoksanolu oraz rozdziel HPLC wektory AAV kodujące gen reporterowy dla białka β -galaktozydazy (AAV-LacZ) w różnej dawce (1000 lub 10 000 MOI – ang. *multiplicity of infection*) dodawano do pożywki hodowlanej komórek HEK293, HeLa i HaCaT rosnących na 96-studzienkowej płytce. Po 72 h komórki dwukrotnie płukano PBS, utrwalano na płytce 0,2% aldehydem glutarowym (AppliChem), a następnie barwiono inkubując przez kilka do kilkunastu godzin w roztworze substratu: 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$, 0,2% X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranozyl) (AppliChem) w PBS. Wydajność transdukcji określano poprzez odsetek komórek wykazujących niebieskie zabarwienie, wynikające z aktywności β -galaktozydazy.

2.11. Pomiar ilości infekcyjnych cząstek AAV

Komórki HEK293 wysiewano na płytkę 96-studzienkową w ilości 4×10^3 na studzienkę, 24 godziny przed transdukcją. Do komórek dodawano kolejne rozcieńczenia wektorów AAV z genem reporterowym kodującym białko o zielonej fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*) w objętości 30 μ L na dołek. Po dwóch godzinach inkubacji do komórek dodawano pożywkę hodowlaną do końcowej objętości 100 μ L na dołek i hodowano je przez następne 72 godziny. Po tym czasie, w dwóch najniższych rozcieńczeniach oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym liczbę komórek zawierających GFP. Zakładając, że jedna cząstka AAV transdukuje jedną

komórkę, liczbę cząstek infekcyjnych (TU) wyliczono ze wzoru: $TU/mL = A/0,1 \times B$, gdzie A odpowiada liczbie komórek transduktantów w jednym dołku, a B to rozcieńczenie, jakiego w danym dołku użyto. Współczynnik 0,1 oznacza końcową objętość pożywki w jednym dołku – w tym przypadku 0,1 mL.

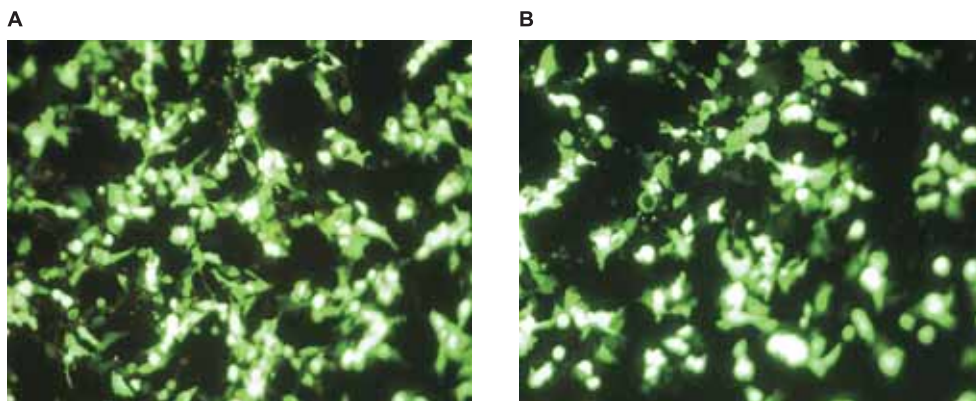
2.12. Analiza cytotoksyczności

Toksyczność wektorów AAV określano poprzez pomiar ilości uwolnionej do pożywki hodowlanej dehydrogenazy mleczanowej (LDH) według procedury zalecanej przez producenta odczynników (Promega).

3. Wyniki

3.1. Wydajność transfekcji komórek pakujących w systemie dwu- i trójplazmidowym

Komórki HEK293 zostały poddane transfekcji dwu- lub trójplazmidowej. Wektorem niosącym transgen w obu przypadkach był plazmid pAAV-GFP, kodujący białko GFP. Używany w transfekcji dwuplazmidowej plazmid pDG jest bardzo dużym wektorem (około 22 kb), około 3-krotnie większym od pAAV-GFP. W związku z tym, aby uniknąć sytuacji, w której plazmid niosący transgen preferencyjnie wnikałby do komórek, plazmid pomocniczy dodawano do mieszaniny transfekcyjnej w ilości 3-krotnie przekraczającej ilość plazmidu kodującego transgen. W transfekcji trójplazmidowej (Stratagene) wielkość wszystkich wektorów (1, 2 i 3) jest zbliżona, dodawano

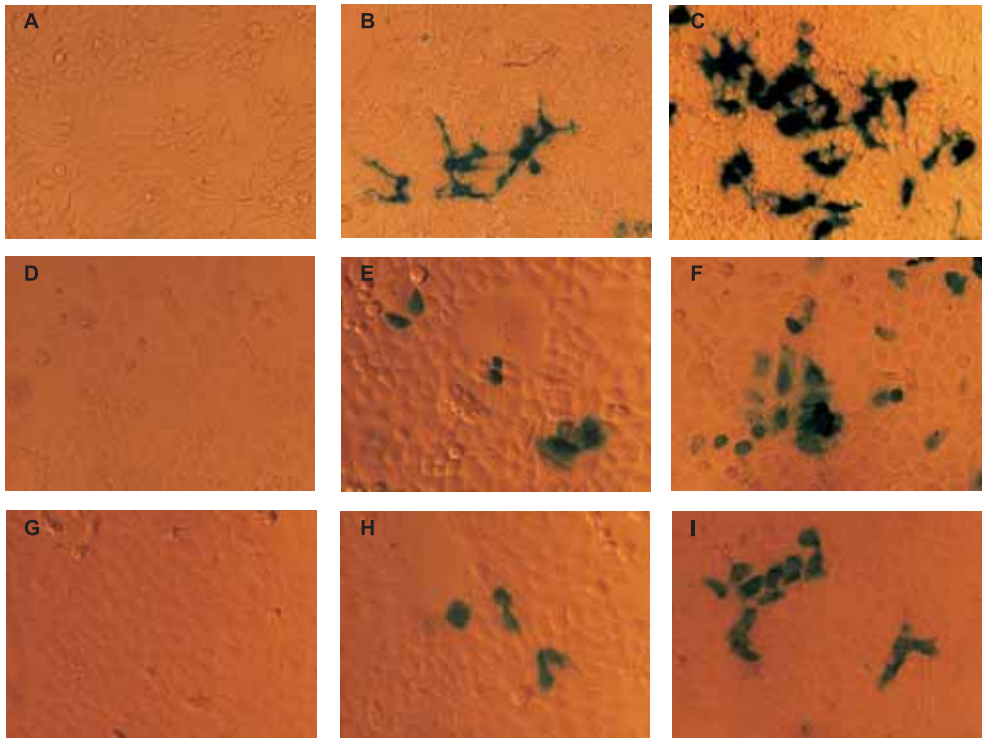


Rys. 1. Reprezentatywne zdjęcia komórek HEK293 24 godziny po transfekcji: A – z dwoma plazmidami – pAAV-GFP i pDG oraz B – z trzema plazmidami – pAAV-GFP, pAAV-helper i pAd-helper (Stratagene) (zdjęcie po prawej).

je zatem do mieszaniny transfekcyjnej w stosunku molarnym 1:1:1. W obu przypadkach, w dziesięciu losowo wybranych polach widzenia policzono komórki wykazujące zieloną fluorescencję. Nie zaobserwowano różnic w wydajności transfekcji pomiędzy dwoma testowanymi systemami – w obu przypadkach była ona wysoka i wynosiła około 80% (rys. 1).

3.2. Wydajność transdukcji różnych typów komórek przez wektory AAV

W celu określenia, która z trzech wybranych linii komórkowych najefektywniej będzie ulegać transdukcji, oczyszczone poprzez ultrawierowanie w gradiencie jodoksanolu i przez HPLC wektory AAV-LacZ w ilości 1000 i 10 000 MOI zostały dodane do pożywki hodowlanej komórek HEK293, HeLa i HaCaT. Poziom żywotności hodowli w przypadku obu dawek AAV, określony z użyciem testu mierzącego ilość uwolnionej do pożywki LDH nie wykazał istotnych różnic w stosunku do komórek



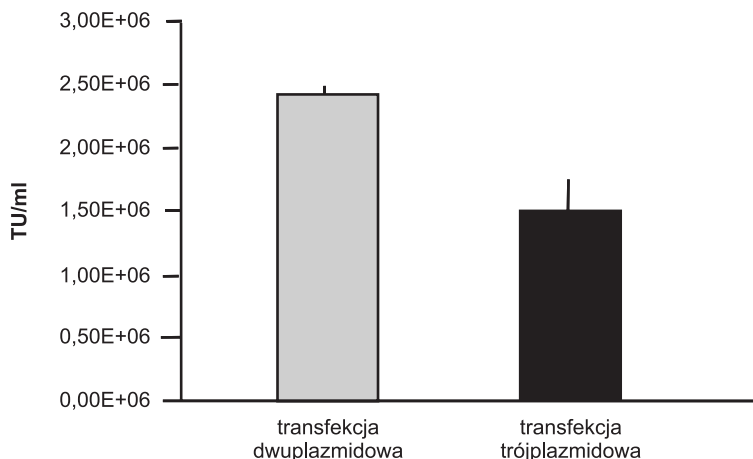
Rys. 2. Wydajność transdukcji różnych typów komórek przez wektory AAV-LacZ. Zdjęcia A-C – komórki HEK293, gdzie B – 1000 MOI i C – 10 000 MOI wektora. Zdjęcia D-F – komórki HeLa, gdzie E – 1000 MOI i F – 10 000 MOI wektora. Zdjęcia G-I – komórki HaCaT, gdzie H – 1000 MOI i I – 10 000 MOI wektora.

kontrolnych (danych nie przedstawiono). Wydajność transdukcji określona została poprzez odsetek komórek wykazujących niebieskie zabarwienie po dodaniu do nich roztworu X-Gal. Najbardziej podatna na transdukcję okazała się linia HEK293 (rys. 2). Z tego względu, te właśnie komórki służyły do rutynowego testowania na zawartość TU każdego nowego izolatu AAV.

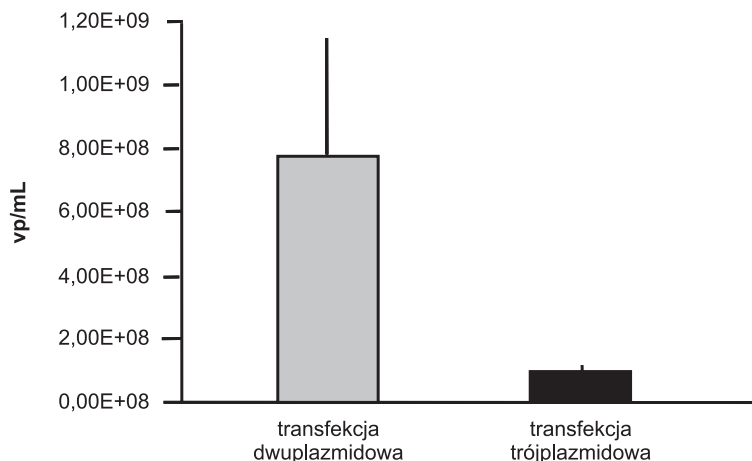
W przeprowadzonej później analizie porównawczej oczyszczonych w identyczny sposób i z identycznej liczby komórek pakujących izolatów AAV-GFP i AAV-LacZ wykazano, że ilość białka GFP w mikroskopie fluorescencyjnym w stransdukowanych komórkach HEK293 była około 10-krotnie większa niż barwnego produktu aktywności enzymatycznej białka LacZ (danych nie przedstawiono). W związku z tym do dalszych badań jako genu reporterowego używano GFP.

3.3. Określenie ilości cząstek infekcyjnych (TU, ang. *transducing units*) wektorów AAV

Identyczną liczbę komórek HEK293 transfekowano plazmidem zawierający gen reporterowy kodujący białko GFP w systemie dwu- i trójplazmidowym. Po 48 godzinach od momentu transfekcji przeprowadzono procedurę oczyszczania wektorów AAV na kolumnach w systemie SSCP. W obu izolatach określono liczbę cząstek zdolnych do transdukcji pojedynczej komórki w hodowli. Analizy dokonano poprzez transdukcję komórek HEK293 kolejnymi rozcieńczeniami obu izolatów AAV. Po 72 godzinach hodowli stwierdzono, że liczba infekcyjnych cząstek AAV powstałych w układzie dwuplazmidowym była wyższa niż w izolacie uzyskanym po transfekcji trzema plazmidami, np. odpowiednio: $2,4 \times 10^6$ TU/mL oraz $1,5 \times 10^6$ TU/mL (rys. 3).



Rys. 3. Analiza porównawcza ilości infekcyjnych cząstek AAV (TU/ml) w izolatach powstałych w wyniku transfekcji dwu- i trójplazmidowej. Oceny immunofluorescencji dokonano po 72 godzinach hodowli w obecności AAV kodujących GFP.



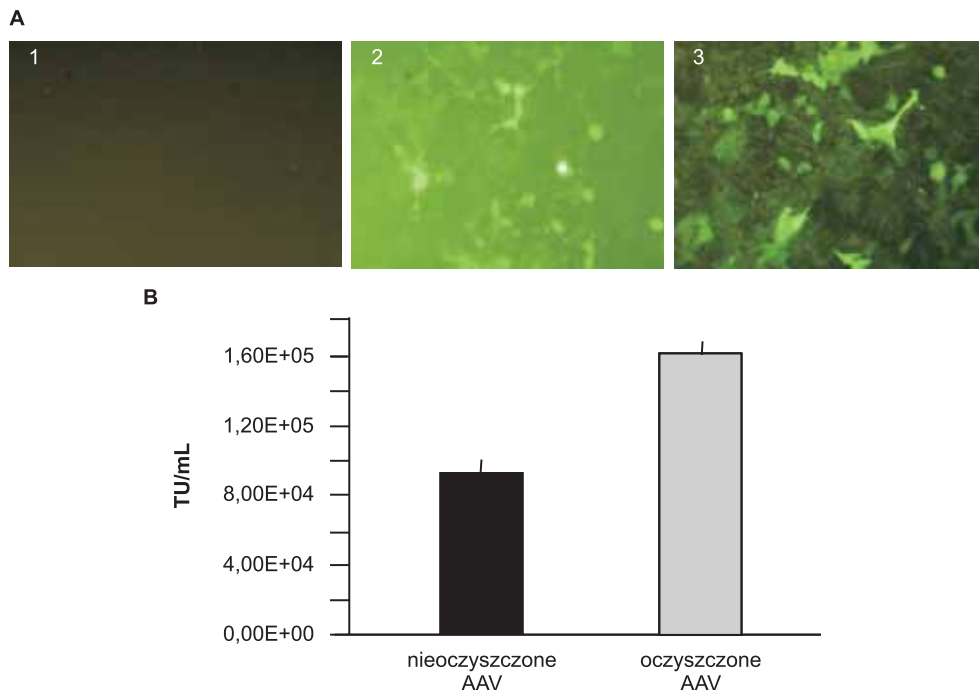
Rys. 4. Analiza porównawcza liczby kopii genomów wektorów AAV (vp/mL) oznaczonej przy użyciu techniki qPCR po transfekcji komórek HEK293 dwoma lub trzema plazmidami.

3.4. Miano wektorów AAV otrzymanych w wyniku transfekcji dwu- i trójplazmidowej

W tych samych izolatach wektorów AAV otrzymanych w wyniku transfekcji dwu- i trójplazmidowej, w których oznaczano liczbę cząstek infekcyjnych AAV dokonano oznaczenia miana wektorów AAV poprzez zastosowanie metody qPCR. Na podstawie krzywej standardowej określono liczbę kopii genu białka GFP, a przez to liczbę cząstek AAV w analizowanym materiale, np. na poziomie $7,8 \times 10^8$ vp/mL w wyniku transfekcji dwuplazmidowej oraz $9,2 \times 10^7$ vp/mL po transfekcji trójplazmidowej (rys. 4). Mimo braku znaczących różnic w poziomie transfekcji komórek linii pakującej (rys. 1), system transfekcji dwuplazmidowej, jak się okazało, był efektywniejszy także pod względem liczby kopii genomów wektorów AAV.

3.5. Wpływ oczyszczania wektorów AAV na liczbę cząstek infekcyjnych i wydajność transdukcji

Komórki HEK293 hodowano w obecności wektorów AAV-GFP (rys. 5A). Jedną grupę stanowiły komórki potraktowane wektorami nieoczyszczonymi (klarowny lizat komórkowy trawiony DNazą I), a drugą – komórki hodowane w obecności wektorów AAV oczyszczonych z użyciem kolumn wypełnionych złożem heparynowanej agarazy. Zawartość cząstek infekcyjnych w oczyszczonym izolacie AAV wynosiła $1,6 \times 10^5$ TU/mL (rys. 5B). W przypadku nieoczyszczonego lisatu komórkowego wartość ta była niższa i wynosiła 9×10^4 TU/mL (rys. 5B). Ponadto, w polu widzenia w mikroskopie fluorescencyjnym dało się zauważyć stosunkowo silne tło, które do-

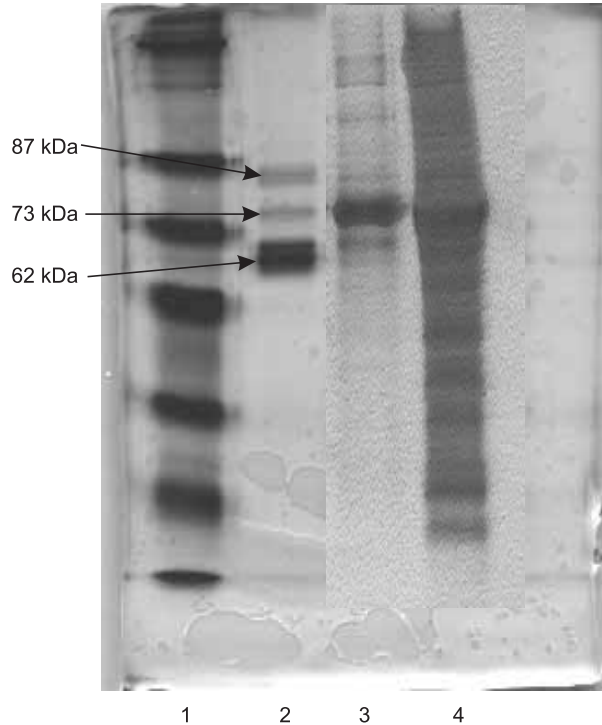


Rys. 5. A) Reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego. Ocena wydajności transdukcji komórek HEK293 przez wektory AAV-GFP obecne w pierwotnym lizacie komórkowym (2) (nieoczyszczone AAV) i po oczyszczeniu tego lizatu (3) na kolumnach SSCP z heparynowaną agarozą (oczyszczone AAV), 1 – kontrola nietransdukowana. B) Analiza ilościowa cząstek infekcyjnych (TU).

datkowo utrudniało analizę (rys. 5A). Efekt ten był spowodowany obecnością znacznych ilości białek komórkowych (w tym GFP), które zanieczyszczały pierwotny lizat komórkowy. Niewykluczone również, że zanieczyszczenia te utrudniając wiązanie się cząstek AAV do receptorów na powierzchni komórek, były przyczyną niższej infekcyjności wektorów AAV-GFP w nieoczyszczonym lizacie.

3.6. Ocena stopnia czystości wektorów AAV

Stopień zanieczyszczenia wektorów AAV białkami komórkowymi oceniano poprzez barwienie srebrem izolatów AAV po rozdziale elektroforetycznym w 12% żelu poliakrylamidowym (rys. 6). Po dokładnym oczyszczeniu powinny być widoczne jedynie białka budujące kapsyd AAV – VP1, VP2, VP3. Na podstawie analizy wybarwionego żelu wykazano, że tylko oczyszczanie wektorów w procesie ultrawirowania w gradiencie jodiksanolu z następującym potem rozdzielaniem HPLC pozwala na uzyskanie preparatów wysokiej czystości (rys. 6, ścieżka 2).



Rys. 6. Wybarwiony srebrem żel poliakrylamidowy po rozdziale elektroforetycznym. Na żel naniesiono kolejno: 1 – marker masowy, 2 – wektory AAV oczyszczone w systemie ultrawirowania w gradiencie jodiksanolu i rozdzielu HPLC (widoczne trzy prążki pochodzące od białek VP1, VP2 i VP3), 3 – wektory AAV oczyszczone na kolumnach z heparynowaną agarozą o przepływie grawitacyjnym, 4 – nieoczyszczony klarowny lizat komórkowy – bardzo duże zanieczyszczenie białkami komórkowymi.

4. Dyskusja

Wektory AAV są bardzo obiecującym narzędziem terapii genowej ze względu na kilka istotnych cech, do których należą brak immunogenności i patogenności oraz zdolność do wywoływania długotrwałego efektu terapeutycznego – jak się obecnie uważa – głównie poprzez możliwość transdukcji komórek nie dzielących się, np. komórek mięśniowych, neuronów i hepatocytów (5). Najważniejszym czynnikiem ograniczającym ich zastosowanie w terapii genowej u ludzi jest problem z uzyskaniem wysokiego miana wektorów, pozwalającego na osiągnięcie odpowiedniego efektu terapeutycznego. Można tego dokonać poprzez zwiększenie liczby poddawanych transfekcji komórek pakujących HEK293 (12). Jednakże, nie zawsze jest to możliwe do wykonania ze względów czysto technicznych, jak chociażby ograniczona pojemność inkubatora do hodowli komórek, bądź brak możliwości nabycia kilkusetlitrowego bioreaktora. W związku z tym, wielu badaczy przez szereg lat koncen-

trowało się na ulepszeniu metod transfekcji komórek linii pakującej i dalszych etapów izolacji wektorów AAV (12,8,13). Dotychczas nie ma jednej, ogólnie przyjętej procedury produkcji i mianowania wektorów AAV. Pojawiające się w związku z tym rozbieżności często utrudniają porównanie wyników pomiędzy różnymi laboratoriami lub nawet ich powtórzenie w tym samym laboratorium. Prezentowana praca miała na celu optymalizację otrzymywania wektorów AAV poprzez ocenę ich miana, infekcyjności oraz stopnia czystości w izolatach wynikających z zastosowania różnych procedur.

Pierwszym etapem było porównanie wydajności dwóch najczęściej używanych do otrzymywania AAV metod transfekcji komórek HEK293 systemu dwu- (10) i trójplazmidowego (Stratagene). Na podstawie ekspresji białka GFP stwierdzono, że w obu przypadkach poziom transfekcji był stosunkowo wysoki – około 80% komórek wykazywało zieloną fluorescencję po wzbudzeniu w świetle UV. Tym samym, nie zaobserwowano różnic w wydajności transfekcji dwu- i trójplazmidowej.

W dalszej kolejności sprawdzono, która z linii komórkowych najlepiej nadaje się do analizy ilości cząstek infekcyjnych. Trzy linie komórkowe: HEK293 (komórki używane także do produkcji wektorów AAV), HeLa oraz HaCaT transdukowano tymi samymi dawkami oczyszczonego wektora zawierającego gen reporterowy β -galaktozydazy. Okazało się, że zdecydowanie najbardziej podatne na transdukcję AAV są komórki HEK293. Do doświadczeń sprawdzających ilość cząstek infekcyjnych w danym izolacie rutynowo używano więc tę linię komórkową.

Na podstawie oznaczenia ilości kopii genomów wektorów AAV (vp/mL) oraz liczby cząstek infekcyjnych (TU/mL) w izolatach uzyskanych w wyniku transfekcji dwu- i trójplazmidowej, oczyszczonych metodą SSCP stwierdzono, że system transfekcji dwuplazmidowej jest efektywniejszy – wykryto bowiem około 1,6-krotnie więcej TU oraz około 8,5-krotnie więcej vp wektorów AAV po transfekcji komórek HEK293 plazmidami pAAV-GFP i pDG. Pozostaje to w zgodzie z danymi opublikowanymi przez twórców dwuplazmidowej metody transfekcji z użyciem plazmidu pomocniczego pDG (10). Wykazali oni, że miano wektorów AAV powstałych po transfekcji komórek HEK293 plazmidem pDG było co najmniej 10-krotnie większe niż w izolatach uzyskanych po transfekcji jakimikolwiek innymi dostępnymi wówczas plazmidami pomocniczymi. Autorzy podają, że pomimo iż zastąpienie oryginalnego promotora p5 w plazmidzie pDG promotorem retrowirusowym MMTV-LTR przyczyniło się do obniżenia ekspresji białek Rep78/68, to wytwarzanie białek VP budujących kapsyd wektora było znacznie podwyższone. Najprawdopodobniej to jest przyczyną efektywniejszego formowania się cząstek AAV po transfekcji dwuplazmidowej.

W badaniach cząstek infekcyjnych wektora przyjmuje się założenie, że jedna cząstka jest w stanie zainfekować jedną komórkę. W praktyce wygląda to trochę inaczej. W niektórych przypadkach stosunek ilości kopii genomów wektora (vp) do liczby cząstek infekcyjnych (TU), tzw. *particle-to-infectivity ratio* może dochodzić do 1000 vp/TU. Nie świadczy to oczywiście najlepiej o jakości danego izolatu, wskazuje bowiem, że znaczna część wektorów jest niefunkcjonalna. Uzyskane w tej pracy wy-

niki zarówno w systemie dwu- jak i trójplazmidowym nie przekraczały tej wartości i wynosiły odpowiednio 325 i 62 vp/TU. Są to wartości znacznie wyższe w porównaniu do danych zamieszczonych w oryginalnej pracy, w której ta procedura została opisana (12). Według autorów, stosunek średniej ilości kopii genomów wektorów AAV do TU osiągnany tą metodą oczyszczania wynosi 8,4. Należy jednak podkreślić, że autorzy cytowanej pracy określali liczbę cząstek infekcyjnych poprzez transdukcję komórek linii 84-31. Jest to linia wykazująca nadekspresję białek adenowirusowych E1 i E4 (2), co może pozwalać na niezależną replikację wprowadzonych AAV. Wydajność transdukcji tych komórek mogła być zatem znacznie większa w porównaniu do używanych przez nas komórek HEK293. Dodatkowo, na podstawie analizy żelu SDS-PAGE po barwieniu srebrem wykazano, że czystość naszych preparatów nie była aż tak dobra, jak czystość izolatów w cytowanej pracy. To mogło być przyczyną spadku infekcyjności naszych wektorów, co potwierdziliśmy porównując liczbę cząstek infekcyjnych w nieoczyszczonym lizacie komórkowym z izolatem AAV po oczyszczeniu na kolumnach z heparynowaną agarozą. Według naszej oceny, system izolacji na kolumnach o przepływie grawitacyjnym, bez uprzedniego wstępnego etapu ultrawierowania (czy to w gradiencie jodiksanolu, czy CsCl), który pozwoliłby na wstępne odseparowanie cząstek AAV od większości białek komórkowych, nie jest systemem idealnym. Wykazano ponadto, że białka komórkowe posiadające zdolność wiązania z siarczanem heparanu, takie jak np. czynnik wzrostu śródbłonnka naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) ulegający silnej ekspresji w komórkach HEK293, zwłaszcza po ich transfekcji plazmidem zawierającym ten transgen, mogą nie tylko skutecznie blokować wiązanie cząstek AAV do heparynowanej kolumny, zmniejszając miano wektorów, ale i wypłukiwać się z kolumny wraz z wektorami pod wpływem wysokiego stężenia soli (danych nie przedstawiono w tej pracy). W takim przypadku ryzyko zanieczyszczenia izolatu AAV nie tylko istnieje, ale jest wysoce prawdopodobne. Użycie takich preparatów zwłaszcza do badań *in vivo* może budzić wiele wątpliwości.

Zdecydowanie najlepszym systemem izolacji pod względem czystości uzyskiwanych frakcji, jak się okazało, była procedura ultrawierowania pierwotnego lizatu komórkowego w gradiencie jodiksanolu, a następnie rozdział na kolumnie heparynowej techniką HPLC. Na podstawie analizy żelu poliakrylamidowego wybarwionego srebrem wykazano obecność jedynie trzech białek budujących kapsyd AAV.

Warto również wspomnieć o pewnych problemach związanych z oceną otrzymywanych rekombinowanych wektorów AAV. Na wydajność transdukcji ma wpływ wiele czynników, takich jak rodzaj użytych komórek, różnice w ekspresji genu reporternego, czy wreszcie rodzaj promotora. Równie wiele problemów sprawia oznaczenie ilości kopii genomów wektorów AAV i porównanie tych wartości pomiędzy laboratoriami stosującymi różne techniki mianowania, jak hybrydyzacja *slot-blot* lub *dot-blot*, czy qPCR. Niewątpliwie, istnieje potrzeba nie tylko ujednoczenia procedur, ale także stworzenia dobrze zdefiniowanych wzorców i kontroli referencyjnych, co z pewnością wpłynie na powtarzalność i podniesie jakość uzyskiwanych wyników.

Badania finansowano z projektów 2 P04 016 26, PBZ-KBN 096 P05 2004, PBZ-KBN 105 P05 2004, i 1998 P01 2006 31 (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego).

Agnieszka Jaźwa jest stypendystką Funduszu im. Stanisława Estreichera. Andrzej Rutkowski otrzymuje stypendium Sapere Auso z Małopolskiej Fundacji Stypendialnej. Alicja Józkowicz jest beneficjentem Wellcome Trust (International Senior Research Fellowship).

Dziękujemy prof. Seppo Yla-Herttua i Elisa Vahakangas z Instytutu A.I. Virtanen Uniwersytetu w Kuopio w Finlandii za pomoc w zapoznaniu się z procedurą oczyszczania wektorów AAV w systemie ultrawiórowania w gradiencie jodoksanolu połączonego z rozdzielaniem HPLC.

Literatura

1. McLaughlin S. K., Collis P., Hermonat P. L., Muzyczka N., (1988), *J. Virol.*, 62, 1963-1973.
2. Siegl G., Bates R. C., Berns K. I., Carter B. J., Kelly D. C., Kurstak E., Tattersall P., (1985), *Intervirology*, 23, 61-73.
3. Berns K. I., Linden R. M., (1995), *Bioessays*, 17, 237-245.
4. Lu Y., (2004), *Stem Cells Dev.*, 13, 133-145.
5. Muzyczka N., (1994), *J. Clin. Invest.*, 94, 1351.
6. Samulski R. J., Chang L. S., Shenk T., (1987), *J. Virol.*, 61, 3096-3101.
7. Conway J. E., Zolotukhin S., Muzyczka N., Hayward G. S., Byrne B. J., (1997), *J. Virol.*, 71, 8780-8789.
8. Xiao X., Li J., Samulski R. J., (1998), *J. Virol.*, 72, 2224-2232.
9. Graham F. L., Smiley J., Russell W. C., Nairn R., (1977), *J. Gen. Virol.*, 36, 59-74.
10. Grimm D., Kern A., Rittner K., Kleinschmidt J. A., (1998), *Hum. Gene Ther.*, 9, 2745-2760.
11. Toolan H. W., (1968), *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 6, 135-180, Review.
12. Auricchio A., Hildinger M., O'Connor E., Gao G. P., Wilson J. M., (2001), *Hum. Gene Ther.*, 12, 71-76.
13. Zolotukhin S., Byrne B. J., Mason E., Zolotukhin I., Potter M., Chesnut K., Summerford C., Samulski R. J., Muzyczka N., (1999), *Gene Ther.*, 6, 973-985.
14. Summerford C., Samulski R. J., (1998), *J. Virol.*, 72, 1438-1445.
15. Rohr U. P., Wulf M. A., Stahn S., Steidl U., Haas R., Kronenwett R., (2002), *J. Virol. Methods*, 106, 81-88.
16. Bennett J., Maguire A. M., Cideciyan A. V., Schnell M., Glover E., Anand V., Aleman T. S., Chirmule N., Gupta A. R., Huang Y., Gao G. P., Nyberg W. C., Tazelaar J., Hughes J., Wilson J. M., Jacobson S. G., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9920-9925.