



Optymalizacja warunków transdukcji wybranych linii komórkowych przy użyciu wektorów adenowirusowych pierwszej generacji

Magdalena Stopa, Józef Dulak, Alicja Józkowicz

Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Bio-
technologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Optimization of transduction of chosen cell lines using adenoviral vectors of the first generation

Summary

Efficacy of adenoviral vectors (AdV) was checked by transduction of six different cell lines (COS-7, HUVEC, HMEC-1, NIH 3T3, HaCaT, and B16(F10)) with the vectors containing reporter gene β -galactosidase (Ad β -gal). We optimised the adsorption time and dose of Ad β -gal. The transduction with efficacy of up to 100% was obtained for the doses 10-100 IU/cell.

In order to examine the effect of transduction procedure on biology of the cells, we measured the production of major proinflammatory cytokines. In several cell lines (HMEC-1, HUVEC, HaCaT), we found the induction of IL-6 synthesis and decrease in the cell viability, particularly in the case of the highest Ad β -gal dose. However, the treatment with adenoviral vectors did not induce TNF generation and did not modify proliferation of cells.

Adres do korespondencji

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

Key words:

adenoviral vectors, gene therapy, reporter genes.

1. Wstęp

Proces wnikania do komórki adenowirusów (Ad) i wektorów adenowirusowych (AdV) odbywa się za pośrednictwem pierwszorzędowych receptorów CAR (ang. *coxackie and adenoviral receptor*) i drugorzędowych receptorów integrynowych (1-3). Poziom ekspresji obu typów receptorów decyduje o wydajności

infekcji. Komórki, które są trudne do transdukcji za pomocą AdV, mają mało lub nie posiadają w ogóle białek CAR na powierzchni, co sugeruje, że receptory te są najważniejsze dla wydajnej infekcji, tak *in vitro* jak i *in vivo* (1,4-6). Dodatkowe czynniki wpływające na skuteczność transdukcji w warunkach *in vitro* to liczba i wielkość infekowanych komórek oraz skład i lepkość medium (7). *In vivo* natomiast, najważniejszą rolę odgrywają bariery anatomiczne (8).

Na efektywność wnikania adenowirusów do komórki wpływają także integryny, a ich brak znacząco obniża wydajność transdukcji (4,9). Są to jednak białka powszechnie występujące na powierzchni komórek, dlatego nie mają dużego znaczenia dla tropizmu AdV (10). Na przykład pierwotne fibroblasty mimo wysokiego poziomu integryn transdukują się słabo, co jest spowodowane niską ekspresją CAR (4). Inne komórki, o znikomej lub kompletnie zahamowanej ekspresji CAR, to komórki hematopoetyczne, pierwotne komórki rakowe, komórki dendrytyczne i komórki krwi, w tym limfocyty B i T (1,2,9,11,12). Ponadto ekspresja CAR (a co za tym idzie – tropizm Ad) może się zmieniać w zależności od stopnia rozwoju tkanki – niewiele receptorów wykrywa się m.in. na zróżnicowanych mięśniach szkieletowych i gładkich, czy zróżnicowanym nabłonku oddechowym (1,2,9,10). Na jej poziom wpływa także konfluencja komórek – np. na śródbłonkach HUVEC liczba receptorów wzrasta wraz z gęstością hodowli (13). Co więcej, różnice w ekspresji CAR mogą występować nawet w obrębie linii komórkowych o tym samym pochodzeniu histologicznym (6).

Problemy wynikające ze zróżnicowanego poziomu ekspresji CAR mogą zostać rozwiązane poprzez stosowanie serotypów adenowirusów wiążących się z innymi receptorami (np. Ad35 dla komórek hematopoetycznych (14)), czy dzięki modyfikacjom kapsydu wirusowego powodującym zmianę jego tropizmu (1,15-17). Nie należy ponadto zapominać, że mimo trudności w infekcji niektórych typów tkanek, AdV transdukuje linie komórkowe i organy, które często są niedostępne dla innych metod wprowadzania genów. Jest to możliwe dzięki obecności CAR w trzustce, mózgu, sercu, grasicy, śledzionie, nerkach, mięśniach, prostatie, jądrach, płucach, komórkach układu krwionośnego, pokarmowego, oddechowego czy nerwowego (1,2,17,18). Sugerowano także możliwość wnikania wektorów do komórek jedynie dzięki receptorom integrynowym, a przy wysokiej liczbie cząstek wirusowych przypadających na jedną komórkę (MOI, ang. *multiplicity of infection*) nawet bez udziału żadnych receptorów (4,9). Może to dodatkowo poszerzyć zastosowania AdV.

Wydajność transdukcji AdV jest odmienna dla różnych linii komórkowych, dla komórek tego samego typu należących do różnych gatunków, a nawet dla tej samej linii komórkowej hodowanej w różnych warunkach (1,11,13,17,18). Na jej poziom można jednak wpływać, stosując różne dawki AdV oraz różne czasy adsorpcji (19,20). W prezentowanej pracy przedstawiono optymalizację tych dwóch czynników dla wybranych linii komórkowych, wykorzystując wektory adenowirusowe zawierające gen β -galaktozydazy (Ad β -gal). Należy też pamiętać, że transdukcja AdV nie jest procesem obojętnym dla komórki, lecz aktywuje wiele szlaków metabolicz-

nych, zwłaszcza tych odpowiedzialnych za indukcję odpowiedzi zapalnej. Dlatego zbadano także wpływ Ad β -gal na proliferację komórek i produkcję najważniejszych cytokin.

2. Materiały i metody

2.1. Hodowle komórkowe

Efektywność transdukcji badana była dla siedmiu linii komórkowych: NIH 3T3 (mysie fibroblasty), COS-7 (małpie fibroblasty), HaCaT (ludzkie keratynocyty), HMEC-1 (ludzkie mikronaczyniowe komórki śródbłónka), HUVEC (ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej) oraz B16(F10) (komórki mysiego czerniaka). Wykorzystywano następujące pożywki hodowlane (PAA Laboratories) zawierające streptomycynę (10 μ g/mL) i penicylinę (100 U/mL) (Sigma): NIH 3T3 i COS-7 – medium DMEM High Glucose (4,5 g/L) + 10% FBS; HaCaT – medium DMEM Low Glucose (1 g/L) + 10% FBS; HMEC-1 – medium MCDB 131 + 10% FBS + hydrokortyzon 1 μ g/mL (Sigma-Aldrich) + EGF 10 ng/mL (Sigma-Aldrich); HUVEC – medium M199 + 20% FBS + ECGS 0,1 mg/mL (Upstate); B16(F10) – medium RPMI + 10% FBS.

2.2. Wektory Ad β -gal

Do transdukcji wykorzystano wektory adenowirusowe z genem reporterowym β -galaktozydazy i mianie 10^8 IU/mL. Proces produkcji oraz oznaczania miana przedstawiony został w artykule *Produkcja wektorów adenowirusowych pierwszej generacji – optymalizacja metody* w tym numerze „Biotechnologii”.

2.3. Infekcja badanych linii komórkowych

W celu zbadania wydajności poziomu transdukcji oraz żywotności i proliferacji infekowanych komórek, na dzień przed rozpoczęciem eksperymentu komórki wysiewano na płytkę 96-dołkową w liczbie 10 000 komórek/dołek (do zbadania wydajności transdukcji i żywotności komórek) lub 5000 komórek/dołek (do zbadania proliferacji). Infekcji dokonywano przy różnych wartościach MOI (od 0,01 do 100 IU/komórkę). Podawano na komórki odpowiednią ilość zawiesiny wirusowej w 40 μ L medium hodowlanego, inkubowano w 37°C przez 1,5, 5, 8 lub 24 h, a następnie dodawano 60 μ L czystego medium hodowlanego. Wydajność transdukcji, żywotność oraz proliferację komórek sprawdzano po 48 h od momentu infekcji.

W celu określenia produkcji cytokin prozapalnych, komórki wysiewano na płytkę 24-dołkową w liczbie 60 000 komórek/dołek, infekowano MOI wynoszącym 100

oraz 10 IU/komórkę, podając odpowiednią ilość zawiesiny wirusowej w 240 μL medium hodowlanego. Po 24-godzinnej inkubacji dodawano 360 μL świeżego medium hodowlanego, a po dalszych 24 h zbierano medium do oznaczeń. Doświadczenia przeprowadzano w duplikatach.

2.4. Sprawdzanie wydajności transdukcji

Efektywność transdukcji sprawdzano poprzez badanie ekspresji β -galaktozydazy testem barwienia *in situ* – komórki utrwalano 0,25% aldehydem glutarowym (Appli-Chem), a następnie podawano syntetyczny substrat β -galaktozydazy – X-gal (Appli-Chem). Komórki wykazujące ekspresję β -galaktozydazy wybarwiały się na kolor niebieski. W celu ilościowego oceny wydajności transdukcji, liczone komórki pozytywne, znajdujące się w 10 losowo wybranych polach widzenia mikroskopu. Do zliczeń używano programu ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) oraz plug-in (G. Landini, <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html#ruifrok>).

2.5. Badanie żywotności komórek – test MTT

48 h po infekcji ściągano medium infekcyjne z nad komórek i podawano na nie 100 μL roztworu soli tetrazolowej (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma) w stężeniu 0,5 mg/mL, rozpuszczonej w medium hodowlanym. Komórki inkubowano w temperaturze 37°C przez 2-3 h, do momentu zredukowania soli tetrazolowej i wytworzenia kryształów formazanu. Kryształki rozpuszczano w roztworze lizującym (50% DMF i 5% SDS w wodzie) i dokonywano spektrofotometrycznego odczytu absorbancji przy długości fali 563 nm. Wszystkie wyniki przedstawiono jako procent kontroli (kontrolę stanowiły komórki nie infekowane).

2.6. Badanie żywotności komórek – test LDH

Żywotność określano 48 h po infekcji testem CytoTox 96[®] (Promega), poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) uwalnianej do medium hodowlanego. Test wykonywano zgodnie ze wskazówkami producenta.

2.7. Pomiar proliferacji komórek

Proliferację komórek badano 48 h po infekcji poprzez oznaczanie inkorporacji do DNA bromodeoksyurydyny (BrdU). Wykorzystywano przy tym test Cell Proliferation ELISA BrdU (Roche), który przeprowadzano zgodnie ze wskazówkami producenta.

2.8. Oznaczenie stężenia czynnika nekrozy nowotworów (TNF, ang. *tumor necrosis factor*) i interleukiny-6 (IL-6, ang. *interleukin-6*)

Oznaczenia przeprowadzono zgodnie ze wskazówkami producenta w mediach zebranych z komórek 48 h po infekcji, wykorzystując zestawy DuoSet® ELISA (R&D Systems) z przeciwciałami rozpoznającymi mysz i ludzki TNF oraz mysz i ludzką IL-6.

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 kilku próbek). Jako istotne statystycznie uznawano wyniki dla $p < 0,05$.

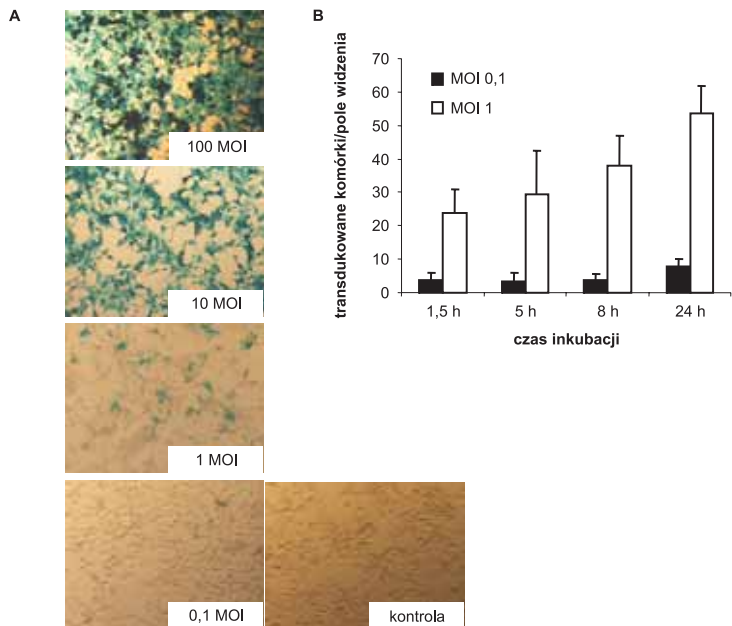
3. Wyniki

3.1. Optymalizacja warunków transdukcji

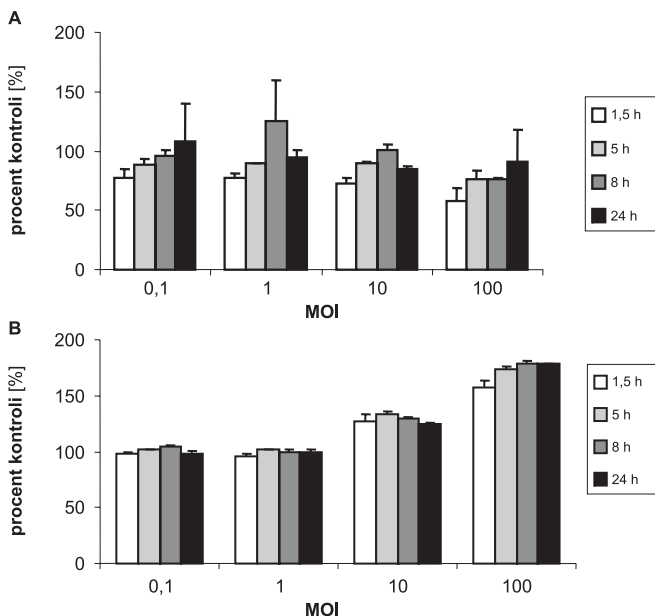
W celu zoptymalizowania warunków infekcji komórek docelowych, zbadano wydajność transdukcji linii HUVEC, HMEC-1, NIH 3T3, COS-7, HaCaT i B16(F10) różnymi MOI (0,1 – 100 IU/komórkę) i przy różnych czasach inkubacji z minimalną objętością medium (1,5, 5, 8, 24 h). Sprawdzano ponadto wpływ stosowanych procedur infekcji na przeżywalność komórek za pomocą testu MTT i LDH.

Wydajność transdukcji wszystkich linii zależała przede wszystkim od dawki wektora. W przypadku HUVEC zastosowanie MOI 100 i 10 IU/komórkę pozwalało na wprowadzenie transgeny do wszystkich komórek (rys. 1). Przy dawce 1 IU/komórkę uzyskiwano ok. 40% wydajności transdukcji, zaś zmniejszenie dawki do 0,1 IU/komórkę pozwalało na transdukowanie jedynie kilku procent komórek. Przy niskich dawkach (0,1 i 1 IU/komórkę) można było znacząco poprawić wydajność transdukcji, wydłużając czas adsorpcji wektora, czyli inkubację w minimalnej objętości medium hodowlanego.

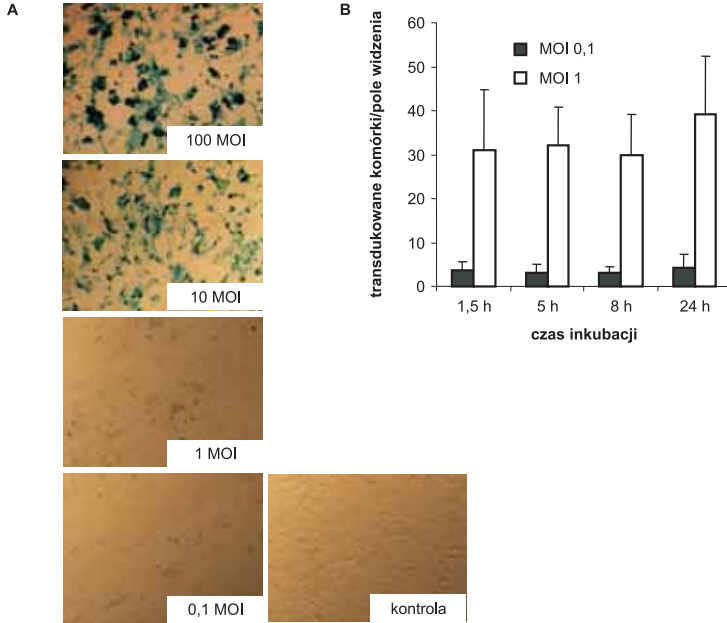
Na podstawie wyników testu MTT sugeruje się, że infekcja Ad β -gal w dawce 100 IU/komórkę powoduje obniżenie żywotności HUVEC (rys. 2A), choć wpływ ten nie jest silny. Jednocześnie test LDH, dla dwóch najwyższych dawek potwierdza wzrost ilości martwych komórek (rys. 2B). Co istotne, oba testy wskazują, że wydłużanie czasu adsorpcji nie wpływa znacząco na żywotność hodowli. Dlatego, biorąc pod uwagę efektywność procesu, za optymalną metodę transdukcji HUVEC wektorami adenowirusowymi uznano zastosowanie MOI 10 IU/komórkę i 24 h inkubacji.



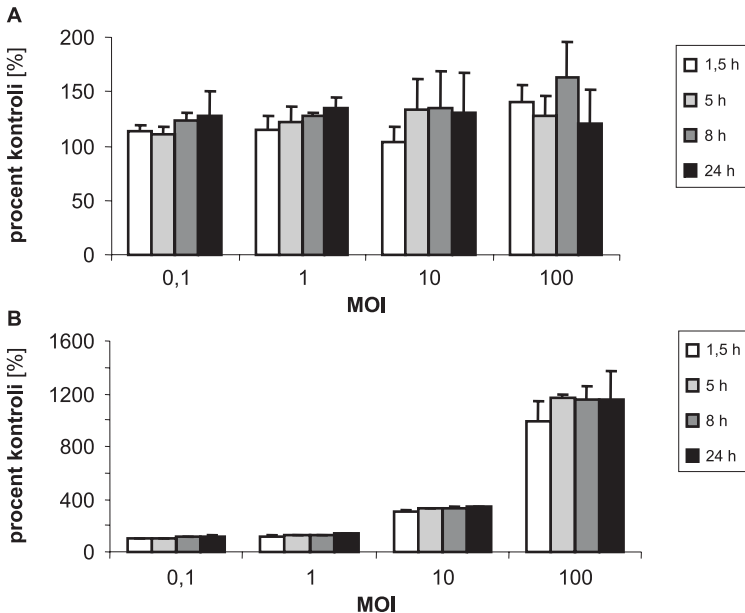
Rys. 1. Wydajność transdukcji komórek HUVEC Ad β -gal. (A) Przykładowe zdjęcia po transdukcji HUVEC różnymi MOI, 24 h inkubacji. (B) Wpływ czasu inkubacji na wydajność transdukcji – średnia liczba transdukowanych komórek na pole widzenia \pm SD.



Rys. 2. Przeżywalność komórek HUVEC sprawdzona testem redukcji MTT (A) i testem aktywności LDH (B). Wyniki (dla różnych MOI i różnych czasów inkubacji) przedstawione jako procent wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych (nie infekowanych). Każdy słupek reprezentuje średnią \pm SD.



Rys. 3. Wydajność transdukcji komórek HMEC-1 Ad β -gal. (A) Przykładowe zdjęcia po transdukcji HMEC-1 różnymi MOI, 24 h inkubacji. (B) Wpływ czasu inkubacji na wydajność transdukcji – średnia liczba transdukowanych komórek na pole widzenia \pm SD.



Rys. 4. Przeżywalność komórek HMEC-1 sprawdzona testem redukcji MTT (A) i testem aktywności LDH (B). Wyniki (dla różnych MOI i różnych czasów inkubacji) przedstawione jako procent wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych (nie infekowanych). Każdy słupek reprezentuje średnią \pm SD.

Drugą z testowanych linii śródbłonkowych były komórki HMEC-1. Również w tym przypadku wydajność transdukcji dla dawek 100 i 10 IU/komórkę wynosi 100% (rys. 3). Niższe dawki były jednak mniej efektywne, dając maksymalnie około 30% transdukcji dla 1 IU/komórkę i 2% dla 0,1 IU/komórkę. Wydłużenie czasu adsorpcji wektora do maksymalnej wartości 24 h nie wpływało istotnie na wydajność transdukcji, choć nieznaczny wzrost liczby pozytywnych komórek przy najdłuższym czasie inkubacji sugeruje taką tendencję (rys. 3B).

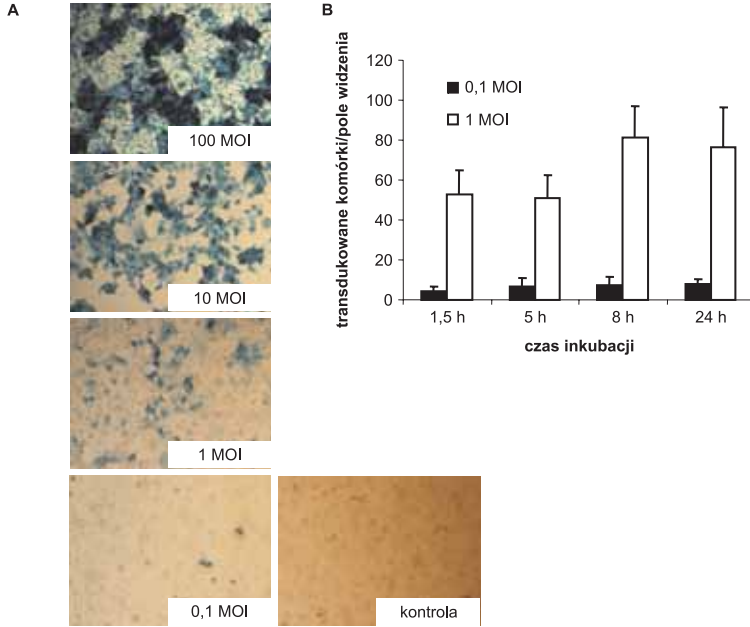
Na podstawie testu MTT wskazuje się, że infekcja Ad β -gal nie obniża żywotności HMEC-1 (rys. 4A), a może nawet aktywować dehydrogenazy mitochondrialne powyżej poziomu typowego dla komórek kontrolnych. Wyniki testu LDH świadczą jednak, że dawki 10 i 100 IU/komórkę mogą być toksyczne (rys. 4B). Ze względu na skuteczność procedury, mimo obserwowanego zwiększenia uwalniania LDH w komórkach, optymalne warunki transdukcji dla HMEC-1 zostały ustalone podobnie jak dla HUVEC na 10 IU/komórkę i 24 h inkubacji.

Na rysunkach 5 i 6 prezentowane są wyniki dla komórek COS-7, kolejnej linii dla której wydajność transdukcji przy dawkach 100 i 10 IU/komórkę wynosi 100% (rys. 5). Również dla niższych MOI efektywność jest dość wysoka (ok. 40% dla 1 IU/komórkę i ok. 2% dla 0,1 IU/komórkę) i może być znacząco poprawiona przy zastosowaniu dłuższych czasów adsorpcji wektora, szczególnie dla dawki 1 IU/komórkę (rys. 5B).

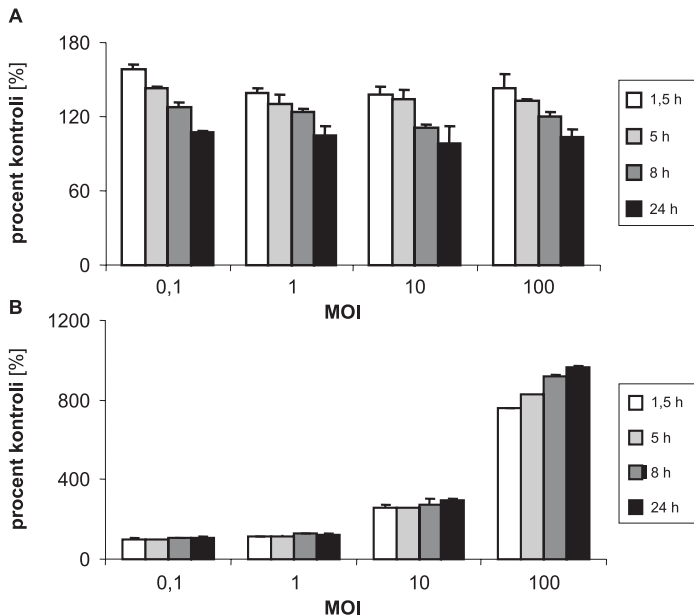
Na podstawie wyników testu LDH wskazuje się, że wirusy w dawce 10 i 100 IU/komórkę zwiększają śmiertelność, zwłaszcza przy wydłużeniu czasu inkubacji. Natomiast na podstawie testu MTT sugeruje się aktywację dehydrogenaz mitochondrialnych w komórkach COS-7 narażonych na kontakt z wektorem (rys. 6). Na podstawie oceny skuteczności i toksyczności procedury, za optymalne warunki transdukcji uznano inkubację komórek COS-7 przez 8 h z wektorami adenowirusowymi w dawce 10 IU/komórkę.

Wydajność transdukcji fibroblastów NIH 3T3 i keratynocytów HaCaT jest bardzo podobna i sięga 100% (dla 100 IU/komórkę) lub 90% (dla 10 IU/komórkę) (rys. 7,9). W obu liniach komórkowych niższe dawki wektorów były jednak znacznie mniej skuteczne, dając 10% wydajności transdukcji dla dawki 1 IU/komórkę i 1% dla dawki 0,1 IU/komórkę. Wydłużenie czasu adsorpcji wektorów nie poprawiało wydajności transdukcji (rys. 7,9).

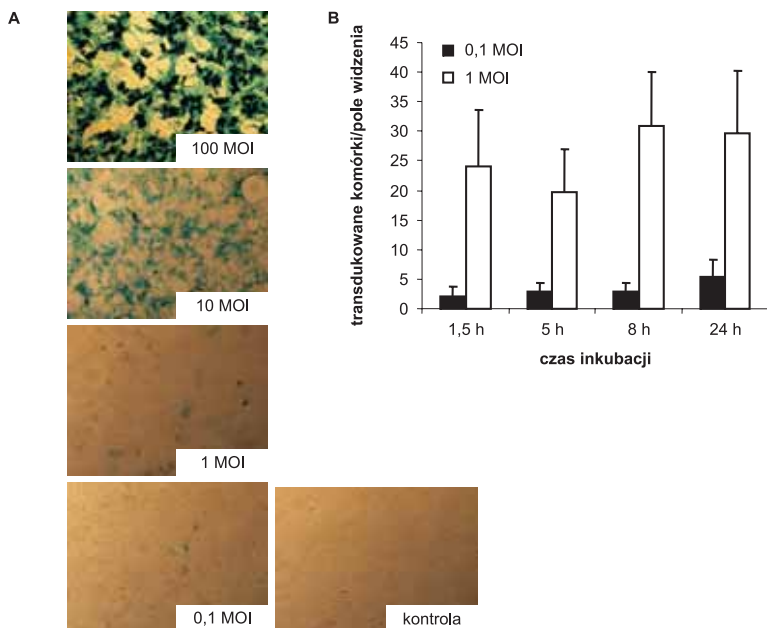
Na podstawie wyników testu redukcji MTT sugeruje się, że infekcja Ad β -gal obniża żywotność NIH 3T3 o około 10-20%, niezależnie od wartości MOI i czasu inkubacji (rys. 8A). Test aktywności LDH pokazuje jednak, że wysokie dawki wirusów (zwłaszcza 100 IU/komórkę) mogą być silnie toksyczne dla fibroblastów (rys. 8B). Użycie wektorów w dawce 100 MOI zmniejsza również znacząco żywotność komórek HaCaT (rys. 10). Dlatego uznano, że optymalna dawka wektorów do transdukcji fibroblastów NIH3T3 oraz keratynocytów HaCaT to 10 MOI, a optymalny czas inkubacji to 24 h.



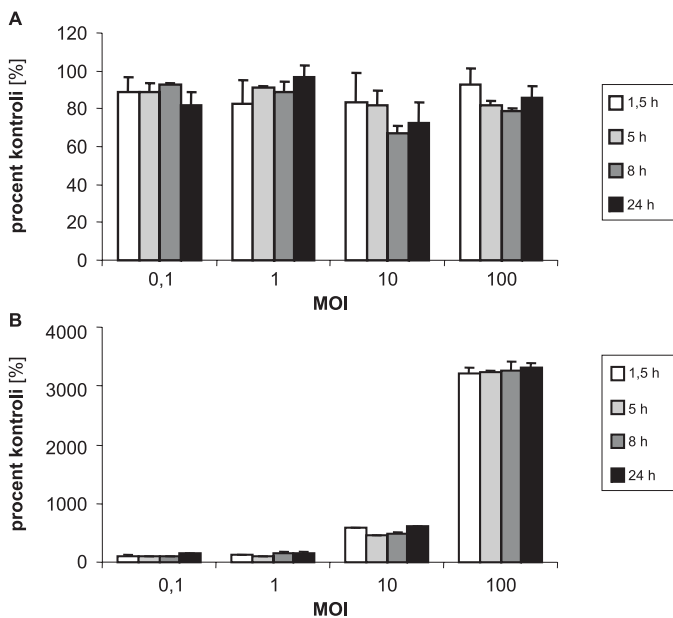
Rys. 5. Wydajność transdukcji komórek COS-7 Ad β -gal. (A) Przykładowe zdjęcia po transdukcji COS-7 różnymi MOI, 24 h inkubacji. (B) Wpływ czasu inkubacji na wydajność transdukcji – średnia liczba transdukowanych komórek na pole widzenia \pm SD.



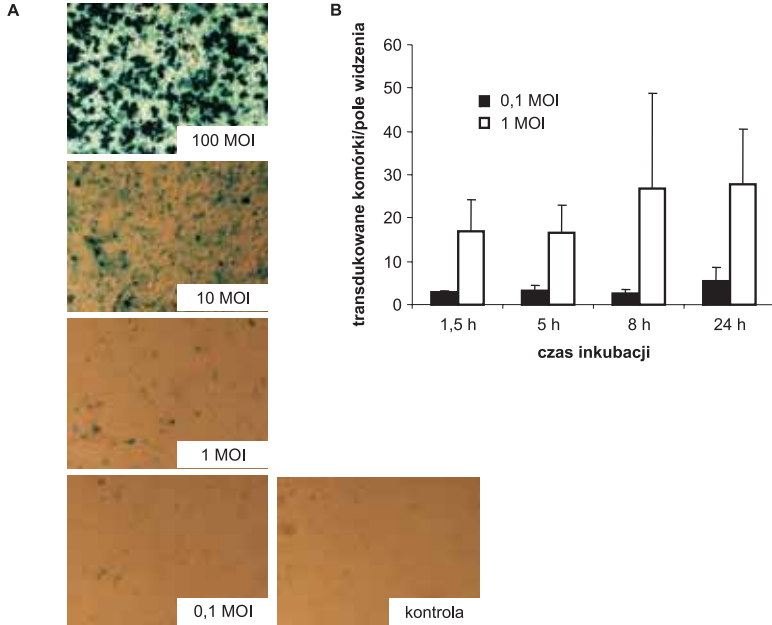
Rys. 6. Przeżywalność komórek COS-7 sprawdzona testem redukcji MTT (A) i testem aktywności LDH (B). Wyniki (dla różnych MOI i różnych czasów inkubacji) przedstawione jako procent wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych (nie infekowanych). Każdy słupek reprezentuje średnią \pm SD.



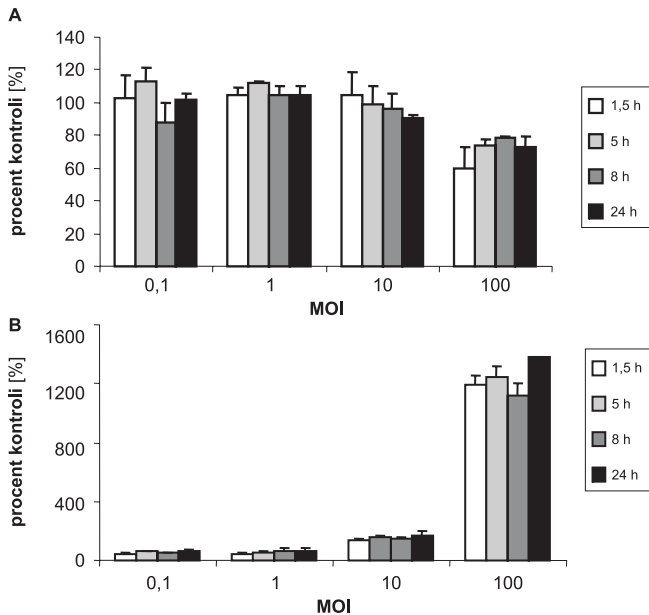
Rys. 7. Wydajność transdukcji komórek NIH 3T3 Ad β -gal. (A) Przykładowe zdjęcia po transdukcji NIH 3T3 różnymi MOI, 24 h inkubacji. (B) Wpływ czasu inkubacji na wydajność transdukcji – średnia liczba transdukowanych komórek na pole widzenia \pm SD.



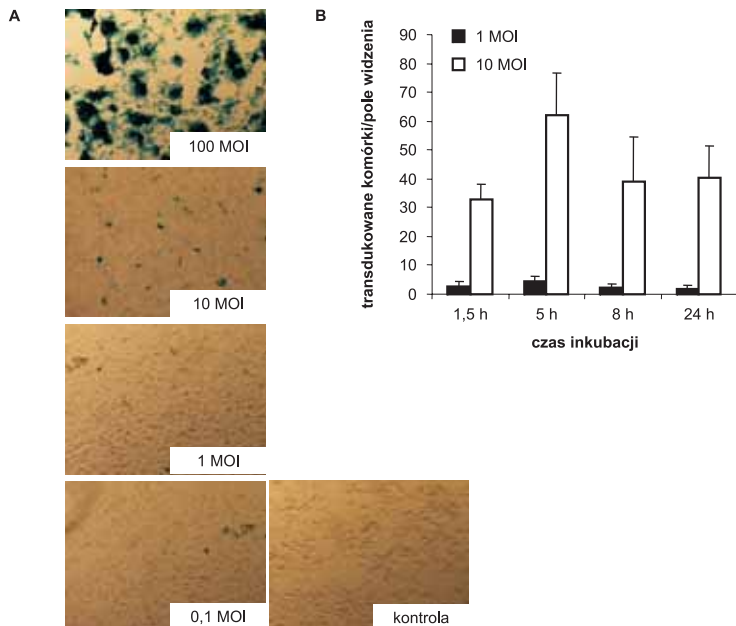
Rys. 8. Przeżywalność komórek NIH 3T3 sprawdzona testem redukcji MTT (A) i testem aktywności LDH (B). Wyniki (dla różnych MOI i różnych czasów inkubacji) przedstawione jako procent wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych (nie infekowanych). Każdy słupek reprezentuje średnią \pm SD.



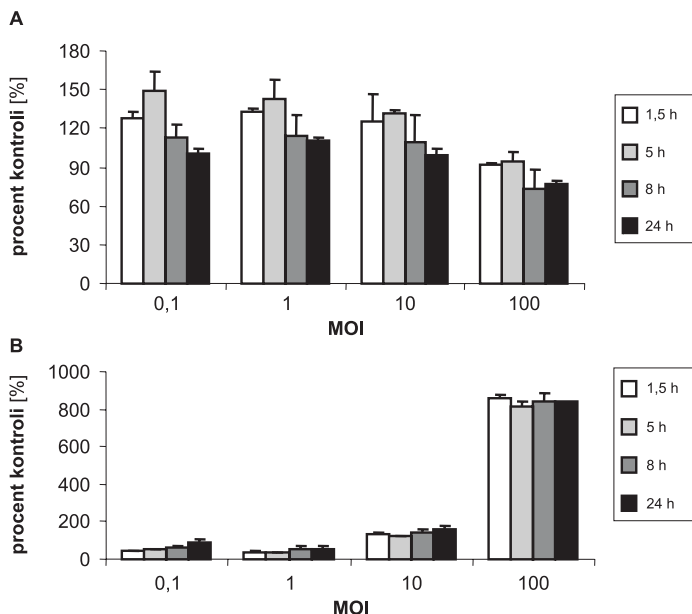
Rys. 9. Wydajność transdukcji komórek HaCaT Ad β -gal. (A) Przykładowe zdjęcia po transdukcji HaCaT różnymi MOI, 24 h inkubacji. (B) Wpływ czasu inkubacji na wydajność transdukcji – średnia liczba transdukowanych komórek na pole widzenia \pm SD.



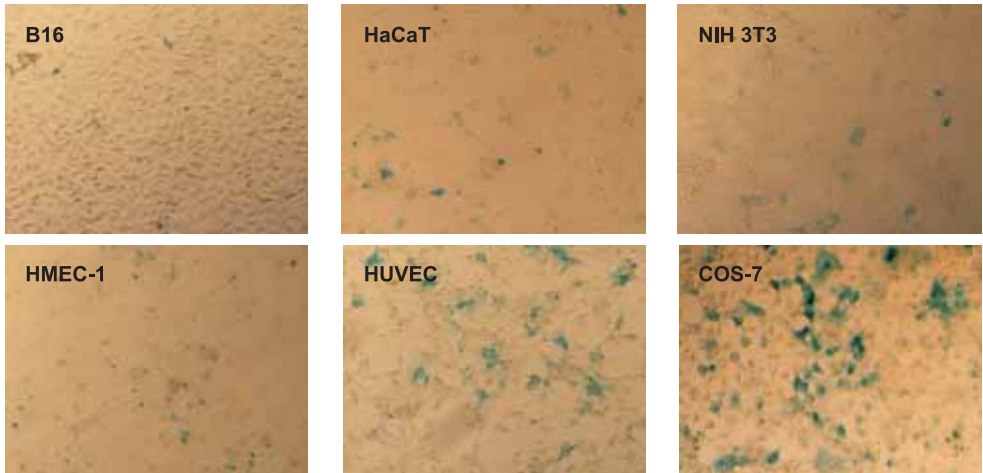
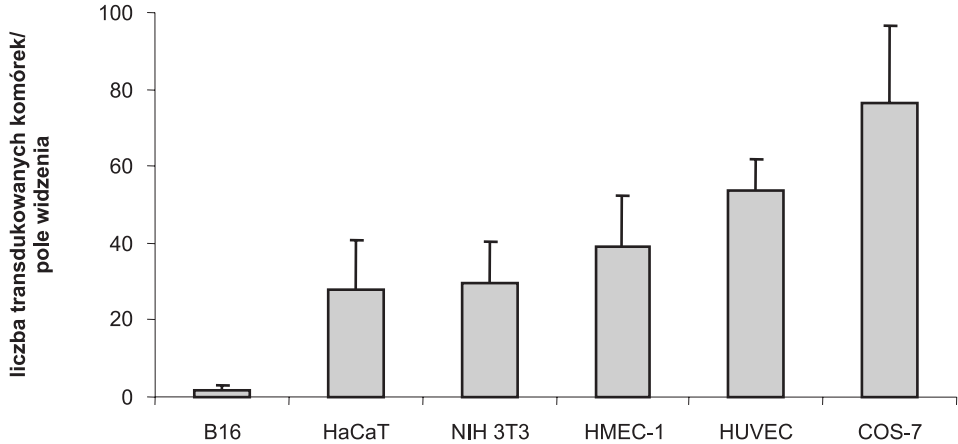
Rys. 10. Przeżywalność komórek HaCaT sprawdzona testem redukcji MTT (A) i testem aktywności LDH (B). Wyniki (dla różnych MOI i różnych czasów inkubacji) przedstawione jako procent wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych (nie infekowanych). Każdy słupek reprezentuje średnią \pm SD.



Rys. 11. Wydajność transdukcji komórek B16(F10) Ad β -gal. (A) Przykładowe zdjęcia po transdukcji B16(F10) różnymi MOI, 24 h inkubacji. (B) Wpływ czasu inkubacji na wydajność transdukcji – średnia liczba transdukowanych komórek na pole widzenia \pm SD.



Rys. 12. Przeżywalność komórek B16(F10) sprawdzona testem redukcji MTT (A) i testem aktywności LDH (B). Wyniki (dla różnych MOI i różnych czasów inkubacji) przedstawione jako procent wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych (nie infekowanych). Każdy słupek reprezentuje średnią \pm SD.



Rys. 13. Porównanie wydajności transdukcji różnych linii komórkowych dla warunków (MOI – 1 IU/komórkę, czas inkubacji – 24 h). Każdy słupek reprezentuje średnią \pm SD.

Ostatnią badaną linią były komórki czerniaka B16(F10). Okazało się, że są one najmniej podatne na transdukcję wektorami adenowirusowymi i nawet najwyższa dawka Ad β -gal dawała jedynie około 90% wydajności (rys. 11). Niższe MOI były znacznie mniej skuteczne – podanie 10 IU/komórkę pozwalało na transdukcję powyżej 30% komórek, a zmniejszenie dawki do 1 IU/komórkę umożliwiało zainfekowanie mniej niż 1% komórek. Wydłużenie czasu adsorpcji wektora nie miało wpływu na wydajność transdukcji (rys. 11B).

Na podstawie wyników testu redukcji MTT sugeruje się, że jedynie infekcja dawką 100 IU/komórkę obniża żywotność hodowli (rys. 12A). Pomiar aktywności LDH pokazuje jednak, że śmiertelność przy najwyższej dawce jest bardzo wysoka

oraz, że również MOI 10 IU/komórkę może działać cytotoksycznie (rys. 12B). Mimo to, ze względu na skuteczność procedury, za optymalne warunki transdukcji komórek B16(F10) uznano podawanie wektorów w dawce 10 IU/komórkę oraz inkubację przez 24 h.

Porównanie wydajności transdukcji wskazuje, że najłatwiej wprowadzić transgen za pomocą wektorów adenowirusowych do linii COS-7 oraz komórek śródbłonna – HUVEC i HMEC-1. Zastosowanie dawki 1 IU/komórkę pozwala bowiem na uzyskanie 30-40% wydajności. W tych samych warunkach skuteczność transdukcji linii NIH 3T3 i HaCaT wynosi około 10%. Najgorzej transdukowaną linią jest natomiast B16(F10), dla której wydajność w przy dawce 1 IU/komórkę jest mniejsza niż 1% (rys. 13).

3.2. Wpływ Ad β -gal na produkcję cytokin prozapalnych

Infekcja wirusowa jest procesem aktywującym wiele kinaz i czynników transkrypcyjnych, co może utrudniać interpretację wyników przy badaniu skutków nadekspresji transgenu. Dlatego sprawdzono wpływ Ad β -gal na proliferację i produkcję cytokin przez transdukowane komórki.

Poziom proliferacji komórek zmierzono testem inkorporacji BrdU. Na rysunku 14 pokazano wyniki uzyskane dla keratynocytów HaCaT. Stwierdzono, że infekcja wirusowa nie ma wpływu na ich podziały – jedynie w przypadku najwyższej dawki Ad β -gal można zaobserwować spadek proliferacji o ok. 20%. Bardzo podobne wyniki uzyskano dla HMEC-1 i B16(F10), natomiast dla komórek HUVEC, COS-7 i NIH 3T3 nie zaobserwowano żadnego wpływu nawet najwyższej dawki wektorów (dane nie pokazane).

Aby zmierzyć syntezę cytokin prozapalnych przez transdukowane komórki, zbadano testem ELISA poziom TNF i IL-6 w mediach hodowlanych. Nie zaobserwowano produkcji TNF przez żadną z badanych linii. Komórki B16(F10) i NIH3T3 nie produkowały także mierzalnych ilości IL-6. W przypadku pozostałych linii poziom uwalnianej do medium IL-6 przez komórki nietransdukowane wahał się od 200 pg/mL w hodowlach HMEC-1 do 2,5 ng/mL w hodowlach HUVEC. We wszystkich tych liniach, podanie najwyższej dawki wektora (100 IU/komórkę) wywoływało wzrost syntezy IL-6, szczególnie wyraźny w HMEC-1. Statystycznie istotne zwiększenie produkcji obserwowano także w hodowlach HUVEC i HaCaT, nawet przy niższej dawce wektorów (10 IU/komórkę).

4. Dyskusja

Ponieważ związanie AdV do powierzchni komórki jest krytycznym etapem podczas jego internalizacji, liczba pierwszo- i drugorzędowych receptorów AdV (białek

CAR i integryn) na powierzchni komórek to praktycznie jedyny czynnik decydujący o tropizmie wektora w kierunku danej tkanki i jej wydajnej transdukcji (1,4-6). Choć receptory te występują powszechnie, poziom ich ekspresji zależy od typu komórek (11,12), stopnia ich zróżnicowania (2,9,10), zagęszczenia komórek w hodowli (13) czy gatunku (21) i może być różny nawet dla komórek o podobnym pochodzeniu histologicznym (6).

Informacje zawarte w różnych publikacjach na temat metod transdukcji komórek wektorami adenowirusowymi, bywają sprzeczne (9,21). Dlatego aby stosować wydajną transdukcję za pomocą AdV, konieczna jest optymalizacja procedury dla każdego typu komórek. Zgodnie z wcześniejszymi pracami wektory AdV skutecznie transdukują wszystkie badane przez komórki – linie śródbłonkowe (HUVEC i HMEC-1) (3,13,22), fibroblasty (COS-7 i NIH 3T3) (4,23,24), komórki nowotworowe (B16(F10)) (11,12) oraz ludzkie keratynocyty (HaCaT) (5,11,25).

Ze względu na obserwowaną przez nas wydajność transdukcji (rys. 13), badane linie komórkowe można podzielić na łatwo transdukowane przy użyciu AdV, takie jak COS-7 (rys. 5), HUVEC (rys. 1) i HMEC-1 (rys. 3), średnio transdukowane – NIH 3T3 (rys. 7) i HaCaT (rys. 9), oraz trudno transdukowane – B16(F10) (rys. 11). Infekcja przy wartości MOI 10 IU/komórkę w przypadku linii łatwo ulegających transdukcji zapewniała wydajność 100%. Jest to zgodne z dotychczasowymi doniesieniami, które w większości pokazują efektywną infekcję komórek śródbłonka przez AdV (3,22,23), choć na podstawie niektórych badań sugeruje się, że transdukcja może być utrudniona przy małej gęstości hodowli i przy wysokim zróżnicowaniu komórek (13). Stosunkowo słaba wydajność transdukcji komórek NIH 3T3 to wynik niskiej ekspresji zarówno integryn jak i receptorów CAR na ich powierzchni (odpowiednio 10^4 i 10^2 receptorów na komórkę), 10 razy mniejszej niż w przypadku fibroblastów COS-7 (10,23). Dlatego, choć NIH 3T3 ulegają transdukcji (24,25), jej stopień nie jest aż tak wysoki jak w przypadku innych linii (4). Potwierdzają to także nasze wyniki. Jedną z najtrudniej infekowanych linii są jednak komórki czerniaka, B16(F10) (11,12), które w naszych badaniach potrzebowały średnio 10 razy wyższej dawki wektora niż inne komórki, aby osiągnąć 90% wydajności. Powodem tego jest prawdopodobnie typowa dla komórek czerniaka niska ekspresja integryny $\alpha_v\beta_5$ i receptorów CAR (26,27).

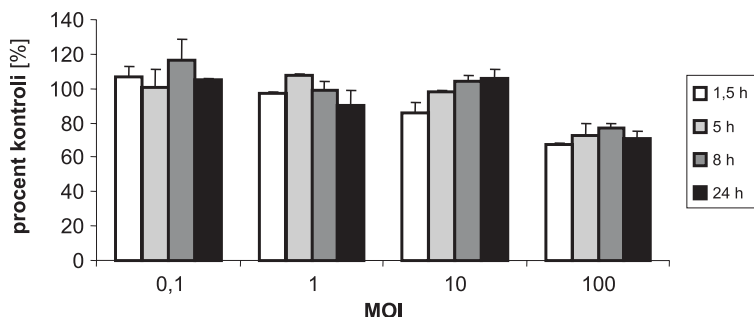
W dotychczasowych badaniach wskazywano, że wydłużenie czasu inkubacji wektorów z komórkami zwiększa wydajność transdukcji (20,24). Również w naszych doświadczeniach zwiększenie czasu inkubacji prowadziło do zwiększenia wydajności w liniach HUVEC, HMEC-1 i COS-7 (por. rys. 1B,3B,5B). Nie zaobserwowaliśmy natomiast podobnego wzrostu w liniach gorzej transdukowanych B16(F10), NIH 3T3 i HaCaT, (por. rys. 11B,7B,9B).

Transdukcja AdV, szczególnie przy zastosowaniu wysokich mian wektora, może wywoływać apoptozę komórek (1,16). Dlatego sprawdziliśmy, w jaki sposób infekcja wirusowa przy różnych MOI i różnych czasach inkubacji wpływa na przeżywalność komórek. Wyniki testów redukcji MTT i aktywności LDH nie zawsze pozosta-

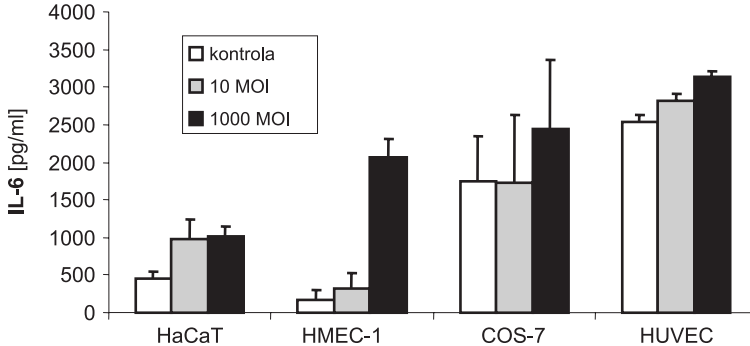
wały ze sobą w zgodzie. Podczas gdy test redukcji MTT pokazywał, że infekcja Ad β -gal nie wpływa na żywotność komórek, wyniki testu aktywności LDH zawsze sugerowały cytotoksyczność, zarówno dla MOI 100 jak i MOI 10. Rozbieżności mogą wynikać z odmiennych zasad działania obu testów. Test aktywności LDH mierzy wyciek dehydrogenazy mleczanowej, wynikający z uszkodzenia błony komórkowej. Test redukcji MTT mierzy natomiast aktywność dehydrogenaz mitochondrialnych. Może być ona obniżona na skutek zwiększonej śmiertelności w hodowli, równocześnie jednak może być podwyższona w wyniku aktywacji komórek (28). Te dwa czynniki, jak się wydaje, działają jednocześnie w przypadku infekcji Ad β -gal, sprawiając, że test redukcji MTT nie wykazuje zmiany przeżywalności.

Wyniki pomiarów aktywności LDH i redukcji MTT wskazują, że najwyższa dawka Ad β -gal (100 IU/komórkę) jest cytotoksyczna, jednak dawki wybrane jako optymalne pozwalały na bardzo skuteczną transdukcję bez znacznego wpływu na śmiertelność. Wyjątkiem jest linia B16(F10) dla której zastosowanie skutecznej dawki wiązało się ze znaczącym spadkiem przeżywalności komórek. Co ważne, przedłużenie czasu adsorpcji wektora, mogące zwiększać skuteczność transdukcji, nie miało istotnego wpływu na żywotność hodowli. Jedyną linią, dla której długi czas adsorpcji był niekorzystny jest COS-7.

Infekcja adenowirusami oraz wektorami AdV może pobudzać w komórkach ekspresję regulatorów wzrostu, wpływać na funkcje cytoszkieletu i wywoływać produkcję cytokin (17,29,30), co poważnie utrudnia interpretację wyników doświadczeń. Dlatego sprawdziliśmy czy podanie wektorów Ad β -gal wpływa na proliferację komórek oraz czy indukuje syntezę dwóch ważnych cytokin prozapalnych TNF i IL-6. Okazało się, że w naszych warunkach doświadczalnych wektory adenowirusowe nie wpływają na proliferację. Zmniejszona inkorporacja BrdU obserwowana w przypadku zastosowania najwyższej dawki Ad β -gal, wynikała nie tyle z zahamowania podziałów, co ze zmniejszoną żywotnością komórek (rys. 14).



Rys. 14. Proliferacja komórek HaCaT po infekcji przy różnych MOI, dla różnych czasów inkubacji. Wyniki przedstawiono jako procent wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych (nie infekowanych). Każdy słupek reprezentuje średnią \pm SD.



Rys. 15. Produkcja IL-6 przez różne linie komórkowe, podczas infekcji dwoma najwyższymi dawkami Ad β -gal (10 i 100 MOI, czas inkubacji – adsorpcji 24 h). Każdy słupek reprezentuje średnią \pm SD.

Infekcja AdV w ciągu kilkunastu minut aktywuje w komórkach czynnik NF κ B, który z kolei nasila syntezę cytokin, w szczególności TNF i IL-6 (1). Może to powodować gwałtowną reakcję zapalną (1,17,29,31). Badane komórki, zarówno kontrolne jak i transdukiowane, nie syntetyzowały mierzalnych ilości TNF. Produkcję IL-6 zaobserwowano natomiast w liniach HMEC-1, HUVEC, HaCaT i COS-7 (rys. 15). Potwierdza to dotychczasowe doniesienia, że keratynocyty, fibroblasty, a przede wszystkim śródbłoki produkują IL-6 w odpowiedzi na różne czynniki (29,32). Co istotne, indukcja IL-6 często osiągała maksymalne wartości już dla dawki 10 IU/komórkę. Na podstawie tych wyników pokazuje się, że przy stosowaniu wektorów adenowirusowych należy zawsze stosować wektory kontrolne i zachować ostrożność przy interpretacji wyników, zwłaszcza przy badaniu funkcji komórek, które mogą być modyfikowane przez IL-6.

Przedstawione doświadczenia umożliwiły wybór optymalnych warunków do wydajnej transdukcji różnych linii komórkowych. Optymalizacja metod pozwoliła na prowadzenie dalszych doświadczeń z wykorzystaniem wektorów AdV do uzyskiwania nadekspresji transgenów i badania ich funkcji *in vitro*.

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. Alicja Józkowicz jest beneficjentem Wellcome Trust (International Senior Research Fellowship).

Literatura

1. Russell W. C., (2000), J. Gen. Virol., 81, 2573-2604.
2. Meier O., Greber U. F., (2004), J. Gene Med., 6, S152-S163.
3. Wickham T. J., Mathias P., Ceresh D. A., Nemerow G. R., (1993), Cell, 73, 309-319.
4. Hidaka C., Milano E., Leopold P. L., Bergelson J. M., Hackett N. R., Finberg R. W., Wickham T. J., Kovsesi I., Roelvink P., Crystal R. G., (1999), J. Clin. Invest., 103, 579-587.

5. Doeblis C., Ritter T., Brandt C., Schonberger B., Volk H.-D., Seifert M., (2002), *Transpl. Immunol.*, 9, 323-329.
6. Li D., Duan L., Freimuth P., O'Malley B. W., (1999), *Clin. Cancer Res.*, 5, 4175-4181.
7. Nadeau I., Kamen A., (2003), *Biotechnol. Adv.*, 20, 475-489.
8. Fechner H., Haack A., Wang H., Wang X., Eizema K., Pauschinger M., Schoemaker R. G., van Veghel R., Houtsmuller A. B., Schultheiss H.-P., Lamers J. M. J., Poller W., (1999), *Gene Ther.*, 6, 1520-1535.
9. Shayakhmetov D. M., Papayannopoulou T., Stamatoyannopoulos G., Lieber A., (2000), *J. Virol.*, 74, 2567-2583.
10. Nalbantoglu J., Pari G., Karpati G., Holland P. C., (1999), *Hum. Gene Ther.*, 10, 1009-1019.
11. Bonnekoh B., Greenhalgh D. A., Bundman D. S., Kosai K., Chen S. H., Finegold M. J., Krieg T., Woo S. L. C., Roop D. R., (1996), *J. Invest. Dermatol.*, 106, 1163-1168.
12. Bonnekoh B., Greenhalgh D. A., Bundman D. S., Eckhardt J. N., Lonley M. A., Chen S.-H., Woo S. L. C., Roop D. R., (1995), *J. Invest. Dermatol.*, 104, 913-917.
13. Carson S. D., Hobbs J. T., Tracy S. M., Chapman N. M., (1999), *J. Virol.*, 73, 7077-7079.
14. Sakurai F., Mizuguchi H., Hayakawa T., (2003), *Gene Ther.*, 10, 1041-1048.
15. Korokhov N., Mikheeva G., Krendelshchikov A., Belousova N., Simonenko V., Krendelshchikova V., Pereboev A., Kotov A., Kotova O., Triozzi P. L., Aldrich W. A., Douglas J. T., Lo K.-M., Banerjee P. T., Gillies S. D., Curiel D. T., Krasnykh V., (2003), *J. Virol.*, 77, 12931-12940.
16. Yeh P., Perricaudet M., (1997), *FASEB J.*, 11, 615-623.
17. Amalfitano A., Parks R. J., (2002), *Curr. Gene Ther.*, 2, 111-133.
18. Amaltano A., (2004), *Methods*, 33, 173-178.
19. Wang Y., Huang S., (2000), *Drug Discov. Today*, 5, 10-16.
20. Zabner J., (1996), *J. Virol.*, 70, 6994-7003.
21. de Martin R., Raidl M., Hofer E., Binder B. R., (1997), *Gene Ther.*, 4, 493-495.
22. Lemarchand P. et. al., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6482-6486.
23. Seth P., Rosenfeld M., Higginbotham J., Crystal R. G., (1994), *J. Virol.*, 68, 933-940.
24. Fasbender A., Zabner J., Chillon M., Moninger T. O., Puga A. P., Davidson B. L., Welsh M. J., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 6479-6489.
25. Crombleholme T. M., (2000), *Wound Repair Regen.*, 8, 460-472.
26. Wickham T. J., Filardo E. J., Cheres D. A., Nemerow G. R., *J. Cell Biol.*, 127, 257-264.
27. Rivera A. A., Davydova J., Schierer S., Wang M., Krasnykh V., Yamamoto M., Curiel D. T., Nettelbeck D. M., (2004), *Gene Ther.*, 11, 1694-1702.
28. Mosmann T., (1983), *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
29. Liu Q., Muruve D. A., (2003), *Gene Ther.*, 10, 935-940.
30. Ramalingam R., Rafii S., Worgall S., Hackett N. R., Crystal R. G., (1999), *J. Virol.*, 73, 10183-10190.
31. Schagen F. H. E., Ossevoort M., Toe R. E. M., Hoeben R. C., (2004), *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 50, 51-70.
32. Lieber A., He C.-Y., Meuse L., Schowalter D., Kirillova I., Winther B., Kay M. A., (1997), *J. Virol.*, 71, 8798-8807.