

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologicko-biochemických věd

Detekce cizorodé DNA v materiálech pro genovou terapii

Bc. Iveta Hnilíčková

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Iveta Hniličková**
Osobní číslo: **C17439**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Detekce cizorodé DNA v materiálech pro genovou terapii**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

Rešerše - materiály genové terapie a jejich DNA kontaminanty


Experimentální část:

Vývoj a validace metody pro detekci kontaminující křeččí DNA (qPCR)

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Generi Biotech s.r.o. Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1. 5. 2019

.....

Iveta Hnilíčková

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. za ochotu, vstřícnost a cenné rady, které mi poskytoval v průběhu zpracování této práce. Další poděkování patří mé rodině a přátelům za podporu během studia.

ANOTACE

Tato práce se zaměřuje na materiály, které jsou používány během léčby genovou terapií. Popisuje kontaminující DNA, která může vzniknout při výrobě těchto materiálů. V experimentální části se zabývá vývojem a validací metody založené na real-time PCR pro detekci kontaminující DNA čínského křečka.

KLÍČOVÁ SLOVA

Genová terapie, vektor, rekombinantní protein, kontaminující DNA, buněčná linie CHO, real-time PCR

TITLE

Detection of foreign DNA in the materials for gene therapy

ANNOTATION

This thesis focuses on the materials, which are used during the treatment by gene therapy. Thesis describes contaminating DNA, which may arise during production of these materials. In the experimental section deals with development and validation of the method based on real-time PCR for detection contaminating DNA from Chinese hamster.

KEYWORDS

Gene therapy, vector, recombinant protein, contaminating DNA, CHO cell line, real-time PCR

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	10
SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ	12
ÚVOD	14
1 GENOVÁ TERAPIE	15
2 VEKTORY POUŽÍVANÉ V GENOVÉ TERAPII	17
2.1 Nevirové vektory.....	17
2.2 Virové vektory	18
2.2.1 Adenovirus.....	20
2.2.1.1 Výroba adenovirových vektorů	22
2.2.2 Adeno-asociovaný virus	23
2.2.2.1 Výroba adeno-asociovaných vektorů.....	24
2.2.3 Retrovirus	24
2.2.3.1 Výroba retrovirálních vektorů	25
2.2.4 Lentivirus.....	26
2.2.4.1 Výroba lentivirových vektorů.....	27
2.2.5 Herpes simplex virus.....	27
2.2.5.1 Výroba herpetických vektorů	28
3 PROTEINY	30
3.1 Produkční buňky	30
3.1.1 HEK293.....	30
3.1.2 PER.C6.....	31
3.1.3 CHO	31
4 KONTAMINUJÍCÍ DNA	33
4.1 Metody detekce kontaminující DNA	34
4.1.1 Polymerázová řetězcová reakce.....	34

4.1.2	Polymerázová řetězcová reakce v reálném čase	35
4.1.3	Přímá metoda polymerázové řetězcové reakce v reálném čase	37
5	CÍLE PRÁCE	39
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
6.1	Izolace DNA	40
6.2	Reagencie, chemikálie, izoláty DNA a přístroje	42
6.3	Detekce DNA čínského křečka	42
6.3.1	Detekční systém I	43
6.3.1.1	Návrh primerů a sondy	43
6.3.1.2	Optimalizace složení reakční směsi	44
6.3.1.3	Složení reakční směsi	44
6.3.1.4	Optimalizace teplotního profilu reakce	45
6.3.1.5	Specifičnost metody	45
6.3.1.6	Selektivita metody	46
6.3.1.7	Rozsah a linearita metody	46
6.3.1.8	Preciznost	48
6.3.1.9	Mez detekce a kvantifikace	48
6.3.1.10	Testování metody na reálných vzorcích	49
6.3.2	Detekční systém II	49
6.3.2.1	Návrh primerů a sondy	49
6.3.2.2	Optimalizace reakční směsi	51
6.3.2.3	Složení reakční směsi	52
6.3.2.4	Teplotní profil reakce	52
6.3.2.5	Specifičnost metody	52
6.3.2.6	Selektivita metody	53
6.3.2.7	Rozsah a linearita metody	53
6.3.2.8	Preciznost	53

6.3.2.9	Mez detekce a kvantifikace	54
6.3.2.10	Testování metody na reálných vzorcích	54
6.4	Detekce lidské DNA.....	54
6.4.1	Parametry metody pro detekci lidské DNA.....	55
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	57
7.1	Detekce DNA čínského křečka – systém I	57
7.2	Detekce DNA čínského křečka – systém II.....	63
7.3	Detekce lidské DNA.....	66
8	ZÁVĚR.....	70
	SEZNAM ZDROJŮ	72
	ZDROJE OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ.....	77

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAV	adeno-asociovaný virus
Ad	adenovirus
AMK	aminokyselina
BHQ	black hole quencher
CNS	centrální nervová soustava
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
DOPE	dioleoylfosfatidylethanolamin
ds DNA	dvouvláknová DNA
E	efektivita
EU	Evropská unie
FAM	tetrachlorofluorescein
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GM-CSF	granulocytární a makrofágy stimulující faktor
gb	Generi Biotech
gp	glykoprotein
GT	genová terapie
HC-AdV	adenovirální vektor s vysokou kapacitou
HIV	lidská imunologická nedostatečnost

HSV	herpes simplex virus
ITR	převrácené opakované koncové sekvence
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti/kvantifikace
LTR	dlouhé repetitivní sekvence
mRNA	mediátorová RNA
NK	nukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězcová reakce
pDNA	plazmidová DNA
PID	primární imunodeficience
qPCR	kvantitativní PCR (real-time PCR)
R ²	Pearsonův korelační koeficient
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodeoxysulfonát sodný
siRNA	krátká interferující RNA
ss DNA	jednovláknová DNA
ss RNA	jednovláknová RNA
T _m	teplota tání
X-SCID	těžká kombinovaná imunodeficience spojená s chromozomem X
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1: Vektory pro genovou terapii.	17
Obrázek 2: Výroba virového vektoru.	19
Obrázek 3: Struktura adenovirové kapsidy.	20
Obrázek 4: Adenovirový vektor.	22
Obrázek 5: Výroba adenovirálních vektorů, systém Cre/LoxP.	22
Obrázek 6: Schéma výroby adeno-asociovaných vektorů pro genovou terapii.	24
Obrázek 7: Struktura retroviru, RT - reverzní transkriptáza.	25
Obrázek 8: Schéma principu polymerázové řetězcové reakce.	35
Obrázek 9: Princip SYBR Green barviva.	36
Obrázek 10: Princip TaqMan sondy, označení R - reportér, Q – zhášec.	37
Obrázek 11: Schéma postupu izolace DNA z tkání.	41
Obrázek 12: Sekvence DNA fragmentu genomové DNA izolované z Čínského křečka (<i>Cricetulus griseus</i>), na kterou jsou navrženy primery a sonda v tabulce 4.	50
Obrázek 13: Záznam z real-time cykléru CFX z analýzy selektivity detekce křeččí DNA – systém I, analyzované směsi DNA – poměr křeččí DNA/lidská DNA: 100/0, 99/1, 95/5, 90/10, 75/25, 50/50, 25/75, 10/90, 5/95, 1/99, 0/100.	58
Obrázek 14: Záznam z real-time cykléru CFX z analýzy linearitu pro detekci křeččí DNA – systém I, analyzovaný rozsah koncentrací: 2,85 ng/μl až 0,285 fg/μl, detekční systém I.	59
Obrázek 15: Záznam z real-time cykléru CFX z analýzy selektivity pro detekci křeččí DNA – systém II, analyzované směsi DNA – poměr křeččí DNA/lidská DNA: 100/0, 99/1, 95/5, 90/10, 75/25, 50/50, 25/75, 10/90, 5/95, 1/99, 0/100.	64
Obrázek 16: Záznam z real-time cykléru CFX z analýzy křivky tání pro metodu detekující lidskou DNA jako závislost záporně vzaté derivace fluorescence na teplotě.	67
Tabulka 1: Přehled produkovaných rekombinantních proteinů v CHO buňkách.	32
Tabulka 2: Sekvence primerů a sondy pro detekci křeččí DNA – systém I.	43
Tabulka 3: Počáteční teplotní profil použitý k optimalizaci pro detekci křeččí DNA - systém II.	45
Tabulka 4: Sekvence primerů a sondy pro detekci křeččí DNA – systém II.	50
Tabulka 5: Kombinace použitých koncentrací primerů a sondy v rámci optimalizace reakční směsi pro detekci křeččí DNA – systém II, označení MM – master mix.	51
Tabulka 6: Amplifikační teplotní profil reakce pro detekci křeččí DNA – systém II.	52
Tabulka 7: Sekvence primerů pro metodu detekce lidské DNA.	55
Tabulka 8: Amplifikační teplotní profil reakce pro metodu detekce lidské DNA.	56
Tabulka 9: Amplifikační teplotní profil reakce pro detekci křeččí DNA – systém I.	57
Tabulka 10: Naměřené množství reziduální DNA čínského křečka ve vzorcích jednotlivých proteinů pomocí detekčního systému I.	62
Graf 1: Bodový graf pro zobrazení – linearitu detekčního systému I pro DNA čínského křečka. Závislost odezvy (hodnota Ct) na logaritmu koncentrace.	59
Graf 2: Bodový graf pro zobrazení – linearitu detekčního systému I pro DNA myši. Závislost odezvy (hodnota Ct) na logaritmu koncentrace.	60
Graf 3: Bodový graf pro zobrazení – linearitu detekčního systému I pro DNA potkana. Závislost odezvy (hodnota Ct) na logaritmu koncentrace.	61

Graf 4: Bodový graf pro zobrazení – linearity detekčního systému II DNA čínské křečka. Závislost odezvy (hodnota Ct) na logaritmu koncentrace.	65
Graf 5: První bodový graf pro zobrazení – linearity metody pro detekci lidské DNA (výchozí koncentrace 1 ng/μl). Závislost odezvy (hodnota Ct) na logaritmu koncentrace.....	67
Graf 6: Druhý bodový graf pro zobrazení – linearity metody pro detekci lidské DNA (výchozí koncentrace 326,3 ng/μl). Závislost odezvy (hodnota Ct) na logaritmu koncentrace.	68

ÚVOD

V současné době je genová terapie známý a rozšířený pojem, pod kterým se skrývá léčebný postup, prozatím ve stádiu klinických studií, jehož cílem je oprava chybné sekvence DNA, jež způsobuje dané onemocnění. Genová terapie může být aplikována nejen pro léčbu vrozených, ale i získaných chorob, jako je například nádorové onemocnění. Při procesu opravy genetické informace využívá genová terapie různých přenašečů – vektorů, zahrnujících požadovaný terapeutický gen, který je potřeba transportovat do genomu buňky.

V teoretické části této diplomové práce je nejprve stručně popsáno seznámení s genovou terapií, kde jsme se následně zaměřili na její materiály, které se během této léčby používají. Jsou zde charakterizovány transportéry terapeutického genu, kterými jsou virové a neviróvé vektory. V průběhu léčby se často vedle vektorů podávají i rekombinantní proteiny, ty mohou působit v synergii s genovou terapií, či pouze jako její doplněk.

V dalších částech práce je cíleno na DNA kontaminanty genové terapie, které mohou vzniknout v průběhu výroby virových vektorů, nebo rekombinantních proteinů. Jelikož se pro jejich výrobu používají různé tkáňové kultury, kontaminace daného terapeutika může vzniknout právě v tomto kroku. Proto je potřeba kontrolovat hladiny takovéto reziduální DNA, která by při jejím podání pacientovi ve vyšším množství mohla způsobit zdraví škodlivé reakce.

Cílem experimentální části diplomové práce je vývoj a validace metody pro detekci reziduální DNA pocházející z čínského křečka. Tento kontaminant byl vybrán, jelikož buněčná linie CHO, která je odvozená od buněk vaječníků právě čínského křečka, je často používána pro produkci rekombinantních lidských proteinů. Pro detekci reziduální DNA je nezbytné, aby byla metoda dostatečně citlivá, proto je metoda pro detekci křeččí DNA založena na real-time PCR, která tyto kritéria splňuje.

1 GENOVÁ TERAPIE

Genová terapie (GT) představuje experimentální léčebnou metodu, jejímž principem je vpravení genetického materiálu do genomu buňky za účelem opravení chybné genetické informace, která je příčinou stávajícího patologického stavu pacienta. Cílem GT je tedy vyléčení pacienta, či zlepšení jeho setrvávajícího zdravotního stavu. Genetickým materiálem pak rozumíme části nukleových kyselin (NK), ať už RNA nebo DNA. V GT lze hovořit o několika strategiích, jedná se o záměnu, inaktivaci, či odstranění nesprávně fungujícího genu. Další volbou může být začlenění zcela nového genu, který napomáhá v boji proti určitému onemocnění [1].

Jelikož nelze gen do buňky vložit přímo, využívá GT přenašeče, tzv. vektory, které slouží k transportu genetického materiálu, obsahující konkrétní gen, jenž má být integrován do genomu buňky. Tyto vektory lze jednoduše rozdělit na virové a neviróvé. K nejčastěji využívaným virovým vektorům řadíme retroviry, adenoviry, proxiviry, adeno-asociované viry a herpetické viry. Viry musí být ovšem geneticky upraveny tak, aby ztratily své patogenní vlastnosti. V případě neviróvých vektorů se používají tzv. polyplexy, což je komplex DNA společně s polymery. Další variantou mohou být tzv. lipoflexy, které opět zahrnují DNA, ale místo polymerů jsou zde lipidy [2]. Při porovnání virových a neviróvých vektorů se zdají být virové vektory efektivnější, co se týče transportu NK do buňky. Vzhledem k tomu, že ale mohou představovat určité biologické riziko pro hostitele, je v současnosti i do budoucna kladen důraz na rozvoj neviróvých vektorů [3].

GT může být provedena ve dvou odlišných strategiích a to tedy *in vivo*, nebo *ex vivo*. Při GT *in vivo* je pacientovi injektován nejčastěji vir, nesoucí požadovaný terapeutický gen, přímo do těla. *In vivo* strategie je aplikována zvláště pro léčbu nádorových onemocnění. V případě GT *ex vivo* jsou nejprve izolovány pacientovy buňky. Následuje transdukce (přenos genu pomocí virových částic) těchto buněk a poté jsou upravené buňky navraceny zpět pacientovi. *Ex vivo* GT se vyznačuje vysokou účinností transdukce a zároveň umožňuje kontrolu kvality transdukovaných buněk před reinfúzí. Využívána může být při léčbě např. těžkých imunodeficiencí.

Z hlediska dopadu lze GT rozdělit na somatickou a germinální. Při somatické GT je léčba aplikována pouze na somatické buňky a dopad GT je vztažen pouze na pacienta. U germinální nebo tzv. „GERM-LINE“ GT je léčba zavedena na zárodečné buňky a měla by

tak dopad i na pacientovy děti, tudíž by potomci vyléčeného pacienta, trpícího dříve genetickou poruchou, nezdědili dané onemocnění a byli by taktéž vyléčeni. Ovšem tato GT není zatím z etických důvodů povolena. Z klinických studií se provádí pouze GT na somatické úrovni.

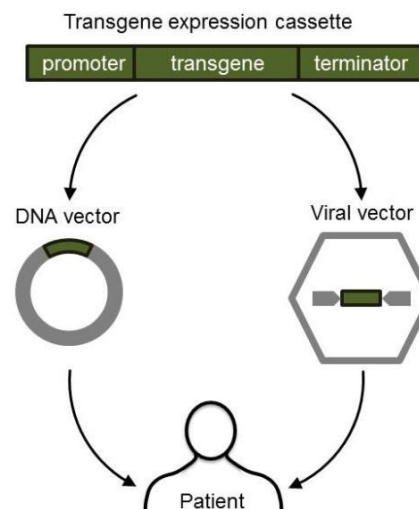
V počátcích se GT zaměřila na léčbu chorob, u kterých jsou jiné léčebné postupy neúspěšné, jako jsou některé typy těžkých imunodeficiencí, zejména tedy primární imunodeficience (PID). Jelikož postupně stoupal počet úspěšných studií, rozšířil se zájem o výzkum léčby pomocí GT u dalších onemocněních jako jsou nádorová onemocnění, metabolické a neurodegenerativní poruchy, zahrnující Parkinsonovu chorobu a v neposlední řadě léčby i hemofilie. V současné době jsou rozšířeny klinické studie pro léčbu získaných onemocnění, z nichž dominuje terapie právě nádorových onemocnění. U nádorových onemocnění hraje roli důležitý fakt, že je těžké zajistit přenos genetického materiálu u všech nádorových buněk a zdá se být tak jednodušší nádorově zvrhlou buňku zničit než ji „opravit“ [1, 4].

Ačkoliv se GT zasloužila o mnohé klinicky úspěšné výsledky, stále se potýká s různými problémy a komplikacemi, včetně obav z vedlejších účinků léčby. Z těchto důvodů se jedná zatím pouze o experimentální metodu a není tak dosud zavedena do běžné klinické praxe. Není ovšem vyloučeno, že by se tak v blízké době nemohlo stát, vzhledem k probíhajícím studiím. Z analýzy z června roku 2012 bylo zaznamenáno 1 843 klinických studií v 31 zemích světa, zatímco z dat z listopadu 2017, která udávají 2 597 studií v 38 zemích, je tedy zřejmé, že se zájem o GT zvyšuje [5].

2 VEKTORY POUŽÍVANÉ V GENOVÉ TERAPII

Jak už bylo výše zmíněno, GT využívá pro přenos genetické informace vektory, které jsou rozděleny na virové a nevirové. V následujících kapitolách budou rozebrány jednotlivé typy.

Součástí každého vektoru je tzv. expresní genová kazeta, která je konstruována z promotoru, požadovaného terapeutického genu čili transgenu a terminátoru. Promotor je signální sekvence DNA pro počátek transkripce a řídí tak transkripci genu. Naopak terminátor představuje signální sekvenci pro ukončení transkripce. Takovýto komplex, skládající se z uvedených částí, může být, jak lze vidět na obrázku 1, buď součástí vektoru virového či nevirového [6].



Obrázek 1: Vektory pro genovou terapii. Převzato z: Zdroj [1].

2.1 Nevirové vektory

Zde jako přenašeč terapeutického genu slouží plazmidová DNA (pDNA), mohou být ale použity oligonukleotidy nebo RNA (mRNA, siRNA). Vzhledem k negativnímu náboji není možné, aby daná NK samostatně pronikla nejen přes hydrofobní buněčnou membránu buňky, ale i přes další bariéry jako jsou epiteliální a endotelové stěny. Dále hrozí její rozklad v extracelulárním prostoru prostřednictvím nukleáz. Metody, které využívá GT pro nevirové vektory k vpravení NK do buňky, dělíme na chemické a fyzikální [6].

Nosiče pro chemické metody vznikají prostřednictvím elektrostatických interakcí NK buď s polykationovými polymery (např. DEAE-dextran, chitosan, polylysin, či polyethylenimin) za vzniku komplexů zvaných polyplexy, nebo s polykationovými liposomy (např. dioleoylfosfatidylethanolamin – DOPE či cholesterol), kdy vznikají tzv. lipoplexy. Tyto komplexy už jsou schopné prostoupit přes buněčnou membránu do buňky ve formě endozomu. V intracelulárním prostoru pak dochází k narušení obalu endozomu a uvolnění komplexu (polyplex/lipoplex). Po vstupu lipoplexu do cytoplazmy se komplex rozvolní a NK putuje do jádra přes jaderné póry, kde probíhá transkripce transgenu. K rozpadu polyplexu, jelikož jsou to komplexy stabilnější než lipoplexy, dochází až po vstupu komplexu do jádra [7].

Nevirové vektory, založené na fyzikálních metodách, využívají aplikace pro dočasné narušení buněčných membrán, čímž se usnadní prostoupení genetického materiálu k jádru buňky. Mezi tyto techniky patří např. mikroinjekce, hydroporace, elektroporace, sonoporace či tzv. biobalistika.

Při použití mikroinjekce je za velmi vysoké rychlosti injektována NK o malém objemu (3 – 5 μ l) přímo do cílové tkáně (např. játra, kůže, mozek či nádor). Zde ovšem hraje riziko degradace NK nukleázami.

V případě hydroporace je injektován do tkáně velký objem NK za krátký čas (3 – 5 s), tím dochází ke zvýšené propustnosti kapilár a vzniku přechodných pórů v buněčných membránách pro vstup NK.

Elektroporace je technika, využívající při lokální aplikaci genetického materiálu elektrických pulzů, které způsobí opět tvorbu dočasných pórů v buněčné membráně.

Sonoporace je proces, u kterého dojde ke změně permeability buněčné membrány prostřednictvím ultrazvukových vln s frekvencí 1 – 3 MHz, čímž se stává přechodně prostupnou pro NK.

U techniky biobalistiky nebo také balistického přenosu genetického materiálu je NK vpravována do buněk tzv. genovou pistolí pomocí kovových částic, které jsou pokryty právě danou NK. Pro výrobu kovových částic, mající v průměru 1 μ m, se používá typicky zlato, wolfram či stříbro. Dostatečná rychlost částic je zajištěna elektrickým výbojem.

Nevirové vektory představují řadu výhod oproti virovým vektorům jako je nízká imunotoxicita, z čehož vyplývá, že jsou tedy bezpečnější. Další výhodou je možnost opakovaného podávání či snadnost výroby. Ovšem potýkají se stále i některými úskalími jako je krátká genová exprese, či dokonce v určitých aplikacích s nízkou účinností přenosu NK [8].

2.2 Virové vektory

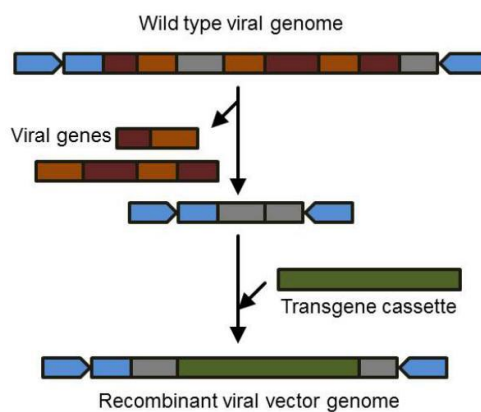
V dnešní době v klinických studiích GT jsou virové vektory stále dominantně využívány, zejména kvůli charakteristickým vlastnostem virů. Mezi nejvíce používané virové vektory, jak už bylo výše zmíněno, patří vektory odvozené od adenovirů, adeno-asociovaných virů, retrovirů a herpetických virů. K pochopení fungování těchto vektorů je třeba si nejprve vysvětlit životní cyklus virů.

Viry jsou schopné napadnout hostitelskou buňku a zavést do buňky svůj genetický materiál a případně ho vmezeřit do genomové informace buňky. Nejdříve ale dojde k rozpoznání cílové buňky a přichycení neboli adsorpci viru prostřednictvím příslušných receptorů na buňce a povrchových proteinů na viru. Následuje penetrace čili vniknutí viru do buňky a to v závislosti na struktuře viru, podle toho zda se jedná o obalený či neobalený virus. V případě obalených virů může dojít k tzv. fúzi tedy splnutí obalu viru s cytoplazmatickou membránou buňky, čímž se obsah viru včetně NK dostává do intracelulárního prostoru nebo může virus do buňky vstoupit pomocí vezikulárního transportu (endocytózou). U neobalených virů proniká pouze NK přímo skrz membránu buňky. V dalších krocích záleží na tom, jaký typ NK vir nese. Pokud vnáší dvouvláknovou (ds) DNA, probíhá její replikace a přepis do mRNA. U jednovláknové (ss) DNA je nejdříve třeba dosyntetizovat komplementární vlákno a proces probíhá dále stejně jako u ds DNA. Jestliže jde o viry s ss RNA, je třeba si odlišit tzv. pozitivní a negativní RNA viry. U pozitivních RNA virů vstupuje jejich mRNA přímo do proteosyntézy, kde je překládána do řetězce aminokyselin (AMK). RNA negativních RNA virů je nejprve syntetizována za vzniku komplementárního RNA a jako u pozitivních RNA virů, tak také tato RNA vstupuje do proteosyntézy. Nově vzniklé viriony opouští buňku a napadají další vnímavé buňky [9].

K tomu aby mohl být vir použit pro účely GT jako vektor, je nezbytné upravit jeho genom. Tím rozumíme odstranění (delece) většiny virových nativních sekvencí, ale zároveň zachování signálních sekvencí, což má za důsledek zabránění patogenity a také produkci dalších infekčních virů. V tomto případě se jedná vlastně o výměnu, kdy po delecii virových genů, dosadíme expresní genovou kazetu (viz výše obrázek 1), obsahující

požadovaný transgen, kolem níž se v případě retrovirů nachází dlouhé repetitivní sekvence – LTR (long terminal repeat) a obalový signál (viz obrázek 2). Pro zvýšení stability a rozšíření rozsahu vektoru se upravují i obalové proteiny viru. Ty jsou nejčastěji nahrazeny proteinem G, což je heterologní virový glykoprotein [6, 9].

Při navrhování virových vektorů je nezbytné si nejprve zvážit řadu aspektů. Jelikož se v současnosti pro GT používá řada různých druhů virů, je třeba si pečlivě nastudovat



Obrázek 2: Výroba virového vektoru. Převzato z: Zdroj [1].

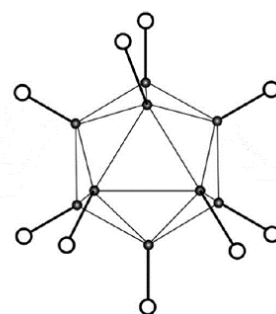
specifické vlastnosti pro určitý typ viru, mezi které patří replikační mechanismus nebo také interakce s jejich přirozenými hostitelskými buňkami. Dalším kritériem je role imunitního systému. Imunitní systém dokáže rozeznat cizorodé částice a zahájit imunitní reakci s cílem jejich zničení. Tento proces je ovšem v případě GT nežádoucí, kdyby došlo ihned k destrukci virových vektorů či již transdukovaných buněk, nemohlo by dojít k žádným terapeutickým výsledkům, proto je zájem o vektory, které dokáží tento problém obejít. Mezi zkoumané aspekty patří také, aby byl vektor schopen procházet skrz biologické bariéry a napadat pouze požadované buňky, dále doba transgenní exprese nebo důsledky integrace na hostitelskou buňku [10].

V následujících podkapitolách si blíže popíšeme některé z vybraných druhů virů používaných v GT, včetně jejich struktury a vlastností.

2.2.1 Adenovirus

Adenoviry (Ad), patřící do čeledi *Adenoviridae*, jsou neobalené DNA viry střední velikosti. Rozlišujeme 7 druhů, které jsou označeny písmeny A – G. Dále existuje více než 50 sérotypů. Jedná se tedy o velmi rozšířený vir, který napadá nejen zvířata ale i lidskou populaci. Zaslouhuje se převážně o infekce horních cest dýchacích, také o záněty spojivek, mandlí, průjmové onemocnění a další. Přenáší se buď kapénkovou infekcí či orálně-fekální cestou.

Jak lze vidět na obrázku 3, adenovirová kapsida má tvar dvacetistěnu neboli ikosaedru. Na každém vrcholu proteinového pláště je uloženo fibrinové vlákno, které napomáhá k přichycení na cílovou buňku. Po navázání prochází virová kapsida skrz buněčnou membránu prostřednictvím endocytózy. Uvnitř kapsidy se nachází genom viru, tedy ds DNA o délce 26 – 40 kb (kilobáze = kilobase pair (kbp) – 1000 párů nukleotidů), kde je složena do struktury připomínající nukleozom. Později se virová



Obrázek 3: Struktura adenovirové kapsidy. Převzato z: Zdroj [2].

kapsida uvolní z endozomu a genom viru se poté dostává do jádra hostitelské buňky. Genom tohoto viru lze rozdělit na dvě transkripční oblasti, jedná se o časnou a pozdní oblast. Toto rozdělení je závislé na replikaci DNA. Časná oblast zahrnuje transkripční jednotky E1, E2, E3 a E4. Každá z těchto jednotek plní svou funkci. Jednotka E1A je zodpovědná za spuštění transkripce a také vyvolává S fázi čili replikaci v hostitelské buňce. E1B zabraňuje předčasné smrti virem napadené buňky a dále napomáhá replikaci viru. Jednotka E2 kóduje DNA polymerázu. E3 kóduje proteiny potřebné k blokaci vůči přirozené imunitní odpovědi na virový

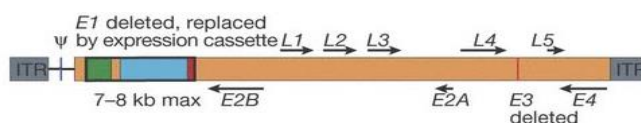
atak. E4 kóduje proteiny, které hrají roli v replikaci DNA, transportu mRNA a v sestřihu neboli splicingu nekódujících částí primárního transkriptu [11]. Pozdní oblast, která se skládá z pěti jednotek (L1, L2, L3, L4, L5), má za cíl tvorbu strukturních proteinů pro zabalení DNA. Na koncích virového genomu se nachází tzv. převrácené opakované koncové sekvence (ITR).

Adenovirus se vyznačuje některými vlastnostmi, díky nimž je vhodný pro využití v GT. Zejména tedy nízká patogenita, poměrně vysoká úroveň exprese virových proteinů a v neposlední řadě přirozený transport genetického materiálu viru do jádra hostitelské buňky, protože velké množství buněk v lidském těle tvoří přirozeně primární Ad receptory a sekundární integrinové receptory, díky nimž je lze snadno infikovat těmito vektory. Z tohoto důvodu je také pro Ad vektory nejvhodnější aplikace GT *in vivo*. Další jejich výhodou je, že jejich virový genom se neintegruje do genomu hostitelské buňky, ale zůstává v jádře pouze epizomálně, tudíž zde není riziko vzniku inserční mutagenese [12]. Jelikož se jedná o velmi široce se vyskytující vir, jak již bylo výše zmíněno, problém nastává tehdy, pakliže se v předchozím období pacient již setkal s onemocněním, které bylo vyvoláno některým z druhů adenoviru. Tento pacient má pak ve svém těle vytvořené protilátky proti určitému sérotypu a nemohl by mu potom být aplikován virový vektor tohoto sérotypu. Proto jsou tedy Ad vektory odvozené od vzácných sérotypů. Důležitým faktem také je, že Ad vektory dokáží transdukovat široké rozmezí klidových i proliferujících lidských buněk, což jsou buňky, jež právě prochází buněčným dělením [9, 12].

Ad vektory jsou v současnosti nejvíce používány v klinických studiích jako onkolytické vektory, tedy k léčbě nádorových onemocnění. Mohou způsobit přímou smrt nádorové buňky nebo mohou zapříčinit zvýšenou citlivost nádorových buněk vůči léčivu. Ad vektory jsou používány a zkoumány ve studiích GT také k léčbě onemocnění jater, ale i HIV, kardiovaskulárních onemocnění či tuberkulózy [11, 13]. Příkladem úspěšně testovaného onkolytického viru je ONCOS-102, což je modifikovaný Ad typu 5 s kapsidovými prvky z Ad typu 3. Ve svém genomu obsahuje transgen, kódující protein GM-CSF (granulocytární a makrofágy stimulující faktor). ONCOS-102 je schopen nejen cílit pouze na nádorové buňky, ale uvolněním proteinů GM-CSF se aktivuje imunitní systém a nastává tak destrukce dalších nádorových buněk [13].

2.2.1.1 Výroba adenovirových vektorů

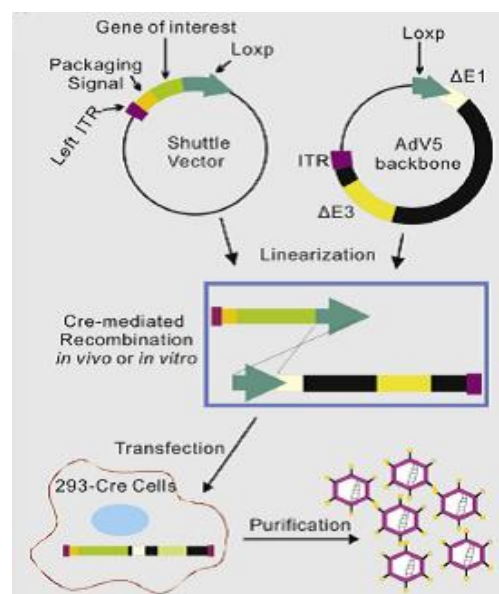
Pro aplikaci v GT jako vektory jsou některé transkripční podjednotky odstraněny. Jedná se o podjednotky E1 nebo také i E3 (viz obrázek 4). V důsledku odstranění těchto částí genomu vzniká prostor pro vložení cizorodé (transgenní) DNA o velikosti 7 – 8 kb. Dále byl použit i vektor, jehož cílem bylo snížení imunitní odpovědi na virovou infekci. V tomto vektoru byla eliminována jednotka E1 spolu s E4 [11]. V některých studiích byly použity Ad vektory, kde je veškerý virový genom kromě sekvencí ITR vymazán, čímž vzniká prostor pro vložení DNA o velikosti až 36 kb. Tyto vektory jsou nazývány Ad vektory s vysokou kapacitou – HC-AdV [11, 14].



Obrázek 4: Adenovirový vektor. Převzato z: Zdroj [3].

K výrobě Ad vektorů s deletovanou oblastí E1 a terapeutickým genem se využívá rekombinace v buněčné linii HEK293 (tzv. packaging linie), která exprimuje právě gen E1, mezi plasmidovým vektorem (kyvadlový vektor) a adenovirální DNA. Virová DNA je již defektní a není schopna se sama replikovat a tvořit nové viriony. Plasmidový vektor zahrnuje ve svém genomu požadovaný transgen, oblast 5'-ITR, obalový signál a homologní sekvence k Ad vektoru. Tento systém se používá už jen zřídka, jelikož se zde nezdá být generování Ad dostatečně efektivní.

Další alternativou pro produkci Ad vektorů je tzv. systém Cre/LoxP, který si lze prohlédnout na obrázku 5. Opět je zde potřeba plasmidového vektoru s příslušným transgenem, oblastí 5'-ITR, obalovým signálem a přítomností místa LoxP, dále tzv. Ad páteřního (backbone) vektoru opět s oblastí LoxP a buněčné linie HEK293, která exprimuje enzym Cre rekombináza. Enzym Cre rekombináza je schopna rozeznat místa LoxP v plasmidovém a v Ad páteřním vektoru, ty pak rozštěpí a vzniká tak rekombinantní Ad vektor [12, 14]. Tato cesta generace Ad vektorů je efektivnější 30 – 100× než předchozí metoda [14].



Obrázek 5: Výroba adenovirálních vektorů, systém Cre/LoxP. Převzato z: Zdroj [4].

System AdEasy je třetí metodou používanou ke generování Ad vektorů, kde dochází k homologní rekombinaci s vysokou účinností v bakteriálních buňkách *Escherichia coli* kmenu BJ5183. Zde je potřeba opět dvou vektorů a to tedy plazmidového, který nese ve svém genomu příslušný transgen a Ad páteřního. Plazmidový vektor je následně linearizován a transportován do buněk BJ5183, které obsahují Ad páteřní vektor. Ten obsahuje gen pro rezistenci na antibiotikum kanamycin. Homologní rekombinací těchto dvou vektorů vzniká rekombinantní Ad vektor se selekcí vůči kanamycinu. K ověření správnosti rekombinace je vektor štěpen restriční nukleázou a dále vložen (transfekován) do buněk HEK293, kde jsou produkovány výsledné Ad vektory.

Pro produkci HC-AdV je potřeba přítomnosti tzv. pomocného adenoviru, jelikož je téměř veškerá virová DNA nahrazena transgenem. V tomto případě je opět využíván systém Cre/LoxP [12, 14].

2.2.2 Adeno-asociovaný virus

Adeno-asociovaný vir (AAV) je částice malého rozměru, jejíž proteinový obal čili kapsida má tvar obdobný jako Ad tedy ikosaedru. AAV patří do čeledě *Parvoviridae* a rodu *Dependovirus*. Je známo 11 sérotypů AAV a nejčastěji využívaným je sérotyp 2 (AAV2). Díky různým afinitám k daným receptorům na hostitelských buňkách určitých sérotypů AAV, je zajištěno zacílení na různé typy tkání.

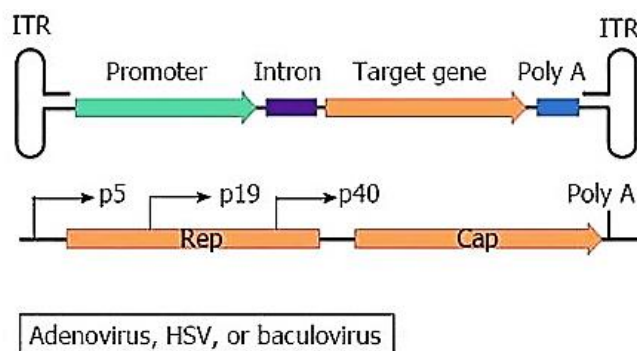
Genom AAV tvořený ss DNA o velikosti 4,7 kb je konstruován ze dvou genů, které se nazývají Rep a Cap. Tyto geny jsou obklopeny opět jako u Ad sekvencemi ITR. Gen Rep kóduje proteiny, které jsou významné pro replikaci a tedy i pro životní cyklus tohoto viru. Jedná se o proteiny Rep 40, Rep 52, Rep 68 a Rep 78. Druhý gen Cap kóduje proteiny (VP1, VP2, VP3), jež se podílejí na výstavbě kapsidové struktury [9, 11, 15].

Významnou výhodou AAV vektorů je schopnost se integrovat do dlouhého ramene 19. lidského chromozomu, což má za důsledek dlouhodobé exprese [16]. Nevýhodou AAV vektorů je nízká kapacita pro vložení transgenů, ale i přesto je tento druh virového vektoru velmi využívaný ve studiích GT, zejména kvůli své schopnosti působení na řadu různých tkání např. AAV5, který má afinitu k receptorům vyskytující se na buňkách mozku, plic a sítnice, dále sérotypy AAV1, AAV6, AAV7 a AAV8 se váží na receptory, jež se nachází na buňkách svalů, plic a jater. V některých studiích byly použity i tzv. mozaiky, kde byly sloučeny 2 různé sérotypy AAV vektorů. Tyto mozaikové vektory pak vykazovaly afinitu obou sérotypů.

AAV vektory jsou často spojovány v klinických studiích GT s léčbou monogenních onemocnění, o něco méně pak s léčbou nádorových onemocnění [6, 11, 16].

2.2.2.1 Výroba adeno-asociovaných vektorů

Pro konstrukci AAV vektorů za účelem aplikace v GT se nejprve odstraní geny Rep a Cap. Místo nich vznikne místo (4,7 kb) pro vložení transgenní DNA. Výroba AAV vektorů je založena na aplikaci tří vektorů (viz obrázek 6): plazmidový vektor, který nese ITR sekvence a daný terapeutický gen v místě genů Rep a Cap, další plazmidový vektor s kódovanými geny pro Rep a Cap, a pomocný vektor. Pomocný vektor je přítomen, aby mohlo dojít k úplné replikaci viru, může jím být herpetický virus, adenovir či bakulovirus. Následně jsou tyto tři vektory transfekovány do buněk HEK293, kde se poté generují AAV vektory [15, 16].



Obrázek 6: Schéma výroby adeno-asociovaných vektorů pro genovou terapii. Převzato z: Zdroj [5].

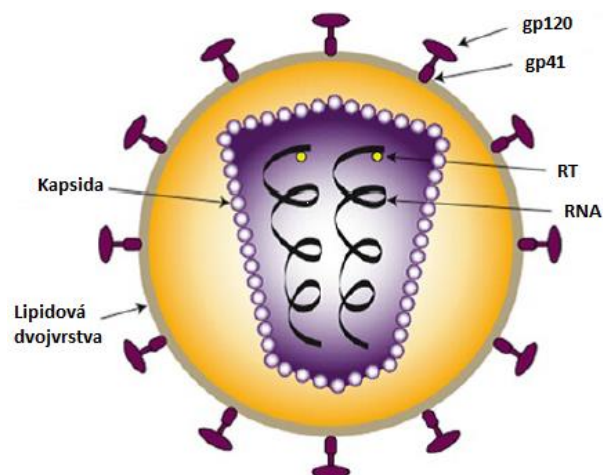
2.2.3 Retrovirus

Retroviry je skupina pozitivních obalených RNA virů a patří do čeledi *Retroviridae*. Čeleď *Retroviridae* obsahuje dvě podčeledi: *Orthoretrovirinae* a *Spumaretovirinae*. Podčeleď *Orthoretrovirinae* je v některých literaturách pak kategorizována na jednoduché a složité retroviry. Genom složitých retrovirů je navíc obohacen o regulační prvky pro jejich replikaci. Do této skupiny jsou řazeny lentiviry a spumaviry [17].

Struktura retrovirů se poněkud liší od výše zmíněných virů. Jelikož se tedy jedná o obalené viry, tak je jejich kapsida navíc obalena lipidovou dvojrůstvou, jak lze vidět na obrázku 7. Uvnitř kapsidy se klasicky nachází genom viru, který je složen ze dvou vláken ss RNA o velikosti 7 – 12 kb. Na povrchu retrovirové částice vyskytují jednak povrchové glykoproteiny (gp), ale i transmembránové gp. Povrchové gp slouží k přichycení viru na cílovou buňku jako je např. u viru HIV gp120 a transmembránové gp napomáhají při fúzi viru s hostitelskou buňkou, opět jako příklad u viru HIV gp41. Genom retroviru obsahuje 3 důležité geny, které jsou obklopeny sekvencemi LTR. Tyto geny jsou nazývány jako gag, pol

a env. Gen gag kóduje strukturální a povrchové proteiny, gen pol kóduje enzymy důležité pro ss RNA, jedná se o reverzní transkriptázu a integrázu, jako poslední gen env kóduje obalové proteiny [18].

Životní cyklus retroviru nejprve začíná přichycením povrchových gp na vnímavou buňku. Poté dojde k splynutí obalu retroviru a membrány hostitelské buňky, tím se dostává virová kapsida do nitra buňky. V tomto okamžiku vzniká reverzní transkripce za pomoci enzymu reverzní transkriptázy z virové ss RNA na ds DNA. Tato ds DNA pak putuje do jádra buňky. V případě jednoduchých retrovirů nedokáže ds DNA proniknout



Obrázek 7: Struktura retroviru, RT - reverzní transkriptáza. Převzato z: Zdroj [2].

do jádra, proto musí pronikat do jádra jen v okamžiku, kdy se buňka dělí a došlo právě k rozpadu jaderné membrány. Prostřednictvím enzymu integrázy se virová ds DNA dostává do hostitelského genomu, kde zůstává již permanentně [11, 18].

Přednostní využití retrovirálních vektorů v klinických studiích GT náleží léčba kardiovaskulárních chorob či tkáňové inženýrství. Dále byly použity k léčbě těžké kombinované imunodeficiencie spojené s chromozomem X (X-SCID), v jistých studiích došlo k výraznému zlepšení, v jiné studii však u některých pacientů došlo k vzniku leukémie a dokonce i k úmrtí jednoho z pacientů. Vzhledem k těmto negativním výsledkům byla upřednostněna snaha o zvýšení bezpečnosti těchto vektorů a byly navrženy SIN vektory či vektory s modifikací LTR sekvence. Tyto vektory jsou blíže popsány v následující podkapitole [9, 18].

2.2.3.1 Výroba retrovirálních vektorů

Pro využití retrovirů jako vektorů v GT, jsou geny gag, pol a env deletovány a vznikne tak prostor pro vložení terapeutického genu o maximální velikosti 8 kb. Zachovány jsou pouze sekvence LTR, důležité obalové signály (ψ) a signály pro expresi genomu. Při podání takového vektoru je genom vektoru po fúzi s hostitelskou buňkou reverzně transkribován, transportován do jádra buňky, kde dojde k jeho trvalé integraci, čímž je zajištěna jeho dlouhodobá exprese. Nevýhodou retrovirálních vektorů, kromě schopnosti pronikat pouze do dělicích buněk, je

náhodnost vkládání prostřednictvím enzymu integrázy do genomu hostitelské buňky. Za předpokladu, že by byl transgen vložen do regulační oblasti genu původního hostitelského genomu, nastane tak dysregulace transkripce a dochází k tzv. inserční mutagenezi. Ve snaze potlačit toto riziko, byly vyvinuty vektory s mutací právě integrázy. V druhém případě by mohlo dojít i k aktivaci onkogenu, jelikož LTR obsahují sekvence, které jsou schopny po zařazení do genomu hostitele aktivovat expresi okolních genů a tedy i onkogenů, proto byly navrženy tzv. SIN (self-inactivating) vektory, které obsahují nefunkční LTR na 3' konci [6, 9, 19].

Postup pro vznik retrovirálních vektorů prošel v průběhu několika let určitým vývojem s cílem zlepšení produkce těchto vektorů v produkčních liniích a zvýšení bezpečnosti. Z počátku se používaly buněčné linie odvozené od myši (NIH3T3). Později se však zjistilo, že myší buňky produkují uhlovodíkové skupiny galaktóza- α -1,3-galaktózy. Tyto struktury jsou následně prezentovány na vektorových obalech a činí tak vektor rychle identifikovatelný lidským imunitním systémem, proto se produkce retrovirálních vektorů nyní přiklání k využití lidských buněčných linií [19].

K vlastní konstrukci retrovirálních vektorů je využívána technologie tzv. výměna kazet zprostředkovaná rekombinázou (RMCE – recombinase mediated cassette exchange). Zapotřebí je vektor, který ve svém genomu nese geny gag, pol a env obklopené heterologními sekvencemi LTR a po obou stranách vektoru se nachází selekční markerový gen např. gen pro rezistenci na neomycin. Dále je potřeba plazmidového vektoru, který obsahuje transgenní kazetu s požadovaným genem, obalový signál, počáteční sekvenci gag a 5'LTR. Po výměně kazet těchto dvou vektorů za působení enzymu rekombinázy vzniká požadovaný retrovirální vektor [20].

2.2.4 Lentivirus

Jak již bylo v předchozí kapitole zmíněno, lentiviry řadíme do skupiny složitých retrovirů. Samotný rod *Lentivirus* je tvořen dalšími devíti druhy. Pro tento rod je charakteristická dlouhá inkubační doba a doživotní infekce. Nejznámějším patogenem je virus lidské imunologické nedostatečnosti čili ve zkratce HIV.

Genom lentivirů např. právě HIV (konkrétně HIV-1) obsahuje stejně jako retroviry geny gag, pol a env, navíc ale obsahuje další šest genů, z nichž dva z těchto genů kódují proteiny Tat a Rev, které plní regulační funkci. Protein Tat reguluje reverzní transkripci ss RNA a protein Rev je nezbytný pro syntézu dalších virových proteinů. Zbylé čtyři geny jsou geny doplňkové,

ty pak kódují proteiny: Vif, Nef, Vpr a Vpu. Všechny tyto proteiny přispívají k replikaci viru, zvyšují jeho infekčnost a napomáhají k transportu nových virionů z hostitelské buňky [17, 20].

Životní cyklus retrovirů a lentivirů je podobný, ovšem na rozdíl od skupiny jednoduchých virů, u lentiviru je po průniku do buňky jeho genetický materiál díky přítomnosti proteinu Vpr přenesen do jádra buňky i u nedělicích se buněk, což činí významnou výhodu oproti jednoduchým retrovirům [18, 20].

První klinickou studií v GT s využitím lentivirálních vektorů byla léčba pěti HIV pozitivních pacientů. Výsledky této studie byly více než příznivé, u všech pacientů bylo zaznamenáno snížení virové zátěže a u čtyř pacientů došlo dokonce ke zvýšení pomocných T lymfocytů (CD4+). Po této studii se ohlas o lentivirální vektory výrazně zvedl a používají se v klinických studiích nejen k léčbě HIV ale i k léčbě monogenně dědičných onemocnění jako je např. β -talasémie, Wiskott-Aldrichův syndrom, X-SCID či cerebrální adrenoleukodystrofie [21].

2.2.4.1 Výroba lentivirových vektorů

Jako ostatní virové vektory prošly vektory odvozené od lentiviru v průběhu několika let určitým vývojem za účelem zvýšení bezpečnosti, snížení rizika inserční mutagenese či zamezení vzniku nových infekčních částic. Jsou známy celkem tři generace. U vektorů první generace byl odstraněn pouze gen env, většina genomu viru byla ponechána. Druhá generace vektorů měla kromě genu env deletovány i některé regulační geny. Třetí generace je založena již na SIN vektorech. Potřebné geny jako gag-pol, rev a env jsou kódovány zvlášť v příslušných plazmidech [18, 21].

Pro produkci lentivirálních vektorů jsou obvykle využívány buněčné linie HEK293. U takovýchto buněk je nezbytné, aby obsahovaly geny, které zajistí tvorbu lentivirových částic, což je zajištěno působením plazmidů, které v sobě tyto geny nesou. Mezi tyto plazmidy patří lentivirální plazmid, obsahující transgen obklopený sekvencemi LTR a obalový signál. Geny pol, gag, rev a tat nese druhý plazmidový vektor. Poslední plazmid kóduje gen pro expresi obalového glykoproteinu G, pocházející z viru vezikulární stomatidy [19, 21].

2.2.5 Herpes simplex virus

Herpes simplex virus (HSV) patří do čeledi *Herpesviridae* a podčeledi *Alphaherpesvirinae*. Vůbec nejznámějšími lidskými patogeny HSV je typ 1 a 2 (HSV-1,

HSV-2). HSV-1 vyvolává zejména infekce úst, rtů či hltanu, zatímco HSV-2 způsobuje infekce na genitáliích [9, 22].

Částice herpetických virů je složena z kapsidy, kde se nachází ds DNA, jejíž velikost je 152 bp. Kolem kapsidy je vrstva proteinu společně s enzymy, která se nazývá tegument. Celá částice je chráněna obalem, což je jako u retrovirů lipidová dvojvrstva. Na povrchu obalu jsou rozmístěny glykoproteiny, sloužící k připojení a vstupu do hostitelské buňky. Genom tohoto zahrnuje dvě jedinečné domény, jedná se tedy o krátkou (US) a dlouhou (UL) doménu, ty jsou lemovány sekvencemi ITR. V doménách jsou kódovány geny důležité pro replikační cyklus viru, jako jsou např. geny ICP4 a ICP27. Doména US kóduje celkem 12 genů, které jsou označeny čísly US1 – US12, zatímco UL kóduje více než 4× více genů (US1 – US56).

Po napadení buňky a dodání viru do jádra, je potřeba k transkripci virové DNA několik genů, které jsou kategorizovány do 3 skupin, podle toho jaký protein kódují. Jde o skupiny α , β a γ genů. Proteiny ze skupiny α jsou důležité pro transkripci a její regulaci, dále jsou nezbytné pro syntézu proteinů β a γ . Druhá skupina β zahrnuje DNA polymerázu a transkripční faktory. Proteiny γ jsou proteiny zejména strukturní.

Vzhledem k tomu, že herpetické viry přirozeně napadají buňky centrální nervové soustavy (CNS), jsou vektory odvozené od těchto virů aplikovány v klinických studiích GT pro léčbu neurologických onemocnění, jako je např. Parkinsonova choroba, které by mohly do budoucna přinést příznivé výsledky. V dalších klinických studiích jsou herpetické vektory využity jako onkolytické vektory, tedy pro léčbu nádorových onemocnění [6, 22].

2.2.5.1 Výroba herpetických vektorů

Pro aplikaci v GT jako vektory jsou odstraněny α geny, kdy poté vznikne místo pro vložení heterologní DNA o velikosti až 50 kb. Herpetické vektory jsou tak největším nosičem pro terapeutickou DNA. Mezi charakteristické vlastnosti těchto vektorů patří především vysoká infikovatelnost hostitele, kdy se do genomu buňky virový genom trvale integruje, čímž zajišťuje dlouhodobou expresi genu, další slibnou vlastností je schopnost transdukce dělicích i nedělicích buněk.

Herpetické vektory se vyrábí homologní rekombinací dvou plazmidových vektorů. Zde se jedná o herpetický vektor s defektním replikačním systémem, v jehož genomu jsou deletovány některé geny (ICP4, ICP27, ICP22) a obsahuje specifická restriční místa *PacI*.

Druhý plazmid nese transgen, který je klonován v místě *Bam*HI. Následně jsou oba vektory štěpeny ve svých specifických místech a homologní rekombinací vzniká požadovaný herpetický vektor s daným terapeutickým genem [11, 22].

3 PROTEINY

GT bývá často doprovázena z důvodu zvýšení účinku v boji proti danému onemocnění buněčnou terapií či současně podáváním terapeutických proteinů a slouží tak buď pouze jako doplněk, nebo ve společném působení s GT [23].

Produkce rekombinantních proteinů pro terapeutické účely převážně probíhá v lidských buněčných liniích, jako jsou např. buňky HEK293 [24]. Nicméně ve farmaceutickém průmyslu jsou ze savčích buněk, mimo lidských buněčných linií, velice oblíbené i produkční buňky CHO (Chinese hamster ovary), zde je ovšem nutno kontrolovat ve finálním léčivu hladiny zbytkové DNA, pocházející z těchto hostitelských produkčních systémů [25].

3.1 Produkční buňky

V následujících kapitolách budou popsány vybrané buněčné linie používané pro produkci rekombinantních proteinů či virových vektorů v klinických studiích GT.

Escherichia coli

Bezprostředně nejznámějšími produkčními buňkami z prokaryotických buněk je bakterie *Escherichia coli*. Přestože tato bakterie disponuje mnohými výhodami jako je její snadná manipulace, rychlý růst či vysoká produkce rekombinantních proteinů, neposkytuje posttranslační modifikace jako savčí buňky a také neumožňuje skládat proteiny do jejich nativní konfigurace, proto tedy není příliš vhodná k expresi proteinů pro klinické využití.

Ovšem *E. coli* je velice přínosnou pro produkci pDNA, která může být využívána přímo jako terapeutická látka nebo nepřímo pro další aplikace např. jako výchozí komponenta pro konstrukci virových vektorů či proteinů a jiných biofarmaceutických produktů [26].

3.1.1 HEK293

HEK293 (human embryonic kidney) je lidská buněčná linie odvozená z ledvinných buněk embrya. Tato linie byla vytvořena v Holandsku již v 70. letech minulého století Frankem Grahamem. Její imortalizace byla provedena prostřednictvím transformace virové DNA pocházející z adenoviru typu 5. Číslo 293 symbolizuje, že se jednalo o transformační experiment číslo 293. HEK293 jsou jednou z nejvíce používaných buněčných

linií využívané k přechodné expresi rekombinantních terapeutických proteinů, k produkci virových vektorů pro genovou a buněčnou terapii.

Jelikož se jedná o buněčnou linii odvozenou z lidských buněk, jsou tak zajištěny přirozené posttranslační modifikace jako je např. glykosylace, která napomáhá ke správné účinnosti a zlepšení imunogenních vlastností rekombinantních virových vektorů či proteinů. Kdyby použitý vektor měl na sobě navázány jiné než lidské glykany, došlo by k aktivaci komplementárního systému a dále k jeho degradaci. HEK293 slouží jako produkční hostitelský systém pro generaci např. retrovirálních vektorů, adenovirálních, AAV ale i lentivirálních vektorů [24, 27].

Dnes již existuje řada modifikovaných linií odvozené od původní HEK293 se záměrem zlepšení jejích vlastností v souvislosti s užitím pro danou aplikaci. Mezi takové linie patří Flp293A a 293 FLEX. Od sebe se liší tím, že Flp293A exprimuje obal z viru myši leukémie a 293 FLEX z opičího viru, který napadá gibony – GALV. Tyto buněčné linie jsou používány k produkci retrovirálních vektorů, konkrétně pro technologii RMCE, kde se kolem integračních míst nachází specifické místo pro Flp rekombinázu [28].

3.1.2 PER.C6

PER.C6 je opět lidská buněčná linie, která pochází z primárních embryonálních retinálních buněk. Imortalizace těchto buněk proběhla transfekcí prostřednictvím adenoviru typu 5. PER.C6 buňky jsou nejen výborným hostitelským systémem pro výrobu adenovirálních vektorů pro účely GT, ale také se používají pro výrobu vakcín a terapeutických proteinů, kde umožňují jejich trvalou či přechodnou expresi. Stejně jako u HEK293 buněk, PER.C6 poskytují lidské posttranslační modifikace, což je jejich cennou výhodou [29].

3.1.3 CHO

Buněčná linie CHO, odvozená z ovariálních buněk čínského křečka (*Cricetulus griseus*), patří k nejčastěji využívaným hostitelským systémům pro produkci rekombinantních proteinů pro terapeutické účely. Ve farmaceutickém průmyslu figurují již od roku 1987. V tento rok byl poprvé schválen produkovaný rekombinantní protein v savčích buňkách pro využití v klinické praxi. Jednalo se o aktivátor plazminogenu, který byl vyroben právě v CHO buňkách.

Oblíbenost těchto buněk spočívá v jejich přednostech např. hned první je prokázán bezpečnostní profil, další spočívá ve schopnosti CHO buněk růst v bezsérové suspenzní kultuře.

Ačkoliv CHO buňky nejsou odvozené z lidských buněk, poskytují posttranslační modifikace, které jsou velmi blízké modifikacím, jež se přirozeně vyskytují v proteinech lidského organismu, proto jsou CHO buňky tedy vhodným kandidátem pro produkci rekombinantních lidských proteinů [25, 30]. Přehled produkovaných proteinů lze vidět v tabulce 1 [31].

CHO buňky také často slouží, kromě produkce proteinových terapeutik, jako modelový organismus pro účinnost v klinických studiích GT. Do buněk je tedy vnášena daná pDNA, která ve svém genomu obsahuje terapeutický transgen, jenž má být použit pro GT a vyhodnocuje se účinnost transfekce pro CHO buňky [32].

Tabulka 1: Přehled produkovaných rekombinantních proteinů v CHO buňkách. Upraveno podle: Zdroj [6].

Komerční název	Typ proteinu	Klinické využití
Vectibix	Anti-EGFR mAb	Metastatický kolorektální karcinom
Myozyme	α -glukosidáza	Glykogenóza typu II
Aldurazyme	Laronidáza	Mukopolysacharidóza typu I
Orencia	Abatacept	Revmatoidní artritida
Naglazyme	N-acetylgalaktosamin-4-sulfatáza	Mukopolysacharidóza typu VI
Luveris	Luteinizační hormon	Neplodnost
Avastin	Anti-VEGT mAb	Metastatický kolorektální karcinom, rakovina plic
Advate	Factor VIII	Hemofilie A
Xolair	Anti-IgE mAb	Astma
Raptiva	Antu-CD11a mAb	Psoriáza
Fabrazyme	α -galaktosidáza	Fabryho choroba
Rebif	Interferon- β	Roztroušená skleróza
Humira	Anti-TNF α mAb	Revmatoidní artritida
Aranesp	Erythropoetin	Anémie
Campath	Anti-CD52 mAb	Chronická lymfocytární leukémie
ReFacto	Faktor VIII	Hemofilie A
Tenecteplase	Tkáňový aktivátor plazminogenu	Infarkt myokardu
Herceptin	Anti-HER2 mAb	Karcinom prsu
Enbrel	TNT α receptor	Revmatoidní artritida
Benefix	Faktor IX	Hemofilie B
Follistin/Gonal-F	Folikulostimulační hormon	Neplodnost
Rituxan	Anti-CD20 mAb	Non-Hodgkinův lymfom
Avonex	Interferon- β	Roztroušená skleróza
Cerezyme	β -glukocerebrosidáza	Gaucherova choroba
Pulmozyme	Deoxyribonukleáza	Cystická fibróza
Epogen/Procrit	Erythropoetin	Anémie
Activase	Tkáňový aktivátor plazminogenu	Akutní infarkt myokardu

4 KONTAMINUJÍCÍ DNA

Při výrobě terapeutických látek pro GT je přítomnost kontaminující DNA jedním z kritických faktorů. Především v procesu produkce virových vektorů a rekombinantních proteinů, které budou následně využity jako biofarmaceutický produkt, se zde jako hostitelský expresní systém využívá různých tkáňových kultur [33]. Postup přípravy vektorů je uveden výše. Pro technologii výroby rekombinantních proteinů je nejprve třeba připravit inzert, obsahující sekvenci genů kódující daný protein. Inzert je pak vložen do příslušného transportního vektoru. Takto připravený vektor je vpraven do hostitelské buňky a následně dojde k syntéze požadovaného proteinu prostřednictvím genové exprese. Poté je třeba nově syntetizovaný protein očistit neboli purifikovat od buněčných zbytků [34].

Případná kontaminace výsledného léčiva pochází z použitých produkčních linií – zbytkové části těchto buněk. Může se jednat buď o proteiny, nebo o různé fragmenty DNA čili reziduální DNA. Takováto kontaminace představuje možné riziko vzniku nežádoucích reakcí, ohrožující život lidského organismu – pacienta. Zbytková DNA může pocházet z různých druhů buněk, vzhledem k dostupnosti řady hostitelských organismů hovoříme v kontextu s potenciální přítomností reziduální DNA o rizicích týkající se zejména infekčnosti, onkogenicitě, imunogenicitě či mutagenitě. Z těchto důvodů je nezbytné, aby hladina této DNA v takto vzniklých léčivech, byla kontrolována.

Jak již bylo zmíněno výše v textu, GT bývá často spojena s buněčnou či proteinovou terapií. Přestože se GT snaží nahradit potřebu užívat takto připravených proteinů, do úplného vyléčení je třeba i nadále proteiny podávat. Opět by kontaminace reziduální DNA mohla zapříčinit nežádoucí reakce v organismu, proto je i zde nutná kontrola hladin kontaminující DNA.

Prostřednictvím organizace FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) byla stanovena mezní hodnota reziduální DNA 100 pg na dávku léčiva, což je tedy maximální přípustné množství zbytkové DNA. Světová zdravotnická organizace (WHO) a Evropská unie (EU) schválila tuto hodnotu na 10 ng/dávka [33, 35].

4.1 Metody detekce kontaminující DNA

Metody používané k detekci zbytkové DNA musí být přesné a velice citlivé. V následujících kapitolách budou popsány metody, kterými lze takovou cizorodou DNA kvantifikovat [35].

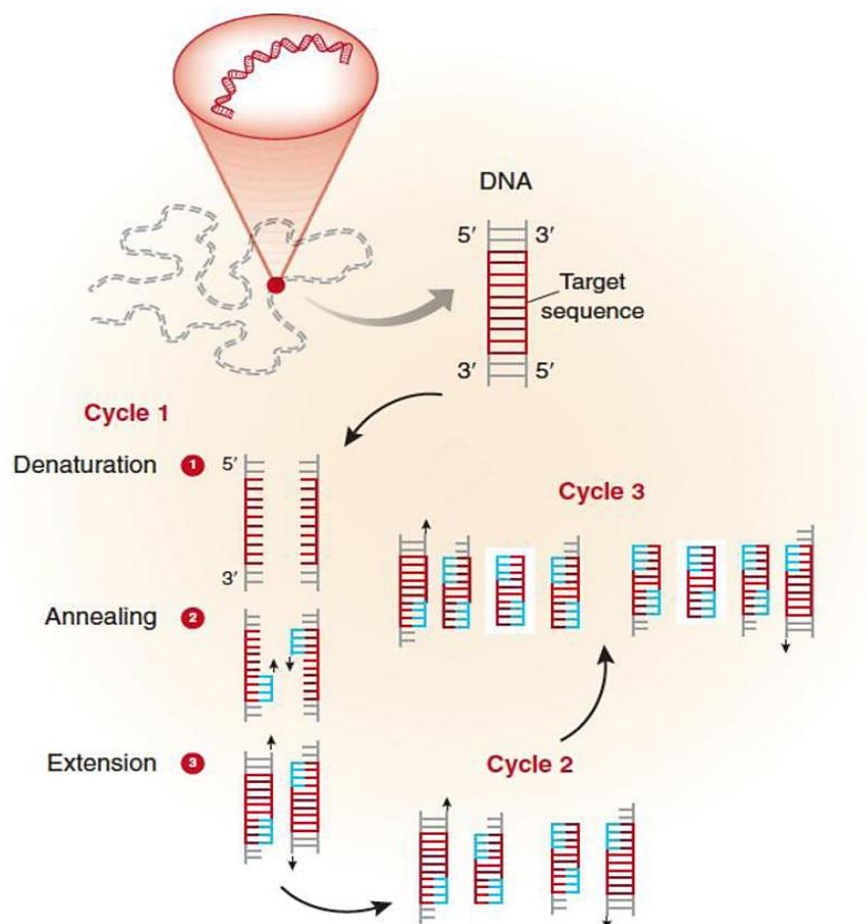
4.1.1 Polymerázová řetězcová reakce

Polymerázová řetězcová reakce (PCR) je široce využívaná metoda, jejíž základem je tzv. amplifikace neboli zmnožení požadovaného úseku DNA. Metodu PCR popsal teoreticky již v roce 1971 profesor Kjell Kleppe. Ovšem za její podstatné vylepšení do té míry, že jí bylo možno využívat v laboratoři, se v roce 1983 zasloužil americký biochemik Kary Mullis, který následně za tento objev v roce 1993 obdržel Nobelovou cenu. Dnes má tato metoda uplatnění nejen v molekulární biologii, ale i např. v oboru mikrobiologie a potravinářství k identifikaci patogenů [36].

K vlastní PCR je potřeba několik komponent, mezi které patří templátová DNA, primery, dále volné nukleotidy a DNA polymeráza. Jako templát slouží tedy DNA o známé sekvenci, na které se prostřednictvím PCR amplifikuje určitý segment. Délka tohoto segmentu se pohybuje v rozmezí od 100 – 1000 bp (párů bazí). Dalšími nezbytnými prvky reakce jsou tzv. primery. Primery jsou krátké oligonukleotidové fragmenty, které jsou komplementární k templátové DNA. Nasednutím na řetězec DNA, tak vymezí specifický úsek vznikajícího produktu. Primery se používají v páru, jedná se o přímý a reverzní primer. Jejich délka bývá 16 – 20 bp. DNA polymeráza je enzym, který zajišťuje syntézu nově vznikajícího PCR produktu. K této syntéze využívá volné nukleotidy (dNTP), které jsou v reakční směsi přítomny v podobě Na⁺ či Li⁺ solí. Nejčastěji používanou DNA polymerázou je termostabilní Taq-polymeráza, která je izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, žijící v horkých pramenech. Taq-polymeráza tak odolává vysokým teplotám během PCR [37].

Metoda PCR se tedy skládá celkem ze tří na sebe navazujících kroků (viz obrázek 8). Prvním krokem této reakce je tepelná denaturace, při které se vzorek vložené dvouřetězcové DNA rozplete na dvě jednoduchá vlákna. K účinnému rozvolnění dvouvláknové struktury probíhá tento krok při vysoké teplotě, která obvykle činí 90 – 97 °C. Následuje druhý krok reakce tzv. annealing, kdy dojde k poklesu teploty na 50 – 60 °C, což je teplota, při které nasedají primery na specifická místa již denaturované DNA. Třetím krokem je extenze nebo také elongace, probíhající za teploty 70 – 72 °C. Zde se syntetizují prostřednictvím

termostabilní DNA polymerázy nová komplementární vlákna DNA. Tyto tři kroky (denaturace, annealing a extenze) se následně cyklicky opakují 30 – 40× a to za pomoci přístroje známého jako termocyklér. Množství PCR produktu stoupá exponenciálně, na konci reakce obsahuje asi 10^5 – 10^6 nově nasyntetizovaných molekul. Na závěr se provede vizualizace výsledného produktu pomocí elektroforézy [38].



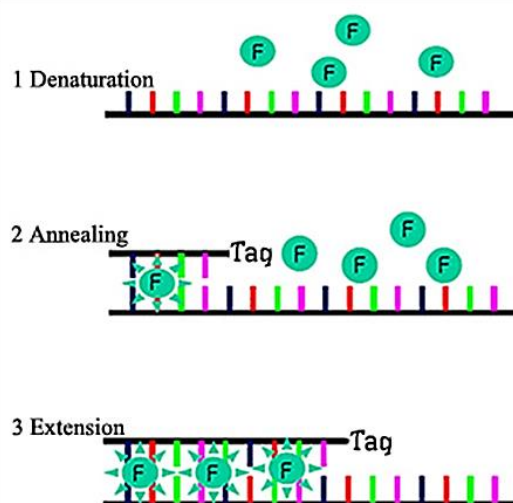
Obrázek 8: Schéma principu polymerázové řetězcové reakce. Převzato z: Zdroj [7].

4.1.2 Polymerázová řetězcová reakce v reálném čase

Jelikož u reziduální DNA hovoříme pouze o stopovém množství DNA, je tedy nezbytné, aby zvolená metoda byla schopná detekovat i takto malé koncentrace. Právě tyto požadavky splňuje polymerázová řetězcová reakce v reálném čase neboli real-time PCR, která tak představuje velice citlivou metodu. Zásadní rozdíl od klasické PCR je v tom, že real-time PCR umožňuje pomocí fluorescenčního signálu analyzovat množství vznikajícího produktu v každém cyklu, kdežto u tradiční PCR je výsledný amplifikovaný fragment detegován až na konci reakce po provedení gelové elektroforézy [33, 39].

Real-time PCR zahrnuje všechny tři kroky (denaturace, annealing, extenze) probíhající v cyklech jako klasická PCR. Jak už bylo podotknuto, real-time PCR využívá fluorescenční signál k monitorování množství vznikajícího amplifikovaného produktu během každého jednotlivého cyklu reakce. Ke vzniku fluorescenčního signálu je zapotřebí přítomnost fluorescenčních molekul. Nejčastěji používanými jsou fluorescenčně značené sondy či interkalační barviva.

Interkalační barviva jsou tedy fluorescenční barviva, která se vážou na dvouřetězcovou DNA. Dnes je nejvíce rozšířené barvivo SYBR Green I, lze ale použít i jiná barviva jako je např. SYBR Gold, EvaGreen či SYTO barviva. Tato barviva začnou emitovat záření až po navázání na nově vzniklá vlákna DNA během posledního kroku reakce (extenze), jak je znázorněno na obrázku 9. Intenzita toho záření se pak zvyšuje se vzrůstajícím množstvím vznikajícího PCR



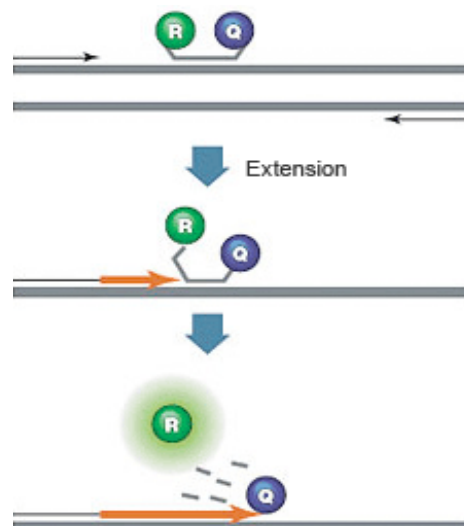
Obrázek 9: Princip SYBR Green barviva. Převzato z: Zdroj [8].

produktu. Nežádoucí je však tvorba nescifických produktů, což mohou být např. dimery primerů. Jelikož fluorescenční barviva emitují záření v přítomnosti jakékoliv dvouřetězcové DNA, mohlo by tak dojít k nepříznivému ovlivnění kvantifikace produktu.

Z tohoto důvodu je vhodné provést na závěr PCR analýzu křivky tání. Jedná se o závislost fluorescence na teplotě, kdy se vzrůstající teplotou postupně klesá fluorescence. V okamžiku dosažení tzv. teploty tání (T_m), což je teplota, při které se polovina dvoušroubovicových molekul DNA rozplete, uvolní se i barvivo. Nad touto teplotou fluorescence prudce klesá. Případný nescifický produkt se liší v teplotě tání od citlivého produktu, tedy jeho přítomnost lze takto rozpoznat.

Fluorescenčně značené oligonukleotidy jsou další možností vedle interkalačních barviv, kterými lze monitorovat fluorescenční signál. Do této skupiny řadíme fluorescenčně značené primery a sondy. V dnešní době jsou nejvíce rozšířené tzv. TaqMan sondy. TaqMan sonda patří mezi hydrolyzační sondy, její struktura zahrnuje krátký oligonukleotidový řetězec, který je komplementární s částí templátové DNA v místě mezi primery. Na 5'-konci sondy je ukotvena

fluorescenční látka, tzv. reportér a na 3' - konci zhášec, který pohlcuje fluorescenci z reportéru. Během polymerizace, kdy probíhá syntéza nových vláken, je prostřednictvím termostabilní DNA polymerázy sonda odbourána, čímž přestává být fluorescence z reportéru pohlcována zhášecem a dochází tak k jejímu nárůstu (viz obrázek 10). Fluorescence je pak tedy úměrná množství amplifikovaného specifického produktu.



Obrázek 10: Princip TaqMan sondy, označení R - reportér, Q – zhášec. Převzato z: Zdroj [6].

K uskutečnění real-time PCR je nutný speciální přístroj tzv. cyklér, který kromě schopnosti tepelného cyklování, obsahuje zdroj excitačního světla, který excituje fluorescenční záření a dále detekční systém pro zachycení fluorescence [39].

4.1.3 Přímá metoda polymerázové řetězové reakce v reálném čase

U běžných metod, které se využívají k detekci a kvantifikaci reziduální DNA z hostitelských buněk, zahrnují před vlastní kvantifikací izolaci DNA z terapeutického léčiva. Ačkoliv real-time PCR představuje vysoce citlivou metodu, krok izolace DNA zbytečně komplikuje zpracování vzorku a může vést ke ztrátě DNA, což ovlivňuje negativně citlivost této metody. Z čehož vyplývá, že je žádoucí, aby byl krok izolace vynechán. Takovou metodu pro kvantifikaci zbytkové cizorodé DNA popisuje přímá metoda real-time PCR neboli přímá qPCR.

Přímá qPCR tedy probíhá bez předchozí izolace DNA, místo toho je vzorek rekombinantního léčiva před vlastním provedením qPCR štěpen prostřednictvím proteázy KAPA, která je pak denaturována při vysoké teplotě. Tímto dochází k degradaci proteinů, především nukleáz nebo v případě proteinového preparátu samotného proteinu, bez nutnosti jeho odstraňování. Obecně proteázy představují skupinu enzymů, které štěpí proteiny na krátké fragmenty. KAPA je relativně nová termostabilní proteáza. Nejprve je vzorek inkubován po dobu 60 min při 56 °C s proteázou KAPA, následuje dalších 10 min inkubace tentokrát při 95 °C, což je teplota při které je KAPA denaturována. V tomto okamžiku je vzorek připraven pro qPCR [40].

Další možností přímé qPCR je použití nescifické aminopeptidázy proteinázy K. Opět se jedná o enzym, štěpící proteiny, stejně tak jako u proteázy KAPA. Její optimální pH se pohybuje v rozmezí 7,4 – 8 pH a teplota v rozmezí 37 – 60 °C (do 60 °C zůstává ještě stabilní). Vzorek rekombinantního proteinu je nejdříve inkubován po dobu 8 – 20 hodin při 55 °C s proteinázou K a přídavkem dodecylsulfátu sodného (SDS), který zvyšuje její aktivitu. Poté je směs vystavena na 10 min teplotě 95 °C. Při této teplotě dochází k inaktivaci proteinázy K. Jelikož by SDS mohl v následujících krocích qPCR inhibovat aktivitu DNA polymerázy, je nutné, aby do PCR mixu byl přidán Tween 20 k eliminaci aktivity právě SDS [41].

5 CÍLE PRÁCE

Cíle práce:

1. Rešerše – materiály genové terapie a jejich DNA kontaminanty
2. Vývoj a validace metody pro detekci kontaminující křeččí DNA (qPCR)

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části diplomové práce je validace metody pro detekci kontaminující DNA, konkrétně detekci reziduální DNA z CHO buněk tedy DNA pocházející z čínského křečka. Na základě rešerše jsme zjistili, že jsou CHO buňky v současné době často používané ve farmaceutickém průmyslu jako hostitelský organismus pro produkci různých terapeutických proteinů. Dle tohoto faktu byla zvolena tato potencionálně kontaminující DNA. Pro takovouto detekci je ovšem potřeba velice citlivá metoda, proto byla zvolena metoda real-time PCR.

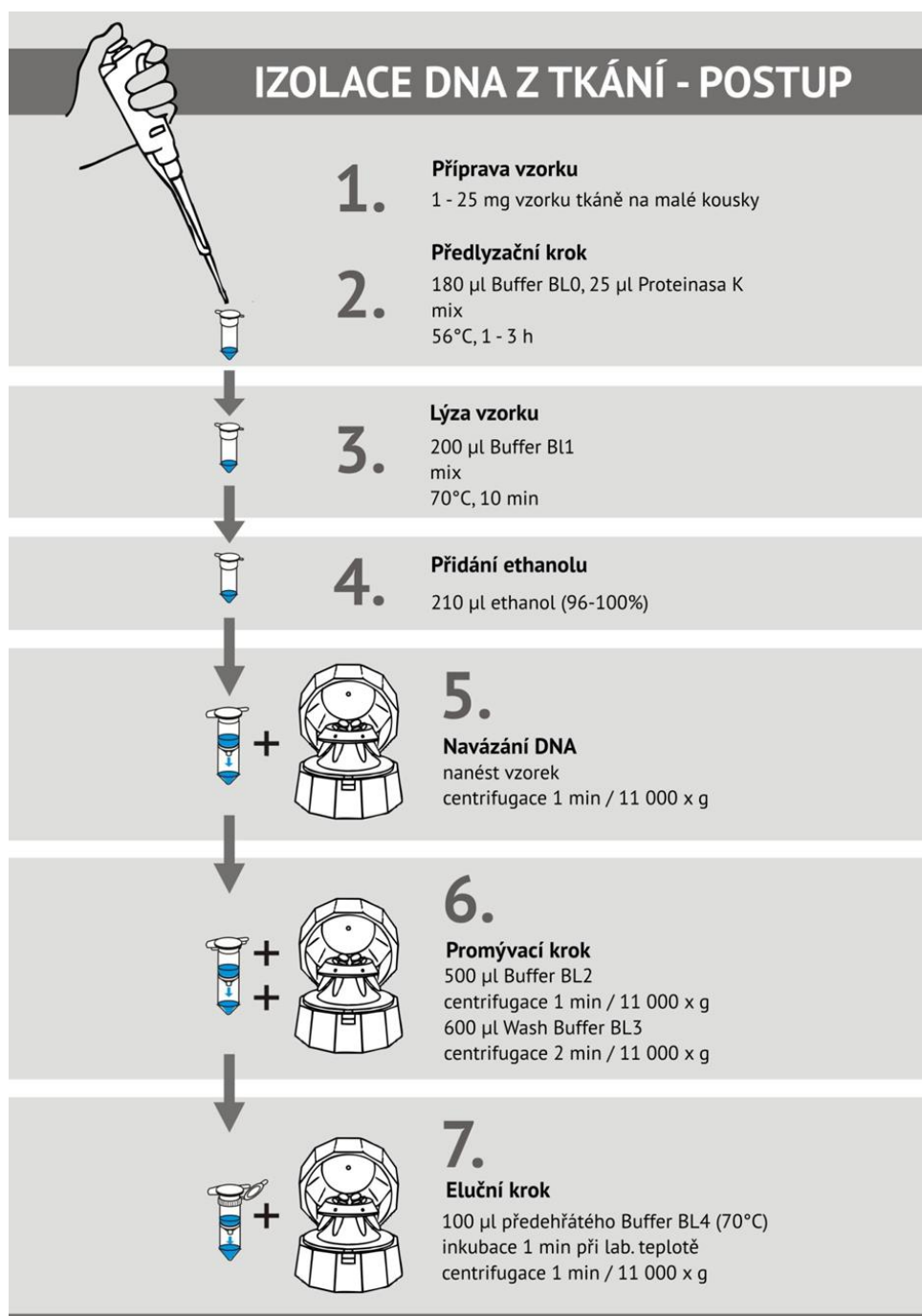
Během validace metody real-time PCR je nezbytné nejprve optimalizovat několik parametrů PCR reakce, jako je složení reakční směsi či teplotní profil amplifikace pro správný průběh reakce. Mezi validační parametry potom patří specifčnost, selektivita metody, dále linearita, rozsah metody, preciznost, limit detekce a limit stanovitelnosti. Pro detekci zbytkové DNA je pochopitelně nejdůležitějším faktorem limit detekce.

6.1 Izolace DNA

Pro izolaci genomové DNA z vybraných vzorků buněčných linií byl použit kit pro izolaci DNA (Kit for isolation of DNA from tissues – Generi Biotech), která probíhá na koloně se silikagelovou membránou. Tento izolační protokol umožňuje získat vysoce čistou genomovou DNA.

Prvními kroky izolace DNA byla příprava vzorku a následně tzv. předlyzační krok, kdy do zkumavky se vzorkem byl napipetován pufr BL0 a Proteinasa K a celý roztok byl promíchán ve vortexu. Tyto roztoky nám zajišťují správnou lýzu vzorku, čímž se naruší buněčná stěna buněk a dojde k uvolnění buněčných kompartmentů. Po proběhlé inkubaci, která trvala 1 – 3 hodin při 56 °C, byl přidán pufr BL1, opět bylo potřeba vzorek s roztoky promíchat ve vortexu a inkubovat, tentokrát při 70 °C po dobu 10 minut. Poté byla zkumavka se vzorkem centrifugována ($3000 \times g$, 5 s) a přidán ethanol, který je důležitý pro navázání DNA na silikagelovou membránu (kolonku) za specifických podmínek. Po řádném promíchání pomocí vortexu byl vzorek opět centrifugován ($3000 \times g$, 5 s). V následujícím kroku – navázání DNA, kde bylo potřeba přepipetovat vzorek na kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce a centrifugovat ($11\ 000 \times g$, 1 min). Kolonka s navázanou DNA byla dále umístěna do nové

sběrné zkumavky a promývána pomocí dvou pufrů (pufr BL2 a BL3). Filtrát z promývacích kroků byl odstraněn a kolonka vložena do nové správně označené zkumavky. Posledním krokem byla eluce, tedy uvolnění DNA navázané na membráně, kdy na střed kolonky byl napipetován přehřátý eluční roztok (BL4) a následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty. Po proběhlé inkubaci byl vzorek s DNA naposledy centrifugován (11 000 g ×, 1 min) a takto připraven k následujícím aplikacím. Schéma popsané izolace lze vidět na obrázku 11.



Obrázek 11: Schéma postupu izolace DNA z tkání. Převzato z: Zdroj [10].

6.2 Reagencie, chemikálie, izoláty DNA a přístroje

Master Mixy (Generi Biotech): gb Elite PCR Master Mix, gb Basic PCR Mater Mix, gb SG PCR Master Mix

IWA (demineralizovaná voda) – přístroj IWA Rosa (WATEK)

DNA z buněčných linií:

CHO (křeček), NIH3T3 (myš), WBF 344 (potkan), K562 (člověk), izolát lidského bukálního stěru, DNA izolovaná z *Penicilium chryseogenum* – veškeré organismy byly poskytnuty laboratoří GB a pochází ze sbírek ATCC nebo ECACC, v případě *Penicillium* ze sbírek CCF.

Rekombinantní lidské proteiny rhSHBG (Generi Biotech) lot 270160004, 270160005, 00116 a 270046004

Vortex – BioSan

Mini centrifuga Hermle

Centrifuga BioSan LMC – 3000

Real-time cyklér CFX Connect (BioRad)

Spektrofotometr Nanodrop ND – 1000 (Thermo)

Automatické pipety Eppendorf (rozsah 0,5 – 1000 µl)

6.3 Detekce DNA čínského křečka

Jak již bylo výše zmíněno, zvoleným kontaminantem pro validaci metody detekce cizorodé DNA této diplomové práce je reziduální DNA pocházející z čínského křečka. Pro následující experimenty byly použity vzorky genomové DNA izolované z buněčné linie CHO (zdroj ECACC-85050302). Vzorky byly připraveny v laboratořích Generi Biotech.

Cílem je tedy optimalizace specifické detekce za použití vzorků genomové DNA z CHO buněk a to i ve směsi s lidskou DNA či DNA pocházející z jiných organismů. Tím dochází k simulaci, kdy je připravována terapeutická DNA v těchto buňkách a DNA buněk CHO je potom kontaminant.

V našich dalších experimentech jsme zahrnuli testování metody na skutečných vzorcích purifikovaných i nepurifikovaných proteinů produkovaných v CHO buňkách, abychom zjistili její aplikovatelnost. Limitní hodnoty detekce musí splňovat podmínky nejnižší množství reziduální DNA stanovené organizacemi FDA, WHO a EU.

6.3.1 Detekční systém I

Pro první detekční systém k analýze DNA čínského křečka, který byl použit v rámci této části diplomové práce, jsme vycházeli z původní studie dle Hussain [40]. Rozhodli jsme se tuto studii využít, protože uváděla vysokou specifitu a nízký detekční limit metody.

6.3.1.1 Návrh primerů a sondy

Jedním z nejdůležitějších kroků metody real-time PCR je dobrá volba konstrukce a návrh primerů. Při návrhu sekvence primerů je potřeba se vyhnout tomu, aby primery neobsahovaly příliš opakujících se bází nebo tzv. palindromy, což jsou sekvence DNA, jež se čtou stejně jak od 5' konce k 3' konci, tak od 5' konce směrem k 3' konci na druhém vlákně DNA. Primery by měly nasedat na cílovou sekvenci DNA a tím nám zajistit specifickou detekci DNA pro daný druh organismu. Jejich délka by měla být 18 – 25 bp [42]. Primery a sonda, které byly použity pro tuto detekci kontaminující DNA, jsou konstruovány tak, aby cílily na repetitivní sekvence Alu. Alu jsou sekvence DNA, které se v daném genomu opakují ve velkém počtu kopií, což zlepšuje detekční limit [40, 42].

Pro naše experimenty jsme vyšli ze sekvencí primerů a sondy z již zmíněné studie dle Hussain [40]. Provedli jsme úpravy fluorescenčního značení sondy. V případě použité sondy se jednalo o hydrolyzační oligonukleotidovou sondu, kde na 5' konci je ukotvena fluorescenční látka FAM (tetrachlorofluoresceinem) a na 3' konci tzv. fluorescenční zhášecí BHQ (black hole quencher). V tabulce 2 jsou uvedeny jednotlivé sekvence primerů a sondy.

Tabulka 2: Sekvence primerů a sondy pro detekci křeččí DNA – systém I.

Název	Primery (5'-3')
qCHO-res-FW	GGTCCTGAGTTCAATTCCCA
qCHO-res-Rev	ATCTGCACACCAGAAGAGGG
	Sonda (5'-3') FAM - BHQ
qCHO-res	CAACTACATGGTGGCTCACAAC

6.3.1.2 Optimalizace složení reakční směsi

Jelikož jsme oproti původní studii použili jinak značenou sondu a využíváme i jinou PCR chemii, bylo nutné reakci optimalizovat. V našich experimentech jsme vyzkoušeli dva typy master mixů, které se komerčně vyrábí ve firmě Generi Biotech. Jednalo se gb Basic Master Mix a gb Elite Master Mix. Tyto master mixy již zahrnují optimalizované směsi komponent pro amplifikační reakci real-time PCR. Obsahují chemicky upravenou DNA polymerázu odvozenou z bakterie *Thermus aquaticus*. Konkrétně se jedná o typ polymerázy hot-start s krátkou aktivační dobou (3 min, při 95 °C) a exonukleázovou aktivitou ve směru 5'-3'. Dále gb Elite a gb Basic obsahují reakční pufr, dNTP, MgCl₂ a složky, které brání inhibici PCR reakce (Generi Biotech). Jelikož se jedná již o optimalizované master mixy, nebylo třeba jejich složky dále upravovat.

Při volbě koncentrace primerů a sondy jsme opět vycházeli z původní studie. Koncentrace obou primerů (přímého a reverzního) byla tedy 10 μM a koncentrace hydrolyzační sondy 2,5 μM. Jako templátovou DNA jsme použili vzorek křeččí DNA izolované z CHO buněk o koncentraci 28,5 ng/μl. Vzorek byl v reakcích pro metodu real-time PCR aplikován jako nezředěný, dále 10× a 100× zředěný. Při vyhodnocení jednotlivých master mixů nebyl shledán žádný rozdíl v průběhu reakce a v rámci finančních důvodů jsme se rozhodli pro další experimenty používat gb Basic Master Mix, jako ekonomičtější variantu.

6.3.1.3 Složení reakční směsi

Počáteční složení reakční směsi, kde jsme zkoušeli využití dvou různých komerčně vyráběných master mixů:

2 μl	vzorek (templátová DNA)
9 μl	gb Basic Master Mix/gb Elite Mater Mix
3,2 μl	směs PCR primerů (10 μM)
0,45 μl	sonda (2,5 μM)
Do 20 μl	demineralizovaná voda

Výsledné složení PCR reakce je uvedeno níže (viz kapitola 8 VÝSLEDKY A DISKUZE).

6.3.1.4 Optimalizace teplotního profilu reakce

Pro optimalizaci teplotního profilu reakce jsme nejprve použili teplotní profil, který zahrnoval následující kroky (viz tabulka 3). Prvními kroky byly počáteční denaturace, kdy první začínala při teplotě 50 °C po dobu 2 minut a druhá byla již vyšší (95 °C, 10 minut). Při těchto teplotách tak dojde k denuraci potenciálně přítomných proteinů, dále k plnému rozvolnění dvoušroubovice DNA a také k aktivaci termostabilní Taq polymerázy. Poté následovalo 40 opakujících se cyklů, v nichž se střídaly dvě teploty. První byla opět teplota denaturační při 95 °C, 15 sekund. Druhá byla teplota při 57 °C po dobu 1 minuty. Při tomto kroku docházelo k hybridizaci primerů na templát neboli annealingu a zároveň probíhala i elongace, což je prodlužování primerů za pomoci Taq polymerázy a tedy i vzniku PCR produktu.

Tabulka 3: Počáteční teplotní profil použitý k optimalizaci pro detekci křeččí DNA - systém II.

Počáteční teplotní profil použitý pro optimalizaci		
Teplota	Čas	Počet cyklů
50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	40
57 °C	1 min	

Jako negativní kontrola nám sloužila demineralizovaná voda a jako pozitivní kontrolu jsme použili DNA izolovanou CHO buněk o známé koncentraci. Jelikož jsme právě u negativní kontroly při vyhodnocování tohoto teplotního profilu získali pozitivní signál, bylo potřeba ho upravit.

Nejprve jsme upravili teplotu i čas kroku annealingu a elongace, abychom tak zajistili správné nasedání primerů na specifickou část rozvolněné DNA. Teplotu jsme měnili v rozsahu 57 – 62 °C. Dále jsme optimalizovali čas elongace.

V rámci zjednodušení teplotního profilu a jeho zkrácení jsme zkusili vynechat první denaturační teplotu, tedy 50 °C po dobu 2 minut, což se nám při analýze reakce osvědčilo a nepřineslo nám žádné nepříznivé rozdíly v získaných výsledcích z real-time PCR reakce.

6.3.1.5 Specifičnost metody

Specifičnost metody čili schopnost detekovat pouze danou veličinou, která má být stanovena, lze v této aplikaci docílit prostřednictvím správně navržených primerů, jež

se specificky naváží pouze na požadovaný úsek DNA [42]. Dosažení vysoké specifčnosti metody bylo pro naše účely v této práci zásadním parametrem. Jelikož byly v metodě zahrnuty primery i hydrolyzační sonda, která nám tím zajišťuje tzv. dvojitou specifitu, měli bychom tedy dosáhnout vysoké specifčnosti metody.

Pro experiment analýzy specifické detekce DNA pocházející z čínského křečka jsme použili izoláty z následujících organismů: čínského křečka (CHO), potkana (WBF 344), myši (NIH3T3), plazmidovou DNA, DNA *E. coli*, izolát z lidského bukalního stěru a také z lidských buněčných linií CaCO. Všechny vzorky DNA jsme nejprve zředili 100× a do real-time PCR aplikovali v triplikátech.

Po proběhlé reakci jsme hodnotili dle dosažených výsledků specifické zacílení detekčního systému I.

6.3.1.6 Selektivita metody

Selektivitu je potřeba testovat, proto abychom zjistili, jak je metoda schopná nezkrlesně detekovat pouze danou látku, v našem případě DNA čínského křečka v přítomnosti jiných rušivých látek [43].

Zde jsme použili vzorek DNA čínského křečka o koncentraci 28,5 ng/μl a vzorek lidské DNA izolovaný z bukalního stěru s 87,6 ng/μl. Tyto vzorky jsme nejprve zředili 100× demineralizovanou vodou a poté jsme si připravili vzorky s postupně zředěnou křeččí DNA pomocí lidské DNA. Poměry DNA čínského křečka/lidská DNA, které byly zhotoveny: 100/0, 99/1, 95/5, 90/10, 75/25, 50/50, 25/75, 10/90, 5/95, 1/99, 0/100. Ze záznamu proběhlé reakce bylo hodnoceno, zda je metoda schopná detekovat pouze křeččí DNA a to tedy i v těch nejvíce zředěných vzorcích lidskou DNA a také jsme vyhodnocovali, jak se mění signál pro DNA čínského křečka s tímto ředěním.

6.3.1.7 Rozsah a linearita metody

Linearitu lze charakterizovat jako závislost mezi odezvou daného přístroje a koncentrací měřeného analytu. K vyhodnocení se u tohoto parametru používá regresní přímka a hodnocena je zde právě těsnost shody čili korelace mezi závislostí odezvy a koncentrací analytu. Uvádí se v druhé mocnině R (R^2), což je tzv. Pearsonův korelační koeficient. Přičemž R^2 by se měl co nejvíce přibližovat hodnotě 1. V podstatě lze říci, že čím je R^2 blíže hodnotě 1, tím silnější

je korelace [44]. Pomocí lineární regrese lze poté určit parametry regresní přímky, podle následující rovnice:

$$Ct = slope \times \log(c_{templát}) + i$$

Ct... počet cyklů, při kterém fluorescenční signál reakce dosáhne prahové hodnoty

slope...směrnice přímky

i...intercept neboli bod, který protíná přímku y

Dále se zde posuzuje efektivita (E) neboli účinnost amplifikace, kterou lze vypočítat ze směrnice kalibrační přímky dle vzorce:

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{slope}\right)}$$

Ideální hodnota efektivity E je 2 (100 % = 2), pokud je ovšem E vyšší než 2, potom dochází u vzorků k inhibici. U real-time PCR je akceptovatelné rozmezí 1,8 – 2,2 [45].

V případě rozsahu metody se jedná vymezené rozpětí naměřeného množství vzorku od nejnižšího po nejvyšší stanovené množství. Validací je pak potvrzeno, že je metoda v tomto intervalu aplikovatelná [43].

Tyto dva parametry byly stavovány v rámci jednoho experimentu. Vzorek původní genomové DNA o koncentraci 28,5 ng/μl jsme nejprve zředili 10× demineralizovanou vodou. Z takto zředěného vzorku jsme následně sériovým desetinásobným ředěním v rozsahu koncentrací od 2,85 ng/μl po 0,285 fg/ul vytvořili kalibrační řadu. Celkový objem amplifikační reakce byl 20 μl, z toho byly vždy 2 μl dané hladiny sériově ředěného vzorku DNA a 18 μl zahrnoval master mix. Každý bod kalibrační řady byl aplikován v triplikátech. Stejně tak jsme postupovali i pro vytvoření kalibrační řady ze vzorku DNA izolované z myši (NIH3T3) o původní koncentraci 61,5 ng/μl a potkana (WBF 344) s původní koncentrací 150,5 ng/μl. Ředěním těchto vzorků jsme tak získali rozpětí koncentrací u myší DNA od 6,15 ng/μl po 6,15 fg/ul a u potkaní DNA od 1,505 ng/μl po 15,05 fg/ul.

Z výsledků získaných ze záznamu real-time PCR jsme vytvořili kalibrační graf vynesemím logaritmu známé koncentrace genomové DNA proti hodnotě Ct.

6.3.1.8 Preciznost

Dalším parametrem je preciznost, což je těsnost shody mezi naměřenými hodnotami, kdy jednotlivé analýzy byly zhotoveny za specifických podmínek [43].

Preciznost za podmínek opakovatelnosti jsme analyzovali následujícím postupem. Nejprve jsme si z původního izolátu genomové DNA čínského křečka o koncentraci 28,5 ng/μl, připravili 100× zředěný vzorek. Takto zředěný vzorek DNA jsme proměřili pomocí real-time PCR v triplicátech po deseti opakováních. Na základě dosažených výsledků z cykléru byla preciznost hodnocena tak, že z hodnot Ct byla vypočítána směrodatná odchylka (SD) a poté variační koeficient (CV) dle vzorce [43]:

$$CV = \frac{SD}{AVG} \times 100$$

AVG...průměr naměřených hodnot Ct

6.3.1.9 Mez detekce a kvantifikace

Detekční limit reakce zkráceně LOD (limit of detection) je definovaný jako nejmenší množství analytu ve vzorku, jež může být danou metodou ještě stanoveno. Tento parametr je pro naše účely opět zásadní, jelikož detekujeme pouze stopové množství cizorodé DNA, chceme, aby byl LOD co nejnižší a splňoval tak podmínky pro minimální hodnotu reziduální DNA stanovenou organizacemi FDA, WHO a EU.

Mez kvantifikace (LOQ – limit of quantification) či limit stanovitelnosti je nejnižší množství koncentrace, kterou lze ještě kvantifikovat [43].

Pro testování detekčního limitu metody jsme si ředěním genomové DNA čínského křečka o původní koncentraci 28,5 ng/μl připravili tyto hladiny koncentrací: $2,85 \times 10^{-3}$; $2,85 \times 10^{-4}$; $5,7 \times 10^{-5}$; $2,85 \times 10^{-5}$; $5,7 \times 10^{-6}$; $2,85 \times 10^{-6}$; $5,7 \times 10^{-7}$; $2,85 \times 10^{-7}$; $5,7 \times 10^{-8}$; $2,85 \times 10^{-8}$; $5,7 \times 10^{-9}$; $2,85 \times 10^{-9}$ ng/μl. Stejným ředěním myši DNA o původní koncentraci 61,5 ng/μl jsme si připravili vzorky s následujícím množstvím DNA: $6,15 \times 10^{-3}$; $1,23 \times 10^{-3}$; $6,15 \times 10^{-4}$; $1,23 \times 10^{-4}$; $6,15 \times 10^{-5}$; $1,23 \times 10^{-5}$; $6,15 \times 10^{-6}$; $1,23 \times 10^{-6}$; $6,15 \times 10^{-7}$; $1,23 \times 10^{-7}$; $6,15 \times 10^{-8}$; $1,23 \times 10^{-8}$; $6,15 \times 10^{-9}$ ng/μl a také potkaní DNA (původní koncentrace 150,5 ng/μl) s těmito koncentracemi: $1,505 \times 10^{-2}$; $3,01 \times 10^{-3}$; $1,505 \times 10^{-3}$; $3,01 \times 10^{-4}$; $1,505 \times 10^{-4}$; $3,01 \times 10^{-5}$; $1,505 \times 10^{-5}$; $3,01 \times 10^{-6}$; $1,505 \times 10^{-6}$; $3,01 \times 10^{-7}$; $1,505 \times 10^{-7}$; $3,01 \times 10^{-8}$ ng/μl. Pro všechny reakce byl použit opět objem 20 μl, z čehož 2 μl byla templátová DNA o dané koncentrační hladině

a 18 μ l zahrnoval master mix. Při vyhodnocování jsme hledali nejnižší hladiny koncentrací, kterou je systém I ještě schopen detekovat.

6.3.1.10 Testování metody na reálných vzorcích

Cílem této práce bylo také vyzkoušet detekci metody na reálných vzorcích. Pro kvantifikaci reziduální DNA jsme použili dva vzorky rekombinantních proteinů SHGB produkovaném v křeččích buňkách CHO. Jednalo se o vzorek proteinu, který purifikován nebyl (270046004) a druhý vzorek proteinu již purifikovaný (rhSHBG 00116). DNA z proteinů nebyla izolována, neboť se předpokládalo, že pokud bude DNA kontaminace přítomna, tak pouze ve formě volné DNA. Pokud bychom provedli extrakci DNA (abychom izolovali DNA ze vzorku) mohlo by se také stát, že bychom přišli o potencionální reziduální množství DNA, což by mělo negativní dopad na citlivost této metody.

Oba proteiny s identifikačními čísly 270046004 a 00116 byly naředěny 100 \times a 10 000 \times demineralizovanou vodou, aby došlo k odstranění potencionálních inhibitorů. Do reakce jsme tedy použili nezředěné proteiny, poté 100 \times a 10 000 \times zředěné vzorky proteinů. Jako pozitivní kontrola byla použita 100 \times zředěná DNA čínského křečka a jako negativní kontrola sloužila demineralizovaná voda. Po dokončení průběhu reakce byl ze záznamu z cykléru hodnocen signál pro reziduální DNA z proteinů a na základě získaných hodnot Ct a pomocí kalibrační křivky byla vypočítána koncentrace DNA kontaminující purifikovaný a také nepurifikovaný protein.

6.3.2 Detekční systém II

Na základě výsledků z předešlého detekčního systému I jsme se rozhodli otestovat další detekční systém pro stanovení množství DNA pocházející z čínského křečka, který jsme označili jako detekční systém II. V této části práce jsme vycházeli z navrhované metody z původní studie dle Nissom [46].

6.3.2.1 Návrh primerů a sondy

V této práci jsme pro detekci reziduální DNA pocházející z čínského křečka vycházeli z původního návrhu primerů dle Nissom [46]. Jelikož tato metoda slibovala opět vysokou citlivost, rozhodli jsme se jí dát přednost před již vyvinutými PCR systémy cílicími na tzv. housekeeping geny. Primery, které byly použity pro tento systém detekce křeččí DNA,

jsou navrženy tak, aby cílily na specifickou sekvenci genomové DNA čínského křečka – tzv. minimal gDNA s minimální homologií vůči jiným hlodavcům dle Nissom [46].

Pro první část experimentů (ověření funkčnosti systému a specifity) jsme využili ekonomičtější kombinací primerů a komerčního master mixu obsahující interkalační barvivo SYBR Green (gb SG PCR Master Mix). Real-Time PCR detekce byla doplněna o analýzu teploty tání.

Pro zvýšení specifity byla k použité sadě primerů navržena hydrolyzační oligonukleotidovou sondou prostřednictvím serveru Primer3: WWW primer tool. Jedná se o hydrolyzační oligonukleotidovou sondu, která je značena na 5' konci značkou FAM a na 3' konci je připojen zhášecí BHQ. Sekvence použitých primerů (přímý a reverzní) včetně oligonukleotidové sondy lze vidět v tabulce 4 a následně v obrázku 12 je znázorněno, kde přesně primery a sonda nasedají na templátovou DNA.

Tabulka 4: Sekvence primerů a sondy pro detekci křečí DNA – systém II.

Název	Primery (5'-3')
NVI_F	ACAGGTTTCTGCTTCTGGCT
NVI_R	CATCAGCTGACTGGTTCACA
	Sonda (5'-3') FAM - BHQ
NVI_P	CTGCGAACCCCTAGACTTGCT

1	GGCACGAGGG	AAAAATGTAC	ATGCTTATAT	CCCAAATCTG	CAGTTTTTGC
51	TAGGACTCAA	AGTTATAAAT	ATGTTCTTGC	TGTTTAAACA	GATATCTGCT
101	TTTTCTACAC	TGTGGGCTTC	AGAAAATAAG	TTTTAACCTC	TGTTCCCAGT
151	TTAAACATGT	CTTAAACAGG	TTTCTGCTTC	TGGCTGACAT	CTGAGTATCA
201	GTTGCTGACT	ACAGGCTGTT	CTAAGTAGAC	TGCGAACCCCT	AGACTTGCTG
251	TGGATGTGAA	CCAGTCAGCT	GATGTGGACA	CCCCCTGTCT	CTGCAACAGT
301	GTCTGCTAAC	CAGAAGCCCC	TGATGGATTC	CCCATTGCCT	AAATTCCTTT
351	TTGCTTTTGA	CTAGCATTTT	AACCTTCTGG	GGTCCCTAAC	TTCGTCCCAA
401	AGTCAGCAGG	AAGCAGTTTG	GAAAAGAATT	TCGCCGTCCA	TTTTCCGGG
451	TTAAAATGCA	AAGTCAAAG	GAACTCCCTT	ACATGGGGAT	GCCAATATCT
501	ATCACTCCCT	GATGGGGATG	CTAGAGAGAC	AGCAATTCCA	TGATTGAATT
551	TCCAGAAAAG	AAAATGGGGG	AATGAAAGAA	ACCGGCTTCC	CTTTTGACAG
601	CCATAATGGT	TGAACATGTG	CTTCTATGAC	CTTGTCTAG	AAACCAGAAA
651	GTCAGATGCC	TGTCTTGTGA	CAAGGAACCA		

Obrázek 12: Sekvence DNA fragmentu genomové DNA izolované z Čínského křečka (*Cricetulus griseus*), na kterou jsou navrženy primery a sonda v tabulce 4. Převzato z: Zdroj [11].

6.3.2.2 Optimalizace reakční směsi

Pro detekci křeččí DNA tohoto druhého systému jsme zvolili master mix komerčně vyráběný firmou Generi Biotech – gb Elite PCR Master Mix. Jelikož se jedná, jak bylo již výše zmíněno, o optimalizovaný master mix, nemuseli jsme jeho komponenty dále upravovat.

Koncentrace zvolených primerů nám může významně ovlivnit průběh amplifikační reakce real-time PCR. Příliš nízká koncentrace primerů by mohla vést k nedostatečnému výtěžku PCR produktu či předčasné spotřebě primerů. Naopak nadměrně vysoká koncentrace by vedla k tvorbě nespecifických produktů. Z těchto důvodů bylo tedy potřeba koncentraci primerů optimalizovat [42].

V našich experimentech jsme testovali v reakčních směsích různé koncentrace primerů v rozsahu 0,1 μM až 0,4 μM . Jako templátovou DNA jsme použili 100 \times zředěný vzorek křeččí DNA, jehož původní koncentrace činila 40,7 ng/ μl . Při vyhodnocení amplifikace real-time PCR na základě velikosti signálu produktu jsme zjistili, že nejslabší signál se jevil vzorků s koncentrací primerů 0,1 μM . Se vzrůstající koncentrací primerů pak signál sílil. Nejvhodnější hodnota koncentrace na základě síly signálu se jevila u vzorku, u kterého byla koncentrace primerů 0,3 μM .

V rámci optimalizace koncentrace primerů, jsme testovali i koncentraci hydrolyzační sondy. Použili jsme obdobné rozmezí koncentrací jako u primerů, tedy v rozmezí 0,1 μM až 0,4 μM . Nejnížší signál jsme pozorovali u vzorku s nejnižší koncentrací sondy. S rostoucí koncentrací rostla i síla signálu, proto se jako neoptimálnější hodnoty koncentrací sondy jeví 0,3 μM a 0,4 μM .

V tomto experimentu jsme tedy testovali dohromady 16 master mixů s různě nakombinovanými koncentracemi primerů a sondy (viz tabulka 5), u obou v rozsahu 0,1 μM až 0,4 μM . Pro následující použití jsme zvolili jako nejlepší vyhodnocené koncentrace primerů 0,3 μM a koncentrace sondy 0,4 μM (master mix č. 12).

Tabulka 5: Kombinace použitých koncentrací primerů a sondy v rámci optimalizace reakční směsi pro detekci křeččí DNA – systém II, označení MM – master mix.

	MM 1	MM 2	MM 3	MM 4	MM 5	MM 6	MM 7	MM 8
$c_{\text{primer}} (\mu\text{M})$	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
$c_{\text{sonda}} (\mu\text{M})$	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,3	0,4
	MM 9	MM 10	MM 11	MM 12	MM 13	MM 14	MM 15	MM 16
$c_{\text{primer}} (\mu\text{M})$	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4
$c_{\text{sonda}} (\mu\text{M})$	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,3	0,4

6.3.2.3 Složení reakční směsi

Na základě prvotních experimentů jsme zvolili následující složení reakční směsi:

2 μ l	vzorek (templátová DNA)
9 μ l	gb Elite PCR Master Mix
1,08 μ l	směs PCR primerů (0,3 μ M)
0,72 μ l	sonda (0,4 μ M)
Do 20 μ l	demineralizovaná voda

6.3.2.4 Teplotní profil reakce

Teplotní profil pro naše experimenty v detekčním systému II (viz tabulka 6) zahrnoval v prvních krocích úvodní tepelné denaturace. První probíhala při teplotě 50 °C po dobu 2 minut a druhá, která trvala 10 minut, při teplotě 95 °C. Následovalo 40 cyklů dvou opakujících se teplot. Jednalo se o denaturační teplotu při 95 °C a délce 15 sekund. V nadcházející teplotě 60 °C po dobu 1 minut, pak docházelo k annealingu a také k elongaci.

Tabulka 6: Amplifikační teplotní profil reakce pro detekci křeččí DNA – systém II.

Teplotní profil pro detekci křeččí DNA – systém II		
Teplota	Čas	Počet cyklů
50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	40
60 °C	1 min	

6.3.2.5 Specifičnost metody

Při testování specifického zacílení na genomovou DNA čínského křečka u tohoto detekčního systému II jsme kromě DNA izolované z CHO buněk analyzovali vzorky DNA získané z buněčné linie odvozené z potkana (WBF 344) a myši (NIH3T3), dále vzorek lidské DNA izolované z bukálního stěru a DNA získanou z bakterie *Penicilium chryseogenum*. Všechny vzorky použité DNA byly opět 100× zředěné a aplikované vždy v triplicátech.

Při vyhodnocení amplifikace real-time PCR s použitím barviva SYBR green jsme získali pozitivní signál u křeččí DNA, ale také i slabý signál u vzorku DNA z myši a potkana. Vzhledem k tomuto výsledku jsme se rozhodli pro zvýšení specifičnosti systému navrhnout

hydrolyzační sondu, jejíž sekvenci si lze prohlédnout v tabulce 4 a její zacílení v obrázku 12. Tato sonda bude nasedat na úsek sekvence DNA mezi primery, které jsme použili v předchozím testování a zajistí nám tak vyšší specifitu detekce.

Opět jsme tedy provedli tento experiment, ale tentokrát s přidavkem hydrolyzační sondy (a pochopitelně bez použití SYBR Green). Jako templátovou DNA jsme znovu použili vzorky DNA ze stejných druhů organismů. Po proběhlé amplifikační reakci bylo následně hodnoceno, zda použitý systém zahrnující hydrolyzační sondu specificky detekuje pouze křeččí DNA.

6.3.2.6 Selektivita metody

V experimentu pro stanovení tohoto parametru jsme použili DNA čínského křečka o původní koncentraci 40,7 ng/μl a lidskou DNA izolovanou z bukálního stěru o koncentraci 87,6 ng/μl. Dále jsme s přípravou vzorků postupovali obdobně jako v předešlém detekčním systému I. Opět jsme si vzorky zředili 100× a zhotovili vzorky s postupně zředěnou křeččí DNA pomocí lidské DNA v poměrech (křečka/lidská DNA): 100/0, 99/1, 95/5, 90/10, 75/25, 50/50, 25/75, 10/90, 5/95, 1/99, 0/100. Následně jsme dle záznamu z cykléru hodnotili stejné parametry jako u detekčního systému I.

6.3.2.7 Rozsah a linearita metody

Při testování těchto dvou parametrů jsme opět postupovali stejným způsobem jako u detekčního systému I. Připravili jsme si tedy kalibrační řadu koncentrací ze vzorku DNA čínského křečka o původní koncentraci 40,7 ng/μl postupným ředěním demineralizovanou vodou v rozsahu koncentrací od 4,07 ng/μl po 0,407 fg/ul. Každý bod kalibrační řady byl do reakce aplikován v triplikátech. Po dokončení real-time PCR jsme následně pomocí grafického znázornění ze získaných dat hodnotili parametry uvedené v kapitole 6.31.7 Rozsah a linearita metody.

6.3.2.8 Preciznost

Preciznost za podmínek opakovatelnosti byla testována následovně. Vzorek genomové DNA o původní koncentraci 40,7 ng/μl jsme zředili 100× demineralizovanou vodou a takto připravený vzorek jsme do reakce aplikovali po deseti opakováních opět v triplikátech. Preciznost pak byla posuzována opět prostřednictvím CV.

6.3.2.9 Mez detekce a kvantifikace

Pro tento experiment se opět lze postupem odkázat na předešlý detekční systém I. Zde jsme ale použili vzorek, jehož původní koncentrace genomové DNA čínského křečka činila 40,7 ng/μl. Vzorek byl postupně ředěn, abychom získali následující koncentrační body: $4,07 \times 10^{-3}$; $4,07 \times 10^{-4}$; $2,035 \times 10^{-4}$; $1,018 \times 10^{-4}$; $6,8 \times 10^{-5}$; $5,09 \times 10^{-5}$; $4,07 \times 10^{-5}$; $2,035 \times 10^{-5}$; $1,018 \times 10^{-5}$; $6,8 \times 10^{-6}$; $5,09 \times 10^{-6}$; $4,07 \times 10^{-6}$; $8,18 \times 10^{-7}$ ng/μl. Každou z koncentračních hladin jsme do reakce aplikovali v triplicátech. Poté co byla reakce dokončena, bylo možné opět ze záznamu z cykléru hledat LOD a LOQ pro detekční systém II.

6.3.2.10 Testování metody na reálných vzorcích

Pro testování metody na reálných vzorcích jsme použili dva vzorky již purifikovaných rekombinantních proteinů s identifikačními čísly 270160004 a 270160005. Opět je třeba říci, že se jednalo o proteiny produkované v CHO buňkách. Oba vzorky jsme nejprve zředili 100× a dále 10 000× za použití demineralizované vody. Do reakce byl každý vzorek proteinů (nezředěný, 100× a 10 000× naředěný) napipetován třikrát. Jako pozitivní kontrola i zde sloužil 100× zředěný vzorek DNA čínského křečka a jako negativní kontrola demineralizovaná voda. Ze záznamu z real-time PCR jsme pak mohli vyhodnotit pomocí hodnot Ct a z již hotové kalibrační křivky, jaké množství DNA se nachází v jednotlivých vzorcích proteinů.

6.4 Detekce lidské DNA

Navíc oproti cílům diplomové práce, jsme začali pracovat na metodě, která detekuje pouze lidskou DNA.

Metoda využívá primery cílicí na Alu repetitivní sekvence v lidské DNA, zde se ovšem jedná o jinou sekvenci Alu než u detekce čínského křečka (detekční systém I). Tyto sekvence se vyskytují s více než 10^6 kopií na genom. Z tohoto důvodu je metoda velice citlivá a vhodná pro detekci zbytkové DNA. Případné výsledky jsme chtěli využít pro porovnání metody pro detekci zbytkové křeččí DNA.

Nejdříve byla testována detekce na DNA izolované z lidských buněk K562 a z lidského bukálního stěru za využití gb SG PCR Master Mixu s obsahem interkalačního barviva. Detekce byla dále doplněna analýzou teploty tání pro kontrolu specifického cílení primerů.

Pro ověření linearity, limitu detekce a rozsahu metody byly proměřeny dvě koncentrační řady DNA izolované z lidských buněk K562, jejichž původní koncentrace byly 1 ng/μl

a 326,3 ng/μl. Izoláty byly ředěny demineralizovanou vodou desítkovým ředěním v rozsahu 1×10^{-2} ng/μl až 1×10^{-12} ng/μl a 3,263 ng/μl až $3,263 \times 10^{-8}$ ng/μl. Po dokončení reakce byly stanoveny z hodnot Ct parametry linearity, limit detekce a rozsah metody.

Mezi další experiment jsme zahrnuli aplikaci metody pro detekci reziduální DNA v rekombinantních proteinech. Jednalo se o stejné proteiny, které byly použity u detekce DNA čínské křečka – systém II (viz kapitola 7.3.2.10 Testování metody na reálných vzorcích). Do reakce byly aplikovány opět v nezředěném stavu, $100 \times$ a $10\,000 \times$ zředěné. Ovšem u těchto proteinů není předpokládána kontaminace lidskou DNA, jelikož se jedná o proteiny produkované v CHO buňkách. Možná kontaminace lidskou DNA, ke které by mohlo dojít během manipulace s proteiny, bude analyzována na základě výsledků Ct a za pomoci kalibrační křivky, která byla zhotovena v předešlém experimentu.

6.4.1 Parametry metody pro detekci lidské DNA

Jak již bylo výše uvedeno, metoda je navržena tak, aby detekovala pouze repetitivní sekvence Alu obsažené v lidském genomu. Primery, které během PCR reakce nasedají na tyto Alu elementy, jsou uvedeny v tabulce 7, kde si lze prohlédnout jejich sekvenci.

Tabulka 7: Sekvence primerů pro metodu detekce lidské DNA.

Název	Primery (5'-3')
hAlu-YB8F	CGAGGCGGGTGGATCATGAGGT
hAlu-YB8R	TCTGTGCGCCAGGCCGGACT

Teplotní profil a složení reakční směsi bylo opět optimalizováno v rámci diplomové práce v podobném rozsahu jako u předešlých metod.

Do reakční směsi je použit master mix s obsahem interkalačního barviva SYBR Green gb SG PCR Master Mix a koncentrace uvedených primerů je v reakci 0,65 μM. Složení reakční směsi je tedy následující:

6 μl	vzorek (templátová DNA)
10 μl	gb SG PCR Master Mix
0,26 μl	směs primerů (0,65 μM)
Do 20 μl	demineralizovaná voda

Teplotní profil amplifikační reakce je uveden v tabulce 8. Zde je první teplota denaturační při 95 °C po dobu 3 minut, následuje 50 cyklů opakujících kroků: denaturace (94 °C, 30 sekund), annealing (55 °C, 30 sekund) a elongace (72 °C, 30 sekund). Teplotní profil je doplněn o melting analýzu tedy analýzu pro teplotu tání, která probíhá po dobu 5 minut, kdy teplota začíná na 72 °C a každých 5 sekund se teplota zvedá o 0,2 °C až ke konečné teplotě 95 °C.

Tabulka 8: Amplifikační teplotní profil reakce pro metodu detekce lidské DNA.

Teplotní profil pro metodu detekce lidské DNA		
Teplota	Čas	Počet cyklů
95 °C	3 min	1
94 °C	30 s	50
55 °C	30 s	
72 °C	30 s	
Analýza teploty tání		
72 °C	5 min	

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

V následujících kapitolách budou shrnuty veškeré výsledky a parametry metody pro detekci křeččí DNA (detekčního systému I i II). V poslední kapitole budou porovnány výkonnostní parametry metody s metodou pro detekci lidské DNA.

7.1 Detekce DNA čínské křečka – systém I

Provedli jsme optimalizaci detekční metody pro detekci zbytkové křeččí DNA založené na real-time PCR, která vycházela ze studie dle Hussain [40].

Koncentrace primerů v reakci byla tedy 10 μM a koncentrace sondy činila 2,5 μM .

Finální složení reakční směsi:

2 μl	vzorek
9 μl	gb Basic Master Mix
3,2 μl	směs PCR primerů (10 μM)
0,45 μl	sonda (2,5 μM)
Do 20 μl	demineralizovaná voda

Na základě provedených experimentů jsme optimalizovali teplotní profil reakce, který je uveden v tabulce 9.

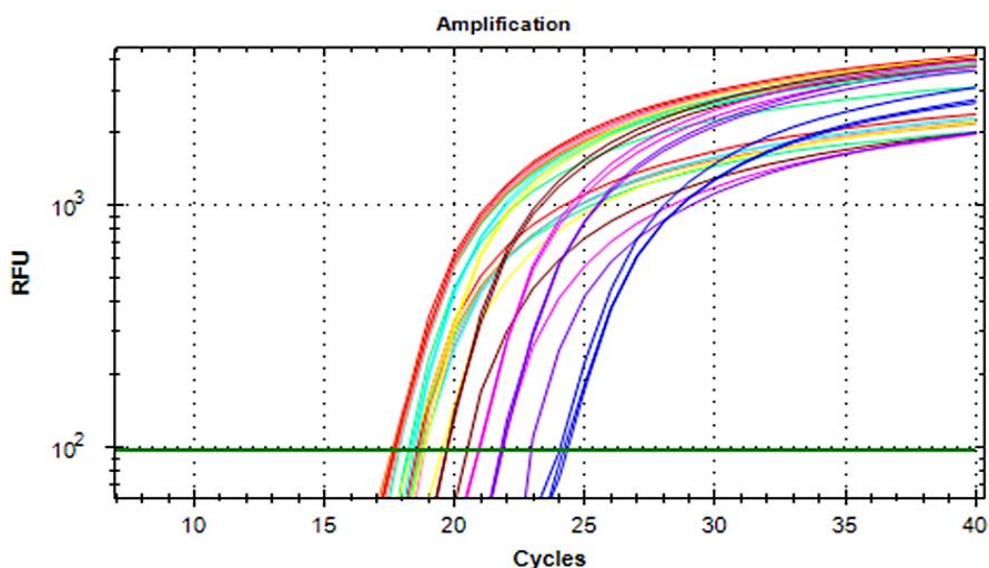
Tabulka 9: Amplifikační teplotní profil reakce pro detekci křeččí DNA – systém I.

Teplotní profil pro detekci křeččí DNA – systém I		
Teplota	Čas	Počet cyklů
95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	40
62 °C	45 s	

Optimalizovaný teplotní profil byl výrazně zkrácen oproti původnímu, aniž bychom pozorovali změny v detekci. Po této optimalizaci je možné celou PCR reakci provést v čase přibližně jedné hodiny.

Složení reakční směsi prošlo také optimalizací. Je zde ovšem ještě místo pro navýšení množství vzorku. Dle našich zkušeností a v závislosti na povaze vzorku potom může docházet k inhibici PCR. Proto jsme nakonec zvolili jako optimální množství vzorku 1/10 celkového objemu reakce.

Po optimalizaci PCR reakce jsme provedli validaci jednotlivých parametrů. Prvním parametrem byla specifita metody. Při testování tohoto parametru, za použití DNA izolované z různých organismů, jsme zjistili, že detekční systém I detekuje nejen DNA pocházející z čínského křečka, ale i DNA pocházející z dalších hlodavců jako je myš (NIH3T3) či potkan (WBF 344), což vyvrací tvrzení z původní studie dle Hussain [40], ze které jsme vycházeli při návrhu této metody, kde je slibována právě specifická detekce DNA čínského křečka. Ačkoliv se tento detekční systém zdá být nespecifický, má stále svou aplikaci. V případě, kdy by byl produkován v CHO buňkách terapeutický protein, nepředpokládá se kontaminace jiným hlodavcem. Cílem je tedy, aby ve finálním léčivu nebyla žádná DNA. Z těchto důvodů jsme se rozhodli validaci detekčního systému I rozšířit o další příbuzné druhy – hlodavce (myš a potkan).

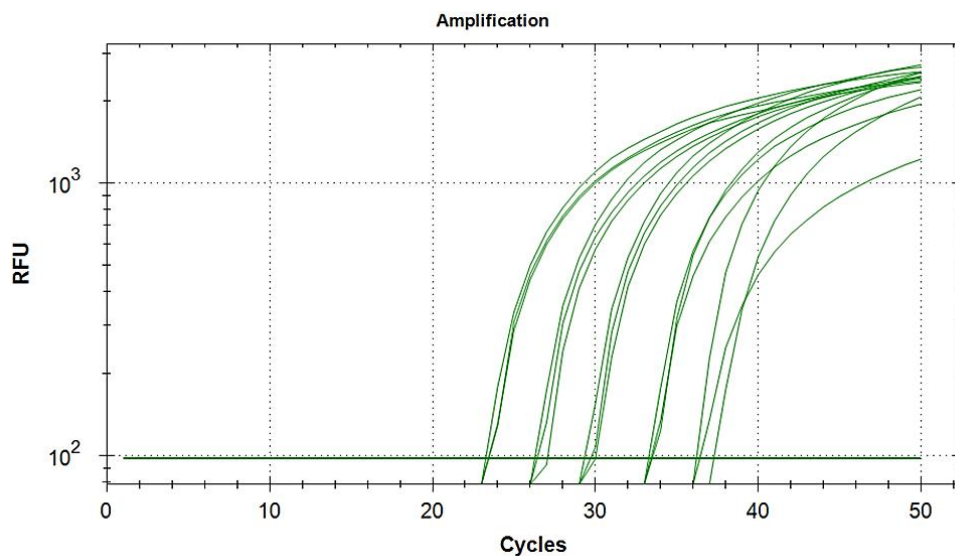


Obrázek 13: Záznam z real-time cykléru CFX z analýzy selektivity detekce křeččí DNA – systém I, analyzované směsi DNA – poměr křeččí DNA/lidská DNA: 100/0, 99/1, 95/5, 90/10, 75/25, 50/50, 25/75, 10/90, 5/95, 1/99, 0/100.

V rámci testování parametru selektivity, kde byl vzorek DNA čínského křečka postupně ředěn lidskou DNA, jsme hodnotili, jak je metoda schopná stanovit specifickou DNA a to v přítomnosti jiných rušivých látek. Ze záznamu z real-time cykléru CFX (viz obrázek 13) lze vidět, že i u nejzřednějšího vzorku, tedy u vzorku kde byla křeččí DNA zředěna 99× lidskou DNA, jsme získali signál pouze pro DNA čínského křečka. Na základě tohoto výsledku lze tedy

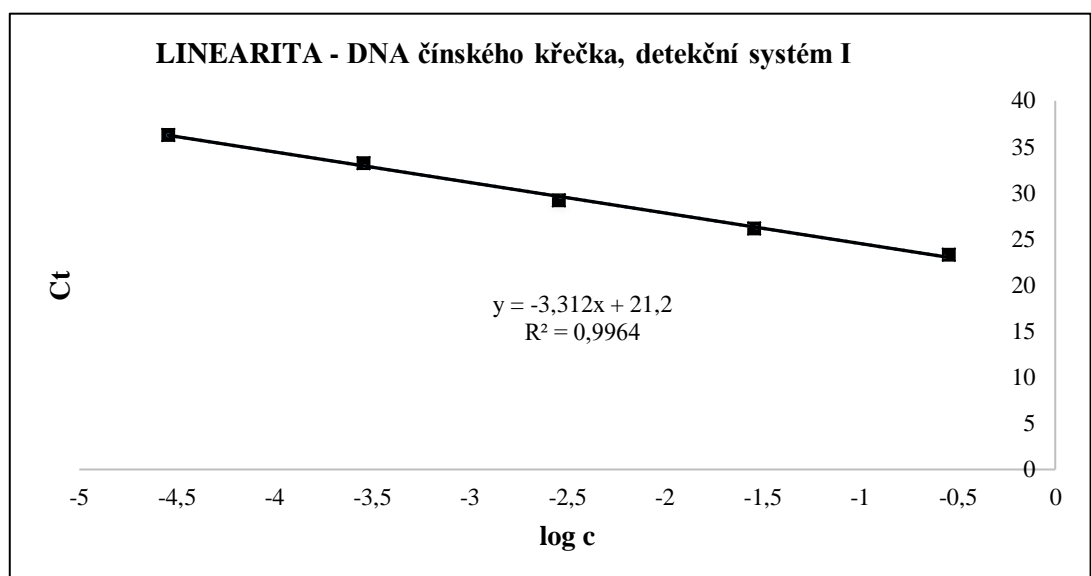
řící, že je testovaná metoda schopna nezkresleně detekovat specifickou DNA i v prostředí dalších látek.

V případě linearity jsme zhotovili kalibrační řady o různých koncentracích DNA čínské křečka, myši a také potkana. Záznam kalibračních bodů z CFX cykléru použitých v případě křeččí DNA lze vidět v obrázku 14. Na základě získaných hodnot z cykléru jsme vytvořili kalibrační grafy (viz graf 1, 2 a 3). Do grafů jsme vynesli hodnoty Ct v závislosti na logaritmu koncentrace dané genomové DNA. Dle rovnice regrese jsme tak mohli získat uvedené parametry.



Obrázek 14: Záznam z real-time cykléru CFX z analýzy linearity pro detekci křeččí DNA – systém I, analyzovaný rozsah koncentrací: 2,85 ng/μl až 0,285 fg/μl, detekční systém I.

Graf 1: Bodový graf pro zobrazení – linearity detekčního systému I pro DNA čínské křečka. Závislost odezvy (hodnota Ct) na logaritmu koncentrace.



R²: 0,9964

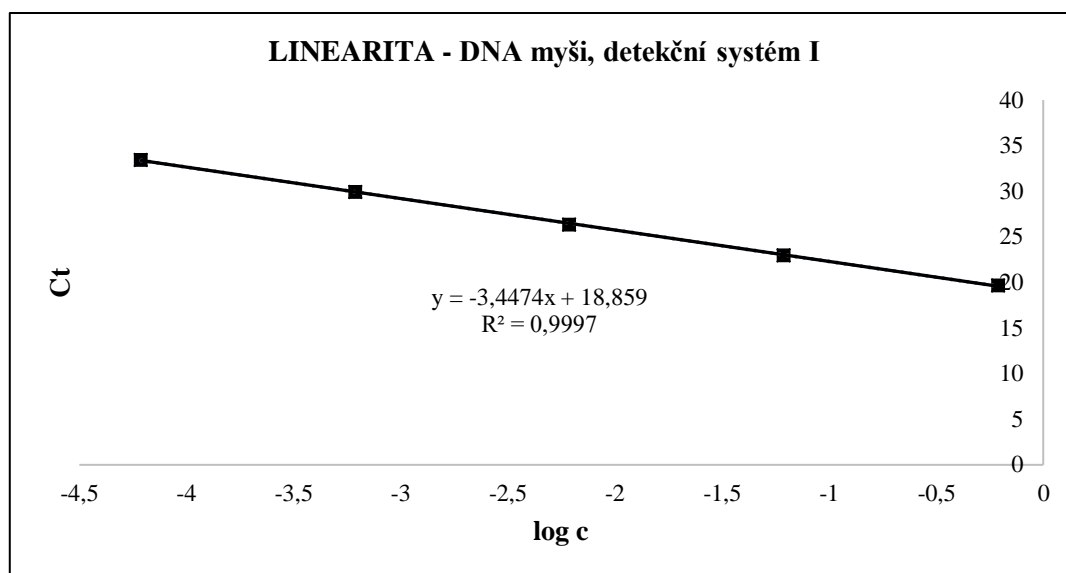
Směrnice přímky: -3,312

Intercept: 21,2

Rovnice: $y = -3,312x + 21,2$

Efektivita amplifikace (E): 2,004

Graf 2: Bodový graf pro zobrazení – linearity detekčního systému I pro DNA myši. Závislost odezvy (hodnota Ct) na logaritmu koncentrace.



R²: 0,9997

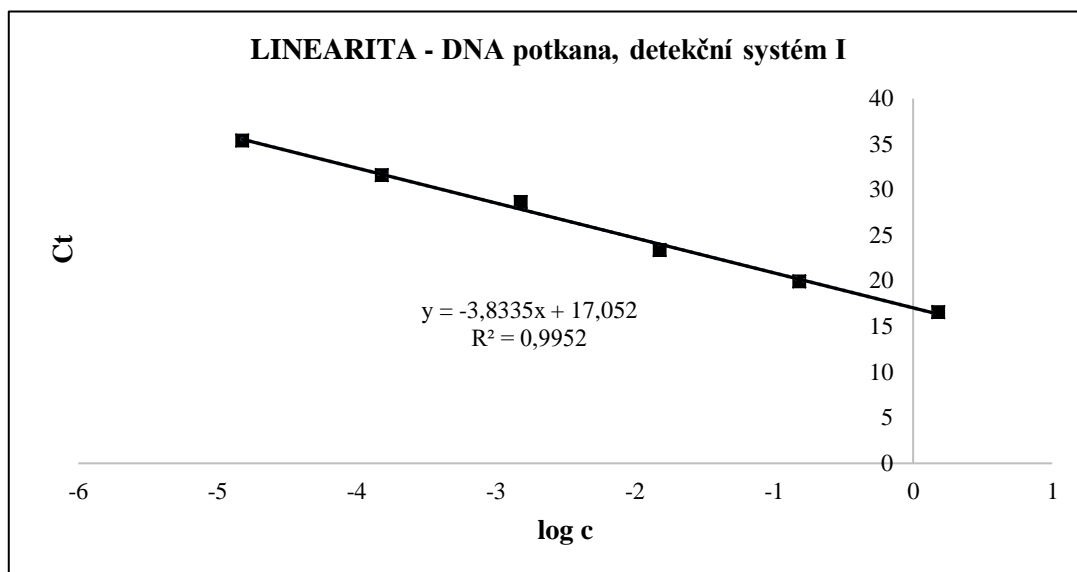
Směrnice přímky: -3,4474

Intercept: 18,859

Rovnice: $y = -3,4474x + 18,859$

E: 1,95

Graf 3: Bodový graf pro zobrazení – linearity detekčního systému I pro DNA potkana. Závislost odezvy (hodnota Ct) na logaritmu koncentrace.



R²: 0,9952

Směrnice přímky: -3,8335

Intercept: 17,052

Rovnice: $y = -3,8335x + 17,052$

E: 1,82

Na základě tohoto experimentu byly stanoveny rozsahy metod. Pro DNA čínského křečka je rozsah metody v rozmezí $0,57 - 5,7 \times 10^{-5}$ ng, pro DNA myši $1,23 - 2,46 \times 10^{-4}$ ng a pro DNA potkana $3,01 - 3,01 \times 10^{-6}$ ng.

Pro vyhodnocení preciznosti za podmínek opakovatelnosti byly proměřeny vzorky v deseti opakováních jedné koncentrační hladiny. Následně byla z průměru hodnot Ct vypočítána směrodatná odchylka a dále vypočítán variační koeficient, jehož hodnota byla stanovena na 2,5 %.

Při stanovení meze detekce a kvantifikace byly vytvořeny různé koncentrační hladiny DNA izolované z uvedených hlodavců (čínský křeček, myš, potkan) a hledali jsme nejnížší množství DNA, kterou je detekční systém I schopen ještě zachytit. LOD pro křeččí DNA odpovídá hodnotě $5,7 \times 10^{-5}$ ng, pro DNA myši byl LOD stanoven na $2,46 \times 10^{-4}$ ng a pro DNA potkana $3,01 \times 10^{-6}$ ng. Pokud bychom tyto výsledky porovnali s původní studií, LOD, který je

zde uveden, odpovídá hodnotě 5×10^{-6} ng. Ačkoliv se náš LOD, jehož jsme dosáhli u křeččí DNA, neshoduje s touto koncentrační hladinou, je pouze o jeden stupeň vyšší. Nižších hodnot by bylo jistě možno dosáhnout při použití plazmidové DNA jako standardu. Naším cílem bylo také, aby testovaná metoda splňovala limitní hodnoty detekce stanovené organizacemi FDA, WHO a EU, což se nám podařilo. Meze kvantifikace byly stanoveny shodně s hodnotami LOD u všech tří hlodavců.

Detekční systém I byl dále vyzkoušen na reálných vzorcích. Zde jsme použili dva rekombinantní proteiny, které byly produkovány v CHO buňkách. První protein nebyl purifikovaný (270046004) a druhý již purifikovaný byl (rhSHBG 00116). Hodnotili jsme, zda metoda dokáže měřit množství v takovýchto vzorcích a také nás samozřejmě zajímalo, jaké množství reziduální DNA se v nich nachází. Z naměřených hodnot jsme získali jednotlivé hodnoty Ct, ze kterých jsme za pomoci kalibrační řady byly schopni vypočítat dané koncentrace. V následující tabulce 10 si lze prohlédnout množství DNA v obou proteinech v různých ředěních. V nezředěných vzorcích proteinů bylo naměřeno opravdu velké množství reziduální DNA, zvláště u nepurifikovaného proteinu. Při porovnání těchto hodnot s mezními hodnotami reziduální DNA stanovené organizacemi FDA, WHO a EU (FDA: 0,1 ng; WHO a EU: 10 ng/dávka), jsme zjistili, že naměřené množství reziduální DNA nezředěného vzorku proteinu 270046004 je příliš vysoké a pro terapeutické využití je tak tento protein v nezředěném stavu nevhodný, zatímco u proteinu rhSHBG 00116 je toto množství přijatelné pro terapeutické využití pouze z pohledu FDA. Zředěné vzorky proteinu by již mohly být použity jako terapeutikum, zejména tedy vzorky purifikovaného proteinu.

Tabulka 10: Naměřené množství reziduální DNA čínské křečka ve vzorcích jednotlivých proteinů pomocí detekčního systému I.

Naměřené množství reziduální DNA ve vzorcích jednotlivých proteinů		
Identifikační číslo proteinu	Ředění proteinu	Množství reziduální DNA (ng)
270046004 (nepurifikovaný protein)	Nezředěný	124,31
	100× zředěný	2,925
	10 000× zředěný	$3,27 \times 10^{-2}$
rhSHBG 00116 (purifikovaný protein)	Nezředěný	6,3
	100× zředěný	$7,63 \times 10^{-3}$
	10 000× zředěný	$1,11 \times 10^{-4}$

7.2 Detekce DNA čínského křečka – systém II

Jelikož jsme zjistili, že systém I byl schopen zachytit nejen DNA čínského křečka ale i další hlodavce, čímž se tak jedná o nespecifickou detekci, rozhodli jsme se testovat nově navržený detekční systém (detekční systém II) pro detekci DNA čínského křečka se záměrem získat specifickou metodu, která by detekovala pouze DNA z buněk CHO. Provedli jsme optimalizaci PCR reakce včetně návrhu sondy s následnou validací metody.

Prvním bodem bylo ověření funkčnosti navržených primerů jednoduchou nespecifickou detekcí za využití barviva SYBR Green. Jelikož docházelo k minoritní detekci i jiných druhů hlodavců, byla navržena hydrolyzační sonda, pro zvýšení specifity detekce (více níže). Po ověření funkčnosti tohoto systému jsme přistoupili k dalšímu bodu, kterým je optimalizace PCR reakce.

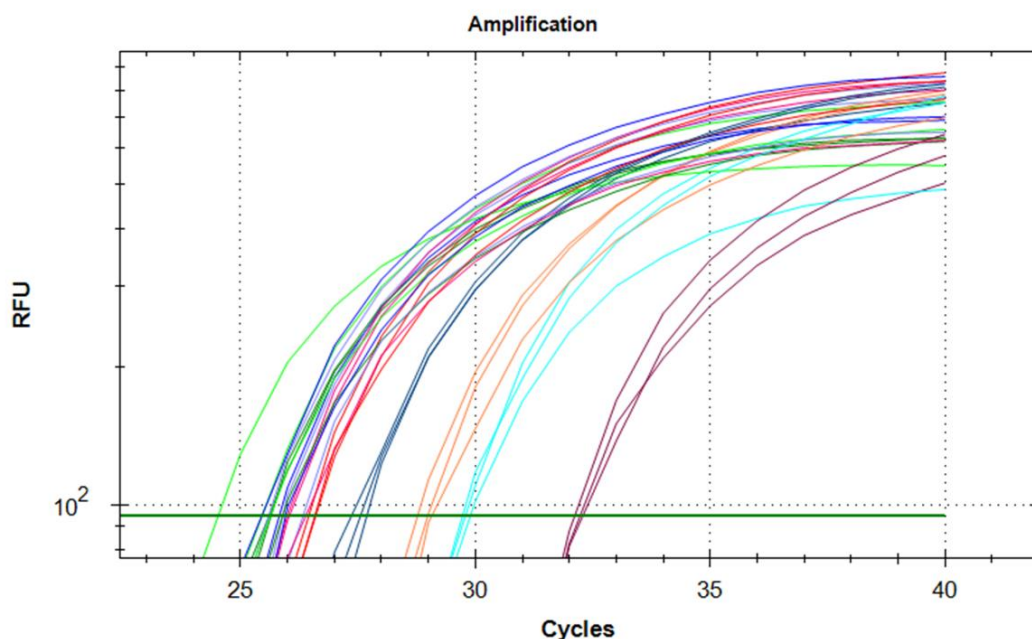
Zde bylo nutné provést optimalizaci koncentrace primerů a hydrolyzační sondy. Testované rozmezí koncentrací primerů i sondy bylo 0,1 – 0,4 μM . V našem experimentu jsme tedy použili celkem 16 master mixů s rozdílně nakombinovanými koncentracemi primerů a sondy. Na základě výsledků jsme jako nejoptimálnější koncentraci primerů zvolili 0,3 μM a hydrolyzační sondy 0,4 μM . Jako master mix jsme použili komerčně vyráběný firmou Generi Biotech – gb Elite PCR Master Mix, který již obsahoval optimalizované komponenty pro PCR reakci.

Finální složení reakce je následující:

2 μl	vzorek
9 μl	gb Elite Master Mixu
1,08 μl	směs primerů (0,3 μM)
0,72 μl	sonda (0,4 μM)
Do 20 μl	demineralizovaná voda

Při sestavení teplotního profilu jsme použili teplotní profil z původního článku dle Nissom [46], který si lze prohlédnout v tabulce 6. Teplotní profil nebylo již třeba nadále optimalizovat, jelikož nám poskytoval dobré výsledky.

Specifičnost metody byla jedním z testovaných validačních parametrů v detekčním systému II. Cílem bylo tedy analyzovat, zda je metoda schopná specificky detekovat křeččí DNA či nikoliv. Pro tento test jsme použili opět vzorky DNA izolované z různých organismů a zjistili jsme, že metoda detekovala DNA čínského křečka, ale i DNA potkana. Jak již bylo uvedeno výše, díky tomuto výsledku jsme se rozhodli zkusit zvýšit specifičnost metody navržením hydrolyzační sondy. Po další analýze tentokrát i s přítomností sondy, detekční systém II byl schopen stanovit pouze DNA čínského křečka, čímž jsme tedy získali zcela specifickou detekci.

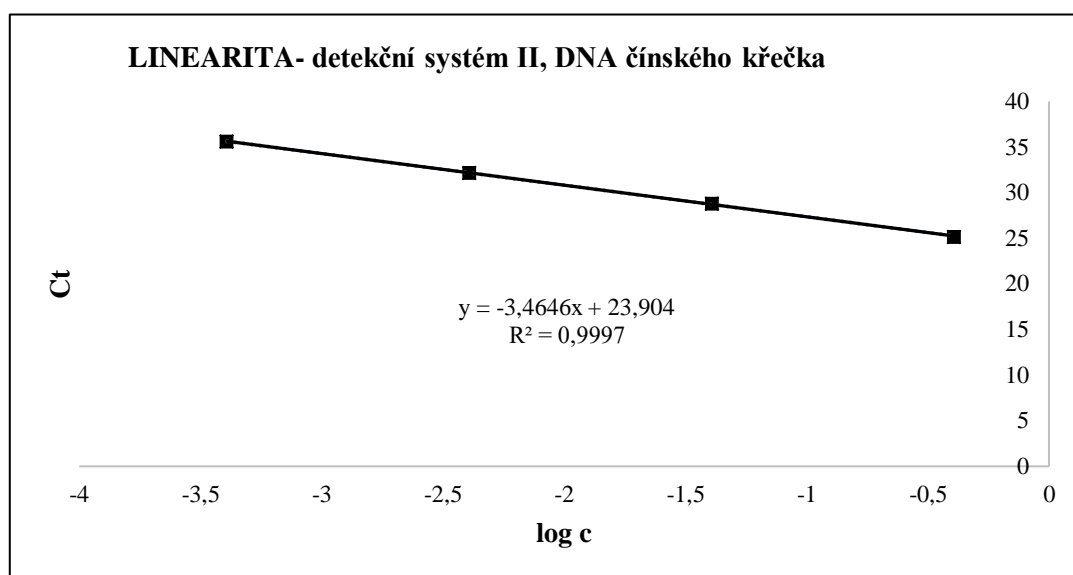


Obrázek 15: Záznam z real-time cykléru CFX z analýzy selektivity pro detekci křeččí DNA – systém II, analyzované směsi DNA – poměr křeččí DNA/lidská DNA: 100/0, 99/1, 95/5, 90/10, 75/25, 50/50, 25/75, 10/90, 5/95, 1/99, 0/100.

Jako u předešlého detekčního systému I jsme stanovovali selektivitu metody, přitom jsme hodnotili stejné parametry. Experiment byl připraven shodným způsobem a to tedy tím, že jsme analyzovali postupně zředěné vzorky DNA čínského křečka pomocí lidské DNA. Z výsledků bylo zjevné, jak lze vidět na obrázku 15, že detekční systém II je schopen detekovat pouze křeččí DNA v přítomnosti dalších potencionálně rušivých látek a to i u vzorku, kde byla DNA čínského křečka 99× zředěna lidskou DNA. Lze tak říci, že metoda vykazuje vysoký stupeň selektivity.

Pro validační parametr linearita byla zhotovena kalibrační řada s klesajícím množstvím koncentrace DNA čínského křečka. Poté byl vytvořen graf kalibrační přímky (viz graf 4), ze kterých byly stanoveny následující hodnoty:

Graf 4: Bodový graf pro zobrazení – linearity detekčního systému II DNA čínského křečka. Závislost odezvy (hodnota Ct) na logaritmu koncentrace.



R²: 0,9997

Směrnice přímky: -3,4646

Intercept: 23,904

Rovnice: $y = -3,4646x + 23,904$

E: 1,94

Rozsah metody detekčního systému II byl stanoven v rozmezí množství DNA z CHO buněk od 0,814 ng do $8,14 \times 10^{-4}$ ng.

Parametr preciznost za podmínek opakovatelnosti jsme vyhodnocovali obdobným způsobem jako u systému I. Po proměření vzorků jedné koncentrační hladiny v deseti opakováních (aplikovány vždy v triplikátech) jsme z průměru hodnot Ct vypočítali SD a následně CV. Hodnota CV je rovna 1,4 %.

Dalším testovaným parametrem byla mez detekce, kde jsme hledali nejnížší detekovatelnou hladinu koncentrace DNA čínského křečka. K tomuto experimentu byly připraveny vzorky v širokém rozmezí koncentrací DNA čínského křečka. LOD byl poté stanoven na $8,14 \times 10^{-4}$ ng. Tento LOD opět splňuje podmínky o mezních hodnotách reziduální DNA dané organizacemi FDA, WHO a EU. Při porovnání našeho výsledku s LOD, kterého dosáhli vědci v původní studii dle Nissom [46], kde jejich LOD je roven $4,34 \times 10^{-4}$ ng, což je

hodnota velmi podobná té naší a lze tedy říci, že jsme docílili stejné citlivosti detekčního systému. Hodnota LOQ byla opět shodná s hodnotou LOD.

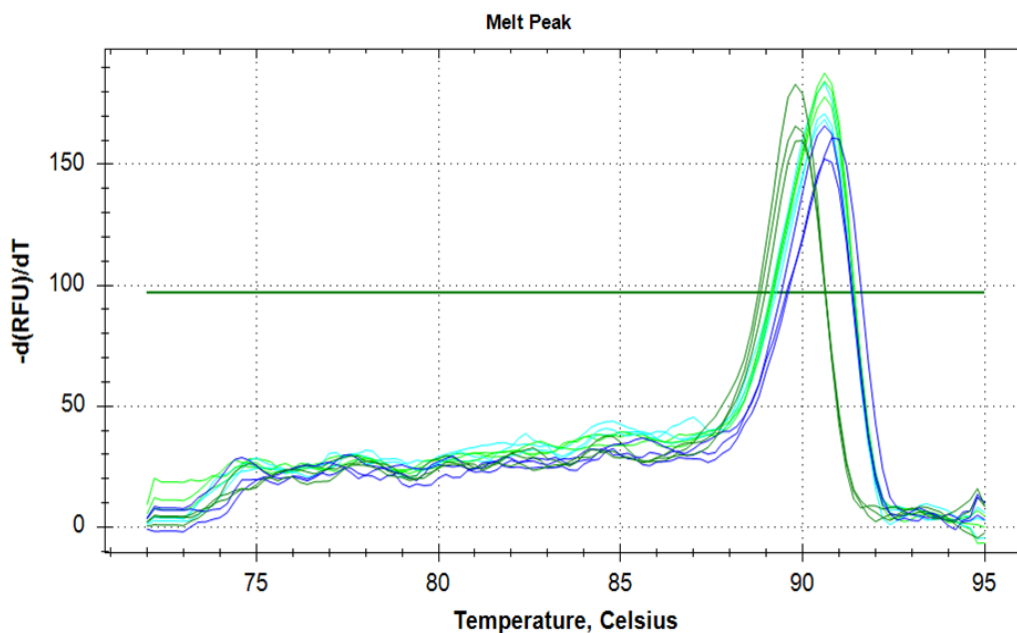
Detekční systém II jsme také vyzkoušeli testovat na skutečných vzorcích. Použili jsme dva vzorky proteinu (s identifikačními čísly 270160004 a 270160005), ale na rozdíl od předešlého systému I, jsou oba tyto proteiny již purifikovány. Oba rekombinantní proteiny byly vyprodukovány v CHO buňkách. Pro analýzu jsme aplikovali proteiny nezředěné, poté $100\times$ a $10\,000\times$ zředěné. Následně jsme z hodnot Ct pomocí kalibrační řady vypočítali množství reziduální DNA z buněk CHO (tedy DNA čínského křečka) v jednotlivých proteinech. U proteinu s identifikačním číslem 270160004 bylo zaznamenáno určité množství reziduální DNA pouze u nezředěného vzorku. Toto množství bylo vypočítáno na $2,74\times 10^{-3}$ ng, což je hodnota v mezích hodnot schválenými organizacemi FDA, WHO a EU. U druhého vzorku proteinu již nebylo detekováno žádné množství reziduální DNA a lze tak říci, že množství DNA je ještě nižší než LOD detekčního systému II, z tohoto důvodu tak lze oba proteiny použít pro terapeutické účely.

7.3 Detekce lidské DNA

Po validaci metody pro detekci křeččí DNA byly oba detekční systémy porovnány s rozpracovanou metodou pro detekci lidské DNA, která by měla představovat velice citlivou metodu pro stanovení reziduální lidské DNA.

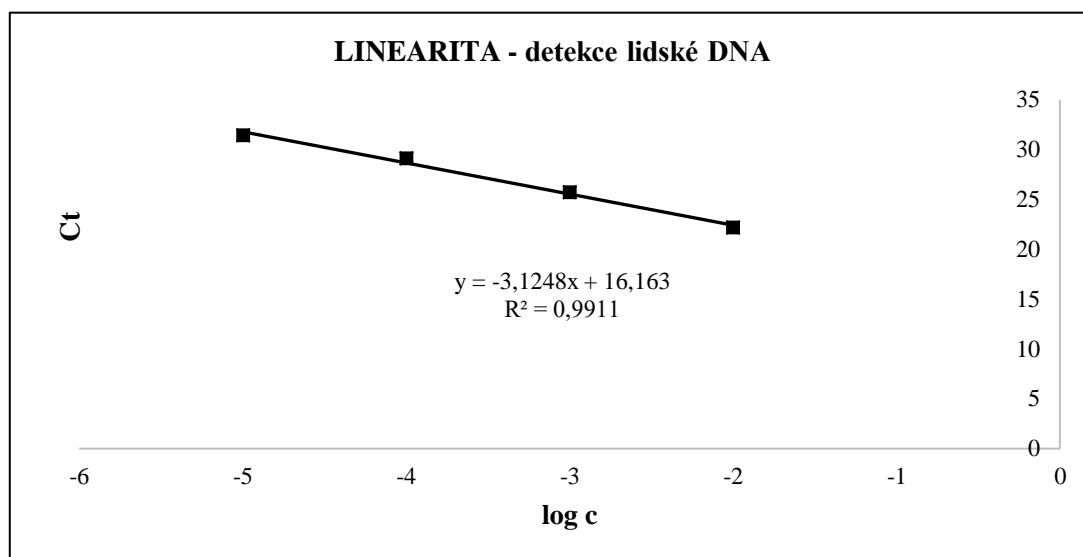
V prvních experimentech jsme testovali tuto metodu právě na detekci lidské DNA izolované z buněk K562 a z lidského bukalního stěru, kde jsme zároveň mohli pozorovat pomocí analýzy křivky tání, zda nevznikají v průběhu PCR reakce nespecifické produkty. Křivku tání lze vidět níže na obrázku 16, jedná se o závislost záporně vzaté derivace fluorescence dle teploty na teplotě. Jelikož zde není více vrcholů, můžeme reakci považovat za specifickou.

Pro experiment testující linearitu metody byly proměřeny kalibrační řady lidské DNA. Dle výsledků byly opět, jako u metody detekující křeččí DNA zhotoveny kalibrační grafy vynesáním logaritmu koncentrací lidské DNA v závislosti na hodnotách Ct (viz grafy 5 a 6) s následujícími parametry kalibračních křivek.



Obrázek 16: Záznam z real-time cykléru CFX z analýzy křivky tání pro metodu detekující lidskou DNA, jako závislost záporně vzaté derivace fluorescence na teplotě.

Graf 5: První bodový graf pro zobrazení – linearity metody pro detekci lidské DNA (výchozí koncentrace 1 ng/μl). Závislost odezvy (hodnota Ct) na logaritmu koncentrace.



R²: 0,9911

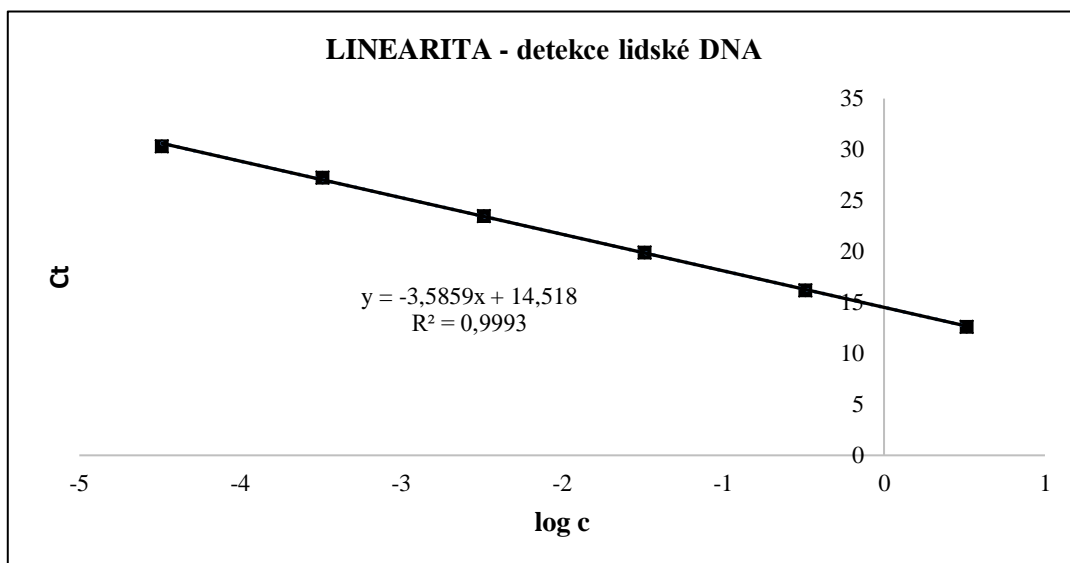
Směrnice přímky: -3,1248

Intercept: 16,163

Rovnice: $y = -3,1248x + 16,163$

E: 2,089

Graf 6: Druhý bodový graf pro zobrazení – linearity metody pro detekci lidské DNA (výchozí koncentrace 326,3 ng/μl). Závislost odezvy (hodnota Ct) na logaritmu koncentrace.



R²: 0,9993

Směrnice přímky: -3,5859

Intercept: 14,518

Rovnice: $y = -3,5859x + 14,518$

E: 1,9

Při porovnání linearit v předešlých detekčních systémech lze vidět, že obě metody, jak metoda pro detekci křeččí DNA, tak metoda pro detekci lidské DNA, vykazují vysoký stupeň korelace, což lze soudit na základě uvedených hodnot Pearsonova korelačního koeficientu – R². Účinnost amplifikace – E se u obou metod pohybuje v akceptovatelném rozmezí.

Dále zde byly stanoveny rozsahy metody, které byly tedy $6 \times 10^{-2} - 6 \times 10^{-5}$ ng u první použité kalibrační řady, kde byla výchozí koncentrace DNA 1 ng/μl. U druhé kalibrační řady s výchozí koncentrací lidské DNA 326,3 ng/μl byl rozsah stanoven na $0,958 - 19,58 \times 10^{-6}$ ng. Opět při porovnání s metodou pro detekci křeččí DNA lze vypožorovat, že rozsahy metody u detekčního systému I jsou řádově shodné s těmito uvedenými hodnotami. Detekční systém II ovšem těmito hodnotám nedosahuje, jeho rozsah je o řád vyšší.

Limity detekce byly u této metody stanoveny na 6×10^{-5} a $1,958 \times 10^{-6}$ ng. Těmito hodnotám se řádově rovnaly pouze limity detekce detekčního systému I u stanoveného LOD

čínského křečka a potkana. Ostatní limity detekce a to i u detekčního systému II byly o jeden či dva řády vyšší a lze tak v těchto případech tuto metodu považovat za citlivější.

Posledním experimentem, který jsme provedli, bylo testování, zda se v rekombinantních proteinech připravované v CHO buňkách vyskytuje reziduální lidská DNA. Použity byly purifikované proteiny s identifikačními čísly 270160004 a 270160005, které byly do reakce jako v ostatních experimentech aplikovány nezředěné, 100× a 10 000× zředěné. Dle záznamu z cykléru jsme nezískali žádný signál, což znamená, že jsou proteiny buď bez jakékoliv kontaminující lidské DNA, nebo reziduální množství DNA je tak malé, že je menší než limit detekce této metody a je tak akceptovatelné pro další terapeutické využití proteinů.

8 ZÁVĚR

V této diplomové práci jsme se na základě provedené rešerše zabývali optimalizací a validací metody pro detekci kontaminující DNA, jelikož detekce cizorodých látek včetně DNA je ve farmaceutickém průmyslu velmi důležitou analýzou. V našem případě jsme se zaměřili na detekci zbytkové DNA pocházející z CHO buněk (tedy DNA čínského křečka) založené na metodě real-time PCR. Pro tuto metodu byly navrženy a optimalizovány dva detekční systémy (systémy s označením I a II).

Dle rešerše lze konstatovat, že CHO buňky jsou v současné době velmi oblíbeným produkčním systémem pro výrobu lidských rekombinantních proteinů, které mohou být následně použity jako terapeutikum a to i v součinnosti s genovou terapií či jako její doplněk. Lze tak i říci, že tento druh kontaminující DNA patří mezi nejčastěji poptávané analýzy pro detekci reziduální DNA.

V případě detekčního systému I se na základě dosažených výsledků jedná o nespecifickou detekci. Systém detekuje nejen DNA čínského křečka, ale i DNA ostatních hlodavců – myši a potkana. Nedetekuje ovšem DNA jiných druhů, což je důležitý fakt a i přesto lze systém I použít pro detekci reziduální DNA, pokud nám jde o to, aby ve finálním léčivu nebyla žádná cizorodá DNA. Detekční systém I je navržen tak, aby cílil na repetitivní sekvence Alu. Jelikož se tato sekvence vyskytuje v genomu ve více kopiích, limit detekce je tak logicky nižší než u detekčního systému II.

Detekční systém II naopak stanovuje již specificky pouze DNA čínského křečka, protože je tento systém konstruován, aby detekoval specifickou sekvenci genomové DNA čínského křečka s minimální homologií vůči ostatním hlodavců. V porovnání s detekčním systémem I, systém II má ale o řád vyšší detekční limit. Ovšem detekční limity u obou systémů jsou v rámci mezních hodnot reziduální DNA stanovené FDA, WHO a EU, tedy plně dostačující.

Pokud by byl do budoucna kladen důraz na ještě nižší detekční limit, bylo by potřeba optimalizovat reakční směs buď zvýšením objemu vstupního vzorku či přidáním aditiv. Zvýšením objemu vzorku by ovšem mohlo, v závislosti na testovaném vzorku, docházet k inhibici PCR reakci a byla by tak nutná validace pro každou testovanou matici.

Nad rámec diplomové práce byla dále rozpracována metoda pro detekci zbytkové lidské DNA, cílící na repetitivní sekvence Alu. Tato metoda ještě vyžaduje optimalizaci a dokončení validace, než bude moci být zavedena do praxe. Oba detekční systémy pro detekci křeččí DNA byly s touto metodou porovnány. Přičemž detekční limit, jakého bylo dosaženo u metody pro detekci lidské DNA, se řádově shoduje s detekčním systémem I.

Závěrem lze konstatovat, že cíle diplomové práce byly splněny a výsledky této práce mají jistý praktický aspekt, jelikož je do budoucna plánováno zavedení všech zmíněných metod do běžné praxe v laboratořích firmy Generi Biotech.

SEZNAM ZDROJŮ

- [1] DRAŠAR, L. a M. LEDVINA. Genová terapie: kationové lipidy pro konstrukci nevirálních vektorů nukleových kyselin. *Chemické listy*. 2012, **106**, 646-652.
- [2] KLENER, P. a P. KLENER. Principy systémové protinádorové léčby. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4171-0.
- [3] BAUM, B. J. Gene therapy. *Oral Diseases*. 2014, **20**(2), 115-118.
- [4] KAUFMANN, K. B., H. BÜNING, A. GALY, A. SCHAMBACH a M. GREZ. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med*. 2013, **5**(11), 1642–1661.
- [5] GINN, S. L., A. K. AMAYA, I. E. ALEXANDER, M. EDELSTEIN a M. R. ABEDI. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *The Journal of Gene Medicine*. 2018, **20**(5), 1-51.
- [6] WANG, D. a G. GAO. State-of-the-art human gene therapy: Part I. gene delivery technologies. *Discovery Medicine*. 2014, **18**(97), 67-77.
- [7] AL-DOSARI, M. S. a X. GAO. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *The AAPS Journal*. 2009, **11**(4), 671-681.
- [8] RAMAMOORTH, M. a A. NARVEKAR. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015, **9**(1), 1-6.
- [9] VANNUCCI, L., M. LAI, F. CHIUPPESI, L. CECCHERINI-NELLI a M. PISTELLO. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiologica*. 2013, **36**, 1-22.
- [10] BOUARD, D., N. ALAZARD-DANY a F. - L. COSSET. Viral vectors: from virology to transgene expression. *British Journal of Pharmacology*. 2009, **157**(2), 153-165.
- [11] WARNOCK, J. N., C. DAIGRE a M. AL-RUBEAI. Introduction to Viral Vectors. *Viral Vectors for Gene Therapy*. 2011, **737**, 1-25.

- [12] LEE, C. S., E. S. BISHOP, R. ZHANG, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases*. 2017, **4**(2), 43-63
- [13] RANKI, T., S. PESONEN, A. HEMMINKI, et al. Phase I study with ONCOS-102 for the treatment of solid tumors – an evaluation of clinical response and exploratory analyses of immune markers. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2016, **4**(1), 1-18.
- [14] VEMULA, S. V a S. K MITTAL. Production of adenovirus vectors and their use as a delivery system for influenza vaccines. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2010, **10**(10), 1469-1487.
- [15] CLÉMENT, N. a J. C. GRIEGER. Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development*. 2016, **3**, 1-7.
- [16] KOTTERMAN, M. A., T. W. CHALBERG a D. V. SCHAFFER. Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2015, **17**(1), 63-89.
- [17] TOMÁS H. A., RODRIGUES A. F., ALVES P. M. a COROADINHA A. S. Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges and Future Directions. *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*. 2013, 287-317.
- [18] ESCORS, D. a K. BRECKPOT. Lentiviral Vectors in Gene Therapy: Their Current Status and Future Potential. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2010, **58**(2), 107-119
- [19] RODRIGUES, A., P. M. ALVES a A. COROADINH. Production of Retroviral and Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges in the Manufacturing of Lipid Enveloped Virus. *Viral Gene Therapy*. *InTech*, 2011, 1-28.
- [20] COROADINHA, A. S., L. GAMA-NORTON, A. I. AMARAL, H. HAUSER, P. M. ALVES a P. E. CRUZ. Production of Retroviral Vectors: Review. *Current Gene Therapy*. 2010, **10**, 456-473.

- [21] MILONE, M. C. a U. O'DOHERTY. *Clinical use of lentiviral vectors*. *Leukemia*. 2018, **32**(7), 1529-1541
- [22] GOINS, W. F., D. M. KRISKY, J. B. WECHUCK, S. HUANG a J. C. GLORIOSO. Construction and Production of Recombinant Herpes Simplex Virus Vectors. *Gene Therapy Protocols*. 2008, **433**, 97-103.
- [23] SAITO, H., K. KITAGAWA, T. NAKA, S. SERADA a T. SHIRAKAWA. 117. Development of Novel Cancer Therapy Combination of Ad-SOCS Gene Therapy and LAK Cell Immunotherapy for the Treatment of Prostate Cancer. *Molecular Therapy*. 2016, **24**.
- [24] PETIOT, E., M. CUPERLOVIC-CULF, C.. F. SHEN a A. KAMEN. Influence of HEK293 metabolism on the production of viral vectors and vaccine. *Vaccine*. 2015, **33**(44), 5974-5981.
- [25] KIM, J. Y., Y. KIM a G. M. LEE. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, **93**(3), 917-930.
- [26] LOPES, A. G., T. S. CASTINEINAS, A. G. HITCHCOCK a D. C. SMITH. Cost-Effective Process Development for Plasmid DNA Manufacture: Evaluation of Single-Use Technologies to Support Escherichia coli Culture. *BioProcess International*. 2015, **13**(9).
- [27] WARNOCK, J. N., O. MERTEN a M. AL-RUBEAI. Cell Culture Processes for the Production of Viral Vectors for Gene Therapy Purposes. *Cytotechnology*. 2006, **50**(1-3), 141-162.
- [28] GAMA-NORTON, L., S. HERRMANN, R. SCHUCHT, et al. Retroviral Vector Performance in Defined Chromosomal Loci of Modular Packaging Cell Lines. *Human Gene Therapy*. 2010, **21**(8), 979-991.
- [29] BERDICHEVSKY, M., M.-P. GENTILE, B. HUGHES, P. MEIS, J. PELTIER, I. BLUMENTALS, J. AUNINS a N.E. ALTARAS. Establishment of Higher Passage PER.C6 Cells for Adenovirus Manufacture. *Biotechnology Progress*. 2008, **24**(1), 158-165.

- [30] FISCHER, S., R. HANDRICK a K. OTTE. The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnology Advances*. 2015, **33**(8), 1878-1896.
- [31] JAYAPAL, K. P., K. F. WLASCHIN, W. S. HU a M. G. S. YAP. Recombinant protein therapeutics from CHO Cells - 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*. 2007, **103**(10), 40-47.
- [32] KARIMFAR, M. H., R. M. FARAHANI, M. NOOROZIAN, M. S. KHORAMGAH, A. A. K. NIA, A. MOAIERI, H. AZIMI a H.-A. ABBASZADEH. Using transient transfected Chinese hamster ovary (CHO) cells by pET28a-LIC-NTF4 in gene therapy. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*. 2014, **1**(4), 34-41.
- [33] WANG, X., D. M. MORGAN, G. WANG a N. M. MOZIER. Residual DNA analysis in biologics development: Review of measurement and quantitation technologies and future directions. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, **109**(2), 307-317.
- [34] EL-GAYAR, K. E. Principles of recombinant protein production, extraction and purification from bacterial strains. *International Journal of Microbiology and Allied Sciences*. 2015, **2**(2), 18-33.
- [35] ANDRÉ, M., S. REGHIN, E. BOUSSARD, L. LEMPEREUR a S. MAISONNEUVE. Universal real-time PCR assay for quantitation and size evaluation of residual cell DNA in human viral vaccines. *Biologicals*. 2016, **44**, 139-149.
- [36] VALONES, M.A.A., et al. Principle and applications of polymerase chain reaction in medici diagnostic fields: A review. *Brazil Journal of Microbiology*. 2009, **40**(1) 1-11.
- [37] MAHEASWARI R., KSHIRSAGAR J. T., LAVANYA N. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *J Indian Soc Periodontol* 2016, **20**, 128-135.
- [38] JOSHI, M. a J. D. DESHPANDE. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*. 2010, (5), 81-97.
- [39] NAVARRO, E., G. SERRANO-HERAS, M. J. CASTAÑO a J. SOLERA. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 2015, **439**, 231–250.

- [40] HUSSAIN, M. A direct qPCR method for residual DNA quantification in monoclonal antibody drugs produced in CHO cells. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, **115**, 603-606.
- [41] PEPER, G., A. FANKHAUSER, T. MERLIN, A. ROSCIC, M. HOFMANN a P. OBRDLIK. Direct real-time quantitative PCR for measurement of host-cell residual DNA in therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, **100**, 123-130.
- [42] BUSTIN, S. A., V. BENES, J. A. GARSON, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 2009, **55**(4), 611-622.
- [43] *Český lékopis: Pharmacopoea bohemica*. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [44] SUCHÁNEK, M. Kvalimetrie: 16. Statistické metody v metrologii a analytické chemii. Praha 6: EURACHEM-ČR, 2009. ISBN 80-86322-04-1.
- [45] KARLEN, Y., A. MCNAIR, S. PERSEGUERS, Ch. MAZZA a N. MERMOD. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*. 2007, **8**(1).
- [46] NISSOM, P. M. Specific detection of residual CHO host cell DNA by real-time PCR. *Biologicals*. 2007, **35**, 211-215.

ZDROJE OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

- [1] WANG, D. a G. GAO. State-of-the-art human gene therapy: Part I. gene delivery technologies. *Discovery Medicine*. 2014, **18**(97), 67-77.
- [2] WARNOCK, J. N., C. DAIGRE a M. AL-RUBEAI. Introduction to Viral Vectors. *Viral Vectors for Gene Therapy*. 2011, **737**, 1-25.
- [3] LABIOTECH. *Viral vectors*. [online]. [cit.2018-11-11]. Dostupné z: <https://labiotech.eu/medical/german-biotech-cevec-viral-vectors-rca-free-gene-therapy/>
- [4] LEE, C. S., E. S. BISHOP, R. ZHANG, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases*. 2017, **4**(2), 43-63.
- [5] CHEN, H. Adeno-associated virus vectors for human gene therapy. *World Journal of Medical Genetics*. 2015, **5**(3).
- [6] JAYAPAL, K. P., K. F. WLASCHIN, W. S. HU a M. G. S. YAP. Recombinant protein therapeutics from CHO Cells - 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*. 2007, **103**(10), 40-47.
- [7] GARIBYAN, L a N AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, **133**, 1-4.
- [8] SINO BIOLOGICAL. *SYBR Green Dye Method of qPCR*. [online]. [cit.2018-06-28]. Dostupné z: <http://www.sinobiological.com/sybr-green-qpcr-method-cro-service.html>
- [9] BIO-RAD. *Hydrolysis (TaqMan) Probes*. [online]. [cit.2018-06-28]. Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/introduction-pcr-primer-probe-chemistries?ID=LUSOJW3Q3>
- [10] Generi Biotech - Kit for isolation of DNA from tissues, Katalogové číslo 3101
- [11] PRIMER3 WWW PRIMER TOOL. [ONLINE]. [cit.2019-02-17]. Dostupné z: http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi